نقش مایکوریزا درتوسعه
سیستم های ریز ازدیادی وکاربردهای بالقوه آن

تهیه و تنظیم: رامین رستمی

خلاصه :

در سالهای گذشته کاربرد گسترده تکنیک های ریز ازدیادی ابزار پیشنهادی مهمی برای تکثیر سریع بسیاری از واریته های گیاهی تجاری و گونه های درختان جنگلی بوده است. هر چند این تکنولوژی موفقیت هایی بهمراه داشته ، لیکن درصد پائین زنده ماندن و رشد ضعیف گیاهچه در طی مرحله انتقال به مزرعه، مهمترین عاملی است که کاربرد آن را در تولید تجاری گیاه با مشکل مواجه می نماید . تلقیح قارچ های مایکوریزا (AMF) با ریشه گیاهچه های ریز ازدیادی شده ، نقش مهمی در حفظ بقای آنها بعد از انتقال به شرایط مزرعه دارد.در این مقاله ، در مورد اثرات چند گانه همزیستی مایکوریزایی(AM) در استقرار گیاهچه ها ، روشها یا تکنیک های مختلف مایکوریزایی و تعلق اجباری به استفاده ار این روشها نیز بحث شده است .

۱- مقدمه :

کشت بافت یکی از مهمترین کاربردهای مدرن بیوتکنولوزی در باغبانی می باشد تکنیکهای ریزازدیادی سنتی اجازه تولید سریع باکیفیت بالا و عاری از بیماری مواد گیاهی یکنواخت را در دوره نسبتا کوتاهی از زمان می دهد [41] این روشها فوائد مشخص زیادی را ارائه می کنند که با روشهای ازدیاد مرسوم امکان پذیر نمی باشد [44]. کشت بافت ، به گیاهان رشد یافته روی بسترهای کشت غنی ازعناصر غذایی وبدور از آلودگی میکروبی اشاره دارد که منجر به تولید گیاهچه های فاقد همزیستی مسالمت آمیز می شود هر چند تعدادی از این روشها در گذشته برا ی توسعه رشد وکاهش نسبتهای مرگ ومیر گیاهچه ها در طی نشاءاستفاده شده، ولی اغلب آنها جهت کنترل شرایط محیطی یا به عبارت دیگر ،افزایش شدت نور وتغییر غلظت CO_2 بکار گرفته می شدند . گزارش شده که تلقیح (biopriming) گیاهچه ها ی ریزازدیادی با AMF عملکرد و نمو گیاه را توسعه داده ونقش کلیدی در اطمینان از سلامت گیاهچه ها دارد [42]. علاوه براین ، دوره سازگاری گیاهچه های ریزازدیادی نیز با مصرف AM کوتاه می شود. نمونه های متعدد موجود،اثرات مفید AMF را در توسعه رشد گونه های درختان جنگلی، باغبانی وگل وگیاهان زینتی آزمایشگاهی نشان می دهد.

همزیستی AM یک همکاری مسالمت آمیز بین گیاهان و تنوع وسیعی از قارچهای شاخه Glomerymycota می باشد[48]. قارچ های AM اندوتروف، میکروارگانیزم های معمول در خاک هستند که ترکیب کاملی را در اکوسیستم های خشکی تشکیل می دهند که با سیستم ریشه بیش از ۸۰٪ گونه های گیاهان خشکی شامل بعضی از گیاهان مهم باغی همزیستی دارند . میزبانهای گیاهی AMF اغلب نهاندانگان (Angiosperms) وبعضا بازدانگان(Gymnosperms)، سرخس ها ، پنجه برگها وخزه ها می باشند[53]. معمولا درهمزیستی عناصر غذایی

مبادله میشود.AMF کربن را از گیاه دریافت کرده، در حالیکه میزان عرضه فسفر را در گیاه افزایش می دهد همزیستی AM فوائد متعددی شامل استحصال سایر عناصر معدنی مانند ازت ومقاومت به انواع تنش ها را برای گیاه به همراه دارد . در کل، همزیستی AM اهمیت زیادی برای بقای گیاهچه در اکوسیستم های کشاورزی و طبیعی دارد .

۲- موانع موفقیت تکنیک های ریز ازدیادی سنتی

هرچند ریزازدیادی یکی از روشهای معمول تکثیر گیاه در شرایط آزمایشگاهی می باشد گیاهچه های تولید شده در این شرایط، ظاهر خاص نامعمولی را پیدا می کنند که به شرایط محیطی کنترل شده (مانند رطوبت بالا وشدت نور کم) ظروف کشت مربوط است در نتیجه گیاهچه ها ممکن است نتوانند شوک احتمالی ناشی از تغییرات محیطی را درموقع انتقال از آزمایشگاه به شرایط محیط بیرون تحمل نمایند. برگهایی که در آزمایشگاه تشکیل می شوند ضعیف بوده وفاقد کوتیکول می باشند که باعث از دست دادن آب از طریق تعرق زیادو خشک شدن آنها در شرایط محیطی بیرون می شود . برگهای گیاهچه های ریز ازدیادی نازک بوده، مزوفیل برگ کمتر توسعه یافته، مقدار کمی کلروفیل داشته وسیستم کلروپلاست ضعیفی دارند [50]. روزنه ها در برگهایی که در شرایط آزمایشگاهی تشکیل می شوند غیرفعال می باشند که می تواند مقادیر بالایی از کلسیم وسدیم را ازسلولهای محافظ جای دهد. غلظت بالای سدیم در سلولهای محافظ در جابجایی یونهای پتاسیم اختلال ایجاد می کند فعالیت آنزیم فتوسنتزی(رابیسکو)، در چنین برگهایی بسیار کم می شود[64] تمامی این عوامل منجر به کاهش بازده فتوسنتزی برگهای گیاهچه ها در محیط آزاد می گردد.

تعریق شدید(hyperhydricity) از گیاهچه ها که به انحراف رشد آنهااز حالت طبیعی منتهی می شود، مشکل دیگری است که در استقرار موفق گیاهچه های تشکیلی در آزمایشگاه تاثیر دارد. رسوب غیر معمول لیگنین وسلولز در برگها وساقه ها، به کاهش فشار دیوار سلولی و افزایش جذب آب منتهی می گردد و با تورژسانس شدید باعث انحراف شدید رشد از حالت طبیعی می گردد [64,22] که ممکن است با تشکیل کم کوتیکول و ایجاد بافت آوندی ضعیف مرتبط باشد. در گیاهان تکثیر شده در آزمایشگاه که به صورت ضعیف رشد کرده اند، ایجاد مقاومت به بیماری، به کاهش مقدار فیتوآلکسین مربوط بوده وچنین گیاهچه هایی خلاء بیولوژیک قابل دسترسی را برای پاتوژنهای موجود فراهم می نماید [28]. سیستم ریشه ضعیف توام با عدم توسعه مناسب تارهای کشنده ریشه، استقرار گیاهچه ها را از طریق تغییر جذب عناصر غذایی در خاک به تاخیر می اندازد گیاهچه های ریز ازدیادی گاها اتصالات آوندی ضعیفی دارند که روی جذب آب از طریق ریشه و انتقال آن به بافت ساقه تاثیر می گذارند در موارد دیگر ، حتی اتصالات آوندی ناقص بین ریشه ها وساقه ها نیز گزارش شده است [64].

