Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima Bradyrhizobium japonicum i Pseudomonas fluorescens

Lenkert, Bernarda

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:638935

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens*

DIPLOMSKI RAD

Bernarda Lenkert

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens*

DIPLOMSKI RAD

Bernarda Lenkert

Mentor: prof.dr.sc. Sanja Sikora

Neposredni voditelj: Sanja Kajić, mag. biol. mol.

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Bernarda Lenkert**, JMBAG 017809499, rođen/a 08.09.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens*

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Bernarda Lenkert**, JMBAG 017809499, naslova

Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens*

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	prof. dr.sc. Sanja Sikora	mentor	_____
	Sanja Kajić, mag. biol. mol.	neposredni voditelj	_____
2.	prof. dr.sc. Ana Pospišil	član	_____
3.	Izv. prof. dr.sc. Mihaela Blažinkov	član	_____

Sadržaj

1. Uvod 1

Cilj istraživanja 3

2. Pregled literature 4

Soja – *Glycine max.* (L.) Merr. 4

2.1.1. Karakteristike kvržica 6

Biološka fiksacija dušika 7

2.1.2. Prepoznavanje kvržičnih bakterija i mahunarki 8

2.1.3. Infekcija 9

2.1.4. Nodulacija 10

2.2. Kvržične bakterije 10

2.2.1. Kvržična bakterija *Bradyrhizobium japonicum* 11

2.2.2. Kvržična bakterija *Sinorhizobium spp.* 13

2.3. Značaj ko-inokulacije 14

2.3.1. Fiksacija dušika 16

2.3.2. Biodostupnost fosfora 16

2.3.3. Proizvodnja fitohormona 17

2.3.4. Rizobakterija - *Pseudomonas fluorescens* 17

2.4. Endofiti 19

3. Materijali i metode 21

3.1. Sorta soje 21

3.2. Bakterijski sojevi korišteni u istraživanju 21

3.3. Priprema inokuluma za bakterizaciju soje 22

3.4. Vegetacijski pokus 23

4. Rezultati i rasprava 26

4.1. Procjena učinkovitosti autohtonih sojeva kvržičnih bakterija i bakterije *P.* fluorescens 26

4.1.1. Broj kvržica po biljci 27
4.1.2. Masa suhe tvari kvržica po biljci 28
4.1.3. Masa suhe tvari nadzemnoga dijela biljke 29
4.1.4. Duljina korijena 30

5. Zaključak 31

6. Popis literature 33

7. Životopis 46

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Bernarda Lenkert**, naslova

Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens*

Soja predstavlja jednu od vodećih ratarskih i ekonomski važnih kultura u svijetu. Predsjetvena bakterizacija soje osigurava opskrbu dušikom prirodnim putem te time umanjuje potrebu za unosom mineralnih gnojiva. Velike klimatske promjene su potaknule selekciju kultivara soje te sojeva kvržičnih bakterija s ciljem prilagodbe novonastalim ekološkim uvjetima. Selekcija autohtonih sojeva kvržičnih bakterija igra važnu ulogu u većem iskorištavanju procesa biološke fiksacije dušika, jer predstavlja vrijedan genentski potencijal određene važne poljoprivredne regije. Pravilan odabir bakterijskog soja osigurava raniju i efikasniju infekciju i nodulaciju te optimalno usvajanje atmosferskog dušika. Cilj ovoga istraživanja je utvrditi utjecaj inokulacije soje sa različitim sojevima kvržičnih bakterija i korisnim bakterijama koje pospješuju rast biljaka, te koji će se od autohtonih sojeva kvržičnih bakterija pokazati najefikasniji u nodulaciji soje. U svrhu istraživanja proveden je pokus u kojemu su korišteni autohtoni sojevi kvržičnih bakterija izolirani sa različitih lokacija Hrvatske te *Pseudomonas fluorescens* kao bakterija koja promovira rast biljaka. Rezultati istraživanja pokazali su kako je ko-inokulacija kvržičnih i PGPR bakterija primjer iskorištavanja korisnih mikroorganzama u uzgoju soje te se kao takav može smatrati jednim od vrlo značajnih alata biotehnologije u sustavima održive poljoprivrede.

