مقاله پژوهشی

استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ به‌منظور بهینه‌سازی کشت کالوس گیاه 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 محیط‌کشت 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) به‌منظور 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 هردو 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 محیط‌کشت حاوی ۱/۰۵ و ۰/۹٤ 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 2,4-D وKin مشاهده شد. در مجموع نتایج حاصل تاحدود زیادی با داده‌های پیش‌بینی‌شده همخوانی دارد. برازش مدل مناسب بوده و روش‌شناسی سطح پاسخ به‌منظور بهینه‌سازی کالوس‌زایی و تولید بیومس در گیاه سرخارگل ارغوانی موفق بوده است.

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

مقدمه

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 آن مشتقات کافئیک اسید به‌ویژه شیکوریک اسید، آلکامیدها، کتوآلکن‌ها، 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

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

درنتیجه 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 پرفروش‌ترین 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 تاحدود زیادی می‌تواند به رفع مشکلات ذکرشده 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) (۱۹٦۲) 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 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 SurfaceMethodology (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 Benkcen Design; BBD) و دهلرت (Dehlort) صورت می‌گیرد. در بین روش‌های ذکرشده 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 (وزن‌تر و خشک) به‌عنوان متغیر پاسخ (متغیر وابسته) و غلظت‌های مختلف

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌عنوان پارامترهای بهینه‌سازی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

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

تولید کالوس: از گیاهچه‌های استریل ٤٥ 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) به‌منظور 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 به‌همراه 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: به‌منظور نگهداری گیاهچه استریل و همچنین کالوس حاصل از آن از اتاقک رشد با دمای ۲±۲٤ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی (با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس) و هشت ساعت تاریکی استفاده شد.

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

طراحی آزمایش: به‌منظور 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 وزن‌تر و خشک در هر نوع ریزنمونه قابل ارزیابی است. اثر متغیرهای مستقل شامل X_1:Kin و X_2:2,4-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 به‌صورت Face centered در نظر گرفته شد. آزمایشات به‌منظور کاهش تأثیرات عوامل ناشناخته بیرونی به‌صورت تصادفی اجرا شدند. همچنین از آنالیز واریانس (ANOVA) به‌منظور آنالیز داده‌ها استفاده شد. اعتبار و دقت مدل‌ها توسط ضریب تعیین R^2، ضریب تعیین تعدیل‌شده ($R^2_{adjusted}$) و ضریب تعیین پیش‌بینی‌شده ($R^2_{predict}$) آنالیز شد. بعد از برازش مدل، داده‌های حاصل به‌منظور رسم نمودارهای بهینه‌سازی سه بعدی و کانتور (Countor) مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز طرح مرکب مرکزی: به‌منظور تعیین بهترین مدل رگرسیون، بررسی متغیرهای مستقل (غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد) ضروری به‌نظر 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.

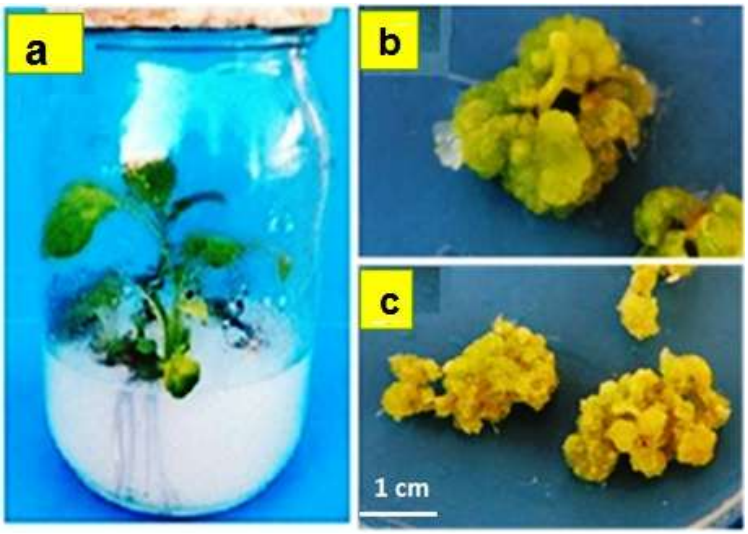
رابطه (۱)

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

در رابطه ذکرشده Y نشان‌دهنده پاسخ، $\beta_{1,2,\ldots,K}$ نشان‌دهنده ضرایب متغیرها و $X_{1,2,\ldots,i}$ 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]



شکل ۱- a: گیاهچه استریل ٤٥ روزه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*)، b: کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت MS ۱/۲ حاوی ۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، c:کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه در محیط‌کشت MS ۱/۲ حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin.