۳- اثرات مفید تلقیح AMF با گیاهچه های ریز ازدیادی

گیاهان در محیط طبیعی با هردو میکرو ارگانیسم های داخلی وخارجی کلنیزه می شوند بعضی از میکرو ارگانیسم ها، خصوصا باکتریها وقارچهای مفید ، می توانند عملکرد گیاه را در شرایط تنش اصلاح نموده ودر نتیجه ، باعث افزایش عملکرد گردند[16].

انتقال گیاهچه های کشت شده در آزمایشگاه به گلخانه ، یکی از مهمترین مراحل در سازگاری فیزیولوژیکی وساختمانی تولید آنها می باشد . این مرحله سازگاری با شروع وضعیت اتوتروفیکی گیاه وآغاز فرایندهای فیزیولوژیکی ضروری برای حیات توام می باشد در طی سازگاری، گیاهچه ها باید جذب آب ومواد معدنی را مانند نسبت فتوسنتز افزایش دهند . AMF می تواند گیاهان میزبان را از پاتوژنهای ریشه حمایت نموده واثر تغییرات زیاد درجه حرارت ، PH و تنش آبی را کاهش دهد[52]. اثر تلقیح موفق گیاهچه های ریز ازدیادی با AMF در شروع دوره سازگاری یا حتی در طی شرایط آزمایشگاهی ثابت شده است [20]. فوائد همزیستی مایکوریزایی گیاهچه های ریز ازدیادی به شرح زیر می باشد:

۳-۱: توسعه سیستم ریشه برتر (Superior)

آغشتگی (Biopriming) گیاهچه های ریزازدیادی با AMF به توسعه سیستم ریشه قوی وبرتر ازطریق افزایش شدت ریشه دهی وسطح تماس ریشه های موجود کمک می کند[40] کلنیزاسیون ریشه گیاه باAMF فونولوژی سیستم ریشه را از نظر ساختار، فضا و وضعیت کمی تغییر می دهد [37]. ریشه های کلنیزه AMF انشعابات زیادی دارند به عبارت دیگر، سیستم ریشه از ریشه های جانبی کوتاه ومنشعب تر با قطر بیشتر وطول ویژه کمتری تشکیل می شوند[2] دریک نتیجه گیری کلی، تلقیح مایکوریزایی ریشه دهی ورشد را تحریک می کند و بقائ قلمه ها وگیاهچه ها رادر محیط های غذایی در زمان انتقال آن بالا می برد آن همچنین ، به استقرار پوشش گیاهی در خاکهای معدنی ، خاکهای فرسایش یافته وبقایای صنعتی که استقرار پوشش گیاهی در آنها مشکل است، کمک می کند.

۳-۲: افزایش بازده فتوسنتزی

اکثر مطالعات نشان داده اند که همزیستی AMF به افزایش نسبت فتوسنتزی ، ذخیره وانتقال همزمان مواد فتوسنتزی کمک می کند [3]. همکاریهایAMF ، کارآیی فتوسنتزی را از طریق افزایش تغذیه فسفر در گیاهان بالا می برد مقدار فسفر گیاه نیز روی واکنشهای تثبیت یا جذب CO_2 در گیاه اثر دارد نسبت فتوسنتزی تاثیر پذیری زیادی از غلظت فسفر کلروپلاست داشته وکمبود فسفر مانع از فتوسنتز در گیاهان می شود . همچنین نشان داده شده که

غلظت کلروفیل در گیاهان تیمار شده با AMF از انواع غیر مایکوریزایی بیشتر است [33,24] از طرفی AMF های مختلف، اثرات متفاوتی روی فتوسنتز در تنش خشکی دارند. Burleigh وهمکاران(۲۰۰۲) نشان دادند که درمقایسه با گیاهان غیر مایکوریزایی ، یکی از گونه های جنس *Glomus* مایکوریزا ،کارآیی مصرف فسفر فتوسنتزی را در گیاه میزبان افزایش داد در حالیکه گونه های دیگر این بازده را کاهش دادند این مورد تاثیر متفاوت قارچ را روی فتوسنتز گیاه میزبان نشان می دهد.

۳-۳ : افزایش ظرفیت هدایت هیدرولیکی

تلقیح AMF گیاهچه های ریزازدیادی نقش مهمی در تبادل آب گیاهچه ها بازی می کند همزیستی مایکوریزایی هدایت هیدرولیکی ریشه را در پتانسیل پایین آب خاک بهبود می بخشد که تاثیر زیادی روی پتانسیل آب ، نسبت تعرق و مقاومت برگ دارد. مشخص شده که در ریشه های تلقیح شده با AMF ، یک ژن کد کننده ، تولید پروتئین (aquaporin) گیاه را تنظیم می کند که در واکوئل بسیار قطعه قطعه شده سلولهای حاوی آربوسکول جای گرفته است [45]. مایکوریزا جذب مواد غذایی وهدایت هیدرولیکی ریشه را در گیاهان تحت تنش آبی افزایش می دهد وآنها را قادر می سازد که بطور کاراتری از آب استفاده نمایند. گیاهان مایکوریزایی پتانسیل بالایی از آب را دارا می باشند [36]. مکانیزم اصلی سازگاری آن هنوز مشخص نیست اما ممکن است افزایش فعالیت هیدرولیکی ریشه ،تنظیم اسمزی ، انعطاف پذیری دیوار سلولی وهدایت اسمزی را شامل شود [4].

۳-٤ : افزایش جذب مواد غذایی

AMF ، اندازه گیاه میزبان را از طریق افزایش جذب مواد معدنی نظیر فسفر که در خاکهابصورت نسبتا غیر متحرک است، افزایش می دهد [56] AMF ، ریشه های داخلی را بشدت توسعه داده و با تشکیل گسترده میسلیوم برون ریشه ای، به گیاه در جهت اکتساب آب ومواد غذایی از خاک کمک می کند در گیاهان ، بویژه آنهایی که سیستم ریشه ضعیف و محدودی دارند ، اتصالات ریسه ای به صورت پلی بین ریشه ها و عناصر غذایی در خاک عمل کرده وجذب موثر عناصر غذایی تثبیت شده را بوسیله گیاهان میزبان تسهیل می کند [5]. بسته به گیاه میزبان، کلنیزاسیون AMF می تواند تغذیه فسفر وسایر عناصر معدنی مانند کلسیم ، مس، منگنز و روی را افزایش دهد . ساختارهای مایکوریزایی بصورت موثر فسفر را از غلظت های پایین خاک ، جایی که ریشه گیاهان معمولی ازبین می روند، جذب می کند [31]. AMF به افزایش جذب عناصر غذایی از طریق افزایش سطح تماس سیستم جذب ریشه های گیاهان وکاوش ریسه های برون ریشه ای قارچ در خاک در نقاطی دورتر از تارهای کشنده ریشه ومنطقه کمبود فسفر، کمک می کند. فسفر جذب شده ، سپس در ریسه خارجی به گرانولهای فسفات تبدیل شده وازآربوسکول جهت

انتقال به گیاه میزبان عبور می کند [5] مکانیزم مشابهی برای جذب پتاسیم، روی،آهن، مس، منیزیم و کلسیم بکار گرفته می شود.

