# بهینه سازی کالوس‌زایی و باززایی در دو رقم اسفناج با استفاده از سه ریزنمونه‌ی مختلف

# Optimization of Callogenesis and Regeneration of Two Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Cultivars Utilizing Three Different Explants

مونا خیاط‌زاده[۱*]، داریوش نباتی احمدی[۲]، حمید رجبی معماری[۲] و محمد رضا عبداللهی[۳]


## چکیده

اسفناج یکی از سبزیجات برگی مهم در اکثر کشورها بوده و به علت این که دارای بیش‌ترین تعداد کلروپلاست می باشد و همچنین تعداد ژنوم کلروپلاستی در یک کلروپلاست آن بسیار زیاد است یکی از قدیمی ترین گیاهان مدل برای مطالعه کلروپلاست است. لذا بهینه سازی باززایی این گیاه ضروری است. این پژوهش به منظور بهینه سازی کالوس زایی و باززایی گیاه اسفناج، با استفاده از سه ریزنمونه برگ، هیپوکوتیل و کوتیلدون در سه آزمایش فاکتوریل جداگانه، با غلظت ها و ترکیبات مختلف از تنظیم کننده های رشد گیاهی IAA، 2,4-D و $GA_3$ در قالب طرح کاملا تصادفی روی محیط کشت پایه MS جهت ارزیابی باززایی دو رقم Orai و Viroflay اجرا شد. نتایج نشان داد که بیشترین انگیزش کالوس از ریزنمونه برگ رقم Orai با ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم 2,4-D و رقم Viroflay با غلظت ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم 2,4-D صورت گرفت که بعد از انتقال به محیط حاوی 2,4-D، کنتین و $GA_3$ به ترتیب با غلظت های ۰/۰۱ ، ۲ و ۱ میلی‌گرم درلیتر، در ژنوتیپ Orai گیاهچه تولید نمودند. همچنین کالوس های حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در ژنوتیپ Viroflay پس از قرار گرفتن روی محیط حاوی ۲ میلی‌گرم درلیتر IAA و ۳/۴ میلی‌گرم درلیتر $GA_3$ باززایی شدند. باززایی در ریزنمونه کوتیلدون هر دو ژنوتیپ در هیچ یک از محیط های کشت رخ نداد.


