

بررسی تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتابسیم بر تکوین اندام‌های رویشی و زایشی گیاه^۱ L.

Arabidopsis thaliana

الهام بصیری^۲، سایه جعفری مرندی^{۳*}، صدیقه اربابیان^۴، احمد مجید^۵، محمد علی ملبوبی^۶

چکیده

ثبتیت فسفات توسط کودهای شیمیایی علاوه بر پر هزینه بودن، خطرات زیست محیطی را در بردارد. امروزه کود زیستی فسفاته بارور ۲ حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات باعث تجزیه ترکیبات فسفر نامحلول و قابل جذب برای گیاه است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کودهای زیستی بارور ۲ (*Pantoea agglomerans* (strain P5) و *Pseudomonas putida* (strain P13)) (تا پایان دوره رشد ۰, ۱, ۲ mM, ۵ mM) (فقط یکبار در ابتدای دوره رشد) و فسفات پتابسیم درسه غلاظت (۰, ۱, ۲ mM, ۵ mM) (تا پایان دوره رشد گیاهان، هفتادی یکبار همراه با آبیاری) بر برخی ویژگی‌های تکوینی گیاه *Arabidopsis thaliana* در شرایط گلخانه‌ای، ۱۵ ساعت روشناختی، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، شدت نور ۶۰۰۰ لوکس در قالب طرح تصادفی انجام شد. بعد از مراحل سلول - بافت شناختی، لامها با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. نتایج، کاهش معنی‌دار تراکم آوند چوب در ساقه گیاهان تحت تیمار با فسفات پتابسیم ۵ و ۱.۲ mM را در مقایسه با دو تیمار دیگر نشان داد. هم چنین فسفات پتابسیم ۵ mM سبب افزایش لایه‌های تونیکا و ضخامت دیواره مخصوص تراویدها شد. افزایش سلولی پریموردیم تخمکی، پیش رویان و آویزه در گیاهان تیمار با کود زیستی و فسفات ۵ mM مشاهده شد. تیمار با کود زیستی، بیشترین میانگین تعداد دانه‌های تولید شده را نشان داد. کاربرد کود زیستی بارور ۲ در این آزمایش با اثراتی مشابه با فسفات

۱. قسمتی از رساله دکتری از دانشگاه تهران شمال. اساتید: سایه جعفری مرندی، صدیقه اربابیان، احمد مجید، علی محمد ملبوبی
۲. دانشجوی دوره دکترای دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران
۳. استادیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران *نویسنده مسئول s_jafari@iau-tnb.ac.ir
۴. دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران
۵. استاد دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران
۶. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

پتاسیم، عملکرد کمی و کیفی آراییدوپسیس را افزایش داد. کود زیستی می‌تواند به عنوان یک جایگزین مطمئن و موثر برای افزایش بهره‌وری خاک و رشد گیاه در کشاورزی پایدار و به حداقل رساندن آلودگی محیطی باشد.

واژه‌های کلیدی: پرموردیم تخمکی، پیش‌رویان، ریزبacterی، ساختار تشریحی، مریستم رویشی

مقدمه

فسفر یکی از عناصر اصلی و پرمصرف برای رشد و نمو گیاهی از جمله تقسیم سلولی، رشد بافت جدید، و ترکیبی در ساختار اسید نوکلئیک‌هاست که در ساخت پژوتئین‌ها نقش دارد. هم‌چنین در کل گیاه متابولیسم کربوهیدرات‌ها را تحریک کرده و یکی از Afzal *et al.*, 2005; Ciereszko *et al.*, 2017; Maathuis, 2009; (ATP, CTP, GTP, UTP) است (Malhotra *et al.*, 2018; Mehra *et al.*, 2019; Péret *et al.*, 2011; Vessey, 2003

. گیاهان در زمان فقر فسفات تغییراتی در رفتارهای فیزیولوژیکی و پاسخ‌های ریخت‌شناسی خود ایفا نموده، که جذب فسفات را افزایش می‌دهند (از طریق استراتژی‌های همزیستی، تغییرات در معماری ریشه، ترشح اسیدهای آلی و اسیدفسفاتازها توسط ریشه (Amtmann *et al.*, 2005; Betencourt *et al.*, 2012; Hakeem *et al.*, 2014; Latati *et al.*, 2016; Péret *et al.*, 2011; Scheible ها 2005) & Rojas-Triana, 2015; Zhang *et al.*, 2014) و عامل دیگر در جذب فسفات توسط ریشه، تعديل فعالیت میکروبی در مجاورت plant growth (Morgan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009) این میکرورگانیسم‌ها تحت عنوان (Rizosfer است (Sukriti *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 2017 Mishra & Sundari, 2013; PGPM (promoting microbes

. ریزوبacterی‌های محرک رشد (PGPRs) به طور مستقیم از مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با حل شدن و جذب مواد مغذی (به عنوان مثال P، K، Zn و غیره)، تثبیت بیولوژیکی N2 و تولید فیتوهورمون و مولکول‌های سیدروفور (Fankem et al., 2006; Panhwar *et al.*, 2011) و نیز به طور غیرمستقیم با تعديل مکانیسم‌های دفاعی گیاهان و سیگنال‌های القاکننده ایمنی گیاهی در برابر حملات فیتوپاتوژن‌ها رشد گیاه را تحریک می‌کنند (Kumar *et al.*, 2018). از مهمترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توان به پاسیلوس (*Bacillus*) و سودوموناس (*Pseudomonas*) اشاره کرد (Tilak *et al.*, 2005)

محصولات کشاورزی با بازدهی بالا نیاز به استفاده مداوم کودهای شیمیایی در سیستم‌های زراعی دارد (Zahid, 2015). با این حال، قیمت و در دسترس بودن این مواد یک عامل محدودکننده تولید محصولات به ویژه در کشورهای در حال توسعه در سراسر جهان است (Zahid, 2015). استفاده مداوم از کودها ممکن است اثرات منفی بر سیستم اکوسیستم کشاورزی مانند شستشو، آلودگی منابع آب، انتشار گازها به اتمسفر داشته باشند، در نتیجه صدمات جبران‌ناپذیری به کل اکوسیستم و محیط زیست وارد می‌کنند (Azospirillum, Bacillus, Pseudomonas PGPM شامل Qureshi *et al.*, 2012). نتایج موفقیت آمیزی از کاربرد گونه‌های Enterobacteria (Abbasi *et al.*, 2011; Almaghrabi *et al.*, 2013; El-Sayed *et al.*, 2014; Iqbal Hussain *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2014) است (Yadav *et al.*, 2014).

آرابیدوپسیس یک جنس از گیاهان خانواده شب‌بیان (Brassicaceae) است. *A.thaliana* یکی از گونه‌های این جنس است که به عنوان یک گیاه مدل در زیست‌شناسی گیاهی بطور گسترده استفاده می‌شود (Franzke *et al.*, 2009). این گیاه اولین گیاهی است که تمام زنوم آن توالی‌بابی شده و به گیاه‌شناسان اجازه آنالیزهای مناسب گیاهی، ترکیبی از زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیکی را می‌دهد تمام چرخه زندگی این گیاه در مدت شش هفته کامل می‌شود (Cotter, 2005; Page & Grossniklaus, 2002). ریشه‌های آرابیدوپسیس دارای ساختمان ساده، آسان برای مطالعه در کشت است و نیز ریشه این گیاه، همزیستی با باکتری‌های تثبیت نیتروژن و قارچ‌های میکوریزایی را ندارد (Smyth *et al.*, 1990). معرفی ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPRs) از جمله باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB) به عنوان کودهای زیستی گزینه‌ای پایدار برای دسترسی بیشتر مواد مغذی و بهبود رشد گیاه و عملکرد آن پیشنهاد می‌شود (Vessey, 2003). کاربرد این باکتری‌ها، به جهت کاهش استفاده از کودهای شیمیایی بدون به خطر انداختن عملکرد، در حال حاضر یکی از ویژگی‌های مهم تحقیقات در زمینه کشاورزی، میکروب‌شناسی و فناوری زیستی است (Minorsky, 2008). با فرض اینکه کودزیستی با تاثیر بر پدیده‌های رشد و نموی می‌تواند منجر به بهبود عملکرد گیاه آرابیدوپسیس شود، در پژوهش حاضر ارزیابی عملکرد کود زیستی بارور ۲ در مقایسه با فسفات پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای *Arabidopsis thaliana* (واریته کلمبیا) از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران تهیه شد و بعد از ضدعفونی کردن (به منظور استریل کردن، بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه شسته شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۲۰ درصد غوطه‌ور شدند در نهایت ۳ بار با آب دوبار تقطیر شسته شدند و سپس به مدت ۶ ساعت در آب دو بار تقطیر

