

استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ به منظور بهینه‌سازی کشت کالوس سرخارگل ارغوانی (*Echinacea purpurea*)

رضوان رمضان‌نژاد، مهناز اقدسی* و محمد فاطمی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۱/۲۳)

چکیده

سرخارگل ارغوانی (*Echinacea purpurea*) گیاهی متعلق به تیره آفتابگردان که خواص دارویی متعددی برای آن گزارش شده است. هدف از مطالعه حاضر، بهینه‌سازی تولید کالوس و بیومس این گیاه با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ است. به این منظور دو نوع ریزنمونه برگ و ریشه در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS ۱/۲) حاوی غلظت‌های مختلف (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) تنظیم‌کننده‌های رشد Kin، 2,4-D و NAA کشت شدند. در این تحقیق تولید کالوس و بیومس (وزن تر و خشک) به‌عنوان متغیر پاسخ (متغیر وابسته) و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان پارامترهای بهینه‌سازی (متغیر مستقل) مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین از طرح مرکب مرکزی (CCD) به منظور بهینه‌سازی پارامترهای تولید کالوس استفاده شد. آنالیزهای همبستگی مدل رگرسیون نشان‌دهنده یک مدل چندجمله‌ای درجه دو بود که جهت بهینه‌سازی کالوس‌زایی و تولید بیومس استفاده شد. نتایج حاضر نشان داد که هر دو ریزنمونه برگ و ریشه در تمام محیط‌های کشت حاوی تیمارهای مورد بررسی کالوس تولید کردند. اما بیشترین درصد کالوس‌زایی و وزن خشک در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و در محیط کشت حاوی ۱/۰۵ و ۰/۹۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin به‌دست آمد. این در حالی است که بیشترین میزان وزن تر در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و در تیمار با غلظت‌های ۱/۰۷ و ۱/۱۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و 2,4-D مشاهده شد. در مجموع نتایج حاصل تا حدود زیادی با داده‌های پیش‌بینی شده همخوانی دارد. برآزش مدل مناسب بوده و روش‌شناسی سطح پاسخ به‌منظور بهینه‌سازی کالوس‌زایی و تولید بیومس در گیاه سرخارگل ارغوانی موفق بوده است.

کلمات کلیدی: برآزش مدل، تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزنمونه، متغیر وابسته، متغیر مستقل

مقدمه

آن مشتقات کافئیک اسید به‌ویژه شیکوریک اسید، آلکامیدها، کتوالکن‌ها، پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها است (Barnes et al., 2005). تاکنون خواص دارویی متعددی از این گیاه گزارش شده است که به‌عنوان مثال می‌توان به نقش آن در کاهش عفونت و التهاب (Lee et al., 2010)، فعالیت فاگوسیتوزی، تحریک فیبروبلاست، افزایش فعالیت تنفسی و

سرخارگل ارغوانی با نام علمی *Echinacea purpurea* گیاهی متعلق به تیره آفتابگردان است و تاکنون ۹ گونه از این جنس شناسایی شده است (McGregor, 1968). این گیاه بومی ایران نبوده و متعلق به شمال شرق آمریکا است (Hudson, 2011). سرخارگل ارغوانی ترکیبات متعددی در خود دارد که مهم‌ترین

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.agdasi@gu.ac.ir

نقش کامل متغیرها بر فرآیند مورد آزمایش اشاره کرد (Bas and Boyaci, 2007). این محدودیت سبب می‌شود تا احتمال به‌دست‌آوردن شرایط لازم جهت بهینه‌سازی تولید کالوس کاهش یابد. از طرفی این روش‌ها بر پایه آزمون و خطا بوده و به انجام آزمایش‌های متعدد، هزینه و زمان زیاد نیاز دارد (Box and Wilson, 1951). روش‌شناسی سطح پاسخ (Response Surface Methodology (RSM)) یک روش جایگزین مفید بوده که می‌تواند بر این مشکلات غلبه کند. RSM تلفیقی از تکنیک‌های آماری و ریاضی بوده که جهت طراحی آزمایش، مدل‌سازی و تحلیل موقعیت‌هایی که یک متغیر وابسته (پاسخ) تحت تأثیر متغیرهای ورودی متعدد قرار می‌گیرد، مورد استفاده واقع می‌شود (Sheng et al., 2013). با استفاده از این تکنیک می‌توان اثر چندین فاکتور و برهم‌کنش آنها را به‌طور یکجا بررسی نموده و با صرف هزینه و وقت کمتر به شناسایی بهترین ترکیب از فاکتورهای متعدد جهت تولید پاسخ‌های مطلوب پرداخت (Prasad et al., 2011). در مجموع می‌توان گفت که استفاده از RSM، کارایی و بازدهی آزمایش را افزایش می‌دهد. طراحی آزمایش به کمک RSM به سه روش مختلف طرح مرکب مرکزی (Central Composite Design; CCD)، باکس بنکن (Box Benckcen Design; BBD) و دهلرت (Dehlort) صورت می‌گیرد. در بین روش‌های ذکر شده طرح مرکب مرکزی از اعتبار بیشتری برخوردار است (Prasad et al., 2011).

به‌تازگی تعدادی از گزارش‌های علمی کاربرد RSM را در بهینه‌سازی تولید کالوس از گونه‌های مختلف گیاهی نشان داده‌اند (Niedz et al., 2014). در تحقیق حاضر سعی شده است تا با استفاده از این تکنیک، بهینه‌سازی تولید کالوس در سرخارگل ارغوانی برای اولین بار مورد بررسی قرار گیرد. به این منظور تولید کالوس از ریزنمونه برگ و ریشه در محیط‌کشت MS ۱/۲ حاوی غلظت‌های مختلف اکسین (-2,4-D, NAA) و سایتوکینین (Kin) مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، تولید کالوس و بیومس (وزن تر و خشک) به‌عنوان متغیر پاسخ (متغیر وابسته) و غلظت‌های مختلف

در نتیجه آن تقویت تحرک لوکوسیت‌ها (Manayi et al., 2015) اشاره کرد. علاوه بر خواص دارویی، امروزه از این گیاه در تهیه مکمل‌های غذایی نیز استفاده می‌شود (Percival, 2000). در حال حاضر سرخارگل ارغوانی به‌عنوان یکی از پر فروش‌ترین گیاهان دارویی و مکمل‌های غذایی در اروپا و ایالات‌متحده آمریکا شناخته‌شده است (Wang et al., 2006).

بررسی‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که فاکتورهای مختلفی نظیر شرایط محیطی، سن گیاه، آلودگی‌های میکروبی، زمان برداشت و شرایط فیزیولوژیکی گیاه بر تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی اثر دارد. از طرفی عوامل دیگری نظیر طولانی‌بودن زمان لازم برای تولید محصول قابل فروش می‌تواند امکان استفاده مطلوب و مؤثر از گیاهان دارویی را کاهش دهد (Choffe et al., 2000). کشت‌بافت و اندام گیاهی روش جایگزین مناسبی است که امروزه از آن جهت تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاهی استفاده می‌شود. این روش تا حدود زیادی می‌تواند به رفع مشکلات ذکر شده کمک نماید. تاکنون گزارش‌های اندکی در خصوص کشت‌بافت گونه‌های مختلف جنس سرخارگل ارغوانی منتشر شده است. مطالعات انجام‌شده توسط Zebarjadi و همکاران (۲۰۱۱) در ارتباط با اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی بر تولید کالوس ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل سرخارگل ارغوانی نشان داد که بالاترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون در محیط‌کشت Murashige و Skoog (MS) (۱۹۶۲) حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA دیده می‌شود. گزارش دیگری نیز نشان داده است که بالاترین میزان بیوماس در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر دو ترکیب 2ip و IBA در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ سرخارگل ارغوانی مشاهده شده است (Butiuc-Keul et al., 2012).

پیش از این به‌منظور بهینه‌سازی تولید کالوس از روش یک متغیر در یک زمان به‌طور گسترده‌ای استفاده شده است. از معایب این روش می‌توان به مواردی مانند عدم‌توانایی بررسی تأثیرات برهم‌کنشی بین متغیرها و عدم‌توانایی در نشان‌دادن

شدند (وزن خشک).