۳-۵ : دفع تهاجم پاتوژنهای خاکزی مضر

AMF بعنوان عوامل کنترل بیولوژیک می توانند باعث کاهش ویا حتی ممانعت از خسارت پاتوژنهای خاکزی گردند [30] گیاهان کلنیزه شده با AMF نقش مهمی در حفاظت بیولژیک در مقابل پاتوژنهای مختلف مانند فوزاریوم ،فیتوفترا ،آگانومیستها ، ورتیسلیوم و نماتدها دارد که به ترتیب عامل پوسیدگی ریشه ، لکه ها ، پژمردگی ها و گالها می باشند [5,19,57].

مطالعات همزیستی AMF نشان می دهد که ژنهای متعدد و پروتئین خاصی در اثر واکنش های دفاعی گیاه تولید می شود که تغییر شکل کالوز ،تولید فیتوالکسین ها ، بتا ۱-۳ گلوکانازها ،کیتینازها و PR پاتوژنی بااین پروتئین ارتباط دارد [26,28,47]. Cordierو همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که پیش تلقیحی گوجه فرنگی با یک قارچ AM در رقابت با *Phytophthora parasitica* باعث خسارت کمتر به ریشه گردید در مطالعه دیگر از روش برچسب مصونیت طلایی (labeling technique immunogold) استفاده کردند تا نشان دهند که تعداد ریسه های پاتوژن در ریسه های مایکوریزایی وبافت ریشه مایکوریزایی آلوده به پاتوژن بسیار کاهش می یابد. گونه *G.mosseae* میکوریزا قادر است که از طریق جاگیری وایجاد مقاومت سیستمیک در ریشه های مایکوریزایی وغیر مایکو ریزایی در برابر *P. parasitica* حفاظت بیولژیکی ایجاد نماید.

۳-٦ : کاهش تنش های محیطی

مایکوریزایی شدن با AMF گیاهان را قادر به تحمل دامنه وسیعی از تنش های محیطی مانند خشکی ، فلزات سمی ، خاک شور ، پاتوژنهای ریشه ، درجه حرارت بالای خاک و PH نامناسب می نماید همزیستی مایکوریزایی خوب ممکن است بقای گیاهان را در مناطق آلوده از طریق اصلاح روابط آب ، اکتساب بهتر مواد غذایی ، مقاومت پاتوژنی ، بهبود ساختمان خاک ، تولید هورمون گیاهی و کمک به توده ای شدن خاک افزایش داده وبنابراین موفقیت انواع پالایش زیستی مانند کاهش جذب کاسیوم (Cs) را توسط گیاهان تیمار شده با AMF بهبود ببخشد [8]. همچنین می تواند در استقرار موثر پوشش گیاهی در خاکهای حاوی مواد رادیواکتیو بکار رفته ودر نهایت تاثیر خطرات محیطی را کاهش دهد . مایکو ریزایی شدن ممکن است برای تقلیل شرایط زیان آور خاک بکار رود [29]. آنها همچنین پتانسیل نمایش مناطق سمی وکارآیی روشهای برگرداندن به حالت اولیه را دارا می باشند [25].

بنابراین قارچ مایکوریزایی گیاهان را قادر می سازد که با تنش های غیر زنده از طریق کاهش کمبود مواد معدنی ، برطرف کردن اثرات زیان آور شوری ، اصلاح تحمل به خشکی ، افزایش تحمل به آلودگی و بهبود سازگاری گیاهچه

های ریز ازدیادی ضد عفونی شده مقابله کند و باتغییر شرایط محیطی در شرایط آزمایشگاه در مواجه با موارد تنش زا ، خود گیاه از عهده آن برآید [7].

۴ : روشهای مایکوریزایی نمودن

مایکوریزایی نمودن در آزمایشگاه، به تلقیح AMF با ریشه های گیاهچه های ریز ازدیادی که روی محیط آگار رشد یافته اند، اشاره دارد. با وجود اینکه روش مایکوریزایی نمودن آزمایشگاهی اهمیت زیادی در توسعه گیاهچه های ریز ازدیادی دارد، آلودگی ماده تلقیح ، رفتار میزبان در آزمایشگاه و طبیعت اجباری اندوفیت بخشی از موانع مهم در استقرار همزیستی میزبان مایکوریزایی در آزمایشگاه می باشند [43].

جهت رفع این مشکل ،روش دیگری که میتواند بکار رود تلقیح بیرون آزمایشگاه یا مایکوریزایی خود گیاه می باشد که نسبتا آسان ، طبیعی وعملی بوده و مشکلات فنی مایکوریزایی نمودن آزمایشگاهی را ندارد در تلقیح برون آزمایشگاهی ، اسپورهای AMF با گیاهچه های ریز ازدیادی بعد از انتقال به گلدان تلقیح می شوند [40,54,43].

با اینکه رابطه بین AMF و گیاهان میزبان معمولا غیر اختصاصی می باشند، ارتباط در هردو سطح فیزیولوژیکی وساختمانی تنظیم می شود اختصاصی نبودن باعث تنوع قابل توجهی در پاسخهای همزیستی می شود و با توجه به اختلافات فیزیولوژیکی موجود در گونه ها و نژادهای جغرافیایی ، تنوع زیستی اندوفیت های AMF زیاد است. اطلاعات کمی در مورد خصوصیات فیزیولژیکی وفعالیت این میکروارگانیسم های خاکی وجود دارد . دانش مربوط به روابط ویژه بین گیاهان و قارچ برای کاربرد موفق AMF در شرایط خاص مهم است . یکی از این ویژگیها ، طول زمان مشخص مایکوریزایی شدن می باشد که بستگی به نوع ماده تلقیح کاربردی دارد به عبارت دیگر وقتی ماده تلقیح به شکل ریسه بکار برده می شود ریشه ها باید در زمان کوتاهی (ساعت ها / روزها) با آن تماس داشته باشند در صورتیکه در تلقیح بااسپورهایAMF این مدت، سه هفته میباشد. نشان داده شده که خواب اسپور AMF بین گونه ها وجنس های مختلف متفاوت است [32]. بنابراین توصیه می شود که برای مایکوریزایی نمودن موثر اسپورهای جوانه زده AMF بکار برده شوند.