Ključne riječi: soja, *Bradyrhizobium japonicum*, inokulacija, PGPR, nodulacija, simbiozna učinkovitost

Summary

Of the master's thesis-student Bernarda Lenkert**,** entitled

Co-inoculation of soybean seed with indigenous strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Pseudomonas fluorescens*

Soybean is one of the world's leading agricultural and economically important crops. Soybean inoculation can provide natural supply of plants with nitrogen, thereby reducing the need for input of synthetic fertilizers. Large climate changes have encouraged selection of soybean cultivars and strains of nodule bacteria that would adapt to new ecological conditions. Selection of indigenous rhizobial strains plays an important role in soil microbiology, as it represents valuable genetic potential from a certain agricultural region. Proper bacterial strain selection can provide an earlier and more effective infection, nodulation and fixation of atmospheric nitrogen. The aim of this research was to determine the impact of soybean inoculation with different strains of nodule and PGPR bacteria, and to establish which of the indigenous strains will provide the most effective soybean nodulation. For this purpose vegetation pot experiment was conducted in which indigenous rhizobial strains isolated from different regions Croatia and bacterium with plant growth promoting abilities – *Pseudomonas flurescens* were tested. The result of the study showed that soybean co-inoculation with nodule bacteria and PGPR is a example for positive relationship between microorganisms and legumes that can be considered as one of the important tools of biotechnology in sustainable agricultural systems.

Keywords: soya bean, *Bradyrhizobium japonicum,* inoculantion, PGPR, nodulation, symbiotic efficiency

1. Uvod

Povećanjem broja stanovnika javlja se potreba za efikasnijom proizvodnjom hrane. Moderna održiva poljoprivreda teži ka iskorištavanju prednosti prirodnih resursa svake pojedine lokacije, supstrata u koji se kultura sije, te tako i autohtone mikrobne populacije koja je prisutna u tlu. U konačnici održiva poljoprivreda se okreće nedestruktvnim metodama uzgoja koje smanjuju korištenje mineralnih gnojiva i pesticida, gledajući sveobuhvatan utjecaj agrotehnike na okoliš. Dugoročna primjena dušićnih gnojiva na poljoprivrednim tlima uzrokuje: degradaciju tla, narušavanje njegovih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava, zagađenje podzemnih i nadzemnih voda te njihovu eutrofikaciju (Topol, 2012). U zemljištu sa formiranim profilom, mikroorganizmi održavaju njegovu strukturu, nivo organske tvari i stablinost drugih svojstva tla. Mikroorganizmi u ukupnim tranfosrmacijama u tlu sudjeluju sa oko 60 – 80 %, dok glavnu ulogu imaju u procesima kao što je kruženje tvari i energije (Jarak i Đurić, 2008.). Prilikom ocjenjivanja plodnosti i kvalitete tla raznovrsnost i enzimatska aktivnost mikrobne populacije veoma su značajni paramteri (Milošević et al., 2007; Milošević et al., 2008). Sve je više prisutna primjena rizobakterija i kvržičnih bakterija u biljnoj proizvodnji kao mjera koja smanjuje potrebu za unosom dušičnih gnojiva, no mogu se primjeniti i za obnovu plodnosti tla (Jarak i Đurić, 2008.). Mahunarke predstavljaju neizostavnu komponentu u održivoj poljoprivredi i/ili plodoredu zbog svoje sposobnosti da se same snabdjevaju dušikom, tj. da stupaju u simbiozni odnos s bakterijama tla koje imaju sposonost fiksacije atmosferskog dušika.

Proces fiksacije dušika označava vezanje elementarnog odnosno molekula plinovitog dušika(N_2) iz atmosfere i njegovo prevođenje u oblike koje mogu iskoristiti mikroorganizmi ili biljke. Prilikom transformacije prekida se njegova trostrka veza te se on transformira u anogranski reaktivni oblik, što doprinosi unosu dušika u tlo od 100 – 175 milijuna tona/godišnje na planetu (Bottomley i Mylord 2007.). Antorpogeni utjecaj na ukupnu biološku fiksaciju dušika dodaje još 50 – 70 t/god. koje se koriste u poljoprivredi (Herridge et al. 2008; Lindström et al., 2010.). Prilikom fiksacije dušika potrebne su i troše se velike količine fosfora. Prema Vadez et al.(1997.) potrebe za fosforom su do 3 puta veće u kvržica nego u okolnog korijenja jer se fosfor troši u enzimatskoj transformaciji N_2 u NH_3^+.

Biološka fiksacija dušika kod kultiviranih biljaka djeluje pozitivno na sam rast biljke te doprinosi održivosti razvoja usjeva i utječe na smanjenje emisija stakleničkih plinova jer ona zamijenjuje dušićna gnojiva koja se dobivaju uz utrošak neobnovljivih izvora energije (Boddey et al., 2009.).