طراحی آزمایش: به منظور طراحی آزمایش‌ها و آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Design-Expert نسخه ۱۰ در قالب طرح مرکب مرکزی استفاده شد. با استفاده از این طرح کلیه اثرات اصلی و متقابل متغیرهای مستقل شامل غلظت‌های مختلف Kin, 2,4-D و یا NAA بر روی تولید کالوس و وزن تر و خشک در هر نوع ریزنمونه قابل ارزیابی است. اثر متغیرهای مستقل شامل Kin: X₁ و X₂: 2,4-D/NAA در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. در این آزمایش یک نقطه فاکتوریل، یک نقطه محوری و پنج تکرار در نقطه مرکزی (برای تخمین خطای خالص) با ۱۳ آزمایش و α به صورت Face centered در نظر گرفته شد. آزمایشات به منظور کاهش تأثیرات عوامل ناشناخته بیرونی به صورت تصادفی اجرا شدند. همچنین از آنالیز واریانس (ANOVA) به منظور آنالیز داده‌ها استفاده شد. اعتبار و دقت مدل‌ها توسط ضریب تعیین R²، ضریب تعیین تعدیل شده (R²_{adjusted}) و ضریب تعیین پیش‌بینی شده (R²_{predict}) آنالیز شد. بعد از برازش مدل، داده‌های حاصل به منظور رسم نمودارهای بهینه‌سازی سه بعدی و کانتور (Countor) مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز طرح مرکب مرکزی: به منظور تعیین بهترین مدل رگرسیون، بررسی متغیرهای مستقل (غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد) ضروری به نظر می‌رسد. براساس مطالعات اولیه محدوده غلظتی مورد بررسی برای هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد Kin، 2,4-D و NAA از صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر انتخاب شد. بهترین مدل‌های رگرسیون برای هر تیمار با استفاده از مدل درجه دوم کامل در رابطه ۱ برازش شدند.

رابطه (۱)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \varepsilon$$

در رابطه ذکر شده Y نشان‌دهنده پاسخ، $\beta_{1,2,\dots,K}$ نشان‌دهنده ضرایب متغیرها و $X_{1,2,\dots,K}$ نشان‌دهنده متغیرها است. آنالیز رگرسیون این مدل پایه برای هر تیمار، معنی‌داری تأثیرات هر تنظیم‌کننده رشد را آشکار کرده و برهمکنش‌های خطی و درجه دو بر روی هر پاسخ را نشان می‌دهد.

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به عنوان پارامترهای بهینه‌سازی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

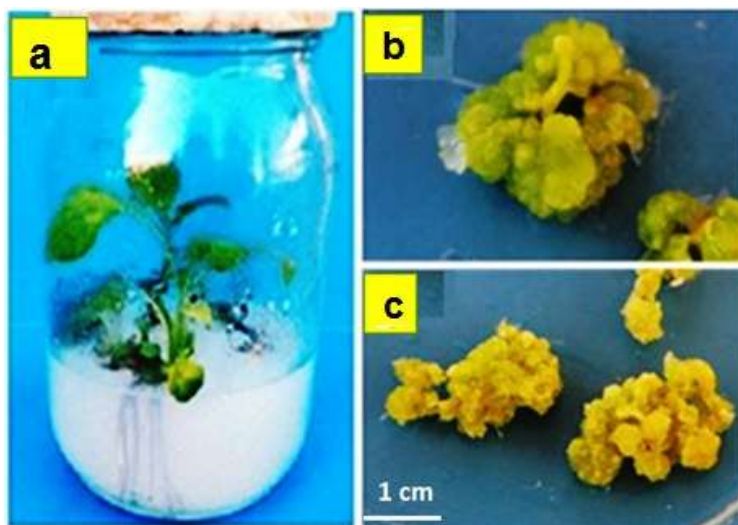
مواد و روش‌ها

تولید گیاهچه استریل: به منظور تولید گیاهچه استریل سرخارگل ارغوانی بذرهای گیاه از شرکت دشتیار اصفهان خریداری شدند. ابتدا بذرهای به مدت ۱۵ دقیقه با آب شستشو داده شده و به دنبال آن به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ ضدعفونی شدند. پس از شستشو با آب مقطر، بذرهای به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۷٪ ضدعفونی شده و در نهایت سه بار با آب مقطر شستشو شدند. بذرهای ضدعفونی شده در محیط‌کشت پایه MS کشت شدند (Murashige and Skoog, 1962).

تولید کالوس: از گیاهچه‌های استریل ۴۵ روزه، ریزنمونه جهت تولید کالوس تهیه شد. تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق شامل سه نوع تنظیم‌کننده رشد Kin، 2,4-D و NAA و درسه سطح صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بودند. همچنین از دو نوع ریزنمونه (ریشه و برگ) به منظور تولید کالوس استفاده شد. ریزنمونه ریشه به طول پنج تا هشت میلی‌متر و برگ به اندازه تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر تهیه و در پتری‌دیش‌های حاوی محیط‌کشت MS ۱/۲ به همراه غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند. برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد. پس از دو ماه فاکتورهای مختلفی نظیر درصد کالوس‌زایی، رنگ، مورفولوژی، وزن خشک و تر کالوس مورد بررسی قرار گرفت.

شرایط نگهداری: به منظور نگهداری گیاهچه استریل و همچنین کالوس حاصل از آن از اتاقک رشد با دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس) و هشت ساعت تاریکی استفاده شد.

وزن تر و خشک: برای اندازه‌گیری وزن تر، کالوس‌های جمع‌آوری شده با ترازو (دقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شد. سپس کالوس‌ها در پاکت‌های کاغذی قرار گرفته و به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک و دوباره توزین



شکل ۱- a: گیاهچه استریل ۴۵ روزه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*)، b: کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت ۱/۲ MS حاوی ۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، c: کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه در محیط کشت ۱/۲ MS حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D Kin و D

نتایج

کدشده به ترتیب نشان‌دهنده بهترین مدل‌ها برای پیش‌بینی درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه برگ تحت تأثیر دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و Kin است.

رابطه (۲)

$$y = 80.65 + 3.71 \text{ 2,4-D} + 8.33 \text{ kin} + 13.89 \text{ 2,4-D} \times \text{kin} + 20.50 \text{ 2,4-D}^2 - 32.28 \text{ kin}^2$$

رابطه (۳)

$$y = 1.31 + 0.66 \text{ 2,4-D} + 1 \text{ kin} - 0.06 \text{ 2,4-D} \times \text{kin} - 0.36 \text{ 2,4-D}^2 - 0.42 \text{ kin}^2$$

رابطه (۴)

$$y = 0.11 + 0.13 \text{ 2,4-D} + 0.27 \text{ kin} - 0.03 \text{ 2,4-D} \times \text{kin} - 0.05 \text{ 2,4-D}^2 - 0.1 \text{ kin}^2$$

رابطه‌های ۵ تا ۷ با استفاده از واحدهای کدشده بهترین مدل‌ها را برای پیش‌بینی درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس برگ تحت تأثیر دو تنظیم‌کننده رشد NAA و Kin نشان می‌دهد.

رابطه (۵)

$$y = 69.01 - 31.77 \text{ NAA} + 64.17 \text{ kin} + 8.08 \text{ NAA} \times \text{kin} + 15.63 \text{ NAA}^2 - 34.36 \text{ kin}^2$$

رابطه (۶)

$$y = 1.36 + 0.45 \text{ NAA} + 1 \text{ kin} - 0.04 \text{ NAA} \times \text{kin} - 0.18 \text{ NAA}^2 - 0.47 \text{ kin}^2$$

رابطه (۷)

در این تحقیق از گیاهچه استریل ۴۵ روزه به‌عنوان منبع ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی استفاده شد (شکل ۱ a). ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های تولیدشده در جدول ۱ نشان داده شده است. رنگ کالوس برگ در تمام تیمارهای مورد بررسی سبز بوده در اکثر نمونه‌ها دارای بافتی نرم بود. رنگ کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه نیز در بیشتر تیمارها سبز روشن بوده و کالوس‌ها بافتی نرم داشتند (شکل ۱ b,c).

در ادامه به‌منظور تعیین غلظت‌های بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد جهت تولید بیشترین درصد کالوس‌زایی و نیز بیوماس (وزن تر و خشک) از ریزنمونه برگ و ریشه گیاه سرخارگل ارغوانی از RSM استفاده شد. مقادیر کدشده غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت ۱/۲ MS به‌همراه پاسخ‌های تجربی (Actual) مربوطه (درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک) و به‌موازات آن مقادیر پیش‌بینی‌شده (Predicted) توسط مدل‌های ریاضی نهایی در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

برازش مدل: رابطه‌های ۲ تا ۴ با استفاده از واحدهای

جدول ۱- ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه گیاه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*) در محیط کشت ۱/۲ MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs: Plant Growth Regulators).

| ریزنمونه ریشه | | ریزنمونه برگ | | PGRs (mg/L) | | |
|---------------|------------|--------------|------------|-------------|-------|-----|
| رنگ کالوس | بافت کالوس | رنگ کالوس | بافت کالوس | NAA | 2,4-D | Kin |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۰ | ۰ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۲ | ۰ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۰ | ۲ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۲ | ۲ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۰ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | سخت | ۰ | ۲ | ۱ |
| قهوه‌ای | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۱ | ۰ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۱ | ۲ |
| سبز روشن | نرم | سبز | سخت | ۰ | ۱ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۱ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۱ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۱ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۱ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۰ | ۰ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۲ | ۰ | ۰ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۰ | ۲ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۲ | ۰ | ۲ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۰ | ۰ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | سخت | ۲ | ۰ | ۱ |
| قهوه‌ای | نرم | سبز | نرم | ۱ | ۰ | ۰ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۱ | ۰ | ۲ |
| سبز روشن | نرم | سبز | سخت | ۱ | ۰ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۱ | ۰ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۱ | ۰ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۱ | ۰ | ۱ |
| سبز روشن | نرم | سبز | نرم | ۱ | ۰ | ۱ |

انتخابی برای پیش‌بینی درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه در محیط دارای NAA و Kin است.

