

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

محمد کبیری^۱، سیدعلی محمد میرمحمدی میبدی^۱، علی محمد شکیب^۲ و عبدالمجید رضایی^۱

چکیده

به منظور دست یابی به ریز نمونه مناسب و محیط غذایی مؤثر جهت باززایی گیاه در اسفناج، پاسخ ریزنمونه‌های محور زیر لپه، لپه و نوک ساقه، جدا شده از بذرها، جوانه زده دو رقم ملودی و توده بومی کرج روی محیط کشت پایه MS با ترکیبات متفاوت از هورمون‌های IAA، GA₃، NAA و BAP بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرارهای متفاوت انجام شد. انگیزش پینه از ریز نمونه محور زیر لپه روی محیط با ترکیب هورمونی ۱۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی گرم در لیتر GA₃ صورت گرفت. باززایی گیاه از پینه‌ها با زیرکشت آنها روی محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی گرم در لیتر GA₃ 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 نوک ساقه روی محیط حاوی ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر BAP، به میزان ۸۰ درصد باززایی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، اندام‌زایی، محور زیر لپه، ایندول استیک اسید (IAA) (جیبرلیک اسید (GA₃))، ۶- بنزیل آمینو پیورین (BAP)

مقدمه

تحقیق در باززایی از محور زیر لپه اثر متقابل GA₃ با واریته‌های مختلف را مورد تأکید قرار داد (۱۱). الخیری و همکاران (۲ و ۳) با استفاده از ریزنمونه برگ تأثیرات هورمون‌های 2,4-D و GA₃ را بر اندام‌زایی بررسی نمودند. در بررسی دیگری با بررسی اثر غلظت‌هایی متفاوت اکسین بر باززایی ریزنمونه محور زیر لپه، کاربرد ۱۵ میلی گرم در لیتر هورمون 5,6-Cl₂-IAA در مرحله انگیزش پینه توصیه شد (۸). اولین مورد جنین‌زایی در اسفناج از ریزنمونه محور زیر لپه با کاربرد

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

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

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

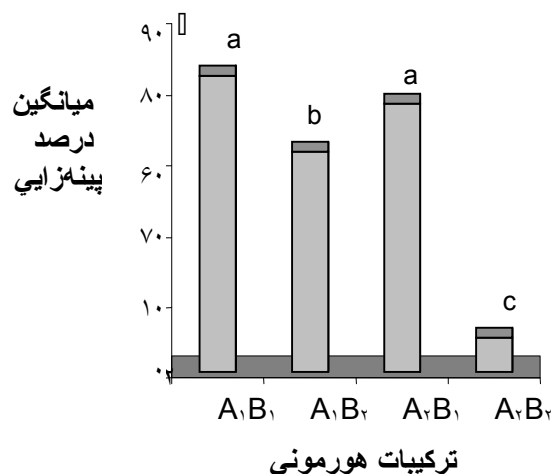
سطوح بالای هورمون‌های IAA و GA₃ در محیط تولید پینه و کاهش میزان این هورمون‌ها در محیط باززایی گزارش شده است (۱۳). زانگ و زیوارت (۱۴) نیز آثار هورمون‌های NAA و BA بر باززایی ریزنمونه لپه اسفناج مورد بررسی قرار دادند. ایشیزاکی و همکاران (۷) با استفاده از ریزنمونه ریشه جنین‌زایی رویشی را گزارش نمودند. در این مقاله روش باززایی گیاه با استفاده از ریز نمونه‌های محور زیرلپه، لپه و نوک ساقه از بذره‌های توده بومی کرج و رقم ملودی ارایه می‌شود.

مواد و روش‌ها

بذره‌های رقم ملودی و توده بومی کرج به عنوان مواد گیاهی در این آزمایش به کار 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 و ۲۰ 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 و ۷ گرم در لیتر آگار با چهار تیمار هورمونی شامل IAA در دو سطح ۸/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر (A₁ و A₂) و GA₃ در دو سطح ۳/۴ و ۳۴ میلی‌گرم در لیتر (B₁ و B₂) جهت انگیزش پینه کشت شدند. آزمایش به صورت 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 ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه دو هفته در ۱۰ ساعت روشنایی با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و سپس یک ماه در شرایط ۲۴ 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 (C₁ و C₂) به همراه ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر GA₃ به عنوان تیمارهای هورمونی بررسی شد. شرایط ۱۰ ساعت نور با شدت ۱۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد برای مرحله باززایی اعمال گردید. داده‌ها به صورت تعداد پینه‌هایی که باززایی داشتند، ثبت شد. با توجه به این که تیمار شماره ۴ 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 به صورت آزمایش فاکتوریل نامتعادل (از لحاظ تیمار) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی نامتعادل (حداکثر ۶ 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 ۴ روزگی از گیاهچه‌ها جدا شدند و روی محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ترکیبات هورمونی شامل BA در ۴ سطح ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و NAA در سطوح ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ 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 نظر گرفته شد. شرایط نگهداری ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴ 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 به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافته بود و هر سطح BA با سطوح صفر، ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر GA₃ تکمیل شده بود منتقل شدند.