**واژه‌های کلیدی**: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، باززایی، کالوس، IAA، 2,4-D، $GA_3$

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*: نویسنده مسوول

**مقدمه**

اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، گیاهی علفی و دو پایه متعلق به خانواده‌ی Chenopodiacea می‌باشد، که به جهت خصوصیات ویژه‌اش از جمله بیش‌ترین تعداد کلروپلاست و کوتاه بودن طول دوره رشد، به‌عنوان یک گیاه مدل مناسب در مطالعات ژنتیکی و مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه هم‌چنین دارای ارزش غذایی بالایی بوده و یک منبع غنی از مواد معدنی و آهن می‌باشد (Swiader *et al*. 1992). پیش‌نیاز بسیاری از روش‌های انتقال ژن، بهینه سازی شرایط کشت بافت جهت انجام باززایی با راندمان بالا است. گونه‌های مختلف، ارقام درون گونه‌ای و اندام‌های مختلف یک گیاه، به یک روش کشت بافت واکنش یکسان نشان نمی‌دهند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷). گزارش-های موجود درباره باززایی اسفناج نشان می‌دهند که نوع ریزنمونه نقش مهمی را در این مورد بازی می‌کند به‌طوری‌که قطعات ریشه بیشتر در جنین زایی سوماتیکی موثرند در حالی‌که کوتیلدون‌ها در اندام‌زایی کارایی بهتری دارند (Komai *et al*. 1996b; Molvig & Komai *et al*. *1996a*; Zhang & Zeevaart, 1999; Rose, 1994 and). *سازاکی* و همکاران (Sasaki *et al*. 1986) با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل اسفناج یک سیستم اندام زایی را بهینه نمودند که در آن ترکیب محیط کشت برای کالوس زایی و باززایی یکسان و بدون واکشت بوده و حاوی ۱ میلی‌گرم درلیتر IAA و ۰/۰۱ میلی‌گرم درلیتر زآتین می‌باشد. هم‌چنین در پژوهشی دیگر مشخص شد که کشت ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی در محیط حاوی ۱۵ میلی‌گرم درلیتر $5,6\text{-}Cl_2$-IAA بالاترین میزان جوانه‌زنی را دارد (Mii *et al*. 1992). *چین* و همکاران (Chin *et al*. 2009) باززایی از ریزنمونه‌های برگی در اسفناج را از طریق استفاده از 2,4-D، کنتین و $GA_3$ جهت القای کالوس و باززایی و با کاربرد سه تیمار دمایی مختلف ۱۴، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اجرا نمودند، و نتیجه گرفتند که کشت کالوس در دمای پایین‌تر، درصد باززایی بالاتری را نشان می‌دهد. هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که تولید کالوس از ریزنمونه‌های برگی وابسته به ژنوتیپ بوده و بالاترین میزان باززایی از کالوس‌های القا شده در تاریکی به‌دست آمد (Al-khayri *et al*. 1991). *جیکی یانگ* و همکاران (Geekiyanage *et al*. 2006) تاثیر شرایط روز کوتاهی و روز بلندی و همین‌طور اثر شدت نور زیاد و کم را بر روی باززایی از کوتیلدون در اسفناج، بررسی نمودند که در نهایت بالاترین درصد باززایی از تیمار روز کوتاهی و در شدت نور زیاد به‌دست آمد. هم‌چنین در پژوهشی دیگر نیز اثر هورمون‌های NAA و BAP بر باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدونی اسفناج مورد مطالعه قرار گرفت که در نتیجه در محیط حاوی ۰/۴ mg/l NAA و ۱ mg/l BAP بالاترین درصد باززایی مشاهده شد (Zhang & Zeevaart. 1999). هدف از مطالعه حاضر، تعیین بهترین ترکیب هورمونی و ریزنمونه به‌منظور باززایی از ریزنمونه‌های ارقام Orai و Viroflay، با هدف ایجاد یک سیستم کارآمد در انتقال ژن در اسفناج می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

بذرهای ارقام Orai و Viroflay از طریق قرار دادن در الکل ٪۷۰ به‌مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ٪ ۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل، ضد عفونی شدند. این بذرها بر روی محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog. 1962) که دارای۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸ بود، به‌منظور جوانه‌زنی قرار گرفتند.

آزمایش اول: پس از ۲ تا ۳ هفته از رشد گیاهچه‌ها در این شرایط، برگ‌ها جدا و به قطعه‌های ۵ میلی‌متری تقسیم و بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با سه سطح ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به اضافه‌ی ۲ میلی‌گرم درلیتر کنتین، به‌منظور تولید کالوس کشت شدند. این کشت‌ها در شرایط ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ساعت تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. بعد از دو ماه میزان کالوس‌زایی بر اساس تولید و یا عدم تولید کالوس در ریزنمونه ها، ارزیابی شد. سپس کالوس-ها بر روی محیط باززایی حاوی ۰/۰۱، ۱ و۱ میلی‌گرم درلیتر به‌ترتیب 2,4-D، Kinetin و $GA_3$، در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی واکشت شدند. به‌منظور ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های تولید شده از این ریزنمونه‌ها، ابتدا گیاهچه‌ها در محیط کشت پایه MS که حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر IBA بود به‌مدت ۲ ساعت قرار داده شدند و سپس به محیط کشت پایه MS بدون هورمون انتقال یافتند.

آزمایش دوم: ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی از گیاهچه-های چهار روزه جدا شده و روی محیط کشت پایه MS حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار شامل ۸/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA ($A_1$ و $A_2$) و در ترکیب با ۰/۳۴ و ۳/۴

میلی‌گرم در لیتر $GA_3$ ($B_1$ و $B_2$) جهت تولید کالوس قرار گرفتند. این کشت‌ها یک هفته در تاریکی، در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، سپس دو هفته در ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک ماه در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شدند. پس از این مدت میزان تولید کالوس ارزیابی شده و ریزنمونه‌ها روی محیط باززایی که حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر $GA_3$ بود و در همان شرایط، انتقال یافتند.

آزمایش سوم: چهار روز پس از جوانه زنی بذرها، کوتیلدون‌ها جدا و روی محیط کشت پایه MS دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و ترکیبات هورمونی شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و $GA_3$ در سه سطح صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر، کشت شدند.

