پینه‌زایی و باززایی گیاه در اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)

محمد کبیری[۱]، سیدعلی‌محمد میرمحمدی میبدی[۱]، علی محمد شکیب[۲] و عبدالمجید رضایی[۱]

چکیده

به منظور دست یابی به ریز نمونه مناسب و محیط غذایی مؤثرجهت باززایی گیاه در اسفناج، پاسخ ریزنمونه‌های محور زیر لپه، لپه و نوک ساقه، جدا شده از بذرهای جوانه‌زده دو رقم ملودی و توده بومی کرج روی محیط کشت‌پایه MS با ترکیبات متفاوت از هورمون‌های IAA، GA_3، NAA و BAP بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرارهای متفاوت انجام شد. انگیزش پینه از ریز نمونه محور زیرلپه روی محیط با ترکیب هورمونی ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر GA_3 صورت گرفت. باززایی گیاه از پینه‌ها با زیرکشت آنها روی محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به میزان ۳۸ درصد حاصل شد. گیاهچه‌های حاصل حالت شیشه‌ای داشتند، که با افزایش آگار به ۹ گرم در لیتر این مشکل رفع شد. ریزنمونه لپه تنها تولید پینه نمود.کشت ریزنمونه نوک‌ساقه روی محیط حاوی ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، به میزان ۸۰ درصد باززایی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، اندام‌زایی، محور زیرلپه، ایندول استیک اسید(IAA) جیبرلیک اسید(GA3)، ٦- بنزیل آمینو پیورین (BAP)

مقدمه

اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) گیاهی علفی و دوپایه از خانواده کنوپودیاسه است. ویژگی‌های خاص این گیاه از جمله تعداد کم کروموزوم، دو پایه بودن، وجود کروموزوم‌های جنسی و کوتاه بودن دوره رشد و نمو(۱) موجب شده است، تا به عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد. انتقال ژن در این گیاه نیازمند روش مناسب کشت بافت و باززایی گیاه می‌باشد. نتایج یک تحقیق در باززایی از محور زیرلپه اثر متقابل GA_3 با واریته‌های مختلف را مورد تأکید قرار داد (۱۱). الخیری و همکاران (۲ و۳) با استفاده از ریزنمونه برگ تأثیرات هورمون‌های 2,4-D و GA_3 را بر اندام‌زایی بررسی نمودند. در بررسی دیگری با بررسی اثر غلظت‌هایی متفاوت اکسین بر باززایی ریزنمونه محور زیرلپه، کاربرد ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 5,6-Cl2-IAA در مرحله انگیزش پینه توصیه شد (۸). اولین مورد جنین‌زایی در اسفناج از ریزنمونه محور زیرلپه با کاربرد

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیار ژنتیک مولکولی، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.4.20.4]

سطوح بالای هورمون‌های IAA و GA_3 در محیط تولید پینه و کاهش میزان این هورمون‌ها در محیط باززایی گزارش شده است (۱۳). زانگ و زیوارت (۱۴) نیز آثار هورمون‌های NAA و BA بر باززایی ریزنمونه لپه اسفناج مورد بررسی قرار دادند. ایشیزاکی و همکاران (۷) با استفاده از ریزنمونه ریشه جنین‌زایی رویشی را گزارش نمودند. در این مقاله روش باززایی گیاه با استفاده از ریز نمونه‌های محور زیرلپه، لپه و نوک ساقه از بذرهای توده بومی کرج و رقم ملودی ارایه می‌شود.

