



## پرآوری شاخساره درون‌شیشه‌ای گلابی رقم شکری تحت تاثیر عناصر غذایی محیط کشت در

### فضای نرم افزار Design Expert

ساجده کریم پور<sup>۱</sup> - غلامحسین داوری نژاد<sup>۲\*</sup> - محمد زکی عقل<sup>۳</sup> - محمدرضا صفر نژاد<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

#### چکیده

بمنظور بهبود رشد شاخه‌های باززایی شده گلابی رقم شکری آزمایشی در فضای نرم افزار Design Expert در قالب ۲۰ نقطه شامل مقادیر تصادفی از سه فاکتور عناصر غذایی ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ، آهن و عناصر میکرو) اجرا شد. پاسخ ریزنمونه‌ها از نظر تعداد شاخه پرآوری شده، طول شاخه پرآوری شده، تعداد برگ، مقدار کلروفیل a برگ، کارتنوئید برگ و قدرت رشدی بعد از دو ماه ثبت گردید. فاکتورهای مورد بررسی در قالب مدل‌های حاصل از تجزیه آماری (مدل‌های خطی، چندجمله‌ای ساده و چندجمله‌ای درجه دوم) بر پاسخ‌های مورد ارزیابی بطور معنی‌داری موثر بودند. افزایش آهن تا یک و نیم برابر و کاهش  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  به نصف غلظت آن‌ها در محیط کشت MS باعث افزایش تعداد شاخه پرآوری شده (۴/۴۳ برابر) گردید.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ، آهن  $\times$  عناصر میکرو رابطه‌ی خطی منفی با طول شاخه نشان دادند درحالی‌که تعداد برگ بطور منفی متأثر از عناصر میکرو بود. با افزایش  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  از طول شاخه پرآوری شده کاسته شد و از طرف دیگر مقادیر  $\times 0/5$  و  $\times 1$  محیط کشت MS به ترتیب برای آهن و میکرو باعث افزایش ۱/۵ برابری در طول شاخه شد. شاخه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی  $\times 1$  مقادیر میکرو در محیط کشت پایه MS به میزان ۱/۵ برابر برگ بیشتری نسبت به مقادیر  $\times 2$  تولید کردند. محتوی کلروفیل a و کارتنوئید برگ در قالب مدل خطی تحت تاثیر مقادیر آهن (مثبت) و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (منفی) قرار گرفتند. افزایش آهن تا  $\times 1/5$  برابر و کاهش  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  تا  $\times 0/5$  برابر محیط کشت پایه MS باعث افزایش ۲ برابری در میزان کلروفیل a و کارتنوئید شد.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  و میکرو در قالب رابطه خطی منفی رشد رویشی را تحت تاثیر قرار دادند بطوریکه نصف مقادیر  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  با افزایش تعداد شاخه پرآوری شده و طول شاخه موجب افزایش قدرت رشدی شاخه تا ۲/۵ برابر شاهد گردید و کاهش مقادیر میکرو از طریق افزایش طول شاخه بر قدرت رشدی تاثیر مثبت داشت. محیط کشت بهینه شده برای گلابی شکری با استفاده از نرم افزار Design Expert محیط کشت MS تغییر یافته به ترتیب حاوی  $\times 0/9$ ،  $\times 1$  و  $\times 0/5$  مقادیر آهن، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  بود.

واژه‌های کلیدی: ازدیاد درون‌شیشه‌ای، *Pyrus communis*، Response surface method، میکرو، آهن

#### مقدمه

می‌باشد. با این وجود بدلیل اینکه پاسخ به محیط کشت اغلب وابسته به ژنوتیپ بوده و تاثیرات مواد غذایی روی مورفوزنیز بطور خیلی ضعیفی مورد بررسی قرار گرفته است، توسعه یک محیط کشت بهینه برای یک محصول ویژه کاملاً پیچیده است (۱۴ و ۲۱). در ارتباط با اهمیت نمک‌های موجود در محیط کشت برای گلابی آزمایشاتی انجام گرفته است (۳۷، ۳۸، ۴۵، ۴۶ و ۴۷). بسیاری از گیاهان و ارقام ریکالسیترانت<sup>۵</sup> یا رشد کند به محیط کشت‌های هورمونی (تنظیم کننده های رشد گیاهی) مختلف و یا محیط کشت‌های رایج MS و WPM بهینه شده پاسخ نمی‌دهند. بدلیل تنوع ژنتیکی وسیع یافت شده در کلکسیون‌های ژرم پلاسما‌های گلابی (*Pyrus sp.*)، پاسخ‌های رشدی متنوعی به محیط کشت‌های مختلف دیده شده

ریزازدیادی علاوه بر اینکه نقش مهمی در تولید سریع و بهره‌برداری از ارقام محصولات باغی جدید دارد، وسیله‌ای را جهت ذخیره ژرم‌پلاسما و نگهداری ذخایر عاری از ویروس فراهم می‌آورد (۳۶). برای ازدیاد و ذخیره درون‌شیشه‌ای ماده گیاهی، انتخاب محیط کشت مناسب یکی از مهم‌ترین مراحل در توسعه پروتکل ریزازدیادی

۱ و ۲- فارغ التحصیل مقطع دکتری و استاد گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
(\*) نویسنده مسئول: (Email: davarynej@um.ac.ir)

۳- استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشیار، بخش ویروس‌شناسی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i4.70420

فاکتوری<sup>۳</sup> ترکیبات مزوز بیشترین تاثیر را داشتند. عناصر غذایی هم‌چنین مورفوزنیز رو تحت تاثیر قرار می‌دهد. برای مثال شاخه‌های رشد یافته روی محیط کشت با غلظت‌های بالای آهن نسبت به شاهد (محیط کشت MS) معمولاً کوتاه شدند درحالی‌که شاخه‌ها روی محیط کشت‌های غنی از مزوز رشد قویتری داشتند و برگ‌های بزرگی تولید کردند. پرآوری شاخه هم‌چنین می‌تواند توسط دستکاری عناصر غذایی بدون تغییر تنظیم‌کننده‌های رشد تحت تاثیر قرار گیرد (۳۷) و (۳۸).

کیفیت ریزافزانه تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای (تعداد شاخه پرآوری شده و طول شاخه) بطور موثری تحت تاثیر عناصر  $MgSO_4$ ،  $KH_2PO_4$  و  $CaCl_2$  قرار گرفت که با توجه به ژنوتیپ‌های گلابی بسیار متغییر بود (۴۶). شاخه‌های پرآوری شده گلابی رقم  $\square$  شکری در محیط کشت استاندارد MS غنی شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA رشد طولی مناسب و توسعه طبیعی برگ‌ها دیده نشد لذا به منظور بهبود خصوصیات رویشی ریزافزانه‌های درون شیشه‌ای این رقم آزمایش چندفاکتوره شامل تعدادی از فاکتورهای تغذیه‌ای محیط کشت موثر در نظر (۳۷ و ۴۶) گرفته شدند. هدف از اجرای این آزمایش استفاده از روش  $RSM^4$  برای یافتن مقادیر بهینه تعدادی از عناصر غذایی محیط کشت MS برای گلابی رقم  $\square$  شکری و همچنین نشان دادن اهمیت استفاده از این روش در بهینه‌سازی رشد درون شیشه‌ای مواد گیاهی می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی: از شاخه‌های درون شیشه‌ای گلابی رقم  $\square$  شکری کشت شده در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت استاندارد MS غنی شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA (۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار) استفاده شد. جهت اجرای آزمایش شاخه‌هایی بطول ۱/۵ سانتی‌متر مورد استفاده قرار گرفتند. شاخه‌ها درون شیشه‌های ۹۰ میلی‌لیتری هر کدام حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت و یک نمونه گیاهی نگهداری شدند.