رابطه (۸)

$$y = 44.8 + 16.51 \text{ 2,4-D} - 65.62 \text{ kin} + 6.94 \text{ 2,4-D} \times \text{kin} + 10.8 \text{ 2,4-D}^2 - 25.3 \text{ kin}^2$$

$$y = 0.06 + 0.65 \text{ NAA} + 0.84 \text{ kin} - 0.03 \text{ NAA} \times \text{kin} - 0.32 \text{ NAA}^2 - 0.38 \text{ kin}^2$$

همچنین رابطه‌های ۸ تا ۱۰ به ترتیب نشان‌دهنده بهترین

مدل برای پیش‌بینی درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک

کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه تحت تأثیر دو تنظیم‌کننده

رشد 2,4-D و Kin و معادله ۱۱ تا ۱۳ مربوط به مدل‌های

جدول ۲- مقادیر غیر کدشده متغیرهای مستقل (Kin و 2,4-D) و نتایج تجربی (A) و پیش‌بینی شده (P) در تحریک تولید کالوس از ریزنمونه برگ و ریشه گیاه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

| ریزنمونه ریشه | | | | | | ریزنمونه برگ | | | | | | Kin (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | تیمار |
|---------------|------|--------|------|------------|--------|--------------|------|--------|------|------------|--------|------------|--------------|-------|
| وزن خشک | | وزن تر | | کالوس‌زایی | | وزن خشک | | وزن تر | | کالوس‌زایی | | | | |
| (گرم) | | (گرم) | | (/.) | | (گرم) | | (گرم) | | (/.) | | | | |
| A | P | A | P | A | P | A | P | A | P | A | P | | | |
| ۰/۰۹ | ۰/۰۹ | ۱/۲۹ | ۱/۲۶ | ۴۴/۴۴ | ۴۰/۳ | ۰/۱۲ | ۰/۱۲ | ۱/۳ | ۱/۳۱ | ۶۶/۶۶ | ۷۰/۷۲ | ۰ | ۰ | ۱ |
| ۰/۱ | ۰/۰۸ | ۱/۳۲ | ۱/۲۷ | ۵۰ | ۵۰/۳۵ | ۰/۲۱ | ۰/۱۹ | ۱/۲۳ | ۱/۱۷ | ۵۰ | ۵۰/۳۵ | ۰ | ۲ | ۲ |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۸ | ۱/۶۷ | ۱/۶۸ | ۶۶/۶۶ | ۷۰/۷۲ | ۰/۲۷ | ۰/۲۷ | ۱/۶۹ | ۱/۶۹ | ۶۱/۱ | ۵۹/۶ | ۲ | ۰ | ۳ |
| ۰/۱۶ | ۰/۱۴ | ۱/۸۹ | ۱/۸۷ | ۱۰۰ | ۹۴/۸ | ۰/۲۳ | ۰/۲۱ | ۱/۳۵ | ۱/۲۸ | ۱۰۰ | ۹۴/۸ | ۲ | ۲ | ۴ |
| ۰/۱۴ | ۰/۱۳ | ۱/۳۴ | ۱/۳۶ | ۶۶/۶۶ | ۷۰/۷۲ | ۰/۲۹ | ۰/۲۹ | ۱/۹۱ | ۱/۹۰ | ۱۰۰ | ۹۴/۴۴ | ۱ | ۰ | ۵ |
| ۰/۱۲ | ۰/۱۶ | ۱/۳۹ | ۱/۴۶ | ۱۰۰ | ۱۰۴/۸۵ | ۰/۲۷ | ۰/۳ | ۱/۴۹ | ۱/۶۳ | ۱۰۰ | ۱۰۴/۸۵ | ۱ | ۲ | ۶ |
| ۰/۲۲ | ۰/۲۳ | ۱/۵ | ۱/۵۸ | ۴۴/۴۴ | ۴۰/۰۳ | ۰/۱۹ | ۰/۲۱ | ۱/۵۵ | ۱/۶۰ | ۴۴/۴۴ | ۴۰/۰۳ | ۰ | ۱ | ۷ |
| ۰/۲۴ | ۰/۲۶ | ۲/۰۷ | ۲/۰۸ | ۵۰ | ۵۶/۷ | ۰/۲۷ | ۰/۲۹ | ۱/۷۷ | ۱/۸۵ | ۵۰ | ۵۶/۷ | ۲ | ۱ | ۸ |
| ۰/۳۳ | ۱/۷۲ | ۱/۸ | ۱/۷۲ | ۶۶/۶۶ | ۸۰/۶۵ | ۰/۳۷ | ۰/۳۵ | ۲/۱۲ | ۲/۱۳ | ۶۶/۶۶ | ۸۰/۶۵ | ۱ | ۱ | ۹ |
| ۰/۳ | ۱/۷۲ | ۱/۷۶ | ۱/۷۲ | ۸۳/۳۳ | ۸۰/۶۵ | ۰/۳۵ | ۰/۳۵ | ۲/۱۷ | ۲/۱۳ | ۸۳/۳۳ | ۸۰/۶۵ | ۱ | ۱ | ۱۰ |
| ۰/۲۹ | ۱/۷۲ | ۱/۷۳ | ۱/۷۲ | ۷۷/۷۷ | ۸۰/۶۵ | ۰/۳ | ۰/۳۵ | ۲/۲۳ | ۲/۱۳ | ۷۷/۷۷ | ۸۰/۶۵ | ۱ | ۱ | ۱۱ |
| ۰/۲۹ | ۱/۷۲ | ۱/۷۹ | ۱/۷۲ | ۵۰ | ۸۰/۶۵ | ۰/۳۸ | ۰/۳۵ | ۲/۱۹ | ۲/۱۳ | ۷۷/۷۷ | ۸۰/۶۵ | ۱ | ۱ | ۱۲ |
| ۰/۲۸ | ۱/۷۲ | ۱/۶۳ | ۱/۷۲ | ۱۰۰ | ۸۰/۶۵ | ۰/۳۹ | ۰/۳۵ | ۲/۰۹ | ۲/۱۳ | ۱۰۰ | ۸۰/۶۵ | ۱ | ۱ | ۱۳ |

A: Actual, P: Predicted

رابطه (۹) نشان‌دهنده معنی‌داری هر مدل است. براساس جدول ۴ همه مدل‌های پیشنهادی معنی‌داری بالایی ($P < 0.05$) داشتند. همچنین مقدار F نیز برای هر مدل بالا بوده که نشان‌دهنده درجه بالایی از دقت مدل‌ها است. دقت برآورد (Adequacy precision) نسبت سیگنال به خطا را اندازه گرفته و نسبت بیشتر از ۴ مناسب است. در مورد مدل‌های انتخابی در این پژوهش، میزان دقت برآورد بیش از ۴ بوده است. مقادیر R^2 (ضریب تعیین) و R^2_{adj} (ضریب تعیین تعدیل‌شده) برای هر مدل در جدول ۵ و ۶ قابل مشاهده است. به‌طورمعمول R^2_{adj} از R^2 کوچک‌تر و نزدیک به آن است. بالا بودن مقدار آنها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن بالای مدل‌ها است. زمانی که یک مدل رگرسیون بتواند ارتباط عملکردی بین متغیرهای مستقل و پاسخ را به‌خوبی توضیح دهد، آزمون فقدان برازش (Lack of

رابطه (۹)

$$y = 1.26 + 0.62 \text{ 2,4-D} - 0.01 \text{ kin} + 0.04 \text{ 2,4-D} \times \text{kin} - 0.31 \text{ 2,4-D}^2 + 0.1 \text{ kin}^2$$

رابطه (۱۰)

$$y = 1.26 + 0.62 \text{ 2,4-D} + 0.08 \text{ kin} + 0.01 \text{ 2,4-D} \times \text{kin} - 0.14 \text{ 2,4-D}^2 - 0.04 \text{ kin}^2$$

رابطه (۱۱)

$$y = 42.4 + 7.05 \text{ NAA} + 52.08 \text{ kin} + 1.13 \text{ NAA} \times \text{kin} + 3.85 \text{ NAA}^2 - 21.14 \text{ kin}^2$$

رابطه (۱۲)

$$y = 1.26 + 0.72 \text{ NAA} + 0.07 \text{ kin} - 0.1 \text{ NAA} \times \text{kin} - 0.3 \text{ NAA}^2 + 0.05 \text{ kin}^2$$