نتایج

در این تحقیق از گیاهچه استریل ٤٥ روزه به‌عنوان منبع ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی استفاده شد (شکل a ۱). 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 b,c ۱).

در ادامه به‌منظور تعیین غلظت‌های بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد جهت تولید بیشترین درصد کالوس‌زایی و نیز بیوماس (وزن تر و خشک) ازریزنمونه برگ و ریشه گیاه سرخارگل ارغوانی از RSM استفاده شد. مقادیر کدنشده غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت MS ۱/۲ 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 ٤ با استفاده از واحدهای کدنشده به‌ترتیب 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)

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

رابطه (۳)

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

رابطه (٤)

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

رابطه‌های ۵ تا ۷ با استفاده از واحدهای کدنشده 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)

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

رابطه (٦)

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

رابطه (۷)

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

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

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

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

همچنین رابطه‌های ۸ تا ۱۰ به‌ترتیب 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 انتخابی برای پیش‌بینی درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه در محیط دارای NAA و Kin است.

رابطه (۸)

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

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

تیمار	2,4-D (mg/L)	Kin (mg/L)	ریزنمونه برگ						ریزنمونه ریشه					
			کالوس‌زایی (٪)		وزن تر (گرم)		وزن خشک (گرم)		کالوس‌زایی (٪)		وزن تر (گرم)		وزن خشک (گرم)	
			P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
۱	۰	۰	۷۰/۷۲	٦٦/٦٦	۱/۳۱	۱/۳	۰/۱۲	۰/۱۲	٤۰/۳	٤٤/٤٤	۱/۲٦	۱/۲۹	۰/۰۹	۰/۰۹
۲	۲	۰	۵۰/۳۵	۵۰	۱/۱۷	۱/۲۳	۰/۱۹	۰/۲۱	۵۰/۳۵	۵۰	۱/۲۷	۱/۳۲	۰/۰۸	۰/۱
۳	۰	۲	۵۹/٦	٦۱/۱	۱/٦۹	۱/٦۹	۰/۲۷	۰/۲۷	۷۰/۷۲	٦٦/٦٦	۱/٦۸	۱/٦۷	۰/۰۸	۰/۰۸
٤	۲	۲	۹٤/۸	۱۰۰	۱/۲۸	۱/۳۵	۰/۲۱	۰/۲۳	۹٤/۸	۱۰۰	۱/۸۷	۱/۸۹	۰/۱٤	۰/۱٦
۵	۰	۱	۹٤/٤٤	۱۰۰	۱/۹۰	۱/۹۱	۰/۲۹	۰/۲۹	۷۰/۷۲	٦٦/٦٦	۱/۳٦	۱/۳٤	۰/۱۳	۰/۱٤
٦	۲	۱	۱۰٤/۸۵	۱۰۰	۱/٦۳	۱/٤۹	۰/۳	۰/۲۷	۱۰٤/۸۵	۱۰۰	۱/٤٦	۱/۳۹	۰/۱٦	۰/۱۲
۷	۱	۰	٤۰/۰۳	٤٤/٤٤	۱/٦۰	۱/۵۵	۰/۲۱	۰/۱۹	٤٤/٤٤	٤۰/۰۳	۱/۵۸	۱/۵	۰/۲۳	۰/۲۲
۸	۱	۲	۵٦/۷	۵۰	۱/۸۵	۱/۷۷	۰/۲۹	۰/۲۷	۵٦/۷	۵۰	۲/۰۸	۲/۰۷	۰/۲٦	۰/۲٤
۹	۱	۱	۸۰/٦۵	٦٦/٦٦	۲/۱۳	۲/۱۲	۰/۳۵	۰/۳۷	۸۰/٦۵	٦٦/٦٦	۱/۷۲	۱/۸	۱/۷۲	۰/۳۳
۱۰	۱	۱	۸۰/٦۵	۸۳/۳۳	۲/۱۳	۲/۱۷	۰/۳۵	۰/۳۵	۸۰/٦۵	۸۳/۳۳	۱/۷۲	۱/۷٦	۱/۷۲	۰/۳
۱۱	۱	۱	۸۰/٦۵	۷۷/۷۷	۲/۱۳	۲/۲۳	۰/۳۵	۰/۳	۸۰/٦۵	۷۷/۷۷	۱/۷۲	۱/۷۳	۱/۷۲	۰/۲۹
۱۲	۱	۱	۸۰/٦۵	۷۷/۷۷	۲/۱۳	۲/۱۹	۰/۳۵	۰/۳۸	۸۰/٦۵	۵۰	۱/۷۲	۱/۷۹	۱/۷۲	۰/۲۹
۱۳	۱	۱	۸۰/٦۵	۱۰۰	۲/۱۳	۲/۰۹	۰/۳۵	۰/۳۹	۸۰/٦۵	۱۰۰	۱/۷۲	۱/٦۳	۱/۷۲	۰/۲۸

