Journal of Vegetables Sciences, Autumn & Winter 2026, Vol 9, No 18(2), Pages 37-50

doi:10.22034/iuvs.2024.2027247.1363 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Effect of coating time with calcium chloride on encapsulation of Asparagus somatic embryos

Mohammad Sadegh Safarian-nezhad Nematabad[1], Seyyed Javad Mousavizadeh*[2], Mehdi Alizadeh[2], Mostafa Khoshhal Sarmast[2]

1-PhD candidate. Department of Horticultural Sciences and Landscape Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2-Associated Prof. Department of Horticultural Sciences and Landscape Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

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

(**Received:** 24 April 2024 **Revised:** 02 June 2024 **Accepted:** 07 June 2024)

Extended Abstract

1. **Introduction**: All the species belonging to the Asparagus subgenus are dioecious with the basic number of chromosomes (=10x), and the number of chromosomes varies depending on the type of species and due to changes in the ploidy level. Genotypes of Asparagus subgenus with chromosome number diploid (x2=20), triploid (x3=30), tetraploid (x4=40), pentaploid (x5=50), hexaploid (x6=60), octaploid (x8=80), decaploid (x10=100), and dodecaploid (x12=120) can be found. Asparagus is widely distributed in different climates of Iran. *Asparagus officinalis* L. is an edible herbaceous perennial dioecious crop species with different ploidy levels. One of the problems of asparagus production is the decrease in fertility due to the increase in ploidy levels, resulting in a reduction in seed production. The limitation of genetic resources in asparagus makes it necessary to use methods such as vegetative embryogenesis for the clonal propagation of this plant. One of the main uses of vegetative embryo is its use in artificial seed production. Hydrated artificial seeding was first achieved by coating alfalfa embryos. These seeds are prepared by encapsulating vegetative embryos or other vegetative organs of the plant in a hydrogel. So far, several methods have been used to produce artificial seeds, such as potassium alginate, sodium alginate, agar, gelrite, etc., among which the use of sodium alginate and calcium alginate has been introduced as the most successful methods.
2. **Materials and Methods:** The current research was carried out to encapsulate tissue culture-originated vegetative embryos. For this purpose, the seeds of *A. officinalis* L. with two different ploidy levels (diploid and octaploid) were prepared. After washing the seeds with water and detergent, the seeds were disinfected in 70% ethanol under a laminar hood for one minute and then placed in 30% sodium hypochlorite for 15 minutes. In the next step, the seeds were washed three times with sterile distilled water. Then they were established in the MS basic culture medium. The resulting seedlings were used for collecting five to seven-cm single-node explants. These single-node explants were cultured on B5 liquid media supplemented with 2 mg/L 2,4-D. Then they were kept in the axophyton device for 14 days in the induction phase. Afterwards, the explants were grown in B5 media without 2-4-D. After the emergence of vegetative embryos, the embryos were encapsulated using 2% sodium alginate in half-strength B5 medium containing 1 ppm of Kinetin. To harden the coverings of somatic embryos, a 100 mM calcium chloride solution was applied at three different time points of 30, 40, and 60 minutes.
3. **Results and Discussion:** The lowest and highest percentage of germination rate among artificial seeds with Kinetin was recorded as T40 (25.2) and T30 (39.9), respectively. Also, the lowest and highest percentage of germination rate among artificial seeds without Kinetin was observed in C40 (21.7) and C60 (47.3), respectively. The comparison of the average data on the germination speed between the mutual effects of mass and encapsulation treatment showed that the highest rate was related to the diploid seedlings obtained from artificial seeds treated with Kinetin, with a time of 60 minutes (AO6T60), as 14.4, and the lowest rate was related to the diploid mother plant (AO6P), as 9.7. Comparison of the average data of the effects of encapsulation treatment related to the average time required for germination shows that the highest was related to the 30-minute treatment (c30), as 8.1, and the lowest was related to the c40 treatment, as 2.4, and no significant difference was observed between the other treatments ($p>0.05$). Comparison of the average effects of encapsulation treatment in terms of length and number of stems shows that the longest stem length after the mother seedlings was related to Kinetin treatment 30 minutes (T30), as 6.8 cm, and this result was also observed for the trait number of stems. The lowest value of these traits was observed in the C60 treatment, as 4.61 cm for stem length and the C30 treatment for stem number (4 numbers). The results of the average comparison between two plant populations show that the highest amount of carotenoid, total chlorophyll, chlorophyll a, and chlorophyll b is related to octaploid plants. Based on the results of comparing the averages

related to the encapsulation treatment, the highest amount of carotenoids was observed for 40 minutes with kinetin (T40) as 1.69 (mg/g fresh weight), and the lowest was observed for 40 minutes without Kinetin (C40) as 1.09 (mg/g fresh weight). In terms of chlorophyll b and total chlorophyll, the highest amount was observed in the mother seedlings, and the lowest was observed for chlorophyll b in C40 treatment as 1.02 (mg/g fresh weight) and for total chlorophyll in T30 treatment as 1.08 (mg/g fresh weight).

4. **Conclusion**: The results of the comparison of the averages related to the mutual effects between plant mass and encapsulation treatments showed that in terms of carotenoid, chlorophyll b and total chlorophyll, the highest amount was related to the octaploid seedlings obtained from artificial seeds without 60 minutes Kinetin, and the lowest amount of carotenoid was related to the diploid seedlings obtained from artificial seeds with 60 minutes Kinetin, and in terms of chlorophyll b, it corresponded to diploid seedlings obtained from artificial seeds without 60 minutes Kinetin, and in terms of total chlorophyll, corresponding to diploid seedlings obtained from synthetic seeds without 40 minutes Kinetin.

***Keywords*:** Sodium alginate, Octaploid, Diploid, Explant, Culture medium

Citation: Safarian-nezhad Nematabad, M.S., Mousavizadeh, S.J., Alizadeh, M., & Khoshhal Sarmast, M. (2026). Effect of coating time with calcium chloride on encapsulation of Asparagus somatic embryos. *Journal of Vegetables Sciences*, 18(2), 37-50. doi:10.22034/iuvs.2024.2027247.1363

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 ۹ ، دوره ۱۸، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۴، صفحات (۵۰-۳۷)

شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi:10.22034/iuvs.2024.2027247.1363

تأثیر مدت زمان پوشش‌دهی با کلریدکلسیم بر کپسوله‌کردن جنین‌های رویشی مارچوبه

محمدصادق صفریان‌نژاد نعمت‌آباد[۱]، سید جواد موسوی زاده*[۲]، مهدی علیزاده[۲]، مصطفی خوشحال‌سرمست[۲]

۱- دانشجوی دکتری گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: mousavizadeh@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۸)

