

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

Arabidopsis thaliana

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

چکیده

تثبیت فسفات توسط کودهای شیمیایی علاوه بر پر هزینه بودن، خطرات زیست محیطی را در بردارد. امروزه کود زیستی فسفات 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 (*Pseudomonas putida* (strain P13) و *Pantoea agglomerans* (strain P5) (فقط یک‌بار در ابتدای دوره رشد) و فسفات پتاسیم درسه غلظت (0, 1.2mM, 5mM) (تا پایان دوره رشد گیاهان، هفته‌ای یک‌بار همراه با آبیاری) بر برخی ویژگی‌های تکوینی گیاه *Arabidopsis thaliana* در شرایط گلخانه‌ای، ۱۵ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، 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 پتاسیم 5 mM و 1.2 mM را در مقایسه با دو تیمار دیگر نشان داد. هم چنین فسفات پتاسیم 5mM سبب افزایش لایه‌های تونیکا و ضخامت دیواره مخصوص تترادها شد. افزایش سلولی پریموردیم تخمکی، پیش رویان و آویزه در گیاهان تیمار با کود زیستی و فسفات 5mM 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 مرندي، صدیقه اربابیان، احمد مجد، 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 آرابیدوپسیس 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.

واژه های کلیدی: پریموردیم تخمکی، پیش‌روبان، ریزوباکتری‌ها، 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 پزوتئین‌ها نقش دارند. هم‌چنین در کل گیاه متابولیسم کربوهیدرات‌ها را تحریک کرده و یکی از غنی‌ترین ترکیبات موجود در (ATP, CTP, GTP, UTP) است (Afzal *et al.*, 2005; Ciereszko *et al.*, 2017; Maathuis, 2009;) (Malhotra *et al.*, 2018; Mehra *et al.*, 2019; Péret *et al.*, 2011; Vessey, 2003).

یکی از مشکلات موجود در کشاورزی پایدار، تثبیت فسفر در خاک و غیرقابل استفاده شدن این عنصر برای گیاهان است.

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 ریشه‌ها (Amtmann *et al.*, 2005; Betencourt *et al.*, 2012; Hakeem *et al.*, 2014; Latati *et al.*, 2016; Péret *et al.*, 2011; Scheible & Rojas-Triana, 2015; Zhang *et al.*, 2014) و عامل دیگر در جذب فسفات توسط ریشه، تعدیل فعالیت میکروبی در مجاورت ریزوسفر است (Morgan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009) این میکروارگانیسم‌ها تحت عنوان (plant growth PGPM (promoting microbes) رشد گیاه را به طور مستقیم و یا غیر مستقیم تحت شعاع قرار می‌دهند (Mishra & Sundari, 2013; Sukriti *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 2017).

ریزوباکتری‌های 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 تعدیل 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 *Bacillus* و *Sudomonas* (Pseudomonas) اشاره

کرد (Tilak *et al.*, 2005).

محصولات کشاورزی با بازدهی بالا نیاز به استفاده مداوم کودهای شیمیایی در سیستم‌های زراعی دارند (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 (Qureshi et al., 2012). نتایج موفقیت آمیزی از کاربرد گونه های PGPM شامل *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* و *Enterobacteria*، روی ذرت، کلزا، گندم و سایر محصولات هم در محیط آزمایشگاه و هم در شرایط مختلف اکولوژی بدست آمده است (Abbasi et al., 2011; Almaghrabi et al., 2013; El-Sayed et al., 2014; Iqbal Hussain et al., 2013; Mehta et al., 2015; Yadav et al., 2014).

آرابیدوپسیس یک جنس از گیاهان خانواده شب‌بویان (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 ژنوم آن توالی‌یابی 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 حل‌کننده فسفات (Phosphate solubilizing bacteria (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، میکروبی‌شناسی و فناوری زیستی است (Minorsky, 2008). با فرض اینکه کودزیستی با تاثیر بر پدیده‌های رشد و نمو 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 روش ها

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 روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. گروهی از بذرها با کود زیستی فسفات تهیه شده از شرکت زیست فناوری سبز تهران، از نوع فسفات بارور ۲ آغشته شدند که حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات *Pseudomonas Putida* (P13) و *Pantoea Agglomerans* (P5) بود. سایر نمونه‌های مورد آزمایش در دومین هفته رویش بذرها، در بستر پیت، با اضافه نمودن فسفات پتاسیم با غلظت‌های (0, 1.2mM, 5mM) هفته‌ای یک بار همراه آبیاری تا پایان دوره رشد تیمار شدند. هم‌چنین به منظور تهیه برش‌گیری دستی از اندام‌های رویشی، ابتدا نمونه‌ها در الکل، گلیسرین (۱:۱) تثبیت شده و سپس برش‌گیری دستی و رنگ‌آمیزی به روش مضاعف با آبی‌متیل و کارمن‌زاجی انجام شد. برای برش میکروتومی مریستم راس ساقه، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در فیکساتور فرمالدئید ۳۷ درصد، اسیداستیک ۱۰۰ درصد اتانول ۷۰ درصد (۱۷:۱:۲) (FAA) تثبیت شدند. پس از آب‌گیری با درجات رو به افزایش الکل، شفاف‌سازی 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، رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین 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 Digimizer استفاده شد.