A: Actual, P:Predicted

رابطه (۹)

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

رابطه (۱۰)

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

رابطه (۱۱)

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

رابطه (۱۲)

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

رابطه (۱۳)

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

آنالیزهای آماری: آنالیز واریانس (ANOVA) مدل‌های نشان داده‌شده در بخش قبلی نشان‌دهنده ارتباط بین اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های مورد بررسی است. مقدار P نشان‌دهنده معنی‌داری هر مدل است. براساس جدول ٤ 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 ٤ مناسب است. در مورد مدل‌های انتخابی در این پژوهش، میزان دقت برآورد بیش از ٤ بوده است. مقادیر R^2 (ضریب تعیین) و R^2_{adj} (ضریب تعیین تعدیل‌شده) برای هر مدل در جدول ۵ و ٦ قابل‌مشاهده است. به‌طورمعمول R^2_{adj} از R^2 کوچک‌تر و نزدیک به آن است. بالابودن مقدار آنها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن بالای مدل‌ها است. زمانی‌که یک مدل رگرسیون بتواند ارتباط عملکردی بین متغیرهای مستقل و پاسخ را به‌خوبی توضیح دهد، آزمون فقدان برازش (Lack of

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

جدول ٤- خلاصه آنالیز واریانس (ANOVA) برای مدل‌های نشان داده‌شده در معادلات ۲تا 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)	٤٣٦٦/١٦	٥	٨٧٣/٢٣	٨/٣٢	٠/٠٠٧*	٩/٣١
	برازش مدل	١٤١/٣٦	٣	٤٧/١٢	٠/٣٢	٠/٨١ ns	
	FW(2,4-D,Kin)	١/٥١	٥	٠/٣١	٤٠/٦٢	٠/٠٠٠١>*	١٦/٨١
	برازش مدل	٠/٠٤	٣	٠/٠١	٤/٤٥	٠/٠٩ ns	
	DW(2,4-D,Kin)	٠/٠٦	٥	٠/٠١	١٣/٢١	٠/٠٠١*	١٠/١٥
	برازش مدل	٢/٦٥٧E-٠٠٣	٣	٨/٨٥٨E-٠٠٤	٠/٧٨	٠/٥٦ ns	
	CI(NAA,Kin)	٣٩٦٣/٠٥	٥	٧٩٢/٦١	٤/١٥	٠/٠٤*	١٠/٢٣
	برازش مدل	٤٤٧/٨٥	٣	١٤٩/٢٨	٠/٦٧	٠/٦١ ns	
	FW(NAA,Kin)	١/٠٨	٥	٠/٢٢	٢٥/٥٧	٠/٠٠٠٢**	٦/١٧
	برازش مدل	٠/٠٣	٣	٠/٠١	١/٨٦	٠/٢٧ ns	
	DW(NAA,Kin)	١/١٥	٥	٠/٢٣	١٧/٤٩	٠/٠٠٠٨*	٨/٥٢
	برازش مدل	٠/٠٥	٣	٨/٣٥٠E-٠٠٣	٢/٣٤	٠/٢١ ns	
ریشه	CI (2,4-D,Kin)	٣٨٤٣/٨٣	٥	٧٦٨/٧٧	٤/٥٣	٠/٠٣**	٦/١٤
	برازش مدل	٥١٠/٨٧	٣	١٧٠/٢٩	١	٠/٤٧ ns	
	FW(2,4-D,Kin)	٠/٦٨	٥	٠/١٤	٢٦/٣٦	٠/٠٠٠٢*	١٦/٨٤
	برازش مدل	٠/٠١	٣	٥/٦٨٧E-٠٠٣	١/٢٤	٠/٤ ns	
	DW(2,4-D,Kin)	٠/٠٩	٥	٠/٠١	٣٠/٨	٠/٠٠٠١*	١٢/٤١
	برازش مدل	٢/٨٤٤E-٠٠٣	٥	٩/٤٨١E-٠٠٤	٢/٥٦	٠/١٩ ns	
	CI(NAA,Kin)	٣٥٣٤/٠٣	٥	٧٠٦/٨١	٦/٦٤	٠/٠١*	١٠/٣٦
	برازش مدل	٢٢٦/١٣	٣	٧٥/٣٨	٠/٥٨	٠/٦٥ ns	
	FW(NAA,Kin)	٠/٣٦	٥	٠/٠٧	١٨/٥٢	٠/٠٠٠٧*	١٤/٢٩
	برازش مدل	٦/٥٦٠E-٠٠٣	٣	٢/١٨٧E-٠٠٣	٠/٤٣	٠/٧٤ ns	
	DW(NAA,Kin)	٠/٠٦	٥	٠/٠١	١٢/٢٧	٠/٠٠٢*	١٠/٥٣
	برازش مدل	٢/٨٠٨E-٠٠٣	٣	٩/٣٥٩E-٠٠٣	٠/٧٤	٠/٥٨ ns	