رابطه (۱۳)

$$y = 0.11 + 0.13 \text{ NAA} + 0.27 \text{ kin} - 0.03 \text{ NAA} \times \text{kin} - 0.05 \text{ NAA}^2 + 0.1 \text{ kin}^2$$

آنالیزهای آماری: آنالیز واریانس (ANOVA) مدل‌های

نشان داده شده در بخش قبلی نشان‌دهنده ارتباط بین اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های مورد بررسی است. مقدار P

جدول ۴- خلاصه آنالیز واریانس (ANOVA) برای مدل‌های نشان داده شده در معادلات ۲ تا ۱۳. القا کالوس (CI)، وزن تر (FW) و وزن خشک (DW).

| ریزنمونه | مدل | مجموع مربعات | درجه آزادی | میانگین مربعات | مقدار F | مقدار P | دقت برآورد |
|----------|----------------|--------------|------------|----------------|---------|--------------------|------------|
| برگ | CI (2,4-D,Kin) | ۴۳۶۶/۱۶ | ۵ | ۸۷۳/۲۳ | ۸/۳۲ | ۰/۰۰۷* | ۹/۳۱ |
| | برازش مدل | ۱۴۱/۳۶ | ۳ | ۴۷/۱۲ | ۰/۳۲ | ۰/۸۱ ^{ns} | |
| | FW(2,4-D,Kin) | ۱/۵۱ | ۵ | ۰/۳۱ | ۴۰/۶۲ | ۰/۰۰۰۱>* | ۱۶/۸۱ |
| | برازش مدل | ۰/۰۴ | ۳ | ۰/۰۱ | ۴/۴۵ | ۰/۰۹ ^{ns} | |
| | DW(2,4-D,Kin) | ۰/۰۶ | ۵ | ۰/۰۱ | ۱۳/۲۱ | ۰/۰۰۱* | ۱۰/۱۵ |
| | برازش مدل | ۲/۶۵۷E-۰۰۳ | ۳ | ۸/۸۵۸E-۰۰۴ | ۰/۷۸ | ۰/۵۶ ^{ns} | |
| | CI(NAA,Kin) | ۳۹۶۳/۰۵ | ۵ | ۷۹۲/۶۱ | ۴/۱۵ | ۰/۰۴* | ۱۰/۲۳ |
| | برازش مدل | ۴۴۷/۸۵ | ۳ | ۱۴۹/۲۸ | ۰/۶۷ | ۰/۶۱ ^{ns} | |
| | FW(NAA,Kin) | ۱/۰۸ | ۵ | ۰/۲۲ | ۲۵/۵۷ | ۰/۰۰۰۲** | ۶/۱۷ |
| | برازش مدل | ۰/۰۳ | ۳ | ۰/۰۱ | ۱/۸۶ | ۰/۲۷ ^{ns} | |
| | DW(NAA,Kin) | ۱/۱۵ | ۵ | ۰/۲۳ | ۱۷/۴۹ | ۰/۰۰۰۸* | ۸/۵۲ |
| | برازش مدل | ۰/۰۵ | ۳ | ۸/۳۵۰E-۰۰۳ | ۲/۳۴ | ۰/۲۱ ^{ns} | |
| ریشه | CI (2,4-D,Kin) | ۳۸۴۳/۸۳ | ۵ | ۷۶۸/۷۷ | ۴/۵۳ | ۰/۰۳** | ۶/۱۴ |
| | برازش مدل | ۵۱۰/۸۷ | ۳ | ۱۷۰/۲۹ | ۱ | ۰/۴۷ ^{ns} | |
| | FW(2,4-D,Kin) | ۰/۶۸ | ۵ | ۰/۱۴ | ۲۶/۳۶ | ۰/۰۰۰۲* | ۱۶/۸۴ |
| | برازش مدل | ۰/۰۱ | ۳ | ۵/۶۸۷E-۰۰۳ | ۱/۲۴ | ۰/۴ ^{ns} | |
| | DW(2,4-D,Kin) | ۰/۰۹ | ۵ | ۰/۰۱ | ۳۰/۸ | ۰/۰۰۰۱* | ۱۲/۴۱ |
| | برازش مدل | ۲/۸۴۴E-۰۰۳ | ۵ | ۹/۴۸۱E-۰۰۴ | ۲/۵۶ | ۰/۱۹ ^{ns} | |
| | CI(NAA,Kin) | ۳۵۳۴/۰۳ | ۵ | ۷۰۶/۸۱ | ۶/۶۴ | ۰/۰۱* | ۱۰/۳۶ |
| | برازش مدل | ۲۲۶/۱۳ | ۳ | ۷۵/۳۸ | ۰/۵۸ | ۰/۶۵ ^{ns} | |
| | FW(NAA,Kin) | ۰/۳۶ | ۵ | ۰/۰۷ | ۱۸/۵۲ | ۰/۰۰۰۷* | ۱۴/۲۹ |
| | برازش مدل | ۶/۵۶۰E-۰۰۳ | ۳ | ۲/۱۸۷E-۰۰۳ | ۰/۴۳ | ۰/۷۴ ^{ns} | |
| | DW(NAA,Kin) | ۰/۰۶ | ۵ | ۰/۰۱ | ۱۲/۲۷ | ۰/۰۰۲* | ۱۰/۵۳ |
| | برازش مدل | ۲/۸۰۸E-۰۰۳ | ۳ | ۹/۳۵۹E-۰۰۳ | ۰/۷۴ | ۰/۵۸ ^{ns} | |

* و ** به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح ۱ و ۵ درصد و ^{ns} عدم تفاوت معنی دار را نشان می‌دهد.

CI: Callus Induction; FW: Fresh Weight; DW: Dry Weight

نتایج به دست آمده نشان داده که افزایش غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی گرم در لیتر به همراه افزایش غلظت 2,4-D از ۱ تا ۲ میلی گرم در لیتر سبب بالارفتن درصد کالوس زایی در ریزنمونه برگ می‌شود. در حالی که با افزایش غلظت Kin از ۱ تا ۲ میلی گرم در لیتر به همراه افزایش غلظت 2,4-D از صفر تا ۱ میلی گرم در لیتر کاهش تدریجی در کالوس زایی مشاهده

(fit) آن معنی دار نیست. در مطالعه حاضر معنی دار نبودن فقدان برازش در تمام مدل‌های به دست آمده قابل مشاهده است.

آنالیز سطح پاسخ: جهت انجام آنالیز سطح پاسخ، معادلات رگرسیون در نمودارهای سه بعدی و کانتور تهیه شدند. این نمودارها اثر متغیرهای مستقل و برهمکنش آنها را با پاسخ مورد نظر نشان می‌دهند.

جدول ۵- مقادیر R مدل‌های نشان داده‌شده در رابطه‌های ۲ تا ۴ و ۸ تا ۱۰ مربوط به تنظیم‌کننده‌های رشد Kin و 2,4-D

| مدل | ریز نمونه ریشه | | | ریز نمونه برگ | | |
|-------------------------------|----------------|--------------|----------------|---------------|--------------|----------------|
| | وزن خشک (گرم) | وزن تر (گرم) | کالوس‌زایی (%) | وزن خشک (گرم) | وزن تر (گرم) | کالوس‌زایی (%) |
| R ² | ۰/۹۵ | ۰/۹۴ | ۰/۷۶ | ۰/۹ | ۰/۹۶ | ۰/۸۵ |
| R ² _{adj} | ۰/۹۲ | ۰/۹۱ | ۰/۵۹ | ۰/۸۳ | ۰/۹۴ | ۰/۷۵ |
| R ² _{pre} | ۰/۷۳ | ۰/۷۷ | ۰/۱۳ | ۰/۶۳ | ۰/۷۸ | ۰/۵۵ |

جدول ۶- مقادیر R مدل‌های نشان داده‌شده در رابطه‌های ۵ تا ۷ و ۱۱ تا ۱۳ مربوط به تنظیم‌کننده‌های رشد Kin و NAA