آزمون آماری

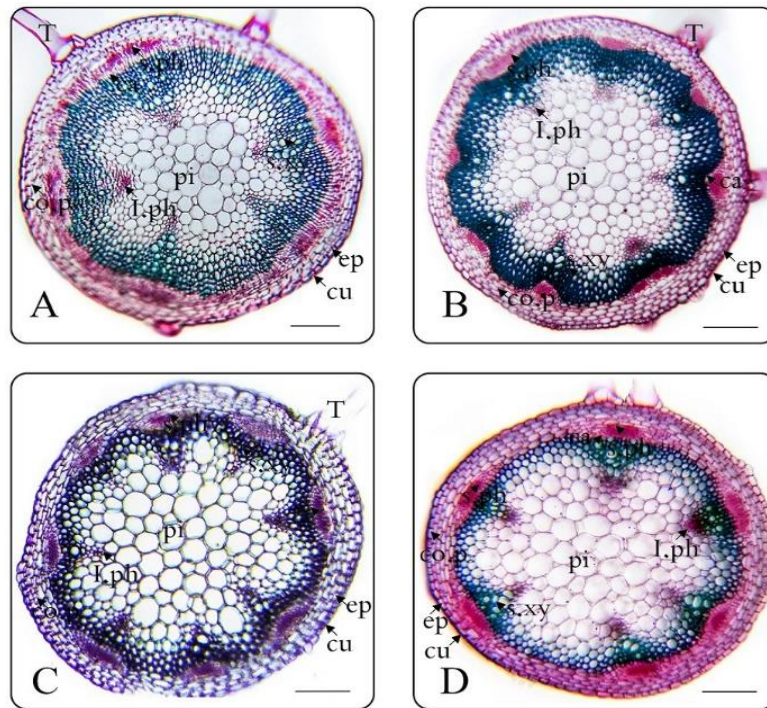
به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (20) و Excel استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ۳ تکرار (میانگین \pm انحراف معیار) گزارش شدند. سطح معنی داری آزمایش‌ها ($P \leq 0.5$) در مورد اختلافات بین میانگین پارامترهای مختلف در نمونه‌های مورد آزمایش با آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت

نتایج

بررسی ساختار تشریحی ساقه

در مشاهدات میکروسکوپی برش عرضی ساقه مشخص شد که، بیرونی‌ترین بخش را سلول‌های مکعبی شکل اپیدرم (ep) تشکیل می‌دهد که توسط لایه‌ای از کوتیکول (Cu) احاطه شده است. هم‌چنین 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 پروتوزایلم (p.x) با سایز کوچکتر در نوک دسته آوندی 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 5 mM و 1.2 mM در مقایسه با نمونه‌های شاهد و کود زیستی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱). هم‌چنین سلول‌های بافت پاراننشیم پوست در نمونه‌های تحت تیمار با فسفات پتاسیم در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار شده با کود زیستی حجیم‌تر 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 1.2 mM, D: فسفات پتاسیم 5 mM: cu کوتیکول, ep: روپوست; co.p: پاراننشیم پوستی, s.ph: آبکش

