جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی-پژوهشی
علوم کشاورزی
سال دوازدهم، شماره (۲) ۱۳۸۵

باززایی گیاه از گیاه کشت بساک در کنف

امیر حسین گرجی
مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

چکیده:

در این بررسی اثر ترکیبات محیط کشت برروی بساکهای کنف جهت کاربرد القاء کالوس و باززائی گیاه مورد بررسی قرار گرفت. بساکها درون محیط کشت MS که دارای پنج ترکیب مختلف تنظیم کننده رشد بود قرار داده شدند .محیط کشتی که حاوی ترکیب ۱ میلی گرم در لیتر۶-بنزیل آمینوپورین (BAP) و ۲ میلی گرم در لیتر کلروفنوکسی استیک (2,4-D) بود به صورت معنی‌داری تعداد کالوس‌های بیشتری تولید کرد و افزایش معنی‌داری در باززائی همان محیط کشت به اضافه ۱ میلی گرم درلیتر اسیدآلفانفتالین استیک (NAA) و ۲ میلی گرم در لیتر (BAP) مشاهده شد. بین پنج سطح هیدروکلرید تیمین محیط کشتی که حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر هیدروکلرید تیمین بود باززایی بیشتری را نشان داد. غلظت مالتوز اثر معنی‌داری بر روی درصد بساکهای تولید کننده کالوس، تعداد کالوس‌های تولید کنندهٔ ریشه چه و باززایی داشت. محیط کشت حاوی ۶ تا۹ درصد مالتوز بالاترین بازدهی کلی باززایی را بین پنج سطح مالتوز به کار برده شده داشت. غلظت ساکارز به طور معنی‌داری بر روی تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه و درصد باززایی تأثیر گذاشت و همچنین ساکارز بر روی فراوانی میکروسپورهای تبدیل شونده به گیاهان کامل و فراوانی کروموزم‌های دوبل خودبخودی در میکروسپورهایی که به گیاهان کامل تبدیل شدند تأثیر گذاشت.

واژه‌های کلیدی: کنف، مالتوز، تنظیم کننده رشد گیاهان، ساکارز، هیدروکلریدتیامین

مقدمه

کنف یک گونه زراعی است که از دانه آن روغن خوراکی استخراج و از الیاف آن محصولات مختلف منجمله کاغذ تهیه می‌شود(۲). کنف گیاهی است دولپه و گلدار از تیرهٔ مالواسه، نافه که از تعداد بسیاری پرچم تشکیل یافته است(۳)، از اتصال میله‌های پرچم به یکدیگر لوله‌ای بوجود می‌آید که تخمدان و خامه مادگی را در بر می‌گیرد، پرچم‌ها اکستروس (به طرف خارج گل باز می‌شود) و دانه گرده آن درشت و خاردار است(۳). تکنیک‌های اصلاحی تولید هاپلوئید کنف بهره سریعی در توسعه لاین‌های کاملاً هموزیگوس داشته و تأثیر معنی‌داری در انتخاب ژنوتیپی دارد(۱۰). پیش شرط یک سیستم اصلاحی هاپلوئید تولید مقدار زیاد گیاهان هاپلوئید و دبل هاپلوئید می‌باشد (۶). ترکیبات کشت به عنوان عاملی مؤثر در القاء کالوس‌ها به تولید جنین و مراحل بعدی

تاریخ دریافت مقاله ۸۳/۱/۱۶ تاریخ دریافت نسخه نهایی ۸۴/۳/۲۱

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(باززایی گیاهان) در تعدادی از گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است(۶). هورمون اکسین به طور خالص برای شروع و پیشرفت مراحل جنین زائی میکروسپورها و مقدار کمی سیتوکینین به علاوه اکسین جهت ادامه رشد بساک لازم است.