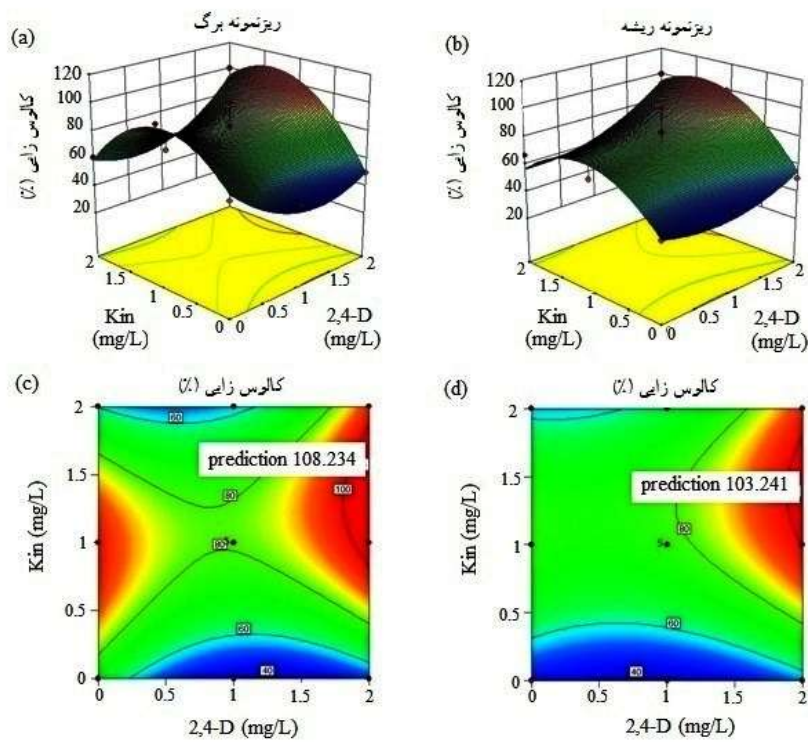
| مدل | ریز نمونه ریشه | | | ریز نمونه برگ | | |
|-------------------------------|----------------|--------------|----------------|---------------|--------------|----------------|
| | وزن خشک (گرم) | وزن تر (گرم) | کالوس‌زایی (%) | وزن خشک (گرم) | وزن تر (گرم) | کالوس‌زایی (%) |
| R ² | ۰/۸۹ | ۰/۹۲ | ۰/۸۲ | ۰/۹۴ | ۰/۷۴ | ۰/۸۹ |
| R ² _{adj} | ۰/۸۲ | ۰/۸۷ | ۰/۷ | ۰/۹۱ | ۰/۵۶ | ۰/۸۲ |
| R ² _{pre} | ۰/۶۲ | ۰/۷۵ | ۰/۴۴ | ۰/۶۷ | ۰/۰۴ | ۰/۶۲ |

می‌شود (شکل ۲a). بیشترین درصد کالوس‌زایی پیش‌بینی شده (۱۰۸/۲۴٪) در غلظت ۱/۹۹ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۱/۴۴ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (شکل ۲c). همچنین تغییر غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه را به‌همراه داشته است. درحالی‌که با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده رشد از ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر درصد کالوس‌زایی کاهش یافت. این نتایج نشان داد که تغییر غلظت 2,4-D اثر معنی‌داری بر تولید کالوس ندارد. اما برهمکنش این دو تنظیم‌کننده رشد اثر مشخصی بر کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه داشته است (شکل ۲b). به‌طوری‌که بیشترین درصد کالوس‌زایی پیش‌بینی شده (۱۰۳/۶۹٪) در غلظت‌های ترکیبی ۱/۹۸ و ۱/۲۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin مشاهده شد (شکل ۲d).

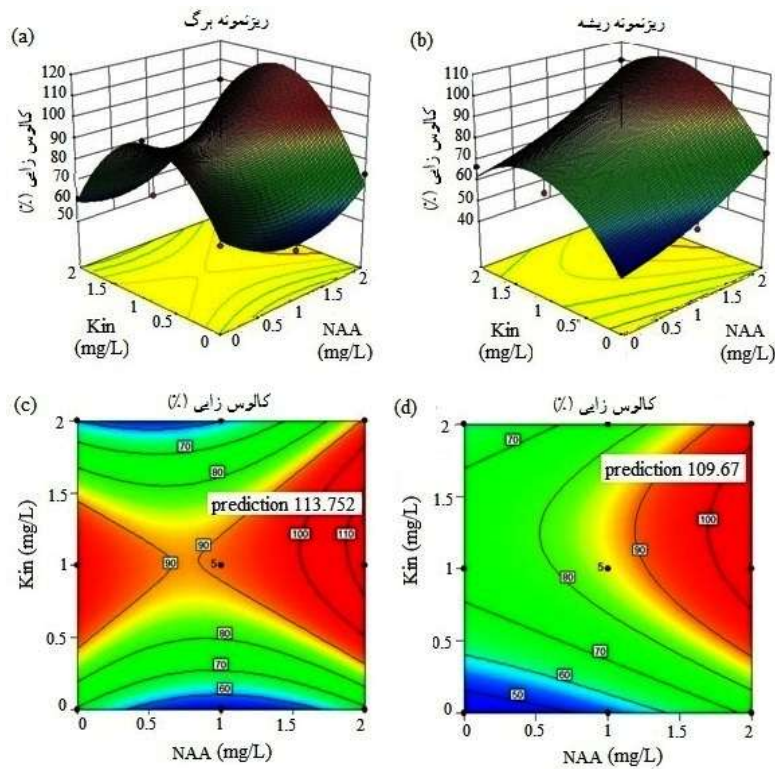
اثر برهمکنش NAA و Kin بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ به‌ترتیب به‌صورت خطی و درجه دوم است (شکل ۳a). با افزایش غلظت NAA از صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر میزان کالوس‌زایی افزایش نامحسوسی یافت. اما با تغییر غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر درصد کالوس‌زایی افزایش یافت.

افزایش بیشتر غلظت Kin تا ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش درصد کالوس‌زایی شد (شکل ۳a). بیشترین میزان کالوس‌زایی (۱۱۳/۷۵٪) در غلظت‌های ترکیبی ۱/۹۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin مشاهده شد (شکل ۳c). افزایش غلظت NAA نتوانست تغییر محسوسی در میزان تولید کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه ایجاد کند. اما افزایش غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش درصد کالوس‌زایی شد (شکل ۳b). اگرچه افزایش بیشتر غلظت Kin از ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه شد. برهمکنش Kin در غلظت‌های نزدیک به ۱ میلی‌گرم در لیتر با غلظت‌های بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اثر بسیار مشخصی بر افزایش درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه داشت. به این ترتیب که بیشترین درصد کالوس‌زایی پیش‌بینی شده برای ریزنمونه ریشه ۱۰۶/۸۲٪ بوده که در غلظت‌های ۱/۹۹ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin مشاهده شد (شکل ۳d).

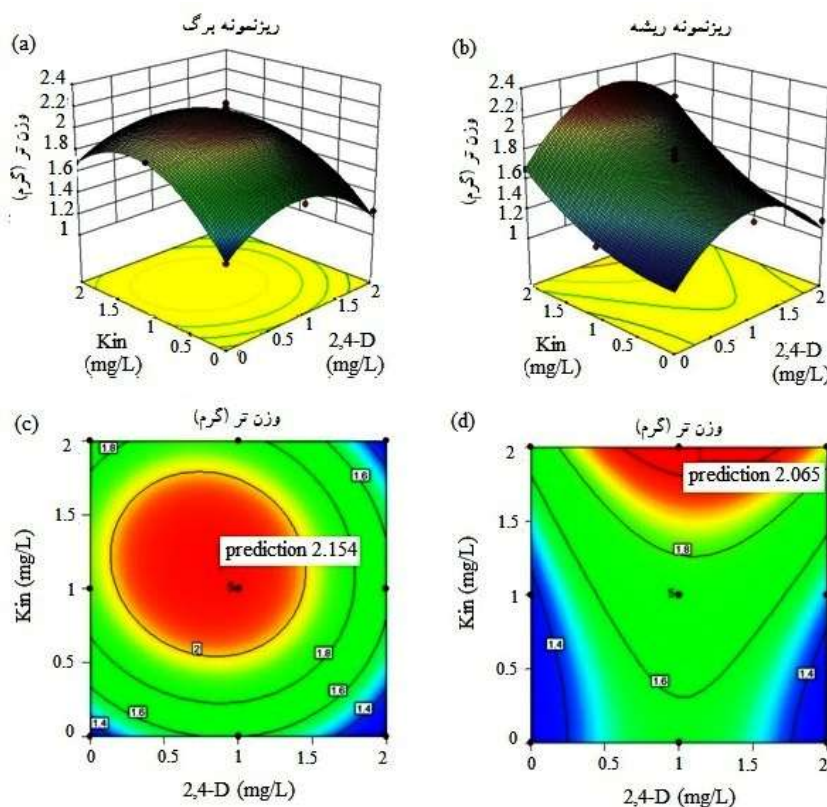
اثر هر یک از دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و Kin بر وزن تر کالوس حاصل از برگ از نوع درجه دوم است. به این ترتیب که با افزایش غلظت هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد از صفر تا



شکل ۲- نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی (a و c) و کانتور (b و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, 2,4-D) بر درصد کالوس زایی ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).