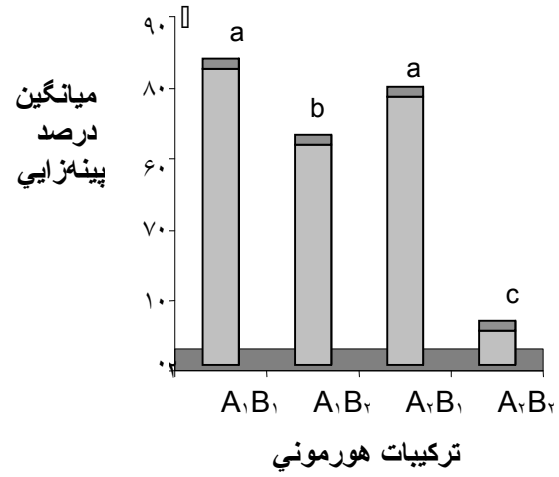
مواد و روش‌ها

بذرهای رقم ملودی وتوده بومی کرج به عنوان مواد گیاهی در این آزمایش به‌کار رفت. بدین منظور ابتدا پوست بذرها حذف و به مدت ۱/۵ دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس ۲۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد تیمار شدند. سپس چندین بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. جوانه زنی بذرها در محیط کشت پایه MS (۹) نیمه غلظت حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و۲۰ گرم در لیتر ساکارز با pH معادل ۵/۸ انجام شد. قطعات محور زیرلپه به طول ۳ میلی‌متر از جوانه ۳ روزه جدا شد و روی محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بیوتین،۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین،۲۰ گرم در لیتر ساکارز و۷ گرم در لیتر آگار با چهار تیمار هورمونی شامل IAA در دو سطح ۸/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر (A_1 و A_2) و GA_3 در دو سطح ۳/٤ و۳٤ میلی‌گرم در لیتر (B_1 و B_2) جهت انگیزش پینه کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار (پتری دیش) و در هر تکرار ۸ ریزنمونه انجام شد. ریزنمونه‌های کشت شده در محیط پینه‌زایی، یک هفته در شرایط تاریکی با دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد و در ادامه دو هفته در ۱۰ ساعت روشنایی با دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد و سپس یک ماه در شرایط ۲٤ ساعت روشنایی کامل با شدت ۱۲۰۰۰ لوکس قرار داده شدند. ارزیابی روی میزان پینه‌زایی یک ماه پس از قرار گرفتن در روشنایی کامل انجام گردید. داده‌ها به صورت تعداد ریزنمونه‌هایی که پینه تولید نموده بودند ثبت گردید. محیط باززایی مشابه محیط پینه‌زایی بود با این تفاوت که IAA در دو سطح ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر (C_1) و (C_2) به همراه ۳/٤ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به عنوان تیمارهای هورمونی بررسی شد. شرایط ۱۰ ساعت نور با شدت ۱۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد برای مرحله باززایی اعمال گردید. داده‌ها به صورت تعداد پینه‌هایی که باززایی داشتند، ثبت شد. با توجه به این که تیمار شماره ٤ درصد بسیار پایینی پینه‌زایی داشت، در طرح باززایی حذف گردید، در سایر تیمارهای پینه‌زایی نیز تعداد ریز نمونه‌هایی که تولید پینه نموده بودند بایکدیگر متفاوت بود و بنابراین داده‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل نامتعادل (از لحاظ تیمار) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی نامتعادل (حداکثر ٦ تکرار) تجزیه گردیدند. در تمامی مراحل تجزیه آماری به دلیل نرمال نبودن داده‌ها تبدیل $\text{Arc sin}\sqrt{X+0/5}$ انجام شد. در تجزیه آماری این طرح علاوه بر اثرات محیط‌های باززایی، آثار محیط‌های مرحله قبل که روی آنها پینه تولید شده بود و مجموع آثار متقابل قابل اندازه‌گیری مورد بررسی قرار گرفت.

ریز نمونه‌های لپه در سنین ٤ روزگی از گیاهچه‌ها جدا شدند و روی محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز وترکیبات هورمونی شامل BA در ٤ سطح ۰/۵، ۱، ۱/۵ و۳ میلی‌گرم در لیتر و NAA در سطوح ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به صورت فاکتوریل کشت گردیدند. برای هر ترکیب هورمونی ۵ عدد پتری دیش که در داخل هر کدام ۱۲ ریزنمونه قرار داده شده بود، در نظرگرفته شد. شرایط نگه‌داری ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ٤ الی ۵ هزار لوکس و تاریکی با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بود. بعد از یک ماه ریزنمونه‌ها که تولید پینه نموده بودند به محیط باززایی که میزان NAA در همه تیمارها به۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافته بود و هر سطح BA با سطوح صفر, ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر GA_3 تکمیل شده بود منتقل شدند.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.4.20.4]



شکل ۱. مقایسه میانگین‌های پینه‌زایی ریز نمونه محور زیرلپه اسفناج روی محیط کشت با ترکیبات هورمونی IAA و GA_3 با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد.