نگه داری شدند (Ma et al., 2016). بذرهای استریل به گلدان‌هایی به ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر ۱۳ سانتی‌متر متشکل از پرلیت، ورمیکولیت و پیت به نسبت ۱:۱:۱ در شرایط گلخانه‌ای با ۱۵ ساعت روشناختی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. گروهی از بذرها با کود زیستی فسفاته تهیه شده از شرکت زیست فناوری سبز تهران، از نوع فسفات بارور ۲ آغشته شدند که حاوی دو نوع باکتری حل کننده فسفات (P13) و *Pseudomonas Putida* (P5) و *Pantoea Agglomerans* بود. سایر نمونه‌های مورد آزمایش در دومین هفته رویش بذرها، در بستر پیت، با اضافه نمودن فسفات پتاسیم با غلظت‌های (0, 0.1, 0.2 mM, 5 mM) هفته‌ای یک بار همراه آبیاری تا پایان دوره رشد تیمار شدند. هم چنین به منظور تهیه برش‌گیری دستی از اندام‌های رویشی، ابتدا نمونه‌ها در الكل، گلیسیرین (۱:۱) تثبیت شده و سپس برش‌گیری دستی و رنگ آمیزی به روش مضاعف با آبی‌متیل و کارمن‌زاجی انجام شد. برای برش میکروتومی مریستم راس ساقه، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در فیکساتور فرمالدئید ۳٪ درصد، اسیداستیک ۱۰۰ درصد اتانول ۷۰ درصد (۱:۲:۱) تثبیت شدند. پس از آب‌گیری با درجات رو به افزایش الكل، شفاف سازی با تولوئن و سپس قالب‌گیری در پارافین، با میکروتوم (Cut 4060 Co., Mainz, Germany) برش‌هایی با ضخامت ۸ میکرومتر تهیه گردید. پس از طی مراحل پارافین‌زدایی و آبدهی، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوژین صورت گرفت (Yeung, 1984). پس از تهیه لام، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری (BLACKL.3000) مشاهده و عکس برداری صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری محیط دانه‌های گرده از نرم‌افزار استفاده شد. Digimizer

آزمون آماری

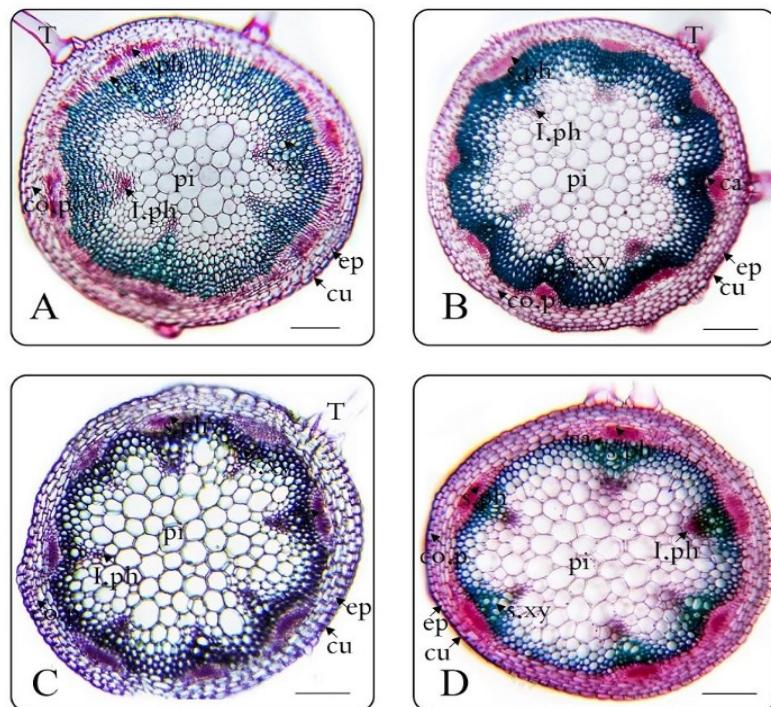
به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار (20) SPSS و Excel استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ۳ تکرار (میانگین \pm انحراف معیار) گزارش شدند. سطح معنی داری آزمایش‌ها ($P \leq 0.05$) در مورد اختلافات بین میانگین پارامترهای مختلف در نمونه‌های مورد آزمایش با آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت

نتایج

بررسی ساختار تشریحی ساقه

در مشاهدات میکروسکوپی برش عرضی ساقه مشخص شد که، بیرونی ترین بخش را سلول‌های مکعبی شکل اپیدرم (ep) تشکیل می‌دهد که توسط لایه‌ای از کوتیکول (Cu) احاطه شده است. هم چنین در این لایه تعدادی کرک (T) دیده می‌شود. منطقه بعدی پارانشیم پوست (Co.p) است که بین اپیدرم و استوانه مرکزی قرار دارد و از چند ردیف سلول مکعبی شکل تشکیل شده است.

استوانه مرکزی شامل بافت آبکش پسین (s.ph) به صورت پیوسته به طرف خارج و آبکش به صورت منقطع به سمت داخل است. بافت چوبی پسین (s.xy) در داخل با دیواره‌ای ضخیم و سبز رنگ مشاهده می‌شود. حد فاصل آبکش پسین و چوب پسین لایه کامبیوم (Ca) وجود دارد. رشد چوب در ساقه این گیاه به صورت گریز از مرکز بوده و پروتوزال (p.x) با سایز کوچکتر در نوک دسته آوندی (Ca) و به سمت مرکز قرار دارد و متازایلم (M.x) با سایز بزرگتر به سمت آبکش قرار دارد. مغز نیز در قسمت میانی ساقه واقع شده است. تراکم آوند چوب در ساقه نمونه‌های تحت تیمار با فسفات پتاسیم ۵ mM و ۱.۲ mM در مقایسه با نمونه‌های شاهد و کود زیستی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱). هم‌چنین سلول‌های بافت پارانشیم پوست در نمونه‌های تحت تیمار با فسفات پتاسیم در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار شده با کود زیستی حجمی‌تر اند. ضخامت و پیوستگی آبکش پسین در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده است و کمترین ضخامت بافت آبکش در نمونه زیستی مشاهده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی تغییرات تشریحی برش عرضی ساقه *A.thaliana* A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات پتاسیم ۵ mM، D: فسفات پتاسیم ۱.۲ mM، co.p: روبوست، ep: پارانشیم پوستی، s.ph: آبکش پسین، ca: کامبیوم، s.xy: چوب پسین، I.ph: آبکش داخلی، pi: مغز، T: میکروگراف، ۵۰µm: مقیاس.

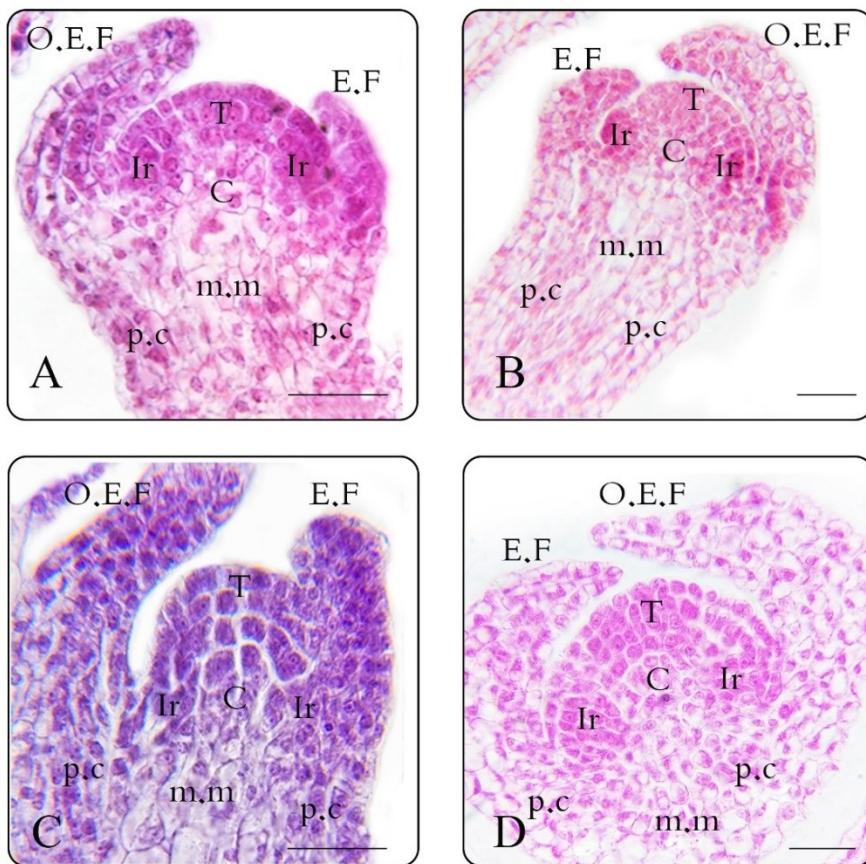
جدول ۱: مقایسه نتایج ساختاری تشریحی در ساقه آراییدوپسیس تالیانا