پسین, ca: کامبیوم, s.xy: چوب پسین, I.ph: آبکش داخلی, pi: مغز, T: کرک, مقیاس 50µm

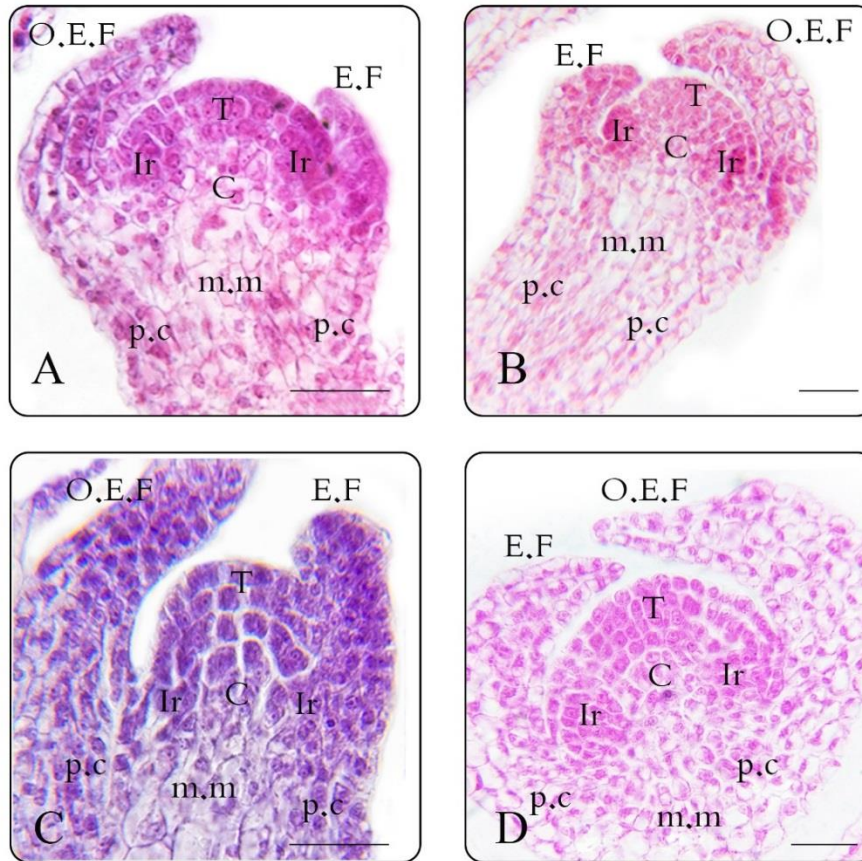
جدول ۱: مقایسه نتایج ساختاری تشریحی در ساقه آرابیدوپسیس تالیانا

| تیمار | بدون فسفات پتاسیم | کود زیستی | 1.2 mM Pi | 5 mM |
|---------------------|-------------------|------------|--------------|-------------|
| Pi | | | | |
| وسعت آوند چوبی (μm) | ۳۲/۲±۸/۵۱۵ a | ۲±۳۲/۳۸۵ a | ۱۸/۱±۶/۱۳۷ b | |
| | | | | ۱۸/۱±۶/۵۰۴b |

نتایج بصورت $x \pm SE$ 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 آرابیدوپسیس 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 حجیم است که نشانه تقسیم سلولی در آنهاست، بنابراین نسبت به سایر نواحی مریستم رنگ‌پذیری 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. رنگ‌پذیری 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 برگ (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 و کورپوس و حلقه بنیادی، به طور مشخص در حال فعالیت مشاهده می‌شود که با فعالیت خود مولد برگ‌های متناوب است. مریستم 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 نوکلئوسیتوپلاسمی 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 1.2 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. thaliana*. A: شاهد, B: کود زیستی بارور ۲, C: فسفات

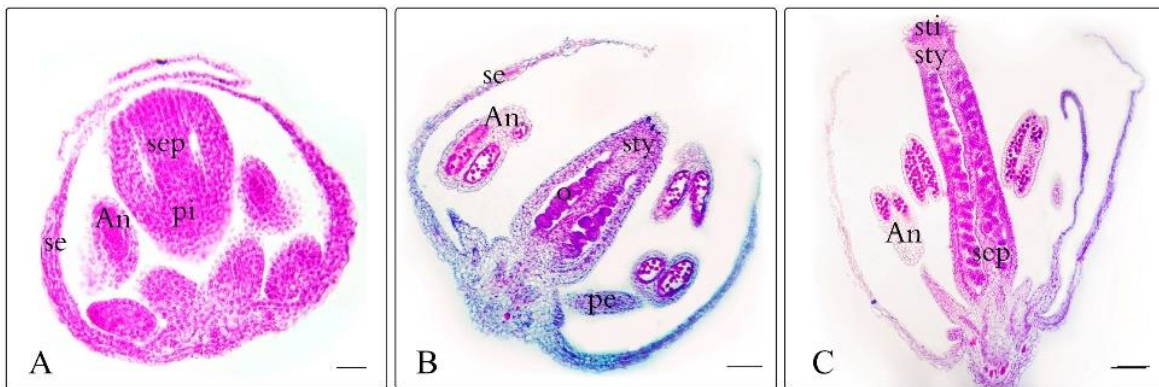
پتاسیم 1.2 mM, D: فسفات پتاسیم 5 mM, T: تونیکا, C: کورپوس, Ir: حلقه بنیادی, m.m: مریستم مغز pc

;نوارهای پروکامبیومی, E.f: طرح اولیه برگ, O.E.F: طرح اولیه برگ قدیمی, مقیاس 50µm

ضریب نوکلئوسیتوپلاسمی در مقایسه با دو نمونه قبل افزایش یافته است. در گیاهان تحت تیمار با فسفات 5mM مریستم تقریباً همگن است و تمام سلول‌ها شروع به فعالیت کرده است که در نتیجه لایه تونیکا ۴ لایه‌ای و مریستم در مقایسه با نمونه شاهد حجیم‌تر شده است (شکل ۲).

