

Effect of *Serendipita indica* Fungus and Plant Growth Regulators on Callus Induction and Organogenesis from Anther Culture in Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Alimoradi¹, A., Pour Mohammadi^{2*}, P., Frkhari³, M. and Ghaffari⁴, M.

Received Date: 04 May 2024

Accepted Date: 11 July February 2025

(Research Article)

Abstract

Anther culture is one of the most efficient methods for producing haploid and doubled-haploid plants to accelerate breeding programs in sunflower. This study was conducted to investigate the interaction effect of inoculating mother plants with the fungus *Serendipita indica* and different concentrations of the growth regulators 2,4-D and BAP on callus induction and regeneration from anther culture of three sunflower cultivars (Barzegar, Farrokh, and Ghasem) using a factorial experiment based on a completely randomized design. Sunflower seeds were inoculated with *S. indica* in the field, and after confirming symbiosis, buds at the R2 stage (1.5–2 cm diameter) were harvested. Anthers were cultured on solid MS basal medium containing various combinations of 2,4-D (0, 1, 2, 5 mgL⁻¹) and BAP (0, 0.5, 1 mgL⁻¹), and the resulting calli were transferred to three different organogenesis media containing NAA, BAP, kinetin, and IAA. The results showed that the main effect of the fungus on callus induction percentage was not significant ($P>0.05$), but the three-way interaction of fungus, BAP, and 2,4-D on callus quality was significant at the 1% level. The best combination for callus induction was 1 mgL⁻¹ BAP plus 1 mgL⁻¹ 2,4-D, which yielded an average of 75% callus induction. Furthermore, in fungus-inoculated plants, callus quality in this treatment (mean 2.2) was significantly better than in control plants (mean 1.3). Maximum regeneration (approximately 61%) was observed on MS medium containing 2 mgL⁻¹ BAP and 1 mgL⁻¹ NAA. In conclusion, the use of mother plants inoculated with *S. indica* in combination with optimized growth regulators can improve the quality of calli derived from sunflower anther culture.

Keywords: Androgenesis, Haploid plant, Endophytic symbiosis, Micropropagation

1, 2 and 3. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

4. Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

*: Corresponding author Email: mohammadi@asnruk.ac.ir

اثر قارچ *Serendipita indica* و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القای کالوس و اندام‌زایی در کشت بساک آفتابگردان

Effect of *Serendipita indica* Fungus and Plant Growth Regulators on Callus Induction and Organogenesis from Anther Culture in Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

علی علی مرادی^۱، پیام پورمحمدی^{۲*}، محمد فرخاری^۳ و مهدی غفاری^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۱

چکیده

کشت بساک یکی از کارآمدترین روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید و دابل‌هاپلوئید جهت تسریع برنامه‌های به‌نژادی در آفتابگردان است. این پژوهش به منظور بررسی اثر متقابل تلقیح گیاهان مادری با قارچ *Serendipita indica* و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP بر کالوس‌زایی و باززایی از کشت بساک سه رقم آفتابگردان (برزگر، فرخ و قاسم) به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. بذور آفتابگردان در مزرعه با قارچ *S. indica* تلقیح شدند و پس از تأیید همزیستی، غنچه‌های گیاهان در مرحله R2 (قطر ۱/۵-۲ سانتی‌متر) برداشت گردید و بساک‌ها در محیط کشت پایه MS جامد حاوی ترکیبات مختلف 2,4-D (۰، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰، ۵/۰، ۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند و کالوس‌های حاصل به سه محیط کشت اندام‌زایی مختلف حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، BAP، Kinetin و IAA منتقل گردیدند. نتایج نشان داد که اثر اصلی قارچ بر درصد کالوس‌زایی معنی‌دار نبود ($P>0.05$)، اما اثر متقابل سه‌جانبه قارچ، BAP و 2,4-D بر کیفیت کالوس در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. بهترین ترکیب برای کالوس‌زایی، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود که میانگین ۷۵ درصد کالوس‌زایی را به همراه داشت. همچنین، در گیاهان تلقیح شده با قارچ، کیفیت کالوس در این تیمار به‌طور معنی‌داری (میانگین ۲/۲) بهتر از گیاهان شاهد (میانگین ۱/۳) بود. بیشینه باززایی (حدود ۶۱ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در نتیجه، استفاده از گیاهان مادری تلقیح شده با *S. indica* در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد بهینه می‌تواند کیفیت کالوس‌های حاصل از کشت بساک آفتابگردان را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: آندروئوز، گیاه هاپلوئید، همزیستی اندوفیتی، ریزازدیادی

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۴. دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران

* نویسنده مسؤول Email: Mohammadi@asnrukh.ac.ir

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد آقای علی علی مرادی به راهنمایی دکتر پیام پورمحمدی و دکتر محمد فرخاری و مشاوره دکتر مهدی غفاری در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان است.

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی جهان است که پس از سویا و کلزا، سهم قابل توجهی در تولید روغن خوراکی دارد (FAO, 2023). در ایران به‌رغم پتانسیل بالا، عملکرد این محصول به دلیل تنوع ژنتیکی محدود ارقام و عدم دسترسی به لاین‌های خالص مطلوب، کمتر از میانگین جهانی است (ثابتی و همکاران، ۱۳۹۳؛ احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). یکی از چالش‌های اصلی در به‌نژادی آفتابگردان، طولانی و پرهزینه بودن فرآیند تولید لاین‌های اینبرد از طریق خودگشنی متوالی (۶ تا ۷ نسل) است (Zapata, 1984). در این میان، تولید گیاهان هاپلوئید و دابل‌هاپلوئید از طریق کشت میکروسپور یا بساک، روشی سریع و کارآمد برای دستیابی به هموزیگوسیتی کامل در یک نسل محسوب می‌شود (Touraev et al., 2009; Ferrie & Caswell, 2011). بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده از روش‌های نوین مانند پرتوپاشی گرده برای القای پارتنوژنز نیز می‌تواند تولید دابل‌هاپلوئید را در آفتابگردان تسهیل کند (Feng et al., 2023). با این حال، کشت بساک همچنان به دلیل سادگی و هزینه کمتر، یکی از پرکاربردترین روش‌ها باقی مانده است (Mabuza et al., 2023).