Soja se zbog svojih karakteristika kao što su odličan izvor proteina za ljude i životinje, vrlo visoke iskoristivost te relativno nezahtjevnog način uzgoja, smatra jednom od vodećih svjetskih kultura što se tiče ekonomičnosti uzgoja. Kod uzgoja soje koriste se velike količine dušićnih gnojiva. Glavni cilj inokulacije usjeva mikrobiološkim preparatom je smanjiti unos mineralnih dušičnih gnojiva, smanjiti mobilizacije nevezanih dušičnih spojeva u podzemne i nadzemene vode, tlo i zrak te smanjiti troškove prilikom uzgoja usjeva. Prema Zimmer et al.(2016.) soja ima sposobnost dobivanja dušika iz simbioze sa kvržičnim bakterijama *Bradyrhizobium spp*. Navedene bakterije nisu autohtone u europskim tlima pa je sjeme soje potrebno inokulirati sojevima *Bradyrhizobium spp.*

Aplikacijom mikrobiološkog preparata u tlo kod usjeva se poboljšava usvajanje esencijalnih hranjiva i vode, te će usjevi efikasnije iskorištavati dodana sintetska gnojiva ili minerale (Schoebitz et al. 2013.). Osim unosa mikrobiološke populacije u tlo također je vrlo česta metoda inokulacije samog sjemena usjeva. Glavna svrha inokulacije sjemena je osigurati dovoljan broj živućih kvržičnih bakterija koje će inficirati korijen mahunarki te time omogućiti nodulaciju ubrzo nakon klijanja (Thompson 1988.; Catroux 1991.). Komercijalni mikrobiološki preparati su prvi puta predstavljeni 1896. godine koristeći kulture *Rhizobium spp.*, koje su uzgajane u plitkim staklenim bocama u malo želatinoznog medija (Smith 1992.). Godine 1887. znanstvenici Hellriegel i Wilfarth svojim su eksperimentom dokazali da je N_2 fiksacija povezana s kvržicama na korijenu mahunarki te da je provode infektivni biološki agnesi u kvržicama. Ti agensi variraju u sposobnosti nodulacije različite grupe biljaka. Godinu dana kasnije Beijerinck je uspio izolirati kvržične bakterije (Fred et al., 1932.). Beijerinck je došao do zaključka da mahunarke iste potporodice (taksonomski u bliskome srodstvu) nodulira ista vrsta *Rhizobium spp.* te je tako potreba za inokulacijom sjemena mahunarki postala opće prihvaćena kada se radilo o uzgoju na tlima na kojima mahunarke prethodno nisu uzgajane (Deaker et al.,2006.).

Veliku važnost mikrobiologija tla polaže na selekciju autohtonih sojeva kvržičnih bakterija nekog podneblja. Klima se svakim danom sve više mijenja te je za efikasnu bakterizaciju i što

bolji rast i razvoj usjeva potrebno provesti niz biokemijskih, fenotipskih i genotipskih testova i selekciju kojom dobivamo sojeve prilagođene ekološkim uvjetima svakog pojedinog uzgojnog podneblja. Prilikom selekcije autohtonih sojeva kvržičnih bakterija nekoliko ključnih karakteristika igra glavnu ulogu: sposobnost agresivne kolonizacije korijena biljke domaćina, prilagodivost same bakterije uvjetima sredine, sposobnost uspostave simbizonog odnosa s biljkom domaćinom te sposobnost efikasnog usvajanja dušika i promoviranja rasta biljaka putem drugih mehanizama. Na selekciji se neprekidno radi jer su tla bogata autohtonim populacijama rizobakterija i kvržičnih bakterija koje su se optimalno prilagodile uvjetima sredine te predstavljaju neizostavnog sudionika-pomagača prilikom uzgoja usjeva načinima održive poljoprivrede. Cilj same selekcije jer primjena ciljane populacije bakterija kao bakterijskog preparata, prilikom uzgoja nekoga usjeva kako bi se osigurala optimalna infekcija, nodulacija i fiksacija dušika te time i opskrba biljke neizostavnim esencijalnim hranjivom.

Jedan od novijih alata biotehnologije su svakako i ko-inokulacija koje uključuje PGPM (eng. *plant growth promoting microorganism*) te kvržične bakterije. PGPM uključuju različite rodove bakterija i gljiva te se koriste za poboljšanje rasta usjeva. Primjenjuju se u predsjetvenoj ko-inokulaciji kao više predstavnika PGPM ili zajedno sa kvržičnim bakterijama, a cilj njihove primjene je višestruk: zaštita usjeva od patogena i bolesti, opskrba teško dostupnim hranjivima (fosfor, dušik) te proizvodnja fitohormona koji direktno djeluju na rast biljke. Ko-inokulacije različitih bakterija ili bakterija i gljiva te njihove interakcije u pojedinim kombinacijama zasada nisu u široj primjeni premda su započela intenzivna istraživanja na ovom području.

