مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۶، شماره ۱، سال ۱۳۸۹

بهبود ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون زرد با استفاده از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* و قارچ *Trichoderma harzianum*

Improvement of Rooting and Acclimatization of Tissue Cultured Plantlets of Olive (*Olea europaea* L. *cv.* Zard) by *Agrobacterium rhizogenes* and *Trichoderma harzianum*

آزاده ایران‌نژاد[۱]، علی وطن‌پورازغندی[۲]، حسن رهنما[۳]، نرجس جلیانی[۴] و رضا بزرگی‌پور[۵]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران.
۲ و ۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.
۴- محقق، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، کرج.
۵- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۲۳

چکیده

ایران‌نژاد، آ.، وطن‌پور ازغندی، ع.، رهنما، ح.، جلیانی، ن. و بزرگی‌پور، ر. ۱۳۸۹. بهبود ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون زرد با استفاده از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* و قارچ *Tricoderma harzianum*. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۶ (۱):** ۹۳ - ۸۵

این پژوهش به منظور دستیابی به حداکثر ریشه‌زایی در ریزقلمه‌های تولیدشده از مرحله شاخه‌افزایی توسط باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز *Agrobacterium rhizogenes*، در رقم زیتون زرد با هدف ریزازدیادی تجاری آن انجام شد. تاثیر باکتری بر درصد ریشه‌زایی، میزان کالوس‌دهی در قاعده ریزقلمه و شاخص کیفی رشد گیاهچه‌های تولیدی در زمان‌های ۲ و ۴ هفته پس از کشت ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تلقیح ریزقلمه‌ها با باکتری همراه با کاربرد یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در محیط کشت اثر بسیار معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی و کاهش میزان کالوس‌دهی داشت. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۷۰٪) مربوط به تیمار تلقیح شده با باکتری یک ماه پس از کشت بدست آمد در حالی که در تیمار شاهد درصد ریشه‌زایی ۳۰٪ بود. کمترین میزان کالوس‌دهی (۴۶/۷٪) در تیمار تلقیح شده با باکتری حاصل شد در حالی که در تیمار شاهد ۱۰۰٪ نمونه‌ها دارای کالوس بودند. القای ریشه‌ها در قاعده ریزقلمه‌ها بدون تولید کالوس یا با کالوس کمتر در مراحل انتقال به خاک و سازگاری به شرایط برون شیشه یک مزیت محسوب می‌شود. در این تحقیق تیمار تلقیح شده با باکتری ضمن القای درصد ریشه‌زایی بالاتر به میزان قابل توجهی کالوس کمتری در مقایسه با نمونه‌های شاهد تولید کردند. در مرحله سازگاری آلوده‌کردن ریشه‌های گیاهچه‌ها با قارچ *Trichoderma harzianum* موجب افزایش چشمگیری در تعداد ریشه در هر گیاهچه (۱۱/۸) و طول ریشه‌ها (۲۱۵/۳ میلیمتر) نسبت به تیمار شاهد با میانگین ۲/۷ ریشه و ۶۰ میلیمتر طول در چهار هفته پس از کاشت شد. بنابراین به دلیل اثر تحریک‌کنندگی این قارچ می‌تواند به عنوان میکروارگانیسم توسعه‌دهنده نظام ریشه‌ای گیاه در مراحل اولیه رشد و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون در شرایط برون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: زیتون، ریشه زایی، کالوس دهی، ریزقلمه و ریزازدیادی.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: a_iran2005@yahoo.com

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) یکی از مهم‌ترین درختان میوه نواحی مدیترانه است که از نظر اقتصادی برای تولید روغن به عنوان بهترین روغن خوراکی و نیز خواص دارویی عصاره طبیعی و خالص استخراج شده از زیتون و همچنین تهیه کنسرو از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

در سال‌های اخیر روش‌های سریع برای بدست آوردن ریشه‌های تراریخته بوسیله *Agrobacterium rhizogenes*، پاتوژن خاکزی که بواسطه انتقال پلاسمید Ri، باعث تراریختگی ریشه‌ها و ایجاد نظام تولید ریشه‌های مویین در طوقه و یا در روی اندام‌های هوایی می‌شود توسعه یافته است (Mireille *et al*., 2006). این باکتری یک میکروارگانیسم معمولی خاک است که قابلیت ورود به گیاه را از طریق زخم‌های ایجاد شده دارد و باعث تکثیر ریشه‌های ثانویه می‌شود. ساز و کار تشکیل ریشه‌های مویین بر پایه انتقال چندین ژن باکتریایی به ژنوم گیاه است (Ercan *et al*., 1999)، که شامل جایگاه‌های *rol A, B, C* بر روی پلاسمید Ri باکتری است، بیان این سه جایگاه ژنی در گیاهان تراریخته سندرم ریشه مویی را بوجود می‌آورد (Schmulling *et al*., 1988). اثر اکسینی مشاهده شده در آلودگی بوسیله *A. rhizogenes* ناشی از افزایش حساسیت اکسین سلولی و نه افزایش تولید اکسین است (Ercan *et al*., 1999).