A_1 وA_2: به‌ترتیب سطوح ۸/۵ و۱۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IAA

B_1 وB_2: به ترتیب سطوح ۳/۴ و۳۴ میلی‌گرم بر لیتر هورمون GA_3.

ریزنمونه نوک ساقه حاصل از بذرهای توده بومی کرج پس از جداسازی روی محیط باززایی شامل محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ گرم در لیتر ژل‌رایت با ۸ تیمار هورمونی شامل IAA در سطوح صفر و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر (I1 و I2)، BAP در سطوح صفر، ۰/۰۲، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر (B_1، B_2، B_3 و B_4) کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (پتری‌دیش) و در داخل هر پتری ۱۰ ریزنمونه انجام شد. کشت‌ها درشرایط ۱۰ ساعت نور با شدت ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگه‌داری شدند. ارزیابی روی تعداد گیاهچه‌های رشد یافته که دارای قابلیت انتقال به محیط ریشه‌زایی بودند، صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS (۱۰) انجام شد.

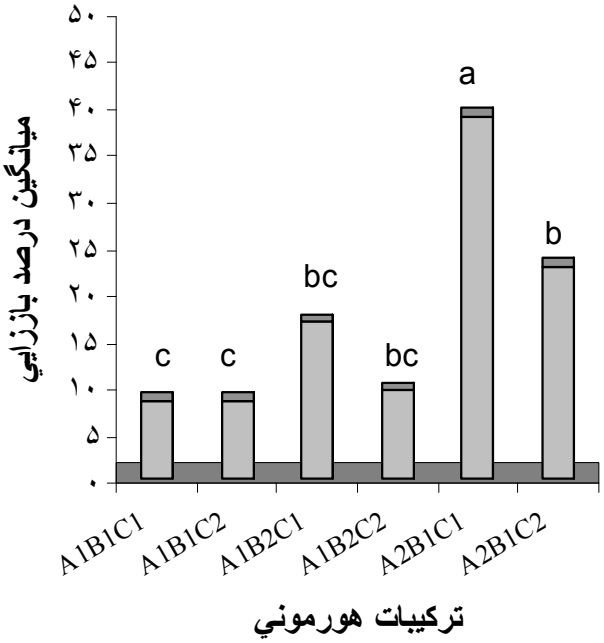
نتایج و بحث

ریزنمونه محور زیرلپه کشت شده در روی محیط کشت در هفته اول تنها گسترش طولی نشان داد، به طوری که از ۳ میلی‌متر به حدود ۱ سانتی‌متر رسید. با گذشت زمان در هفته سوم به بعد پینه‌های اولیه در محل برش دیده شد و سپس در طول ریزنمونه‌ها نیز پینه به وجود آمد. پینه‌ها رنگ سبز داشتند. اندازه پینه‌ها در ترکیبات هورمونی مختلف متفاوت بود. کاربرد هورمون GA_3 در سطوح بالا اندازه پینه‌ها را کاهش داد، به طوری که ترکیبات هورمونی با سطوح بالای GA_3 (A1B2 وA2B2) پینه‌هایی با قطر حدود ۲ میلی‌متر تولید نمودند،در حالی‌که تیمارهای با میزان پایین GA_3 (A_1B_1 و A_2B_1) پینه‌هایی با قطر حدود ۵ میلی‌متر تولید نمودند. بین سطوح IAA و GA_3 و اثرات متقابل آنها در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، ولی اثر واریته و آثار متقابل آن معنی‌دار نبود. با توجه به این که اثر ژنوتیپ و آثار متقابل آن معنی دار نشده بود، میانگین درصد پینه‌زایی فقط برای ترکیبات هورمونی محاسبه شد (شکل ۱). در سطوح بالای IAA و GA_3 پایین‌ترین رتبه پینه‌زایی(c) به دست آمد. از مقایسه ترکیبات هورمونی A_2B_1 و A_1B_1 در مقابل A_2B_2 و $A1B_2$ می‌توان افزایش درصد پینه‌زایی را با استفاده از کاربرد GA_3 به میزان ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر نسبت به ۳۴ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت مشاهده نمود. تفاوت رتبه پینه‌زایی بین دو ترکیب هورمونی A_2B_2 و A_1B_2 و یکسان بودن آن بین دو تیمار A_2B_1 و A_1B_1 مربوط به معنی‌دار شدن آثار متقابل ترکیبات هورمونی بود.

از نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به باززایی از محور زیرلپه مشخص گردید که فاکتور IAA (اثر هورمون IAA مورد استفاده در محیط پینه‌زایی) و فاکتور IAA_1 (اثر هورمون IAA مورد استفاده در محیط باززایی) هر دو معنی‌دار بوده، در نتیجه می‌توان استنباط نمود که غلظت هورمون IAA در هر دو مرحله پینه‌زایی و باززایی بر میزان باززایی گیاه تأثیر داشته است. با توجه به نامتعادل بودن تیمارها اثر متقابل سه‌گانه ترکیبات هورمونی حذف شده است، بنابراین مقایسه میانگین ترکیبات سه‌گانه موجود در سطح احتمال یک

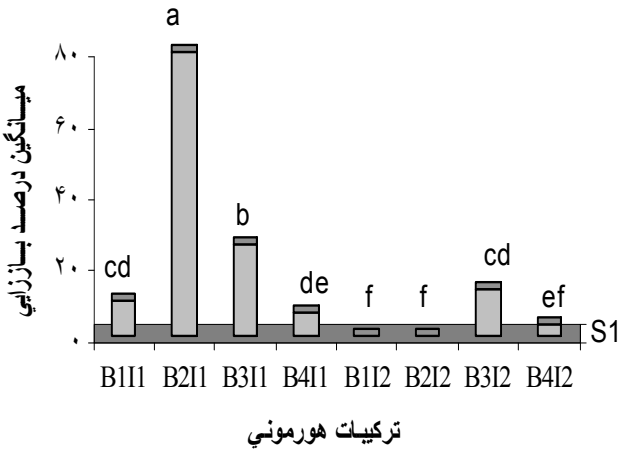
[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.4.20.4]



شکل ۲. مقایسه تأثیرترکیبات هورمونی بر میانگین‌های باززایی گیاه از ریز نمونه محور زیرلپه اسفناج

شکل ۳. گیاهچه حاصل از اندام‌زایی از پینه بعد از رفع مشکل شیشه‌ای شدن



شکل ۴. مقایسه میانگین درصد باززایی از ریزنمونه نوک ساقه اسفناج (سطوح مختلفBAP و IAA)

شکل ۵. باززایی از ریز نمونه نوک ساقه در محیط حاوی ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر BAP

درصد انجام گرفت (شکل ۲).

چون، ترکیب هورمونی $A_2B_1C_1$ دارای بالاترین میزان باززایی بوده، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که، کشت قطعات جدا کشت محور زیرلپه روی محیط A_2B_1 برای تولید پینه و انتقال آنها به محیط C_2 برای باززایی مناسب است. مقایسه‌های گروهی بین ترکیبات هورمونی حاوی سطوح A_1 و A_2 نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد بود، بنابراین کاربرد سطوح بالای IAA (به میزان ۱۵ میلی‌گرم در

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.4.20.4]