طرح آماری: روش کار همانطور که توسط رید و همکاران (۳۷) اشاره شده است بصورت مختصر بدین صورت می‌باشد؛ (۱) فضای طراحی سه بعدی تعریف شده بوسیله‌ی نمک‌های محیط کشت MS یا یک گروه از نمک‌های آن ایجاد شد و (۲) پرآوری شاخه‌های گلابی روی ترکیب‌های تیماری بیان شده به‌عنوان نقاطی داخل یا روی

است (۲، ۳ و ۲۴)، و بسیاری از گونه‌ها و ارقام گلابی روی محیط کشت‌های استاندارد مختلف بسختی واکنش مثبتی نشان می‌دهند (۳۵) ولی محیط کشت MS معمولاً برای باززایی شاخه در گونه‌های گلابی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲ و ۶). عناصر غذایی نقش مهمی را در تنظیم رشد و نمو گیاهی بر عهده دارند (۳۴). کمبود عناصر غذایی بخوبی در شرایط مزرعه‌ای مطالعه شده (۴) اما به روشنی در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار نگرفته است. رشد گیاه روی محیط کشت‌های غیربهینه ممکن است بوسیله‌ی غلظت‌های بالاتر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جبران شود و محیط کشت‌های بهینه ممکن است نیازمند غلظت‌های پایین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای رشد مناسب گیاه باشند (۳۲). تعیین مکانیسم‌های در دسترس مواد غذایی که رشد گیاه را کنترل می‌کند یک چالش عمده در زیست‌شناسی گیاهی است، و اثرات متقابلی که در جذب مواد غذایی موثر هستند آن‌را بیشتر دچار چالش می‌کند (۱۵).

در حال حاضر طرح‌های آزمایشی و نرم افزارهای آماری بهبودیافته روش‌های بسیار کارآمدتری را برای بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط ریزادیدادی فراهم می‌کنند (۱۲، ۱۳ و ۲۸). در روش‌های سطح پاسخ<sup>۱</sup>، هر فاکتور موثر به عنوان یک بعد هندسی در نظر گرفته می‌شود که منجر به یک حجم هندسی با  $n$  بعد می‌شود. این حجم فضای طرح آزمایشی است که مطابق اهداف آزمایش نمونه‌گیری می‌شود. به‌منظور نمونه‌گیری از فضای طرح تعدادی از نقاط ایجاد می‌شود. پاسخ‌های حاصل از هر یک از نقاط طراحی شده، اندازه‌گیری می‌شوند و بدین صورت انواع فرمولاسیون‌ها برای بهترین پاسخ تعیین می‌شود، از اینرو آزمایشات چندعامله اطلاعات زیادتری را نسبت به تست‌های تک عامله فراهم می‌کند (۲۸). مطالعات چندفاکتوره می‌تواند راه حل مناسبی برای درک چگونگی تاثیر فاکتورهای محتمل بر پاسخ‌های مورد نظر باشد. طراحی آزمایشات پیشرفته و روش‌های سطوح پاسخ جهت بهینه‌سازی محیط کشت برای کشت شاخه و کالوس برخی گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (۲۷، ۲۸، ۲۹ و ۳۰). همچنین مطالعات متعددی به روش سطح پاسخ و با استفاده از نرم افزار Design Expert به‌منظور بهینه‌سازی ساختن عناصر غذایی محیط کشت برای ارقام گلابی صورت گرفته است (۳۷ و ۳۸). در این آزمایشات بر اساس آنالیز پنج فاکتور عناصر غذایی از محیط کشت MS (گروه مزوز<sup>۲</sup>:  $CaCl_2$ ،  $KH_2PO_4$  و  $MgSO_4$ ؛  $KNO_3$ ؛  $NH_4NO_3$ ؛ عناصر میکرو و آهن) در رشد درون شیشه‌ای پنج نوع گلابی با استفاده از طرح پاسخ سطحی چند

۳- Multifactor surface response design

۴- Response Surface Methodology

۱- Surface response method

۲- Mesos

اصلی در فتوستنتز) و کارتنوئید به روش اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد (۷).

**آنالیز آماری:** میانگین پنج تکرار به عنوان پاسخ برای هر نقطه مورد استفاده قرار گرفت. بالاترین مرتبه از مدل چندجمله‌ای که حداقل در سطح ۵ درصد برای هر پاسخ معنی‌دار بود با استفاده از تجزیه واریانس آنالیز گردید (۲۷، ۲۸ و ۲۹). نرم افزار Design-Expert 8 (2010) برای طراحی، ارزیابی مدل و تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری نشان داد که سه فاکتور مورد بررسی (آهن، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) در قالب مدل‌های خطی، چندجمله‌ای درجه ساده و چند جمله‌ای درجه دوم بر تمامی پاسخ‌های مورد ارزیابی بطور معنی‌داری ( $p \leq 0.01$ ) موثر بودند (جدول ۲). مدل‌های پاسخ که نشان دهنده تاثیر فاکتورهای مورد بررسی بر هر پاسخ است در شکل‌ها آورده شده است.

سطح فضای سه بعدی طراحی شده ارزیابی شدند، ۳ در نهایت یک معادله پیش‌بینی شده برای هر پاسخ تولید شد. سه فاکتور عناصر غذایی بر اساس نمک‌های محیط کشت MS ایجاد شد که هر فاکتور بر اساس غلظت‌هایی از محیط کشت MS متغیر بودند ( $\times \text{MS}$ ).  $0.5 \times$  تا  $1.5 \times$  برای آهن ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  و  $1 \times$  تا  $2 \times$  برای عناصر میکرو ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ،  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ،  $\text{KI}$ ،  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ،  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ،  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). ۲۰ نقطه بصورت تصادفی در قالب طرح D-optimal (۳۷ و ۴۷) برای فاکتورهای مورد نظر ایجاد شد (جدول ۱، شکل ۱). تمامی ۲۰ نقطه طراحی شده بطور همزمان اجرا شدند. برای هر تیمار ۵ تکرار (هر تکرار شامل یک شاخه در شیشه‌های ۹۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت) در نظر گرفته شد و بعد از دو بار واکنش به فاصله ۴ هفته در همان محیط کشت ثبت داده صورت گرفت.

**داده برداری:** صفات مورد بررسی تعداد شاخه پرآوری شده، طول شاخه پرآوری شده (میلی‌متر)، تعداد کل برگ‌های تولید شده، کلروفیل a برگ (میلی‌گرم برگ‌گرم)، کارتنوئید برگ (میلی‌گرم برگ‌گرم) و قدرت رشدی ((تعداد شاخه پرآوری شده  $\times$  طول شاخه پرآوری شده) + طول شاخه اصلی؛ میلی‌متر) بود. میزان کلروفیل a (به عنوان رنگدانه