Pretpostavka je da će istovremena primjena kvržičnih i rizobakterija u predsjetvenoj inokulaciji soje doprinjeti poboljšanom rastu i razvoju bakterijskih vrsta te time i biljke, te da će se različiti autohtoni sojevi međusobno razlikovati po svojim nodulacijskim i drugim simbioznim svojstvima.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bilo je utvrditi utjecaj bakterizacije soje sa različitim sojevima kvržičnih bakterijama i bakterijama koje pospješuju rast biljaka na simbioznu učinkovitost te rast soje.

2. Pregled literature

2.1. Soja-*Glycine max.*(L.) Merr.

Soja predstavlja jednu od vodećih ratarskih kultura u svijetu te je glavna bjelančevinasta i uljna kultura. Soja je stara ratarska kultura, koja se uzgaja više od 4 000 godina. Zrno soje koristi se kao izvor jestivih ulja i bjelančevina za ishranu ljudi i stoke, te u razne prerađivačke svrhe. Stoga upravo važnost i značaj soje proizlazi iz kakvoće njenog zrna. Zrno soje sadrži 35-50% bjelančevina te 18-24% ulja, ovisno o sorti i uvjetima uzgoja. Bjelančevine iz zrna soje su bogate esencijalnim aminokiselinama, posebice lizinom i metioninom, te su najsličnije bjelančevinama životinjskog podrijetla. Osim bjelančevina i ulja od bitnih komponenti zrno soje još sadrži: K, Na, B-kompleks, vitamine A,D,E i K. Soja se kod prerade može iskoristiti do 100%. Danas se pri preradi soje najveći dio proizvedenog sojinog zrna u svijetu koristi za ishranu stoke. Preradom sojinog zrna dobiva se ulje i drugi proizvodi (sačma, pogača, brašno, teksturalni bjelančevinasti koncentrai, izolati) koji se koriste u prehrani ljudi, domaćih životinja te kao sirovina u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji (Vratarić i Sudarić, 2008). Soja je vrlo korisna komponenta plodoreda jer zajedno sa kvržičnim bakterijama obogaćuje tlo dušikom. Ima sposobnost premještanja i aktiviranja hranjiva iz teže topivih oblika u lakše pristupačne oblike te time popravlja strukturu i plodnost tla (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Soja pripada porodici *Fabaceae* odnosno mahunarki. Porijeklo kulturne soje je iz zemalja Dalekog Istoka (Kina), a starost joj je 4000-5000 god. Kultivirana soja *Glycine max.* (L.) Merr je uspravna, granata, jednogodišnja biljka. Sjeme soje je različitog oblika i veličine što ovisi o sorti i načinu uzgoja. Oblik varira od okruglog do spljoštenog oblika. Sjeme je građeno od embrija kojeg obavija sjemena ljuska. Sjemena ljuska završava hilumom ili sjemenskim pupkom. Sjemena ljuska građena je od tri sloja: epiderme, hipoderme i unutarnjeg parenhima. Biljku soje karakterizira jaki korijenov sustav visoke apsorpcijske sposobnosti. Korijenov sustav se sastoji od jakog glavnog vretenastog korijena i velikog broja sekundarnih korijena, rasprostranjenih na različitim dubinama tla. Na razvitak korijenova sustava utječe raspoloživost vode i hranjiva u tlu, sastav zemljišta te asimilirana energija. Veličina i rasprostranjenost korijena i broj kvržica značajno utječu na konačan urod zrna soje. Korijen

ide u dubinu do 180 cm, no glavnina njegove mase nalazi se u rizosfernom sloju tla (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Kvržice su izrasline korijena u kojima žive kvržične bakterije, simbiozni partner biljke soje. One su mjesto asimilacije i transformacije atmosferskog dušika ubiljkama pristupačnije forme dušika kao što je nitratni ili amonijski oblik.

Prema habitusu i visini stabljike soja varira u nadzemnome dijelu između 80 i 120 cm, ovisno o sorti i uvjetima rasta. Prosječna visina do prve mahune je 4 do 16 cm, ovisno o genotipu i načinu uzgoja. Boja stabljike je tokom vegetacije zelena a u zriobi svjetlo do tamno žute boje. Soja posjeduje četri osnovna tipa lista: kotiledoni, jednostavni primarni listovi, troliske i zalisci (trokutasti listovi). Jednostavni primarni listovi formiraju se u sjemenci i dobro su razvijeni kada klijanac izbija na površinu. Ova tip lista uvijek je smješten nasuprotno dok su svi ostali tipovi listova poredani naizmjenično. Većina sorata soje ima listove s tri liske, u prosjeku od 15 do 20 listova po biljci (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Cvijet je veličine 3 – 8 mm. Boja cvijeta može biti bijela, ljubičasta ili kombinacija. Cvjetovi se stvaraju u pazšku lista ili grana. Cvijet je sastavljen od čaške, vjenčića, prašnika i tučka. Mahuna je plod biljke soje. Oblik joj varira od srpastog, okruglog ili spljoštenog ovisno o sorti soje. Oblik mahune direktno određuje broj i oblik sjemenki. Mahuna u prosjeku sadrži jedno do pet zrna. Boja mahuna u sezoni je zelena a u vrijeme zriobe varira od slamnatožute do crne. Klimatski činitelji utječu na nijansu boje mahune, tj. hoće li izvorna boja biti svjetlija ili tamnija. Ne postoji jasno definiran prijelaz između cvatnje i stvaranja mahune te se na istoj biljci mogu naći cvijetovi, mahune i ocvali cvjetovi. Prve mahune se pojavljuju oko 14 dana nakon prvih cvjetova. U normalnim uvjetima razvoj mahuna traje oko tri tjedna (Vratarić i Sudarić, 2008.).