در مرحله سازگاری، استفاده از قارچ *Trichoderma harzianum* به عنوان تحریک‌کننده و توسعه‌دهنده نظام ریشه‌ای گیاه می‌تواند، موثر باشد. گونه‌های این قارچ (*Trichoderma* spp.) از جمله قارچ‌های آزادزی هستند که معمولاً در خاک و منطقه رایزوسفر وجود دارند. این قارچ همزیست با ریشه گیاه بوده و به عنوان انگل برای قارچ‌های بیماری زا شناخته شده است. سویه‌های این قارچ روی ریشه گیاه به صورت طولانی مدت، تشکیل کلنی داده و به داخل اپیدرم و سلول‌های زیر اپیدرم نفوذ کرده و تولید ترکیبات متفاوتی می‌کنند که منجربه مقاومت سیستمیک و یا موضعی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شود. بروز مقاومت احتمالاً به دلیل تغییراتی است که قارچ در پروتئوم و متابولیسم گیاهی بوجود می‌آورد (Harman *et al*., 2004).

تحقیقات اخیر نشان داده است که تشکیل کلنی در ریشه‌های گیاه توسط تریکودرما باعث افزایش رشد ریشه‌ها و گسترش آنها، تولید محصول بیشتر، افزایش مقاومت در برابر تنش‌های غیرزنده و در دسترس قرار دادن مواد غذایی مورد نیاز گیاه می‌شود (Harman *et al*., 2004). افزایش رشد گیاه در گیاهانی چون سنبل، میخک، گل جعفری، پروانش، بادنجان، نخود، تربچه، تنباکو و دیگر محصولات به اثبات رسیده است (Margaret *et al*., 1994). کاربرد این قارچ در

خاک‌های عاری از پاتوژن نیز باعث افزایش رشد، ارتفاع، سطح برگ و وزن خشک گیاه شده است (Kleifeld & Chet, 1992).

زیتون یکی از محصولات مهم باغی کشور است که در برنامه تلاش برای رسیدن به خودکفایی روغن در کشور دارای اولویت خاصی می‌باشد. با توجه به برنامه‌های گسترش سطح زیر کشت زیتون در کشور، نیاز به تولید نهال سالم (عاری از ویروس) و اصیل از ارقام پر محصول بویژه ارقام روغنی، بیش از پیش احساس می‌شود. با وجودیکه اکثر ارقام زیتون از طریق قلمه، پاجوش و پیوند قابل تکثیر هستند ولی تهیه نهال‌های سالم زیتون بدون استفاده از فن‌آوری کشت بافت امکان‌پذیر نمی‌باشد. کشت بافت و ریزازدیادی تنها روش رویشی مطمئن برای تولید نهال‌های سالم و یکنواخت از پایه‌ها و ارقام برتر زیتون میباشد.

هدف از این تحقیق بهبود ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون زرد که یک رقم بومی و سخت ریشه‌زا است، با استفاده از باکتری *A. rhizogenes* و سازگاری بهتر آنها توسط قارچ *T. harzianum* بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از جوانه‌های جانبی حاصل از سرشاخه‌های جوان درختان زیتون رقم زرد از ایستگاه تحقیقات زیتون طارم (بهار ۱۳۸۶) و نیز نهال‌های تهیه شده از آنها که در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی نگهداری می‌شدند، استفاده شد. ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه در محیط کشت پایه OM (Rugini, 1986)، مستقر شدند. پس از ۳ هفته نوشاخه‌های رشد کرده به محیط تکثیر شاخساره که محتوی mg/l ۴ زآتین بود منتقل و ۲ یا ۳ بار دیگر در فواصل زمانی چهار هفته‌ای واکشت شدند.