تیمار Pi	بدون فسفات پتاسیم	کود زیستی	1.2 mM Pi	5 mM
وسعت آوند چوبی (μm) ۱۸/۶±۱/۵۰.۴b	۳۲/۸±۲/۵۱۵ a	۳۲±۲/۳۸۵ a	۱۸/۶±۱/۱۳۷ b	

نتایج بصورت $\bar{x} \pm \text{SE}$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

بررسی ساختار تشریحی مریستم راس ساقه

این مریستم در گیاه آراییدوپسیس از نوع مریستم‌های تیپ برآمده یا گنبدی شکل است و نواحی زیر در آن قابل تشخیص است. ناحیه انتهایی مریستم شامل سه ردیف سلول منظم و مکعبی شکل است که تونیکا نام دارد. سلول‌های زیر تونیکا، کورپوس نام دارد که به صورت توده‌ای از سلول‌های کم و بیش کوچک و چند وجهی‌اند. در زیر ناحیه انتهایی و در پهلوهای مریستم، یک منطقه فعال به نام حلقه بنیادی وجود دارد. حلقه بنیادی دارای سلول‌های ریزتر با هسته‌های درشت و حجمی است که نشانه تقسیم سلولی در آنهاست، بنابراین نسبت به سایر نواحی مریستم رنگ پذیری بیشتری دارند. ناحیه مریستم مغز که در زیر ناحیه انتهایی قرار دارد، دارای سلول‌های کم و بیش کشیده هستند. واکوئل در سلول‌های این منطقه گسترش زیادی دارد. رنگ پذیری کم، نشانگر فعالیت کم می‌توزی این ناحیه است. با فعالیت این قسمت مغز ساقه ایجاد می‌شود. در اثر تقسیمات مماسی زیر تونیکا و شعاعی تونیکا محل تشکیل برگ جدید متورم می‌شود (I.f) اطراف مریستم راسی به وسیله طرح‌های اولیه برگی (E.F) احاطه شده است و در بخش‌هایی نوارهای پروکامبیومی (P.c) نیز قابل رویت هستند. در گیاهان شاهد (بدون فسفات پتاسیم) مریستم رویشی، شامل تونیکا با سه لایه مغز با سلول‌های واکوئلی در قسمت میانی مشخص هستند اما در گیاهان تحت تیمار با کود زیستی بارور ۲ سلول‌های تونیکا نسبت به گروه شاهد کوچک‌تر به نظر می‌رسند و نظمی در آرایش سلول‌های این لایه نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده نمی‌شود. ناحیه مربوط به مریستم مغز واکوئلی شده و ضریب نوکلئوپلاسمی در سلول‌های مغز این گروه نسبت به نمونه شاهد کمتر و هسته در مقایسه با کل سلول کوچک‌تر است. در گیاهان تحت تیمار با فسفات پتاسیم ۱.۲ mM مریستم حالت لایه لایه پیدا کرده است ناحیه مربوط به تونیکا و کورپوس از هم قابل تشخیص نیست منطقه مربوط به حلقه بنیادی در مقایسه با دو نمونه قبل تقلیل یافته است.

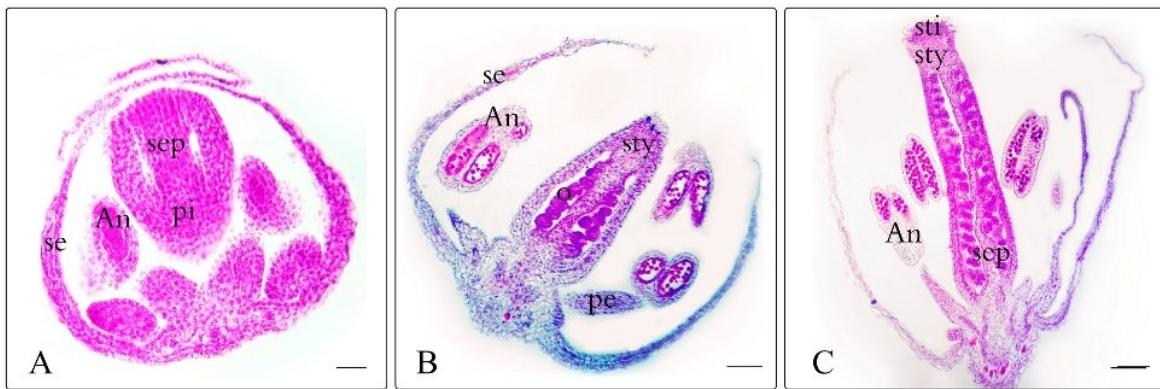


شکل ۲: بررسی تغییرات تشریحی مریستم رویشی
A: *A.thaliana*, B: شاهد، C: کود زیستی بارور ۲، D: فسفات پتاسیم ۱.۲ mM، E: طرح اولیه برگی قديمه، F: نوارهای پروکامبیومی، G: ميریستم مغز ۵ mM، H: حلقه بنیادی، I: کورپوس، J: تونیکا، K: ميریستم تقریبا ۵۰ μm مقیاس.

ضریب نوکلئوپلاسمی در مقایسه با دو نمونه قبل افزایش بافته است. در گیاهان تحت تیمار با فسفات ۵ mM مریستم تقریبا همگن است و تمام سلول‌ها شروع به فعالیت کرده است که در نتیجه لایه تونیکا ۴ لایه‌ای و مریستم در مقایسه با نمونه شاهد حجمی تر شده است (شکل ۲).

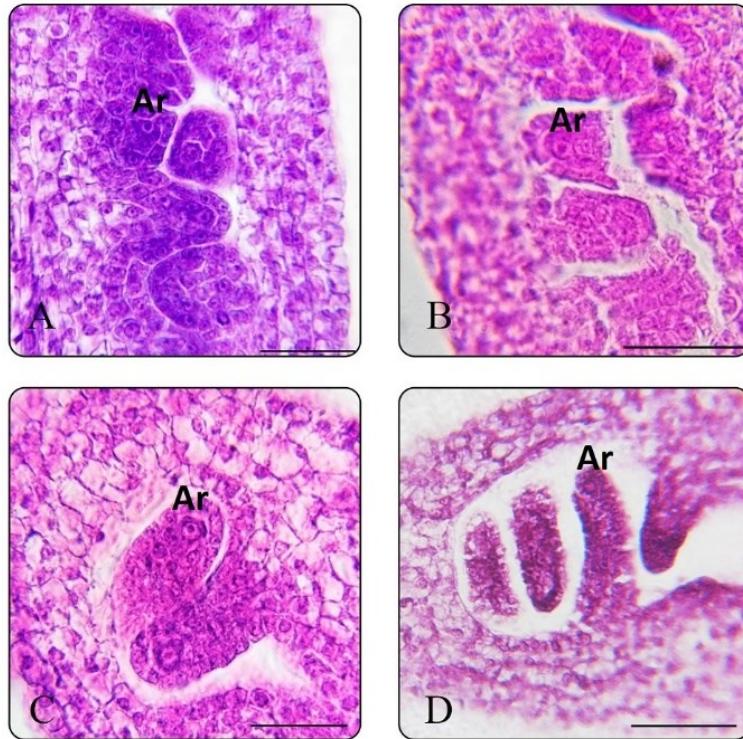
بررسی ساختار تشریحی تکوین تخمک

با تکوین پرچم‌ها، توده میانی مریستم هاگزا در جهت تشکیل مادگی تمایز می‌یابد. تخدمان در ابتدا تخم مرغی (شکل-A) و سپس به شکل کشیده در می‌آید (شکل-B). نهایتاً به سه بخش تخدمان، خامه و کلاله تمایز می‌یابد (شکل-C). تخدمان در گونه مورد بررسی به صورت فوقانی است، بدین صورت که مادگی بالاتر از نقطه اتصال گلبرگ و گاسبرگ‌ها قرار دارد (شکل-C) تخدمان دو خانه (دارای دو برقه) است که توسط تیغه کاذبی از یکدیگر جدا شده‌اند (شکل-B, C). در هر خانه تخدمان، تخمک‌های زیادی چسبیده به محور میانی هستند که با پیشرفت تکوین آنها تعداد زیادی دانه در درون خانه‌های تخدمانی ظهرور می‌کند.