***و ** به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و ns عدم‌تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد.**

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

fit) آن معنی‌دار نیست. در مطالعه حاضر معنی‌دار نبودن فقدان برازش در تمام مدل‌های به‌دست آمده قابل مشاهده است.

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

نتایج به‌دست آمده نشان داده که افزایش غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه افزایش غلظت 2,4-D از ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب بالارفتن درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ می‌شود. درحالی‌که با افزایش غلظت Kin از ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه افزایش غلظت 2,4-D از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر کاهش تدریجی در کالوس‌زایی مشاهده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

جدول ۵- مقادیر R مدل‌های نشان داده‌شده در رابطه‌های ۲ تا ٤ 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	۰/۹٤	۰/۷٦	۰/۹	۰/۹٦	۰/۸۵
R^2_{adj}	۰/۹۲	۰/۹۱	۰/۵۹	۰/۸۳	۰/۹٤	۰/۷۵
R^2_{pre}	۰/۷۳	۰/۷۷	۰/۱۳	۰/٦۳	۰/۷۸	۰/۵۵

جدول ٦- 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	۰/۹٤	۰/۷٤	۰/۸۹
R^2_{adj}	۰/۸۲	۰/۸۷	۰/۷	۰/۹۱	۰/۵٦	۰/۸۲
R^2_{pre}	۰/٦۲	۰/۷۵	۰/٤٤	۰/٦۷	۰/۰٤	۰/٦۲

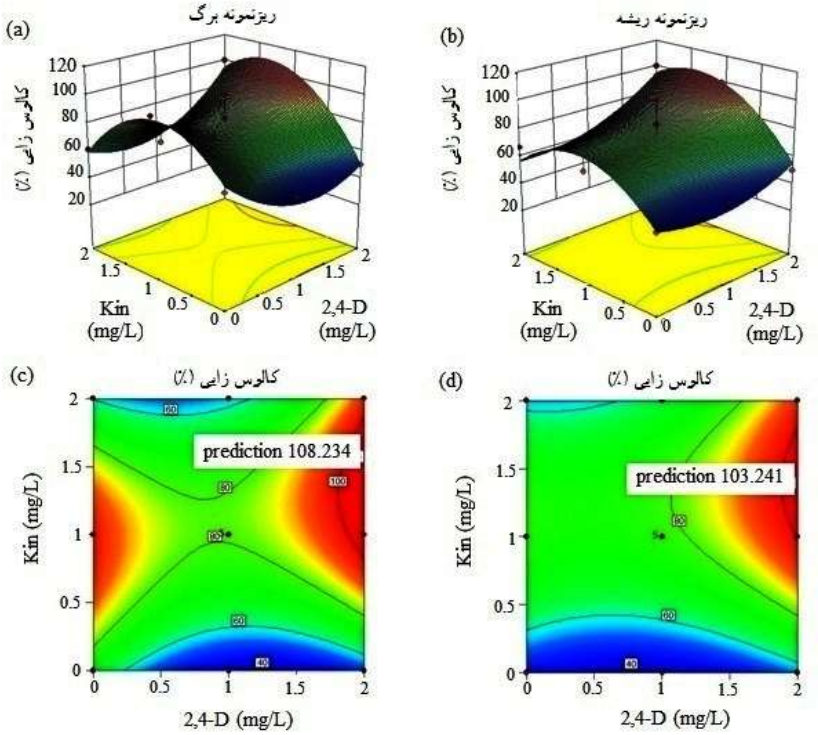
می‌شود (شکل ۲a). بیشترین درصد کالوس‌زایی پیش‌بینی شده (۱۰۸/۲٤٪) در غلظت ۱/۹۹ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۱/٤٤ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (شکل ۲c). همچنین تغییر غلظت Kin از صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه را به‌همراه داشته است. درحالی‌که با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده 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 (۱۰۳/٦۹٪) در غلظت‌های ترکیبی ۱/۹۸ و ۱/۲٦ 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 ۱/۲میلی‌گرم 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 ۱۰٦/۸۲٪ بوده که در غلظت‌های ۱/۹۹ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin مشاهده شد (شکل ۳d).