شرایط نگهداری ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. در نهایت میزان انگیزش کالوس و باززایی بررسی شد. هر سه آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار و ۱۰ریز نمونه در هر تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS انجام شدند.

## نتایج و بحث

آزمایش اول: کالوس‌ها حدوداً دو ماه پس از قرارگیری ریزنمونه‌های برگ بر روی محیط کشت، ظاهر شدند. نتایج تجزیه واریانس، بیان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف 2,4-D در سطح ۰/۰۵ و وجود اثر متقابل معنی‌داری در سطح ۱٪ بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن (شکل ۱)، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D را به‌عنوان بهترین تیمار کالوس زایی برای هر دو رقم معرفی کرد به گونه‌ای که در این غلظت ۹۴ درصد از ریزنمونه‌های ژنوتیپ Orai و ۸۸ درصد از ریزنمونه‌های برگی ژنوتیپ Viroflay کالوس تولید نمودند. بررسی میانگین‌ها (شکل ۱) نشان داد رقم Orai با ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین کالوس‌زایی ولی رقم Viroflay با ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین کالوس‌زایی را نشان می‌دهند. کالوس‌های تولید شده در این مرحله به رنگ زرد روشن تا سبز و بافت آن‌ها ترد بود. از کالوس‌های تولید شده بر روی تیمار اول (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر کنتین) و دوم (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر کنتین) پس از انتقال به محیط باززایی که حاوی به ترتیب ۰/۰۱، ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، کنتین و $GA_3$ بود، در ژنوتیپ Orai پس از گذشت یک ماه باززایی حاصل شد و گیاهچه-های تولید شده پس از قرار گیری در محیط ریشه‌زایی، ریشه‌دار شدند. در حالی‌که در ژنوتیپ Viroflay نتیجه‌ای حاصل نشد (شکل ۲ و ۳).

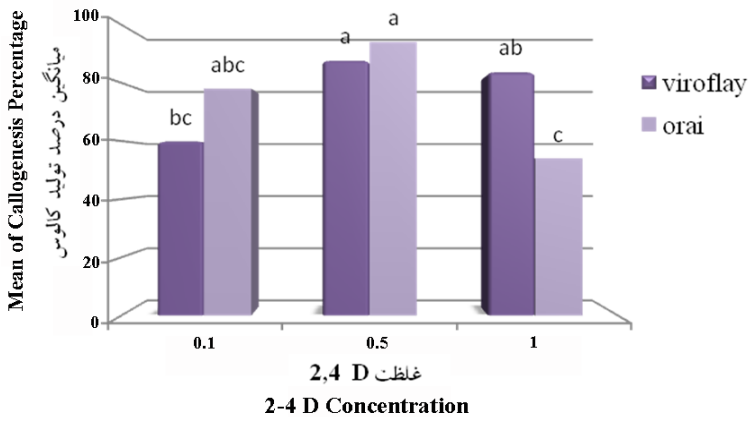
افزایش کالوس‌زایی با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه برگ و به‌دنبال آن تولید گیاهچه در محیط باززایی با نتایج به دست آمده از مطالعات *چین* و همکاران (2009) و هم‌چنین پژوهش‌های *الخیری* و همکاران (1991b) بر روی این گیاه مطابقت دارد مطابقت دارد.

جدول۱: نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف سطوح 2,4-D و رقم در کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ

Table 1: Analysis of variation on the callogenesis in leaf explants

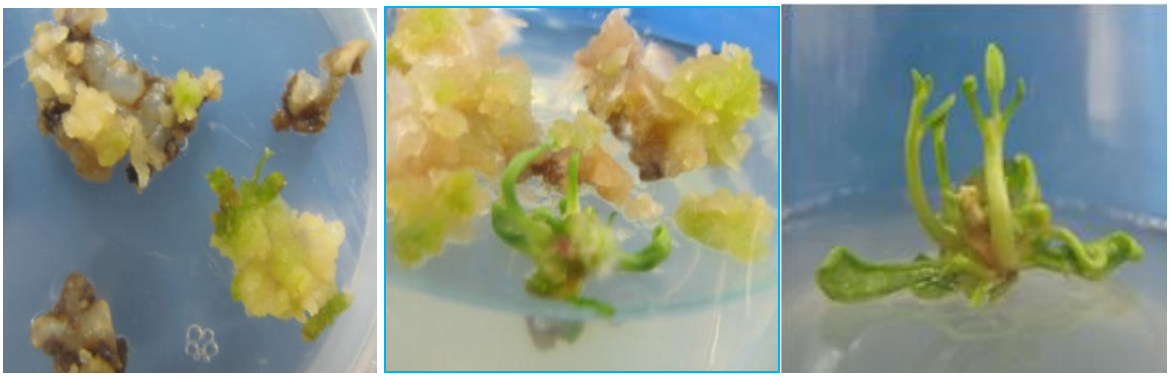
| منبع تغییرات<br>Source of variation | درجه آزادی<br>df | میانگین مربعات<br>Mean of square |
|---|---|---|
| هورمون توفوردی<br>2,4-D (A) | 3 | $16.13^{*}$ |
| رقم<br>Cultivar (B) | 1 | $0.30^{ns}$ |
| هورمون توفوردی × رقم<br>A*B | 2 | $15.60^{ns}$ |
| خطا error | 24 | 3.9 |

**و*: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح α=0.01 و α=0.05 CV=27.61%



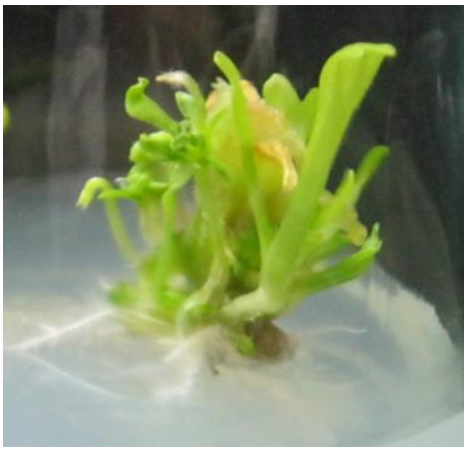

شکل۱: مقایسه میانگین‌های کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در غلظت‌های مختلف 2,4-D

Fig 1: Mean of spinach callogenesis in different 2,4-D concentration of leaf explant



شکل ۲: روند شکل گیری گیاهچه از کالوس ریزنمونه برگ در رقم Orai

Fig 1: Regenerated plantlet achieved from leaf callus in Orai cultivar



شکل ۳: گیاهچه ریشه‌دار شده از ریزنمونه برگ رقم Orai

Fig 2: Rooted plantlet achieved from Orai cultivar leaf explants

آزمایش دوم: در ریزنمونه هیپوکوتیل کشت شده بر روی محیط پس از گذشت حدود سه هفته کالوس‌ها ابتدا در محل برش و به‌تدریج در طول ریزنمونه ظاهر شدند. این کالوس‌ها سبز رنگ بودند. نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌های کالوس‌زایی از هیپوکوتیل نشان‌داد که بین سطوح مختلف IAA در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود

دارد (جدول ۲). و کاربرد میزان پایین این هورمون (۸/۵ میلی‌گرم درلیتر) در هر دو رقم افزایش کالوس‌زایی را در بر داشت. هم‌چنین کم‌ترین میزان کالوس‌زایی در هر دو رقم در تیمار $A_2B_2$ یعنی ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر $GA_3$، به‌دست آمد. یک ماه پس از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر $GA_3$، کالوس‌های حاصل از تیمار $A_1B_1$ (۸/۵ IAA + ۰/۳۴ $GA_3$) و $A_1B_2$ (۸/۵ IAA + ۳/۴ $GA_3$) در رقم Viroflay گیاهچه تولید نمودند اما در رقم Orai باززایی حاصل نشد (شکل ۴).

در سایر پژوهش‌ها بیش‌ترین باززایی با کاربرد ۱۵ میلی‌گرم در لیتر IAA حاصل شده است (کبیری و همکاران، ۱۳۸۴).