توفوردی (2-4,D) باعث تسریع در تکثیر سلولی و القاء کالوس می‌شود در حالی که اسید نفتالین استیک (NAA) و اسید فینل استیک (PAA) در کشت بساک / میکروسپور جو(۱۱) و گندم(۴) باعث کمک درالقاء جنین زایی مستقیم می شود . هیدروکلریدتیامین جهت تحریک کشتهای سلولی سویا جهت رشد بکار برده شده است (Gamborg و همکاران ۱۹۸۶). بهرحال بابررسی منابع موجود هیچگونه مطالعات تحقیقی برای تعیین اثر هیدروکلریدتیامین روی القاء کالوس و باززایی در کشت باک/میکروسپورکنف انجام نشده است و اخیرا مشخص شده که مالتوز نسبت به ساکاروز برای القای جنین و باززایی گیاه در کشت بساک / میکروسپور جو و گندم برتری دارد (Alvrez-Navarro و همکاران ۱۹۹۴).

اهداف این بررسی عبارتند بودند از :

هدف اصلی:

ارزیابی اثر تنظیم کننده های رشد در القاء وتولید کالوس و باززایی.

اهداف فرعی :

۱. تعیین اثر هیدروکلریدتیمین درالقاءوتولیدکالوس وباززایی گیاهچه.

۲. ارزیابی اثرغلظت مالتوز در القاء و تولید کالوس و باززایی گیاهچه .

۳ . تعیین اثر غلظت ساکارز در القاء و تولید کالوس ، باززایی گیاهچه ، باززایی گیاهان حاصله از میکروسپورها و دوبل شدن خودبخودی کروموزمها در گیاهان مشتق شده از میکروسپورها.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: دو هیبرید F1از کنف ، (H.C.Purpurea*H.C.Siplox) و (H.C.Var.virdis*H.C.Var vulgaris) در این بررسی بکاربرده شده است.

مزایای کاربرد F1 نسبت به ژنوتیپ های هموزیگوس در کشت بساک قبلاً توسط چن و همکاران سال۱۹۸۶ بیان شده است(۶). هر هیبرید به عنوان گیاه بخشنده برای تعدادی از آزمایشها بکار برده شده هیبرید (H.C.Var.virdis*H.C. vulgaris) F1 به عنوان گیاه بخشنده در آزمایشهای یک و چهار وهیبرید (H.C.Purpurea*H.C.Sinplox) درآزمایشهای ۲ و ۳ بکار برده شدند. خصوصیات زراعی و ناحیه‌ای چهار کولتیواری که در دو تلاقی شرکت کرده بودند قبلاً توسط برگر و همکاران در سال ۱۹۹۸ شرح داده شده است(۵). ژنوتیپ‌هایی که عکس‌العمل خوبی نشان دادند جهت تسهیل ارزیابی اثر تغییر دهنده‌های محیط کشت روی القاء کالوس و باززایی گیاهچه بکار برده شدند. پنج بساک از هر دو غنچه (مجموعاً ۱۰ عدد) درون پتری دیشی که حاوی ۳ میلی متر از محیط کشت MS بود قرار داده شدند. به قسمی که در هرپتریدیش کوچک ۱۰عدد بساک قرار داده شد و از هر گیاه ۳ تکرار وجود داشت. سه پتری دیش کوچک درون یک پتری دیش بزرگ با چند قطره آب مقطر جهت نگهداری رطوبت قرار داده شدند. پتری دیش‌های بزرگ با پارافیلم بسته شده و به مدت یک روز در دمای $34\ ^{\circ}C$ درانکوباتور قرار داده شدند و سپس به مدت ۲۶ روز در درجه حرارت $25\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند .کالوس های القاء شده سپس به یک محیط کشت باززایی منتقل شدند. ترکیبات و وضعیت محیط کشت جهت باززایی و ریشه دهی و همچنین روش انتقال همانند روش بکار برده شد توسط چن و همکاران در سال ۱۹۹۸ بود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