پس از پرآوری نوشاخه‌ها و رشد طولی آنها، برای تلقیح با باکتری استوک مایع باکتری به شرح زیر تهیه و سپس نوشاخه‌های زیتون را در شرایط استریل زیر هود لامینار از انتها بریده و ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در محیط حاوی باکتری که آماده شده بود فرو برده و سپس داخل محیط ریشه‌زایی (OMr) واکشت شدند. نمونه‌ها به مدت ۳ روز در این محیط و شرایط تاریکی قرار داده شدند و در این مدت هر روز از نمونه‌ها بازدید به عمل آمد. به محض رویت اولین هاله در اطراف ریزنمونه‌ها، به محیط‌های OMr حاوی Cefatoxime (به منظور کنترل رشد باکتری) انتقال داده شدند. نمونه‌های واکشت شده از لحظه تلقیح با باکتری به منظور القای ریشه‌زایی به مدت ۷ روز در تاریکی قرار داده و بعد از آن به روشنایی انتقال داده شدند و چهار هفته بعد که ریشه‌ها ظاهر و کاملاً طویل شدند، گیاهچه‌ها به خاک انتقال داده شدند.

تهیه استوک مایع باکتری: برای این منظور از

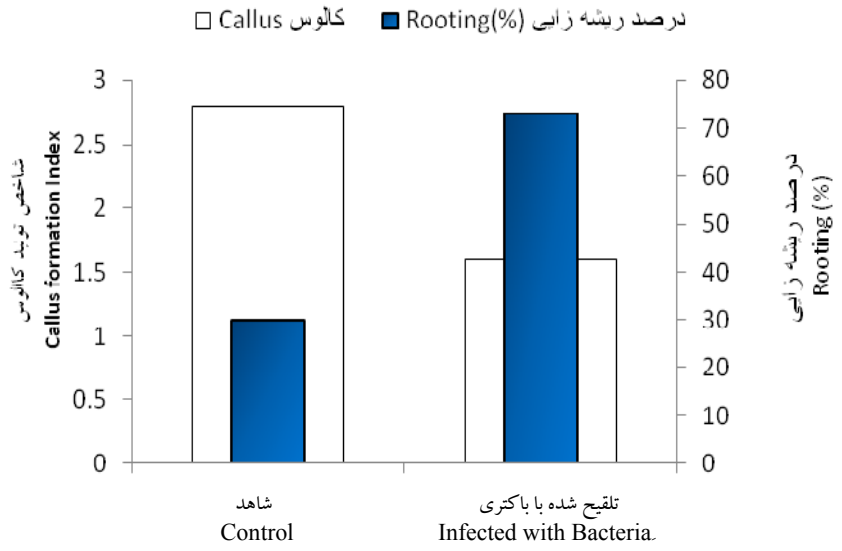
محیط کشت مایع LB آماده استفاده شد. برای تهیه این محیط به میزان ۲۰ g/l پودر LB را وزن و در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری هر کدام ۵ میلی‌لیتر پخش و محیط‌ها را اتوکلاو کرده، بعد از اتوکلاو و خنک شدن درب فالکون‌ها را در شرایط استریل و زیر هود باز کرده و ۱۰ µl از آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین، به اضافه ۵ µl از باکتری *A. rhizogenes* به محیط‌های کشت LB اضافه شدند و بعد محیط‌ها داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ °C و ۱۸۰-۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند. بعد از ۱۶ ساعت که باکتری رشد کرد، برای تلقیح ریزنمونه‌های زیتون مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله سازگاری نمونه‌های ریشه‌دار شده را از قسمت ریشه قبل از انتقال به خاک در محلول ۲/۵٪ وزنی حجمی قارچ *T. harzianum* به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده و بعد داخل مخلوط خاکی پیت و پرلیت (استریل شده) کاشته شدند. نمونه‌های تلقیح شده با قارچ و نمونه‌های شاهد به شرایط مشابه در گلخانه منتقل نموده، و یک روز در میان آبیاری شدند. بعد از یک ماه گیاهان از نظر طول ساقه، تعداد برگ، طول ریشه و تعداد ریشه در هر گیاه ارزیابی و با نمونه‌های شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند.