شکل ۳: برش طولی گل *A.thaliana* تکوین تخدمانی (دو برقه با تیغه میانی بین آنها) **An**: گلبرگ، **pe**: پرچم، **se**: برقه میانی، **scp**: مادگی، **sep**: تیغه میانی، **stv**: گاسبرگ، **sti**: کاسبرگ، **o**: تخمک، مقیاس $50\mu\text{m}$

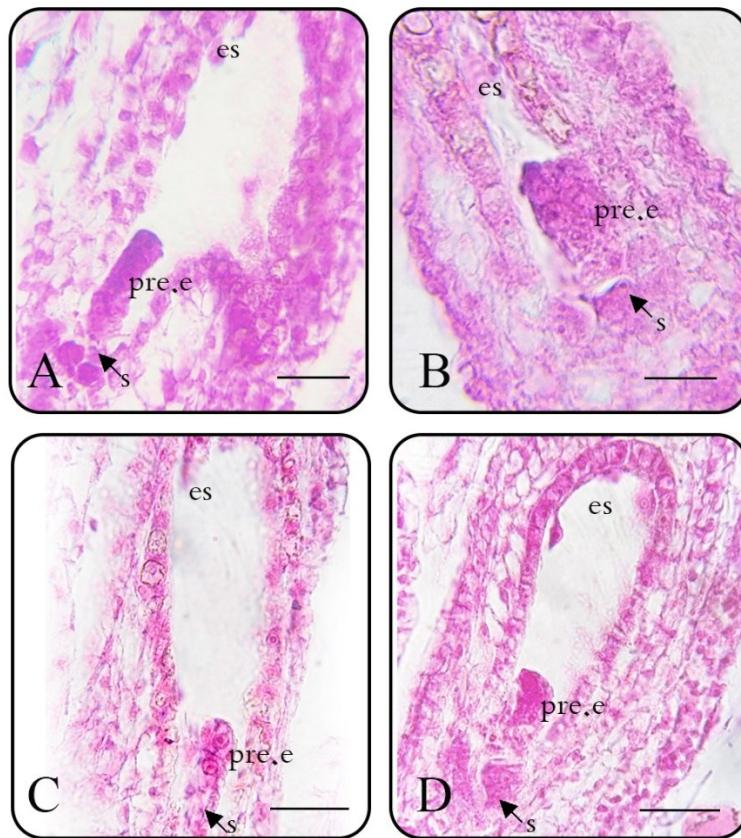
بنیان تخمکی به صورت برآمدگی کوچکی ابتدا در بخش کناری حفره تخدمان تشکیل شده و تمكن از نوع محوری است (شکل ۳-B). تخمک به صورت برجستگی کوچک کم و بیش کروی (پریموردیوم تخمک) در جدار تخدمان قبل از تکوین بخش‌های فوقانی تخدمان و تشکیل خامه و کلاله پدیدار می‌شود (شکل ۳-B). پریموردیوم تخمکی در گروه‌های تحت تیمار با کود زیستی و فسفات پتابسیم 5 mM و 1.2 Mm ، نسبت به گروه شاهد که کوتاه‌تر و گبیدی شکل هستند، حالت طویل و کشیده‌تر (انگشتی مانند) دارند (شکل ۴).



شکل ۴: بررسی تغییرات تشریحی پریموردیوم تخمکی *A.thaliana* A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات پتاسیم ۱.۲ mM، D: فسفات پتاسیم ۵ mM. میزان آرکوپسیور: ۵۰ μm

بررسی تشریحی پیش‌رویان

سلول تخم در امتداد محور راسی پایه‌ای طویل شده و به دنبال آن تقسیم نامتقارن رخ می‌دهد. پیش‌رویان و سوسپانسور حاصل تقسیم نامتقارن در سلول زیگوت هستند سلول کوچک‌تر، یعنی سلول راسی رویان و سلول بازال سوسپانسور را تولید می‌کند سلول‌های سوسپانسور به طور قابل ملاحظه‌ای واکوئلی هستند اما سلول‌های رویان با اندازه کوچک‌تر و سیتوپلاسم متراکم و بدون واکوئل از سوسپانسور قابل تشخیص‌اند (شکل ۵). تقسیمات پیش‌رویان در نمونه‌های تحت تیمار فسفات پتاسیم ۵ mM در مقایسه با نمونه‌های شاهد نامنظم‌تراند. در پیش‌رویان نمونه شاهد سطح رویان کاملاً صاف است در حالی که در گروه‌های تحت تیمار به صورت نامنظم هستند (به ویژه در گیاهان تحت تیمار با ۵ mM). این سلول‌ها در گیاهان شاهد و ۱.۲ mM فسفات پتاسیم درشت‌تر و کاملاً مشخص هستند در حالیکه در نمونه‌های دیگر سلول‌ها کوچک‌تر شده و به راحتی قابل تفکیک و تمایز نیستند. هم‌چنین تعداد سلول‌های سوسپانسور (آویزه) با تقسیمات پری‌کلینیال و آنتی‌کلینیال خود در گیاهان تیمار با کود زیستی و ۵ mM فسفات پتاسیم افزایش یافته‌اند که در مقایسه با نمونه شاهد پهنه‌تر به نظر می‌رسد (شکل ۵).



شکل ۵: بررسی تغییرات تشریحی پیش رویان در کیسه رویانی گیاه *A.thaliana*

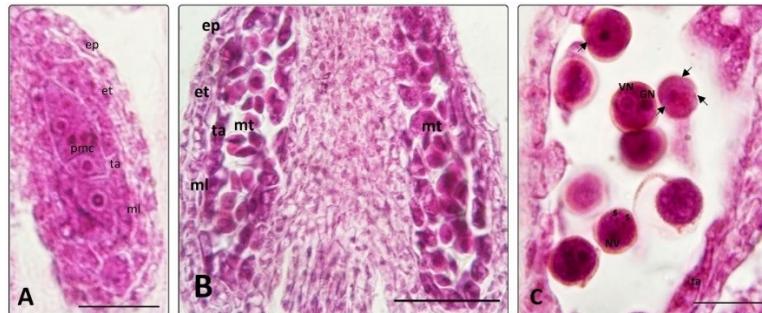
A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات پتابسیم ۱.۲ mM، D: فسفات

پتابسیم ۵ mM pe : پیش رویان، es : کیسه رویانی، s : آوبیزه، مقیاس ۵۰ μ m.

میکروسپوروزایی و نمو دانه

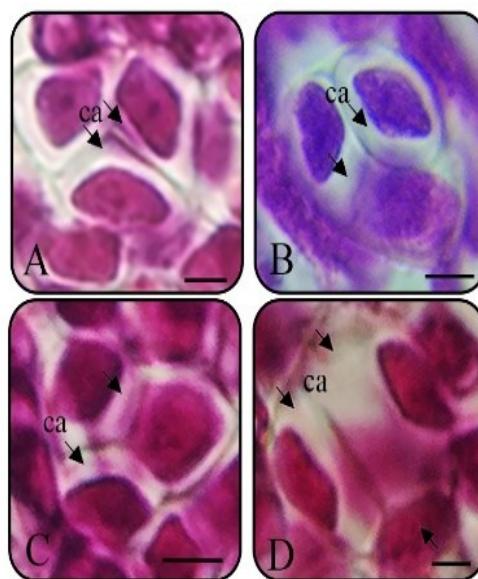
سلول‌های بافت هاگزایی به وجود آمده از سلول‌های آرکئوسپور به سلول‌های مادر گرده تمایز پیدا می‌یابند. سلول‌های مادر گرده با سیتوپلاسم متراکم، اندازه بزرگ و هسته‌های مشخص از سلول‌های بافت احاطه کننده متفاوت هستند (شکل ۶-A). باخته‌های مادر گرده با تقسیم میوزی تتراسپورها هاپلوبیتی را تولید می‌کنند. در اطراف میکروسپوروسیت‌ها با شروع میوز، کالوز شروع به تشکیل می‌کند که در تصاویر میکروسکوپی تهیه شده به صورت یک لایه ضخیم و شفاف در اطراف میکروسپوروسیت‌ها (شکل ۶-B) و تترادها (آرایش تترادها میکروسپور در داخل دیواره کالوزی در گونه مورد بررسی از نوع تتراهدرال و به ندرت از نوع تتراگونال است) مشاهده می‌شود (شکل ۶-C). گرده بالغ کروی و منفذدار با سه هسته (یک هسته رویشی و دو اسپرم) قابل رویت است (شکل ۶-C).

در تکوین گامتوفیت نر، افزایش ضخامت دیواره مخصوص تترادها در نمونه تحت تیمار با 5 mM فسفات نسبت به نمونه‌های دیگر بسیار مشهود است (شکل ۷).



شکل ۶: بررسی میکروسپورزایی و نمودانه گرده A: کیسه گرده حاوی سلول‌های مادر گرده، B: سلول‌های تترادی، C: دانه گرده بالغ: pmc: سلول مادر گرده، ep: اپیدرم، et: لایه مکانیکی، ml: لایه میانی، ta: لایه تاپی، mt: تترادهای میکروسپوری، VN: هسته رويشی دانه گرده، GN: هسته زایشی دانه گرده، S: اسپرم.