چکیده

مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) یک محصول چندساله علفی خوراکی، دوپایه و با سطوح پلوئیدی مختلف می‌باشد. از مشکلات مارچوبه کاهش باروری به دلیل افزایش سطوح پلوئیدی و به دنبال آن کاهش تولید بذر می‌باشد. به دلیل محدود بودن منبع ژنتیکی مارچوبه، به‌کارگیری روش‌هایی مانند جنین‌زایی رویشی، برای ازدیاد این گیاه ضروری می‌باشد. یکی از اصلی‌ترین استفاده‌های جنین رویشی، کاربرد آن در تولید بذر مصنوعی است. پژوهش حاضر با هدف کپسوله کردن جنین‌های رویشی حاصل از گیاهچه‌های کشت بافتی مارچوبه انجام گرفته است. بدین منظور بذرهای گونه *A. officinalis* L. با دو سطح پلوئیدی دیپلوئید و اکتاپلوئید تهیه گردید. سپس در محیط کشت پایه MS کشت شدند. از گیاهچه‌های حاصل، ریزنمونه‌های ۵ تا ۷ سانتیمتری حاوی یک گره را جدا کرده و در محیط B5 مایع حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2-4-D قرار داده شدند. سپس در دستگاه آکسوفیتون به مدت ۱۴ روز در فاز القا نگهداری شدند. پس از آن ریزنمونه‌ها در محیط کشت B5 مایع فاقد 2-4-D واکشت شدند. پس از ظهور جنین‌های رویشی، کپسوله کردن جنین‌ها با استفاده از آلژینات سدیم دو درصد در محیط $\frac{1}{2}$B5 حاوی یک میلی‌گرم در لیتر کینتین انجام شد. جهت سخت شدن پوشش جنین‌های رویشی از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدکلسیم در سه تیمار زمانی ۳۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه استفاده شد. کمترین و بالاترین مقادیر درصد جوانه‌زنی برای تیمارهای زمانی با کینتین به ترتیب T40 (۲/ ۲۵ ٪) و T30 (۳۹/۹ ٪) و برای تیمارهای بدون کینتین به ترتیب C40 (۲۱/۷ ٪) و C60 (۴۷/۳ ٪) بود.

***واژه‌های کلیدی*: آلژینات سدیم، اکتاپلوئید، دیپلوئید، ریزنمونه، محیط کشت.**

استناد: صفریان‌نژاد نعمت‌آباد، م.ص.، موسوی زاده، س.ج.، علیزاده، م.، و خوشحال‌سرمست، م. (۱۴۰۴). تأثیر مدت زمان پوشش‌دهی با کلریدکلسیم بر کپسوله‌کردن جنین‌های رویشی مارچوبه. علوم سبزی‌ها، ۱۸(۲)، ۵۰-۳۷.

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

جنس مارچوبه (*Asparagus*) متعلق به تیره مارچوبگان (Asparagaceae) است. این جنس به طور تقریبی دربردارنده ۳۰۰ گونه است. جنس مارچوبه بومی اروپا، آفریقای شمالی و آسیای غربی است (Bentz *et al.*, 2024). تمام گونه‌های متعلق به زیرجنس *Asparagus* دوپایه با تعداد پایه کروموزوم (x=۱۰) هستند و تعداد کروموزوم بسته به نوع گونه و ناشی از تغییرات سطح پلوئیدی متغیر است. ژنوتیپ‌های زیرجنس *Asparagus* با تعداد کروموزوم دیپلوئید (۲x=۲۰)، تریپلوئید (۳x=۳۰)، تتراپلوئید (۴x=۴۰)، پنتاپلوئید (۵x=۵۰)، هگزاپلوئید (۶x=۶۰)، اوکتاپلوئید (۸x=۸۰)، دکاپلوئید (۱۰x=۱۰۰) و دودکاپلوئید (۱۲x=۱۲۰) می‌توانند یافت شوند (Ranjbar *et al.*, 2020). بیان شده است که همین تغییرات پلوئیدی که به صورت پیوسته در گیاهان این جنس رخ می‌دهد می‌تواند راهبرد تکاملی این جنس باشد (Mousavizadeh *et al.*, 2016). مارچوبه در اقلیم‌های مختلف ایران نیز پراکنش گسترده‌ای دارد. تاکنون از این جنس پنج گونه علفی دائمی شامل *A. officinalis*، *A. persicus*، *A. verticillatus*، *A. breslerianus* شناسایی و گزارش شده است که ارزشمندترین و متداول‌ترین گونه این جنس مارچوبه باغی *A. officinalis* است (Mousavizadeh *et al.*, 2017; Khormali *et al.*, 2020).

مارچوبه به صورت رویشی از طریق تقسیم ریزوم‌های گیاه به منظور فراهم‌کردن تعداد محدودی از نسخه‌های کلونال از ژنوتیپ‌های منتخب تکثیر داده می‌شود اما این روش‌ها علاوه بر هزینه بالا، دارای خطر بهداشتی گسترش بیماری‌ها (مانند *Fusarium sp.*) به جمعیت‌های جدید است (Encina & Regalado, 2022). دوپایه‌بودن مارچوبه و افزایش سطوح پلوئیدی تکثیر جنسی این گونه را سخت می‌سازد. تلاقی بین گونه‌ای نیز به دلیل موانعی همچون عدم سازگاری بین گونه‌ای به شدت مشکل است. از همین رو استفاده از روش‌های زیست‌فناوری مانند جنین‌زایی رویشی (Somatic embryos) می‌تواند راهکاری مناسب جهت فائق آمدن بر این محدودیت‌ها باشد (Encina & Regalado, 2022). جنین‌زایی رویشی حاصل از تشکیل رویان از سلول غیرجنسی در شرایط آزمایشگاهی است که همانند جنین بذری قادر به نمو بوده و می‌تواند به گیاه کامل تبدیل شود. برتری جنین‌زایی رویشی نسبت به سایر روش‌های تکثیر غیرجنسی به این دلیل می‌باشد که روش مناسبی برای تکثیر کلون بوده و امکان تکثیر انبوه گیاهان وجود دارد (Poddar & Poddar, 2021). به طور معمول در کشت بافت، القای جنین‌های رویشی با تنظیم مقادیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کنترل می‌شود. در اکثر موارد پس از انتقال سلول‌ها از محیط کشت حاوی اکسین به محیط کشت مقادیر کمتر اکسین یا فاقد اکسین جنین‌زایی تحریک می‌شود. اکسین‌ها و به خصوص 2,4-D به‌عنوان اکسین مصنوعی، نقش روشنی در القای جنین رویشی در گیاهان مختلف ایفا می‌کنند و برای ایجاد جنین رویشی استفاده می‌شود (Lotfi *et al.*, 2022). یکی از کاربردهای اصلی جنین رویشی، استفاده آن در تولید بذر مصنوعی (Synthetic) است (Garg & Maheshwari, 2023).