طرح آزمایشی و تجزیه مشاهدات

در آزمایش اول پنج ترکیب مختلف از اکسین و سیتوکینین روی محیط کشت MS مورد آزمون قرار گرفتند (جدول ۱) . محیط کشت شماره یک حاوی ترکیبات تنظیم کننده رشد شامل ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و یک میلی گرم در لیتر NAA بود . همه محیطهای کشت با ساکارز ۶درصد وآگارز۰/۴ درصد تکمیل شدند .درآزمایش دوم پنج سطح هیدروکلرید تیامین مورد آزمون قرار گرفت. تیمارها عبارتند بود از مقدار صفر ، ۰/۲ ، ۱ ، ۸ ، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و سطح ۰/۲ میلی گرم در لیتر هیدروکلریدتیامین به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. همه محیطهای کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر 2,2-D و یک میلی گرم در لیتر BAP به عنوان تنظیم کننده رشد گیاه بودند . درآزمایش سوم پنج سطح مالتوزموردآزمون قرارگرفت تیمارها عبارت بودنداز۳٪،۶٪،۹٪،۱۲٪و۱۵٪ مالتوز. در آزمایش چهارم، چهار سطح ساکارز (۶٪،۹٪،۱۲٪،۱۴٪) مورد بررسی قرار گرفتند. همه محیطهای کشت حاوی مقدار یکسانی از هیدروکلریدتیامین و ترکیبات تنظیم کننده رشد همانند آزمایش سوم بودند . تمامی آزمایشها در طرحهای کاملاً تصادفی با چهار تکرار پیاده شدند. یک پتری دیش بزرگ حاوی ۳ پتری دیش کوچک (که هر کدام حاوی ۱۰ بساک) به عنوان یک واحد آزمایش محسوب شد بنابراین ۱۲۰ بساک برای هر تیمار بکار برده شد تعداد بساکهایی که بعد از ۲۶ روز تولید کالوس کرده بودند محاسبه شدند. تعداد بساک‌هایی که بعد از ۲۶ روز پس از انتقال به محیط کشت بازززایی تولید ریشه چه کرده بودند محاسبه و سپس دوباره با مدت فوق درمحیط کشتی کاملاً یکسان با محیط کشت بازززایی تجدید کشت شدند. درصد بساک‌های تولیدکننده کالوس به عنوان تعداد بساکهای تولید کننده کالوس در ۱۰۰ عدد محاسبه شدند . تعداد کالوسهای تشکیل دهنده ریشه چه در ۱۰۰ عدد بساک که کالوس تولید کرده بودند به عنوان درصد کالوسهای تولید کننده ریشه چه محسوب شدند. روی هم رفته بازدهی بازززایی به عنوان تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه در ۱۰۰ عدد بساک تعریف شد. مقایسه میانگین‌ها توسط روش LSD انجام گرفت و میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان بودند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با همدیگر نداشتند.

نتایج و بحث

اثر ترکیبات تنظیم کننده رشد:

نتایج اثر ترکیبات تنظیم کننده رشد روی القاء کالوس و بازززایی ریشه چه کنف در جدول دوم خلاصه شده است. ترکیب ۲ میلی گرم در لیتر 2,2-D و یک میلی گرم در لیتر BAP در قیاس با ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر NAA و دو میلی‌گرم در لیتر BAP به طور معنی‌داری از لحاظ اندامزایی برتر بود.

اثرهیدروکلرید تیامین

دررابطه با اثرغلظت‌های هیدروکلرید تیامین برروی القاء کالوس و بازززایی ریشه چه در کشت بساک محیط کشت محتوی ۸ میلی گرم در لیتر هیدروکلریدتیامین تعدادی بیشتری کالوس تشکیل ریشه چه دادند و همچنین روی هم رفته بازدهی آن از محیط کشتی که حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر هیدروکلریدتیامین بود بیشتر بود (جدول ۳).

اثرغلظت های ساکارز و مالتوز:

نتایج اثر غلظت ساکارز در القا محیط کشت و تبدیل میکروسپورها به گیاهان بالغ، دوبل شدن خودبخودی کروموزوم‌ها در میکروسپورهایی که به گیاهان بالغ تبدیل می‌شوند و بازدهی کلی مورد انتظار تولید لاین‌های دبل هاپلوئید در جدول شماره ۶ خلاصه شده است.