مقیاس $.50\mu\text{m}$

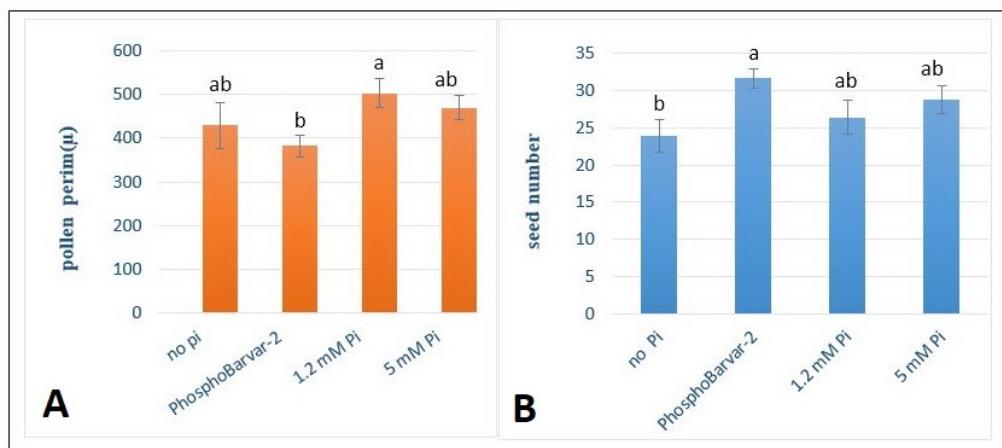


شکل ۷: بررسی ضخامت دیواره ویژه A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات پتاسیم 1.2 mM ، D: فسفات پتاسیم 5 mM : ca: لایه کالوز (دیواره ویژه)، مقیاس $.10\mu\text{m}$

ویژگی ریخت‌شناسی

بررسی تشریحی دانه گرده و تعداد دانه

نتایج حاصل از بررسی‌های تشریحی دانه گرده نشان می‌دهد تنها بین دو گروه ۱.۲ mM فسفات و کود زیستی اختلاف معنی‌داری وجود دارد و بیشترین محیط دانه گرده به نمونه‌های تیمار با ۱.۲ mM فسفات تعلق دارد (شکل A-۸) (جدول ۲). تعداد دانه‌های هر غلاف در نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان تیمار با کود زیستی است. و با نمونه‌های تیمار شده با فسفات پتاسیم اختلاف معنی‌داری ندارند (شکل B-۸) (جدول ۲).



شکل ۸: نمودار تاثیر کودزیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر محیط دانه گرده (نمودار A) و تعداد دانه

A.thaliana (B) نمودار گیاه

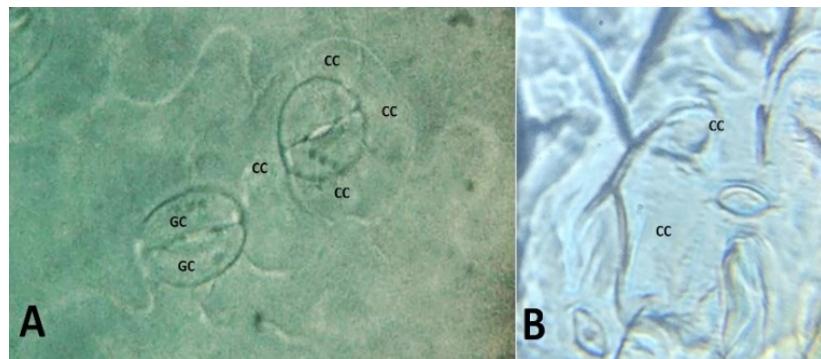
جدول ۲: مقایسه نتایج محیط دانه گرده و تعداد دانه در غلاف در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

تیمار	بدون فسفات پتاسیم	کود زیستی	۱.۲ mM Pi	۵mM Pi
محیط دانه گرده μm	۴۲۹/۸۶۰±۵۲/۵۱۷ ab	۳۸۱/۶۸۳±۲۴/۷۶۵ b	۵۰۳/۱۸۷±۳۱/۰۹۸ a	۴۶۹/۲۶۹±۲۸/۰۶۷ ab
تعداد دانه در غلاف	۲۳/۹۲±۲/۲۱۱ b	۳۱/۶۲±۱/۲۷۱ a	۲۶/۳۹±۲/۲۷۳ ab	۲۸/۷۵±۱/۹۱۳ ab

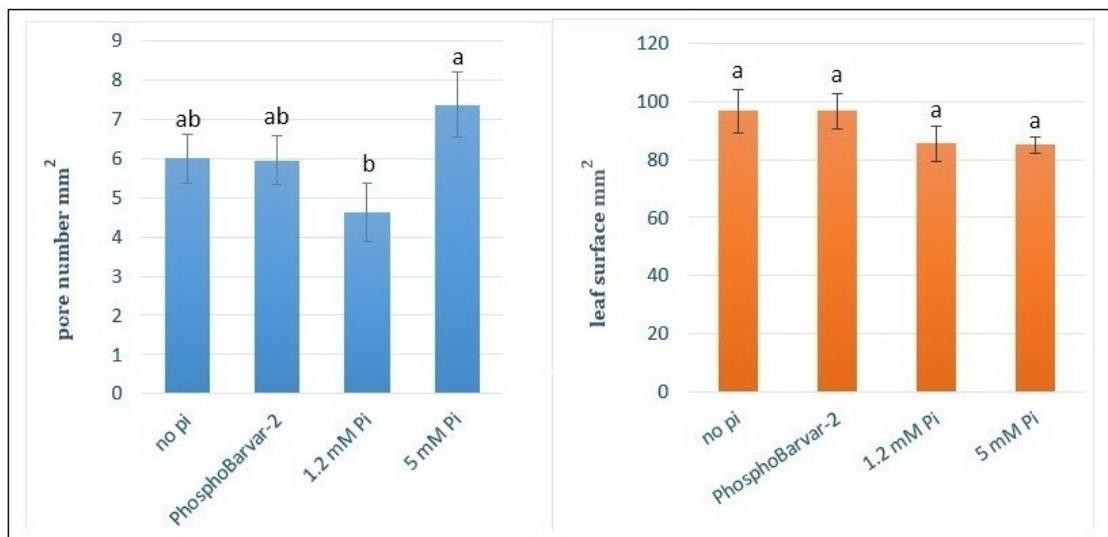
نتایج بصورت $\bar{x} \pm \text{SE}$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

بررسی تعداد روزنه و سطح برگی

در گیاه *A.thaliana* سلول‌های همراه اطراف سلول‌های نگهبان اندازه متفاوتی دارند و از نوع آنیزوسیتیک هستند (شکل ۹-۹). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در غلظت‌های مختلف فسفات، میانگین تعداد روزنه، به طور معنی‌داری در نمونه‌های فسفات پتاسیم ۵ mM بیش از نمونه‌های فسفات پتاسیم ۱.۲ mM است و با نمونه‌های دیگر آزمایش اختلاف معنی‌داری ندارد (شکل ۱۰-A) (جدول ۳). اما از لحاظ سطح برگی در گیاهان شاهد و سایر نمونه‌های تحت تیمار با کود زیستی و فسفات پتاسیم ۱.۲ mM و ۵ mM تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۱۰-B) (جدول ۳).



شکل ۹: روزنه و سلول‌های اپیدرمی در گیاه *A.thaliana*



شکل ۱۰: نمودار تاثیر کودزیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تراکم روزنه (نمودار A) و سطح برگی (نمودار B) گیاه *A.thaliana*

جدول ۳: مقایسه نتایج تراکم روزنہ و سطح برگی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

تیمار	بدون فسفات پتابیم	کود زیستی	۱.۲ mM Pi	۵ mM Pi
تراکم روزنہ (mm^2)	۶±۰/۶۲۳ab	۵/۹±۰/۶۲۳ab	۴/۶±۰/۷۴۱ b	۷/۳۶±۰/۸۲۳a
سطح برگی (mm^2)	۹۶/۶±۷/۲۶۴ a	۹۶/۸±۶/۰۶۵ a	۸۵/۵±۵/۰۹۷ a	۸۵±۲/۰۸۶ a

نتایج بصورت $\bar{x} \pm \text{SE}$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

بحث

در برش عرضی ساقه سلول‌های مکعب مستطیلی اپیدرم و سلول‌های پارانشیم پوستی با دیواره‌ی نازک در زیر آن حاکی از وجود ساختاری مشابه با سایر گیاهان دو لپه ای‌ها دارد و با پژوهش باقری ابیانه و همکاران در سال ۱۳۹۶ بر روی گیاه شاهی (Lepidium sativum L.) از این خانواده هم‌خوانی دارد. وجود آبکش دوطرفه در این گیاه که در انتقال و ترابری مواد آلی به تمام بخش‌های گیاه کمک زیادی می‌کند با پژوهش باقری ابیانه و همکاران (۱۳۹۶) بر روی گیاه شاهی هم‌سوئیست. سلول‌های مریستمی کامبیوم در گیاهان دولپه همیشه به صورت حلقه‌ای است اما همواره در استوانه آوندی حلقه‌ای کامل از چوب و آبکش به وجود نمی‌آید. در آرابیدوپسیس نیز کامبیوم فقط در ناحیه آوندی ایجاد این دو بافت هادی را می‌کند که با گزارش‌های باقری ابیانه و همکاران در سال ۱۳۹۶ بر روی گیاه شاهی (Lepidium sativum L.) از این خانواده مطابقت دارد.