در سال‌های اخیر علاقه زیادی متوجه تهیه بذرهای مصنوعی از طریق کپسوله‌کردن (Encapsulation) بذر یا سایر اندام‌های گیاه شده است که روشی مهم برای حفظ و تبادل ژرم‌پلاسم محسوب می‌گردد (Majumder *et al.*, 2023). تکنولوژی بذر مصنوعی از اهمیت فوق‌العاده‌ای در تولید انبوه گونه‌های گیاهی که در آنها تکثیر جنسی بذر دچار محدودیت‌هایی است، برخوردار است. اخیراً، جنین‌های رویشی در کپسوله‌کردن جهت تولید بذر مصنوعی به شدت مورد استفاده قرار گرفته‌اند و تلاش‌های زیادی برای کپسوله‌کردن اندام‌های غیرجنینی و سایر اندام‌های رویشی همچون جوانه‌های جانبی یا محوری (Axillary buds)، نوک ساقه‌ها و گره‌ها (nodal segments)، صورت گرفته است (Poddar & Poddar, 2021). بذرهای مصنوعی مشابه بذرهای طبیعی هستند که در

آن جنین‌های رویشی با یک یا بیش از یک لایه مصنوعی پوشیده شده‌اند که در نهایت باعث می‌شود شبیه کپسول به نظر برسند. جنین‌های کپسوله‌شده می‌تواند با اهداف حفاظتی از ژرم‌پلاسم‌های مهمی همچون گیاهان در معرض خطر انقراض یا گیاهان با محدودیت تکثیر جنسی مورد استفاده قرار بگیرد. این جنین‌ها همچنین فرایند تبادل مواد مابین مراکز تحقیقاتی در سراسر جهان را تسهیل می‌کنند (Majumder *et al*., 2023). بذر مصنوعی به صورت هیدراته‌شده اولین‌بار از طریق روکش‌کردن جنین‌های یونجه انجام شد. این بذرها از طریق کپسوله‌کردن جنین‌های رویشی یا سایر اندام‌های رویشی گیاه در هیدروژل تهیه می‌شوند. تاکنون روش‌های متعددی برای تولید بذر مصنوعی همچون پتاسیم‌آلژینات، سدیم‌آلژینات، آگار، ژلریت و غیره مورد استفاده قرار گرفته است که در بین آنها استفاده از سدیم‌آلژینات و کلسیم‌آلژینات به عنوان موفقیت آمیزترین روش‌ها معرفی شده‌اند (Abbas *et al*., 2022). در بین ژل‌های استفاده شده در کپسوله‌سازی مانند موارد ذکر شده، کپسول‌های آلژینات به دلیل برخورداری ویژگی‌هایی همچون خصوصیات برتر یون، ویسکوزیته مطلوب، اثر سمی کم برای جنین، سرعت ژله‌ای شدن و امکان نگهداری طولانی‌مدت به عنوان بهترین روش برای کپسوله‌سازی جنین‌های سوماتیکی کاربرد دارند. آلژینات‌سدیم با قرارگیری در کلریدکلسیم به حالت جامد تبدیل می‌شود که این فرایند به دلیل جایگزینی یون‌های سدیم با کلسیم انجام می‌شود و آلژینات به حالت جامد تغییر می‌کند (Sarmah *et al*., 2010).

بذرهای مصنوعی، ریزنمونه‌های مصنوعی هر بافت مریستمی فعالی هستند که می‌توانند به یک گیاه کامل تبدیل شوند. و این توانایی را چه در شرایط آزمایشگاهی و چه خارج از شرایط آزمایشگاه، پس از نگهداری حفظ می‌کنند (Abbas *et al*., 2022). فناوری بذرهای مصنوعی برای حفظ و تکثیر گیاهان امیدوار کننده است، به ویژه برای گیاهان بدون دانه یا گیاهانی که بذر زنده تولید نمی‌کنند و برای حفظ ویژگی‌های مطلوب و برتر نیاز به تکثیر رویشی دارند. این فناوری مزایای زیادی از جمله کاهش هزینه و فضا، سهولت کار، حفظ ژرم پلاسم گیاهان کمیاب و مهم اقتصادی، تکثیر مستقل و پیوسته و مستقل فصلی گونه‌های گیاهی برتر از نظر ژنتیک پایدار و تبادل ژرم پلاسم بین کشورها را ارائه می‌کند (Abbas *et al*., 2022; Garg & Maheshwari, 2023). تولید بذرمصنوعی به طور موفقیت‌آمیزی روی انواع گیاهان و محصولات باغی و مهم تجاری از جمله محصولات سبزی استفاده شده است (Sarmah *et al*., 2010). Abbasi و همکاران، (۲۰۲۰) ذکر کردند که جوانه‌های راسی گیاه مارچوبه و جنین‌های سوماتیک حاصل از کشت ساقه، پتانسیل مورد استفاده برای تولید بذرهای مصنوعی در شرایط آزمایشگاهی را دارند. آنها دریافتند که بذرهای مصنوعی رشد یافته در محیط MS با سرعت بیشتری نسبت به دانه های رشد یافته در محیط $\frac{1}{2}$ MS جوانه می‌زنند و به نهال تبدیل می‌شوند. ماتریس ژل ایجاد شده توسط کمپلکس ۲ درصد آلژینات‌سدیم و ۱۰۰ میلی مولار کلریدکلسیم کارآمدترین روش برای کپسوله‌کردن نوک شاخه گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی است (Oceania *et al*., 2015). تولید و استفاده از بذرهای مصنوعی برای تکثیر سیب زمینی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی کپسوله‌سازی ریزنمونه‌های مختلف سیب‌زمینی (مانند جنین‌های سوماتیک، بخش‌های گرهی، نوک شاخه‌ها و کشت‌های سوسپانسیون سلولی) و تخمین عملکرد گیاهان رشد یافته از بذرهای مصنوعی (Schafer-menuhr *et al*., 2003) انجام شده است.

با وجود تحقیقات موفق در زمینه تولید بذرهای مصنوعی در گیاهان، اما مدت زمان پوشش دهی با کلریدکلسیم برای سخت شدن جنین‌های کپسوله شده به خوبی مشخص نشده است. لذا هدف از تحقیق حاضر، ضمن تولید جنین‌های رویشی در مارچوبه با دو سطح پلوئیدی دیپلوئید و اکتاپلوئید، بررسی تأثیر مدت زمان

پوشش‌دهی با کلریدکلسیم بر کپسوله کردن جنین‌های رویشی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طرح حاضر در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان در سال‌های ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۲ انجام شده است.

مواد گیاهی

بذرهای گونه *A. officinalis* L. در دو سطح دیپلوئید و اکتاپلوئید بومی ایران تهیه گردید (Mousavizadeh *et al*., 2016). پس از شستشوی بذرها با آب و مایع شوینده، در زیر هود لامینار بذرها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (کلر فعال ۲ درصد) قرار داده شد. بذرها در مرحله بعد با آب مقطر استریل، سه نوبت آبشویی شدند (Lotfi *et al*., 2021) و سپس در محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) کشت شدند. سپس بذرها در اتاقک کشت قرار داده شد. پس از گذشت ۱۴ روز بذرها جوانه زدند. از گیاهان تشکیل شده از بذر طبیعی (والدین مادری(p)) برای تولید جنین رویشی استفاده شد (شکل. ۱a).