لیتر) در محیط پینه‌زایی می‌تواند موجب بهبود میزان باززایی گردد. مقایسات گروهی بین ترکیبات هورمونی دارای سطوح C_1 و C_2 نشان داد که این ترکیبات هورمونی در سطح احتمال ۵ درصد به‌طور معنی‌داری متفاوت بودند، بنابراین کاربرد سطح پایین IAA در محیط باززایی (۲ میلی‌گرم در لیتر) موجب افزایش باززایی می‌شود. ترکیب حاوی ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به علاوه ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر GA_3 جهت تولید پینه و سپس انتقال به محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA به علاوه ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بالاترین میزان باززایی را داشت، ولی گیاهچه‌های حاصل در این محیط‌ها دارای شکل غیر طبیعی بودند، برگ‌ها بد شکل و آبدار و به شکل غیرطبیعی چین‌دار و حلقوی بودند، توان تشکیل ساقه وجود نداشتند و ادامه رشد ممکن نبود. در چنین محیطی پینه‌های حاصل رنگ سبز تیره داشتند و شکل ظاهری آنها آبدار بود. این ویژگی ناشی از تجمع بیش از اندازه آب بود (شکل ۳). برای رفع مشکل فوق آثار افزایش میزان آگار و کاهش غلظت یون NH_4^+ بررسی قرار گرفت.

ترکیباتی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.A_1 و A_2 به ترتیب سطوح ۸/۵ و۱۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA در محیط پینه‌زایی، B_1 و B_2 به ترتیب سطوح ۳/۴ و۳۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون GA_3 در محیط پینه‌زایی، C_1 و C_2 به ترتیب سطوح ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IAA در محیط باززایی هستند.

با توجه به بررسی‌های مشاهده‌ای با کاربرد آگار به میزان ۹ گرم در لیتر در محیط‌های کشت مشکل شیشه‌ای شدن بهبود یافت (شکل ۳). این امر در مورد هر دو واریته صادق بود. کاهش یون NH_4^+ شیشه‌ای شدن را اندکی کاهش داد، ولی کاملاً بر طرف نکرد. پینه‌های حاصل از ریزنمونه لپه بعد از ۳ ماه از انتقال به محیط باززایی واکنشی به باززایی نشان ندادند.

از نتایج تجزیه واریانس باززایی از ریز نمونه نوک ساقه مشخص گردید که اثر هر دو هورمون IAA و BAP و اثرات متقابل آنها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. بنابراین میانگین سطوح ۸ تیمار با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۴). با توجه به شکل مشاهده می‌شود تیمار B_2I_1 (صفر میلی‌گرم در لیتر IAA به علاوه ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر BAP) با میانگین ۸۰ درصد بالاترین رتبه (a) را احراز نموده است. کاربرد هورمون IAA باعث کاهش میزان باززایی مریستم گردید. کاربرد سطوح بالای BAP نیز روی باززایی اثر منفی نشان داد. کشت ریز نمونه نوک ساقه در محیط فاقد هورمون علی‌رغم این که ساختار مریستم کامل شده می‌باشد، باززایی بالایی نشان نداد. به نظر می‌رسد سطوح پایین BAP جهت باززایی مریستم کافی باشد (شکل ۵).

محیط‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بودند.B_1، B_2، B_3 و B_4 به ترتیب سطوح صفر ۰/۰۲، ۰/۲ و۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، I_1 و I_2 به ترتیب سطوح صفر و۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA هستند.

مؤثر بودن کاربرد ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در محیط کشت پینه‌زایی برای انگیزش پینه‌های با قابلیت باززایی بالا از ریزنمونه محورزیرلپه در این آزمایش با نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی (۸، ۱۱ و۱۳) مطابقت دارد. در این پژوهش کاربرد هورمون GA_3 از باززایی پینه‌های حاصل از ریزنمونه محورزیرلپه جلوگیری نکرد. این نتایج با مطالعات قبلی باززایی در اسفناج (۲، ۳، ۷، ۸، ۱۱ و۱۳) مطابقت دارد در حالی‌که کاربرد GA_3 در گیاهان دیگر از باززایی جلوگیری می‌نماید(۵ و ۱۲). زیااو و براچارد (۱۳) میزان پینه‌زایی از ریزنمونه محورزیر لپه را روی ترکیبات متفاوت هورمون IAA و GA_3 یکسان گزارش نمودند ولی در مرحله باززایی تنها پینه‌های انگیزش‌شده در محیط حاوی ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳۴/۴ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بعد از واکشت در محیط باززایی بالاترین میزان باززایی(۰/۳۵) از نوع جنین‌زایی را موجب گردیدند. ولی این تیمار در این مطالعه درصد بسیار پایینی از پینه‌زایی را نشان داد که به دلیل تعداد اندک از آزمایش باززایی حذف شد. در این