کشت بساک عبارت است از جداسازی بساک‌های حاوی میکروسپورهای در حال رشد (معمولاً مرحله تک‌هسته‌ای) و کشت آن‌ها در محیط کشت مصنوعی به منظور القای آندروژنز و تولید جنین یا کالوس هاپلوئید (Germana, 2011). اولین گزارش موفق کشت بساک در آفتابگردان توسط Gurel و همکاران (۱۹۹۱) ارائه شد. از آن زمان، محققان متعددی عوامل مؤثر بر این فرآیند را بررسی کرده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: ژنوتیپ (Saji & Sujatha, 1998)، مرحله نمو بساک (Miladinovic et al., 2016)، پیش‌تیمارهای فیزیکی (شوگ حرارتی و سرما) (Thengane et al., 1994) و ترکیب محیط کشت به‌ویژه نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد نشان داده‌اند که حتی عواملی مانند اندازه گلچه و شرایط محیطی مزرعه نیز بر پاسخ کشت بساک تأثیرگذار هستند (Saensee et al., 2018; Miladinovic et al., 2016). با وجود پیشرفت‌های فراوان، پاسخ به کشت بساک در آفتابگردان همچنان پایین، وابسته به ژنوتیپ و نیازمند بهینه‌سازی بیشتر است (Blinkov et al., 2022).

در میان تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین ۲،۴-دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) به‌عنوان مؤثرترین

ترکیب برای القای کالوس در کشت بساک آفتابگردان شناخته شده است (Vijaya et al., 2003). همچنین سیتوکنین بنزیل آمینو پورین (BAP) در ترکیب با اکسین‌ها نقش هم‌افزایی در تحریک تقسیم سلولی و جنین‌زایی دارد (Saisingthong et al., 1996). مرور منابع نشان می‌دهد که نسبت مناسب BAP به 2,4-D برای القای کالوس‌های مرفوژنیک حیاتی است و غلظت‌های بالای اکسین معمولاً منجر به کالوس‌های آبکی و غیرقابل باززایی می‌شود (Pasternak and Steinmacher, 2024). با این حال، پاسخ به کشت بساک در آفتابگردان همچنان پایین و وابسته به ژنوتیپ باقی مانده است (Touraev et al., 2009). در سال‌های اخیر، استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاک به‌عنوان رویکردی نوین برای بهبود پاسخ‌های کشت بافت موردتوجه قرار گرفته است (Soumare et al., 2021; Cantabella et al., 2022) و در این میان، قارچ اندوفیت *Indica* به دلیل توانایی در ترشح هورمون‌های رشدی و افزایش کارایی کشت بافت در گیاهان مختلف موردتوجه پژوهشگران قرار گرفته است (Yin et al., 2025; Qu et al., 2025). این قارچ از رده بازیدیومیست‌ها، با طیف وسیعی از گیاهان زراعی همزیستی ایجاد کرده و با تولید هورمون‌های رشدی مانند اکسین و سیتوکنین، افزایش جذب مواد معدنی و تعدیل بیان ژن‌های مرتبط با رشد، باعث بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌گردد (Waller et al., 2005; Bagde et al., 2012; Varma et al., 2011). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این قارچ می‌تواند به‌عنوان یک کود زیستی عمل کرده و مقاومت به تنش‌های غیرزیستی را نیز افزایش دهد (Gill et al., 2022).

مطالعات جدید نشان داده‌اند که حضور این قارچ در بافت ریشه گیاهان مادری، می‌تواند محتوای هورمونی درون‌زا را تغییر داده و بر پاسخ ریزنمونه‌های جداسازی شده در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر بگذارد (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۵). با این حال، تاکنون اثر تلقیح گیاهان مادری آفتابگردان با *S. indica* بر کارایی کشت بساک گزارش نشده است.

بنابراین، هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر متقابل تلقیح گیاهان مادری با قارچ *S. indica* و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP بر کالوس‌زایی و باززایی از کشت بساک سه رقم آفتابگردان ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و قارچ

سه رقم هیبرید تجاری آفتابگردان شامل قاسم، برزگر و فرخ (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج)

ضد عفونی و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند (شکل ۱). برای تعیین مرحله نمو میکروسپورها، از چند غنچه نمونه برداری شد و بساک‌ها پس از رنگ‌آمیزی با استوکارمین ۱ درصد (w/v) تحت بررسی با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی $40\times$) قرار گرفتند؛ بدین ترتیب مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی به‌عنوان مرحله مناسب برای کشت تأیید گردید (شکل ۲).

با استفاده از میکروسکوپ استریو مدل (Olympus SZ61)، گلچه‌ها جدا شده و بساک‌ها به کمک سوزن تشریح و پنس استریل از گلچه‌ها خارج گردیدند. هر بساک بر روی محیط‌کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و pH ۵/۸ (تنظیم شده قبل از اتوکلاو) کشت شد. محیط‌های کشت با ترکیبات هورمونی مندرج در جدول ۱ مورد آزمایش قرار گرفتند. هر تیمار شامل ۲۵ بساک در سه تکرار بود. پتری‌دیش‌ها به‌مدت یک هفته در تاریکی مطلق (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و سپس در شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از سه هفته، کالوس‌های تشکیل شده به محیط کشت مشابه منتقل شدند.

اندام‌زایی از کالوس‌های بساک

کالوس‌های تولید شده با اندازه و کیفیت مناسب (بافت فشرده و متمایل به زرد) به سه محیط‌کشت باززایی بر پایه MS با ترکیبات زیر منتقل گردیدند:

محیط‌کشت یک (EM1): ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (Badigannavar & Kuruvinashetti, 1996).

محیط‌کشت دو (EM2): ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (گرگی، ۱۳۹۴).

محیط‌کشت سه (EM3): ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر Kinitin و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA (Wen et al., 1991).

کالوس‌ها در شرایط نوری مشابه با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت روشنایی- تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد اندام‌زایی (تعداد کالوس‌های تولیدکننده شاخساره یا ریشه از کل کالوس‌های کشت شده) پس از چهار هفته ثبت گردید.

مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه قارچ *Serendipita indica* کد (DSM 11827) از دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شد. قارچ در محیط کشت جامد اختصاصی CM (Compost Medium) حاوی ۲ درصد آگار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Varma et al., 1999).

تلقیح گیاهان مادری

برای تهیه مایه تلقیح قارچ، قطعاتی از محیط‌کشت CM حاوی میسلیم قارچ به محیط‌کشت مایع سیب‌زمینی- گلوکز (۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم گلوکز در لیتر) منتقل و به مدت ۱۴ روز در شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون قارچ (حاوی کلأمیدوسپور و میسلیم) به دانه‌های جو استریل شده افزوده و به مدت دو هفته دیگر در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا دانه‌ها با قارچ کلنیزه گردند (Ghabooli et al., 2013).