بررسی ساختار تشریحی تکوین تخمک

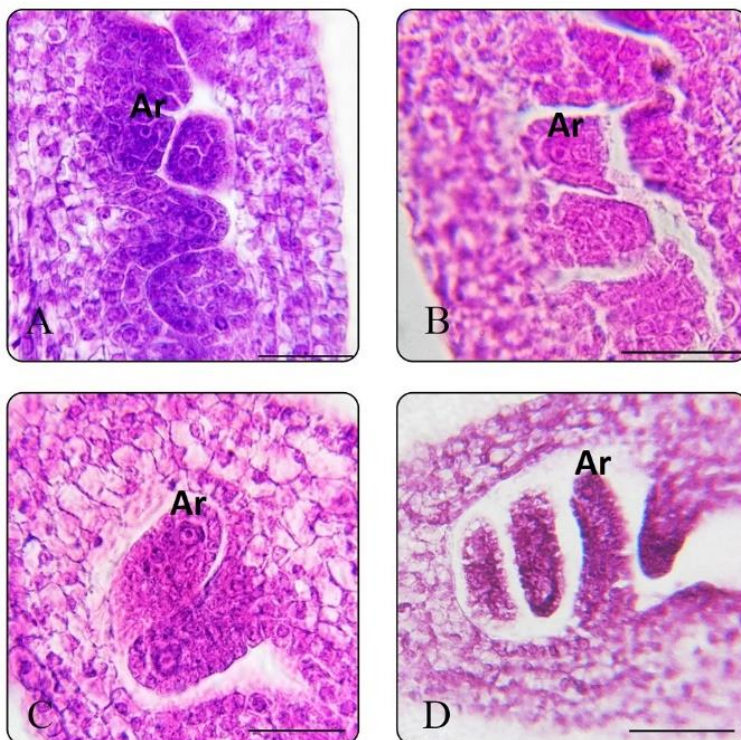
با تکوین پرچم‌ها، توده میانی مریستم هاگزا در جهت تشکیل مادگی تمایز می‌یابد. تخمدان در ابتدا تخم مرغی (شکل-A) و سپس به شکل کشیده در می‌آید (شکل-B). نهایتاً به سه بخش تخمدان، خامه و کلاله تمایز می‌یابد (شکل-C). تخمدان در گونه مورد بررسی به صورت فوقانی است، بدین صورت که مادگی بالاتر از نقطه اتصال گلبرگ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



شکل ۳: برش طولی گل *A. thaliana* تکوین تخمدانی (دو برچه با تیغه میانی بین آنها) **pi**: مادگی, **sep**: تیغه میانی,

se: کاسبرگ, **pe**: گلبرگ, **An**: پرچم, **o**: تخمک, مقیاس **50µm**

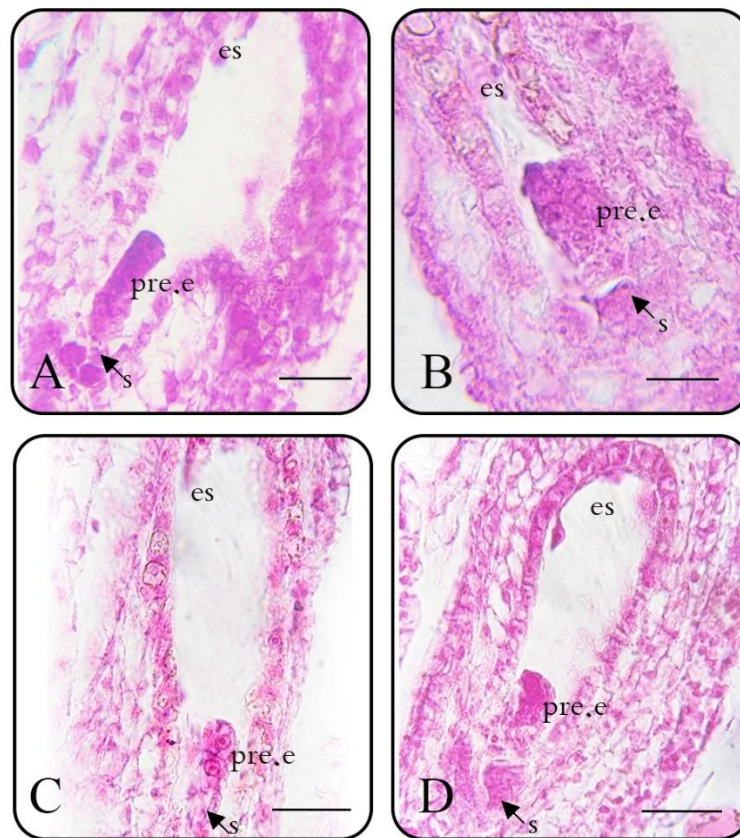
بنیان تخمکی به صورت برآمدگی کوچکی ابتدا در بخش کناری حفره تخمدان تشکیل شده و تمکن از نوع محوری است (شکل ۳-B). تخمک به صورت برجستگی کوچک کم و بیش کروی (پرموردیوم تخمک) در جدار تخمدان قبل از تکوین بخش‌های فوقانی تخمدان و تشکیل خامه و کلاله پدیدار می‌شود (شکل ۳-B). پرموردیوم تخمکی در گروه‌های تیمار با کود زیستی و فسفات پتاسیم 5 mM و 1.2 Mm، نسبت به گروه شاهد که کوتاه‌تر و گنبدی 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 1.2, D: 5 mM فسفات پتاسیم 5 mM, Ar: آرکئوسپور, مقیاس 50µm.

