DOI: 10.22034/JPR.2023.2175 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴

بهینه سازی اندام زایی مستقیم در بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*) با استفاده از روش سطح پاسخ

ماریا میثاقی[۱] ، فتانه یاری[۲*]، امیر موسوی[۳]، یونس مستوفی[۴] و حمیده افقی[۵]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم باغبانی و زراعی

[۲] ایران، تهران، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار

[۳] ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی

[۴] ایران، کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی

[۵] ایران، تهران، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، گروه زیست‌فناوری پزشکی و صنایع دارویی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۰

چکیده

بنفشه آفریقایی یکی از گیاهان تجاری مهم با تنوعی بی‌نظیر در رنگ و شکل بوده که سبب محبوبیت این گیاه شده است. مهندسی ژنتیک می‌تواند یکی از تکنیک‌های پرکاربرد برای اصلاح گیاهان باشد. اگرچه این تکنیک خود مبتنی بر کشت بافت برای به ثمر نشاندن ایده‌های نو در ایجاد ارقام جدید است و بهینه سازی اندام‌زایی مستقیم به منظور پایه گذاری اصلاح گل بسیار حائزه اهمیت است. به همین منظور بهینه سازی اندام‌زایی از بافت‌های برگ و دمبرگ دو رقم مختلف بنفشه آفریقایی به نام‌هایLittle Maya, Grinia بااستفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرارگرفت. هدف پژوهش حاضر اثر محیط کشت پایه حاوی مقادیر مختلف تنظیم کننده های رشد شاملTDZ، BA و IAA بر القاء اندام‌زایی مستقیم بود. تیمارهای اعمال شده در هر دو رقم، منجر به القای اندام‌زایی مستقیم در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ شدند. ریزنمونه برگ نسبت به دمبرگ پتانسیل اندام زایی بیشتری نشان داد اما پتانسیل اندام‌زایی مستقیم رقم ها در ریزنمونه‌های مشابه باهم با یکدیگر تفاوت چشمگیری نداشت. اگرچه مدل بهینه شده توسط نرم افزار و نتیجه تکرار آزمایشگاهی این مدل، بیانگر این است که ریزنمونه برگ رقم Little Maya بیشترین پتانسیل اندام‌زایی مستقیم را دارد و در این راستا محیط حاوی BA 0.05 mg/l+ TDZ 0.01 mg/l +IAA 1 mg/l در القای اندام‌زایی مستقیم در هر دو رقم موفق عمل نموده است. لذا باتوجه به مدل بدست آمده، به نظر می‌رسد میزان اندام‌زایی مستقیم ماحصل تعامل بین نوع هورمون‌های بکار رفته و نوع ریزنمونه بوده که می‌تواند همبستگی مستقیم با ژنوتیپ نیز نشان‌دهد.

واژه های کلیدی: بنفشه آفریقایی، القای اندام‌زایی، کالوس، هورمون های گیاهی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۰۸۲۵۲۶۰ ، پست الکترونیکی: Fataneh.yari@gmail.com

مقدمه

Saintpaulia در سراسر جهان به عنوان بنفشه آفریقایی شناخته شده و یک گیاه تجاری- زینتی با ارقام متنوعی از رنگ و شکل است. ویژگی هایی که آن را به عنوان یک گیاه آپارتمانی محبوب ساخته، میزان تحمل آن به سایه، رنگ بندی متنوع و همیشه گلدار بودن این گیاه در اغلب فصل‌های سال است (۱۱). تکنیک های ریز ازدیادی برای تولید انبوه گیاهان جدید، خصوصاً انواع ابلق یا اصلاح شده در یک دوره نسبتاً کوتاه پرکاربرد بوده است (۲۹). از دیگر سو، روش‌های درون شیشه‌ای به طور گسترده ای برای القای تغییرات و معرفی ارقام جدید دارای ارزش

DOI: 10.22034/JPR.2023.2175 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴

تجاری مورد استفاده بوده و ترکیب این تکنیک‌ها با شیوه-های مهندسی ژنتیک توانسته دریچه جدیدی دراین زمینه بر روی صنعت گلکاری باز نماید (۱۹). گزارشاتی بیان داشتند که بنفشه آفریقایی ظرفیت بالایی برای اندام‌زایی از طریق باززایی یا رویان‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از ریز نمونه های مختلفی ازجمله برگ (۲۷)، جوانه گل (۲۰)، اپیدرم (۲)، پرچم (۳۲) و پروتوپلاست (۱۳) دارد. اندام زایی در کشت بافت مستلزم تشکیل اندام-های نابجا از ناحیه تقسیم سلولی فعال است و اندام‌های نابجا مستقیماً از بافت اصلی (اندام زایی مستقیم) یا به طور غیرمستقیم از طریق کالوس (اندام زایی غیرمستقیم) ایجاد می‌شوند. این در حالیست که جدا بر نوع ریزنمونه، موقعیت فیزیولوژیک گیاه مادری، دهنده ریزنمونه و تعامل و مقادیر هورمون‌های به کار رفته در محیط کشت در میزان اندام‌زایی و موفقیت در این امر بسیار کلیدی اعلام شده است (۶، ۲۷و ۳۱). گزارش شده که دمبرگ بنفشه آفریقایی فاقد خصیصه اندام‌زایی در شرایط درون شیشه ای می باشد (۱۶). این در حالی است که در گزارش دیگری ذکر شده است که دمبرگ دارای امکان اندام‌زایی بیشتری نسبت به دیگر بخش‌های برگ است و در نتیجه پتانسیل بالایی برای ریز ازدیادی بنفشه آفریقایی دارد (۳ ،۲۹ و۳۰). بررسی های انجام گرفته بر روی مواد مختلف تنظیم کننده رشد مصنوعی در شرایط کشت درون شیشه‌ای مشخص کرده که سیتوکنین‌ها جزو مهمترین تنظیم کننده‌های رشد برای باززائی محسوب می شوند. در بین آنها بنزیل‌آمینوپورین (BAP) مؤثرترین و پرکاربردترین سیتوکنین مورد استفاده بوده است (۲۱و ۳۱)، اگرچه TDZ، از دسته فنیل اوره‌ها، در بسیاری از کشت‌های گیاهان زینتی به عنوان ماده القاء کننده اندام‌زایی مورد استفاده قرارگرفته است. این در حالیست که گزارش شده، کاربرد آن در القاء رویان‌زایی در بیشتر ارقام سبب ایجاد جهش‌های سوماکلونال زیادی گردیده است. اولین گزارش کاربرد آن در بنفشه آفریقایی متعلق به سال ۲۰۰۲ میلادی می‌باشد که در مقادیر کمتر از ۵/۲ میکرومول بر لیتر منجر به اندام‌زایی و در مقادیر بالاتر رویان‌زایی شده است (۱۹). بیشتر گزارشات حاکی از اثر بهینه TDZ در باززایی شاخساره نسبت به BA می باشد (۲۹). روش‌شناسی سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری مفید برای مدل‌سازی و تحلیل یک فرایند است که در آن یک پاسخ مورد نظر تحت تأثیر چندین عامل مستقل قرار می‌گیرد (۲۳). هدف طرح های سطح پاسخ ، بهینه سازی پاسخ (متغیر خروجی) متأثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) برای ساخت مدل های تجربی است. در طراحی آزمایش ها، هدف، شناسایی و تحلیل متغیرهای مؤثر بر خروجی‌ها با کمترین تعداد آزمایش است (۲۳و۲۵). در بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک به دلیل تعداد زیاد عوامل کنترل‌کننده، ناشناخته بودن مکانیسم یا پیچیدگی محاسباتی، امکان ارایه یک مدل ریاضی ساده مقدور نبوده و در چنین مواردی استفاده از روش‌های تجربی مدلسازی کارساز است، که روش سطح پاسخ به عنوان یکی از روش‌های مدل‌سازی تجربی کارآمد مطرح است (۱۰و ۲۳). که در سال ۱۹۷۱ از این روش برای بهینه سازی محیط کشت بافت استفاده شد (۲۲) و در مورد ریزازدیادی، بینش مطلوبی از برهمکنش بسیاری از عوامل موثر بر رشد و اندام‌زایی در شرایط آزمایشگاهی ایجاد کرده و تاکنون مطالعاتی در مورد بهینه‌سازی باززایی شاخساره یا گیاه در برخی از گیاهان با استفاده از RSM انجام شده است (۱، ۸، ۱۰، ۱۴و ۲۴). بررسی های انجام شده با استفاده از روش سطح پاسخ مشخص نموده است که هر دو عامل تغذیه ای (۲۵و ۲۸) و هورمون (۵، ۸، ۱۲و ۲۶) نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان در شرایط کشت درون شیشه‌ای در آزمایشگاه ایفا کرده و مدل بهینه شده توسط این روش مقادیر تأثیرگذار هریک از عوامل را روی پاسخ مورد بررسی شبیه سازی نموده و به صورت یک مدل ارائه نموده است. سطح ساکارز (۵) و همچنین ماهیت، غلظت و نسبت اکسین ها و سیتوکینین های مختلف درون زا و برون زا (۱۲، ۲۴، ۲۵،