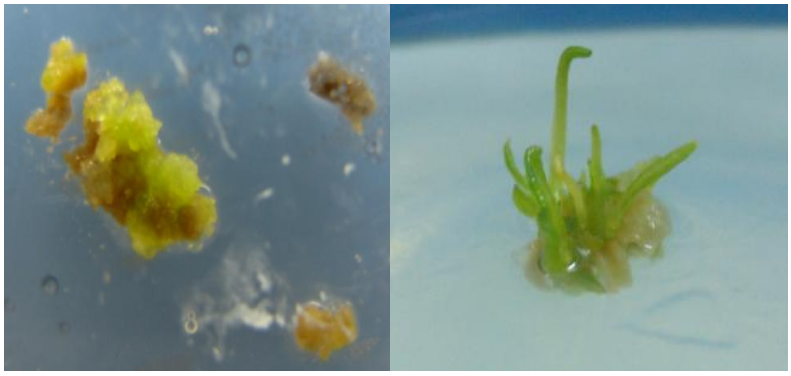
آزمایش سوم: ریزنمونه‌های کوتیلدون پس از گذشت یک هفته از کشت بر روی محیط، رشد طولی و عرضی نمودند و اندازه آن‌ها افزایش یافت. با گذشت زمان در هفته سوم به بعد کالوس ها ظاهر شدند. در نتایج به‌دست آمده از تولید کالوس در ریزنمونه‌های کوتیلدونی، مشاهده گردید که بین غلظت‌های مختلف $GA_3$ در سطح ۱ درصد و بین رقم‌ها و اثر متقابل غلظت‌های $GA_3$ و رقم، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). بررسی میانگین کالوس‌زایی غلظت‌های $GA_3$ نشان‌داد که با افزایش غلظت $GA_3$ در هر دو رقم میزان تولید کالوس کاهش می‌یابد. هر دو رقم در تیمار اول (بدون $GA_3$ با ۰/۴ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۱ میلی‌گرم درلیتر BAP) نسبت به دو سطح دیگر $GA_3$، بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی را داشتند ولی در سطح دوم ($GA_3$، NAA و BAP به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم درلیتر)، رقم Orai نسبت به Viroflay درصد تولید کالوس بالاتری داشت (شکل ۵). بعد از گذشت دو ماه، ریزنمونه ها نکروز شده و از این ریزنمونه و کالوس-های تولید شده از آن‌ها هیچ‌گونه باززایی حاصل نشد.

جدول۲: نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف IAA، $GA_3$ و رقم در کالوس‌زایی از ریزنمونه هیپوکوتیل

Table 2: Analysis of variation on the callogenesis in hypocotyl explants

| منبع تغییرات<br>Source of variation | | درجه آزادی<br>df | میانگین مربعات<br>Mean of square |
|---|---|---|---|
| ایندول استیک اسید | IAA (A) | 1 | $81.22^{**}$ |
| اسید جیبرلیک | $GA_3$ (B) | 1 | $24.02^{ns}$ |
| عامل | Cultivar (C) | 1 | $0.22^{ns}$ |
| ایندول استیک اسید × اسید جیبرلیک | A×B | 1 | $3.02^{ns}$ |
| ایندول استیک اسید × رقم | A×C | 1 | $1.22^{ns}$ |
| اسید جیبرلیک × رقم | B×C | 1 | $11.02^{ns}$ |
| ایندول استیک اسید × اسید جیبرلیک × رقم | A×B×C | 1 | $11.02^{ns}$ |
| خطا | error | 32 | 6.10 |

**و*: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح α=0.01 و α=0.05 CV=27.61%



شکل ۴: شکل گیری گیاهچه از ریزنمونه هیپوکوتیل در رقم Viroflay

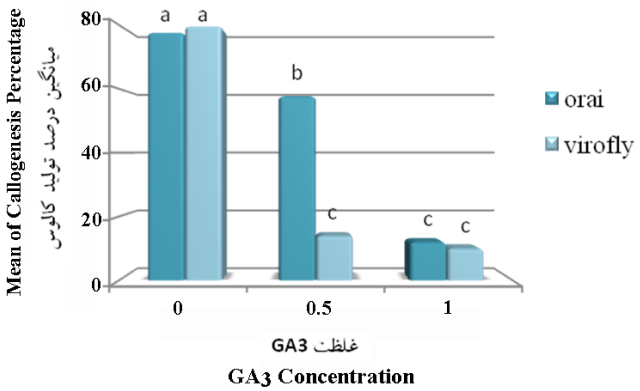
Fig 3: Regenerated plantlet achieved from hypocotyl callus in Viroflay cultivar

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف $GA_3$ و رقم در کالوس‌زایی از ریزنمونه کوتیلدون