القای جنین‌زایی رویشی

از گیاهچه‌های تولید شده ریزنمونه های ۵ تا ۷ سانتیمتری ساقه حاوی یک گره (Mousavizadeh *et al*., 2017) با پنس و قیچی استریل جدا شد و در محیط B5 (Gamburg *et al*., 1968) مایع حاوی 2,4-D با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شدند و در آکسوفیتون (Auxophyton Steward) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰ لوکس توسط لامپ‌های فلورسنت) نگهداری شدند (شکل. ۱b). پس از گذشت ۱۴ روز ریزنمونه‌ها پس از ۳ نوبت آبشویی (۵، ۳ و ۱ دقیقه) شستشو با محیط کشت مایع استریل، به محیط کشت B5 مایع فاقد 2,4-D منتقل شدند و بعد از گذشت سه هفته در زیر بینی‌کولار با بزرگ نمایی ۴۰ جنین‌هایی (شکل. ۱c) که در مرحله دوقطبی بودند برای تولید بذر مصنوعی انتخاب شدند (Lotfi *et al*., 2021).

کپسوله کردن جنین‌ها

فرایند کپسوله‌کردن برای جنین‌های رویشی با بکارگیری سدیم‌آلژینات (۲ درصد) به همراه محیط کشت $\frac{1}{2}$ B5 فاقد هورمون کینتین به عنوان شاهد و سدیم‌آلژینات ۲ درصد (آلژینیک‌اسید نمک سدیم از جلبک قهوه‌ای) به همراه محیط کشت $\frac{1}{2}$ B5 حاوی کینتین با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، با قلیاییت ۵/۸ (pH) انجام شد. جهت سخت‌شدن از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار کلرایدکلسیم با آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. به این صورت که جنین‌های انتخاب شده داخل یک پتری‌دیش قرار داده شدند و سپس با محلول آلژینات‌سدیم مخلوط شدند و بعد از آن با سرنگ ۵۰ سی‌سی به صورت قطره‌ای که در مرکز آن جنین وجود دارد در محلول کلریدکلسیم غوطه‌ور شدند. در سه تیمار زمانی به مدت ۳۰، ۴۰ و۶۰ دقیقه روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه به همان صورت نگهداری شدند. پس از گذشت این مراحل، قطرات چکانده‌شده که حاوی جنین بودند سخت شده و بذر مصنوعی شکل گرفت (شکل.۱d). در مرحله بعد بذرها با آب مقطر پاکسازی شده و در محیط $\frac{1}{2}$ B5 جامد فاقد هورمون کشت شدند (شکل. ۱e). مراحل کپسوله‌کردن به صورت کامل تحت هود لامینار انجام گرفت (Feyzi *et al*., 2017).

ارزیابی خصوصیات جوانه‌زنی بذور مصنوعی و شاخص‌های رشدی

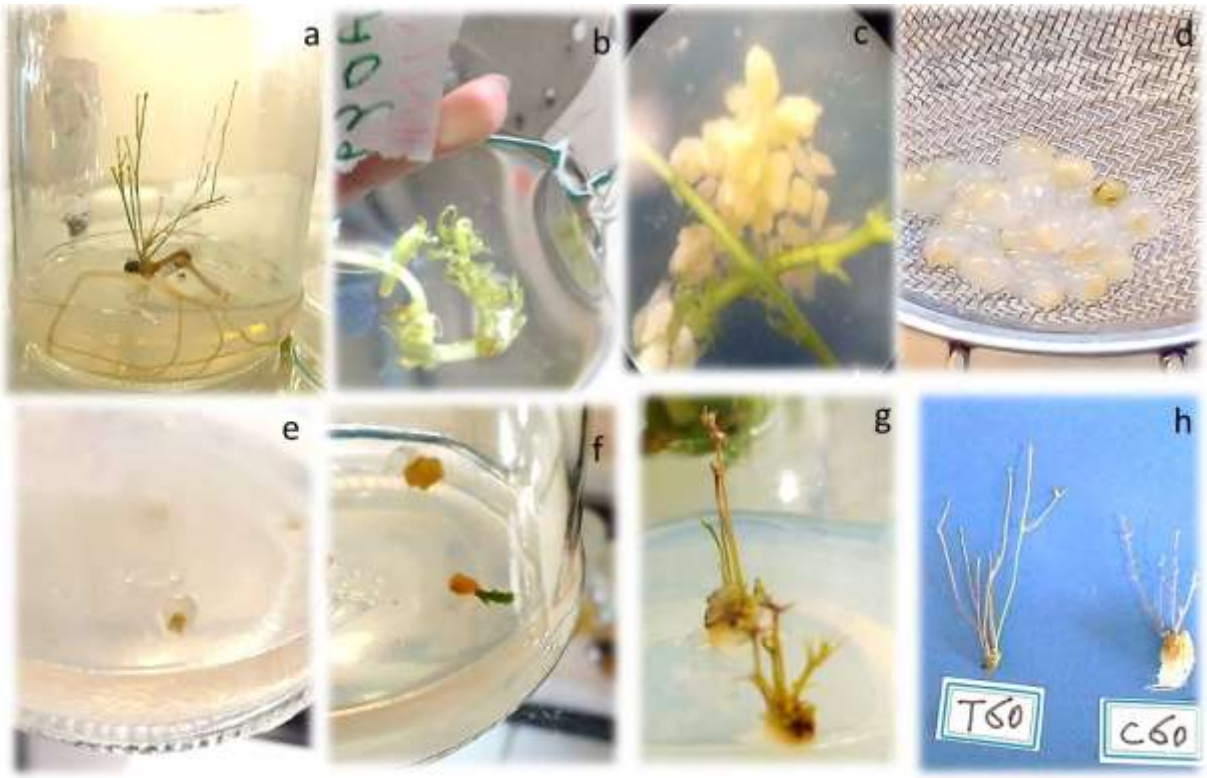
بعد از جوانه‌زدن بذور مصنوعی، صفات درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و میانگین زمان لازم برای جوانه‌زنی به ترتیب با استفاده از رابطه‌های ۱، ۲ و ۳ محاسبه گردید .همچنین بعد از رسیدن گیاهچه‌ها به اندازه مطلوب، ویژگی‌های رشدی شامل برگ‌ها، تعداد گره‌ها و زمان ظهور جوانه‌های قابل روئیت طی مراحل اولیه رویشی گیاه پایش گردید. صفات ریخت‌شناسی گیاهچه‌ها شامل ارتفاع ساقه و طول ریشه با خط‌کش اندازه‌گیری شد و

تعداد ساقه و ریشه به ازای هر گیاه شمارش گردید (Lotfi *et al*., 2021).