کاشت بذور آفتابگردان در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. بذور تیمار قارچ به مدت ۴۸ ساعت در سوسپانسیون قارچ خیسانده شدند و در زمان کاشت، در هر چاله ۶ دانه جو که قبلاً با قارچ تلقیح شده بودند (به‌عنوان مایه تلقیح) همراه با ۳ بذر آفتابگردان در عمق ۷ سانتی‌متر قرار گرفتند. بذور شاهد نیز به مدت ۴۸ ساعت در آب‌مقطر استریل خیسانده شده و بدون دانه جو تلقیح شده کشت شدند. آبیاری و داشت مطابق با روش‌های معمول زراعی انجام شد. تأیید هم‌زیستی با برداشت ریشه در هفته سوم پس از کاشت، رنگ‌آمیزی با تریپان بلو (۰/۰۵ درصد در اسید لاکتیک) و مشاهده زیر میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی $40\times$) انجام گرفت.

برداشت غنچه و کشت بساک

هنگامی که گیاهان وارد مرحله زایشی R2 شدند (قطر غنچه ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر، غنچه‌ها کاملاً بسته)، غنچه‌ها از بوته‌های تلقیح شده و شاهد به‌طور تصادفی جمع‌آوری و بلافاصله در بشر حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. در زیر لامینار، لایه‌های خارجی غنچه حذف و غنچه‌ها به‌ترتیب با اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۱۰ دقیقه)

جدول ۱: ترکیبات تیماری 2,4-D و BAP مورد استفاده در کشت بساک آفتابگردان. محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) جامد با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار بود (pH=۵/۸).

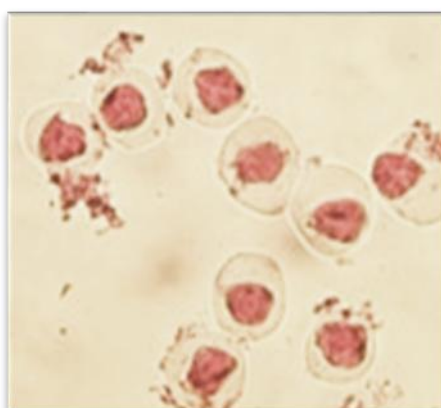
Table 1: Combinations of 2,4-D and BAP treatments used in sunflower anther culture. The basal medium consisted of solidified MS medium with 30 g/l sucrose and 8 g/l agar (pH= 5.8)

تیمار Treatment	2,4-D (mgL ⁻¹)	BAP (mgL ⁻¹)
1	0	0
2	1	0
3	2	0
4	5	0
5	0	0.5
6	1	0.5
7	2	0.5
8	5	0.5
9	0	1
10	1	1
11	2	1
12	5	1



شکل ۱: مراحل تهیه مواد گیاهی: (الف) غنچه کاملاً بسته و مناسب برای نمونه‌برداری، (ب) غنچه‌های جمع‌آوری شده از سه رقم آفتابگردان پیش از مرحله ضدعفونی سطحی

Fig. 1: Preparation of plant material: (a) completely closed bud suitable for sampling, (b) collected buds from the three sunflower cultivars before surface sterilization



شکل ۲: میکروسپورهای آفتابگردان در مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی پس از رنگ‌آمیزی با استوکارمین (۱ درصد)؛ بزرگ‌نمایی ۴۰X (مقیاس = ۵۰ میکرومتر). این مرحله به‌عنوان زمان مناسب برای کشت بساک تأیید شد

Fig. 2: Sunflower microspores at the late uninucleate stage after staining with acetocarmine (1%); 40 X magnification (scale bar = 50 μ m). This stage was confirmed as suitable for anther culture

تجزیه و تحلیل آماری

تولیدکننده شاخساره یا ریشه از کل کالوس‌های کشت شده ثبت گردید.

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (IBM Corp., USA) تجزیه و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ۵ درصد مقایسه شدند. قبل از تجزیه، نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف تأیید گردید.

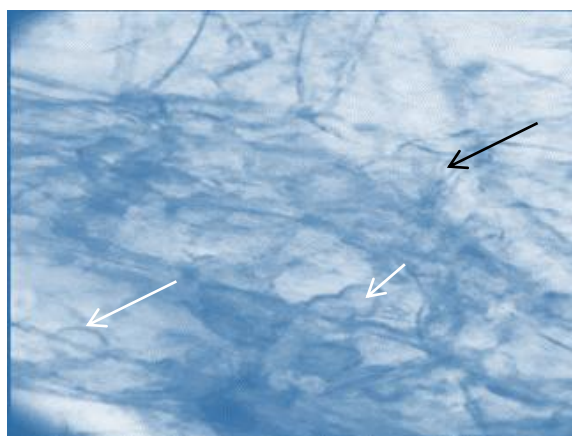
نتایج

تأیید هم‌زیستی قارچ

بررسی میکروسکوپی ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با *S. indica* وجود کلامیدوسپورهای گرد تا بیضی شکل به صورت منفرد یا زنجیره‌ای در بافت کورتکس ریشه را نشان داد. ریشه‌های قارچ به‌وضوح درون سلول‌های کورتکس مشاهده شدند. در ریشه گیاهان شاهد هیچگونه ساختار قارچی دیده نشد. بنابراین، استقرار موفقیت‌آمیز قارچ در گیاهان مادری تأیید گردید (شکل ۳).

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور: رقم (سه سطح)، تلقیح قارچ (دو سطح: با و بدون قارچ)، و ترکیب هورمونی (۱۲ سطح) در سه تکرار اجرا شد. صفات مورد ارزیابی شامل درصد کالوس‌زایی (تعداد بساک‌های تولیدکننده کالوس از کل بساک‌های کشت شده)، اندازه کالوس (با استفاده از مقیاس ۰-۴) و کیفیت کالوس (مقیاس ۰-۳) بدون کالوس، ۱. آبکی و سست، ۲. فشرده و متمایل به سفید، ۳. فشرده و سبز-زرد) بودند. ارزیابی کیفیت کالوس بر اساس معیارهای رنگ، بافت و ریخت‌شناسی با استفاده از یک مقیاس نیمه‌کمی، مطابق با پروتکل‌های استاندارد گزارش‌شده در مطالعات کشت بافت انجام شد (CABRI, 1998; Elkonin *et al.*, 1997).