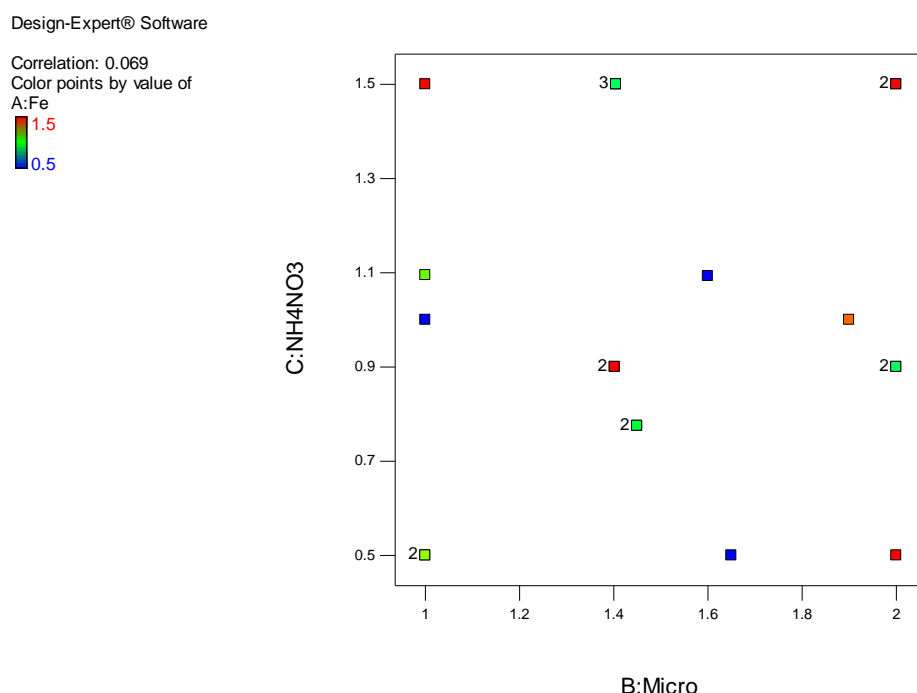
جدول ۱- طرح سه فاکتوری (آهن، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) طراحی شده توسط نرم افزار Design-Expert شامل ۲۰ نقطه مدل مورد استفاده جهت برآوری گلابی رقم 'شکری' در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 1- Three-factor design ( Fe, Micro and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) was designed by Design-Expert software including 20 model points used for *in vitro* shoot proliferation of *Pyrus communis* cv. 'Shekari'

نقاط تیماری طراحی شده Treatment design points	فاکتور اول Factor 1 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	فاکتور دوم Factor 2 Fe	فاکتور سوم Factor 3 Micro
1	1	1	0.5
2	1.5	2	1.5
3	0.5	1	0.5
4	1.5	2	0.5
5	1.5	1	1.5
6	0.5	1.6	0.5
7	1.5	1.4	0.9
8	0.9	2	0.9
9	0.9	1.4	1.5
10	0.5	1	1.1
11	1.1	1.6	0.5
12	0.5	2	1.5
13	0.9	2	0.9
14	1.5	1.4	0.9
15	1	1.9	1.4
16	0.9	1.4	1.5
17	1.5	1.4	0.9
18	0.8	1.4	0.9
19	0.8	1.4	0.9
20	1	1	1

نقاط طراحی شده بصورت تصادفی بودند. نقطه ۲۰ مقادیر محیط کشت MS ( $\times 1$ ) می‌باشد.

Design points were randomly assigned. Point 20 is MS amount ( $\times 1$ ) of three factors.



شکل ۱- پراکنش نقاط طراحی شده در نرم افزار Design-Expert برای سه فاکتور Fe، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . اعداد نشاندهنده تکرار در نقطه می باشند.

Figure 1- Points were designed by Design-Expert software for three-factor Fe, Micro and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Numbers indicate replication in a point.

ندل چوآ (۲۵) و ال-مری و همکاران (۱) دریافتند که پرآوری ارقام 'Bartlett' و 'Passe Crassane' در محیط کشت QL (۳۳) که کمترین میزان  $\text{NH}_4^+$  را داشت بهترین بود. *Pyrus pyrifolia* (Burm. F.) Nakai.I در محیط کشت WPM (۲۱) که حاوی یک چهارم مقادیر  $\text{NH}_4^+$  نسبت به محیط کشت MS است تعداد شاخه بیشتری تولید کرد (۴۴). گونه‌های مختلف گلابی *communis cvs.* در *P. pyrifolia* cv. Sion Szu Mi و *P. OH×F 87*, Horner 51 مقادیر پایین  $\text{NH}_4^+$  و  $\text{NO}_3^-$  بیشترین تعداد شاخه را تولید کردند (۴۶). مطابق با نتایج این آزمایش آهن در تولید شاخه در شرایط درون شیشه ای موثر است بطوریکه گزارش شده است کاهش جذب آهن القا شده توسط غلظت‌های بالای فسفر باعث کاهش تولید شاخه در تنباکو شد (۳۴). همچنین رید و همکاران (۳۷) مشاهده کردند در ژنوتیپ‌های *Pyrus* تعداد شاخه پرآوری شده تحت تاثیر فاکتور  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  و آهن قرار گرفت بطوریکه کاهش  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  تا نصف غلظت محیط کشت MS به همراه افزایش میزان آهن تا یک و نیم برابر غلظت محیط کشت پایه MS تعداد شاخه پرآوری شده در *OH×F87* را افزایش داد که با آنچه برای گلابی رقم  $\square$  شکر  $\square$  بدست آمد مطابقت دارد.

#### تعداد شاخه پرآوری شده: همانطور که در نمونه جدول

تجزیه واریانس جدول ۳ آورده شده است مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای پاسخ تعداد شاخه پرآوری شده معنی دار شد ( $p \leq 0.01$ ). تعداد شاخه پرآوری شده بصورت خطی با مقادیر آهن تغییر کرد در صورتیکه تابعی درجه دو از  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  بود. آهن و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $p \leq 0.01$ ) به ترتیب رابطه مثبت و منفی بر تعداد شاخه پرآوری شده نشان دادند ولی  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  فاکتور موثرتری بود (جدول ۲). افزایش مقادیر آهن تا ۱/۵ برابر محیط کشت پایه MS و کاهش مقدار  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  تا ۰/۵ برابر مقادیر محیط کشت پایه MS (۳/۵ شاخه بر ریزنمونه) تولید شاخه را نسبت به شاهد (۰/۸ شاخه بر ریزنمونه) افزایش داد (شکل ۲). نیتروژن به عنوان یک عنصر ضروری برای رشد ریزنمونه به دو فرم نیترات و آمونیوم در محیط کشت استفاده می‌شود (۱۰). نوع و مقدار منبع نیتروژن مورد نیاز بستگی به ژنوتیپ دارد. بطور واضح نیترات نوع مناسب منبع نیتروژن برای اغلب گونه‌ها است و فرم قابل دسترس در اکثر محیط‌های کشت می‌باشد (۱۸، ۲۶ و ۴۰). تفاوت‌های مشخصی بین گونه‌های گلابی در ارتباط با مقادیر، فرم و نسبت‌های مختلف نیتروژن برای تولید شاخه‌های با کیفیت گزارش شده است بطوریکه برای گونه *P. communis* غلظت‌های بالای  $\text{NO}_3^-$  و غلظت‌های پایین تا متوسط  $\text{NH}_4^+$  مناسب بودند (۴۵).

جدول ۲- خلاصه نتایج آنالیز آماری و فرمول خروجی مدل برای شش پاسخ پرآوری در شاخه‌های درون‌شیشه‌ای گلابی رقم 'شکری' تحت تاثیر سه فاکتور تغذیه‌ای  
 Table 2- Summary of statistical analysis results and model output formula for six shoot proliferation responses of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' shoots *in vitro* affected by three mineral nutrient factors

پاسخ Response	p-value			R-Squared
	Model	Factors	Lack of fit	
تعداد شاخه پرآوری شده (مدل چندجمله‌ای درجه دوم) Proliferated Shoot Number (Quadratic Model)	0.001	Fe: 0.038 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 0.0003 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> <sup>2</sup> : 0.003	0.248	0.63
طول شاخه‌های پرآوری شده (مدل چندجمله‌ای درجه ساده) (2FI Model) Proliferated Shoot Length	0.002	Micro: 0.014 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 0.018 Fe × Micro: 0.042	0.269	0.59
تعداد برگ کل (مدل خطی) Total Leaf Number (Linear Model)	0.008	Micro: 0.008	0.106	0.43
کاروفیل a برگ (مدل خطی) Leaf Chlorophylls a (Linear Model)	0.013	Fe: 0.020 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 0.0343	0.157	0.40
کاروتنوئید برگ (مدل خطی) Leaf Carotenoids (Linear Model)	0.009	Fe: 0.017 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 0.023	0.547	0.42
رشد رویشی (مدل خطی) Vegetative Growth (Linear Model)	0.0005	Micro: 0.008 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 0.0013	0.149	0.59