۱) $\frac{\text{تعداد بذرها جوانه‌زده}}{\text{تعداد کل بذرهای کاشته شده}} \times 100$

۲) $\frac{\text{مجموع درصد جوانه‌زنی روزانه}}{\text{روز}}$

۳) $\frac{\text{تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز}}{\text{مجموع تعداد بذرها}}$



شکل ۱- مراحل کشت بذر مادری مارچوبه، القای جنین رویشی، کپسوله کردن جنین های رویشی و جوانه زنی بذرهای مصنوعی. a=گیاهچه حاصل از بذر طبیعی در محیط کشت MS جامد، b=نمونه گیاهی در مرحله القاء جنین در محیط کشت B5 مایع حاوی توفوردی با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر، c= ظهور جنین‌های رویشی در محیط کشت مایع B5 فاقد هورمون، d=جنین‌های کپسوله شده، e= بذر مصنوعی کشت شده در محیط کشت B5 $\frac{1}{2}$ جامد، f= بذرمصنوعی در حال جوانه‌زنی، g= گیاهچه‌های اُکتاپلوئید حاصل از بذر مصنوعی در محیط کشت B5 $\frac{1}{2}$ جامد، h=گیاهچه‌های دیپلوئید حاصل از بذر مصنوعی دارای کینتین در آندوسپرم اطراف جنین (T60) و آندوسپرم فاقد کینتین در اطراف جنین (C60).

Figure 1- Asparagus maternal seed cultivation stages, induction of vegetative embryos, encapsulation of vegetative embryos and germination of artificial seeds.
a = plant obtained from natural seed in solid MS culture medium, b = plant sample in embryo induction stage in liquid B5 culture medium containing 2,4-D with 2 PPM concentration, c = emergence of vegetative embryos in hormone-free B5 liquid culture medium, d = encapsulated embryos, e = artificial seed grown in solid B5 1/2 culture medium, f = germinating artificial seed, g = octaploid seedlings obtained from artificial seed in solid B5 1/2 culture medium, g = diploid plantlets obtained from artificial seed with kinetin in endosperm around the embryo (T60) and endosperm without kinetin around the embryo (C60)

اندازه‌گیری رنگدانه

از روش Barnes و همکاران (۱۹۹۲) برای محاسبه غلظت کلروفیل در نمونه‌های مارچوبه استفاده شد. میزان جذب محلول به‌دست آمده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ قرائت شد. پس از آن مقدار کلروفیل a، b و کل بترتیب با استفاده از رابطه‌های ۴، ۵ و ۶ برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید. همچنین برای اندازه‌گیری غلظت کارتنوئید، در طول موج‌های ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر قرائت

شد. مقدار کارتنوئید با استفاده از رابطه ۷ برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد.

۴) Chl a (mg/g.fw) = 12.7(A663) – 2.69(A645) ×V/1000×W

۵) Chl b (mg/g.fw) = 22.9(A645) – 4.68(A663) ×V/1000×W

۶) Chl total (mg/g.fw) = 20.2(A645) + 8.02(A663) ×V/1000×W

۷) Car (mg/g.fw) = 7.6(A470) – 1.49(A510) ×V/1000×W

A = طول موج، V = حجم نهایی محلول، FW = وزن تر نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول سطح پلوئیدی مارچوبه گونه *A. officinalis* L. در دو سطح دیپلوئید و اکتاپلوئید بومی ایران (گیاهان حاصل از بذر طبیعی(p)) بود و فاکتور دوم مدت زمان پوشش‌دهی با کلریدکلسیم (۳۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه) در دو حالت با و بدون کینتین بود. آنالیز داده‌ها، توسط نرم‌افزار SAS var 9.1 (۲۰۰۱) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر (جدول ۱) نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به والدین (p) ۷۲/۱ درصد می‌باشد. در بین بذرهای مصنوعی بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار ۶۰ دقیقه بدون کینتین (c60) ۴۷/۳ درصد بود (شکل. ۱h) و کمترین آن مربوط به تیمار زمانی ۴۰ دقیقه بدون کینتین (c40) ۲۱/۷ درصد است (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها تیمار کپسوله کردن نشان می‌دهد که بیشترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار زمانی ۴۰ دقیقه بدون کینتین (c40) ۱۸/۲ درصد در روز است و کمترین آن مربوط به والدین (p) ۱۰/۳ درصد در روز بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌های مربوط به سرعت جوانه‌زنی بین اثرات متقابل توده و تیمار کپسوله کردن نشان داد که بیشترین آن ۱۴/۴ درصد در روز مربوط به گیاهچه‌های دیپلوئید حاصل از بذر مصنوعی تیمارشده با کینتین با زمان ۶۰ دقیقه بود (AO6T60) (شکل. ۱h) و کمترین آن ۹/۷ درصد در روز مربوط به گیاه مادری دیپلوئید (AO6P) بود (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات گیاهی در اثر تیمار کپسوله کردن.

Table 1- Comparison of the average main effects of encapsulation treatment.

تیمارها Treatments	سرعت جوانه زنی Germination rate (G%/day)	درصد جوانه زنی Germination percentage (%)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b b (mg/g) Chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid (mg/g)	تعداد ریشه چه Root number	تعداد ساقه Stem number	طول ریشه Root length (cm)	طول ساقه Stem length (cm)	میانگین زمان لازم جوانه زنی (تعداد جوانه‌زنی در روز)
p	10.3^{c}	72.18^{a}	1.34^{a}	1.39^{a}	1.51^{ab}	14.16^{a}	10.83^{a}	17.16^{a}	8.45^{a}	7.49^{a}
C30	15.88^{ab}	45.49^{b}	1.14^{ab}	1.29^{a}	1.50^{ab}	3.83^{bc}	4^{d}	1.5^{b}	6.35^{bc}	8.14^{a}
T30	17.5^{ab}	39.90^{c}	1.08^{ab}	1.22^{ab}	1.24^{bc}	3.33^{c}	7.83^{b}	1.1^{b}	6.86^{ab}	7.6^{a}
C40	18.2^{a}	21.77^{c}	0.90^{b}	1.02^{b}	1.09^{c}	3.83^{bc}	4.16^{d}	1.36^{b}	5.85^{bc}	2.47^{b}
T40	15.82a^{b}	25.25^{bc}	1.17^{ab}	1.33^{a}	1.69^{a}	3.33^{c}	7.16^{bc}	1.23^{b}	6.83^{ab}	4.44^{ab}
C60	14.54^{b}	47.33^{b}	1.25^{ab}	1.36^{a}	1.53^{ab}	5.66^{b}	5.16^{dc}	1.81^{b}	4.61^{c}	7.89^{a}
T60	17.32^{ab}	37.02^{bc}	1.10^{ab}	1.21^{ab}	1.43^{ab}	4.33^{bc}	7.5^{bc}	1.31^{b}	4.83^{c}	6.42^{a}

P=گیاهان مادری، C30 = ۳۰ دقیقه ، T30= کینتین ۳۰ دقیقه، C40 = ۴۰دقیقه، T40= کینتین ۴۰ دقیقه، C60 = ۶۰ دقیقه ، T60= کینتین ۶۰ دقیقه.