شکل ۳- نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی (a و c) و کانتور (b و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, NAA) بر درصد کالوس زایی حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

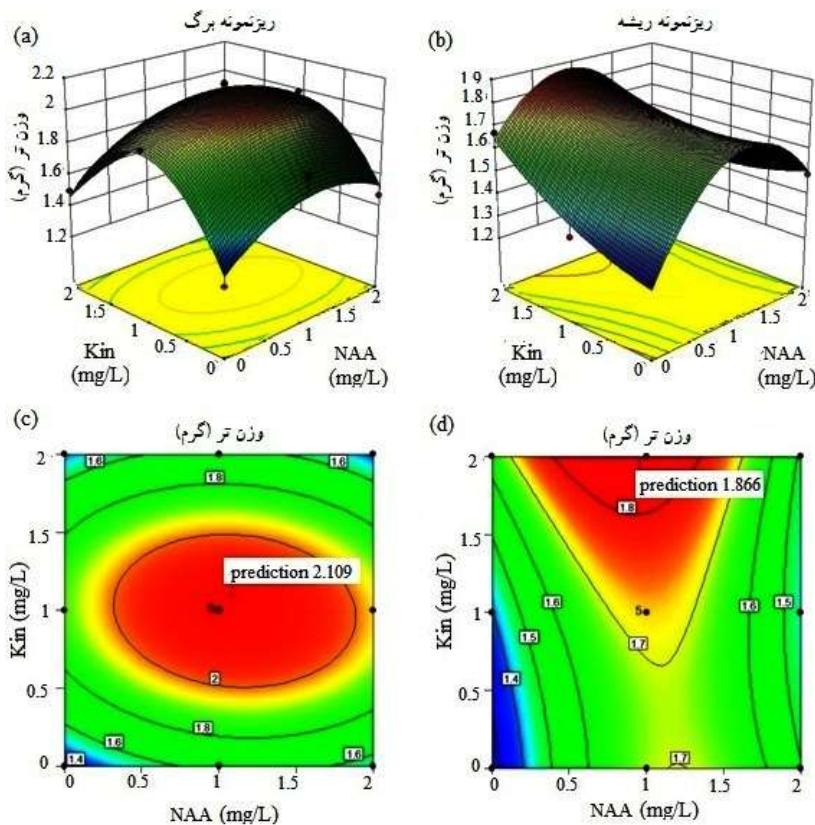


شکل ۴- نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, 2,4-D) بر وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

حاصل از ریشه توانست به بیشینه مقدار پیش‌بینی شده خود (۲/۰۸ گرم) تحت تأثیر غلظت‌های ترکیبی ۱/۱۳ و ۱/۹۸ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin برسد (شکل ۴d).

اثر هر یک از دو تنظیم‌کننده رشد NAA و Kin بر میزان وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه برگ از نوع درجه دوم است (شکل ۴a). در محدوده غلظتی صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر هر دو تنظیم‌کننده رشد وزن تر کالوس افزایش یافت. از طرف دیگر برهمکنش این دو تنظیم‌کننده رشد در غلظت‌های نزدیک به ۱ میلی‌گرم در لیتر نیز اثر مشخصی بر افزایش وزن تر کالوس داشت. بر این اساس بیشترین میزان وزن تر (۲/۱۰ گرم) در غلظت‌های ترکیبی ۱/۰۸ و ۱/۰۸ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin پیشنهاد شده است (شکل ۴c). اثر Kin بر وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه به صورت خطی بود (شکل ۴b). افزایش غلظت Kin از صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش وزن تر کالوس شد. درحالی‌که افزایش غلظت NAA تا

۱ میلی‌گرم در لیتر وزن تر کالوس افزایش یافته است. اما با در غلظت‌های بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر وزن تر کالوس کاهش می‌یابد. برهمکنش 2,4-D در غلظت‌های پایین‌تر از ۱ میلی‌گرم در لیتر با غلظت‌های نزدیک به ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin اثر مشخص و معنی‌داری در افزایش وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه برگ داشت (شکل ۴a). به این ترتیب که بیشترین میزان وزن تر (۲/۱۵ گرم) پیش‌بینی شده کالوس در غلظت‌های ترکیبی ۰/۸۸ و ۱/۱۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin مشاهده شد (شکل ۴c). اثر Kin و 2,4-D بر وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه به ترتیب خطی و درجه ۲ است (شکل ۴b). نتایج حاضر نشان داد که به موازات افزایش غلظت Kin از صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر وزن تر کالوس افزایش یافت. اما بالا رفتن غلظت 2,4-D از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش وزن تر شده، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش تدریجی وزن تر کالوس می‌شود. وزن تر کالوس



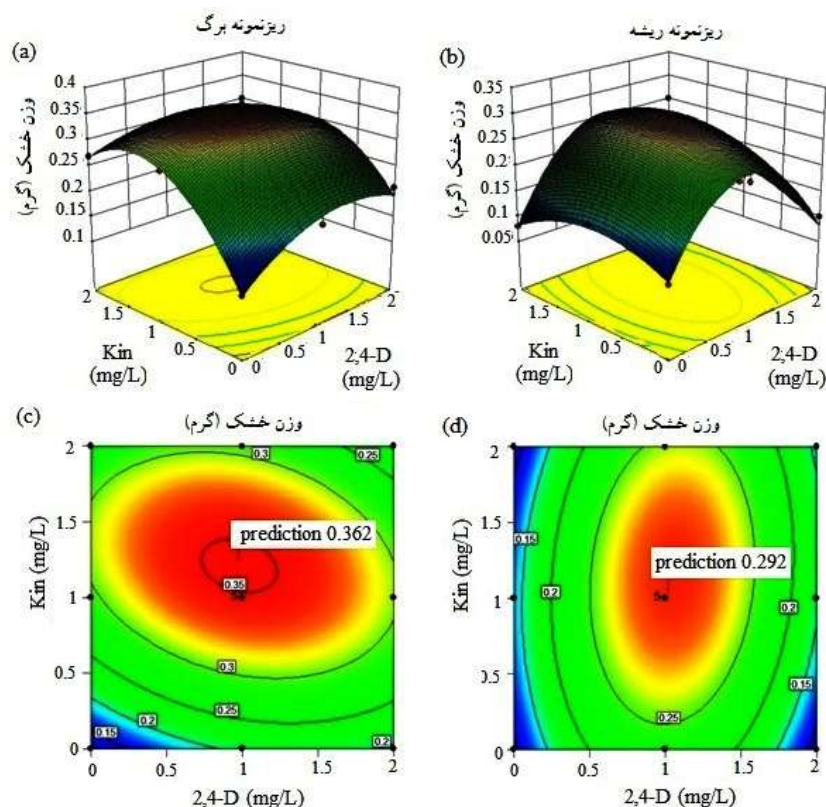
شکل ۵- نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, NAA) بر وزن تر حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

داشته باشد. بیشینه مقدار وزن خشک پیش‌بینی شده (۰/۳۵ گرم) مربوط به برهمکنش 2,4-D و Kin به ترتیب در غلظت‌های ۰/۹۷ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۶c). اثر افزایش غلظت 2,4-D از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر در افزایش وزن خشک کالوس حاصل از ریشه بسیار بالا بود. اگرچه این اثر در مورد Kin چندان محسوس نبود. با این وجود برهمکنش Kin در محدوده غلظتی ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر با غلظت‌های بسیار نزدیک به ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D افزایش وزن خشک کالوس را به همراه داشت (شکل ۶b). بیشترین وزن خشک پیش‌بینی شده (۰/۲۹ گرم) برای کالوس حاصل از ریشه در غلظت‌های ترکیبی ۱/۰۲ و ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin مشاهده شد (شکل ۶d).

افزایش غلظت NAA از صفر تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و افزایش غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه برگ را به همراه داشت. اما

۱/۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش وزن تر کالوس را سبب شد و پس از آن میزان این شاخص را کاهش داد. استفاده از غلظت‌های بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با غلظت‌های کمتر از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث افزایش وزن تر کالوس شد. براساس نتایج حاصل از شکل ۵d می‌توان پیش‌بینی کرد که در غلظت ۰/۹۵ و ۱/۹۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA بیشترین وزن تر (۱/۸ گرم) کالوس قابل دستیابی است.