Table 3: Analysis of variation on the callogenesis in cotyledon explants

| منبع تغییرات Source of variation | | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean of square |
|---|---|---|---|
| اسید جیبرلیک | $GA_3$ (A) | 2 | 118.30** |
| رقم | Cultivar (B) | 1 | 16.13* |
| اسید جیبرلیک × رقم | A×B | 2 | 16.23* |
| خطا | error | 24 | 3.81 |

**و*: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح α=0.01 و α=0.05 CV=27.61%




شکل ۵: مقایسه میانگین های کالوس زایی ریزنمونه کوتیلدون در غلظت های مختلف $GA_3$

Fig 2: Mean of spinach callogenesis in different $GA_3$ concentration of cotyledon explants

طبق مطالعه *ژنگ* و *زیوارت* (1999) کوتیلدون‌ها به جهت دارا بودن سلول‌های مریستمی در انتهای آن‌ها که می‌توانند در غلظت‌های هورمونی مناسب به‌طور مستقیم و بدون واسطه کالوس، تولید برگ نمایند، به‌عنوان ریز نمونه-های مناسبی به‌منظور القای باززایی معرفی شدند اما در این پژوهش با وجود استفاده از ترکیبات هورمونی مشابه، نتیجه-ای حاصل نشد. *جیکی یانگ* و همکاران (2006) کاربرد هورمون $GA_3$ را به‌عنوان عاملی موثر در باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های کوتیلدونی بیان نمودند درحالی‌که در این مطالعه همانند پژوهش کبیری و همکاران (۱۳۸۴)، در هیچ-کدام از این دو رقم، باززایی حاصل نکرد. این می‌تواند دلیل بر اثر بالای ژنوتیپ بر روی باززایی این گیاه باشد که توسط *سازاکی* و همکاران (1989) مورد تاکید قرار گرفت. *زیاو* و *برانچارد* (Xiao and Branchard, 1993) میزان کالوس‌زایی از ریز نمونه هیپوکوتیل را روی ترکیبات متفاوت هورمون IAA و $GA_3$ یکسان گزارش نمودند در حالی‌که در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین سطوح IAA، از لحاظ کالوس‌زایی مشاهده گردید. استفاده از هورمون $GA_3$ در این پژوهش از باززایی کالوس‌های حاصل از ریز نمونه هیپوکوتیل جلوگیری نکرد. این نتایج با پژوهش‌های قبلی باززایی در اسفناج (Ishizaki *et al.* 2000، *الخیری* و همکاران، 1991، *می* و همکاران، 1993، *سازاکی* و همکاران، 1989 و *زیاو* و *برانچارد*، 1993) مطابقت دارد، در حالی‌که کاربرد $GA_3$ در گیاهان دیگر از باززایی جلوگیری می‌نماید (Engvild, 1973; Ezura & Harberd, 1995 and Thorpe & Meijer, 1975). از تفاوت‌های موجود چنین نتیجه می‌شود که تیمارهای جداگانه‌ای برای هر رقم و ریزنمونه به‌منظور دست‌یابی به آغازش سریع گیاهچه نیاز است.

**منابع:**

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

# Optimization of Callogenesis and Regeneration of Two Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Cultivars Utilizing Three Different Explants

Khayatzadeh[1*], M., Nabati Ahmadi[2], D., Rajabi Memari[2], H. and Abdollahi[3], M. R.

**Abstract**

Spinach is one of edible leafy vegetable in many countries worldwide and is the most prime and informative plant species for studying plant chloroplast. A main advantage of spinach which makes it remarkable among other plants is that its leaf possesses abundant number of chloroplasts and each chloroplast sustains a very large genomic molecule. This characteristic of spinach makes it a unique crop that can serve as a valuable genetic model for studying chloroplast manipulation at the molecular genetic level. Therefore, implementing a technique which can lead to identify an appropriate way to induce adequate plant regeneration from explants has become significantly important with a great demand. A study was conducted to examine optimization of callogenesis and regeneration of two spinach cultivars; Orai and Viroflay using MS based medium with various combination of plant growth regulators (PGRs); IAA, 2,4-D and $GA_3$ at different concentration rates in order to evaluate regeneration induction of leaf, hypocotyl and cotyledon explants under three separate experimental studies. The results indicated that leaf explants from both cultivars were capable of producing the highest callogenesis on growth media which supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 2 mg/l Kinetin. When calli was transferred into medium containing concentration of 0.1, 2 and 1 mg/l of 2,4-D, Kinetin and $GA_3$ respectively, only the explants of Orai cultivar was able to induce regeneration. Also, hypocoyl drived calli from Viroflay cultivar showed the best regeneration when transferred on medium containing 2 mg/l IAA and 3.4 mg/l $GA_3$. There was no regeneration from cotyledon explants of both cultivars on all media.