برای هر تیمار حداقل ۵ تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه در نظر گرفته شد. عمل واکشت با فواصل یک ماه یکبار انجام شد. کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند. مشاهدات انجام شده شامل شمارش تعداد نمونه ریشه‌دار شده، شاخص میزان تولید کالوس (۱= بدون تشکیل کالوس ۲= کم ۳= متوسط ۴= زیاد ۵= خیلی زیاد) و شاخص کیفیت رشد برای هر ریزنمونه بوده که پس از چهار هفته یادداشت‌برداری شدند. به دلیل کمی بودن داده‌ها، معمولاً در صورت نیاز با استفاده از تبدیل جذری داده‌ها $X=(x+0.05)^{1/2}$ نرمال شدند و سپس بررسی آماری داده‌های حاصل از آزمایشات در موارد مختلف با استفاده از برنامه آماری SAS انجام گرفت. همچنین به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) گروه‌بندی و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال $p<0.05$ انجام گرفت.

نتایج و بحث

میزان ریشه‌دهی در تیمار تلقیح شده با باکتری به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و مقدار کالوس تولید شده به مقدار قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۱). نتایج حاصل از مشاهدات عینی نشان‌دهنده اثر تحریک‌کنندگی بالای باکتری *A. rhizogenes* بر روی تشکیل ریشه در قاعده ریزقلمه‌های زیتون و همچنین تولید نسبتاً پایین کالوس در این ناحیه بود (شکل ۲). در بررسی که توسط مینگشان و همکاران (Mingshan *et al.*, 2003) انجام شد تلقیح ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، گیاهچه‌های سالم و



شکل ۱- مقایسه اثر تلقیح ریزقلمه‌های زیتون رقم زرد با اگروباکتریوم بر میزان کالوس‌دهی و درصد ریشه‌زایی، محیط کشت OMr، ۴ هفته پس از کشت

Fig. 1. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* inoculation on rooting percentage and callus formation index of olive (cv. Zard) micro cuttings 4 weeks after culture in OMr medium (1= Without callus, 2= Low, 3= Medium 4= High 5= Very high).

شاخساره‌های نابجای کاج با *A. rhizogenes* همراه با استفاده توام از IBA به میزان ۴/۴ میکرو مولار، ۷۵٪ ریشه‌زایی حاصل شد. تحقیقات گذشته از جمله بررسی‌های روجینی و همکاران (Rugini *et al.*, 1991) بر روی کیوی، لمبرت و تپفر (Lambert & Tepfer, 2002) روی قلمه‌های سیب، مکافی و همکاران (McAfee *et al.*, 1993) روی کاج و صنوبر و کارماین و مونتیسلی (Carmine & Monticelli, 1998) روی ریزنمونه‌های درختان میوه نیز موید تاثیر مثبت این باکتری در تولید ریشه و باززایی گیاهچه از ریزنمونه‌های مختلف گیاهان چوبی است. با این وجود نتایج پژوهش حاضر با نتایج پیوندی (Peyvandi, 2000) که تاثیر اکسین و اگروباکتریوم را بر روی ساقه‌های برگدار حاصل از کشت رویانهای زیتون رقم زرد مورد بررسی قرار داده بود، موافقت ندارد. وی گزارش کرد که ریشه‌های تولید شده از نظر ظاهری مشابه یکدیگر بودند و میزان ریشه‌زایی در ریزقلمه‌های آلوده شده با باکتری کمتر از قلمه‌های تیمار شده با اکسین بود. در حالی که در بررسی حاضر میزان کالوس‌دهی در ریزنمونه‌های آلوده شده کمتر و درصد ریشه‌زایی بیشتر از تیمار اکسین می‌باشد.

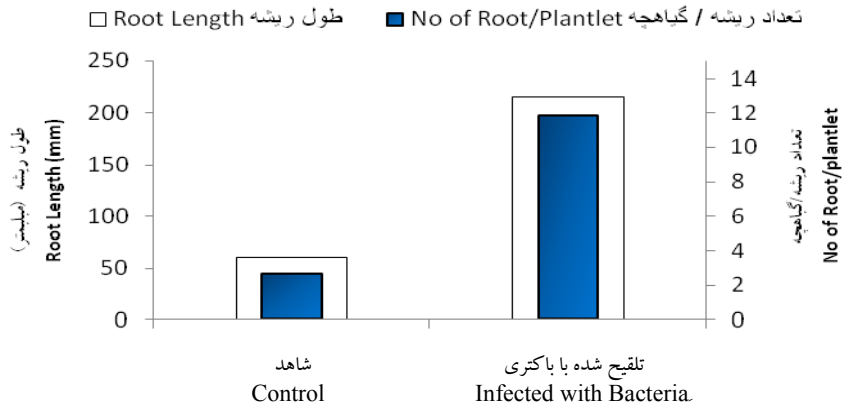
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کاربرد