۵ - : روشهای تولید ماده تلقیح

توسعه روشهای مناسب برای تولید مقادیر زیادی ماده تلقیح خالص وفاقد پاتوژن با پتانسیل آلودگی بالا، نقطه شروع مربوط به استفاده از قارچ های AM بعنوان محرک های رشد گیاه می باشد مانع اصلی کاربرد AMF در سیستم ریزازدیادی ، فقدان روش های مناسب قابل اجرای آسان وقابل اطمینان برای تولید عمده ماده تلقیح است . برخی از روشهای معمول تولید عمده اسپورهای AMFدر زیر آمده است :

۵-۱ : کشت گلدانی

کشت گلدانی گسترده ترین روش مرسوم واستاندارد کشت های AMF در جهان می باشد در این روش اسپورهای AMF با ریشه های گیاه هدف در خاک استریل تلقیح می شوند هر چند بستر معمولی که برای کشت های گلدانی بکارمی روند مخلوطی از خاک وشن ضد عفونی شده می باشد برخی مواد معدنی غیر فعال شبیه پیت ، پرلیت و ورمی کولایت نیز می توانند بعنوان یک بستر مورد استفاده قرار گیرند [1] .گیاهان هدفی که معمولا برای کشت گلدانی به کار می روند عبارتند از؛ ذرت ، سورگوم , *Paspalum notatum* , *Ponicum maximum* , *Cenchrus ciliaris* , *T.subterraneum* , و پیاز *Allium cepa* [13].

ماده تلقیح تولید شده شامل مخلوطی از خاک ، اسپورها ، قطعات ریسه وقطعات ریشه آلوده که معمولا در عرض ۳-۴ ماه بدست می آید با وجودیکه کشت گلدانی بسیار معمول می باشد اما با اشکالات جدی همراه بوده که استفاده گسترده از آن را محدود می کند این اشکالات شامل : مقدار محدود وطبیعت ظاهری ماده تلقیح ، مشکلات انتقال ، احتمال سرایت آلودگی به گلدانهای مجاور آلودگی وفقدان ثبات ژنتیکی ماد ه تلقیح می باشد [1]. بااین وجود ، کشت های گلدانی می تواند برای انتخاب برخی از سویه های قارچی ازلحاظ وضعیت رشد خاص مناسب باشد.

۵-۱-۲ : پلیت (قرص)های خاکی غنی از ماده تلقیح

تکنیک تولید ماده تلقیح AMF در پلیت های خاکی که با ماده تلقیح AMF غنی شده اند توسط Hall & Kelson (۱۹۸۱) ارائه شده است پلیت ها (قرصها) با میانگین وزن خشک ۱/۵۵ گرم وابعاد ۱۲*۱۲*۶ میلی متر می باشند این قرصهای خشک می توانند با صمغ عربی به بذور چسبانده شده و یا براحتی با سایر کودها مخلوط ودر زمان کاشت بذر یا انتقال گیاهچه در زمین پاشیده شوند.

۵-۲ : مواد تلقیح بدون خاک

۵-۲-۱ : کشت های هوایی

باوجود اینکه کشت های گلدانی خاکی بیشترین روش کاربردی برای تولید ماده تلقیح AMF می باشند اخیرا در مطالعات ژنتیکی ، فیزیولژیکی ومایکوریزایی نمودن آزمایشگاهی تمایلی در جهت استفاده از کشت های بدون خاک برای تولید عمده اندامهای تکثیری پاک وخالص AMF می باشد [35]. در کشت هوایی اسپورهای زنده خالص و بادوام یک قارچ خاص جهت تلقیح گیاهان کشت شده بکار می روند و سپس به اتاقک هوایی کنترل شده ، جایی که

محلول غذایی به شکل مه برای آن تامین شده ، منتقل می شوند [50]. نبود ماده بستری فیزیکی ، اطمینانی در جهت رشد بیشتر ریشه ، کلنیزاسیون واسپورزایی بالای قارچ بوده و آن را به یک سیستم ایده آل برای تولید مقادیر کافی از پروپاگولهای AMF تبدیل می کند[1].

۵-۲-۲ : کشت اندام ریشه

موانع اصلی در مطالعه AMF وهمزیستی مایکوریزایی ، بیوتروف اجباری وطبیعت یا خصوصیت hypogeocus اندوفیت ها (AMF)می باشد . تلاشهای زیادی جهت رفع این موانع ازطریق کاربرد کشت اندام ریشه در آزمایشگاه بخاطر پتانسیل آن برای تحقیق وتولید ماده تلقیح صورت گرفته است. *Agrobacterium rhizogenes* یک باکتری بازدارنده وگرم منفی است که وضعیتی موسوم به ریشه های موئینه ایجاد می کند که منجر به تغییر تعادل هورمونی بافت گردیده و ریشه ها را نیرومند ساخته وبه آنها اجازه می دهد که در محیط های کشت مصنوعی سریعا رشد نمایند در ابتدای تهیه ریشه های موئینه ، اسپورها از مزرعه ویا از کشت گلدانی با روش الک کردن خیس وسرازیر کردن(wet sieving and decanting technique) جمع آوری می شوند [23]. معمولا دو نوع ماده تلقیح قارچی در ابتدای کشت های تک میزبانه بکار می روند که شامل اسپورهای برون ریشه ای یا قطعات ریشه مایکوریزایی و وزیکولهای جداسازی شده قارچ است. علاوه براین اسپورها ، قطعات ریشه و اسپورکاپ گونه *G.mosseae* نیز توسط Budi و همکاران (۱۹۹۹) در کشت های گلدانی بکار رفته است .

بعداز جداسازی قارچ از خاک، سطح اسپورها با محلول مناسب تماسی (surfactant) ضد عفونی می شوند. Tween۲۰و یک محلول دارای عامل اکسید کننده قوی ، کلرامین T ، برای ضد عفونی اسپورهای AMF بکار می روند سپس اسپورها با یک محلول آنتی بیوتیک استرپتومایسین – جنتامایسین شستشو می شوند تمامی مراحل از ابتدا ی جداسازی اسپورتا شستشو باید روی یخ انجام گیرد تاخواب بذر حفظ شود اسپورهای شستشو شده باید در دمای ۴ درجه سانتی گراد در آب مقطر یا آگار آب ، یا روی سولفات منیزیم آبدار یک دهم درصد که با صمغ gellan منجمد شده ، انبار گردند در غیر این صورت باید سریعا مصرف شوند [21].مرحله نهایی کشت آزمایشگاهی ، انتخاب محیط کشت مناسب برای ریشه میزبان و AMF می باشد. محیط های کشت غذایی باید به دقت انتخاب شوند تا اجازه رشد توام میزبان با قارچ را درطی مرحله استقرار کشت فراهم نماید چرا که ریشه به محیط کشت غنی از مواد غذایی برای رشد احتیاج داشته ولی AMF معمولا محیط کشت نسبتا ضعیفی را می پسندد [1]. معمولا محیط کشت سفید برای استقرار کشت توام ریشه میزبان و قارچ همزیست AMF بکار می رود.

۵-۲-۳ : روش (NFT) (Nutrient Film Technique)

NFT، تکنیک دیگر تولید ماده تلقیح بدون خاک است که توسط Cooper ارائه شده است [14] در این روش ، ریشه های گیاه با نوار نازکی از جریان سریع محلول غذایی تماس دارند بطور کلی mats ریشه تشکیل شده ودر بخش فوقانی محلول لایه نازکی، از رطوبت را در اطراف آن ایجاد می کند و گیاهچه های بذری پیش تلقیح شده در واحدهای NFT کشت می شوند ماده تلقیحی که توسط این روش تولید می شود برای تولید matهای جامد ریشه ها که به سهولت قابل برداشت می شوند ، ایده آل است و مقدارماده تلقیح درآن نسبت به گیاهان کشت شده در خاک و یا سایر محیط های کشت جامد ، تجمع بیشتر وحجم کمتری دارد[1,13].