DOI: 10.22034/JPR.2023.2175 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴

۲۷ و ۲۹) در هر کدام از بررسی ها توانسته اند یکی ازعوامل اصلی تأثیر گذار بر فرایند رشد و اندام‌زایی قلمداد شوند. باتوجه به اهمیت اندام‌زایی مستقیم، لزوم کاهش تغییرات ناخواسته سوماکلونال و معرفی پروتوکلی مطلوب به عنوان زیرساخت مهندسی ژنتیک در این گونه گیاهی و از دیگر سو قیمت بسیار بالای ماده TDZ در مقایسه با بنزیل آدنین و اهمیت کاهش هزینه‌های تولید در عرصه صنعت گلکاری، تعیین حداقل میزان لازم TDZ به منظور بررسی تکمیلی و بهینه سازی اندام‌زایی در ارقام بنفشه آفریقایی با استفاده از ریزنمونه های مختلف از بخش‌های مختلف برگ در تعامل با غلظت های مختلف TDZ با سایر مواد مختلف تنظیم کننده رشد با لحاظ تأثیر ژنوتیپ، هدف اصلی این تحقیق بوده است، امید است که برای استفاده در پژوهش‌های اصلاحی- ژنتیکی آتی، راهگشا باشد.

مواد و روشها

استقرار ریزنمونه در محیط کشت: در ابتدا برگ و دمبرگ های سالم و جوان هر دو رقم Little Maya, Grinia با آب جاری به مدت ۲۰ دقیقه شسته شدند و در ادامه با محلول سفید کننده تجاری ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردیده و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در ادامه اطراف برگ بریده و حذف شد تا در نهایت برگی به اندازه ۱/۵ سانتی مترمربع به عنوان ریز نمونه در نظر گرفته شد و پهنک برگ در سطح محیط کشت استقرار داده شد. در مورد ریز نمونه های دمبرگ نیز همین مراحل انجام شد با این تفاوت که دمبرگ‌ها داخل محیط کشت به صورت مورب قرار داده شدند. جهت استقرار در شرایط درون شیشه‌ای از محیط کشت پایه‌ی MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۵/۶ گرم در لیتر آگار، ۲ میلی گرم در لیتر اسید ایندول استیک و ۰/۸ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین استفاده گردید.

پرآوری ریزنمونه های کشت بافتی: دراین مرحله، برگ و دمبرگ گیاهچه‌های درون شیشه ای در مرحله استقرار به عنوان ریز نمونه در محیط کشت جدید استفاده شدند. به طوریکه محیط کشت پایه، مشابه مرحله اول در نظر گرفته شد و برای پرآوری از مقادیر بهینه شده از جمله ۳ mg/l هورمون IAA و ۰/۱۲ mg/l BA و ۰/۱ mg/l – Thiamine Hclاستفاده شد (۹).

بهینه سازی اندام زایی مستقیم و تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور بهینه سازی اندام زایی مستقیم، از ریزنمونه برگ یا دمبرگ گیاهچه های درون شیشه ای مرحله پرآوری، مطابق طراحی نرم افزار Design Expert نسخه ۱۱ استفاده گردید. روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه ای از تکنیک های آماری است که در بهینه سازی فرایندهایی به کار می رود که پاسخ موردنظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می گیرد .با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند. مهم ترین مسأله این تحقیق بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها بود، از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد جهت مدل‌سازی و شبیه سازی فرایند باززایی مستقیم انتخاب شد (۷و۲۲). طرح سطح پاسخ با نقاط مرکزی در هر وجه و ۳ نقطه مرکزی دارای ماژول های مختلف ارزیابی است (۲۳). دراین تحقیق برای بررسی و رسیدن به معادله ریاضی، ماژول نرم افزاری Historical Data Design انتخاب شد، که کاربرد اصلی این ماژول مدل‌سازی براساس انجام آزمایش-های تجربی اجرا شده و داده‌های ثبت شده حقیقی می-باشد. تأثیر چهار متغیر مستقل (هورمون‌های به کار رفته در محیط کشت) هرکدام در سه یا دو سطح (مقادیر به میلیگرم بر لیتر) شامل: (۰۲/۰ و ۰۱/۰، ۰) TDZ، (۱/۰ و۰۷۵/۰، ۰۵/۰) BA، (۲و۱) IAA و نوع رقم (در دو سطح)، بر متغییرهای وابسته کمی از جمله، درصد باززایی مستقیم ریزنمونه برگ و دمبرگ مورد بررسی قرارگرفت. که به واقع هردو متغییرهای کمی مذکور به عنوان پاسخ این

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

آزمایش در نظر گرفته شدند. تعداد ۲۴ آزمایش براساس طرح روش سطح پاسخ اجرا گردید. ماژول نرم‌افزاری Historical Data Design فاقد نقطه مرکزی بوده و عدم برازش بوده لذا از سایر فاکتورها اعم از R^2، Adjusted R^2، Predicted R^2، Adequate precision و CV برای تایید صحت مدل استفاده می‌شود.

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده از آنها در طرح سطح پاسخ

Factor	Name	Units	Type	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	TDZ	mg/l	Numeric	0.0000	0.0200	-1 ↔ 0.00	+1 ↔ 0.02	0.0100	0.0083
B	BA	mg/l	Numeric	0.0500	0.1000	-1 ↔ 0.05	+1 ↔ 0.10	0.0750	0.0255
C	IAA	mg/l	Numeric	1.0000	2.00	-1 ↔ 1.00	+1 ↔ 2.00	1.50	0.5108
D	Cultivar		Categoric	Grinia	Little Maya			Levels:	2

رابطه بین متغیرهای مستقل کد شده و مقادیر حقیقی آنها در معادله ۱ آمده است.

معادله ۱: $Xi = (Xi - X_0)/\Delta Xi$

که دراین معادله، Xi مقدار کد شده، Xi مقدار حقیقی، $X0$مقدار حقیقی همان متغیر در نقطه مرکزی و ΔXi: تغییر گام در مقدار متغیر است، داده‌های حاصل از آزمایش‌ها با معادله ۲که معادله برازش چندجمله‌ای درجه ۲ است، مطابقت داده‌شده است.

معادله ۲:

$$Y = \beta_0 + \Sigma \beta_i X_i + \Sigma \beta_{ii} Xi^2 + \Sigma \beta_{ij} X_i X_j$$

دراین معادله : Y پاسخ پیش بینی شده، β0: عرض از مبدأ، βi: ضریب خطی، βii : ضریب درجه دو، βij : ضریب برهمکنش تعاملی و XiXj : متغیرهای غیرمستقل هستند. همچنین به منظور ارزیابی صحت برازش و دقت پیشبینی مدل ارائه شده با روش پاسخ سطح، از دو پارامتر آماری : ضریب تعیین (Determination Coefficient (R^2)) و ضریب تعیین اصلاح شده (Adjusted Determination Coefficient)، Predicted R^2، Adequate precision و CV استفاده شد. مطابق الگوی تعریف شده توسط نرم‌افزار کلیه تیمارها اعمال شد و pH تمامی محیط های کشت روی۵/۷ تنظیم و به مدت ۲۰ دقیقه در فشارpsi ۱۵ اتوکلاو شدند. ظروف پس از کشت در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و ۱۵۰۰ لوکس نور به مدت ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در ادامه میزان باززایی مستقیم ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یکبار یادداشت برداری شدند و توسط نرم افزار تجزیه و تحلیل شدند. همچنین کلیه آزمونهای آماری در سطح معنی ۰۵/۰ ≥P یا همان احتمال ۹۵ درصد انجام شد. آخرین مرحله این مدل آماری، شامل ارائه گرافیکی رابطه‌ی مدل و تعیین میزان هورمون‌های رشد بهینه بود که به وسیله‌ی نمودار رویه پاسخ و کنتور (Contour) انجام پذیرفت و به ترتیب اهمیت میزان پاسخ های مهم در این برایند مشخص شدند و متغیر وابسته (پاسخ)، درصد باززایی مستقیم ریزنمونه ها در نظر گرفته شد. در ادامه محیط کشت بهینه برای باززایی مستقیم از ریزنمونه های بنفشه آفریقایی، با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی (Numerical optimization) تعیین شد.