شکل ۱. مقایسه میانگین‌های پینه‌زایی ریز نمونه محور زیرپه اسفناج روی محیط کشت با ترکیبات هورمونی IAA و GA₃ با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد.

A₁ و A₂: به ترتیب سطوح ۱۵ و ۸/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون IAA
B₁ و B₂: به ترتیب سطوح ۳/۴ و ۳۴ میلی گرم بر لیتر هورمون GA₃.

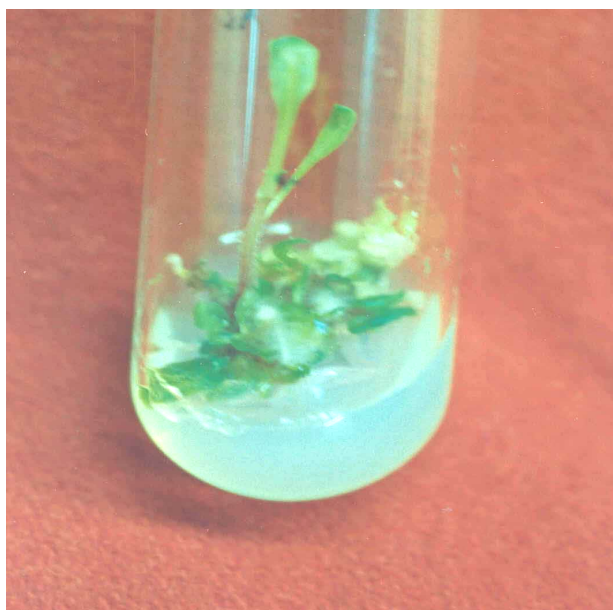
هفته اول تنها گسترش طولی نشان داد، به طوری که از ۳ میلی متر به حدود ۱ سانتی متر رسید. با گذشت زمان در هفته سوم به بعد پینه‌های اولیه در محل برش دیده شد و سپس در طول ریزنمونه‌ها نیز پینه به وجود آمد. پینه‌ها رنگ سبز داشتند. اندازه پینه‌ها در ترکیبات هورمونی مختلف متفاوت بود. کاربرد هورمون GA₃ در سطوح بالا اندازه پینه‌ها را کاهش داد، به طوری که ترکیبات هورمونی با سطوح بالای GA₃ (A₁B₂ و A₂B₂) پینه‌هایی با قطر حدود ۲ میلی متر تولید نمودند، در حالی که تیمارهای با میزان پایین GA₃ (A₁B₁ و A₂B₁) پینه‌هایی با قطر حدود ۵ میلی متر تولید نمودند. بین سطوح IAA و GA₃ و اثرات متقابل آنها در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی داری مشاهده شد، ولی اثر وارسته و آثار متقابل آن معنی دار 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 GA₃ پایین ترین رتبه پینه‌زایی (c) به دست آمد. از مقایسه ترکیبات هورمونی A₁B₁ و A₂B₁ در مقابل A₂B₂ و A₁B₂ می توان افزایش درصد پینه‌زایی را با استفاده از کاربرد GA₃ به میزان ۳/۴ میلی گرم در لیتر نسبت به ۳۴ میلی گرم در لیتر در محیط کشت مشاهده نمود. تفاوت رتبه پینه‌زایی بین دو ترکیب هورمونی A₂B₂ و A₁B₂ و یکسان بودن آن بین دو تیمار A₁B₁ و A₂B₁ مربوط به معنی دار شدن آثار متقابل ترکیبات هورمونی بود.

از نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به باززایی از محور زیرپه مشخص گردید که فاکتور IAA (اثر هورمون IAA مورد استفاده در محیط پینه‌زایی) و فاکتور IAA₁ (اثر هورمون IAA مورد استفاده در محیط باززایی) هر دو معنی دار بوده، در نتیجه می توان 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 سه گانه ترکیبات هورمونی حذف شده است، بنابراین مقایسه میانگین ترکیبات سه گانه موجود در سطح احتمال یک