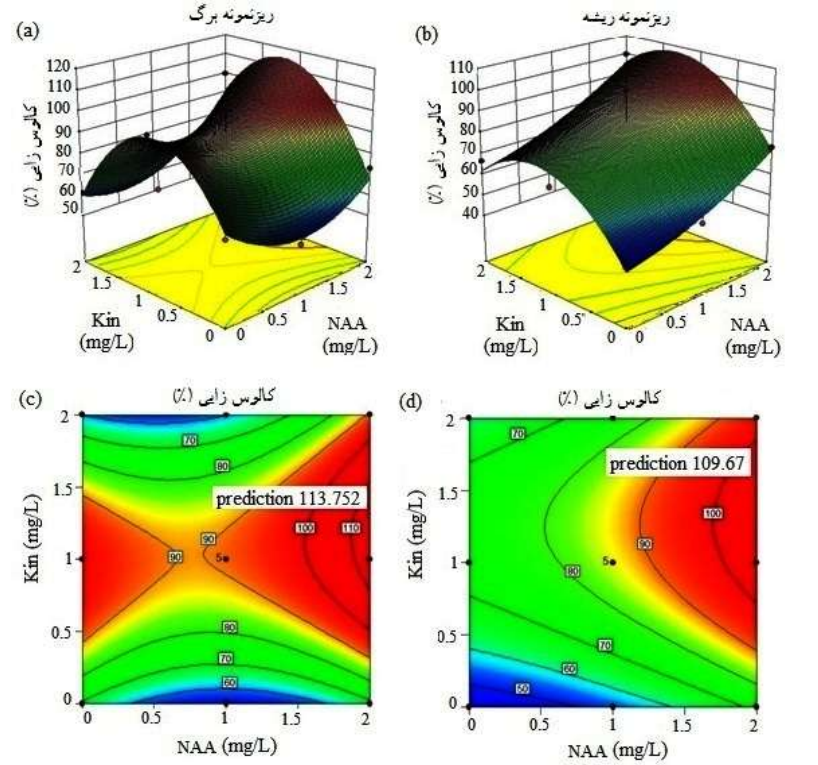
اثر هر یک از دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و Kin بر وزن تر کالوس حاصل از برگ از نوع درجه دوم است. به این ترتیب که با افزایش غلظت هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد از صفر تا

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]



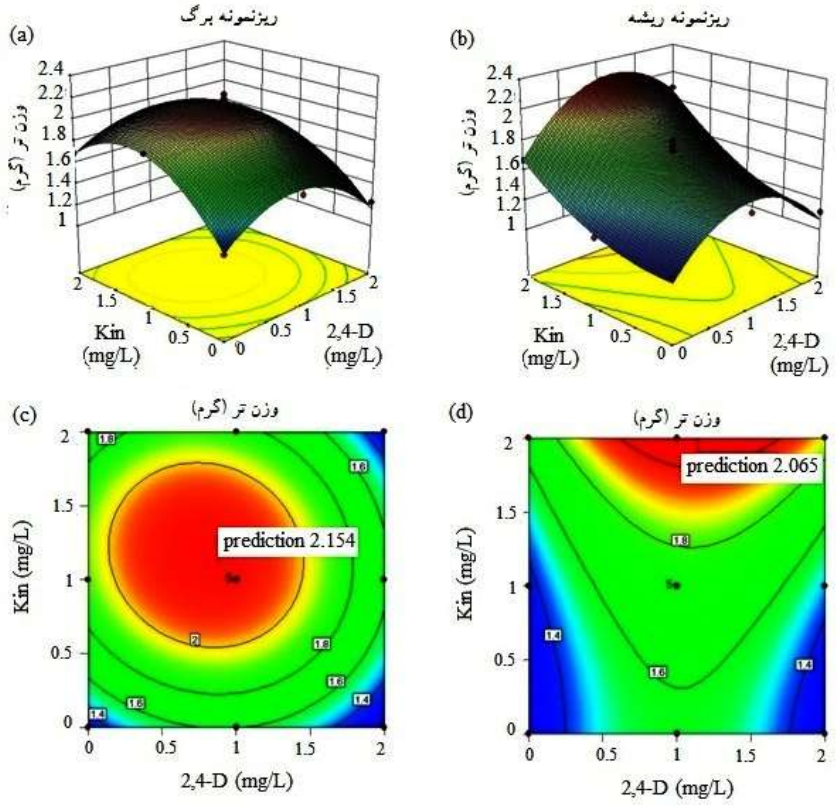
شکل ۲- نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی (a و c) و کانتور (b و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, 2,4-D) بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).