Formula

$$Y = 0.69 + 0.43 \text{ Fe} - 0.91 \text{ NH}_4\text{NO}_3 + 1.01 \text{ NH}_4\text{NO}_3^2$$

$$Y = 0.78 - 0.31 \text{ Micro} - 0.31 \text{ NH}_4\text{NO}_3 + 0.33 (\text{Fe} \times \text{Micro})$$

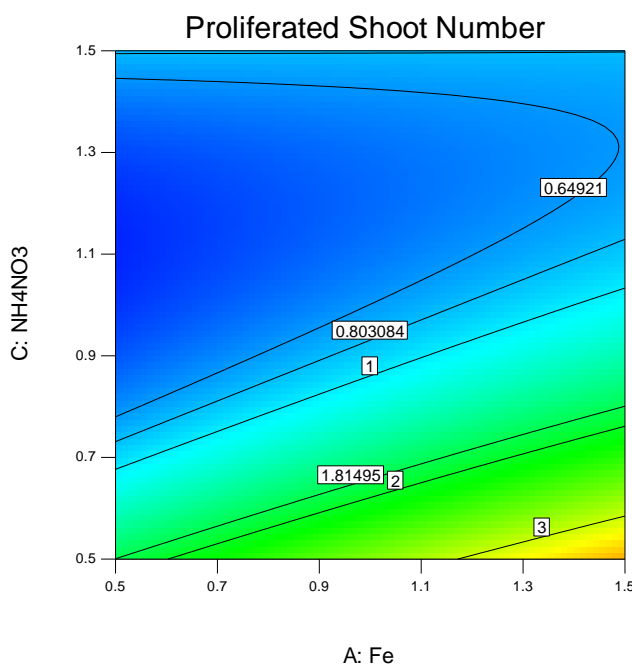
$$2.59 \text{ Micro} - Y = 12.37$$

$$Y = 13.30 + 4.70 \text{ Fe} - 4.29 \text{ NH}_4\text{NO}_3$$

$$Y = 1353.75 + 476.58 \text{ Fe} - 457.20 \text{ NH}_4\text{NO}_3$$

$$Y = 5.71 - 1.77 \text{ Micro} - 2.29 \text{ NH}_4\text{NO}_3$$

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Proliferated Shoot Number  
 4.33333  
 0  
 X1 = A: Fe  
 X2 = C: NH4NO3  
 Actual Factor  
 B: Micro = 1.5



شکل ۲- تعداد شاخه پرآوری شده در گلابی رقم 'شکری' تحت تاثیر مقادیر آهن و  $NH_4NO_3$  در شرایط درون شیشه‌ای.  
 Figure 2- The proliferated shoot numbers of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' under different concentrations of Fe and  $NH_4NO_3$  in *in vitro* condition.

جدول ۳- نمونه‌ای از جزئیات تجزیه واریانس برای پاسخ تعداد شاخه پرآوری شده در گلابی رقم 'شکری' تحت تاثیر مقادیر آهن و  $NH_4NO_3$  در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 3- Sample ANOVA and summary statistics for proliferated shoot numbers response of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' under different concentrations of Fe and  $NH_4NO_3$  in *in vitro* condition.

منبع Source	جمع مربعات Sum of squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	F value	p value (Prob>F)
Model		4	3035	8.39	0.0009
Fe	2.067	1	2.07	5.15	0.0379
$NH_4NO_3$	9.037	1	9.04	22.65	0.0003
$Fe \times NH_4NO_3$	1.212	1	1.21	3.04	0.1017
$NH_4NO_3^2$	4.921	1	4.29	12.34	0.0031
Residual		15	0.40		
Lack of Fit	4.735	10	0.47	1.90	0.248
Pure Error	1.248	5	0.25		
Cor Total	19.367	19			
SD	0.63		<i>R squared</i>	0.69	
Mean	1.19		Adj <i>R squared</i>	0.61	
CV%	53.07		Pred <i>R squared</i>	0.35	
Press	12.54		Adeq Precision	10.82	

تجزیه واریانس برای مدل سطح پاسخ چندجمله‌ای درجه دوم کاهش یافته. جدول تجزیه واریانس (جمع مربعات کلاسیک- نوع II).  
 ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model. Analysis of variance table (classical sum of squares—type II).

آهن  $\times$  میکرو ( $p \leq 0.05$ ) بر طول شاخه‌های پرآوری شده موثر بود که نشان دهنده اثر بیشتر عناصر میکرو بر طول شاخه پرآوری شده است (جدول ۲). کاهش  $NH_4NO_3$  بصورت خطی (شکل ۳، a) و

طول شاخه پرآوری شده: مدل چندجمله‌ای درجه ساده برای پاسخ طول شاخه‌های پرآوری شده معنی‌دار شد ( $p \leq 0.01$ ) بطوری‌که فاکتورهای  $NH_4NO_3$  ( $p \leq 0.01$ )، میکرو ( $p \leq 0.01$ ) و اثر متقابل

داد بطوریکه کاهش آهن تا ۰/۵× و مقادیر میکرو معادل محیط کشت MS باعث افزایش ۱/۵ برابری در طول شاخه شد. رابطه منفی غلظت آهن با طول شاخه در گلابی گزارش شده است (۳۷).

کاهش مقادیر آهن × میکرو بصورت متقابل طول شاخه پرآوری شده را افزایش داد (شکل ۳، b). همانطور که انتظار می‌رود آهن که اثر مثبت بر تعداد شاخه پرآوری شده داشت اثر منفی بر طول شاخه نشان

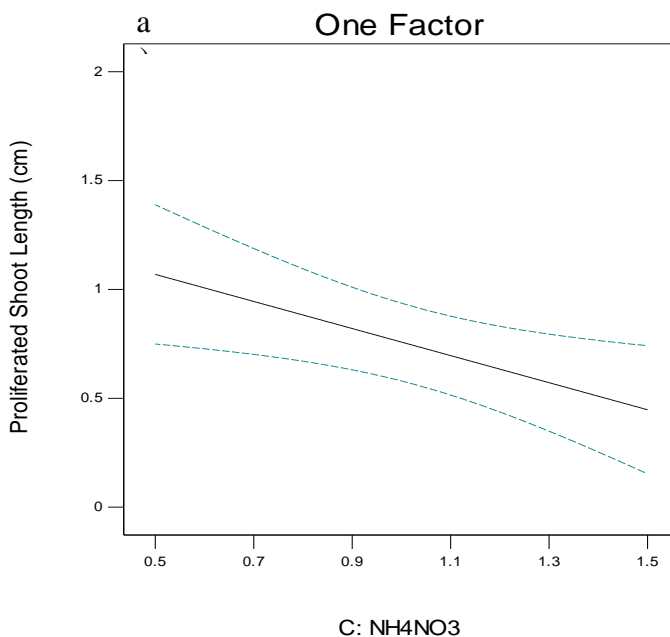
Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Proliferated Shoot Length (cm)  
--- 95% CI Bands