۵-۲-٤ : ماده تلقیح پلیمری

کپسولی کردن یا قرار دادن AMF در مواد پلیمری بعنوان ابزار قوی تثبیت (immobilization) به فراوانی بکار برده می شود که شامل روکش کردن اسپور قارچها، وزیکولها و ریشه های مایکوریزایی بوده که ساختاری متخلخل را در اطراف مواد بیولژیکی تشکیل می دهند. جهت تهیه ماده تلقیح پلیمری ، AMF معمولا با یک ترکیبی که بعدا بصورت ژل در میآید مخلوط شده تا ماده متخلخلی که باندازه کافی خمیری شده را تشکیل دهد. نزدیک به ۱۳۵۰ ترکیب پلمیری ، مصنوعی ونیمه مصنوعی برای کپسولی کردن مایکوریزا وجود دارد[۵۹] اما دراکثراین روشها از ژلهای پلی ساکارید طبیعی حاوی kappa-carrageenan ، آگار و alginates را استفاده می نمایند . آلگینات کلسیم کاربردی ترین حامل انتخابی برای کپسولی نمودن میکوریزا می باشد . در برخی موارد اسپورهای AMF می توانند مستقیما در بذور مصنوعی معرفی شوند که قادر است در شرایط مناسب جوانه زده و به گیاهچه های کامل تبدیل شوند.

۵-۲-۵ : روش تلفیقی

در طبیعت ، هر گیاهی با تنوع وسیعی از میکرو ارگانیسم گیاهی وجانوری همکاری می نماید که نقش موثری در رشد وتوسعه گیاهان دارند .در زمان نشاء گیاهچه ، وقتی گیاهچه های ریز ازدیادی به مزرعه منتقل می شوند آنها نمی توانند همزیست های طبیعی خودشان را پیدا کنند این ممکن است بعلت استقرار ضعیف ویا درصد زنده ماندن پایین آنها باشد . بنابراین کاربرد صحیح AMF و ریزوبیومهای محرک رشد گیاه (PGPRs)می تواند روش موثر ومتفاوتی را برای استقرار مناسب ومطمئن گیاهچه های ریز ازدیادی آزمایشگاهی در شرایط مزرعه فراهم نماید . مطالعه Von(۱۹۸۸)، کاربرد باکتریهای کمک کننده مایکوریزا (MHBs) را در افزایش رشد گیاهان اثبات نمود براساس آن گزارش ، سویه های رایزوسفری *Bacillus mycoides* و *Pseudomonas fluorescens* تشکیل همزیستی را در گونه های گیاهی مختلف از طریق تحریک حساسیت ریشه ها ترغیب می کنند بعدا نقش این باکتریها (MHBs) در رشد وتوسعه گونه های مختلف گیاهی توسط سایر محققین گزارش شد[62,51].

اثرات متقابل مثبت بین میکروارگانیسم هایی مانند تثبیت کننده های ازت وحل کننده های فسفر نیز بعنوان دلیلی برای بهبود رشد برخی ازگونه های گیاهی کلنیزه شده با رایزوبیوم در استقرار گیاهچه هـای ریـز ازدیـادی AMF پیشنهاد شده است[56]. استفاده از رایزوبیوم های محرک رشد گیاه (PGPRs) شامل رایزوبیوم، فرانکیـا ، بـرادی رایزوبیوم در استقرار گیاهچه های ریزازدیادی شده بسیار معروف است گزارشهای متعددی وجود دارد که موفقیت این همزیستی ها را در بهبود رشد ودرصد بقای گیاهچه ها ریزازدیادی شده ثابـت کنـد[17.63] عـلاوه بـر اثـرات تحریک کنندگی رشد، برخی از این باکتریها نظیر فرانکیوم ها ، رایزوبیوم ها وبرادی رایزوبیـوم، ظرفیـت پایـداری وخصوصیات بهم چسبندگی خاک را اصلاح می کنند که اینهاهمانند AMF ، خاک را برای استقرار گیاهچه های ریزازدیادی مساعد می نماید[58] .

۶ : کاربرد مایکوریزا در سیستم های ریز ازدیادی

٦-١ :استقرار گیاهچه های ریز ازدیادی

گزارشهای متعددی در استفاده **از** AMF در اسـتقرار گیاهچـه هـای ریـز ازدیـای وجـود دارد[40,54,64] . اثرات مفید همزیستی AMF با ریشه های گیاهچه های ریزازدیـادی بیـانگر نمـو گیاهچـه هـایی بـا نسـبت هـای بـالای فتوسـنتز ،تعـرق، جـذب بهتـر آب ومـواد غـذایی وافـزایش تحمـل بـه تـنش مـی باشـد[6,30]. مطالعـه Subhan وهمکـاران(۱۹۹۸)، اثـرات مفیـد *G.fasciculatum* رادر کـاهش صـدمه نشـاء گیاهچـه هـای ریـز ازدیـادی شـده *Sesbania sesban* نشان داد آنهاهمکاری مـایکوریزایی خـوبی را تـوام بـا بهبـود رشـد گیاهچـه هـای *S.sesban* مشاهده نمودند که با افزایش فوق العاده پتانسیل تحمل گیاهچـه هـای ایـن گیـاه در برابـر صـدمه نشـا همـراه بـود. ایـن مطالعات ، همچنین ، نقش بالقوه همزیسـتی مـایکوریزایی را در کـاهش صـدمه انتقـال و اسـتقرار موفـق گیاهچـه هـای ریزازدیادی ثابت می کند .

٦-٢ : رشد ونمو گیاهچه های ریزازدیادی

مایکوریزایی شدن گیاهچه های ریزازدیادی باAMF می تواند رشد واندازه گونه های گیاهی ریزازدیـادی شـده را افزایش دهد تلقیح باAMF در گیاهان باغی می تواند با افزایش جذب فسفر،روی وسـایر عناصـر معـدنی [39]، بهبـود رشد ، بهبود توان انتقال (نشاء) گیاهچه ، کاهش تلفات وصدمات انتقـال [9]، کـاهش بیمـاری ، اصـلاح روابـط آب و گیاهان میزبان و افزایش تحمل به خشکی[18] توام گردد. بهبود رشد ونمـو گیاهچـه هـای ریـز ازدیـادی کلنیـزه شـده باAMF توسط تعدادی از محققین گزارش شده است [20,55].Estrada-Luna و همکاران (۲۰۰۰) درصـد رشـد بالای ساقه ، تولید برگ ، نسبتهای بالای فتوسنتزی و هدایت روزنه ای و اصلاح مقدار عناصر معدنی بافت برگ نظیـر فسفر ، منیزیم ، مس و مولیبدن را در گیاهچه های ریزازدیادی شده *Psidium guajava* که با AMF کلنیـزه شـده

بودند را نسبت به گیاهان تیمار نشده نشان دادند. در مطالعه دیگر، اثرات تحریکی AMF روی رشد گیاهچه های آزمایشگاهی علف هرز ضد سرطانی و درحال انقراض *Curculigo orchiodies* گزارش شده است [49].