آزمایش باززایی نیز به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور: رقم (سه سطح)، تلقیح قارچ (دو سطح) و محیط کشت باززایی (سه سطح EM1, EM2, EM3) در سه تکرار انجام شد و صفت درصد اندام‌زایی (تعداد کالوس‌های



شکل ۳: نمای میکروسکوپی از ریشه کلنیزه‌شده آفتابگردان با قارچ (*S. indica*) بزرگ‌نمایی ۴۰ X که ریشه‌های درون سلولی (پیکان‌های سیاه) و کلامیدوسپورهای گرد تا بیضی (پیکان‌های سفید) را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی با تریپان بلو ۰/۰۵ درصد انجام شده است

Fig. 3: Microscopic view of a colonized sunflower root by *S. Indica* (40 X magnification), showing intracellular hyphae (black arrows) and round to oval chlamydospores (white arrows). Staining was performed with trypan blue 0.05%

اثر قارچ و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر اصلی قارچ (*S. indica*) بر درصد کالوس‌زایی و همچنین بر اندازه و کیفیت کالوس معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). اثر اصلی رقم نیز در هیچ یک از صفات معنی‌دار نشد. اثرات اصلی BAP و 2,4-D بر هر سه صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. اثر متقابل دوگانه BAP $\times$ 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی ($P < 0.05$) و بر کیفیت کالوس ($P < 0.01$) معنی‌دار شد. مهم‌تر آن که اثر متقابل

سه‌جانبه قارچ $\times$ 2,4-D $\times$ BAP بر کیفیت کالوس در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید.

از آنجا که تیمار شاهد (فاقد BAP و 2,4-D) هیچ گونه کالوس‌زایی نشان نداد، این تیمار از تحلیل‌های مقایسه میانگین حذف شد. مقایسه میانگین اثر متقابل (BAP $\times$ 2,4-D) (شکل ۴) نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی (به‌طور میانگین ۷۵ درصد از بساک‌های کشت شده) در ترکیب BAP (۱ میلی گرم در لیتر) همراه با 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر) حاصل

اندام‌زایی از کالوس‌های بساک

کالوس‌های با کیفیت بالا (درجه ۲ و ۳) به سه محیط‌کشت باززایی منتقل شدند. نتایج نشان داد که نوع محیط‌کشت باززایی تأثیر معنی‌داری بر درصد اندام‌زایی داشت (جدول ۵). مقایسه میانگین (شکل ۶) نشان داد که محیط‌کشت EM2 حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) با ۶۱/۲ درصد اندام‌زایی بهترین نتیجه را داشت. محیط‌کشت EM1 حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) با ۳۸/۵ درصد (۱) با ۳۸/۵ درصد و محیط‌کشت EM3 حاوی کینتین (۲/۵) میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) با ۶۱/۲ درصد کینتین با ۲۵/۳ درصد در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. باززایی عمدتاً به‌صورت شاخساره‌زایی مستقیم (بدون مرحله ریشه‌زایی مجزا) بود. شاخساره‌های باززایی شده به ارتفاع ۲-۳ سانتی‌متر پس از ۶ هفته به محیط‌کشت MS ۱/۲ حاوی IBA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌دهی منتقل شدند. شکل ۷ مراحل اندام‌زایی را نشان می‌دهد.

شد (شکل ۵). ترکیب (۱ میلی‌گرم در لیتر) BAP با 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) نیز کالوس‌زایی بالایی (حدود ۷۰ درصد) نشان داد. کمترین درصد کالوس‌زایی در غلظت‌های بالای 2,4-D (۵ میلی‌گرم در لیتر) بدون BAP مشاهده گردید (کمتر از ۲۰ درصد).

نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌جانبه قارچ $BAP \times 2,4-D$ بر کیفیت کالوس (جدول ۳) نشان داد که در گیاهان تلقیح شده با قارچ، کیفیت کالوس در ترکیب BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌طور معنی‌داری بالاتر از شرایط عدم تلقیح بود (میانگین کیفیت ۱/۳ در مقابل ۲/۲ از حداکثر ۳). همچنین در غیاب BAP و در غلظت بالای 2,4-D (۵ میلی‌گرم در لیتر)، کیفیت کالوس در هر دو شرایط تلقیح و عدم تلقیح پایین بود. به‌طور کلی، حضور قارچ باعث بهبود کیفیت کالوس در تیمارهای بهینه هورمونی شد، اما نتوانست کالوس‌زایی را در تیمارهای نامناسب القا کند (جدول ۴).

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر رقم، تلقیح با قارچ *S. indica* و غلظت‌های مختلف BAP و 2,4-D بر تعداد و کیفیت کالوس در کشت

بساک آفتابگردان

Table 2: Analysis of variance of the effects of cultivar, *S. indica* inoculation, and different concentrations of BAP and 2,4-D on callus number and quality in sunflower anther culture

میانگین مربعات MS		درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variance	
کیفیت کالوس Callus quality	تعداد کالوس Callus number			
۱۱/۳ ^{ns}	۶۶ ^{ns}	2	Cultivar	رقم
۱/۳ ^{ns}	۳۲۵ ^{ns}	1	Fungi	قارچ
۸/۶ [*]	۳۹۳/۵ ^{**}	2	BAP	BAP
۵۰/۸ [*]	۲۹۳/۸ ^{**}	3	2,4-D	2,4-D
۱/۵۳ ^{ns}	۸/۵ ^{ns}	2	Cultivar × Fungi	رقم × قارچ
۰/۹ ^{ns}	۱/۵ ^{ns}	4	Cultivar × BAP	رقم × BAP
۳/۲ [*]	۱/۶ ^{ns}	6	Cultivar × 2,4-D	رقم × 2,4-D
۴/۴ [*]	۱۲/۷ ^{ns}	2	Fungi × BAP	قارچ × BAP
۱/۸ ^{ns}	۴/۱۲ ^{ns}	3	Fungi × 2,4-D	قارچ × 2,4-D
۱۲/۷ ^{**}	۱۹/۷ [*]	6	BAP × 2,4-D	BAP × 2,4-D
۳/۵ [*]	۱/۵ ^{ns}	4	Cultivar × Fungi × BAP	رقم × قارچ × BAP
۲/۲ ^{ns}	۸/۰ ^{ns}	6	Cultivar × Fungi × 2,4-D	رقم × قارچ × 2,4-D
۲/۳ ^{ns}	۵/۳ ^{ns}	10	Cultivar × BAP × 2,4-D	رقم × BAP × 2,4-D
۳/۲ [*]	۹/۳ ^{ns}	6	Fungi × BAP × 2,4-D	قارچ × BAP × 2,4-D
۲/۲ ^{ns}	۱۰/۱ ^{ns}	10	Cultivar × Fungi × BAP × 2,4-D	رقم × قارچ × BAP × 2,4-D
۱/۴	۸/۶	113	Error	خطا
۳۵	۳۸		CV (%)	ضریب تغییرات (درصد)

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطوح احتمال پنج و یک درصد

ns, * and ** are non-significant and significant at five and one percent probability levels, respectively

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌جانبه تلقیح با قارچ (*S. indica* با/ بدون) در غلظت‌های مختلف BAP و 2,4-D (میلی گرم در لیتر) بر کیفیت کالوس در کشت بساک آفتابگردان. داده‌ها میانگین سه رقم تجاری است