2.1.1. Karakteristike kvržica

Kvržice se počinju stvarati na korijenu soje od trenutka kada dođe do infekcije korijena sa kvržičnim bakterijama. Bakterije ulaze u korijen preko korijenovih dlačica te se počinju intenzivno djeliti. Na tim mjestima nastaju kvržice (Vratarić i Sudarić, 2008.). Prema Lindemannu i Gloveru (2003.): male kvržice na polju se mogu uočiti 2-3 tjedna nakon sadnje, ovisno o vrsti mahunarke i uvijetima za klijanje i nicanje. Četiri tjedna nakon infekcije promjer kvržica je najveći i bakterije intenzivno fiksiraju dušik. U to vrijeme promjer kvržica je 3 – 6 mm. Aktivnost kvržica traje 6 – 7 tjedana, nakon čega njihova aktivnost prestaje i one odumiru (Vratarić i Sudarić, 2008.). Na početku razvoja, kvržice su sitne, bijele do sive boje iznutra što pokazuje da fiksacija dušika još nije započela. S vremenom kvržice postaju sve veće te iznutra mijenjaju boju u ružičastu ili crvenu koja dolazi od aktivnosti leghemoglobina.

Podjelom mahunarki na jednogodišnje i višegodišnje možemo diferencirati kvržice na korijenu jednogodišnjih i višegodišnjih mahunarki. Kvržice višegodišnjih mahunarki su manjih dimenzija, nepravilna oblika, većinom su smještene na glavnom korijenu biljke. Kvržice višegodišnjih mahunarki su dugog životnog vijeka te fiksiraju dušik tokom cijele sezone rasta odnosno dok uvjeti sredine to dopuštaju. Kvržice jednogodišnjih mahunarki su većih dimenzija, okruglog oblika, raspoređene su po cijelom korijenu biljke. Ove kvržice su kratkog životnog vijeka te se neprestano izmjenjuju tijekom cijele sezone rasta (Lindemann i Glover, 2003.).

Kvržice mahunarki koje više ne fiksiraju atmosferski dušik, postepeno mijenjaju boju u zelenkastu nakon čega mogu biti i odbačene od biljke. U sredini sezone rasta na korijenu mahunarke bi trebale dominirati kvržice ružičaste ili crvene unutrašnjosti. Ako dominiraju bijele, sive ili zelene kvržice, to upućuje na slabu fiksaciju dušika. Moguće je da je došlo do infekcije i nodulacije s neučinkovitim sojem kvržične bakterije, da je ishrana biljke nedovoljna ili da je neki drugi faktor stresa (Lindemann i Glover, 2003.). Za zrele kvržice ključna je njihova građa jer o njoj ovisi da li će uvijeti biti idealni za nesmetanu fiksaciju dušika. U zreloj kvržici mahunarke nalazi se peribakteriodna membrana stvorena od strane biljke koja okružuje unutarstaničnog makrosimbionta – bakterioida. Peribakteroidna membrana nastaje od plazmatske membrane biljke. Građena je kao i plazmatska memabrana od fosfolipida i proteina ali su oni organizirani drugačije (Perotto et al., 1995.; Verma, 1992.) može sadržavati

različite noduline biljaka i proteine bakterija (Miao et al., 1992.). Pretpostavlja se da im specifčnost građe omogućuje neka nova specijalizirana svojstva i funkcije (Mylona et al., 1995.). Peribatkeroidna membrana ima više uloga i odgovorna za stvaranje uvjeta koji su potrebni za odvijanje procesa fiksacije dušika. Iako peribakteroidna membrana predstavlja barijeru ona je ujedino i poveznica između članova simbioze te se preko nje izmjenuju signali i metaboliti (Mylona et al., 1995.), no ujedino ona spriječava obrambenu reakciju biljke na unutarstanične bakterije (Nap i Bisseling, 1990.; Verma, 1992.; Werner, 1992.,).Peribatkeroidne membrane stvaraju anaerobne uvjete u unutrašnjosti kvržice koji su neophodni za fiksaciju dušika. Enzim nitrogenaza koji ima glavnu ulogu u procesu fiksacije dušika, vrlo je osjetljiv na prisutnost kisika. Kisik ga ireverzibilno inaktivira (Topol 2012.).