X1 = C: NH4NO3

Actual Factors

A: Fe = 1

B: Micro = 1.5

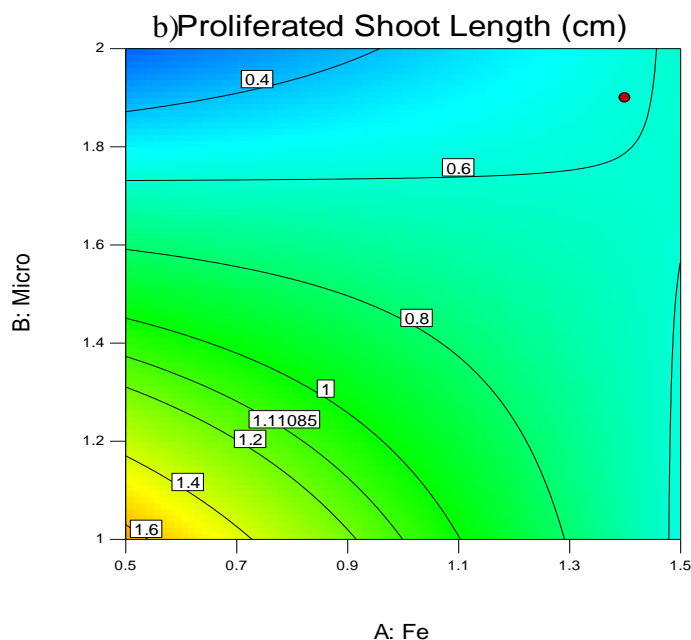


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Proliferated Shoot Length (cm)  
● Design Points  
1.96557  
0.04

X1 = A: Fe

X2 = B: Micro

Actual Factor  
C: NH4NO3 = 1



شکل ۳- طول شاخه‌های پرآوری شده گلابی رقم 'شکری' تحت تاثیر مقادیر NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (a) و آهن × میکرو (b) در شرایط درون شیشه‌ای  
Figure 3- Proliferated shoot length of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' affected by NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (a) and Fe × Micro interaction effect (b) in *in vitro* condition

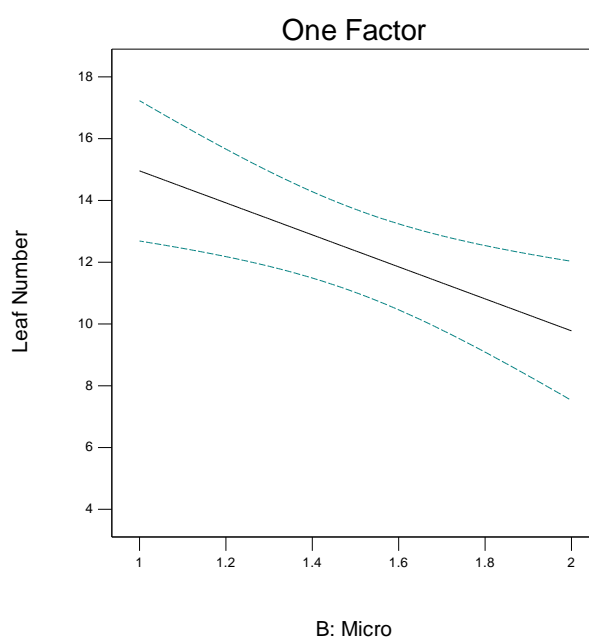
ایجاد سمیت می‌کند که نشانه عمومی سمیت عناصر کاهش رشد می‌باشد (۳۱). در تمام گیاهان عالی حدود ۲۰ پروتئین zinc finger شناسایی شده است که نقش مهمی را در نمو گیاه مانند آغازش برگ و شاخه‌های جانبی دارد (۴۲). به نظر می‌رسد غلظت عناصر میکرو در محیط کشت پایه MS غلظت بهینه برای رشد باشد چنانکه غلظت‌های پایین عناصر میکرو در شاخه‌های درون شیشه‌ای گلابی ارقام Hang Pa Li و Winter Nelis گره‌های بیشتری تولید کرد (۳۷).

**تعداد برگ:** تعداد برگ تولید شده در قالب مدل خطی ( $p \leq 0.01$ ) تحت تاثیر مقادیر میکرو قرار گرفت (جدول ۲). رابطه مستقیم منفی بین تعداد برگ تولید شده و مقادیر میکرو ثبت شد. شاخه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی  $1 \times$  مقادیر میکرو در محیط کشت پایه MS به میزان  $1/5$  برابر برگ بیشتری نسبت به مقادیر  $2 \times$  تولید کردند (شکل ۴). عناصر میکرو در مقادیر بسیار پایین برای گیاه ضروری بوده و در تمام فرآیندهای حیاتی گیاه مانند فتوسنتز و متابولیسم گیاه نقش دارند با این وجود غلظت‌های بیش از حد این عناصر در گیاه

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Leaf Number  
--- 95% CI Bands

X1 = B: Micro

Actual Factors  
A: Fe = 1  
C: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> = 1



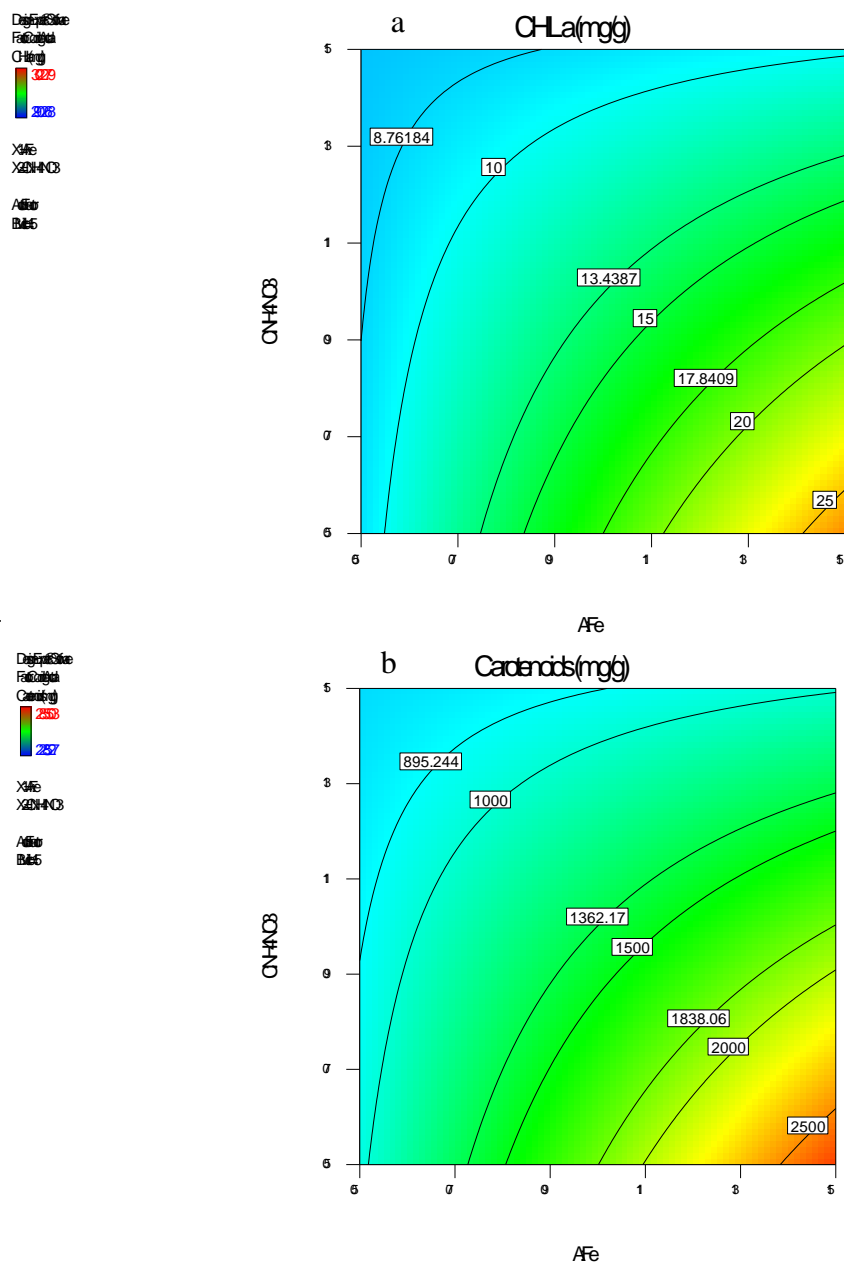
شکل ۴- تعداد برگ تولید شده در شاخه‌های گلابی رقم 'شکری' تحت تاثیر مقادیر مختلف میکرو در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 4- The leaf number of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' shoots under different concentrations of Micro in *in vitro* condition