نتایج

باززایی مستقیم ریزنمونه برگ: به منظور تعیین میزان اثر چهار فاکتورهورمون‌های TDZ، BA، IAA و رقم بنفشه آفریقایی بر پاسخ بهینه باززایی مستقیم و برهمکنش پس از وارد کردن داده‌ها در نرم افزار Design Expert، پاسخ فرایند،

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

مورد ارزیابی قرارگرفت. اعتبار کل مدل رگرسیون با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها (جدول۱) مورد آزمون قرارگرفت و مشخص شد که مدل ارائه شده (پاسخ ۱) با ۹۹ درصد اطمینان، دارای اثر معنی‌دار است. رابطه پاسخ ۱ مدل ارائه شده برای میزان تجزیه صورت گرفته را برحسب عامل‌های کد شده نشان می‌دهد.

پاسخ ۱ =+44.00+(3.19×TDZ)+(11.33×BA)-
(0.9167×IAA)+(2.17×Cultivar)-(27.44×TDZ×BA)

پاسخ ۱(باززایی مستقیم از ریزنمونه برگ)

در ادامه بر مبنای تجزیه واریانس صورت گرفته مشخص شد که کلیه عوامل مورد بررسی و اثر تعاملی هورمون‌های TDZو BA، بیشترین تأثیر را در میزان پاسخ ریزنمونه برگ و ایجاد اندام زایی مستقیم داشته است (جدول ۲) و ضریب همبستگی (R^2) مدل، احتمال درست بودن مدل پیشنهادی نرم افزار را نشان می‌دهد که مطابق آنالیز انجام شده، میزان این ضریب ۹۹ درصد، به دست آمده است. نزدیک بودن مقدار $AdjR^2$ به R^2، تأیید کننده مقدار صحیح ضریب همبستگی (R^2) می باشد. از دیگر سو میزان اختلاف مورد قبول بین این دو ضریب کمتر از ۲/۰ می‌باشد که در اینجا اختلاف در حد هزارم درصد بوده و در حد کاملاً قابل قبول مشاهده می‌شود. در ادامه میزان شاخص دقت کافی (Adequate Precision) برابر با ۰۷/۶۸ بوده که مطابق تعریف خود نرم افزار چون از عدد ۴ بزرگتر می باشد، نشانگر مطلوبیت این شاخص است و میزان ضریب تغییرات نیز ۵۹/۵ بوده است. بنابراین باتوجه به هر چهار ضریب مورد بحث، مشخص می‌گردد که مدل پیشنهادی توسط نرم افزار از صحت کامل برخوردار است. در همین راستا نمودار پراکنش باقیمانده‌ها (شکل ۱) بیانگر نرمال بودن پراکنش داده های مورد بررسی بوده است و در نتیجه تفاوت های معنی دار بدست آمده، در طی آنالیز برگرفته از ماهیت خود داده بوده اند. نمودار پیش بینی پراکنش داده‌ها در کنار خط برازش شده براساس مدل پیشنهادی نرم افزار نیز گویای صحت مدل و کارایی آن در پیش‌بینی و مدلسازی داده‌ها می باشد (شکل ۲). بر مبنای همین نمودارها مشخص می‌گردد پراکنش داده ها پاسخ شماره ۱، بین ۰/۰ تا ۸۵ درصد بوده است. به عبارت دیگر بیشترین میزان باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگ در حدود ۸۵ درصد بوده است.

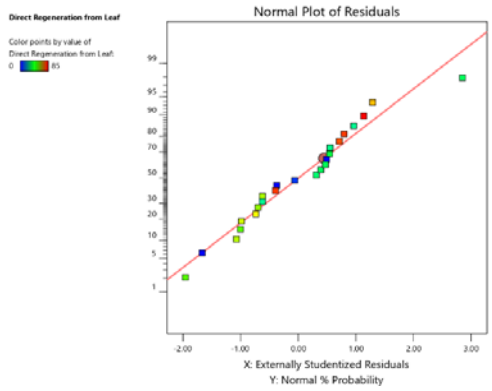
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم کاسته برای درصد باززایی مستقیم ریزنمونه برگ

Source	df	F-value	p-value	
Model	5	509.97	< 0.0001	significant
A-TDZ	1	26.88	< 0.0001	significant
B-BA	1	509.65	< 0.0001	significant
C-IAA	1	3.33	0.0845	
D-cultivar	1	18.63	0.0004	significant
AB	1	1991.38	< 0.0001	significant
Residual	18			
Cor Total	23			

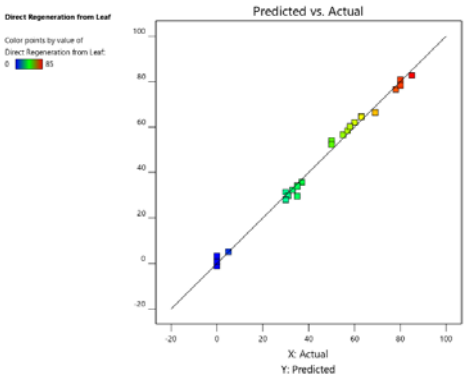
R-Squared= 0.993, Adj R-Squared= 0.991, Adequate Precision= 68.07, C.V%= 5.59

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

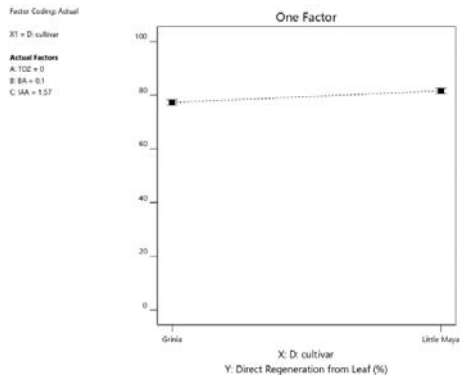
براساس مدل پیشنهادی و آنالیز انجام شده بروی داده ها، می توان مشاهده نمود که تأثیر هر سه هورمون به کار رفته در محیط کشت و خود رقم کاملاً معنی دار بوده است و از دیگر سو تنها اثر متقابل، کاربرد همزمان هورمون های TDZ و BA معنی دار بوده است.