و همکاران (2015) گزارش دادند به دلیل ضرورت فسفات برای رشد گیاه، استفاده از کودهای فسفات برای تولید محصول ضروری است. با این حال در دسترس بودن فسفات برای گیاه، یک مسئله جدی است که به دلیل تثبیت و رسوب آن در خاک باعث کاهش کارآیی فسفر اضافی می‌شود. Qureshi و همکاران (2012) نشان دادند که بیش از ۸۰ درصد فسفات به عنوان کود در حضور ترکیبات یونی در خاک (ترکیب با Ca^{+2} در خاک‌های آهکی، ترکیب با Fe^{+3} و Al^{+3} در خاک‌های اسیدی) از بین می‌رود. در تغذیه گیاه، نه تنها باید عناصر ضروری به اندازه کافی در دسترس گیاه قرار گیرند، بلکه تعادل در میان عناصر غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است (مجیدیان و همکاران، ۱۳۸۷). Chapin et al., 1988) و همکاران (Chapin et al., 1988) بیان کردند ۵۰ تا ۹۰ درصد نیتروژن و فسفر گیاه در مرحله گل‌دهی از برگ‌ها و ساقه به سمت دانه حرکت می‌کنند. بنابر این اگر گیاه در مراحل اولیه رشد در جذب عناصر مغذی با محدودیت مواجه شود، به دلیل انتقال کم عناصر به دانه عملکرد و کیفیت محصول هر دو تحت تاثیر قرار می‌گیرد. میکروارگانیسم‌های خاک در طیف گسترده‌ای، طی فرایندهای زیستی باعث تبدیل مواد مغذی نامحلول خاک به مواد قابل

جذب می‌شوند (Babalola *et al.*, 2012) و با پاسخ‌گویی به محیط‌های غیرزنده برای گیاهان بسیار حیاتی هستند در نتیجه باعث باروری خاک و پایداری محیط می‌شوند (Khan, 2016). کودهای بارور ۲ حاوی باکتری‌های مفید حل کننده فسفات است که با ترشح آنزیم‌های فسفاتاز و نیز اسیدی کردن خاک سبب رهاسازی یون فسفات از ترکیبات کم محلول فسفرمی‌شود. این امر سبب افزایش قابلیت جذب فسفر توسط گیاهان می‌گردد (توحیدی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۲؛ ملبوی، ۱۳۸۶؛ Sharma *et al.*, 2013).

مشاهدات بافت شناسی ساقه گیاه آربیدوپسیس، تراکم آوند چوبی در گیاهان تحت تیمار با کود زیستی و نمونه شاهد را نشان داد. که با گزارش کلاهی و همکاران (۱۳۹۶) در مورد بررسی ویژگی تشریحی گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) در پاسخ به نیترات پتاسیم که وسعت دستجات آوندی ساقه در نمونه‌های تیمار با پتاسیم ۱۵۰ کیلوگرم کود در هکتار کاهش معنی داری نسبت به شاهد و نمونه تیمار با ۷۵ کیلوگرم کود در هکتار را داشته است هم‌خوانی دارد. به نظر می‌رسد در این پژوهش تغییرات تشریحی کاهش آوندی در گیاهان تیمار با فسفات پتاسیم بیانگر سازگاری تشریحی گیاه به افزایش فسفات خاک است. افزایش تراکم آوند چوبی در گیاهان تیمار شده با کود زیستی با توجه به فعالیت میکروارگانیسم‌ها و پایداری خاک، با یافته‌های Turk و همکار (Turk & Tawaha, 2002) بر روی گیاه باقلا در مورد افزایش سرعت نمو گیاهی به دلیل افزایش فسفر قابل دسترس هم‌سو است.

مطالعات، تاثیر فسفر در فرایندهای شیمیایی و واکنش‌های انتقال انرژی را نشان داده است (Miller *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2010) که به رشد و بلوغ کمک می‌کند. رشد و افزایش لایه‌های تونیکا در مریستم رویشی گیاهان تیمار با فسفات پتاسیم ۵ mM با تحقیقات فوق هم‌سو است. زندگی گیاهان بین دو مرحله اسپوروفیتی (دیپلوئید) و گامتوفیتی (هاپلوئید) در چرخه است در آنزیوپسیرم‌ها، اسپوروفیت گیاه گل‌دهنده و نسل بر جسته‌تری نسبت به گامتوفیت‌ها است که تعداد سلول‌های محدود و محصور شده در بافت اسپوروفیتی می‌باشد (Pagnussat *et al.*, 2005).

گیاهان گلدار دارای سلول‌های بنیادی تمایز نیافته در منطقه مریستمی است. بافت مریستمی قادر به رشد و تمایز تشکیل بافت‌ها و اندام‌های روبشی است و در نهایت باعث تولید اندام‌های تولیدمثابی حاوی سلول‌های اسپوروزن دیپلوئید می‌شوند (Honys *et al.*, 2006). تجزیه و تحلیل نشان داده که هنگام مطالعه بساک گیاهان گلدار مجموعه‌ای از مشکلات جنین شناسی حل نشده، مربوط به شروع میکروسپورانژ و زمان تمایز آرکنوسپور است (Shamrov *et al.*, 2020). مطالعه تکوین گل در گیاهان گلدار از اهمیت بسیاری برخوردار است چرا که، رویانزایی به دلیل ایجاد سازمان اولیه گیاه اسپوروفیت، یک مرحله مهم از زندگی گیاه محسوب می‌شود (Mayer *et al.*, 1993). رحمانی و همکاران (۱۳۹۸) با مطالعه بر تاثیر فسفر بر گل‌دهی گل آهار (*Zinnia* sp) گزارش کردند

کمبود فسفر نه تنها به شدت در میزان رشد تاثیر دارد، بلکه روی تشکیل میوه و دانه و کیفیت آن‌ها نیز بسیار موثر است. فسفر می‌تواند بر کمیت و کیفیت دانه بسیار موثر واقع شود. نتایج پژوهش حاضر با گزارش رحمانی در رابطه با تاثیر فسفات بر تکوین گل، هم‌سو می‌باشد. تقسیم سلولی و رشد بیشتر پیش‌رویان و سوسپانسور در گیاهان تحت تیمار با فسفات ۵ mM و گیاهان تحت تیمار با کود زیستی و نیز افزایش تقسیم سلولی در پریموردیم تخمکی در گیاهان تیمار شده با فسفات پتاسیم و کود زیستی و همچنین افزایش ضخامت دیواره ویژه (کالوز) در اطراف تترامیکروسپورها در گیاهان تیمار شده با فسفات ۵ mM ناشی از اثرات فسفات قابل دسترس برای گیاه است.

برخی محققین بیان داشته‌اند که تلقیح بذر با باکتری‌های حل کننده فسفر، می‌تواند فسفر تثبیت‌شده در خاک را حل کرده و به فرم فسفر قابل مصرف درآورد که در نتیجه، عملکرد محصول افزایش می‌یابد (Puente *et al.*, 2004; Tilak *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2012; Kalayu, 2019). به نظر می‌رسد افزایش رشد گیاه نه تنها به محلول‌سازی Pi بلکه به سایر صفات PGP، مانند تولید indole-3-acetic acid (IAA) نیز مربوط است (Pereira & Castro, 2014; Zahid, 2015). نتایج افزایش تعداد دانه در غلاف گیاهان تیمار با کود زیستی با نتایج افزایش تعداد دانه در گیاه آفتتابگردن توسط باکتری‌های حل کننده فسفات توسط اکین (Ekin, 2010) مطابقت دارد.