Table 3: Mean comparison of the three-way interaction effect of *S. indica* inoculation (with/without) at different concentrations of BAP and 2,4-D (mgL^{-1}) on callus quality in sunflower anther culture. Data are the means of three commercial cultivars

میانگین Mean	تیمار (میلی گرم در لیتر) Treatment (mgL^{-1})	میانگین Mean	تیمار (میلی گرم در لیتر) Treatment (mgL^{-1})
c.	قارچ 0.5 BAP + 0 2,4-D	c.	بدون قارچ 1 BAP + 5 2,4-D
de ۱	قارچ 0 BAP + 1 2,4-D	cd ۱/۶۷	بدون قارچ 0.5 BAP + 0 2,4-D
de ۱/۱۷	قارچ 0 BAP + 2 2,4-D	ab ۲	بدون قارچ 0 BAP + 1 2,4-D
bc ۲/۸۷	قارچ 0.5 BAP + 5 2,4-D	abc ۲/۸۹	بدون قارچ 1 BAP + 5 2,4-D
bc ۲/۸۷	قارچ 0 BAP + 5 2,4-D	abc ۳/۱۱	بدون قارچ 1 BAP + 0 2,4-D
abc ۳	قارچ 1 BAP + 1 2,4-D	ab ۳/۴۴	بدون قارچ 1 BAP + 2 2,4-D
ab ۳/۲۲	قارچ 0.5 BAP + 1 2,4-D	ab ۳/۵۶	بدون قارچ 0.5 BAP + 2 2,4-D
ab ۳/۲۲	قارچ 0.5 BAP + 0 2,4-D	ab ۳/۸۹	بدون قارچ 0.5 BAP + 1 2,4-D
ab ۳/۳۳	قارچ 0.5 BAP + 2 2,4-D	ab ۴	بدون قارچ 0.5 BAP + 5 2,4-D
ab ۳/۷۸	قارچ 0 BAP + 1 2,4-D	ab ۴/۲۲	بدون قارچ 0 BAP + 2 2,4-D
ab ۳/۸۹	قارچ 1 BAP + 0 2,4-D	c.	بدون قارچ 0 BAP + 5 2,4-D
a ۴/۴۴	قارچ 1 BAP + 5 2,4-D	ab ۴/۲۳	بدون قارچ 0.5 BAP + 1 2,4-D

میانگین‌های دارای حرف(های) مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند
Means followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% probability level using Duncan's test

جدول ۴: مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌جانبه رقم، تلقیح با قارچ *S. indica* و غلظت BAP (میلی گرم در لیتر) بر کیفیت کالوس در آفتابگردان

Table 4: Mean comparison of the three-way interaction effect of cultivar, *S. indica* inoculation, and BAP (mgL^{-1}) concentration on callus quality in sunflower anther culture

میانگین Mean	تیمار (میلی گرم در لیتر) Treatment (mgL^{-1})
۳/۳۳ ^b	برزگر + قارچ + BAP ۰
۳/۶۷ ^a	برزگر + قارچ + BAP ۰/۵
۳/۷۸ ^a	برزگر + قارچ + BAP ۱
۳/۳۳ ^{ab}	برزگر + بدون قارچ + BAP ۰
۳/۳۳ ^{ab}	برزگر + بدون قارچ + BAP ۰/۵
۳/۵۸ ^a	برزگر + بدون قارچ + BAP ۱
۲/۸۳ ^{ab}	فرخ + قارچ + BAP ۰
۲/۵۸ ^{ab}	فرخ + قارچ + BAP ۰/۵
۳/۵۰ ^a	فرخ + قارچ + BAP ۱
۲/۶۷ ^{ab}	فرخ + بدون قارچ + BAP ۰
۳/۵۰ ^a	فرخ + بدون قارچ + BAP ۰/۵
۳/۶۷ ^a	فرخ + بدون قارچ + BAP ۱
۱/۷۵ ^b	قاسم + قارچ + BAP ۰
۲/۵۸ ^{ab}	قاسم + قارچ + BAP ۰/۵
۳/۹۲ ^a	قاسم + قارچ + BAP ۱
۳/۱۷ ^{ab}	قاسم + بدون قارچ + BAP ۰
۲/۵۸ ^{ab}	قاسم + بدون قارچ + BAP ۰/۵
۳/۱۷ ^{ab}	قاسم + بدون قارچ + BAP ۱

برزگر، قاسم و فرخ ارقام آفتابگردان هستند. میانگین‌های دارای حرف(های) مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند

Barzegar, Ghasem and Farrokh are sunflower cultivars. Means followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% probability level using Duncan's test

جدول ۵: تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط اندام‌زایی بر درصد باززایی شاخساره از کالوس‌های حاصل از کشت بساک آفتابگردان

Table 5: Analysis of variance of the effect of organogenesis medium type on shoot regeneration percentage from calli derived from sunflower anther culture

میانگین مربعات اندام‌زایی Mean squares of organogenesis	درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variance
2.51*	2	نوع محیط اندام‌زایی Type of organogenesis medium
0.36	12	خطا Error
51.4		ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

*: معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

*: significant at 5% probability level

بحث

در این پژوهش، اثر تلقیح گیاهان مادری آفتابگردان با قارچ اندوفیت *S. indica* بر پاسخ به کشت بساک مورد بررسی قرار گرفت. یافته اصلی این است که اگرچه اثر اصلی قارچ بر کالوس‌زایی معنی‌دار نبود، اما اثر متقابل سه‌جانبه قارچ با تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D بر کیفیت کالوس معنی‌دار شد (جدول ۲). به عبارت دیگر، حضور قارچ در گیاه مادری، پاسخ کالوس‌ها به غلظت‌های مختلف هورمون‌های خارجی را تعدیل نمود و باعث بهبود کیفیت کالوس در تیمارهای بهینه گردید (جدول ۳).

عدم معنی‌داری اثر اصلی قارچ بر کالوس‌زایی ممکن است به این دلیل باشد که القای آندروژنز در کشت بساک بیشتر تحت تأثیر عوامل درون‌شیشه‌ای (مانند ترکیب محیط‌کشت، پیش‌تیمارها) قرار دارد تا وضعیت فیزیولوژیکی گیاه مادری (Touraev et al., 2009). با این حال، اثر متقابل معنی‌دار نشان می‌دهد که همزیستی با *S. indica* احتمالاً از طریق تغییر در محتوای هورمون‌های درون‌زا (به‌ویژه اکسین و سیتوکنین) یا متابولیت‌های ثانویه در بافت‌های گل، حساسیت میکروسپورها به هورمون‌های خارجی را افزایش داده است. سیرنبرگ و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که ریشه گیاهان آلوده به *S. indica* مقادیر بیشتری اکسین تولید می‌کنند. همچنین مشخص شده است که این قارچ می‌تواند تا ۶/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسین (IAA) به محیط کشت ترشح کند (Sirrenberg et al., 2007). بنابراین، احتمالاً تجمع اکسین درون‌زا در بافت بساک گیاهان تلقیح شده، اثر هم افزایی با 2,4-D خارجی داشته و کیفیت کالوس را بهبود بخشیده است.