به موازات افزایش غلظت ساکارز از ۶ درصد به ۱۴ درصد فراوانی میکروسپورهایی که به گیاهان کامل تبدیل شدند افزایش یافت (جدول ۵). همچنین فراوانی دوبل شدن خودبخودی کروموزوم‌ها در میکروسپورهایی که به گیاه کامل تبدیل شدند از ۳۰ درصد تا ۷۸ درصد افزایش یافت (جدول ۶).

پیشرفت قابل توجه بازدهی در کشت بساک کنف به وسیله تنظیم ترکیبات تنظیم کننده رشد محیط کشت، غلظت هیدروکلریدتیامین و غلظت شکر فراهم شده است. در این بررسی ترکیب ۲ میلی گرم در لیتر 2,2-D با یک میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت علاوه بر افزایش ظرفیت اندام زایی کالوسهای استحصال شده از بساک‌ها و بازدهی کلی کشت، ظرفیت اندام‌زایی کالوس‌های استحصال شده از بساک‌ها و نیز بازدهی کلی کشت بساک رادر قیاس با ترکیب یک میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BAPافزایش داد (جدول ۲).

اثر معنی‌دار 2,4-D روی تشکیل کالوس و باززایی گیاه در مطالعات قبلی که بروی کشت بساک در گندم (بال و همکاران ۱۹۹۳) و برنج (چن در سال ۱۹۸۶) نیز گزارش شده است. اخیراً 2,4-D به وسیله دیگر اکسین‌ها مانند NAA ، اسید ایندول ـ ۳ ـ استیک ـ (LAA)، PAA به طور موفقیت آمیز برای پیشرفت مستقیم اندام‌زایی از میکروسپورهای جو و گندم جایگزین شده است (جدول ۶). نوع مطلوب اکسین یا نسبت اپتیمم اکسین به سیتوکینین در محیط کشت ، متکی به جنین زایی یااندام زایی یامسیر آندروژنتیک دارد. هیدروکلریدتیامین در محیط کشت جهت القا باززایی بساکهای کنف ضروری نبود (جدول ۳) و این طور استنتاج می‌شود که میکروسپورها قادر به ساختن ویتامین در محیط In *vitro* هستند. همان طور که غلظت مالتوز یا ساکارز درمحیط کشت افزایش می‌یافت کالوس‌ها کوچک‌تر می‌شدند (جدول‌های ۴ و ۵).

بازدهی‌کلی باززایی درمحیط‌های‌کشت حاوی غلظت‌های بالای مالتوز(۱۲٪و۱۵٪) یا ساکارز (۹ تا ۴ درصد) کاهش یافت (جدول‌های ۴ و ۵). طبق این بررسی قرار دادن بساک‌ها جهت توسعه میکروسپورهای حاصل از کشت بساک در سطح بالائی از مالتوز یا ساکارز برای مدت طولانی زیان آور می‌باشد. در یک مطالعه مفصل که برروی القاء کشت بساک در *B.napus.ssp* توسط دان ول و تورلین در سال ۱۹۸۵ صورت گرفت، مشخص گردید که غلظت بالای ساکارز فقط جهت شروع بقاء میکروسپور و تقسیم مفید می باشد و جهت بلوغ جنین و باززایی گیاه دخالت بازدارنده دارد. نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت بالای ساکارز در محیط کشت از تشکیل کالوس و باززایی از بافتهای غیرجنسی جلوگیری می‌کند و به طریقی احتمال دوبل شدن خودبخودی کروموزوم را در گیاهان بدست آمده از میکروسپور افزایش می‌دهد تولید هاپلوئید دوبل شده جهت مقاصد اصلاحی جنبه کاربردی مفیدی دارد.