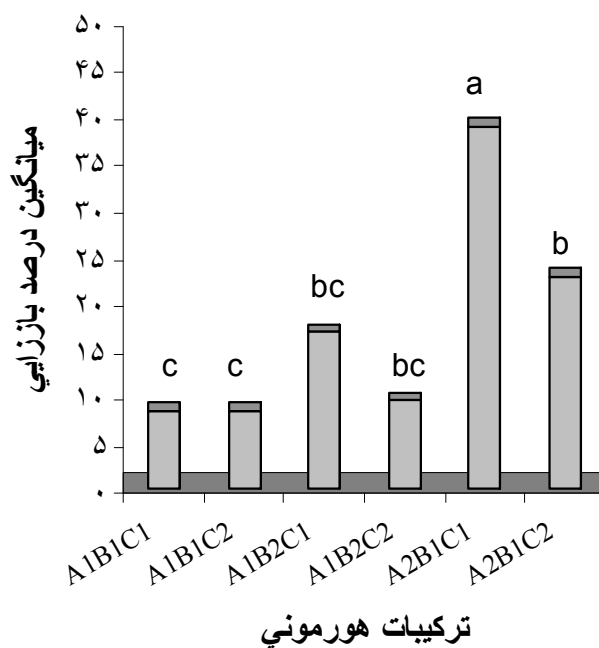
ریزنمونه نوک ساقه حاصل از بذره‌های توده بومی کرج پس از جداسازی روی محیط باززایی شامل محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ گرم در لیتر ژلرایت با ۸ تیمار هورمونی شامل IAA در سطوح صفر و ۰/۲ میلی گرم در لیتر (I₁ و I₂)، BAP در سطوح صفر، ۰/۰۲، ۰/۰۲ و ۲ میلی گرم در لیتر (B₁، B₂، B₃ و B₄) کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (پتری دیش) و در داخل هر پتری ۱۰ ریزنمونه انجام شد. کشت‌ها در شرایط ۱۰ ساعت نور با شدت ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد 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 نرم افزار آماری SAS (۱۰) انجام شد.

نتایج و بحث

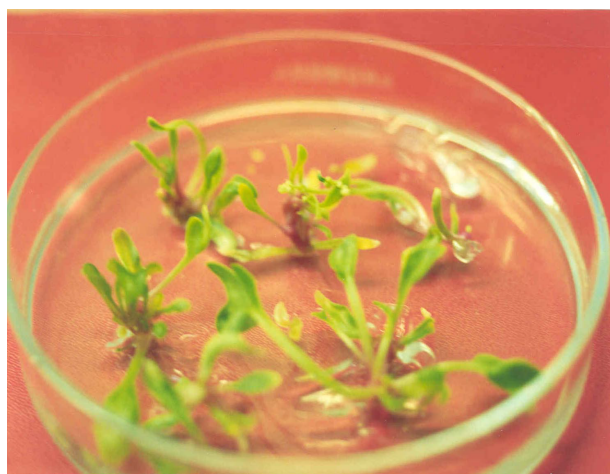
ریزنمونه محور زیرپه کشت شده در روی محیط کشت در



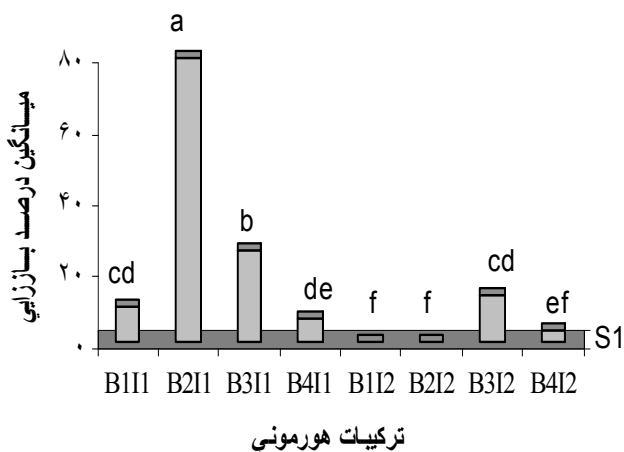
شکل ۳. گیاهچه حاصل از اندام‌زایی از پینه بعد از رفع مشکل شیشه‌ای شدن



شکل ۲. مقایسه تأثیر ترکیبات هورمونی بر میانگین‌های باززایی گیاه از ریز نمونه محور زیرپله اسفناج



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



شکل ۴. مقایسه میانگین درصد باززایی از ریز نمونه نوک ساقه اسفناج (سطوح مختلف BAP و IAA)

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 میلی گرم در

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 زیرپله روی محیط A_2B_1 برای تولید پینه و انتقال

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 میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، I_1 و I_2 به ترتیب سطوح صفر و ۰/۲ 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 و ۱۳) 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 و ۱۳) مطابقت دارد در حالی که کاربرد GA_3 در گیاهان دیگر از باززایی جلوگیری می‌نماید (۵ و ۱۲). زیاو 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 انگیزش شده در محیط حاوی ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳۴/۴ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بعد از واكشت 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

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 معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند. A_1 و A_2 به ترتیب سطوح ۸/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA در محیط پینه‌زایی، B_1 و B_2 به ترتیب سطوح ۳/۴ و ۳۴ 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

بررسی پینه‌های انگیزش شده با هورمون GA_3 در سطح ۳/۴ میلی گرم در لیتر به همراه ۱۵ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر BA بدون واکشت ریزنمونه‌ها حدود ۹۶٪ باززایی به دست آوردند، ولی در این آزمایش با وجودی که سطوح متفاوت NAA، BA و GA_3 مورد بررسی قرار گرفت باززایی مشاهده نگردید. کاربرد ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP موجب میزان باززایی بالا در ریزنمونه 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.