2.2. Biološka fiksacija dušika

Uz dovoljne količine sunčeve svjetlosti i vode, dušik je često ograničavajući čimbenik o kojemu ovisi rast i razvoj biljaka (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Biljke mogu usvajati dušik u dva oblika: nitratni (NO_3^-) i amonijski (NH_4^+). Sama fiksacija dušika može biti abiotska ili biotska. Abitoska fiksacija dušika može po karakteristikama biti prirodna i umjetna. Biotska ili biološka fiksacija dušika može biti asocijativna, asimbiozna ili simbiozna. Za poljoprivredu je najznačajnija simbiozna fiksacija dušika jer se njome fiksiraju najveće količine dušika.

Simbiozni odnos se temelji na uzajamnoj korisiti oba člana simbioze (Topol, 2012.). Biljke domaćini osiguravaju bakterijama izvor ugljika, putem produkata fotosinteze dok bakterije biljci zauzvrat osiguravaju dušik u amonijskom obliku (Howard i Rees, 1996.). Ugljik iz produkata fotosinteze predstavlja izvor energije potrebne za procese fiksacije atmosferskog dušika (Topol, 2012.). Genetski faktori oba simbionta sudjeluju u stvaranju simbioznog odnosa koji započinje međusobnim prepoznavanjem bakterije i biljke, slijedi infekcija korijena biljke te na kraju nodulacija odnosno formiranje kvržica na korijenu biljke domaćina. Sam proces fiksacije dušika zahtjeva prisutnost enzima nitrogenaze koji katalizira kemijsku reakciju redukcije molekularnog dušika i njegove transformacije u amonijak (Postgate, 1982.).

Biološku fiksaciju dušika provode samo prokariotski organizmi, te se dobiveni amonijak (NH_3) asimilira u anorganske oblike dušika koje grade makromolekule ili može biti preveden u NO_2^- ili NO_3^- od strane nitrificirajućih bakterija. Nitrat može dalje ući u organski metabolizam preko redukcije u NH_4^+ i asimilacije u aminokiseline bakterija, gljiva i biljaka te služiti denitrifkacijskim bakterijama kao akceptor elektrona (Crawford et al., 2000.). Svi biološki procesi vezani za ciklus dušika doprinose ravnoteži korištenja anorganskih i organskih oblika dušika koje koriste razni mikroorganizmi, biljke ili životnje.

Biološka fiksacija dušika uz pomoć bakterija roda *Bradyrhizobium* je jedna od najvažnijih značajki za održivost agroekosustava. U mnogim dijelovima svijeta usjevi soje predstavljaju primjer važnost simbioze mahunarki i kvržičnih bakterija (Lindström et al., 2010.).

Prema Salvagiotti et al. (2008.) soja je putem biološke fiksacije N_2 (BNF) u mogućnost fiksirati do 337 kg N/ha te je oko 50-60% soji potrebnoga dušika osigurano putem BNF. Simbiotska fiksacija dušika je inicirana i održana aktivnom izmjenom kemijskih signala između biljke domaćina i bakterija tla (Fox et al., 2007.). Prema Subramanian i Smith (2013.) optimalna temperatura tla za BNF je između 25˚C i 35˚C. Postoje sojevi *Bradyrhizobium spp.* sposobni da efikasno provode BNF pri različitim temperaturama u različitim podnebljima uzgoja (Alves et al., 2003.; Zhang et al., 2003.). Također je značajna kombinacija pojedinog genotipa sorte soje i soja *Bradyrhizobium spp.*(Luna i Palnchon, 1995.; Solomon et al., 2012.).