جدول ۱ـ ترکیبات تنظیم کننده رشد در محیط کشت

محیط کشت	نوع اکسین و غلظت	غلظت سیتوکینین
A	(1 mg / lit) NAA	(2 mg / lit) BAP
B	(2 mg / lit) NAA	(1 mg / lit) BAP
C	(2 mg / lit) 2,4-D	(1 mg / lit) BAP
D	(2 mg / lit)2,4-D , (1mg / lit) NAA	(1 mg / lit) BAP
E	(5 mg / lit) PAA	(1 mg / lit)BAP

بنزیل آمینوپورین = BAP
اسید ۴،۲دی کلروفنوکسی=2,4-D
اسید نفتالین استیک=NAA
اسید فنیل استیک=PAA

جدول ۲ - اثر ترکیبات تنظیم کننده رشد روی القاء کالوس و باززایی ریشه چه در کشت بساک

محیط کشت	درصد بساکهای که کالوس تولید می کنند	تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه درصد عدد بساک تولید کننده کالوس	بازدهی کلی باززایی
A	۵۷/۴	۲۵/۲bc	۱۴/۱ bc
B	۶۰/۸	۸/۱c	۴/۳ c
C	۶۲/۳	۷۰a	۴۲/۴ a
D	۵۴/۳	۳۸/۱۶ b	۱۹/۱ b
E	۴۸/۴	۱۴/۲	۷/۴ c

میانگینهایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری باهمدیگر ندارند
(به وسیله آزمون LSD)

جدول ۳ـ اثر غلظت تیامین روی القا کالوس و باززایی ریشه چه در کشت بساک

تیمار	درصد بساک‌های که کالوس تولید می‌کنند	تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه درصد عدد بساک تولید کننده کالوس	بازدهی کلی باززایی
0.mg/lit	۴۱/۲	۴۰/۸c	۲۲/۵ c
0.2mg/lit	۵۵/۷	۴۹ b	۲۷/۶ bc
1.0mg/lit	۶۱/۸	۶۱/۸ b	۴۰/۱ a
8.0mg/lit	۵۲/۳	۷۹/۴ a	۴۱/۸ a
10.mg/lit	۶۵	۴۸/۳ bc	۳۰/۱ b

میانگین هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با همدیگر ندارند (به وسیله آزمون LSD)

جدول ۴ـ اثرمقادیر مالتوز روی القاء کالوس و باززایی ریشه چه در کشت بساک

تیمار	درصد بساکهای که کالوس تولید می کنند	تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه درصد عدد بساک تولید کننده کالوس	بازدهی کلی باززایی
۳% مالتوز	۶۸/۳ ab	۳۰/۸ b	۲۱/۲ b
۶% مالتوز	۷۳/۳ a	۵۰/۷ a	۳۶/۸ a
۹% مالتوز	۸۵/۸ a	۴۳/۸ ab	۳۷/۱ a
۱۲% مالتوز	۴۷/۴ b	۳۶/۲ ab	۴۱/۸ a
۱۵% مالتوز	۲۲/۶۵ C	۷/۱c	۳۰/۱ b

میانگین هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با همدیگر ندارند (به وسیله آزمون LSD)

جدول ۵ ـ اثر غظت های ساکارز روی القاء کالوس و باززایی ریشه چه در کشت بساکهای حاصل از نتایج (H.C.virdis * H.C. Var . vulgaris) F1

تیمار	درصد بساکهای که کالوس تولید می‌کنند	تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه درصد عدد بساک تولید کننده کالوس	بازدهی کلی باززایی
۶% ساکارز	۷۰/۷	۵۰/۳ a	۲۱/۲ b
۹% ساکارز	۷۵/۱	۱۹/۸ b	۳۶/۸ a
۱۲% ساکارز	۶۸/۷	۴۳/۸ ab	۳۷/۴ a
۱۴% ساکارز	۶۳/۲	۳۶/۲ ab	۱۴/۳ b

جدول ۶ ـ اثر غلظت های ساکارز درالقاء محیط کشت روی میکروسپورهای که به گیاه کامل تبدیل شدند و همچنین دوبل شدن خودبخودی و بازدهی کلی مورد انتظار گیاهان دبل هیبرید (DH)که از هیبرید (*H.C.purpurea*H.C.sinplox*) تولید شدند.