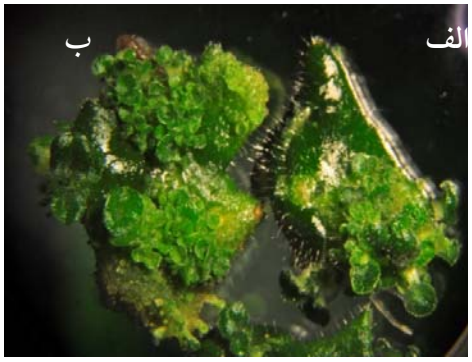
شکل ۱- نمودار پراکنش داده‌ها (نرمال پلات) اثر تیمارهای هورمونی و نوع رقم بر میزان باززایی مستقیم برگ هر دو رقم Little Maya و Grinia بنفشه آفریقایی



شکل ۲- نمودار مقایسه داده های حقیقی و داده‌های پیش‌بینی شده توسط نرم افزار برای میزان باززایی مستقیم در ریزنمونه های برگ هر دو رقم Little Maya و Grinia بنفشه آفریقایی



شکل ۳- نمودار اثر ساده نوع رقم بر میزان باززایی مستقیم برگ هر دو رقم Little Maya و Grinia بنفشه آفریقایی (Little Maya and Grinia)

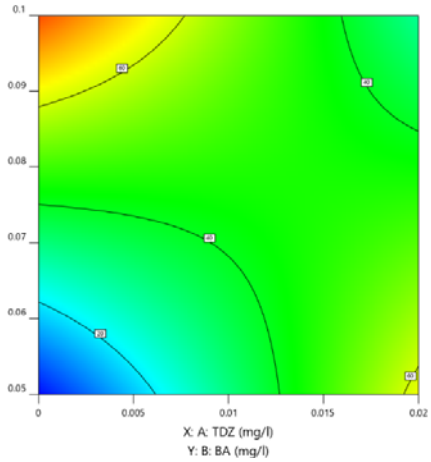


شکل ۴- تصویر باززایی مستقیم ریزنمونه برگ هر دو رقم Grinia (الف) و Little Maya (ب) بنفشه آفریقایی با بزرگنمایی X۱۰، پس از یک ماه

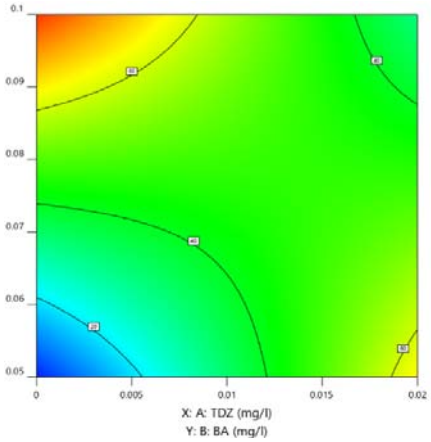
باتوجه به عدم معنی داری سایر اثرات تعاملی و معنی دار بودن اثرات ساده نوع رقم و میزان هورمون اکسین بر باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ، همانطور که مشاهده می-گردد رقم Little Maya توان باززایی بالاتری نسبت به رقم Grinia نشان می‌دهد (شکلهای ۳و ۴) و از سوی دیگر در بافت برگ بالارفتن میزان هورمون اکسین نه تنها اثر مثبتی بر بهبود باززایی مستقیم نداشته است بلکه از میزان آن نیز تا حد معنا داری می‌کاهد. با توجه به اینکه بیشترین میزان باززایی مستقیم بافت برگ در هر دو رقم و در هر دو مقدار تیمار اکسینی به کار رفته در محیط القاء باززایی

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

شامل TDZ mg/l ۰/۰ در ترکیب با BA mg/l ۱/۰ بوده است، به همین دلیل برای نشان دادن اثرات ساده، تغییرات آن‌ها با این مقادیر نشان داده شد.



شکل ۵- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و BA در ترکیب با ۲mg/l هورمون IAA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه برگ هر دو رقم Little Maya و Grinia



شکل ۶- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و BA در ترکیب با ۱mg/l هورمون IAA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه برگ هر دو رقم Little Maya و Grinia

عدم حضور هورمون‌های TDZ و BA در ترکیب با هر دو سطح هورمون IAA برابر با عدم باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های برگ در هر دو رقم می باشد و در کلیه نمودارهای اثرات تعاملی (شماره‌های ۵ و ۶) به خوبی قابل مشاهده است. در تعریف پیش فرض نرم افزار Design Expert مورد استفاده در این تحقیق، رنگ آبی برابر با مقدار صفر در نظر گرفته شده و تغییر رنگ به سمت قرمز بیانگر افزایش آن کمیت تعریف شده است. در همین راستا مشخص می‌گردد که افزایش مقدار هورمونی TDZ در ترکیب با پایین ترین سطح هورمون BA (۰۵/۰ mg/l) در همراهی با اکسین (IAA) منجر به بهبود درصد باززایی مستقیم از ۲۰درصد تا حدود۶۰ درصد در ریزنمونه برگ می‌گردد. این در حالیست که کاربرد هورمون BA به عنوان تنها عامل هورمون سایتوکنینی محیط کشت در ترکیب با اکسین (IAA) می تواند منجر به باززایی بالغ بر ۸۰ درصد از ریزنمونه های برگ گردد. ترکیب مقادیر کمتر از ۰۰۵/۰ هورمون TDZ با مقادیر بالاتر از ۰۹/۰ هورمون BA ، نیز نتایجی مشابه در برداشته است. از دیگر سو ترکیب های مقادیر بالاتر از هر دو نوع هورمون سایتوکنینی بکار رفته در این تحقیق نشانگر تأثیر کمرنگ تعامل آن‌ها بر باززایی مستقیم در ریزنمونه برگ (بین ۴۰ درصد الی ۶۰درصد) در هر دو رقم بوده است.

باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ: در ادامه تجزیه و تحلیل آماری انجام شده بر روی داده ها (جدول۳)، مشخص گردید که ریزنمونه دمبرگ در هر دو رقم پتانسیل باززایی مستقیم داشته که این پاسخ تحت تأثیر هر ۴ عامل اصلی مورد بررسی اعم از خود رقم و تمامی ۳ تیمار هورمونی قرار گرفته است. اثر تعاملی هورمون TDZ (عامل A) درهورمون‌های BA و IAA از یک‌سو و ترکیب تعاملی آن با خود رقم از سوی دیگر معنی دار بوده است. سایر

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

ترکیب‌های بر روی پاسخ باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ بی اثر بوده و بنابراین مطابق مدل پیشنهادی نرم افزار از معادله حذف شده اند. در ادامه مشخص شد که مدل ارائه شده برای پاسخ شماره ۲ با ۹۹ درصد اطمینان، دارای اثر معنی‌دار است. رابطه پاسخ ۲ مدل ارائه شده برای میزان تجزیه صورت گرفته را، برحسب عامل‌های کد شده نشان می‌دهد.

= پاسخ ۲

+17.46+(16.38×TDZ)+(2.54×BA)+(1.37×IAA)+(0.7083×Cultivar)+(1.87×TDZ×BA)+(1.13TDZ×IAA)+(0.5000TDZ×Cultivar)

پاسخ ۲ (باززایی مستقیم از ریزنمونه دمبرگ)

همانطور که اشاره شد، کلیه تیمارهای هورمونی اعمال شده تأثیر به سزایی در میزان پاسخ ریزنمونه دمبرگ و ایجاد اندام زایی مستقیم داشته اند (جدول ۳) و ضریب همبستگی (R^2) مدل، که احتمال درست بودن مدل پیشنهادی را نشان می‌دهد ۹۸ درصد، بوده و نزدیک بودن مقدار $AdjR^2$ به R^2، تأیید کننده مقدار صحیح ضریب همبستگی (R^2) می باشد. از دیگر سو میزان اختلاف مورد قبول بین این دو ضریب کمتر از ۲/۰ لحاظ شده که در اینجا اختلاف یک صدم درصد بوده و در حد کاملاً قابل قبول می‌باشد. در ادامه میزان شاخص دقت کافی (Adequate Precision) برابر با ۳۷/۹۸ بوده که مطابق تعریف خود نرم افزار چون از عدد ۴ بزرگتر می باشد، نشانگر مطلوبیت این شاخص است و میزان ضریب تغییرات نیز ۲۴/۴ بوده است. بنابراین با توجه به هر چهار ضریب مورد بحث، مشخص می‌گردد که مدل پیشنهادی توسط نرم افزار از صحت کامل برخوردار است. در همین راستا نمودار پراکنش باقیمانده ها (شکل ۷) بیانگر نرمال بودن پراکنش داده های مورد بررسی بوده است و در نتیجه تفاوت های معنی دار بدست آمده، در طی آنالیز برگرفته از ماهیت خود داده بوده اند. نمودار پیش بینی پراکنش داده‌ها در کنار خط برازش شده براساس مدل پیشنهادی نرم افزار نیز گویای صحت مدل و کارایی آن در پیشبینی و مدلسازی داده‌ها می باشد (شکل ۸)، همانطور که مشاهده می‌شود پراکنش داده-های حقیقی کاملاً با خط برازش شده مطابقت داشته و اختلاف داده‌ها از خط بسیار جزیی می‌باشد.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم کاسته برای درصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ

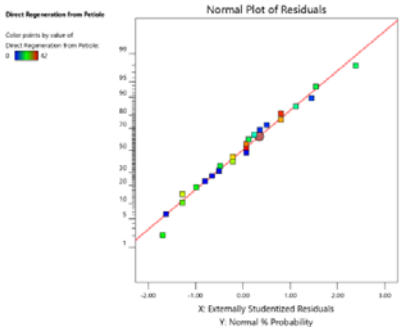
Source	df	F-value	p-value	
Model	7	1197.25	< 0.0001	significant
A-TDZ	1	7845.03	< 0.0001	significant
B-BA	1	283.50	< 0.0001	significant
C-IAA	1	82.97	< 0.0001	significant
D-cultivar	1	22.02	0.0002	significant
AB	1	102.86	< 0.0001	significant
AC	1	37.03	< 0.0001	significant
AD	1	7.31	0.0156	significant
Residual	16			
Cor Total	23			

R-Squared= 0.98, Adj R-Squared= 0.97, Adequate Precision= 98.37, C.V%= 4.24

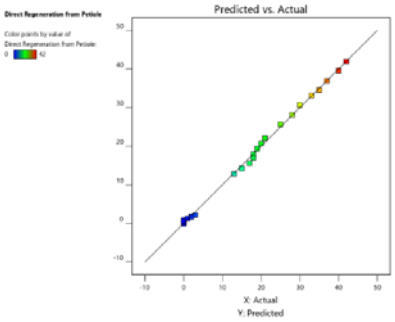
مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

از دیگر سو مطابق نمودارهای شماره ۵ و۶ مشخص می-گردد پراکنش داده‌ها بین ۰ تا ۴۲ درصد بوده است که به بیان دیگر بیشترین میزان باززایی از نمونه‌های دمبرگ تنها ۴۲ درصد بوده است. در مقام مقایسه بین دو پاسخ ۱ و ۲ مشخص می‌گردد که در هر دو رقم مورد بررسی، پتانسیل ریزنمونه‌های برگ در مقایسه با دمبرگ از جهت توان باززایی مستقیم، تقریباً ۲ برابر بوده است (شکلهای ۵ الی ۸).

در نمودارهای تعاملی هورمون‌های سایتوکنینی به کار رفته در محیط کشت القاء باززایی مستقیم از ریزنمونه دمبرگ، مشخص می گردد که بافت دمبرگ در عدم حضور هورمون TDZ هر قدر هم میزان هورمون BA بالا باشد توان باززایی نداشته و به ترتیب با افزایش مقادیر هر دو هورمون در تعامل بایکدیگر بر میزان باززایی افزوده می-گردد و این افزایش با بالارفتن میزان هورمون اکسین در محیط کشت نسبت مستقیم دارد (شکلهای ۹ و ۱۰). بنابراین کاربرد و حضور هورمون TDZ برای القاء باززایی مستقیم از بافت دمبرگ ضروری است. اما برای نتیجه بهتر نیاز به ترکیب هر دو هورمون سایتوکنینی TDZ و BA ضروری به نظر می‌رسد. این در حالیست که برای باززایی مستقیم از بافت برگ حضور هورمون BA کاملاً کافی بوده است. شایان ذکر است افزوده شدن هورمون TDZ در زمینه بهبود پتانسیل باززایی بافت برگ چندان ضروری نبوده است. نکته حائزه اهمیت دیگر اثر ترکیبی هورمون اکسین، در تعامل با هورمون‌های سایتوکنینی در این پژوهش می-باشد. در ریزنمونه برگ اگرچه حضور این هورمون برای القاء باززایی ضروری بوده اما بالارفتن مقدار آن تأثیر به سزایی در بهبود پاسخ شماره ۱ که همان باززایی مستقیم از بافت برگ است، به همراه نداشته است (شکل‌های ۵ و۶).



شکل ۷. نمودار پراکنش داده ها (نرمال پلات) اثر تیمارهای هورمونی و نوع رقم بر میزان باززایی مستقیم دمبرگ هر دو رقم Little Maya وGrinia بنفشه آفریقایی



شکل ۸. نمودار مقایسه داده های حقیقی و داده های پیش‌بینی شده توسط نرم افزار برای میزان باززایی مستقیم در ریزنمونه های دمبرگ هر دو رقمLittle Maya و Grinia بنفشه آفریقایی

این در حالیست که افزوده شدن ۱ میلی‌گرم در لیتر بر میزان هورمون اکسین اعمال شده در محیط، بهبود ۱۰ درصدی پتانسیل باززایی ریزنمونه دمبرگ از ۳۰ به ۴۰ درصد مشهود است (شکلهای ۹ و ۱۰). لذا به نظر می‌رسد بافت دمبرگ برای باززایی به مقادیر بالاتری از تیمارهای ترکیبی هورمون های سایتوکنین و اکسین در هر دو رقم نیاز دارد. نمودارهای ۱۱ و ۱۲ نیز تأیید کننده همین نکته می‌باشند که در مقادیر یکسان هورمون TDZ با افزایش مقدار هورمون BA از ۰۵/۰mg/l به ۱/۰mg/l و متقابلاً افزایش دو برابری مقدار هورمون IAA از۱ mg/l به ۲ mg/l

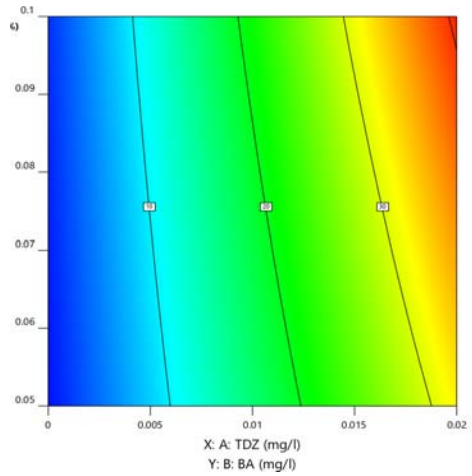
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴

افزایش ۱۰ درصدی در پاسخ شماره ۲، به همراه داشته است. بنابراین در مقایسه این دو بافت از جهت پتانسیل باززایی به نظر می‌رسد که بافت برگ نتایج موفقیت آمیزتری نشان داده و از دیگرسو در محیط القاء باززایی حاوی اندک مقادیر هورمون TDZ یا حتی محیط های فاقد این ماده، فقط با حضور هورمون بنزیل آدنین میزان گیاهچه باززا شده مستقیم مطلوب را فراهم می‌نماید. این در حالیست که هم هزینه تهیه چنین محیط کشت القای باززایی مستقیمی کمتر بوده و هم درصد باززایی بالاتر بوده و از همه مهمتر خطر القاء تغییرات سوماکلونال ناخواسته ناشی از کاربرد هورمون TDZ نیز به حداقل می‌رسد. نتایج نمودارهای ۱۳ الی ۱۶ بیانگر پتانسیل بالاتر رقم Little Maya در مقایسه با رقم Grinia در پاسخ به تیمارهای القا باززایی مستقیم در ریزنمونه دمبرگ می‌باشد و روند صعودی هر ۳ نمودار بیانگر بهبود میزان باززایی در هر دو رقم با افزایش میزان هورمون‌های به کار رفته در محیط کشت می‌باشد و این روند رخدادی یکسان برای هر دو رقم را نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان اینطور نتیجه گرفت که باززایی مستقیم از ریزنمونه دمبرگ، در هر دو رقم وابستگی مستقیم با حضور هورمون TDZ داشته و روند صعودی باززایی نیز منوط به روند افزایشی مقادیر هورمون‌های به کار رفته در محیط کشت است، که به طور قطع هزینه هر گیاهچه باززا شده از ریزنمونه دمبرگ نسبت به ریزنمونه برگ بالاتر بوده و همین طور احتمال بروز تغییرات ناخواسته سوماکلونال در گیاهچه‌ها در طی فرایند رشد آتی نیز بسیار بیشتر خواهد بود. کاهش هزینه‌های تولید متضمن دستیابی به عرصه تجارت پایدار می‌باشد و کاهش هزینه‌های القاء اندام زایی مستقیم یکی از مهمترین اهداف این تحقیق نیز بوده است، برهمین مبنا به منظور تعیین محیط کشت بهینه باززایی مستقیم مطابق جدول ۴، مقادیر برای نرم افزار تعریف شد و درجه اهمیت هرکدام از عوامل تأثیرگذار بر روی پاسخ شماره ۱، لحاظ گردید. دستیابی به اندام‌زایی مستقیم هدف اصلی این بهینه سازی با عدد ۵ یعنی بیشترین درجه اهمیت تعریف شد و کمترین مقدار کاربرد هورمون TDZ در درجه بعدی اهمیت با درجه ۴ قرار گرفت. زایی مستقیم یکی از مهمترین اهداف این تحقیق نیز بوده است، برهمین مبنا به منظور تعیین محیط کشت بهینه باززایی مستقیم مطابق جدول ۴، مقادیر برای نرم افزار تعریف شد و درجه اهمیت هرکدام از عوامل تأثیرگذار بر روی پاسخ شماره ۱، لحاظ گردید. دستیابی به اندام‌زایی مستقیم هدف اصلی این بهینه سازی با عدد ۵ یعنی بیشترین درجه اهمیت تعریف شد و کمترین مقدار کاربرد هورمون TDZ در درجه بعدی اهمیت با درجه ۴ قرار گرفت. اندام زایی مستقیم یکی از مهمترین اهداف این تحقیق نیز بوده است، برهمین مبنا به منظور تعیین محیط کشت بهینه باززایی مستقیم مطابق جدول ۴، مقادیر برای نرم افزار تعریف شد و درجه اهمیت هرکدام از عوامل تأثیرگذار بر روی پاسخ شماره ۱، لحاظ گردید. دستیابی به اندام‌زایی مستقیم هدف اصلی این بهینه سازی با عدد ۵ یعنی بیشترین درجه اهمیت تعریف شد و کمترین مقدار کاربرد هورمون TDZ در درجه بعدی اهمیت با درجه ۴ قرار گرفت.