2.2.1. Prepoznavanje kvržičnih bakterija i mahunarki

Kvržične bakterije su bakterije tla koje imaju jedinstvenu sposobnost inficiranja korijenovih dlačica korijena mahunarki, uslijed čega dolazi do infkecije i nodulacije odnosno stvaranja kvržica ili nodula. Kvržične bakterije posjeduju posebne skupine gena koji se nazivaju nodulacijski geni ili skraćeno nod geni. Oni potiču stvaranje bakterijskih signalnih molekula Nod faktora, koji su ključni za međusobno prepoznavanje točno određene vrste bakterija i mahunarki. Ti geni će se ekspresionirati samo kod onih bakterija koje stupaju u simbiozni odnos s mahunarkom, dok kod slobodnoživućih bakterija neće doći do njihove ekspresije. Iznimka tome je NodD gen koji se ekspresionira prirođeno (Mylona et al., 1995.). NodD gen veže na sebe specifične flavonoide koje izlučuje korijen biljke domaćina (Goethals et al., 1992.). Nakon vezanja flavonoida NodD postaje transkripcijski aktivator drugih nod gena

(Fisher i Long, 1992.). Ostali nod geni počinju kodirati enzime uključene u sintezu Nod faktora (Mylona et al., 1995.). Nod faktor pokreće razvitak kvržica i ulazak kvržičnih bakterija u korijen biljke (Long, 2001.; Geurts i Bisseling, 2002.; Gage, 2004.). Biljka domaćin stvara jedinstvene fitokemijske signale u obliku mješavine flavonoida, koji se preko korijena otpuštaju u rizosferu. Mješavina flavonoida na površinu korijena privlači kompatibilne vrste bakterija, a odbija nepovoljne vrste bakterija koje su prisutne u rizosferi. Bakterijski NodD otkriva i prepoznaje fitokemijske signale biljke, nakon čega inducira transkripciju ostalih nod gena. Proizvode se Nod faktori i oni predstavljaju odgovor bakterije na fitokemijske signale biljke. Nod faktor prepoznaju spefični receptori na korijenu što rezultira iniciranjem razvoja kvržica. Većina bakterija stvara samo nekoliko različitih Nod faktora što im omogućuje stvaranje simbiotskih odnosa s ograničenim brojem vrsta mahunarki. (Topol, 2012.).

2.2.2. Infekcija

Nakon prepoznavanja slijedi infekcija. Bakterije koloniziraju korijenov sustav biljke domaćina pričvršćujući se na njegovu površinu. Kada biljka prepozna Nod faktor kod nje dolazi do aktivacije gena za stvaranje nodulina (Geurts i Bisseling, 2002.).

Vrh korijenovih dlačica se uvija kada se bakterije pričvrste na njega i bakterijske stanice ostaju zarobljene (Mylona et al., 1995.). Stanična stijenka na tom dijelu se razgrađuje (Callaham i Torrey, 1981.; Van Spronsen et al., 1994.) te se uvija plazmatska membrana a novi materijali koji se nakupljaju se ugrađuju u membranu (Bauer, 1981.; Newcomb et al., 1979. Brewin 1991.; Kjine 1992.). Formira se infekcijska nit kroz koju bakterije ulaze u biljku (Mylona et al., 1995.). Infekcijsku nit ne stvaraju bakterije nego stanice korijena mahunarki kao reakciju na infekciju bakterijama. Infekcijska nit se širi kroz stanice korijenovih dlačica i naposljetku u druge stanice korijena. Širenjem i grananjem infekcijske niti koja sadrži bakterije dolazi do širenja infekcije kroz tkivo korijena. Bakterije unutar infekcijske niti se neprestano dijele i stvaraju Nod faktore. Nod faktori potiču diobu stanica unutar korijena i tako nastaje kvržica. Bakterije se iz infekcijske niti otpuštaju u citoplazmu biljne stanice gdje ih okružuje peribakteroidna membrana koju stvara biljna stanica (Mylona et al., 1995.). Slijedi transformacija u bakterioide, koji imaju sposobnost fiksacije atmosferskog dušika (Oke i Long, 1999.).

2.2.3. Nodulacija

Nodulacija je inicirana infekcijom bakterija koje stvaraju Nod faktore koji imaju ulogu u procesu stvaranja kvržica. Kada biljka prepozna bakterijski Nod faktor dolazi do reakcije stanica pojedinih tkiva unutrašnjosti korijena. Nekoliko tipova stanica i tkiva moraju sinkronizirati svoj razvoj da bi se dogodila organogeneza kvržica (Ferguson et al., 2010.). Razvoj kvržica započinje kada bakterije u infekcijskoj niti sintetiziraju Nod faktore i time raste njihova koncentracija. Visoka koncentracija Nod faktora dovodi do mitozne aktivacije, iniciranja diobe stanica korteksa korijena. Tako nastaju primordijalne kvržice (Ferguson et al., 2010.). U stanicama primordijalnih kvržica dolazi do aktivacije a potom i ekspresije nekoliko kvržičnih gena što rezultira stvaranjem razlika između tkiva primordijalnih kvržica i ostatka meristemskog tkiva korijena biljke (Mylona et al., 1995.). Infekcijske niti rastu kroz tkivo korijena sve dok ne dođu do primordijalnih kvržica kada se počinju granati. Iz tih ogranaka se otpuštaju bakterije u stanice primordijalnih kvržica. Unutar tih stanica bakterije se intenzivno dijele i okružuju peribakteroidnom membranom koju je stvorila biljka te se time transformiraju u bakterioide. Bakterioidi imaju sposobnost fiksacije dušika. Primordijalne kvržice se tada razvijaju u zrele kvržice (Mylona et al., 1995.).