بررسی تشریحی پیش‌رویان

سلول تخم در امتداد محور راسی پایه‌ای طویل شده و به دنبال آن تقسیم نامتقارن رخ می‌دهد. پیش‌رویان و سوسپانوسور حاصل تقسیم نامتقارن در سلول زیگوت هستند سلول کوچک‌تر، یعنی سلول راسی رویان و سلول بازال سوسپانوسور را تولید می‌کند سلول‌های سوسپانوسور به طور قابل ملاحظه‌ای واکنشی هستند اما سلول‌های رویان با اندازه کوچک‌تر و سیتوپلاسم متراکم و بدون واکنش از سوسپانوسور قابل تشخیص اند (شکل ۵). تقسیمات پیش‌رویان در نمونه‌های تحت تیمار فسفات پتاسیم 5mM 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 5mM). این سلول‌ها در گیاهان شاهد و 1.2 mM فسفات پتاسیم درشت‌تر و کاملاً مشخص هستند در حالیکه در نمونه‌های دیگر سلول‌ها کوچک‌تر شده و به راحتی قابل تفکیک و تمایز نیستند. هم چنین تعداد سلول‌های سوسپانوسور (آویزه) با تقسیمات پری کلینال و آنتی کلینالی خود در گیاهان تیمار با کود زیستی و 5mM فسفات پتاسیم افزایش یافته‌اند که در مقایسه با نمونه شاهد پهن تر به نظر می‌رسد (شکل ۵).



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

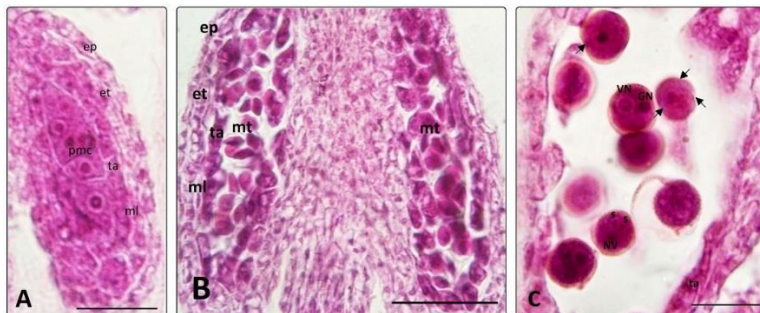
A: شاهد, B: کود زیستی بارور ۲, C: فسفات پتاسیم 1.2 mM, D: فسفات

پتاسیم 5 mM, es: پیش‌رویان, s: آویزه, مقیاس 50µm.

میکروسپورزایی و نمو دانه

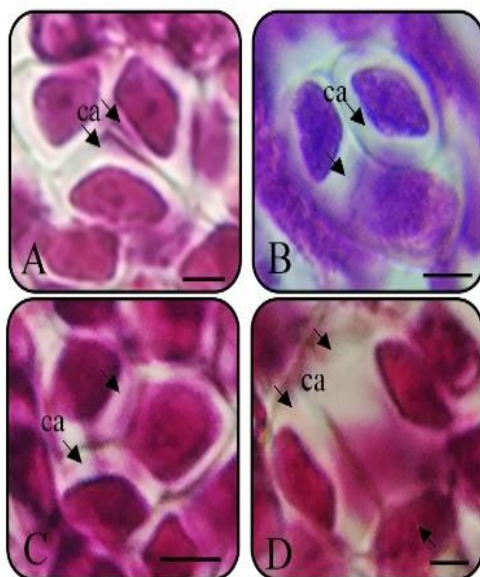
سلول‌های بافت هاگ‌زای به وجود آمده از سلول‌های آرکتوسپور به سلول‌های مادر گرده تمایز پیدا می‌یابند. سلول‌های مادر گرده با سیتوپلاسم متراکم، اندازه بزرگ و هسته‌های مشخص از سلول‌های بافت احاطه‌کننده متفاوت هستند (شکل ۶-۱). یاخته‌های مادر گرده با تقسیم میوزی تتراسپورها هاپلوئیدی را تولید می‌کنند. در اطراف 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 ۶-۲) و تترادها (آرایش تترادها میکروسپور در داخل دیواره کالوزی در گونه مورد بررسی از نوع تتراهدردال و به ندرت از نوع تترگونال است) مشاهده می‌شود (شکل ۶-۲). گرده بالغ کروی و منفذدار با سه هسته (یک هسته رویشی و دو اسپرم) قابل رویت است (شکل ۶-۳).