پاسخ روزنه‌ها به تغییرات محیطی و هدایت روزنه‌ای آنها به صفاتی همچون قطر روزنه، تراکم روزنه، شاخص روزنه، اندازه سلول‌های محافظه و منافذ روزنه و سطح برگ مربوط است. در میان این صفات تراکم روزنه از مهمترین پارامترهای اکوفیزیولوژیکی است که بر تبادلات گازی بین گیاه و اتمسفر مؤثر است (Lake *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2002). محققین نشان داده‌اند که صفات Pandey *et al.*, 2007)، شدت نور (Lake *et al.*, 2001)، کیفیت نور (Liu-Gitz *et al.*, 2000)، اشعه UV (Kakani *et al.*, 2003)، سیگنال‌های خشکی (Majd و همکاران، ۱۳۸۵)، سطوح مختلف CO₂ (Das, 2003) تغییر می‌کنند. مقایسه تعداد روزنه در گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری را در تعداد روزنه در سطح برگی فسفات پتاسیم ۱.۲ mM و ۵ mM نشان می‌دهد. بیشترین تراکم روزنه مربوط به گیاهان تیمار شده با فسفات پتاسیم ۵ mM است. نتایج این پژوهش با مطالعات Kohan و همکاران (2021) که افزایش معنی دار تراکم روزنه های گیاهان کاهو در معرض آلودگی هوا (ناشی از دود اگزوز ماشین) را گزارش دادند مطابقت دارد. پیشنهاد می‌شود ممکن است این تغییرات یک انطباق و سازگاری با غلظت بالای فسفات در خاک باشد.

اسدی و همکاران (۱۳۹۲) گزارش کردند جذب عناصر مغذی در هریک از مراحل رشد گیاه متفاوت است از این رو مصرف کودهای شیمیایی چه کمتر و چه بیشتر از نیاز واقعی، هر دو منجر به کاهش عملکرد و آلوده نمودن محیط زیست می‌شوند. یکی از

۴۰/ بررسی تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تکوین اندام‌های روبشی و زایشی گیاه...

مدیریت‌های صحیح مصرف کودهای شیمیایی تشخیص مراحل مختلف رشد گیاه و تعیین الگوی جذب آن مطابق با مراحل رشد است.

نتیجه گیری

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که یکی از روش‌های بهینه‌سازی مصرف کودهای فسفاته برای جبران محدودیت فسفر خاک، کودهای زیستی فسفاته است. کود زیستی بارور ۲ از طریق فرایندهایی حلالیت ترکیبات فسفر رسوب کرده در خاک را افزایش داده و بدین طریق بخشی از فسفر مورد نیاز گیاه تامین می‌گردد. در این پژوهش کاربرد کود زیستی، باعث بهبود قابل ملاحظه رشد و نمو در گیاه آراییدوپسیس در مقایسه با گیاهان شاهد گردید به طوری که بیشترین تعداد دانه و رشد و نمو در پیش رویان و پریموردیم تخمکی از این تیمار به دست آمده و با گیاهان تحت تیمار فسفات پتاسیم قابل مقایسه است. لذا می‌توان به عنوان کود مناسب برای کشت گیاه در جهت تولید ارگانیک و حفظ محیط زیست توصیه شود.

سپاسگزاری

نویسنده‌گان این پژوهش از بخش تحقیقات و فناوری گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران و گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی جهت همکاری و پشتیبانی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

اسدی، ف. خادمی، ز. ۱۳۹۲. تغییرات غلظت عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم در اندام‌های مختلف گیاه ذرت طی مراحل مختلف رشد. مجله پژوهش‌های خاک. جلد ۲۷، شماره ۴

باقری‌ابیانه، الف. مجد، الف. جعفری، سایه. ۱۳۹۶. بررسی ساختمان تشریحی تکوینی اندام‌های روبشی و زایشی در گیاه شاهی (Lepidium sativum L.). فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران. جلد ۱۲، شماره ۱. ۹-۱۵

توحیدی‌نیا، م. ع. د. مظاہری، س. م. ب. حسینی، و. مدنی، ح. ۱۳۹۲. اثر مصرف توام کود زیستی بارور-۲ و کود شیمیایی فسفر بر

عملکرد دانه و اجزای عملکرد ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴. مجله علوم زراعی ایران جلد ۱۵، شماره ۴. صفحه ۳۱۲-۳۲۴

جعفری، س. شریف‌نیا، ف. پیوندی، م. نیکنام، ف. ۱۳۹۰. بررسی ساختار تشریحی اندام‌های رویشی گیاه عناب *Zizyphus jujuba*

فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی تکوینی، سال سوم، شماره ۱۰

رحمانی، ف. محمدی، الف. ع. مرادی، ح. ۱۳۹۸. مطالعه تاثیر فسفر بر گلدهی و برخی صفات رویشی گل آهار (*Zinnia sp.*) در

محیط حاوی ورمی کمپوست. نشریه علمی گل و گیاهان زینتی، جلد ۴، شماره ۱. صفحه ۱۳-۲۵

کلاهی، م. موسوی، س. حاج شریفی، ح. مساواتی، م. شیخ رضایی، م. ح. صفار، الف. کرد زنگنه، ع. ۱۳۹۶. بررسی ویژگی‌های

تشریحی، عملکردی گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) و میزان پتابسیم خاک در پاسخ به نیترات پتابسیم. فصلنامه

علمی پژوهشی زیست‌شناسی تکوینی. سال نهم، شماره ۲

مجد، الف. جعفری یزدی، الف. فلاحیان، ف. الف. خاوری نژاد، ر. ع. برنارد، ف. جاویدفر، ف. ۱۳۸۵. اثر تنفس خشکی و آبسیزیک اسید

بیرونی بر تکوین گیاه کلزا (*Brassica napus* L.). ویژه نامه زیست‌شناسی. دوره ۱۶، شماره ۶۲. صفحه ۱-۱۱

مجیدیان، م. الف. قلاوند، ع. الف. کامکار حقیقی، ن. کریمیان. ۱۳۸۷. تاثیر تنفس خشکی، کود نیتروژن و کود آلی بر قرائت کلروفیل،

عملکرد دانه و اجزای عملکرد ذرت دانه‌ای رقم سینگل کراس ۷۰۴. مجله علوم زراعی ایران. جلد ۱۰، شماره ۳. صفحه ۳۳۰-۳۰۳

ملبوی، م. ع. ۱۳۸۶. ویژگی‌های کود زیستی فسفات بارور ۲. جهاد دانشگاهی، زیست فناور سبز، ۱۰۴ صفحه

Abbasi, M., Sharif, S., Kazmi, M., Sultan, T., and Aslam, M. (2011). Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. Plant Biosystems, 145(1), 159-168.

Afzal, A., Ashraf, M., Asad, S. A., and Farooq, M. (2005). Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) in rainfed area. Int. J. Agric. Biol., 7(2), 207-209.

- Ahmad, H., Sajjid, M., Hayat, S., Ullah, R., Ali, M., Jamal, A., Ali, J. (2017). Growth, Yield and Fruit Quality of Strawberry (*Fragaria ananasa* Dutch) under Different Phosphorus Levels. Research in Agriculture, 2.
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., and Abdelmoneim, T. S (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi journal of biological sciences, 20(1), 57-61.
- Amtmann, A., Hammond, J. P., Armengaud, P., and White, P. J. (2005). Nutrient sensing and signalling in plants: potassium and phosphorus. Advances in Botanical Research, 43, 209-257.
- Babalola, O. O., and Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. J. Food Agric. Environ, 10(3 and 4), 540-549.
- Betencourt, E., Duputel, M., Colomb, B., Desclaux, D., and Hinsinger, P. (2012). Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. Soil Biology and Biochemistry, 46, 181-190.
- Chapin I, F. S., and Wardlaw, I. F. (1988). Effect of phosphorus deficiency on source-sink interactions between the flag leaf and developing grain in barley. Journal of Experimental Botany, 39(2), 165-177.
- Ciereszko, I., Balwicka, H., and Żebrowska, E. (2017). Acid phosphatases activity and growth of barley, oat, rye and wheat plants as affected by Pi deficiency. The Open Plant Science Journal, 10(1)
- Cotter, M. (2005). Care of *Arabidopsis thaliana* at the Center for Plant Lipid Research. Denton: University of North Texas.
- Das, R. (2003). Characterization of responses of Brassica cultivars to elevated CO₂ under moisture stress condition (Doctoral dissertation, Indian Agricultural Research Institute; New Delhi).
- Ekin, Z. (2010). Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. African Journal of Biotechnology, 9(25), 3794-3800.

- El-Sayed, W. S., Akhkha, A., El-Naggar, M. Y., and Elbadry, M. (2014). In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Frontiers in microbiology*, 5, 651.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., and Etoa, F. X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5(24).
- Franzke, A., German, D., Al-Shehbaz, I. A., and Mummenhoff, K. (2009). *Arabidopsis* family ties: molecular phylogeny and age estimates in Brassicaceae. *Taxon*, 58(2), 425-437.
- Gitz III, D. C., Liu-Gitz, L., Britz, S. J., and Sullivan, J. H. (2005). Ultraviolet-B effects on stomatal density, water-use efficiency, and stable carbon isotope discrimination in four glasshouse-grown soybean (*Glycine max*) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 343-355.
- Hakeem, K. R., Rehman, R. U., and Tahir, I. (2014). Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk: Springer.
- Honya, D., Reňák, D., and Twell, D. (2006). Male gametophyte development and function. *Plant Biotechnol*, 1, 209-22. 4.
- Iqbal Hussain, M., Naeem Asghar, H., Javed Akhtar, M., and Arshad, M. (2013). Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil and Environment*, 32(1).
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Zhao, D., and Sailaja, K. (2003). Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and forest meteorology*, 120(1-4), 191-218.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*.
- Khan, Z., Rho, H., Firrincieli, A., Hung, S. H., Luna, V., Masciarelli, O., and Doty, S. L. (2016). Growth enhancement and drought tolerance of hybrid poplar upon inoculation with endophyte consortia. *Current Plant Biology*, 6, 38-47.