P = mother plants, C30 = 30 minutes, T30 = kinetin 30 minutes, C40 = 40 minutes, T40 = kinetin 40 minutes, C60 = 60 minutes, T60 = kinetin 60 minutes.

مقایسه میانگین داده‌های اثرات تیمار کپسوله کردن مربوط به میانگین زمان لازم برای جوانه زنی نشان می‌دهد که بیشترین آن مربوط به تیمار ۳۰ دقیقه (c30) می‌باشد و کمترین آن متعلق به تیمار c40 بود و اختلاف معنی‌دار بین سایر تیمارها مشاهده نشد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات تیمار کپسوله کردن از نظر طول و تعداد ساقه نشان می‌دهد که بیشترین طول ساقه پس از گیاهچه‌های مادری مربوط به تیمار کینتین ۳۰ دقیقه (T30) بود و برای صفت تعداد ساقه نیز این نتیجه مشاهده گردید. کمترین مقدار این صفات در تیمار C60 برای طول ساقه و تیمار C30 برای تعداد ساقه مشاهده شد (جدول ۱).

در مطالعه‌ای روی گیاه بریش (*Hyparrhenia hirta* L.) توسط Pirozi و همکاران (۲۰۲۰) عنوان شد، بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین‌های کپسوله شده در تیمار زمانی ۴۰ دقیقه در محلول کلریدکلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار روی شیکر بوده است که با نتایج این آزمایش مغایرت دارد. Soni و Sharma (۲۰۱۷) گزارش کردند که تولید بذر مصنوعی در مارچوبه دارویی (*A. racemosus*) امکان پذیر است و ۹۴/۹ درصد بذرهای تولید شده جوانه زدند و به گیاهچه تبدیل شده‌اند. بر اساس تحقیقاتی مشخص شد از جمله عواملی که در نفوذپذیری، مقاومت و سختی بذرهای مصنوعی کاج نقش بسزایی دارد زمان قرار گیری در محلول کلریدکلسیم می‌باشد (Malabadi & Staden, 2005). مدت زمان قرار گرفتن در معرض کلریدکلسیم در طول فرآیند سخت شدن به طور قابل توجهی بر درصد جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده *Vigna aconitifolia* تأثیر گذاشت (Malabadi & Nataraja, 2002). بر اساس نتایج Iqbal و همکاران (۲۰۱۹) ثابت شد که کیفیت بذرهای مصنوعی مستقل از مدت زمان تیمار با آلژینات‌سدیم است، در حالی که ۱۵ دقیقه تیمار با محلول کلریدکلسیم ۱۰۰ میلی مولار بر کیفیت بذرهای مصنوعی تأثیر می‌گذارد و بذرهایی با کیفیت بهتر تولید می‌کند و کاهش زمان تیمار با محلول کلریدکلسیم (۱۰ دقیقه) منجر به تشکیل دانه های ظریف و شکننده می‌شود. که در پژوهش حاضر نیز این نتایج کاملا ثابت گردید. Sarmah و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد کردند که از بین غلظت‌های مختلف آلژینات‌سدیم ، غلظت ۳ ٪ با قرار گرفتن در معرض محلول ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدکلسیم به‌مدت ۳۰ دقیقه، دانه‌های سفت، شفاف، گرد و یکنواخت‌تر تولید می‌کند. Bekheet (۲۰۰۶) گزارش داد که آلژینات‌سدیم ۳ ٪ به عنوان ماتریکس ژل بالاترین میزان بقای جنین و تبدیل به گیاهچه را نشان داد. او همچنین نشان داد که ۳۰ دقیقه بهترین زمان قرار گرفتن در معرض کلریدکلسیم برای سخت شدن بذرهای مصنوعی می‌باشد. Zare و همکاران (۲۰۰۷) بیان نمودند که کینتین با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر روی گندم، سبب افزایش طول ساقه‌چه و افزایش نسبت طول ساقه‌چه به ریشه‌چه گردیده است. در تحقیقی بیان شد که کاربرد سیتوکنین‌ها از جمله کینتین می‌تواند سبب افزایش شاخساره می‌شود (Carelli & Echeverrigaray, 2002).

نتایج مقایسه میانگین اثرات تیمار کپسوله کردن نشان می‌دهد بیشترین طول ریشه مربوط به گیاهچه‌های مادری می‌باشد و در بین تیمارهای کپسوله کردن بیشترین آن مربوط به تیمار شاهد ۶۰ دقیقه روی شیکر می‌باشد (C60) که از لحاظ آماری همه‌ی تیمارهای کپسوله شده با هم برابرند (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل بین توده گیاهی و کپسوله‌کردن نشان داد که اختلافی بین تیمارهای کپسوله شده از نظر طول ریشه در بین هر دو توده گیاهی وجود ندارد اما بین گیاهان مادری دیپلوئید (AO6) و اُکتاپلوئید (AO3) اختلاف از نظر طول ریشه وجود داشت که بیشترین آن مربوط به گونه دیپلوئید است (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل توده گیاهی در تیمار کپسوله کردن.

Table3- Comparison of the average interaction effects of plant accession with encapsulation.

تیمارها Treatments	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کارتنوئید Carotenoid (mg/g)	طول ریشه root length (cm)	سرعت جوانه‌زنی Germination rate (G%/day)
AO6P	2.28^{b}	0.79^{d}	0.94^{cd}	23.33^{a}	9.76^{e}
AO6C30	1.41^{b}	0.31^{e}	0.74^{d}	1.16^{c}	13.56^{cde}
AO6T30	1.49^{b}	0.29^{e}	0.97^{cd}	1.06^{c}	13.56^{ebcd}
AO6C40	1.20^{b}	0.25^{e}	0.86^{cd}	1.53^{c}	19^{ab}
AO6T40	1.38^{b}	0.33^{e}	1.15^{bcd}	1.21^{c}	18.65^{abc}
AO6C60	1.35^{b}	0.34^{e}	0.69^{d}	2.03^{c}	16.43^{abcd}
AO6T60	1.24^{b}	0.31^{e}	0.64^{d}	1.42^{c}	14.40^{bcde}
AO3P	5.08^{a}	1.99^{bc}	2.08^{a}	14^{b}	10.83^{e}
AO3C30	4.9 ^{a}	2.27^{ab}	2.21^{a}	1.86^{c}	18.20^{abc}
AO3T30	4.78^{a}	2.15^{ab}	1.01^{b}	1.16^{c}	18.41^{abc}
AO3C40	4.49^{a}	1.80^{c}	1.23^{bc}	1.20^{c}	17.45^{abcd}
AO3T40	4.76^{a}	2.33^{a}	2.22^{a}	1.26^{c}	19de
AO3C60	5.05^{a}	2.38^{a}	2.37^{a}	1.60^{c}	12.65^{ed}
AO3T60	5.06^{a}	2.10^{abc}	2.21^{a}	1.23^{c}	20.25 ^{a}