تیمار	درصد میکروسپورهایی که به گیاه کامل تبدیل شدند	تعداد کالوسهای تولید کننده ریشه چه درصد عدد بساک تولید کننده کالوس	بازدهی کلی باززایی
۶٪ ساکارز	۶۴/۷	۲۷	۷
۹٪ ساکارز	۸۸/۷	۶۴/۲	۶/۷
۱۲٪ ساکارز	۸۰/۷	۶۶/۶	۷/۸
۱۴٪ ساکارز	۹۴/۱	۷۷/۷	۷/۹

منابع و مآخذ:

۱. گرامی بهرام. ۱۳۷۴. اصلاح و توسعه زراعت کنف در ایران، نشریه مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت کشاورزی .صفحه ۱۵ تا ۲۹

۲. گرامی بهرام . ۱۳۶۰. بررسی اقتصادی کنف در ایران، انتشارات دانشکده تولید و تکنولوژی کشاورزی. دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱۵۲ صفحه.

۳. مهرورز پرویز. ۱۳۶۸. طرز زراعت کنف. انتشارات اداره بررسی کنف. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.۱۶۰صفحه.

4. 4.Ball . S.T.H Zhou , and C.F.konzak . 1993 . Influence of 2,4-D , IAA ,and duration of callus induction in another cultures of spring wheat .plant sci 90,195-200.
5. 5.Berger . Jer.1998 .The worlds major fibre crops , their cultivation and manuring centre d ' etude de l , azote .6.Zurich .P .209 -215 and 227- 231.
6. 6.Chen . Y. 1986 . Anther and pollen culture of rice .In : H.Hu , and H.Yang (eds),Haploids of Higher plant In vitro , 3-25 .China Acad.Publ.Springer - Verlag Beijig . Berlin .
7. Dunwell .J.M. and N Thurling . 1985 . Rols of sucrose in microspore embray production in Brassic napus spp.Olei fera .J.Exp .Bot .36 1478-1491.
8. Gamborg O,L;R.A Miller and K. Ojtma .1986 . Nurtrient requirements of suspension cultres of soybean root cells. Exp . Cell .Res .50 . 151 - 158 .
9. Nichtelein .K.M.H Umbach , and W .Friedt . 1991. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther culture of linseed (linum ustiatissmum L.) .Euphytical 58 , 157164 .
10. Polsoni , L.L. S kott , and W.D . Beversdorf . 1988 . Large - scalection studies in Breassica napus .Can .J.Bot . 66 , 1681 -1685.
11. Sorvari . S . And O.Schieder . 1987 . Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media .Plant Breeding 99. 164 -171.

JOURNAL OF
AGRICULTURAL
SCIENCES
Islamic Azad University

Plant regeneration from anther culture in Linum (Hibiscus cannabinus L.)

A.H.Gorji
Instructorin Broujerd Islamic Azad University

Keywords : Linum, Maltos, Growth regulator,Sucrose,Thyamin Hydrocloride.

Abstract

This study was conducted to determine the affects of different combination of medium over Lignum anther culture to induction and plant regeneration. Anthers were placed inside culture medium of MS that containing five different combination of regulator. Medium with 1 mg L BAP and 2 mg L 2,4-D producted significantly higher amount of callus and significant increase in regeneration the same culture medium in addition 1 mg L NAA and 2 mg L BAP was seen . Between five tested levels of Thyamin Hydrocloride medium with 8.0 mg L H.T. had maximum regeneration. Maltose concentration had significant influence on callus percent production from anther. Between five levels of Maltos used culture medium cotaining 6 until 9 percent of Maltos had maximum regeneration . Sucrose concentration had significant affect on number of callus that product radicle and regeration percentage and also Sucrose had effected on frequency of microspores that transformed to mature plant and frequency of spontaneous double chromosomes in microspores that were transformed to mature plant.