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.4.20.4]

بررسی پینه‌های انگیزش شده با هورمون GA_3 در سطح ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بعد از واکشت در محیط باززایی بالاترین میزان باززایی به میزان ۳۸ درصد (از نوع اندام‌زایی) را موجب گشت، که این اختلاف در غلظت GA_3 با نتایج زیو و برانچارد می‌تواند ناشی از تفاوت واریته باشد، که توسط ساساکی و همکاران (۱۱) مورد تأکید قرار گرفته است. کاربرد ۹ گرم در لیتر آگار موجب رفع مشکل شیشه‌ای شدن گردید، افزایش میزان آگار برای رفع شیشه‌ای شدن در مطالعات دبرگ و همکاران (۴) در گیاه *Cynarea sclymvs* گزارش شده است. زانگ و زیوارت (۱۴) با ریزنمونه لپه واریته ملودی و ترکیب هورمونی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون واکشت ریزنمونه‌ها حدود ۹۶٪ باززایی به دست آوردند، ولی در این آزمایش با وجودی‌که سطوح متفاوت NAA، BA و GA_3 مورد بررسی قرار گرفت باززایی مشاهده نگردید.کاربرد ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP موجب میزان باززایی بالا در ریز نمونه نوک ساقه گردید. در مطالعات قبلی در گیاه پنبه (۶) کاربرد سطوح اندک سیتوکینین در این مورد مؤثر بوده است.

منابع مورد استفاده

۱. عرشی، ی. ۱۳۷۹. *اصلاح ژنتیکی سبزی‌های زراعی*. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

2. Al- Khayri, J. M., F. C. Huang and T. E. Morelock. 1991. Regeneration of spinach from leaf callus. Hort Sci. 26: 913- 914.
3. Al- Khayri, J. M., F. G. Huang, T. E. Morelock and T. A. Busharar. 1992. Stimulation of shoot regeneration in spinach callus by gibberellic acid. Hort. Sci. 27: 1046.
4. Debergh, P. C., Y. Harbaoui and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant 53: 181-187.
5. Ezura, H. and N. P. Harberd. 1995. Endogenous gibberellin levels influence *in-vitro* shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Planta. 197 :301-305.
6. Gould. J. H. and M. Magallanes-cedeno. 1998. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*- mediated transformation. Plant Mol. Biol. Rep. 16: 1-10.
7. Ishizaki, T., F. Komai and K. Masuda. 2000. Exogenous ethylene enhances formation of embryogenic callus and inhibits embryogenesis in cultures of explants of spinach roots. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125: 21- 24.
8. Mii, M., M. Nakano, K. Okuda and M. Iizuka. 1992. Shoot regeneration from spinach hypocotyl segments by short term treatment with 5, 6- dichloro- indole- 3- acetic acid. Plant Cell Rep. 11: 58- 61.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473- 497
10. SAS Institute Inc., 1996. SAS User's Guide. Version 6.2, SAS Institute, Cary, NC.
11. Sasaki, H., M. Ohta and M. Ono. 1989. Effect of gibberellin concentration and cultivar on adventitious bud formation of spinach hypocotyl tissue cultured *in vitro*. J. Hokkaido Univ. Esuc (IIB). 40: 73- 80.
12. Thorpe, T.A. and D. D. Meijer. 1975. Effect of gibberellic acid in starch metabolism in tobacco callus cultured under shoot-forming conditions. Phytomorph. 25: 238-245
13. Xiao, X. G. and M. Brachard. 1993. Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.**)** from hypocotyl segments. Plant Cell Rep. 13: 69-71.
14. Zhang, H. X. and J. A. D. Zeevaart. 1998. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach. Plant Cell Rep. 18: 640- 645.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.4.20.4]