شکل ۲. a. تاثیر باکتری *A. rhizogenes* بر ریشه‌دهی و میزان تولید کالوس در ریزنمونه‌های زیتون رقم زرد (سمت راست: شاهد و سمت چپ: استفاده از باکتری)، b. تاثیر قارچ تریکودرما در افزایش طول و تعداد ریشه فرعی در گیاهچه‌های کشت بافتی رقم زرد در مرحله سازگاری، یک ماه پس از انتقال به گلدان (سمت راست: تلقیح شده با قارچ، سمت چپ: شاهد) c. گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون رقم زرد تلقیح شده با قارچ در مرحله سازگاری در گلخانه یک ماه پس از انتقال به گلخانه

Fig. 2. a: Effect of *A. rhizogenes* on rooting and callus formation in olive (cv. Zard) micro cuttings (right: OMr = Control, left: OMr + Bacteria infected), b: Effect of *T. harzianum* on increasing root length & root number in micropropagated olive plantlet, one month after potting (Right: Infected with *Tricoderma*, Left: Control), c: Olive plantlets infected with *Trichoderma* in adaptation phase one month after potting.

قارچ تریکودرما بر گسترش نظام ریشه‌ای گیاه و افزایش رشد اندام‌های هوایی در مرحله سازگاری در شرایط برون شیشه، برای طول ساقه، تعداد برگ در هر گیاه و تعداد شاخه در هر گیاه معنی‌دار نبود ولی برای طول ریشه و تعداد ریشه در هر گیاه بسیار معنی‌دار بود (شکل ۲). قارچ تریکودرما تاثیر قابل توجهی بر روی نظام ریشه‌ای گیاهچه‌ها داشت. تعداد ریشه در هر گیاهچه در تیمار آلوده شده با قارچ (۱۱/۸۳)، نسبت به تیمار شاهد (۲/۶۶)، افزایش چشمگیری داشت. همچنین در حالی که در تیمار شاهد میانگین طول ریشه ۶۰ میلیمتر بود، در تیمار آلوده شده با قارچ این میزان به ۲۱۵/۲۸ میلیمتر افزایش یافت (شکل ۳)، که اختلاف قابل توجهی را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این بررسی نشان‌دهنده تاثیر مثبت قارچ بر گسترش نظام ریشه‌ای گیاهچه‌های کشت بافتی بود (شکل ۱ b و c).

گونه‌های تریکودرما باعث افزایش جذب و غلظت ترکیبات غذایی شامل مس، فسفر، آهن، منگنز و سدیم در ریشه‌های گیاه در کشت هیدروپونیک می‌شوند و این افزایش در جذب باعث پیشرفت فعالیت ساز و کارهای جذب فعال گیاه می‌شود. گونه‌های تریکودرما به صورت همزیست با گیاه زندگی می‌کنند و قادر به رشد، رقابت و بقا در خاک و سایر بوم نظامها



شکل ۳- اثر قارچ تریکودرما بر طول ریشه (میلیمتر) و تعداد ریشه / گیاهچه کشت بافتی زیتون رقم زرد در شرایط سازگاری، یک ماه پس از انتقال به گلدان

Fig. 3. The effect of *Tricoderma* on root length (mm) and number of roots /plantlet in acclimatization phase, one month after transferring to *in vivo* conditions

بوده و توانایی تشکیل کلنی روی ریشه‌های گیاهان را دارند و هنگامیکه در معرض ریشه‌های سالم قرار می‌گیرند، تعدادشان افزایش می‌یابد. تشکیل کلنی بر روی ریشه‌ها موجب رشد فزاینده ریشه و در نتیجه رشد کل گیاه و به موازات آن افزایش تولیدات گیاهی و افزایش بازدهی اندامهای تولید مثلی گیاه می‌شود. آنها همچنین به گیاه برای غلبه بر تنش‌های غیرزنده و بالابردن میزان جذب عناصر غذایی و استفاده از نیتروژن قابل جذب توسط ریشه گیاه کمک می‌کنند و این از طریق حل کردن عناصر غذایی در خاک انجام می‌شود. اگرچه هنوز ساز وکار ژنتیکی و مولکولی این فرایندها شناخته نشده است (Harman *et al*., 2004).