همچنین براساس نتایج به دست آمده، افزایش غلظت Kin و 2,4-D از صفر تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش وزن خشک کالوس حاصل از برگ شد (شکل ۶a). اگرچه اثر تغییرات غلظت Kin نسبت به 2,4-D در افزایش وزن تر مشخص‌تر است. با این وجود افزایش غلظت هیچ یک از دو تنظیم‌کننده رشد مذکور از ۱/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر نتوانست اثر محسوسی بر میزان وزن خشک کالوس حاصل از برگ

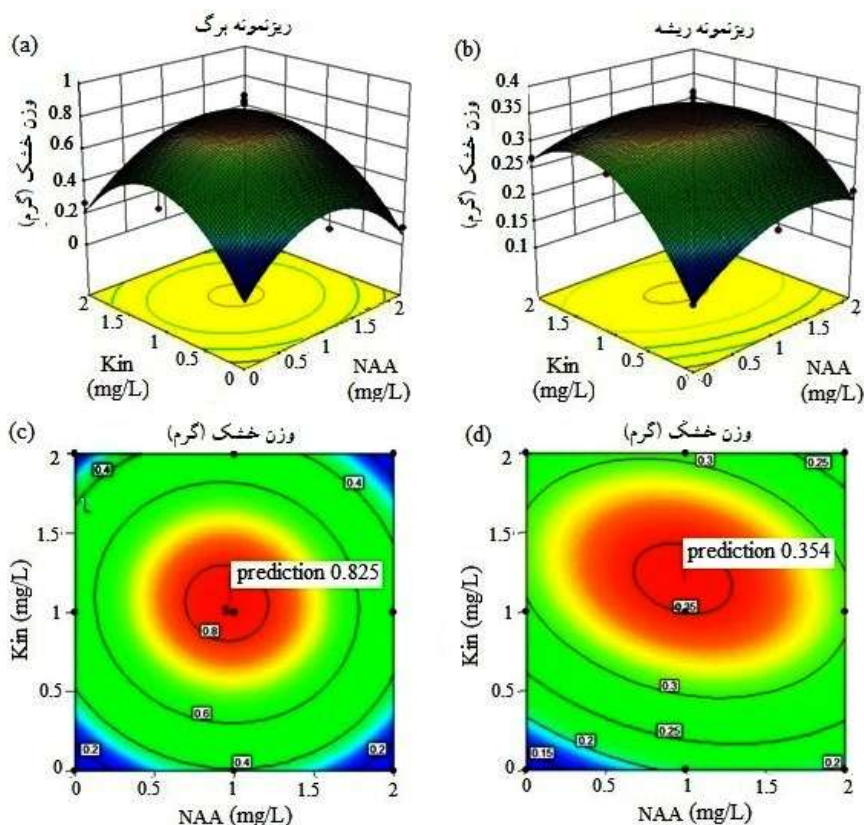


شکل ۶- نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, 2,4-D) بر وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

اعتبارسنجی مدل: این مطالعه با هدف بهینه‌سازی کشت بافت گیاه سرخارگل به منظور یافتن غلظت‌هایی از تنظیم‌کننده‌های رشد که سبب تحریک بیشترین درصد کالوس‌زایی و تولید بیشترین میزان وزن تر و خشک شود، صورت گرفت (جدول ۷ و ۸). فرآیند بهینه‌سازی نشان داد که تیمار ریزنمونه برگ با مقادیر ۱/۱۵ و ۱/۰۷ میلی‌گرم در لیتر Kin و 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی (۸۱/۶۹٪)، وزن تر (۲/۱۳ گرم) و وزن خشک (۰/۳۵ گرم) را سبب می‌شود. همچنین بالاترین درصد کالوس‌زایی (۷۳/۰۷٪)، وزن تر (۲/۰۷ گرم) و وزن خشک (۰/۲۶ گرم) از ریز نمونه ریشه در تیمار ۱/۹۵ و ۱/۱۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و 2,4-D به دست آمده است (جدول ۷). از طرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که تیمار ریز نمونه برگ با غلظت‌های ۰/۹۴ و ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA سبب تحریک بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۸/۷۸٪)، وزن تر (۲/۰۴ گرم) و وزن خشک (۰/۸ گرم) می‌شود. ریزنمونه ریشه نیز در

زمانی که غلظت Kin بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر بود، وزن خشک کالوس کاهش نامحسوسی یافت. از طرفی برهمکنش این دو تنظیم‌کننده رشد با یکدیگر در غلظت‌های نزدیک به ۱ میلی‌گرم در لیتر توانست اثر افزایشی مشخصی بر میزان وزن خشک کالوس داشته باشد (شکل ۷a). بر این اساس بیشترین وزن خشک کالوس پیشنهاد شده توسط مدل معادل ۰/۸۲ گرم بوده که در غلظت‌های ترکیبی ۰/۹۸ و ۱/۰۷ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA مشاهده شد (شکل ۷c). افزایش هر دو تنظیم‌کننده رشد تا ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه و افزایش غلظت از ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر کاهش وزن خشک آن را به همراه داشت (شکل ۷b). بیشترین میزان وزن خشک کالوس (۰/۳۵ گرم) در غلظت ۰/۹۹ و ۱/۲۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA به دست آمد (شکل ۷d).

بهینه‌سازی غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد و



شکل ۷- نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, NAA) بر وزن خشک حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

جدول ۷- بهینه سازی درصد کالوس زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*) در تیمار Kin و 2,4-D

| ریزنمونه | 2,4-D (mg/L) | Kin (mg/L) | کالوس زایی (%) | مطلوبیت | وزن تر (گرم) | وزن خشک (گرم) |
|----------|--------------|------------|----------------|---------|--------------|---------------|
| برگ | ۱/۰۷ | ۱/۱۵ | ۸۱/۶۹ | ۸۰ | ۲/۱۳ | ۰/۳۵ |
| ریشه | ۱/۱۱ | ۱/۹۵ | ۷۳/۰۷ | ۷۲ | ۲/۰۷ | ۰/۲۶ |

جدول ۸- بهینه سازی درصد کالوس زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*) در تیمار Kin و NAA

| ریزنمونه | NAA (mg/L) | Kin (mg/L) | کالوس زایی (%) | مطلوبیت | وزن تر (گرم) | وزن خشک (گرم) |
|----------|------------|------------|----------------|---------|--------------|---------------|
| برگ | ۱/۰۷ | ۱/۱۵ | ۹۸/۷۸ | ۸۹ | ۲/۰۴ | ۰/۸ |
| ریشه | ۱/۱۱ | ۱/۹۵ | ۷۰/۹۶ | ۸۷ | ۱/۷۳ | ۰/۳۵ |

بحث

در این تحقیق برای اولین بار از RSM به منظور مدل سازی و بهینه سازی تولید کالوس و وزن تر و خشک سرخارگل

تیمار با غلظت ۱/۳۲ و ۱/۲۴ میلی گرم در لیتر Kin و NAA بالاترین درصد کالوس زایی (۷۰/۹۶٪)، بیشترین وزن تر و خشک (به ترتیب ۱/۷۳ و ۰/۳۵ گرم) را نشان داد (جدول ۸).

دو تنظیم‌کننده رشد از دیگر فاکتورهای قابل توجه است (Rout *et al.*, 2000). با وجود کاربرد فراوان اکسین و سایتوکینین در تولید کالوس، اطلاعات اندکی در ارتباط با مکانیسم مولکولی این دو تنظیم‌کننده رشد وجود دارد (Ikeuchi *et al.*, 2013). نتایج Yordanove و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که اثر اکسین بر تولید کالوس از طریق تأثیر این تنظیم‌کننده رشد بر چرخه سلولی است. به این ترتیب که با فعال‌شدن مسیر ترانسسانی اکسین توسط فاکتورهای رونویسی ARF7 و ARF19 برخی از فاکتورهای رونویسی خانواده Boundaries Domain (Lateral Organ) که در پایین‌دست ARF قرار دارد، فعال‌شده و بعد از فعال‌کردن مسیرهای پایین‌دست خود در نهایت باعث تشکیل کالوس می‌شوند (Fan *et al.*, 2018). اگر چه مکانیسم تشکیل کالوس با واسطه سایتوکینین کمتر شناخته شده است، اما به نظر می‌رسد که سایتوکینین با فعال‌سازی سایکلین‌های چرخه سلولی به‌ویژه CYCD3;1 باعث تشکیل کالوس شود (Dewitte *et al.*, 2003).

تاکنون گزارش‌های اندکی در ارتباط با اثر نوع ریزنمونه بر تولید بیومس (وزن خشک و تر) کالوس حاصل از سرخارگل ارغوانی منتشر شده است. نتایج حاضر نشان داد که بالاترین میزان وزن تر در کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت حاوی Kin و 2,4-D قابل مشاهده است. بیشترین میزان وزن خشک نیز در کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه و در تیمار با NAA و Kin به‌دست آمد. اما نتایج تحقیق Rabie و همکاران (۲۰۰۷) بر روی تولید کالوس از سه نوع ریزنمونه (برگ، لپه‌ای، جوانه و ریشه‌چه) نشان داد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ‌های لپه‌ای بالاترین میزان بیومس را تولید کردند. اما گزارش‌های دیگری نشان داد که ریزنمونه ساقه در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر zip و IBA قادر به تولید بالاترین میزان بیومس است (Butiuc-*et al.*, 2012). تاکنون اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان تولید بیومس در برخی گونه‌های آفتابگردان نیز نشان داده شده است (Janarthanam *et al.*, 2010). اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر بیومس گیاه به تعداد و نوع

ارغوانی استفاده شده است. این تکنیک دارای دو مزیت مهم نسبت به طرح فاکتوریل دارد. اول آنکه به محقق این امکان را می‌دهد که اثر برهمکنش متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های فرآیند را بررسی کند و دیگر آنکه می‌توان تعداد اجرای آزمایش‌ها را نسبت به طرح فاکتوریل کاهش داد.

داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی در برهمکنش NAA و Kin در ریزنمونه برگ صورت می‌گیرد. تاکنون گزارش‌های اندکی در ارتباط با تولید کالوس از گیاه سرخارگل ارغوانی منتشر شده است. نتایج Zebarjadi و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل تفاوت معنی‌داری را در تولید کالوس نشان می‌دهند. همچنین این محققین نشان دادند که نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد نیز بر میزان کالوس‌زایی مؤثر بوده و بالاترین درصد کالوس‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز غلظت ۰/۲ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA مشاهده می‌شود. اما مطالعات دیگر نشان دادند که میزان کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف Kin و 2,4-D بیشتر از محیط‌کشت حاوی NAA و Kin است (Coker and Camper, 2000). از طرفی دیگر Korocho و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تیمار ریزنمونه برگ با غلظت‌های ۴/۴۴ و ۰/۰۵۴ میکرومولار از BAP و NAA سبب تحریک کالوس‌زایی به‌میزان ۱۰۰٪ می‌شود. همچنین این محققان نشان دادند که محیط‌کشت ۱/۲ MS بهتر از محیط‌کشت MS در تحریک تولید کالوس از ریزنمونه برگ سرخارگل ارغوانی است که این نتایج با تحقیق حاضر همخوانی دارد. تولید کالوس در گیاهان مختلف به فاکتورهای مختلفی نظیر نوع و سن ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بکار رفته وابسته است. اما تاکنون گزارشی در خصوص کالوس‌زایی از ریزنمونه ریشه سرخارگل ارغوانی منتشر نشده است و نتایج حاضر اولین گزارش در خصوص تولید کالوس از ریزنمونه ریشه است. حضور یک تنظیم‌کننده رشد اکسینی و یک تنظیم‌کننده رشد سایتوکینینی در محیط‌کشت برای تولید کالوس ضروری بوده و تعادل بین این

آمده تیمار ریزنمونه برگ با غلظت ۱/۰۵ و ۰/۹۴ میلی گرم در لیتر NAA و Kin سبب بالاترین درصد کالوس زایی (۹۸/۷۸٪) و بیشترین میزان وزن خشک (۰/۸ گرم) کالوس حاصل از آن می شود. استفاده از RSM ضمن آنکه سبب صرفه جویی در زمان و امکانات آزمایشگاهی خواهد شد، داده های ارزشمندی را تولید می کند که می توان از آن جهت تحریک کالوس زایی و به دنبال آن تولید متابولیت های ثانویه با ارزش در مقیاس بزرگ تر استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به دلیل حمایت مالی این تحقیق نهایت تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از دکتر محمد آرمین به دلیل همکاری در بخش آماری مقاله تشکر می شود.

گیرنده های اختصاصی آنها در بخش های مختلف گیاه بستگی دارد (Moore, 1988). همچنین نشان داده شده که تنظیم کننده های رشد گیاهی با اثر بر روی فتوسنتز (Costa et al., 2005) و فعالیت برخی از آنزیم ها مانند نیترات ردوکتاز در میزان تولید بیومس گیاه نقش دارند (Sosnowski et al., 2017).

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار بهینه سازی تولید کالوس و بیومس از دو نوع ریزنمونه برگ و ریشه گیاه سرخارگل ارغوانی در تیمارهای مختلف Kin، 2,4-D و NAA با استفاده از RSM مورد بررسی قرار گرفته است. بعد از آنالیزهای دقیق آماری و با استفاده از مدل های ریاضی ایجاد شده، بهترین غلظت تنظیم کننده های رشد به منظور تولید بالاترین درصد کالوس زایی و بیومس پیش بینی شد. با توجه به نتایج به دست

منابع

- Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S. and Phillipson, J. D. (2005) Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): A review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 929-954.
- Bas, D. and Boyaci, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78: 836-845.
- Box, G. E. and Wilson, K. B. (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 13: 1-38.
- Butiu-Keul, A. L., Vlase, L., and Craciunas, C. (2012) Clonal propagation and production of cichoric acid in three species of Echinaceae. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48: 249-258.
- Choffe, K. L., Murch, S. J. and Saxena, P. K. (2000) Regeneration of *Echinacea purpurea*: Induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants. *Plant cell, tissue and organ culture* 62: 227-234.
- Coker, P. S. and Camper, N. D. (2000) In vitro culture of *Echinacea purpurea* L." *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 74: 1-7.
- Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A. R. and Martinez, G. A. (2005) Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20° C. *Postharvest Biology and Technology* 35: 191-199.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J. S., Jacqard, A., Kilby, N. J. and Murray, J. A. (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *The Plant Cell* 15: 79-92.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K. and Hu, Y. (2018) Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in Arabidopsis regeneration. *Cell Research* 22: 1169-1180.
- Hudson, J. B. (2011) Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. *BioMed Research International* 1-16.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25: 3159-3173.
- Janarthnam, B., Gopalakrishnan, M. and Sekar, T. (2010) Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertonii. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 45: 243-248.
- Koroch, A., Juliani, H. R., Kapteyn, J. and Simon, J. E. (2013) In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 79-83.

- Lee, T. T., Huang, C. C., Shieh, X. H., Chen, C. L., Chen, L. J. and Yu, B. I. (2010) Flavonoid, phenol and polysaccharide contents of *Echinacea purpurea* L. and its immunostimulant capacity in vitro. *International Journal of Environmental Science and Development* 1: 5-9.
- McGregor, R. L. (1968) The taxonomy of the genus *Echinacea* (Compositae). *The University of Kansas Science Bulletin* 48: 113-142.
- Manayi, A., Vazirian, M. and Saeidnia, S. (2015) *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews* 9: 63-72.
- Moore, T. C. (1988) *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer Science and Business Media, New York.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Niedz, R. P., Hyndman, S. E., Evens, T. J. and Weathersbee, A. A. (2014) Mineral nutrition and in vitro growth of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 50: 458-470.
- Percival, S. S. (2000) Use of *Echinacea* in medicine. *Biochemical Pharmacology* 60: 155-158.
- Prasad, R. S., Rao, K. R. H. and Kantha, D. R. (2011) Software reliability measuring using modified maximum likelihood estimation and SPC. *International Journal of Computer Applications* 21: 1-5.
- Rabie, K. A., Abderassoul, M. and Manaf, H. H. (2007) Influence of culture conditions on biomass formation in callus culture of *Echinacea purpurea*. *J. Journal of Agricultural Science, Mansoura University* 32: 6249-6257.
- Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants." *Biotechnology Advances* 18: 2:91-120.
- Sheng, X. W., Kuang, X. Y., Li, P. and Tang, K. T. (2013) Analyzing and modeling the interaction potential of the ground-state beryllium dimer. *Physical Review A* 88: 022517-1-022517-6.
- Sosnowski, J., Malinowska, E., Jankowski, K., Krol, J. and Redzik, P. (2017) An estimation of the effects of synthetic auxin and cytokinin and the time of their application on some morphological and physiological characteristics of *Medicago x varia* T. Martyn. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26: 66-73.
- Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L. and Zhang, Y. (2006) Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 53: 101-104.
- Yordanov, Y. S., Regan, S. and Busov, V. (2010) Members of the lateral organ boundaries domain transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in *Populus*. *The Plant Cell* 22: 3662-3677.
- Zebarjadi, A., Motamedi, J. and Ismaili, A. (2011) Indirect shoot regeneration of Iranian purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) from cotyledon and hypocotyl explants. *Acta Agronomica Hungarica* 59: 65-72.

Application of response surface methodology for optimization of callus production purple coneflower plant (*Echinacea purpurea*)

Rezvan Ramezannezhad, Mahnaz Aghdasi* and Mohammad Fatemi

Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran
(Received: 09/05/2019, Accepted: 12/02/2020)

Abstract

Echinacea purpurea belongs to the family of Asteraceae which has different medicinal properties. The main goal of current research was optimization of callus induction and biomass production by using Response Surface Method (RSM). For this purpose, root and leaf explants were cultured in the ½ MS medium supplemented with different concentrations (0, 1 and 2 mg/L) of Kin either alone or with 2,4-D and NAA. Also, callus production and biomass were considered as dependent variable and different concentrations of plant growth regulators were used as optimizing parameters. At the same time, Central Composite Design was used for optimization of callus production parameters. Correlation analysis of regression model determined a polynomial second degree which was used for optimizing of callus induction and biomass production. The obtained data showed that both root and leaf explants produced callus in the all investigated treatments. But the highest amount of callus induction and biomass production was achieved in leaf derived callus in medium containing 1.05 and 0.94 mg/L NAA and Kin, respectively. On the other hand, the maximum fresh weight was obtained in leaf derived callus in medium supplemented with 1.07 and 1.15 mg/L 2,4-D and Kin. The current results were almost in consistency with predicted data. The fit model was suitable and RSM was successful for optimization of callus induction and biomass production.

Key words: Response surface methodology, Depended variable, Independed variable, Explant, Model fit

Corresponding author, Email: m.agdasi@gu.ac.ir