٦-٣ : سیستم کشت اتوتروف

تشکیل سیستم اتوتروف یکی از موارد کاربرد AMF در گونه های گیاهی ریزازدیادی شده می باشد در سیستم کشت اتوتروفی ، درحالی که ساقه ها در فضای آزاد رشد می کنند ، ریشه های گیاهچه های ریزازدیادی با یک AMF در شرایط آزمایشگاه تلقیح می شوند این روش می تواند بطور مستمر جهت کشت AMF بکار گرفته شود و وسیله موثری برای مطالعه موارد مختلف همزیستی مایکوریزایی می باشد . اخیرا Voets و همکاران (٢٠٠٥)ازسیستم کشت اتوتروفی برای مایکوریزایی نمودن آزمایشگاهی گیاهچه های سیب زمینی استفاده کردند. این محققین در ایجاد سیستم کشت اتوتروفی گیاهچه های سیب زمینی موفق بودند و میسلیوم برون ریشه ای زیادی را همراه با اسپور های قارچی متعدد و کلنیزاسیون فراوان ریشه در شرایط آزمایشگاهی بدست آوردند اسپورهایAMF که در این شرایط تولید شدند، قادرند که گیاهچه های جدید را درشرایط مشابه آلوده کنند .

٦-٤ : کاهش تنش های غیر زنده

AMF نقش بارزی در کاهش تنش های غیر زنده مانند فلزات سمی ، شوری خاک وتنش خشکی دارد . کاربرد AMF می تواند به کاهش تنش فلزات سنگین روی گیاهچه ها تولید شده در آزمایشگاه که در معرض غلظت های بالایی از فلزات سنگین درشروع مرحله انتقال قرار گرفته اند ، کمک کند[12] . هرچند گزارشات کمی در مورد تحمل به فلزات سنگین گیاهچه های ریز ازدیادی شده ای که با AMF تلقیح شده اند ، وجود دارد . مطالعه انجام شده توسط Rufyikiri وهمکاران (٢٠٠٠) مقاومت بیشتر به سمیت آلومینیوم در گیاهچه های مایکوریزایی موز نسبت به گیاهچه های غیر مایکوریزایی که در شرایط جریان مداوم مواد غذایی در آزمایشگاه تولید شده بودند را اثبات کرد . این نتایج افزایش کارایی گونه *Glomus intraradices* را در افزایش جذب آب ومواد غذایی توسط گیاهان موز تحت تنش آلومینیوم نشان داد . درگیاهچه های تیمار شده با AMF ، غلظت AL در ریشه ها وساقه ها کاهش یافته و ظهور علائم برگی ناشی از سمیت آلومینیوم مانند ؛ زردی حاشیه برگها و لکه های نکروزه، را به تاخیر انداخت . بنابراین این مطالعه سندی برای پتانسیل بالقوه AMF در کاهش سمیت آلومینیوم گیاهچه های موز تولید شده در آزمایشگاه می باشد .

شوری خاک مشکل بارزی در کشاورزی می باشد چرا که، رشد گیاهان در شرایط تنش شوری محدود می شود بنابراین نیاز فوری جهت توسعه تولید ارقام متحمل به شوری از طریق تکنیک های مرسوم یا روشهای آزمایشگاهی احساس می شود که زمان کمتری را طلبیده وتنوع بالایی را ایجاد می نماید این میتواند ارزش بالایی را در کشاورزی

داشته باشد . اما نسبت بالای تلفات مشاهده شده در طی مرحله انتقال ارقام گیاهی حاصل از کشت بافت ، کاربرد گسترده این فن آوری را محدود می کند . تلقیح با AMF نه تنها گیاهان را از صدمه انتقال محافظت نموده ، بلکه کیفیت گیاهچه های تیمار شده را نیز بهبود می بخشد . Kashyap و Sharma (۲۰۰۶) افزایش درصد بقای گیاهچه های کشت بافتی *Morus alba* تلقیح شده با AMF وازتوباکتر را گزارش کردند . این مطالعه اثرات مفید AMF ازتوباکتر را روی استقرار گیاهچه های *M.alba* در طی مرحله سازگاری نشان داد .

٦-٥ : حفاظت گیاهان نادر و در حال انقراض

توسعه بی برنامه ، عملیات برداشت مخرب ، بهره برداری بیش از حد از تعدادی از گیاهان اقتصادی مهم منجر به انقراض گونه های متعددی در طبیعت می شود در نواحی تحت حراست منابع طبیعی ، حفاظت گیاهان در حیات وحش و کشت آنها خارج از زیستگاه طبیعی با اهمیت جلوه می کند. تکثیر آزمایشگاهی از طریق کشت بافت وسیله موثری برای تکثیر در سطح کلان وحفاظت گیاهان برای دسترسی به آنها در تمام سال برای استفاده بیشتر وانجام مطالعات می باشد . درصد تلفات بالا و صدمات انتقال گیاهچه ها بخشی از مشکلات اصلی می باشند که انتقال موفق مزرعه ای آنها را محدود می کنند[22,40]. با استفاده از فن آوری مایکوریزایی کردن ، حیات و استقرار گیاهچه های تولید شده در آزمایشگاه، در کشت فضای باز می تواند بهتر شود . مطالعه Panwarو Vyas(۲۰۰۲) مدرک مهمی مبنی بر اثر تلقیح AMF در استقرار مجدد و حفاظت درخت در حال انقراض *Morninga Concanensis* در صحرای Thar هند می باشد . روش تحقیق مشابهی نیز برای حفاظت گیاهان نادر و در حال انقراض ، بویژه گیاهان دارویی که از تکثیر آزمایشگاهی بدست می آیند ، بکار برده شود .

٦-٦ :کاربرد در فن آوری تراریخت

فن آوری تراریخت ، ابزار موثری در کشاورزی ، باغبانی و برنامه های اصلاح درختان جنگلی میباشد، بطوریکه، ژنهای مناسب از باکتری ها ، قارچها ، حیوانات و گیاهان به ژنوم گیاه هدف انتقال می یابند . گیاهان هدف تولید شده ، در شرایط آزمایشگاه وگلخانه تست می شوند ولی تنها تعداد محدودی از ارقام تراریخته شرایط ورود به مزرعه را پیدا می کنند . گیاهان تراریخته در شرایط آزمایشگاهی از طریق کشت بافت تولید می شوند . از نظر ژنتیکی گیاهان تراریخته باید به شرایط مزرعه انتقال یافته تا یک لاین تراریخته خاص تولید شود . لاینهای تراریخته تولید شده در آزمایشگاه را می توان در زمان نشاء کردن با AMF تلقیح نمود تادرصد تلفات این گیاهچه ها کاهش یابد . هرچند قابلیت اجرای این روش نیاز به آزمایش و تحقیق بیشتر دارد قبل از اینکه بصورت تجاری مورد استفاده قرار گیرد .