اثر قارچ تریکودرما در افزایش رشد در محصولات مختلف مثل نخودفرنگی، بادمجان، گوجه‌فرنگی، تربچه، کاهو و گیاهان زینتی مانند گل میمون، اطلسی، میخک و غیره قبلاً گزارش شده است (Margaret *et al.*, 1994). کلیفلد و چت (Kleifeld and Chet, 1992) نیز نشان دادند که کاربرد این قارچ در خاکهای عاری از پاتوژن باعث افزایش رشد گیاهچه‌ها، ارتفاع گیاه، افزایش سطح برگ و وزن خشک گیاه می‌شود. آزمایشات چاور و همکاران (Chaur *et al.*, 2002) روی چند محصول از خانواده خربزه (*Cucurbitacea*e) نشان داد که تیمار با تریکودرما باعث افزایش ارتفاع گیاهچه‌ها، ظهور ریشه، افزایش سطح برگ و افزایش غلظت کلروفیل (mg/cm^2 در سطح برگ) می‌شود. در ایران نیز پیغامی (Peyghami, 2002) علاوه بر نقش مفید این قارچ در کنترل بیماری‌های گندم، بر اثر افزاینده رشد گیاه با اصلاح خاک زراعی توسط تریکودرما در جوانه‌زنی و ریشه‌زایی گندم

تاکید کرده است. جلیانی و همکاران (Jaliani *et al.*, 2002) به وجود آثاری چون مایکوپارازیتیسم و رقابت با قارچ‌های بیماریزا و اثر افزایش رشد در گیاه سیب‌زمینی، و از همه مهمتر بی ضرر بودن آن برای انسان و محیط زیست اشاره کرده‌اند.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نیز نشان داد که استفاده از این قارچ در مرحله سازگاری می‌تواند در جلوگیری از آلودگی ریزنمونه‌ها به میکروارگانیسم‌های مضر در خاک که باعث پوسیدگی ریشه‌های گیاهان کشت بافتی می‌شوند بسیار موثر باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری‌های صمیمانه بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تقدیر و تشکر می‌شود.

References

Chaur, T., Lo, J., and Chien, Y. 2002. Screening strains of *Trichoderma* spp. for plant growth enhancement in Taiwan. Plant Pathology Bulletin 11: 215-220.

Carmine, D., and Monticelli, S. 1998. *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. EJB Electronic Journal of Biotechnology 1 (2): Available online at: http://www.ejb.org.

Ercan, A., and Taskin, M. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. Terkish Journal of Botany 23: 373-377.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, virulent plant symbionts. Nature reviews/Microbiology 2: 43-56.

Jaliani, N., Sharifi, K., and Rouhani, H. 2002. Investigation on control methods of potato stem canker and Black scurf. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress 2: 180-181.

Kleifeld, O., and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. Plant and Soil 144: 267-272.

Lambert, C., and Tepfer, D. 1992. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. Theoritical and Applied Genetics 85: 105-109.

Margaret, A. O., James, M., Lynch, N., and John, M. W. 1994. Potential of

Trichoderma spp. As consistent plant growth stimulators. Biological Fertilizers and Soils 17: 85-90.

McAfee, B. J., White, E. E., Pelcher, L. E., and Lapp, M. S. 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (Larix) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 53-62.

Mingshan, L., and Leung, D. W. M. 2003. Root induction in radiate pine using *Agrobacterium rhizogenes*. Electronic Journal of Biotechnology 6 (3): Available online at: http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/9.

Mireille, C., Aurelien, B., Juan, Z., Christopher, G. T., Oliver, Y., and Barker, D. G. 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. *Medicago truncatula* Handbook. Available online at: http://www.noble.org/Medicago Handbook.

Ousley, M., Lynch J., and Whipps, J. 1994. Potential of *Tricoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. Biological Fertil Soils 17: 85-90.

Peyghami, E. 2002. Increased growth of wheat and biocontrol of *Pythium ultimum* Trow with strains of *Tricoderma harzianum* Rifai. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 9 (1): 31-38.

Peyvandi, M. 2000. Embryogenesis and transgenic plantlet in some olive cultivars due to quantification and qualification of lipids. Ph.D. Thesis, Sciences and Research Unit, Islamic Azad University,Tehran, Iran. 262 pp.

Rugini, E., Pellegrineschi, A., Mencuccini, M., and Mariotti, D. 1991. Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. Plant Cell Reports 10: 291-295.

Rugini, E. 1986. Olive (*Olea europaea* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Bajaj Y. P. S. (ed.). Vol. 1: Trees I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp. 253-267.

Schmulling, T., Schell, J., and Spena, A. 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. The EMBO Journal 7 (9): 2621-2629.