**Keywords:** Spinach (*Spinacia oleracea* L.), Regeneration, Callus, Indole Acetic Acid (IAA), Gibberellic Acid ($GA_3$)

**References**

Al-khayri, J. M., Huang F., Morelock, T., Busharar, T. A. and Gbur, E. E. 1991a. Genotype-dependent response of spinach cultivars to in vitro callus induction and plant regeneration. Plant Science, 78: 121-127.

Al-Khayri, J. M., Huang, F. G. and Morelock, T. E. 1991b. Regeneration of spinach from leaf callus. Hort Sci, 26: 913-914.

Chin D. P., Bao J. H. and Mii M. 2009. Transgenic spinach plants produced by Agrobacterium-mediated method based on the low temperature-dependent high plant regeneration ability of leaf explants. Plant Biotechnology, 26: 243-248.

Engvild, K. C. 1973. Shoot differentiation in callus cultures of *Datura innoxia*. Physiol. Plant, 28: 155-159.

Ezura, H. and Harberd, N. P. 1995. Endogenous gibberellin levels influence in-vitro shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* (L.). Heynh. Planta, 197: 301-305.

Farsim M. and Zolali, J. 2003. Introduction to Plant Biotechnology, 392, Ferdowsi University Of Mashhad publication, Iran, 495 pp.

Geekiyanage, S., Takase, T., Watanabe, S., Fukai, S. and Kiyosue, T. 2006. The combined effect of photoperiod, light intensity and $GA_3$ on adventitious shoot regeneration from cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Plant Biotechnology, 23: 431-435.

Ishizaki, T., Komai, F. and Masuda, K. 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.

Kabiri, M., Meybodi. A. and Rezaii, A. 2005. Callogenesis and regeneration in Spinach (*Spinacia oleracea* L.). M.Sc. Thesis, Esfahan University, Iran, 80 pp.

Komai, F., Okuse, I. and Harada T. 1996a. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (Spinacia oleracea L.). Plant Science, 113: 203–208.

1 and 2. M.Sc student and Assistant professors respectivly, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz.

3. Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan.

∗: Corresponding author

Komai, F., Okuse, I. and Harada T. 1996b. Effective combinations of plant growth regulators for somatic embryogenesis from spinach root segments. J Japan Soc Horticulture Science, 65: 559–564.

Mii, M., Naako, M., Okuda, K. and Iizuka, M. 1992. Shoot regeneration from spinach hypocotyls by shotr term treatment with 5.6-dichloro-indole-3-acetic acid. Plant Cell Report. 11: 58-61.

Molvig, L. and Rose, R. J. 1994. A regeneration protocol for *Spinacia oleracea* using gibberellic acid. Australian J Bot 42: 763–769.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-497.

Sasaki, H., Ohta, M. and Ono, M. 1989. Effect of gibberellin concentration and cultivar on adventitious bud formation of spinach hypocotyl tissue cultured in vitro. J. Hokkaido University. Education (IIB). 40: 73- 80.

Sasaki, H., Nakai, S. and Kubouchi, H. 1986. Organ formation of spinach hypocotyl tissues cultured in vitro. J. Hokkaido University. Education. 37: 49-56.

Swiader, J. M., Ware, G. W. and Mccollum J. P. 1992. Producing Vegetable Crops. Interstate Publishers, Danville, Illinois, 626 pp.

Thorpe, T. A. and Meijer, D. D. 1975. Effect of gibberellic acid in starch metabolism in tobacco callus cultured under shoot-forming conditions. Phytomorphology, 25: 238-245.

Xiao, X. G. and Branchard, M. 1993. Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyl segments. Plant Cell Rep, 13: 69-71.

Zhang, H. X. and Zeevaart, J. A. D., 1999. An efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Plant Cell, Reports. 18: 640-645.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 1-6= ۱-۶).