٦-٧ : مطالعه اثر متقابل میکروب – گیاه

فن آوری مایکوریزایی نمودن در امتزاج با تکنیک ریزازدیادی ، فرصت مناسبی را برای درک اثر متقابل بین گیاه میزبان و همزیست AMF ، کانالهای هدایت سیگنالی آنها و راز فلاونوئیدها فراهم می کند [42]. این همچنین ، به درک مکانیسم های حفاظت زیستی ، پالایش زیستی ، تولید مفرط ترکیبات ثانویه ، فعالیتهای تحریک کننده رشد آنها وتحمل به فلزات سنگین کمک می کند .

٦-٨ : تولید تجاری ترکیبات ثانویه

امروزه تقاضای زیادی برای داروهای گیاهی مانند Podophllotoxin ، Artemisinin و Taxol در صنعت داروسازی وجود دارد . تولید بیش از حد متابولیت های ثانویه به استقرار همزیستی AMF در گیاهچه های تولید شده در آزمایشگاه کمک نموده است . گزارشاتی در مورد افزایش تولید ترکیبات ثانویه ای شبیه Artemisinin با تلقیح AMF وجود دارد[33] . فن آوری مشابهی رامی توان برای تعدادی از گیاهان مهم روغنی ودارویی تولید شده در آزمایشگاه ، جهت توسعه تولید ترکیبات ثانویه برای مصارف تجاری بکار برد .

منابع مورد استفاده :

1. Abdul-Khaliq, Gupta, M.L., Alam, A., 2001. Biotechnological approaches for mass production of arbuscular mycorrhizal fungi: current scenario and future strategies. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Chamola, B.P. (Eds.), Techniques in Mycorrhizal Studies. Kluwer Academic Publishers,The Netherlands, pp. 299–312.
2. Atkinson, D., Berta, G., Hooker, J.E., 1994. Impact of mycorrhizal colonization on root architecture, root longevity and formation of growth regulators. In: Gianinazzi, S., Schu¨epp, H. (Eds.), Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland, pp. 89–99.
3. Auge, R., 2001. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11, 3–42.
4. Auge, R.M., Schekel, K.A.,Wample, R.L., 1987. Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimation. Plant Physiol. 70, 175–182.
5. Azcon-Aguilar, C., Barea, J.M., 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens: an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6, 457–464.

6. Azcon-Aguilar, C., Padilla, I.G., Encina, C.L., Azcon, R., Barea, J.M., 1996. Mycorrhizal inoculation (Glomus deserticola) enhances plant growth and changes root system morphology in microprapagaed Annona cherimola Mill. In: Novel Biotechnological Approaches to Plant Production: From Sterile Root to Mycorrhizosphere. Joint COST Meeting 8.21, Pisa, Italy, p. 21.

7. Barea, J.M., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C., 1993. Mycorrhiza and crops. In: Tommerup, I. (Ed.), Advances in Plant Pathology, vol. 9, Mycorrhiza: A Synthesis. Academic Press, London, pp. 167–189.

8. Berreck, M., Haselwandter, K., 2001. Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of caesium and other cations by plants. Mycorrhiza 10, 275–280.

9. Biermann, B., Linderman, R.G., 1983. Increased geranium growth using pretransplant inoculation with mycorrhizal fungus. J. Am. Horticult. Soc. 108, 972–976.

10. Budi, S.W., Blal, B., Gianinazzi, S., 1999. Surface-sterilization of Glomus mosseae sporocarps for studying endomycorrhization in vitro. Mycorrhiza 9, 65–68.

11. Burleigh, S.H., Cavangaro, T., Jakobsen, I., 2002. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. J. Exp. Bot. 53, 1593–1601.

12. Caldwell, M.M., Virginia, R.A., 1989. Root systems. In: Pearcy, R.W., Ehleringer, J.A., Mooney, H.A., Rundel, P.W. (Eds.), Plant Physiological Ecology-Field Methods and Instrumentation. Chapman and Hall, London, pp. 367–398.

13. Chellappan, P., Christy, S.A.A., Mahadevan, A., 2001. Multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi on roots. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Chamola, B.P. (Eds.), Techniques in Mycorrhizal Studies. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 285–297.

14. Cooper, A.J., 1975. Crop production in the re-circulating nutrient solutions. Sci. Horticult. 3, 251–258.

15. Cordier, C., Gianinnazi-Pearson, Gianinnazi, S., 1996. Colonization patterns of root tissues by Phytophthora nicotianae var. parasitica related to reduced disease in mycorrhizal tomato. Plant Soil 185, 223–232.

16. Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C.A., 1998.Water relations in Azospirilluminoculated wheat seedlings under osmotic stress. Can. J. Bot. 76, 238–244.

17. Davey, M.R., Webster, G., Manders, G., Ringrose, F.L., Power, J.B., Cocking, E.C., 1993. Effective nodulation of micropropagated shoots of the nonlegume Parasponia andersonii by Bradyrhizobium L. J. Exp. Bot. 44, 863–867.

18. Davies, J.F.T., Potter, J.R., Linderman, R.G., 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extra-radical hyphae development of pepper plant independent of plant size and nutrient content. J. Plant Physiol. 139, 289–294.

19. Elsen, A., Declerck, S., De Waele, D., 2001. Effects of Glomus intraradices on the reproduction of burrowing nematode (Radopholus similis) in dixenic culture. Mycorrhiza 11, 49–51.

20. Estrada-Luna, A.A., Davies Jr., F.T., Egilla, J.N., 2000. Mycorrhizal fungienhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (Psidium guajava L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. Mycorrhiza 10, 1–8.

21. Fortin, J.A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St.-Arnaud, M., Coughlan, A.P., Piche, Y., 2002. Arbuscular mycorrhiza on root organ cultures. Can. J. Bot. 80, 1–20.

22. Gaur, A., Adholeya, A., 1999. Mycorrhizal effects on the acclimatization, survival, growth and chlorophyll of micropropagated Syngonium and Dracaena inoculated at weaning and hardening stages. Mycorrhiza 9, 215–219.

23. Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal species extracted from soil by wet sieving and decanting method. Trans. Br. Mycol. Soc. 46, 235–244.

24. Giri, B., Kapoor, R., Mukerji, K.G., 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of Acacia auriculiformis. Biol. Fert. Soil 38, 170–175.

25. Gucwa-przepiora, E., Turnau, K., 2001. Arbuscular mycorrhiza and plant succession in the zinc smelter spoil heap in Katowice-Welnowiec. Acta Soc. Bot. Pol. 70 (2), 153–158.

26. Guillon, C., St-Arnould, M., Hamel, C., Jabaji-Hare, S.H., 2002. Differential and systemic alteration of defence-related gene transcript levels in mycorrhizal bean plants with Rhizoctonia solani. Can. J. Bot. 80, 305–315.

27. Hall, I.R., Kelson, A., 1981. An improved technique for the production of endomycorrhizal infested soil pellets. New Zealand J. Agric. Res. 24, 221–222.