میزان کلروفیل موثر بودند (۳۷). کلروفیل a رنگدانه اصلی در فتوسنتز است و کارتنوئیدها نقش حیاتی در فتوسنتز و حفاظت نوری به عهده دارند (۳، ۹ و ۱۶). مراحل مختلفی از بیوسنتز کلروفیل شامل تبدیل کوپروپروفیرینوژن به پروتوپروفیرین IX (۱۷)، منیزیم-پروتوپروفیرین IX به پروتوکلروفیلید-مونومتیل استر (۴۱) و سنتز ALA (۲۲) وابسته به آهن است. گزارش شده است از یک طرف غلظت‌های بالای آمونیوم مقادیر کلروفیل را به شدت کاهش می‌دهد (۲۰ و ۳۹) و از طرف دیگر افزایش نیتروژن باعث کاهش جذب آهن می‌شود (۵) که می‌تواند تاثیرات اثر منفی NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> را بر میزان کلروفیل a توضیح دهد.

**کلروفیل a و کارتنوئید برگ:** محتوی کلروفیل a ( $p \leq 0.05$ ) و کارتنوئید برگ در قالب مدل خطی تحت تاثیر مقادیر آهن و NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> قرار گرفتند بطوریکه برای هر دو صفت آهن دارای اثر مثبت و NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> دارای اثر منفی ( $p \leq 0.05$ ) بودند (جدول ۲). افزایش آهن تا  $1/5 \times$  برابر و کاهش NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> تا  $0.5 \times$  برابر محیط کشت پایه MS باعث افزایش ۲ برابری در میزان کلروفیل a و کارتنوئید شد (شکل ۵، a و b). علاوه بر مروزها که میزان کلروفیل را در ژنوتیپ‌های گلابی تحت تاثیر قرار داد در رقم Winter Nelis فاکتور آهن و NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> در رقم Horner 51 فاکتور  $1 \times$  NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> میکرو و در گونه *P. dimorphophylla* فاکتور میکرو  $1 \times$  آهن بر





شکل ۵- میزان کلروفیل a (a) و کارنوئید (b) در برگ گلابی رقم 'شکری' تحت تاثیر مقادیر مختلف آهن  $\text{NH}_4\text{NO}_3 \times$  در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 5- Chlorophyll and carotenoids of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' leaf under different concentrations of Fe (a) and  $\text{Fe} \times \text{NH}_4\text{NO}_3$  (b) in *in vitro* condition, respectively.

رشد رویشی: رشد رویشی در قالب مدل خطی ( $p \leq 0.01$ ) بطور منفی تحت تاثیر مقادیر میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $p \leq 0.01$ ) قرار گرفت با این تفاوت که اثر منفی  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  دو برابر بیشتر از اثر میکرو بود (جدول ۲). مقادیر  $1 \times$  میکرو و  $0.5 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$  مقادیر محیط کشت

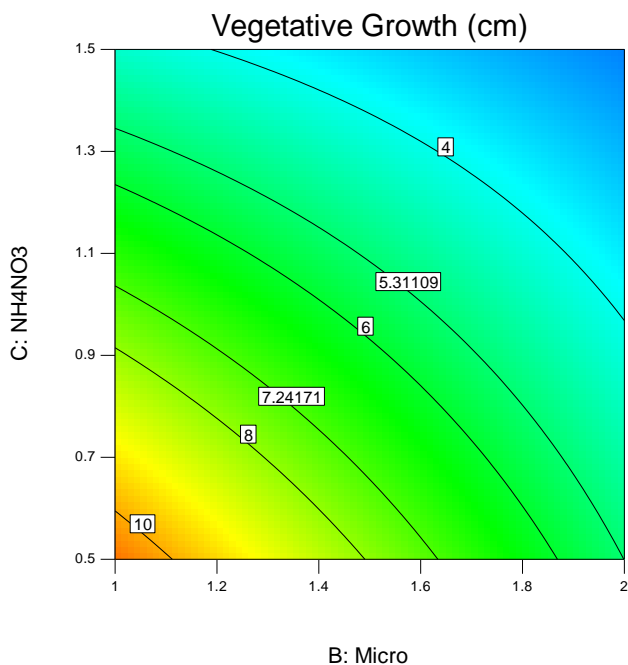
MS ( $10/6$  سانتیمتر) افزایش  $1/5$  برابری در رشد رویشی را نسبت به حالت شاهد ( $7/2$  سانتیمتر) القا کرد (شکل ۶). کاهش  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  از طرفی تعداد شاخه پرآوری شده را افزایش داد و از طرف دیگر باعث طویل تر شدن شاخه شد که هر دو در رشد رویشی موثر بودند.

رشد رویشی: رشد رویشی در قالب مدل خطی ( $p \leq 0.01$ ) بطور منفی تحت تاثیر مقادیر میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $p \leq 0.01$ ) قرار گرفت با این تفاوت که اثر منفی  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  دو برابر بیشتر از اثر میکرو بود (جدول ۲). مقادیر  $1 \times$  میکرو و  $0.5 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$  مقادیر محیط کشت

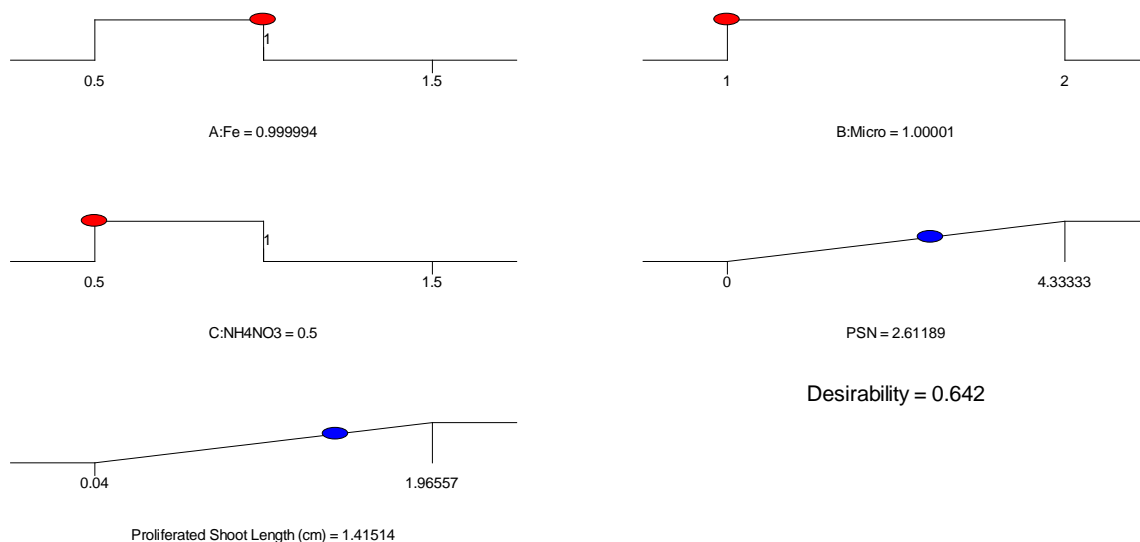
MS غلظت بهینه برای رشد گلایی رقم شکاری □ باشد چرا که احتمالاً غلظت‌های بالاتر بدلیل ایجاد سمیت از رشد ممانعت می‌کنند (۳۱).