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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

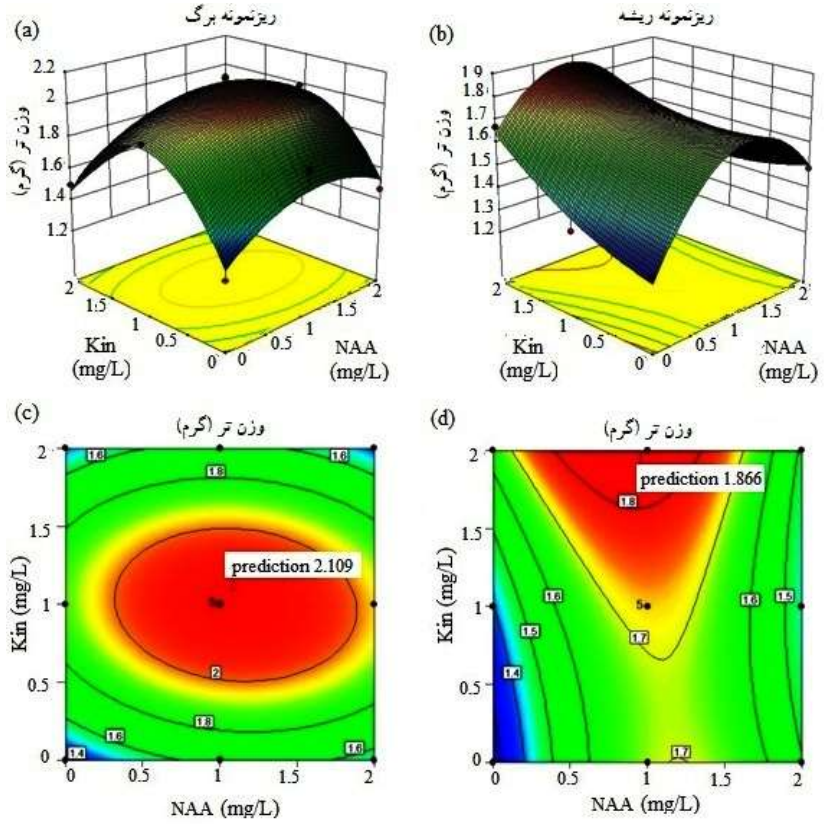


شکل ٤- نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, 2,4-D) بر وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

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 ٤a). 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 ٤c). اثر Kin و 2,4-D بر وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه به‌ترتیب خطی و درجه ۲ است (شکل ٤b). نتایج حاضر نشان داد که به‌موازات افزایش غلظت Kin از صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر وزن تر کالوس افزایش یافت. اما بالارفتن 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 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 ٤d).

اثر هر یک از دو تنظیم‌کننده رشد NAA و Kin بر میزان وزن‌تر کالوس حاصل از ریزنمونه برگ از نوع درجه دوم است (شکل ٥a). 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 ٥c). اثر Kin بر وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه به‌صورت خطی بود (شکل ٥b). افزایش غلظت Kin از صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش وزن تر کالوس شد. درحالی‌که افزایش غلظت NAA تا

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]