28. Harrier, L.A.,Watson, C.A., 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or sustainable farming systems. Pest Manag. Sci. 60, 149–157.

29. Haselwandter, K., Bowen, G.D., 1996. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. Forest Ecol. Manag. 81, 1–17.

30. Hooker, J.E., Jaizme-Vega, M., Atkinson, D., 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi, S., Schuepp, H. (Eds.), Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. ALS, Birkhauser, Basel, pp. 191–200.

31. Jefferies, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.M., 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biol. Fert. Soils 37, 1–16.

32. Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A., Piche, Y., 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices: a critical cold-storage period. Mycorrhiza 12, 37–42.

33. Kapoor, R., Chaudhary, V., Bhatnagar, A.K., 2007. Effects of arbuscular mycorrhizal and phosphorus application on artemisinin concentration in Artemisia annua L. Mycorrhiza 17, 581–587.

34. Kashyap, S., Sharma, S., 2006. In vitro selection of salt tolerant Morus alba and its field performance with bioinoculants. Horticult. Sci. (Parague) 33 (2), 77–86.

35. Mohammad, A., Khan, A.G., Kuek, C., 2000. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 9, 337–339.

36. .Nelson, C.E., Safir, G.R., 1982. The water relations of well watered, mycorrhizal and non-mycorrhizal onion plants. J. Am. Soc. Hort. Sci. 107 (2), 271–274.

37. Norman, J.R., Atkinson, D., Hooker, J.E., 1996. Arbuscular mycorrhizal fungalinduced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen Phytophthora fragariae. Plant Soil 185, 191–198.

38. Panwar, J., Vyas, A., 2002. AM fungi: a biological approach towards conservation of endangered plants in Thar desert, India. Curr. Sci. 82 (5), 576–578.

39. Pearson, J.N., Jakobsen, I., 1993. Symbiotic exchange of carbon and phosphorus between cucumber and three arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 124, 481–488.

40. Puthur, J.S., Prasad, K.V.S.K., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated Leucaena leucocephala plantlets. Plant Cell Tissue Organ Cult. 53, 41–47.

41. Raaman, N., Patharajan, S., 2006. Integration of arbuscular mycorrhizal fungi with micropropagated plants. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C. (Eds.), Current Concepts in Botany. I.K. International Publishing House, India.

42. Rai, M., Acharya, D., Singh, A., Varma, A., 2001. Positive growth responses of the medicinal plants Spilanthes calva andWithania somnifera to inoculation by Piriformospora indica in a field trial. Mycorrhiza 11, 123–128.

43. Rai, M.K., 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. In vitro cell. Dev. Biol. Plant 37, 158–167.

44. Rajasekharan, P.E., Ganeshan, S., 2002. Conservation of medicinal plant biodiversity—an Indian perspective. J. Medi. Aroma. Plant Sci. 24, 132–147.

45. Roussel, H., Bruns, S., Gianinazzi-Pearson, V., Hahlbrock, K., Franken, P., 1997. Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. Plant Sci. 126, 203–210.

46. Rufyikiri, G., Declerck, S., Dufey, J.E., Delvaux, B., 2000. Arbuscular mycorrhizal functioning might alleviate Aluminium toxicity in banana plants. New Phytol. 148 (2), 343–352.

47. Ruiz-Lozano, J.M., Collados, C., Barea, J.M., Azcon, C., 2001. Cloning cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. J. Exp. Bot. 52, 2241–2242.

48. Schubler, A., 2002. Molecular phylogeny, taxonomy and evolution of Geosiphon pyriformis and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 244, 75–83.

49. Sharma, D., Kapoor, R., Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of plantlets of Curculigo orchioides Gaertn.: an endangered medicinal herb. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 395–400.

50. Sharmila, P., Puthur, J.T., Pardha Saradhi, P., 2000. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated plants. In: Mukerji, K.G. (Ed.), Mycorrhizal Biology. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 235–250.

51. Siddiqui, Z.A., Mahmood, I., 1998. Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of Meloidogyne javanica on tomato. Appl. Soil Ecol. 8, 77–84.

52. Siqueira, J.O., 1994. Micorrizas. In: Arau´jo, R.S., Hungaria, M. (Eds.), Microrganismos de importaˆncia agrı´cola. Embrapa-CNPAF, Embrapa-CNPSo. Embrapa-SPI, Brası´lia, pp. 151–194.

53. Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press,London. Souza, C.A.S., Siqueira, J.O., Oliveria, E., Carvalho, J.G., 1991. Development and nutrient levels of coffee seedlings inoculated with mycorrhizal fungi, effect of organic matter and single superphosphate. Pesqui. Agropecu. Bras. 26, 1989–2005.

54. Subhan, S., Sharmila, P., Saradhi, P., 1998. Glomus fasciculatum alleviates transplantation shock of micropropagated Sesbania sesban. Plant Cell Rep. 7, 268–272.

55. Taylor, J., Harrier, L.A., 2001. A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated Fragariaxananassa cv. Elvira (strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. Appl. Soil Ecol. 18, 205–215.

56. Turk, M.A., Assaf, T.A., Hameed, K.M., Al-Tawaha, 2006. Significance of mycorrhizae. World J. Agric. Sci. 2, 16–20.

57. Vaast, P.H., Caswell-Chen, E.P., Zasoski, R.J., 1998. Influences on a root-lesion nematode, Pratylenchus coffeae, and two arbuscular mycorrhizal fungi, Acaulospora mellea and Glomus clarum on coffee (Coffea arabica L.). Boil. Fert. Soils 26, 130–135.

58. Varma, A., Schuepp, H., 1995. Mycorrhization of the commercially important micropropagated plants. In: Stewart, G.G., Russell, I. (Eds.), Critical Reviews in Biotechnology. CRC Press, Canada, pp. 313–328.

59. Vassilev, N., Nikolaeva, I., Vassileva, M., 2005. Polymer based preparation of soil inoculants: Applications to arbuscular mycorrhizal fungi. Rev. Environ. Sci. Bio/Technol. 4, 235–243.

60. Voets, L., de Boulois, H.D., Renard, L., Strullu, D.G., Declerck, S., 2005. Development of an autotrophic culture system for the in vitro mycorrhization of potato plantlets. FEMS Microbiol. Lett. 248 (1), 111–118.

61. Von, A., 1998. State of commercial use of AMF-inoculum in Germany. In: Gianinazzi, S., Schuepp, H. (Eds.), Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil–Plant Systems. Report of 1997 Activities, Cost Action 821, Iceland, p. 153.

62. Vosatka, M., Jansa, J., Regver, M., Sramek, F., Malcova, R., 1999. Inoculation with mycorrhizal fungi—a feasible biotechnology for horticulture. Phyton. Annu. Rev. Bot. 39, 219–224.

63. Webster, G., Poulton, P.R., Cocking, E.C., Davey, M.R., 1995. The nodulation of micropropagated plants of Parasponia andersonii by tropical legume rhizobia. J. Exp. Biol. 46, 1131–1137.

64. Ziv, M., 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.), Micropropagation Technology and Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 45–69