عناصر میکرو نیز از طریق تاثیر بر طول شاخه رشد رویشی رشد رویشی را تحت تاثیر قرار داد. همانطور که برای پاسخ تعداد برگ ذکر گردید بنظر می‌رسد غلظت بهینه عناصر میکرو معادل با محیط کشت

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Vegetative Growth (cm)  
11.8508  
1.18267  
X1 = B: Micro  
X2 = C: NH4NO3  
Actual Factor  
A: Fe = 1



شکل ۶ - تغییرات رشد رویشی شاخه‌های گلایی رقم 'شکاری' تحت تاثیر مقادیر مختلف میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  در شرایط درون شیشه‌ای  
Figure 6- Vegetative growth variation of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' under different concentrations of Micro and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in *in vitro* condition



شکل ۷ - مقادیر بهینه پیش‌بینی شده برای سه فاکتور آهن، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  بوسیله نرم‌افزار Design Expert برای دو پاسخ تعداد شاخه پرآوری شده و طول شاخه پرآوری شده در شاخه‌های درون شیشه‌ای گلایی رقم 'شکاری'

Figure 7- Optimal values were predicted by Design Expert for three factors: Fe, Micro and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  that influence two responses: Proliferated shoot number and Proliferated shoot length of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' shoots in *in vitro* condition

کشت) در شرایط درون شیشه‌ای بهره برده اند؛ نتایج این آزمایش با نتایج آن‌ها بر روی انواع ژنوتیپ گلابی موافقت داشت و امکان استفاده از نرم افزار Design Expert را با هدف بهینه‌سازی اجزای محیط کشت تایید می‌کند. نتایج این آزمایش تاثیرات مشخص مقادیر آهن، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  را بر مورفوژنیز شاخه‌های درون شیشه‌ای گلابی رقم 'شگری' نشان می‌دهد.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  همانطور که برای اکثر گونه‌های گلابی گزارش شده است فاکتور موثر بر تولید شاخه بود در حالیکه فاکتورهای موثر بر طول شاخه عبارت از آهن، میکرو و مزوز بودند. عناصر میکرو در غلظت معادل محیط کشت MS برای گلابی رقم 'شگری' بهینه بوده و در مقادیر بالاتر احتمالاً بدلیل بروز سمیت بر رشد اثر منفی دارد. آزمایشات تکمیلی به‌منظور بررسی نمک‌های ریزمغذی، مزوزها و سایر عناصر ماکرو و سپس بهینه‌سازی ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی برای بهبود پاسخ شاخه‌های گلابی رقم 'شگری' پیشنهاد می‌شود.

**بهینه‌سازی:** نرم افزار Design expert می‌تواند برای پیش‌بینی مقادیر بهینه فاکتورهای موثر در محیط کشت مورد استفاده قرار گیرد. بهترین ترکیب بهینه محیط کشت پیش‌بینی شده توسط نرم افزار Design Expert بر اساس دو پاسخ بسیار مهم در پرآوری شاخه (تعداد و طول شاخه پرآوری شده: حداکثر) محیط کشت MS تغییر یافته به ترتیب حاوی مقادیر  $0.09$ ،  $1$  و  $0.5$  برابر مقادیر آهن، میکرو و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  بود (شکل ۷). رید و همکاران (۳۷) نیز بیان کردند که محیط کشت بهینه برای ژنوتیپ‌های مختلف گلابی محیط کشت MS حاوی  $1 \times$  یا  $0.5 \times$  آهن و مقادیر افزایش یافته مزوزها بود در حالیکه مقدار بهینه نیتروژن برای هر گونه تفاوت داشت.

### نتیجه‌گیری کلی

همانطور که نیدز و همکاران (۲۷، ۲۸ و ۲۹) بطور موفق از نرم‌افزار آماری Design Expert جهت طراحی و تجزیه آزمایشات به منظور تعیین بهترین ترکیب از مواد غذایی (و یا سایر اجزای محیط

### منابع

- Al Maarri K., Duron M., Arnaud Y., and Miginiaaac E. 1986. Etude comparative de l'aptitude a la micropropagation, par culture de meristemes *in vitro*, du poiriers juveniles issus de semis de 'Passe Crassane'. C.R. Acad. Agric. Fr., 72:413-421.
- Bell R.L., and Reed B.M. 2002. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Acta Horticulturae, 596:412-418.
- Bell R.L., Srinivasan C., and Lomberk D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.*, 45:708-714
- Bennett W.F.1993. Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants. APS Press, Minneapolis, MN, 202 pp.
- Chenard, C.H., Kopsell, D.A., and Kopsell, D.E. 2005. Nitrogen Concentration Affects Nutrient and Carotenoid Accumulation in Parsley. Journal of Plant Nutrition, 28(2): 285-297.
- Chevreau E., and Skirvin R.M. 1992. Pear. In: Hammerschlag F.A., Litz R.E. (ed.): Biotechnology of perennial fruit crops. Biotechnology in Agriculture. CAB International, Wallingford, 8: 263-276.
- Dere S., Gunes T., and Sivaci R.1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid content of some algae species using different solvent. Botany, 22 (1): 13-17.
- Design-Expert. 2010. Stat-Ease, Inc., Minneapolis.
- Domonkos M., Kis Z., and Gombos B. 2013. Ughy Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. Prog. Lipid Res., 52: 539-561.
- Engelsberger W.R., and Schulze W.X. 2012. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen starved Arabidopsis seedlings. Plant Journal, 69: 978-995.
- Evens T.J., and Niedz R.P. 2008. ARS-Media: Ion Solution Calculator, U.S. Horticultural Research Laboratory, Ft. Pierce, FL 34945 USA
- Gago J., Martinez-Núñez L., Landin M., and Gallego P.P. 2010. Artificial neural networks as an alternative to the traditional statistical methodology in plant research. Journal of Plant Physiology, 167: 23-27.
- Gallego P.P., Gago J., and Landin M. 2011. Artificial neural networks Technology to model and predict plant biology process. p. 197-216. In K. Suzuki, Artificial Neural Networks-Methodological and Biomedical Applications, (Croatia: Intech Open Access Publisher).
- Greenway M.B, Phillips I.C., Lloyd M.N., Hubstenberger J.F., and Phillips G.C. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48:403-410
- Hermans C., Vuylsteke M., Coppens F., Cristescu S.M., Harren F.J., Inze D., and Verbruggen N. 2010. Systems

- analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 187:132–144.
16. Hashimoto H., Urugami C., and Cogdell R.J. 2016. Carotenoids and photosynthesis *Subcell. Biochem*, 79: 111-139.
  17. Hsu W., and Miller G.W. 1969. Copro-porphyrinogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Biochem*, 1 (117): 215-220.
  18. Ivanova M., and Van Staden J. 2009. Nitrogen source, concentration, and  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloepolyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 167–174.
  19. Karimpour S., Davarynejad G.H., Bagheri A., and Tehranifar A. 2013. *In Vitro* Establishment and Clonal Propagation of Seabri Pear Cultivar. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15: 1209-1217.
  20. Li B.H., Li Q., Xiong L.M., Kronzucker H.J., Kramer U., and Shi W.M. 2012. Arabidopsis plastid AMOS1/EGY1 Integrates abscisic acid signaling to regulate global gene expression response to ammonium stress. *Plant Physiol*, 160: 2040-51.
  21. Lloyd G., and McCown B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *The International Plant Propagators' Societ*, 30:421-427.
  22. Miller G.W., Pushnik J.C. and Welkie G. 1984. Iron chlorosis a worldwide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. 1. *Plant Nutrition*, 7: 1-22.
  23. Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473–497
  24. Nakajima I., Ito A., Moriya S., Saito T., Moriguchi T., and Yamamoto T. 2012. Adventitious shoot regeneration in cotyledons from Japanese pear and related species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48:396–402
  25. Nedelcheva S. 1986. Effect of inorganic components of the nutrient medium on *in vitro* propagation of pears. *Genetics Selection Evolution*, 19:404-406.
  26. Nezami Alanagh E., Garoosi GH-A., Hadad B., Maleki S., Landin M., and Gallego P.P. 2014. Design of tissue culture media for efficient *Prunus* rootstock micropropagation using artificial intelligence models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117:349 -359.
  27. Niedz R.P., and Evens T.J. 2006. A solution to the problem of ion confounding in experimental biology. *Nature Methods*, 3:417.
  28. Niedz R.P., and Evens T.J. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43:370–381.
  29. Niedz R.P., Hyndman S.E., and Evens T.J. 2007. Using a Gestalt to measure the quality of *in vitro* responses. *Scientia Horticulturae*, 112:349–359.
  30. 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 & Developmental Biology – Plant*, 50: 458.
  31. Pandey N. 2018. Role of Plant Nutrients in Plant Growth and Physiology (Chapter 2). M. Hasanuzzaman et al. (eds.), *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, 51-93.
  32. Preece J. 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators?. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1:26–37.
  33. Quoirin M., and Lepoivre P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78:437-442.
  34. Ramage C.M, and Williams R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38:116–124.
  35. Reed B.M, DeNoma J.S., Wada S., and Postman J.D. 2012. Micropropagation of pear (*Pyrus* sp). Chapter 1. p. 3–18. In: Lambardi M., Ozudogru E.A., Jain S.M. (eds) *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. Humana, New York.
  36. Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., and Pence V. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 47:1–4
  37. Reed B.M., Wada S., DeNoma J., and Niedz RP. 2013a. Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49:343-355.
  38. Reed B.M., Wada S., DeNoma J., and Niedz RP. 2013b. Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49:699-709.
  39. Sanchez-Zabala J., Gonz\_alez-Murua C., and Marino D. 2015. Mild ammonium stress increases chlorophyll content in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 10 (3): 9915961-3.
  40. Sathyanarayana B.N., and Blake J.1994. The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on *in vitro* rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). P. 77-82. In P. J. Lumsden, J.R. Nicholas and W.J. Davies. *Physiology Growth and Development of Plants in Culture*. Dordrecht: Kluwer.
  41. Spiller S.C., Castelfranco A., and Castelfranco P. 1982. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. I. *In vivo* observations of iron and oxygen - deficient plants. *Plant Physiol*, 69: 107-111.

42. Takatsuji H. 1999. Zinc finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol Biol* 39:1073–1078.
43. Tang H, Luo Y., and Liu C. 2008. Plant regeneration from *in vitro* leaves of four commercial *Pyrus* species. *Plant, Soil and Environment*, 54 (4): 140–148.
44. Thakur A., and Kanwar J.S. 2008. Micropropagation of 'wild Pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai.I. explant establishment and shoot multiplication. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36 (1): 103-108.
45. Wada S., Niedz R.P., and Reed B.M. 2013. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49:356–365.
46. Wada S., Maki Sh., Niedz R.P., and Reed B.M. 2015. Screening genetically diverse pear species for *in vitro* CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> requirements. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 63.
47. Wada S., Niedz R.P., DeNoma J., and Reed B.M. 2013. Mesos components (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) are critical for improving pear micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49:356–365.



## ***In Vitro* Shoot Proliferation of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' in Different Medium Nutrition by Design Expert Software**

S. Karimpour<sup>1</sup>- G. H. Davarynejad<sup>2\*</sup>- M. Zakiaghi<sup>3</sup>- M. R. Safarnejad<sup>4</sup>

Received: 24-02-2018

Accepted: 10-03-2019

**Introduction:** Micropropagation is important for both multiplication and preservation of a wide range of nursery plants, including many fruit crops. A number of studies exist on optimization of growth in *in vitro* condition for one or two cultivars, but often these results cannot be used for the other genotypes because individual cultivars may differ greatly in their requirements. Therefore, genotype-specific medium are usually empirically developed for many plants including pear. Pear cultivars and species are often recalcitrant to tissue culture manipulations and Murashige and Skoog (23) (MS) basal nutrient medium at full or half strength or with slight modifications is the most media were used. The QL, DKW, and WPM media are also used and they differ mostly in types or amounts of calcium and nitrogen in compared with MS. Developing growth media for specific and unique cultivars is complex and time-consuming. Currently, improved experimental design and using statistical softwares allow much more efficient approaches to be utilized for the improvement of micropropagation media and conditions. Improving of growth medium for *in vitro* propagation of plants depends on type and quantities of mineral nutrients and plant growth regulators as important ones. The existence of statistical softwares to manage effective factors is very needed to access an optimized growth medium for *in vitro* propagation of plants. Design Expert is used as auxiliary software to identify essential factors in *in vitro* culture. Since the *in vitro* proliferation parameters of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' need to optimize for growth better, we were designed and performed a multifactor surface response experiment by Design Expert software to following two goals. First, to find optimized amount of some elements in medium and second, to show the response surface method can be useful for improving *in vitro* culture.

**Materials and Methods:** One experiment was designed by Design Expert software and was performed to improve *in vitro* proliferated shoots of *Pyrus communis* cv. 'Shekari'. Shoots were grown in a modified MS medium (supplement with 1 mg l<sup>-1</sup> of N6-benzyladenine) were used for this experiment. The experiment was included 20 model points randomly based on three nutritional factors: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0.5-1.5×), Fe (0.5-1.5×) and micro nutrients (1-2×) in different concentration of their MS amounts. Media enriched with sucrose (30 g l<sup>-1</sup>) and agar (8 g l<sup>-1</sup>) after pH adjustment at 5.7. Cultures were grown at 25°C under a 16-h photoperiod with 70-90 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> irradiance provided by a combination of cool- and warm-white fluorescent bulbs and were transferred to new medium every 3 weeks. Several responses were recorded after two months: Proliferated shoot number, proliferated shoot length (cm), total leaf number, leaf chlorophyll a (mg g<sup>-1</sup>), leaf carotenoids (mg g<sup>-1</sup>), and vegetative growth (cm). Responses for each point were the mean of 5 replicates. Experimental design, model evaluation, and analysis were done by Design-Expert® 8 (2010) software and the highest-order polynomial model that was significant for each response was used for ANOVA.

**Results and Discussion:** Factors statistically were significant for responses according to ANOVA in linear, 2FI and quadratic models. Reduced NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (×0.5) and enhanced Fe (×1.5) induced the higher number of proliferated shoots up to 4.43 folds of control according a quadratic model. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and Fe×Micro had negative liner relationships with shoot length, while leaf number negatively was affected by micros. Fe and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> were effective factors on leaf chlorophyll a and carotenoids contents. Increasing Fe (×1.5) and decreasing NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (×0.5) led to 2 folds higher production of chlorophyll a and carotenoids. Vegetative growth of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' in a quadratic-order method (negatively controlled by NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and micros) increased by high values of proliferated shoot number and shoot length induced by reduced NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (×0.5). Optimized amount of

1 and 2- PhD Graduate and Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Islamic Republic of Iran

(\*- Corresponding Author Email: davarynej@um.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Islamic Republic of Iran

4- Associate Professor, Department of Plant viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

three studied factors based on two important responses, maximum amount of proliferated shoot number and length, were 0.9, 1 and 0.5× for Fe, micro and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> in MS medium, respectively.

**Conclusions:** Design Expert software and response surface method were used successfully for *in vitro* optimizing of *Pyrus communis* cv. 'Shekari' regenerated shoots. Fe, Micro and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, were the effective factors for shoot regeneration responses in linear, 2FI and quadratic models. The multifactor investigation in surface response design will enable us to predict an optimal medium for several effective factors and estimate suitable responses. Outputs of these types of experiments provide a suitable background to increase optimization accuracy for future experiments.

**Keywords:** *In vitro* propagation, Pear, Response surface method, Micro, Fe.