نتایج این پژوهش از نظر غلظت بهینه 2,4-D و BAP با یافته‌های پیشین همخوانی دارد. ترکیب BAP و 2,4-D به‌عنوان بهترین تیمار برای کالوس‌زایی در آفتابگردان توسط Thengane و همکاران (۱۹۹۴) و نیز Saji و Sujatha (۱۹۹۸) گزارش شده است (شکل ۳). همچنین Voronova (۲۰۱۶) روی آفتابگردان

وحشی نشان داد که نسبت ۲:۱ BAP به NAA بهترین نتیجه را دارد. در مطالعه حاضر، BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) به همراه NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله اندام‌زایی بهترین بود که با گزارش Gurel و همکاران (۱۹۹۱) و همچنین گرجی (۱۳۹۴) روی گیاه کنف همسو است (شکل ۴).

قابل توجه است که در تیمارهای حاوی غلظت بالای 2,4-D (۵ میلی‌گرم در لیتر) بدون BAP، کالوس‌زایی بسیار ضعیف و کیفیت کالوس پایین بود. این موضوع نشان می‌دهد که تعادل مناسب بین اکسین و سیتوکنین برای القای کالوس‌های مرفوژنیک ضروری است (Vijaya et al., 2003). کالوس‌های حاصل از غلظت بالای 2,4-D اغلب آبکی و غیرقابل باززایی بودند که با گزارش Jovic و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد.

در مورد عدم معنی‌داری اثر رقم، ممکن است به این دلیل باشد که هر سه رقم مورد مطالعه هیبریدهای تجاری با زمینه ژنتیکی تا حدی مشابه هستند. پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که پاسخ به کشت بساک در آفتابگردان به شدت وابسته به ژنوتیپ است و برخی ارقام پاسخ بسیار ضعیفی دارند (Miladinovic et al., 2016). در اینجا، ارقام برزگر، فرخ و قاسم پاسخ نسبتاً مشابهی نشان دادند، بنابراین می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های دابل‌هاپلوئیدی استفاده کرد.

در مقایسه با مطالعات مشابه، میزان کالوس‌زایی به‌دست آمده در این تحقیق (حداکثر ۷۵ درصد) نسبت به برخی گزارش‌ها (Saji & Sujatha, ۱۹۹۸) مثلاً با ۳۰-۴۰ درصد کالوس‌زایی بالاتر است، اما نسبت به برخی دیگر (Vijaya et al., 2003) با ۸۵ درصد کالوس‌زایی پایین‌تر است. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از شرایط محیطی مزرعه، مرحله برداشت غنچه و ترکیب دقیق محیط‌کشت باشد.

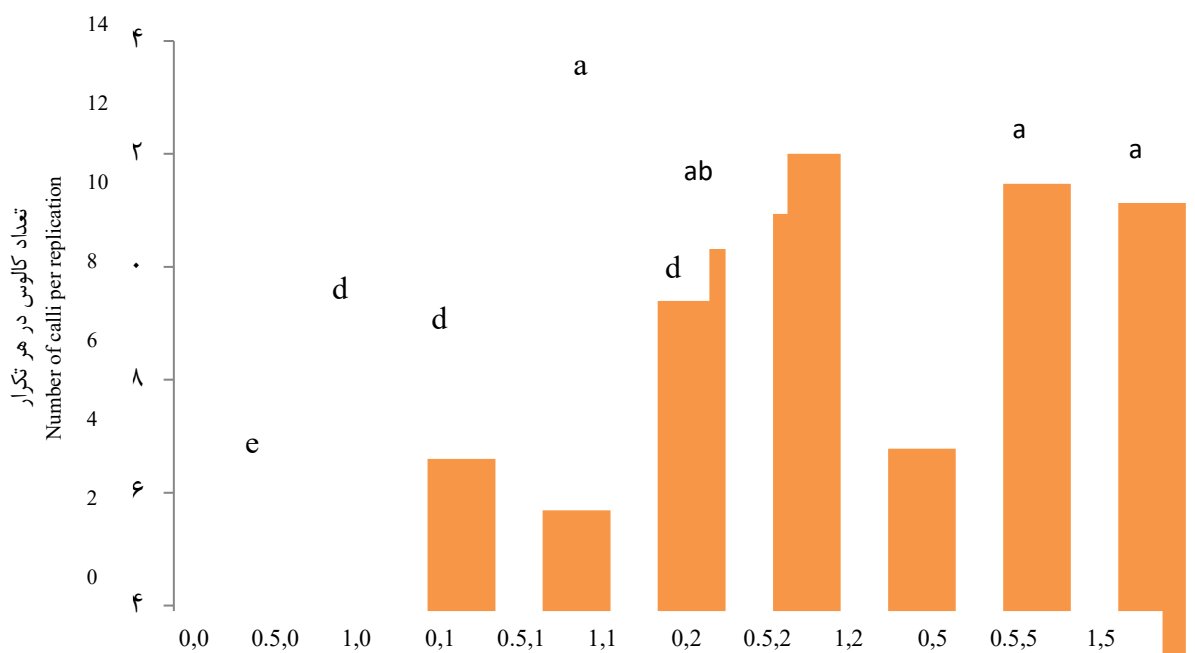
نوآوری این پژوهش در بررسی اثر *S. indica* بر کشت بساک است. تاکنون مطالعه مشابهی روی آفتابگردان یا سایر گیاهان گزارش نشده است. نتایج نشان می‌دهد که تلقیح گیاهان مادری با این قارچ می‌تواند به‌عنوان یک روش

پیش تیمار زیستی برای افزایش کیفیت کالوس در کشت بساک مکانیسم مولکولی این اثر (تغییر در بیان ژن های اکسین یا مورد استفاده قرار گیرد. پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده، آنزیم های آنتی اکسیدان) بررسی شود.