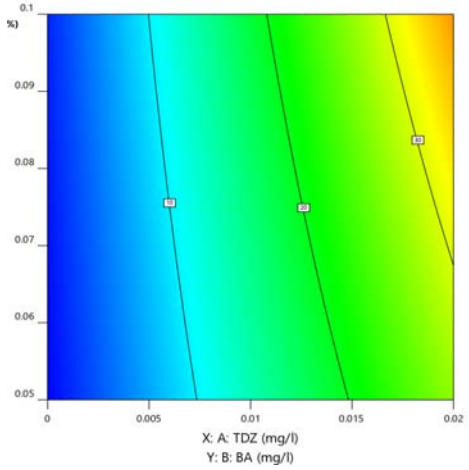
در ادامه ۱۰۰ راه حل بهینه شده توسط نرم افزار ارایه شده، که به طور خلاصه در جدول شماره ۵ به راه حل یا پاسخ بهینه شده اصلی با بالاترین میزان احتمال مطلوبیت و پاسخ بهینه شده برای رقم دوم مورد بررسی، اشاره شده است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

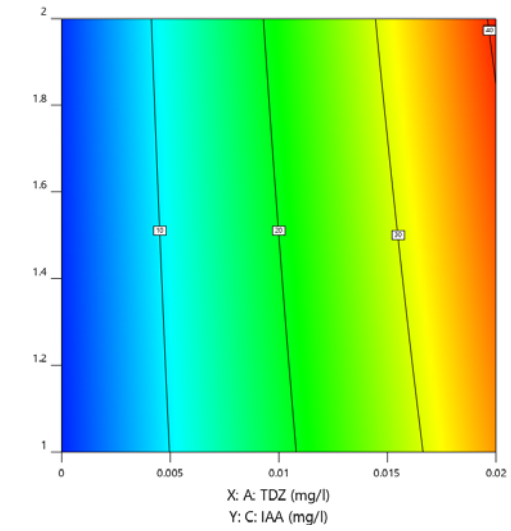
همانطور که در این جدول مشخص شده است رقم Little Maya با میزان احتمال مطلوبیت ۹۸۳/۰ درصد دارای قابلیت ۶۷/۸۲ درصد باززایی مستقیم در محیط کشت حاوی ۱/۰ mg/l هورمون BA و ۱ mg/l هورمون IAAبدون کاربرد هورمون TDZ را دارا می‌باشد.



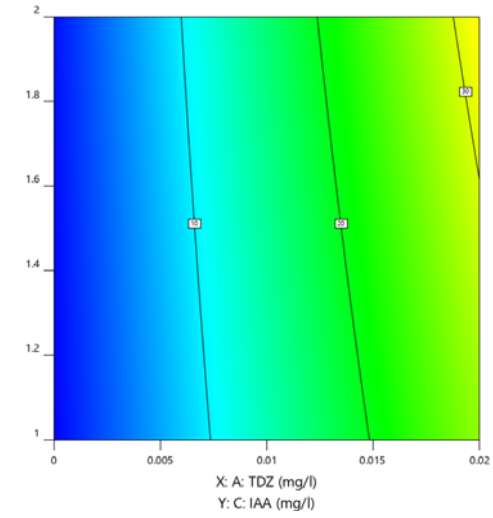
شکل ۹- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و BA در ترکیب با ۲mg/l هورمون IAA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia



شکل ۱۰- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و BA در ترکیب با ۱mg/l هورمون IAA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia

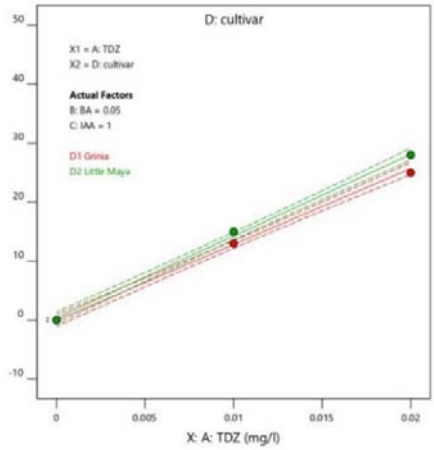


شکل ۱۱- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و IAA در ترکیب با ۱/۰mg/l هورمون BA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia

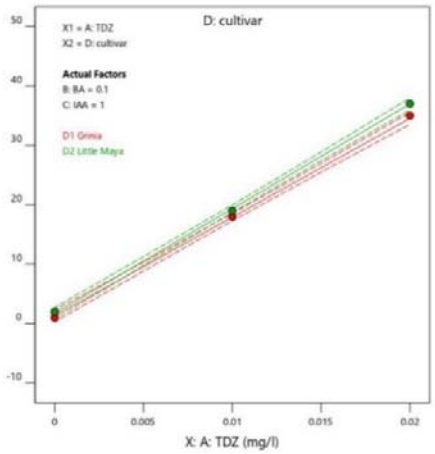


شکل ۱۲- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و IAA در ترکیب با ۰۵/۰mg/l هورمون BA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴
DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

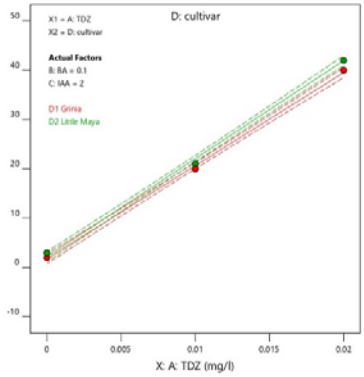


شکل ۱۳- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و رقم در ترکیب با ۰۵/۰mg/l هورمون BA و ۱ mg/l هورمون IAAبردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia

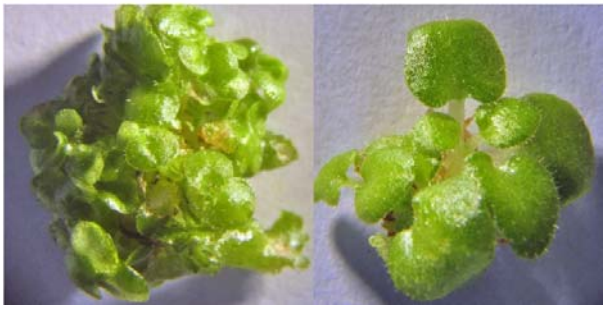


شکل ۱۴- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و رقم در ترکیب با ۱/۰ mg/l هورمون BA و ۱ mg/l هورمون IAA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia

شایان ذکر است باتوجه به پتانسیل مطلوب‌تر این رقم در باززایی مستقیم، ۷۲ راه حل اول داده شده در نرم افزار متعلق به همین رقم بود (داده ها ارایه نشده اند) و رقم Grinia در رتبه۷۳ ام پیشنهادی نرم افزار با احتمال مطلوبیت ۹۵/۰ درصد قرار گرفت که در این راه حل میزان باززایی مدلسازی شده برای این رقم ۳۳/۷۸ درصد در محیط کشت حاوی ۱/۰ mg/l هورمون BA و ۱ mg/l هورمون IAA بدون کاربرد هورمون TDZ بوده است. شایان ذکر است که در ادامه محیط کشت های پیشنهادی بهینه شده توسط نرم افزار، در سه تکرار برای ریزنمونه برگ در هر رقم مجددا اجرا شد که نتایج تجربی حاصله میانگین ۶۶/۸۱ درصدی برای رقم Little Maya و ۳۳/۷۳ درصد برای رقم Grinia را نشان داد که بسیار نزدیک به نتایج پیشنهادی نرم افزار بود. همانطور که مشاهده می‌گردد در صورت حذف هورمون TDZ از محیط کشت القا باززایی مستقیم با بافت برگ، فارغ از نوع رقم، ترکیب تعاملی mg/l ۱/۰ هورمون BA و ۱ mg/l هورمون IAA بهترین محیط کشت با بالاترین میزان القا باززایی مستقیم، می‌باشد.



شکل ۱۵- نمودار اثرات تعاملی هورمون‌های TDZ و رقم در ترکیب با ۱/۰ mg/l هورمون BA و ۲ mg/l هورمون IAA بردرصد باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Little Maya و Grinia



شکل ۱۶- تصویر باززایی مستقیم ریزنمونه دمبرگ هر دو رقم Grinia (الف) و Little Maya (ب) بنفشه آفریقایی پس از ۲ ماه

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴ DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

جدول ۴- مقادیر تعریف شده جهت بهینه سازی محیط کشت القای باززایی مستقیم از ریزنمونه برگ

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Importance
A:TDZ	minimize	0	0.02	4
B:BA	is in range	0.05	0.1	3
C:IAA	is in range	1	2	3
D:Cultivar	is in range	Grinia	Little Maya	3
Direct Regeneration from Leaf	is target = 85	0	85	5

جدول ۵- پاسخ های بهینه شده نرم افزار بر مبنای مدل حاصله از تجربه و تحلیل داده‌ها و مقادیر تعریف شده در جدول ۴

Number	TDZ	BA	IAA	cultivar	Direct Regeneration from Leaf	Desirability	
1	0.000	0.100	1.000	Little Maya	82.667	0.983	Selected
73	0.000	0.100	1.000	Grinia	78.333	0.950	

بحث و نتیجه گیری

تکنیک بهینه‌سازی بوسیله روش سطح پاسخ معمولاً زمانی به کار می‌رود که فاکتورهای مهم و محدوده غلظت آن‌ها در طی تجزیه و تحلیل اولیه شناسایی شده است و بهینه‌سازی تکمیلی در محدوده فاکتورها و محدوده غلظت تعریف شده برای پاسخ مطلوب و مورد نظر، نیاز است. این روش زمانی که بیش از ۲ عامل برای بهینه سازی در نظر گرفته می‌شود می‌تواند ابزار موثری باشد (۲۳). در این تحقیق روش سطح پاسخ سعی دارد تا با استفاده از یک طرح آزمایش مناسب، راهی برای تخمین برهمکنش‌ها و اثرات درجه دوم عوامل موثر بر باززایی بیابد تا تأثیرات چندگانه متغیرها را مدلسازی نماید. سپس به ارائه‌ی یک مدل رگرسیون برای برقراری ارتباطی بین پاسخ ها و فاکتورها می‌پردازد. در این میان هدف اصلی این تحقیق بهبود فرایند باززایی مستقیم با درک عوامل اصلی تأثیرگذار از جمله تأثیر ژنوتیپ، تأثیر تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت، کاهش تغییرات سوماکلونال و کاهش نقاط ضعف از جمله کاهش هزینه های تولید و رسیدن به یک مدل پایدار در فرایند باززایی مستقیم بود. از آنجاییکه رشد و نمو و فرایند تمایزیابی در گیاهان به طور مستقیم یا غیرمستقیم با تغییرات بیان ژن‌ها مرتبط است (۱۷) و در هر دو مکانیسم تولید گیاه کامل از ریزنمونه کشت بافتی، خواه به شکل اندام‌زایی و خواه رویان‌زایی عامل اصلی نوع و غلظت هورمون‌های محیط کشتی بیان شده است (۱۸)، بر همین مبنا فاکتورهای اصلی تأثیرگذار بر این فرایند در روش سطح پاسخ نوع و غلظت هورمون های محیط کشت و نوع ریزنمونه و ژنوتیپ لحاظ شدند و مدل رگرسیونی پیش بینی شده توسط نرم افزار نیز این فرضیات تحقیق را اثبات نمود. گزارشات حاکی از اینست که عوامل بسیار کلیدی وجود دارند که می توانند در تمایزیابی و اندام‌زایی علی الخصوص رویان‌زایی تأثیر مستقیم و به سزایی داشته باشند، از جمله مشاهده شده که محتوای داخلی هورمون‌ها در بافت‌های مختلف حتی در یک رقم با همدیگر تفاوت داشته و به طور شفاف‌تری بررسی‌ها نشان داده است در یک ریزنمونه مقادیر هورمون‌های درونی در ابتدای کشت درون شیشه‌ای و پس از گذر یک دوره کشت نیز تفاوت-های بارزی را بیان داشته اند (۴). مطابق مدل بدست آمده از روش سطح پاسخ با ماژول Historical Data Design

DOI: 10.22034/JPR.2023.2175 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴

مشخص شد که نوع ریزنمونه در یک رقم و در یک محیط کشت یکسان تأثیر بارزی بر اندام‌زایی داشته است. لذا به نظر می‌رسد، همانطور که گزارشات نشان می‌دهد محتوی هورمون‌های درونی در هر بافت نقش کلیدی در تنظیم مورفولوژی گیاه داشته (۱۵) و به احتمال بسیار زیاد، تعادل بین هورمون‌های درونی و بیرونی، القاء کننده فرایند اندام-زایی در ریزنمونه می‌باشند. در همین راستا مشخص شده است که محتوای درونی هورمون‌های اکسین و اسید ابسیزیک در بافت‌هایی که پتانسیل رویان‌زایی را دارند بالاتر است (۱۸و ۳۳) و مقادیر همین هورمون‌ها در طی اندام‌زایی شاخه در بافت‌هایی که پتانسیل اندام‌زایی نیز دارند بالاتر است و عوامل درونی و بیرونی حتی، تنش-هایی که سبب تجمع این هورمون‌ها در بافت می‌شوند نیز پتانسیل اندام‌زایی ریزنمونه را افزایش می‌دهند (۳۳). در کل می‌توان باتوجه به مدل بدست آمده، اینطور نتیجه گیری کرد که مقادیر درونی هورمون‌های بافت برگ یا دمبرگ، پتانسیل اندام‌زایی آن بافت را مشخص می‌کنند که به طور قطع این مقادیر خود وابسته به نوع رقم یا به عبارتی ژنوتیپ گیاه می‌باشد. لذا شناخت روند تغییرات هورمون‌های محیط کشت و حتی نوع تنظیم کننده به کار رفته در محیط کشت و میزان آن در طی فرایند اندام‌زایی یا رویان‌زایی در برخی ارقام می تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم تحت کنترل محتوای درونی هورمون‌های آن رقم و برهمکنش آنها قرار بگیرد. در همین راستا به کارگیری یک مدل تجربی در تحقیقاتی مشابه می‌تواند راهگشای هدفمند تر نمودن میزان و نوع تنظیم کننده های رشد برای دستیابی به اندام زایی خاص و مورد نظر باشد.