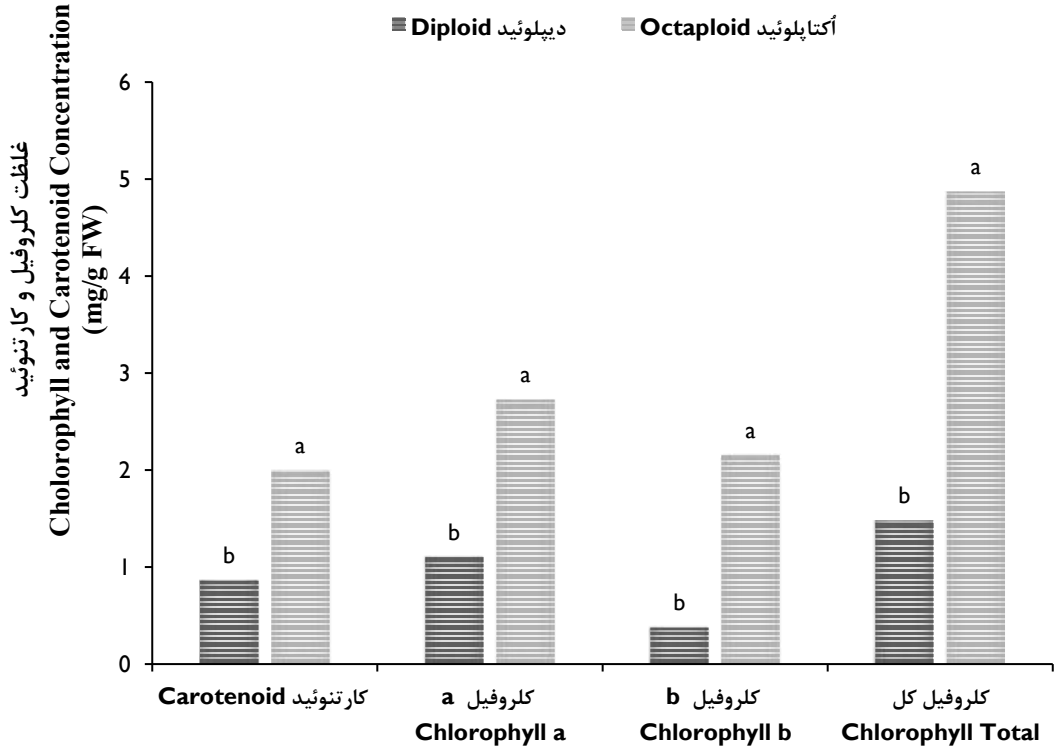
AO6= گیاهان دیپلوئید، AO3= گیاهان اُکتاپلوئید، P=گیاهان مادری، C30 = ۳۰دقیقه ، T30= کینتین ۳۰ دقیقه، C40 =0 ۴۰ دقیقه، T40= کینتین ۴۰ دقیقه، C60 = ۶۰ دقیقه ، T60= کینتین ۶۰ دقیقه.

AO6= Diploid Plants, AO3= Octaploid Plants, P = mother plants, C30 = 30 minutes, T30 = kinetin 30 minutes, C40 = 40 minutes, T40 = kinetin 40 minutes, C60 = 60 minutes, T60 = kinetin 60 minutes.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج مقایسه میانگین بین دو توده گیاهی نشان می‌دهد که بیشترین مقدار کارتنوئید، کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b مربوط به گیاهان اُکتاپلوئید می‌باشد (شکل ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها مربوط به تیمار کپسوله کردن بیشترین مقدار کارتنوئید مربوط به زمان ۴۰ دقیقه با کینتین (T40) بود و کمترین آن مربوط به ۴۰ دقیقه بدون کینتین (C40) مشاهده شد. از نظر کلروفیل b و کلروفیل کل بیشترین مقدار آن در گیاهچه‌های مادری مشاهده شد و کمترین آن برای کلروفیل b تیمار C40 و برای کلروفیل کل تیمار T30 مشاهده شد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل بین توده گیاهی و تیمارهای کپسوله کردن نشان داد که بیشترین مقدار کارتنوئید، کلروفیل b و کلروفیل کل مربوط به گیاهچه‌های AO3C60 بود. کمترین مقدار کارتنوئید مربوط به گیاهچه‌های AO6T60 و کمترین مقدار کلروفیل b مربوط به گیاهچه‌های AO6C60 بود. از نظر کلروفیل کل کمترین مقدار مربوط به گیاهچه‌های AO6C40 بود (جدول ۲).

بر اساس نتایج بیان شده توسط Randall &Joseph (۱۹۸۱) در گیاه فیسکیوبلند (*F. arundinacea*) مشخص شد که با افزایش سطح پلوئیدی غلظت کلروفیل افزایش می‌یابد و حداکثر محتوای کلروفیل در گیاهان اُکتاپلوئید بوده است. Mathura و همکاران (۲۰۰۶) بیان نمودند که با افزایش سطح پلوئیدی از دیپلوئید به تتراپلوئید غلظت کلروفیل دو برابر می‌شود. Shariat & Sefidkon (۲۰۲۱) بیان نمودند که با افزایش القای سطح پلوئیدی در گیاه مرزه (*Satureja khuzistanica*) کلروفیل کل ۳۰ درصد و کارتنوئیدها ۴ درصد افزایش یافت که نتایج فوق با نتایج این پژوهش در یک راستا می‌باشد. بر اساس تحقیقات Naderian و همکاران (۲۰۲۲) افزایش سطح پلوئیدی تفاوت معنی‌داری را در میزان کلروفیل کل و کاروتنوئیدها گیاه داتوره ایجاد نمی‌کند.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات اصلی توده گیاهی برای رنگدانه‌ها فتوسنتزی.
Figure 2 – Mean comparison of the plant accession main effects for pigment

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج نشان داد از نظر خصوصیات فنوتیپی و رشدی بین دو توده‌ی حاصل از بذر مصنوعی (فاکتور a) مارچوبه دیپلوئید و اُکتاپلوئید تفاوتی وجود ندارد در صورتی که این نتایج نشان داد که اختلاف بین اعمال تیمارهای کپسوله کردن وجود داشت. نتایج این پژوهش مشخص کرد بیشترین درصد جوانه‌زنی در بین بذرهای مصنوعی مربوط به تیمار ۶۰ دقیقه روی شیکر بدون کینتین (c60) بود. و بیشترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به بذرهای مصنوعی تیمار شده با کینتین در مدت زمان ۶۰ دقیقه پوشش دهی با کلریدکلسیم بود. بیشترین زمان لازم برای جوانه زنی بذرهای مصنوعی در تیمار ۳۰ دقیقه پوشش دهی با کلریدکلسیم مشاهده شد. بر اساس این نتایج می‌توان اثتنبات نمود که با افزایش مدت زمان پوشش‌دهی با کلریدکلسیم جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی افزایش یافته و با کاهش مدت زمان پوشش‌دهی با کلریدکلسیم نه‌تنها جوانه‌زنی کاهش پیدا کرده بلکه مدت زمان لازم برای جوانه زنی نیز افزایش یافته است. پیشنهاد می‌شود که برای اثبات ثبات ژنتیکی بذرهای مصنوعی از مارکرهای مولکولی استفاده شود و همچنین در زمینه‌ی سازگارسازی گیاهان حاصل از بذر مصنوعی مارچوبه پژوهشی انجام شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای تأمین هزینه‌های طرح حاضر قدردانی می‌گردد.