شکل ۴: نمایی از تولید کالوس فشرده و سبز-زرد آماده انتقال به محیط باززایی در کشت بساک آفتابگردان روی محیط MS حاوی BAP (۱ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر)

Fig. 4: Compact, green-yellow calli ready for transfer to regeneration sunflower anther culture on MS medium containing BAP (1 mgL⁻¹) and 2,4-D (1 mgL⁻¹)

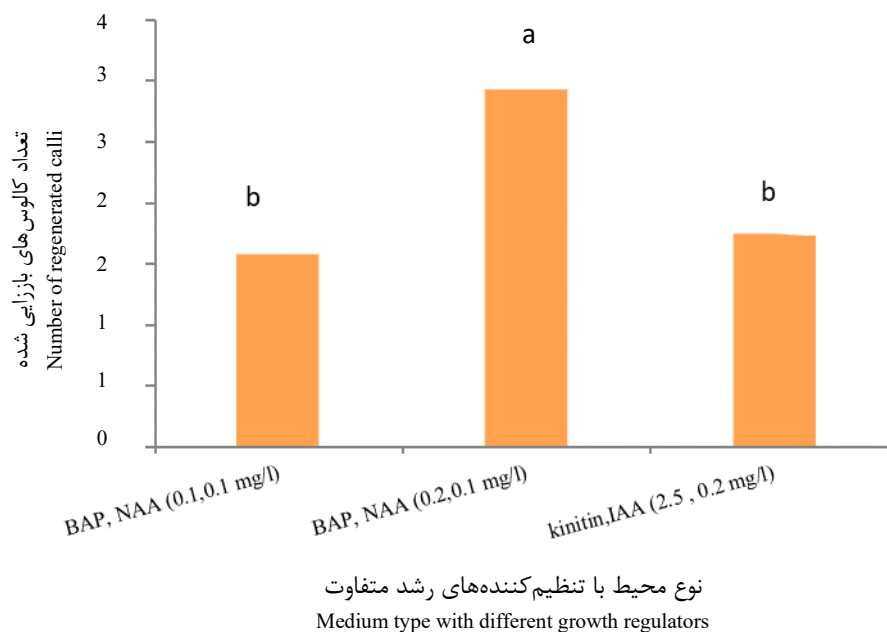


غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد (عدد اول میزان BAP و عدد دوم میزان 2,4-D (میلی گرم در لیتر))

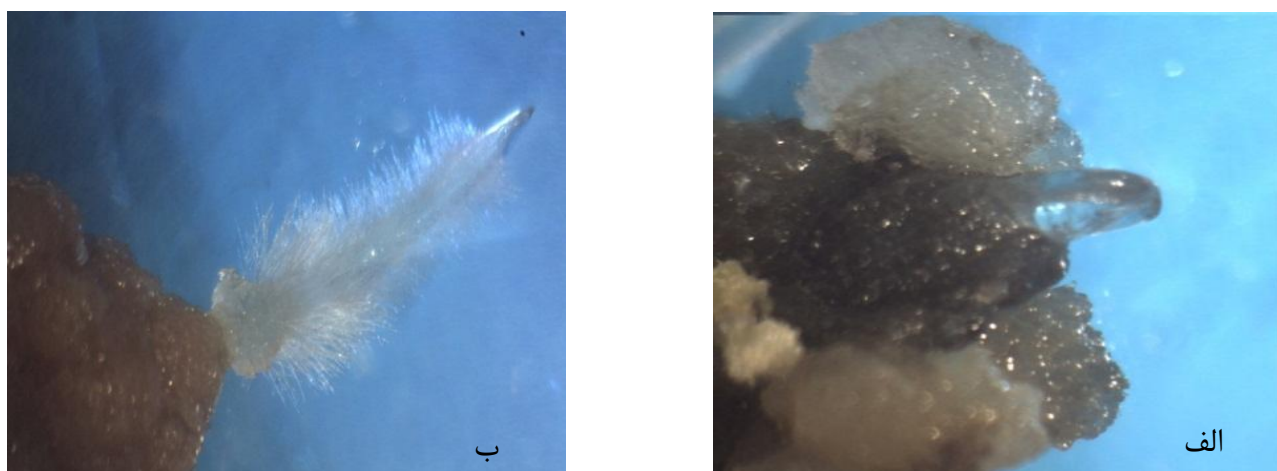
Different concentrations of growth regulators (the first number indicates the BAP level and the second indicates the 2,4-D level (mg/L))

شکل ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل BAP و 2,4-D بر درصد کالوس زایی در کشت بساک آفتابگردان. میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند (n = 3)؛ سه رقم برزگر، فرخ و قاسم، و دو سطح تلقیح قارچ ترکیب شده اند

Fig. 5: Mean comparison of the interaction effect of BAP and 2,4-D on callogenesis percentage in sunflower anther culture. Means with at least one common letter are not significantly different based on Duncan's test at 5% probability level. (n = 3; data pooled over three cultivars and two fungal inoculation levels)



شکل ۶: مقایسه میانگین درصد باززایی شاخساره از کالوس‌های حاصل از کشت بساک آفتابگردان در سه محیط اندام‌زایی مختلف. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.
Fig. 6: Mean comparison of shoot regeneration percentage from sunflower anther-derived calli on three different organogenesis media. Means with at least one common letter are not significantly different based on Duncan's test at 5% probability level



شکل ۷: مراحل اندام‌زایی از کشت بساک آفتابگردان: (الف) آغاز ظهور شاخساره از کالوس، (ب) رشد ریشه پس از یک هفته در محیط باززایی (MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA)

Fig. 7: Organogenesis stages from sunflower anther culture: (a) initiation of shoot emergence from callus, (b) regenerated shoots one week after transfer to regeneration medium (MS containing BAP 2 mgL⁻¹ and NAA 1 mgL⁻¹).

نتیجه‌گیری

۶۱ درصد باززایی است؛ همچنین اگرچه تلقیح گیاهان مادری با قارچ *S. indica* به‌تنهایی کالوس‌زایی را افزایش نداد، اثر متقابل آن با تنظیم‌کننده‌های رشد موجب بهبود معنی‌دار کیفیت کالوس گردید. ارقام مورد مطالعه (برزگر، فرخ و قاسم) نیز پاسخ مشابهی به کشت بساک نشان دادند و بنابراین همگی برای برنامه‌های دابل‌هاپلوئیدی مناسب هستند. با توجه به این نتایج، استفاده از گیاهان مادری تلقیح‌شده با *S. indica* در

این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیب هورمونی BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۵ درصد) را در کشت بساک آفتابگردان به همراه دارد و بهترین محیط کشت برای اندام‌زایی از کالوس‌های بساک، محیط کشت MS حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) با

ترکیب با محیط کشت بهینه (۱ میلی گرم در لیتر) BAP (۱ میلی گرم در لیتر) + 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) + NAA (۱ میلی گرم در لیتر) برای القا و BAP (۲ میلی گرم در لیتر) برای باززایی می تواند به عنوان یک پروتکل کارآمد برای تولید کالوس های با کیفیت و باززایی گیاهان هاپلوئید در آفتابگردان توصیه شود.