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 نمو دانه 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 رویشی دانه گرده، GN: هسته زایشی دانه گرده، S: اسپرم.

مقیاس 50µm.



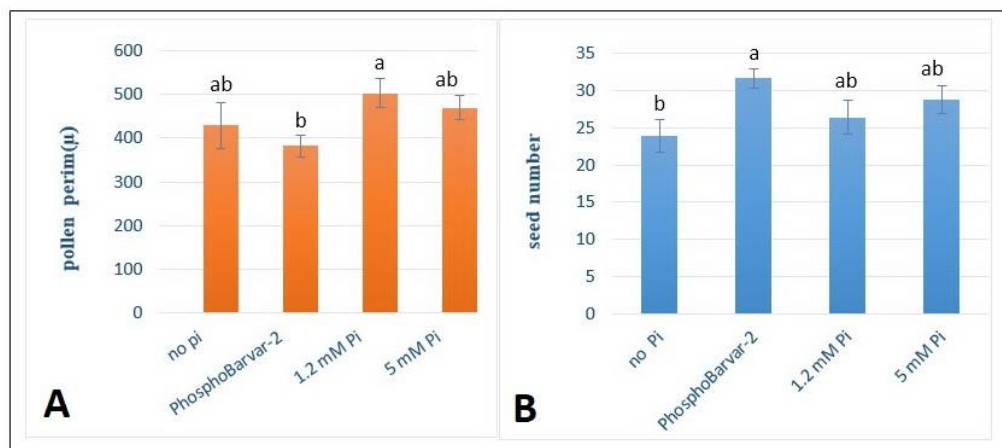
شکل ۷: بررسی ضخامت دیواره ویژه A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات پتاسیم 1.2 mM، D: فسفات

پتاسی 5 mM، ca: لایه کالوز (دیواره ویژه)، مقیاس 10µm.

ویژگی ریخت‌شناسی

بررسی تشریحی دانه گرده و تعداد دانه

نتایج حاصل از بررسی‌های تشریحی دانه گرده نشان می‌دهد تنها بین دو گروه 1.2 mM فسفات و کود زیستی اختلاف معنی‌داری وجود دارد و بیشترین محیط دانه گرده به نمونه‌های تیمار با 1.2 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 کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر محیط دانه گرده (نمودار A) و تعداد دانه

گیاه (نمودار B) *A.thaliana*

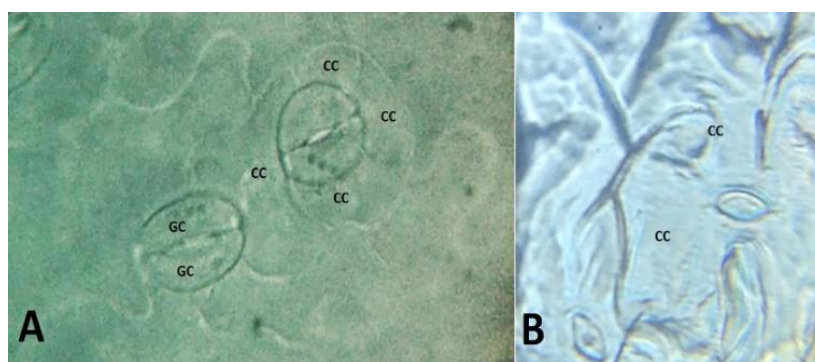
جدول ۲: مقایسه نتایج محیط دانه گرده و تعداد دانه در غلاف در گیاه آراییدوپسیس تالیانا

| تیمار | بدون فسفات پتاسیم | کود زیستی | 1.2 mM Pi | 5mM Pi |
|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| محیط دانه گرده µm | ۴۲۹/۵۲±۸۶۰/۵۱۷ ab | ۳۸۱/۲۴±۶۸۳/۷۶۵ b | ۵۰۳/۱۸۷ ۳۱±/۰۹۸ a | ۴۶۹/۲۸±۲۶۹/۰۶۷ ab |
| تعداد دانه در غلاف | ۲۳/۹۲ ۲±/۲۱۱ b | ۳۱/۶۲ ۱±/۲۷۱ a | ۲۶/۲±۳۹/۲۷۳ ab | ۲۸/۱±۷۵/۹۱۳ ab |