References

Abbas, M. K., Mahood, H. E., & Alhasan, A. S. (2022). Production of synthetic seeds in vegetable crops: A review. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 1060(1), 012099. https://doi.org/10.1088/17551315/1060/1/012099

Abbasi, F., Majd, A., Farahvash, F., Nejadsattari, T., & Tarinejad, A. (2020). Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of in vitro-derived shoot-tips and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. *Nexo Revista Cientifica*, 33(02), 276-285. https://doi.org/10.5377/nexo.v33i02.10767

Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. & Davison, A. W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany,* 32(2), 85-100. https://doi.org/10.1016/00988472(92)90034-Y

Bekheet, S. A. (2006). A synthetic seed method through encapsulation of in vitro proliferated bulblets of garlic (*Allium sativum* L.). *Arabian Journal of Biotechnology*, *9*(3), 415-426.

Bentz, P. C., Liu, Z., Yang, J. B., Zhang, L., Burrows, S., Burrows, J., & Leebens-Mack, J. (2024). Young evolutionary origins of dioecy in the genus Asparagus. *American Journal of Botany*, e16276. https://doi.org/10.1002/ajb2.16276

Carelli, B. P. & Echeverrigaray, S. (2002). An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, 92(1), 69-74. https://doi.org/10.1016/S03044238(01)00280-1

Encina, C.L. & Regalado, J.J. (2022). Aspects of *In Vitro* Plant Tissue Culture and Breeding of Asparagus: A Review. *Horticulturae*, 8(5), 439-454. https://doi.org/10.3390/horticulturae805049

Feyzi, E., Moradi, A. & Maasoumiasl, A. (2017). Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production of persian oak (*Quercus brantii* L.) using 2,4-D hormone. *Plant Research Journal*, 33(2), 445-455. https://doi.org/10.1016//p2199079

Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158. https://doi.org/10.1016/00144827(68)90403-5

Garg, R., & Maheshwari, S. (2023). Synthetic seed technology, application, and future trends. *EPH-International Journal of Agriculture and Environmental Research*, *9*(1), 1-10. https://doi.org/10.53555/eijaer.v9i1.67

Iqbal, M., Ali, A., Rashid, H., Raja, N. I., Huma, N., Naveed, Z., & Chaudhry, Z. (2019). Evaluation of sodium alginate and calcium chloride on development of synthetic seeds. *Pakistan Journal of Botany*, 51(5), 1569-1574. https://doi.org/10.30848/PJB2019-5(36)

Joseph, M.C., Randall, D.D. & Nelson, C.J. (1981). Photosynthesis in polyploid tall fescue: II. Photosynthesis and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase of polyploid tall fescue. *Plant Physiology*, 68(4), 894-898. https://doi.org/10.1104/pp.68.4.894

Khormali, A., Savadkohi, F., Oskoueiyan, R., Mehregan, I. & Mousavizadeh, S. J. (2020). Multivariate Analysis of Asparagus Antioxidant Properties in Relation to Environmental Factors. *Journal of Vegetables Sciences*, 4(7), 99-112. https://doi.org/10.22034/iuvs.2020.136734.1118 (In Persian)

Lotfi, A., Hamidoghli, Y. & Mousavizadeh, S. J. (2021). Improving the Growth of Octoploid Asparagus Embryos under Osmotic Conditions. *Journal of Vegetables Sciences*, 5(9), 35-49.

https://doi.org/10.22034/iuvs.2021.533888.1169 (In Persian)

Majumder, A., Roychowdhury, D., & Ray, S. (2023). Biotechnological approaches for ex situ conservation of medicinal plants. *Medicinal Plants: Biodiversity, Biotechnology and Conservation*, 729-800. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9936-9-26

Malabadi, R. B., & Nataraja, K. (2002). Large scale production and storability of encapsulated somatic embryos of mothbean (*Vigna aconitifolia* Jacq). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 11, 61-64. https://doi.org/10.1007/BF03263137

Malabadi, R.B., & Staden, J.V. (2005). Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 259-265. https://doi.org/10.1007/s11240-005-1313-8

Mathura, S., Fossey, A., & Beck, S. L. (2006). Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). *Forestry*, 79(4), 381-388. https://doi.org/10.1093/forestry/cpl023

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, 269-276. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.011

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Naderian, P., Moshtaghi, N., Bagheri, A., & Malekzade Shafaroudi, S. (2022). Variations in morphological, biochemical and phytochemical traits of diploid and induced tetraploid plants of downy thorn-apple (*Datura innoxia* Mill.). *Journal of Medicinal Plants*, 21(82), 66-79. https://doi.org/20.1001.1.2717204.2022.21.82.3.1

Oceania, C., Doni, T., Tikendra, L. & Nogdam, P. (2015). Establishment of efficient in vitro culture and plantlet generation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and development of synthetic seeds. *Plant Science*, 10 (1), 15-24. https://doi.org/10.3923/jps.2015.15.24

Pirozi, R., Sharifzadeh, F., & Omidi, M. (2020). Production of hydrated artificial seed of Coolatai grass (*Hyparrhenia hirta* L.) by encapsulation of vegetative embryos. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 50(4), 201-208. https://doi.org/10.22059/ijfcs.2019.277145.654587

Poddar, S., & Poddar, S. (2021). Synthetic Seed Technology: An Overview. *Agriculture & Food: E-Newsletter*, *3*, 57-60. https://doi.org/10.5281/zenodo.5893899

Ranjbar, M. E., Ghahremani, Z., Mousavizadeh, S. J., Barzegar, T. & Gil, J. (2020). Evaluation of Progeny Produced through Inter and Intra-Species Crossing between Iranian and European Asparagus (*Asparagus* spp.). *Journal of Vegetables Sciences*, *3*(6), 15-29. https://doi.org/10.22034/iuvs.2020.118394.1080 (In Persian)

Sarmah, D.K., Borthakur, M., & Borua, P.K. (2010). Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.– an endangered orchid. *Current Science*, 98(5), 686-690. https://doi.org//24111822

Shariat, A., & Sefidkon, F. (2021). Tetraploid induction in savory (*Satureja khuzistanica*): cytological, morphological, phytochemical and physiological changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146, 137-148.

https://doi.org/10.1007/s11240-021-02053-y

Soni, S. & Sharma, P. (2017). Encapsulation of Protocorm-like Bodies and *in vitro* regeneration of *Asparagus racemosus* Willd. *Biotechnological Research*, 3(4), 77-79.