منابع

1. Abbasi, Z., Hooshyar, S., and Bagherieh-Najjar, M.B., 2016. Improvement of callus production and shoot regeneration using various organs of soybean (*Glycine max* L. Merr) by response surface methodology. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52(5), PP: 537-545.
2. Bilkey, P., and Cocking, E., 1981. Increased plant vigor by in vitro propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. from sub-epidermal tissue. HortScience, 16, 643-644.
3. Bilkey, P., McCown, B., and Hildebrandt, A., 1978. Micropropagation of African violet from petiole cross sections. Hortscience, 13(1), 37-38.
4. Centeno, M., Rodríguez, A., Feito, I., and Fernández, B., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures, Plant cell reports, 16(1-2), PP:58-62.
5. Chakraborty, D., Bandyopadhyay, A., Bandopadhyay, S., Gupta, K., and Chatterjee, A., 2010. Use of response surface methodology for optimization of a shoot regeneration protocol in *Basilicum polystachyon*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 46(5), PP: 451-459.
6. Craig, R., 2003. Creating a more beautiful world: a century of progress in the breeding of floral and nursery plants, HortScience, 38(5), PP: 928-936.
7. Draper, N.R., and Pukelsheim, F., 1996. An overview of design of experiments. Statistical Papers, 37(1), PP: 1-32. doi:10.1007/bf02926157.
8. George, J., Bais, H.P., Ravishankar, G.A., and Manilal, P., 2000. Optimization of media constituents for shoot regeneration from leaf callus cultures of *Decalepis hamiltonii* Wight. & Arn. HortScience, 35(2), PP: 296-299.
9. Ghaemmaghami, S.A., 2003. Optimization of intra-glass proliferation of African violet. Agriculture Sciences, 9(3), PP: 99- 108.
10. Gómez-Montes, E.O., Oliver-Salvador, C., Durán-Figueroa, N., Badillo-Corona, J.A., and Salas, C.E., 2015. Optimization of direct shoot regeneration using cotyledonary explants and true leaves from lettuce cv. Romaine (*Lactuca sativa* L.) by surface response methodology. Plant Growth Regulation, 77(3), PP: 327-334.
11. Grout, B.W.W., 1990. African Violet. In: Handbook of Plant Cell Culture (Vol. 5).
12. Gururajan, K., Hegde, D., Udupa, S., Shetty, S., and Ujwal, P., 2021. Optimization of shoot

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴ DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

initiation using response surface methodology and callus media standardization for micropropagation of *centella asiatica*. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences, 10(4), PP: 685-690.

13. Hoshino, Y., Nakano, M., and Mii, M., 1995. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Cell Reports, 14(6), PP: 341-344.

14. Hou, L., Wang, Y., Cui, Y., Pang, X., and Li, Y., 2018. Optimisation of a highly efficient shoot regeneration system using leaf explants of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) by response surface methodology. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 93(3), PP: 289-295.

15. Huang, W.L., Lee, C.H., and Chen, Y.R., 2012. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108(2), PP: 257-263.

16. Ioannou, M., 1987. Micropropagation of African Violet from petiole and leaf plade tissue. Cyprus Agricultural Research Institute Technical Bulletin, 92, 1-4.

17. Jiménez, V.M., 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13(2), PP : 196-223.

18. Jiménez, V.M., and Bangerth, F., 2001. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non□embryogenic cultures of carrot. Physiologia Plantarum, 111(3), PP: 389-395.

19. Mithila, J., Hall, J., Victor, J., and Saxena, P., 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Plant Cell Reports, 21(5), PP: 408-414.

20. Mølgaard, J., Roulund, N., Deichmann, V., Irgens-Møller, L., Andersen, S., and Farestveit, B., 1991. In vitro multiplication of *Saintpaulia ionantha* Wendl. by homogenization of tissue cultures. Scientia Horticulturae, 48(3-4), PP: 285-292.

21. Mose, W., Indrianto, A., Purwantoro, A., and Semiarti, E., 2017. The Influence of Thidiazuron on Direct Somatic Embryo Formation from Various Types of Explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Orchid. HAYATI Journal of Biosciences, 24(4), PP: 201-2.

22. Myers, R.H., 1971. Response Surface Methodology, Allyn and Bacon. Inc., Boston, MA.

23. Myers, R.H., Montgomery, D.C., and Anderson-Cook, C.M., 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.

24. Naveenchandra, P.M., Bhattacharya, S., and Ravishankar, G.A., 2011. Culture media optimization through response surface methodology for in vitro shoot bud development of *Solanum melongena* L. for micropropagation. Int. J., Bioautomation, 15(3), PP: 159-172.

25. Omar, M., Abdullah, M.A., Hasan, M.A., and Marziah, M., 2004. Development of growth medium for *Centella asiatica* cell culture via response surface methodology. American Journal of Applied Sciences, 1(3), PP: 215-219.

26. Premkumar, G., Karuppanapandian, T., Sureshpandian, C., Arumugam, N., Selvam, A., and Rajarathinam, K., 2020. Optimization of a liquid culture system for shoot regeneration and achieving an enriched level of scopadulcic acid b in the leaf organ cultures of Scoparia dulcis L. by response surface methodology. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 56(1), PP: 60-71.

27. Sarai, N., Bodhipadma, K., Noichinda, S., Luangsriumporn, P., and Leung, D.W., 2017. Microshoot culture of Persian violet: Plant regeneration and in vitro flowering. Annals of Agricultural Sciences, 62(1), PP: 105-111.

28. Sundaram, U., Anupama, V., and Gurumoorthi, P., 2013. Optimization of pH and sucrose in the callus culture for the micro propagation of Mucuna pruriens using response surface methodology. Int J Pharm Pharmaceut Sciences, 5, PP: 420-426.

29. Sunpui, W., and Kanchanapoom, K., 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured in vitro. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 24(3), PP: 357-364.

30. Taha, R., Daud, N., and Hasbullah, N., 2008. Establishment of Efficient Regeneration System, Acclimatization and Somaclonal Variation in *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. Paper presented at the IV International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 865 p.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۸۸-۳۷۴ DOI: 10.22034/JPR.2023.2175

31. Teixeira da Silva, J.A., Zeng, S., Wicaksono, A., Kher, M.M., Kim, H., Hosokawa, M., and Dewir, Y.H., 2017. In vitro propagation of African violet: A review. South African Journal of Botany, 112, PP: 501-507.

32. Weatherhead, M., Grout, B., and Short, K., 1982. Increased haploid production in *Saintpaulia ionantha* by Anther culture. Scientia Horticulturae, 17(2), PP: 137-144.

33. Zhang, Y., Zhou, J., Wu, T., and Cao, J., 2008. Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93(3), 323 p.

Optimization of direct organogenesis in African violet (*Saintpaulia ionantha*) using response surface methodology

Missaghi M.[1], Yari F.[2*], Mousavi A.[3], Mostofi Y.[4] and Ofoghi H.[5]

[1] Dept. of Horticultural Sciences and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, P.O. Box: 33535111, Tehran, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, P.O. Box 14155-6343, Tehran, I.R. of Iran.

[4] Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources. University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran.

[5] Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Saintpaulia ionantha is one of the most important commercial plants with unique natures in color and shape, which has made it, the most popular indoor plant. Genetic engineering would be one of the most widely used technique for plant breeding. However, these methods are based on tissue culture techniques to create and produce novel cultivars. It also seems that successful direct regeneration constitutes the first step in developing strategies for genetic manipulation. This study aimed to determine the influence of MS medium supplemented with various amounts of growth regulators including IAA, BA, TDZ on direct organogenesis of two African violet cultivars (Little Maya and Grinia) from leaf and petiole explants, using the response surface methodology. Treatments applied on both cultivars resulted in the induction of regeneration in leaf and petiole explants. However, leaf explants showed more organogenic potential than petioles. The potential of direct organogenesis of both cultivars was not significantly different from each other in the same explants. Although, predicted model by historical data design which were investigated practically in 3 replications indicated that, the Little Maya cultivar had the highest percentage of direct organogenesis. In this regard, medium containing BA 0.05 mg/l + TDZ 0.01 mg/l + IAA 1 mg/l was more successful in inducing direct organogenesis in both cultivars. Therefore, according to the obtained model, it seems that the direct organogenesis potential was affected by the interaction of hormones and explants, which could also result from the genotypes.

Key words: African violet (Saintpaulia ionantha), organogenesis induction, callus, plant hormones