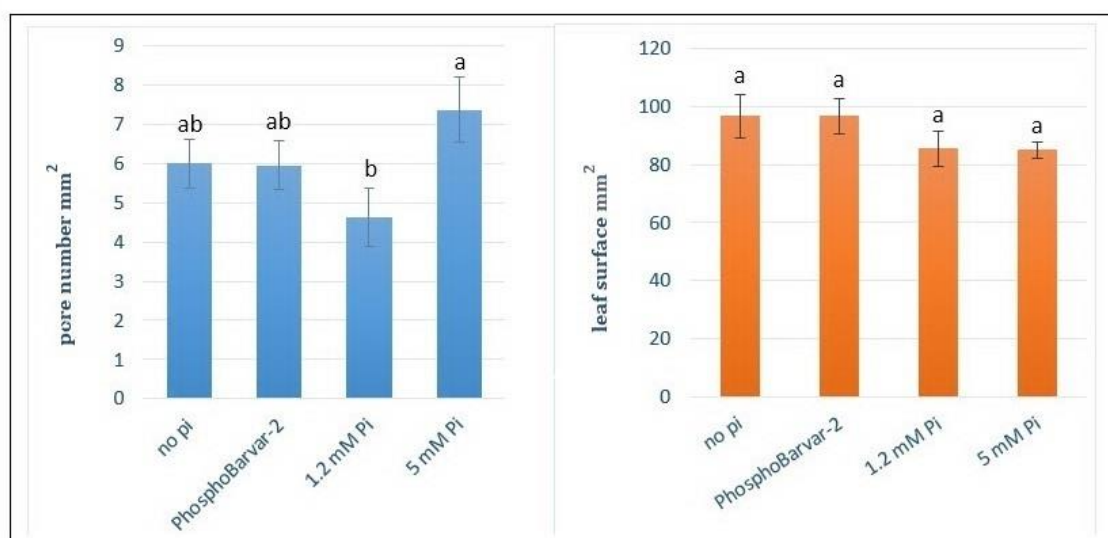
نتایج بصورت $x \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است

بررسی تعداد روزنه و سطح برگی

در گیاه *A.thaliana* سلول‌های همراه اطراف سلول‌های نگهبان اندازه متفاوتی دارند و از نوع آنیزوسیتیک هستند (شکل ۹-۱). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در غلظت‌های مختلف فسفات، میانگین تعداد روزنه، به طور معنی‌داری در نمونه‌های فسفات پتاسیم ۵mM بیش از نمونه‌های فسفات پتاسیم ۱.۲ mM است و با نمونه‌های دیگر آزمایش اختلاف معنی‌داری ندارد (شکل ۱۰-۱). (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 ۱۰-۲) (جدول ۳).



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



شکل ۱۰: نمودار تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تراکم روزنه (نمودار A) و سطح برگی (نمودار B) گیاه

A.thaliana

جدول ۳: مقایسه نتایج تراکم روزنه و سطح برگ گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

| تیمار | بدون فسفات پتاسیم | کود زیستی | 1.2 mM Pi | 5 mM Pi |
|------------------------|-------------------|--------------|--------------|-------------|
| تراکم روزنه (mm^2) | ۰±۶/۶۲۳ab | ۵/۰±۹/۶۲۳ab | ۴/۰±۶/۷۴۱ b | ۷/۰±۳۶/۸۲۳a |
| سطح برگ (mm^2) | ۹۶/۷±۶/۲۶۴ a | ۹۶/۶±۸/۰۶۵ a | ۸۵/۵±۵/۰۹۷ a | ۲±۸۵/۰۸۶ a |

نتایج بصورت $x \pm SE$ 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 لپه‌ای‌ها 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 هم‌سو نیست. 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.

Zahid و همکاران (2015) گزارش دادند که 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 کارایی 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 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. بنابراین این 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. میکروارگانیزم‌های 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 حل‌کننده فسفات است که با ترشح آنزیم‌های فسفاتاز و نیز اسیدی کردن خاک سبب رهاسازی یون فسفات از ترکیبات کم‌محلول فسفر می‌شود. این امر سبب افزایش قابلیت جذب فسفر توسط گیاهان می‌گردد (توحیدی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۲؛ ملبویی، ۱۳۸۶؛ Sharma *et al.*, 2013).