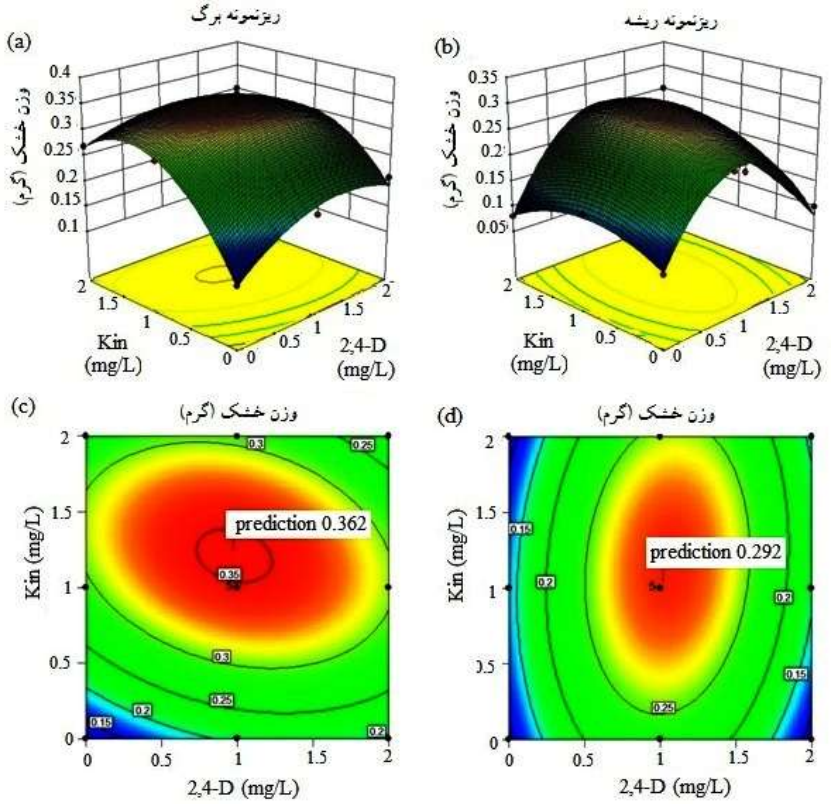
شکل ۵- نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, NAA) بر وزن تر حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

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 ۱/۹۸میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin بیشترین وزن تر (۱/۸گرم) کالوس قابل دستیابی است.

همچنین براساس نتایج به‌دست 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 ٦a). 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 داشته باشد. بیشینه مقدار وزن خشک پیش‌بینی شده (۰/۳۵ گرم) مربوط به برهمکنش 2,4-D و Kin به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۹۷ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ٦c). 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 به‌همراه داشت (شکل ٦b). 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 ٦d).

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 به‌همراه داشت. اما

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

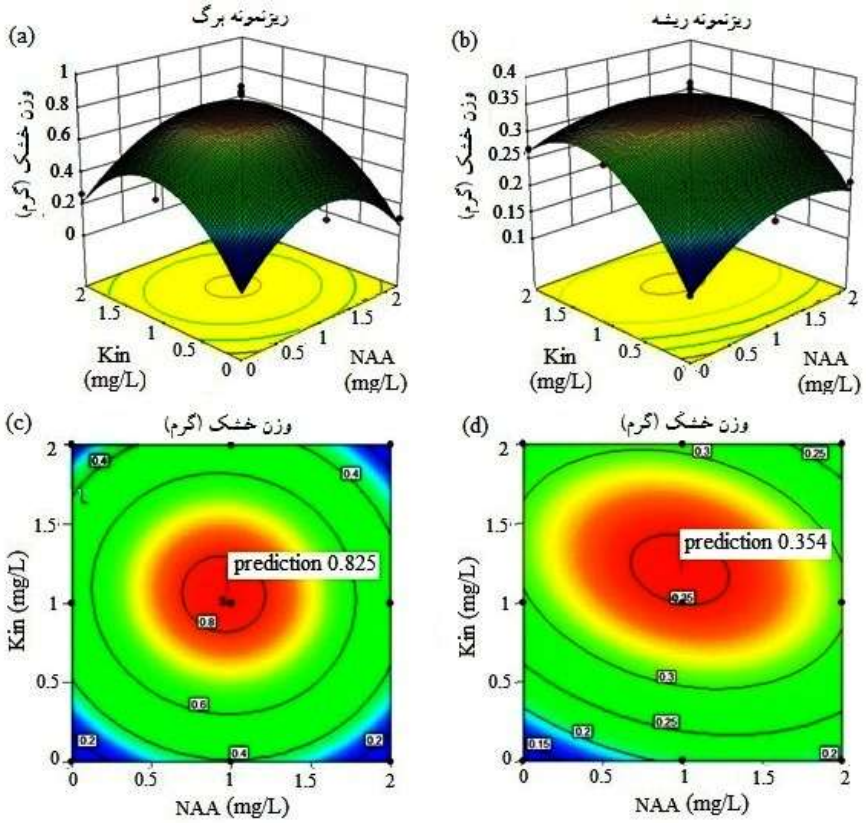


شکل ٦- نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی (a و b) و کانتور (c و d) اثر متغیرهای مستقل (Kin, 2,4-D) بر وزن خشک کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سرخارگل ارغوانی (*E. purpurea*).