- Kohan, A., Haghghi, M., Mirghaffari, N., & Ehtemam, M. H. (2021). Effect of air pollution resulting from exhaust emission on the morphological, physiologic and biochemical responses of lettuce (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) Journal of Plant Process and Function, Vol. 9, No. 4.
- Kumar, A., Singh, V. K., Tripathi, V., Singh, P. P., and Singh, A. K. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): perspective in agriculture under biotic and abiotic stress. In Crop improvement through microbial biotechnology, 333-342: Elsevier.
- Lake, J. A., Quick, W., Beerling, D. J., and Woodward, F. I. (2001). Signals from mature to new leaves. *Nature*, 411(6834), 154-154.
- Latati, M., Bargaz, A., Belarbi, B., Lazali, M., Benlahrech, S., Tellah, S., Ounane, S. M. (2016). The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. European journal of agronomy, 72, 80-90.
- Liu-Gitz, L., Britz, S. J., & Wergin, W. P. (2000). Blue light inhibits stomatal development in soybean isolines containing kaempferol-3-O-2G-glycosyl-gentiobioside (K9), a unique flavonoid glycoside. *Plant, Cell & Environment*, 23(8), 883-891.
- Ma, X., Wang, Q., Rossi, L., and Zhang, W. (2016). Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. Environmental science and technology, 50(13), 6793-6802.
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. Current opinion in plant biology, 12(3), 250-258.
- Malhotra, H., Sharma, S., and Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. In Plant nutrients and abiotic stress tolerance 171-190: Springer.
- Mayer, U., Buttner, G., and Jurgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the gnom gene. *Development*, 117(1), 149-162.
- Mehra, P., Pandey, B. K., Verma, L., and Giri, J. (2019). A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase improves phosphate deficiency tolerance in rice. *Plant, cell and environment*, 42(4), 1167-1179.

- Mehta, P., Walia, A., Kulshrestha, S., Chauhan, A., and Shirkot, C. K. (2015). Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. *Journal of basic microbiology*, 55(1), 33-44.
- Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., and O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology reports*, 2(3), 403-411.
- Minorsky, P. V. (2008). On the Inside. *Plant Physiology*, 148(2), 671.
- Mishra, N., and Sundari, S. K. (2013). Native PGPMs as bioinoculants to promote plant growth: response to PGPM inoculation in principal grain and pulse crops. *International Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 4(10), 1055-1064.
- Morgan, J., Bending, G., and White, P. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1729-1739.
- Page, D. R., and Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 124-136.
- Pagnussat, G. C., Yu, H.-J., Ngo, Q. A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C. S., Sundaresan, V. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development*, 132(3), 603-614.
- Pandey, R., Chacko, P. M., Choudhary, M., Prasad, K., and Pal, M. (2007) .Higher than optimum temperature under CO₂ enrichment influences stomata anatomical characters in rose (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae*, 113(1), 74-81.
- Panhwar, Q., Radziah, O., Zaharah, A., Sariah, M., and Razi, I. M. (2011). Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice. *Journal of environmental biology*, 32(5), 607.
- Pereira, S. I., and Castro, P. M. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance Zea mays growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological engineering*, 73, 526-535.

- Péret, B., Clément, M., Nussaume, L., and Desnos, T. (2011). Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in plant science*, 16(8), 442-450.
- Puente, M., Bashan, Y., Li, C., and Lebsky, V. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6(5), 629-642.
- Qureshi, M., Ahmad, Z., Akhtar, N., Iqbal, A., Mujeeb, F., and Shakir, M. (2012). Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *J. Anim. Plant Sci*, 22(1), 204-210.
- Scheible, W.-R., and Rojas-Triana, M. (2015). Sensing, Signalling, And Control Of Phosphate Starvation In Plants: Molecular Players And Applications. *Annual Plant Reviews, Phosphorus Metabolism in Plants*, 48, 25.
- Shamrov, I. I., Anisimova, G. M., and Babro, A. A. (2020). Early stages of anther development in flowering plants. *Botanica Pacifica: a Journal of Plant Science and Conservation*, 9(2), 3-12.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 1-14.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., and Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2(8), 755-767.
- Song, Y., Marschner, P., Li, L., Bao, X., Sun, J., and Zhang, F. (2007). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 44(2), 307-314.
- Sukriti, G., Srishti, D., Kriti, S., Nikhita, A., and Sundari, S. (2014). Investigating the role of PGPM in assisting plant growth under stress caused by organophosphate pesticide-phorate. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, (3).

- Sun, Y. M., Zhang, N. N., Wang, E. T., Yuan, H. L., Yang, J. S., and Chen, W. X. (2009). Influence of intercropping and intercropping plus rhizobial inoculation on microbial activity and community composition in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Siberian wild rye (*Elymus sibiricus* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 70(2), 218-226.
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, K., De, R., Saxena, A., Nautiyal, C. S., Johri, B. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 136-150.
- Turk, M. A., and Tawaha, A.-R. M. (2002). Impact of seeding rate, seeding date ,rate and method of phosphorus application in faba bean (*Vicia faba* L. minor) in the absence of moisture stress. BASE.
- Upadhyay, D., Dwivedi, N., Jain, V., and Mohan, R. (2002). Effect of elevated carbon dioxide concentration on the stomatal parameters of rice cultivars. *Photosynthetica*, 40(2), 315-319.
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.-H., Peix, A. (2017). The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In *Probiotics and plant health* 41-70: Springer.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Yadav, J., Verma, J. P., Jaiswal, D. K., and Kumar, A. (2014). Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological engineering*, 62, 123-128.
- Yeung, E. C. (1984). Histological and histochemical staining procedures. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 1, 689-697.
- Zahid, M. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in microbiology*, 6, 207.
- Zhang, Z., Liao, H., and Lucas, W. J. (2014) Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 192-220.

Zhu, H.-J., Sun, L.-F., Zhang, Y.-F., Zhang, X.-L., and Qiao, J.-J. (2012). Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinose* FL7. *Bioresource Technology*, 111, 410-416.

The effect of fertile biofertilizer 2 and potassium phosphate on the development of vegetative and reproductive organs of *Arabidopsis thaliana* L.

E .Basiri¹, S. Jafari Marandi², S.Arbabian³, A. Majd⁴, M.A.Malboob⁵

Received: 2021.4.24

Accepted: 2021.7.19

Abstract

Phosphate fixation by chemical fertilizers, in addition to being costly, carries environmental risks. Today, fertile phosphate biofertilizer 2 contains two types of phosphate-solubilizing bacteria, decomposes insoluble phosphorus compounds and thus absorbable for the plant. The aim of this study was to evaluate the effect of fertile biofertilizers 2 *Pseudomounas putida* (Strain P13) and *Pantoea agglomerans* (Strain P5) (only once at the beginning of the growing season) and potassium phosphate in three concentrations (0, 1.2 mM, 5 mM) (Until the end of the growing season,once a week with irrigation) on some developmental characteristics of *Arabidopsis thaliana* in greenhouse conditions, 15 hours of light, temperature 25 ° C, light intensity of 6000 lux was done in a randomized design. After cell-histology, slides were observed under a light microscope. The results showed a significant reduction in wood vascular density in the stems of plants treated with 5 mM and 1.2 mM potassium phosphate compared to the other two treatments. Also, 5 mM potassium phosphate increased the tunica layers and the special wall thickness of the tetrads. Cell proliferation of ovule primordium, pre-embryo, and suspensor was observed in plants treated with biofertilizer and 5 mM phosphate. Treatment with biofertilizer showed the highest average number of seeds produced. The application of fertile biofertilizer 2 in this experiment, with effects similar to potassium phosphate, increased the quantitative and qualitative yield of *Arabidopsis*. Biofertilizer can be effective as a safe alternative to increase soil productivity and plant growth in sustainable agriculture and minimize environmental pollution.

Keywords: anatomical structure, microbacteria, ovule primordium, pre-embryo, vegetative meristem.

¹. PhD student, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Branch of Tehran, Iran

². Associate prophesors: Iran, Tehran, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Faculty of Life Sciences. *Corresponding Author's Email: (s_jafari@iau-tnb.ac.ir)

³. Associate Professor, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Branch of Tehran, Iran

⁴. Professor, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Branch of Tehran, Iran

⁵. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.