مشاهدات بافت‌شناسی ساقه گیاه *آرابیدوپسیس*، 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 نیترا پتاسیم که وسعت دستجات آوندی ساقه در نمونه‌های تیمار با پتاسیم ۱۵۰ کیلوگرم کود در هکتار کاهش معنی‌داری 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.*, 2019; Mehra *et al.*, 2019; Malhotra *et al.*, 2018). بخش مهمی از واحد انرژی (ATP) است که به رشد و بلوغ کمک می‌کند. رشد و افزایش لایه‌های تونیکا در مریستم رویشی گیاهان تیمار با فسفات پتاسیم 5mM با تحقیقات فوق هم‌سو است. زندگی گیاهان بین دو مرحله اسپوروفیتی (دیپلوئید) و گامتوفیتی (هاپلوئیدی) در چرخه است در آنژیوسپرم‌ها، اسپوروفیت گیاه گل‌دهنده و نسل برجسته‌تری 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 رویشی است و در نهایت باعث تولید اندام‌های تولیدمثلی حاوی سلول‌های اسپوروژن دیپلوئید می‌شوند (Hony *et al.*, 2006). تجزیه و تحلیل نشان داده که هنگام مطالعه بساک گیاهان گلدار مجموعه‌ای از مشکلات جنین‌شناسی حل نشده، مربوط به شروع میکروسپورانژ و زمان تمایز آرکتوسپور 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 پیش‌رویابان و سوسپانسون در گیاهان تحت تیمار با فسفات 5mM 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 5 mM ناشی از اثرات فسفات قابل دسترس برای گیاه است.

برخی محققین بیان داشته‌اند که تلقیح بذر با باکتری‌های حل‌کننده 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;). 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 *آفتابگردان* توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات توسط اکین (Ekin, 2010) مطابقت دارد.

پاسخ روزه‌ها به تغییرات محیطی و هدایت روزه‌ای آن‌ها به صفاتی همچون قطر روزه، تراکم روزه، شاخص روزه، اندازه سلول‌های محافظ و منافذ روزه و سطح برگ مربوط است. در میان این صفات تراکم روزه از مهمترین پارامترهای اکوفیزیولوژیکی است که بر تبادلات گازی بین گیاه و اتمسفر مؤثر است (Lake *et al.*, 2001; Uprety *et al.*, 2002). محققین نشان داده‌اند که صفات تشریحی گیاهان مانند تراکم روزه، تراکم سلول‌های اپیدرمی و طول روزه تحت تاثیر عوامل محیطی از جمله دما (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 (مجد و همکاران، ۱۳۸۵)، سطوح مختلف CO₂ (Das, 2003) تغییر می‌کنند. مقایسه تعداد روزه در گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری را در تعداد روزه در سطح برگ فسفات پتاسیم 1.2 mM و 5 mM نشان می‌دهد. بیشترین تراکم روزه مربوط به گیاهان تیمار شده با فسفات پتاسیم 5 mM است. نتایج این پژوهش با مطالعات Kohan و همکاران (2021) که افزایش معنی‌دار تراکم روزه های گیاهان کاهو در معرض آلودگی هوا (ناشی از دود آگروز 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

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 *راییدوپسیس* 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

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

توحیدی‌نیا، م. ع. د. مظاهری، 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 ویژگی های تشریحی، عملکردی گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum L.*) و میزان پتاسیم خاک در پاسخ به نیترات پتاسیم. فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی تکوینی. سال نهم، شماره ۲

مجدد، الف. جعفری یزدی، الف. فلاحیان، ف. الف. خاوری نژاد، ر. ع. برنارد، ف. جاویدفر، ف. ۱۳۸۵. اثر تنش خشکی و آبسیزیک اسید بیرونی بر تکوین گیاه کلزا (*Brassica napus L.*). ویژه نامه زیست شناسی. دوره ۱۶، شماره ۶۲. صفحه ۱-۱۱

مجیدیان، م. الف. فلاوند، ع. الف. کامکار حقیقی، ن. کریمیان. ۱۳۸۷. تاثیر تنش خشکی، کود نیتروژن و کود آلی بر قرائت کلروفیل، عملکرد دانه و اجزای عملکرد ذرت دانه‌ای رقم سنگل کراس ۷۰۴. مجله علوم زراعی ایران. جلد ۱۰، شماره ۳. صفحه ۳۳۰-۳۰۳

ملبویی، م. ع. ۱۳۸۶. ویژگیهای کود زیستی فسفات بارور ۲. جهاد دانشگاهی، زیست فناوری 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.
- Honys, 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-phosphate. *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*.
- Uprety, 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 *Pseudomonas 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 professors: 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.