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 پیشنهادشده توسط مدل معادل ۰/۸۲ گرم بوده که در غلظت‌های ترکیبی ۰/۹۸ و ۱/۰۷ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin 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 به‌همراه داشت (شکل ۷b). بیشترین میزان وزن خشک کالوس (۰/۳۵ گرم) در غلظت ۰/۹۹ و ۱/۲۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin به‌دست آمد (شکل ۷d).

بهینه‌سازی غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد و اعتبارسنجی مدل: این مطالعه با هدف بهینه‌سازی کشت‌بافت گیاه سرخارگل به‌منظور 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 (۸۱/٦۹ ٪)، 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 (۰/۲٦ گرم) از ریز نمونه ریشه در تیمار ۱/۹۵ و ۱/۱۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و 2,4-D به‌دست آمده است (جدول ۷). ازطرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که تیمار ریز نمونه برگ با غلظت‌های ۰/۹٤ و ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA سبب تحریک بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۸/۷۸٪)، وزن تر (۲/۰٤ گرم) و وزن خشک (۰/۸ گرم) می‌شود. ریزنمونه ریشه نیز در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]



شکل ۷- نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی (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- بهینه‌سازی درصد کالوس‌زایی، 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)	کالوس‌زایی	مطلوبیت	وزن تر	وزن خشک
			(٪)		(گرم)	
برگ	۱/۰۷	۱/۱۵	۸۱/٦۹	۸۰	۲/۱۳	۰/۳۵
ریشه	۱/۱۱	۱/۹۵	۷۳/۰۷	۷۲	۲/۰۷	۰/۲٦

جدول ۸- بهینه‌سازی درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس سرخارگل ارغوانی (E. purpurea) در تیمار Kin و NAA

ریزنمونه	NAA (mg/L)	Kin (mg/L)	کالوس‌زایی	مطلوبیت	وزن تر	وزن خشک
			(٪)		(گرم)	
برگ	۱/۰۷	۱/۱۵	۹۸/۷۸	۸۹	۲/۰٤	۰/۸
ریشه	۱/۱۱	۱/۹۵	۷۰/۹٦	۸۷	۱/۷۳	۰/۳۵

تیمار با غلظت ۱/۳۲ و ۱/۲٤ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA بالاترین درصد کالوس‌زایی (۷۰/۹٦٪)، بیشترین وزن تر و خشک (به‌ترتیب ۱/۷۳ و ۰/۳۵ گرم) را نشان داد (جدول ۸).

بحث

در این تحقیق برای اولین بار از RSM به‌منظور مدل‌سازی و بهینه‌سازی تولید کالوس و وزن تر و خشک سرخارگل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

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 Koroch و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تیمار ریزنمونه برگ با غلظت‌های ٤/٤٤ و ۰/۰٥٤ 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 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 ترارسانی اکسین توسط فاکتورهای رونویسی ARF7 و ARF19 برخی از فاکتورهای رونویسی خانواده LBD (Lateral Organ Boundaries Domain) 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 به‌نظر 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 2ip و IBA قادر به تولید بالاترین میزان بیومس است (Butiuc-keul*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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

گیرنده‌های اختصاصی آنها در بخش‌های مختلف گیاه بستگی دارد (Moore, 1988). همچنین نشان داده شده که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی با اثر بر روی فتوسنتز (Costa *et al.*, 2005) و فعالیت برخی از آنزیم‌ها مانند نیترات ردوکتاز در میزان تولید بیومس گیاه نقش دارند (Sosnowski *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار بهینه‌سازی 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 مدل‌های ریاضی ایجادشده، بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد به‌منظور تولید بالاترین درصد کالوس‌زایی و بیومس پیش‌بینی شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده تیمار ریزنمونه برگ با غلظت ۱/۰۵ و ۰/۹٤ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin سبب بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۸/۷۸٪) و بیشترین میزان وزن خشک (۰/۸ گرم) کالوس حاصل از آن می‌شود. استفاده از RSM ضمن آنکه سبب صرفه‌جویی در زمان و امکانات آزمایشگاهی خواهد شد، داده‌های ارزشمندی را تولید می‌کند که می‌توان از آن جهت تحریک کالوس‌زایی و به‌دنبال آن تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در مقیاس بزرگ‌تر استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

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

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.

Butiuc-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., Jacqmard, 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.

Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M. and Sekar, T. (2010) Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

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 Advances18: 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]

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 methology, Depended variable, Independed variable, Explant, Model fit

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.10.7]