References

- Ahmadi, K., Gholizadeh, H. A., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Fazli-Estabragh, M., Hosseinpour, R., Kazemian, A. and Rafiei, M. 2016. Agricultural Statistics of the Crop Year 2015-2016. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran. (in Persian)
- Badigannavar, A. M. and Kuruvnashetti, M. S. 1996. Callus induction and shoot bud formation from cultured anthers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). HELIA, 19(25): 39-46.
- Bagde, U. S., Prasad, R. and Varma, A. 2011. Influence of culture filtrate of *Piriformospora indica* on growth and yield of seed oil in *Helianthus annuus*. Symbiosis, 53(2): 83-88.
- Blinkov, A. O., Varlamova, N. V., Kurenina, L. V. and Khaliluev, M. R. 2022. The production of *Helianthus* haploids: A review of its current status and future prospects. Plants, 11(21): 2919. <https://doi.org/10.3390/plants11212919>
- CABRI. 1998. Evaluation of growth colour and morphological characters of callus cultures. Laboratory Procedures for Plant Cell Lines, Reference No. PC/1998/3/1.1.
- Cantabella, D., Dolcet-Sanjuan, R. and Teixidó, N. 2022. Using plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) to improve plant development under *in vitro* culture conditions. Planta, 255: 117.
- Elkonin, L. A., et al. 1997. Evaluation of 41 elite and exotic inbred Sorghum genotypes for high quality callus production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48: 71-75.
- FAO. 2023. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2023*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Feng, X., et al. 2023. Irradiated pollen-induced parthenogenesis for doubled haploid production in sunflowers (*Helianthus* spp.). Plants, 12: 2430.
- Ferrie, A. M. R. and Caswell, K. L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104(3): 301-309.
- Germana, M. A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104(3): 283-300.
- Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F. S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Ammer, C. and Salekdeh, G. H. (2013). Proteome analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves in response to *Piriformospora indica*. Journal of Plant Physiology, 170(1): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.014>
- Gill, S. S., et al. 2022. *Serendipita indica* – A review from agricultural point of view. Plants, 11(24): 3417.
- Gorji, A. H. 2015. Regeneration from anther culture in kenaf. Scientific-Research Journal of Agricultural Sciences, 12(4): 407-412. (in Persian)
- Gurel, A., Nichterlein, K. and Friedt, W. 1991. Shoot regeneration from anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and some interspecific hybrids as affected by genotype and culture procedure. Plant Breeding, 106(1): 68-76.
- Jocic, S., Vasic, D. and Skoric, D. 2000. Anther culture of sunflower cultivars. In: Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, June 12-15, Toulouse, France.
- Mabuza, L. M., Mchunu, N. P., Crampton, B. G. and Swanevelder, D. Z. H. 2023. Accelerated breeding for *Helianthus annuus* (sunflower) through doubled haploidy: An insight on past and future prospects in the era of genome editing. Plants, 12(3): 485.
- Miladinovic, D., Kovacevic, B., Jocic, S., Merovski, I., Dimitrijevic, A., Cvejic, S. and Balalic, I. 2016. The effect of sowing date and density on callus induction and shoot regeneration from sunflower anthers. In: Proceedings of the 19th International Sunflower Conference, pp. 524-529, Edirne, Turkey.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Norouzi, N. 2016. *Effect of different concentrations of Piriformospora indica extract on silymarin production under in vitro conditions*. MSc Thesis, University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Khuzestan, Iran. (in Persian)
- Pasternak, T. and Steinmacher, D. 2024. Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro. Plants, 13(3): 327. <https://doi.org/10.3390/plants13030327>
- Qu, P., Zhang, Z., Li, R., Zhang, Y. and Cheng, C. 2025. Insights into the rooting and growth-promoting effects of endophytic fungus *Serendipita indica* in blueberry (*Vaccinium corymbosum*). Journal of Plant Growth Regulation, 44: 879-893.
- Sabeti, F., Faraji, A. and Mousakhani, A. 2014. Effect of agronomic management on sunflower yield in western Guilan province. Iranian Journal of Oilseed Plants, 3(2): 45-58. (in Persian)
- Saensee, K., Machikowa, T., Kaya, Y. and Muangsang, N. 2018. Relationship between floret size and anther culture response in an ornamental sunflower. Asia Pacific Journal of Science and Technology, 23(2).
- Saisintong, S., Schmid, J. E., Stamp, P. and Buter, B. 1996. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). Theoretical and Applied Genetics, 92(8): 1017-1023.

- Saji, K. V. and Sujatha, M. 1998. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 103(1): 1-7.
- Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P. and Pawlowski, K. 2007. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum*, 131(4): 581-589.
- Soumare, A., Diédhiou, A. G., Arora, N. K., Al-Ani, L. K. T., Ngom, M., Fall, S., ... and Sy, M. O. 2021. Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Frontiers in Microbiology*, 12: 649878.
- Thengane, S. R., Joshi, M. S., Khuspe, S. S. and Mascarenhas, A. F. 1994. Anther culture in *Helianthus annuus* L.: Influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 13(3-4): 222-226. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00239896>
- Touraev, A., Forster, B. P. and Jain, S. M. (eds.) 2009. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer.
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A. and Oelmüller, R. 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. *Agricultural Research*, 1(2): 117-131.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Nirmal, S., Britta, B. T. and Philipp, F. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2741-2744.
- Vijaya, P., Sassikumar, K. D., Sudhagar, R. and Gopalan, A. 2003. Androgenic response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes in different culture environments. *Helia*, 26(38): 39-50.
- Voronova, O. 2016. Callus formation and plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* tissue culture. In: *Research for Rural Development 2016*, Annual 22nd International Scientific Conference Proceedings, Vol. 1, pp. 194-199, Jelgava, Latvia.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38): 13386-13391.
- Wen, F. S., Sorensen, E. L., Barnett, F. L. and Liang, G. H. 1991. Callus induction and plant regeneration from anther and inflorescence culture of *Sorghum*. *Euphytica*, 52(3): 177-181.
- Yin, L., Cheng, J., Liu, Y., Mu, X. and Zhang, J. 2025. Promoting effects of *Piriformospora indica* on plant growth and development of tissue-cultured *Cerasus humilis* seedlings. *Horticulturae*, 11(2): 186.
- Zapata, F. J. 1984. Tissue culture and its application in rice improvement. In: *Proceedings of the ASEAN-ECC Seminar on Biotechnology*, pp. 113-114, Singapore