2.3. Kvržične bakterije-simbiozni fiksatori dušika

Bakterije koje imaju sposobnost fiksacije dušika dijele se u dvije skupine. Prva skupina uključuje slobodnoživuće bakterije koje fiksiraju dušik i ne pokazuju specifičnost prema određenoj vrsti biljke. Pripadaju rodovima *Azospirillum, Burkholderia, Herbaspirillum, Bacillus, Paenibacillus* (Oberson et al., 2013.). Ove bakterije ne prodiru u tkivo biljke, ali su u vrlo bliskom odnosu s korijenom te fiksiraju atmosferski dušik koji biljka može apsorbirati za potrebe vlastitog metabolizma. Ovaj tip odnosa naziva se asocijativna fiksacija dušika (Goswani et al., 2015.) te se procjenjuje da se njome godišje fiksira oko 20-30 kg N/h (Stacey et al., 1992.).

Druga skupina, koju se karakterzira kao kvržične bakterije, uključuje bakterije u simbiotskom odnosu s korijenom mahunarki te ih se zbog njihove sposobnost da fiksiraju dušik često karakterizira promotorima rasta. Tu spadaju bakterije rodova *Rhizobium, Bradyrhizobium,*

Mesorhizobium, Sinorhizobium i druge (Antoun i Prevost, 2005.). One proizvode regulatore rasta te posjeduju supresivni učinak prema bolestima uzrokovanim gljivama, nematodama, bakterijama, virusima i parazitima. Ove bakterije mogu smanjiti ili eliminirati raspoloživo željezo za druge organizme te time pokazuju kompetitvni učinak. One indirektno stimuliraju biljku da proizvodi fenole, flavonoide ili druge fitoaleksine koji služe kao obrana od bolesti (Šperanda, 2017.).

Sojevi koji pripadaju pojedinim grupama kvržičnih bakterija diferencirali su se prije pojave mahunarki. Simbiozni geni se pojavljuju kasnije prilikom diferenciranja jednog ili više soja uslijed prijenosa gena između različitih rodova i sojeva (Kaneko et al., 2000.; Hirsch et al., 2001.; Galibert et al., 2001.; Moulin et al., 2004.). Diferencijacija između spororastućih i brzorastućih kvržičnih bakterija dogodila se između 507 i 553 milijuna godina.

2.3.1. Kvržična bakterija *Bradyrhizobium japonicum*

Porodica *Bradyrhizobiaceae* je dio reda *Rhizobiales* koji se uvrštava u razred *Alphaproteobacteria.* Filogenetske analize bazirane na 16S rRNA sekvenciranju pokazale su svestranu porodicu, kojoj pripadaju šaroliki organizmi iz različitih okoliša kao što je tlo, biljka ili životinjski domaćin. Bakterije su pleomorfnog oblika, najčešće štapićastog. Vrlo su različitih fenotipskih, metaboličkih ili ekoloških svojstava koja se vežu za svaki pojedini rod i njegovo sudjelovanje u biokemijskim kruženjima. Biološko vezanje dušika koje vrši rod *Bradyrhiobium* je jedna od najvažnijih ekoloških značajki koja ima veliku važnost u poljoprivredi (Delong et al., 2014.).

Porodica obuhvaća bakterije simbiozne fiksatore dušika koji imaju sličnu brzinu rasta (5 – 6 dana) (Garrity et al., 2005.; Turner i Young, 2000.). Porodica obuhvaća 12 rodova, uključujući i rod *Bradyrhizobium*, čije ime dolazi od latinske riječi *bradus* što znaći sporo rastući (Garrity et al., 2005.; Euzéby 2006.).

Prema DeLong et al. (2014.) za *Bradyrhizobium japonicum* karakteristično je da su optimalne temperature rasta između 25˚ i 35˚C. Maksimalne temperature pri kojima se odvija rast su 33 - 35 ˚C. Optimalan pH sredine je 6 – 7, no vrlo su tolerantne na kiselost. Po metaboličkim odlikama su areobi i kemoorganotrofi koji koriste veliki spektar ugljikohidrata i soli iz

organskih kiselina kao izvor ugljika, ali ne koriste celulozu ili škrob. Proizvode alkalnu reakciju na podlogama s manitolom ili drugim šećerima. Na Congo Red podlogama stvaraju ružičaste kolonije, dok većina rizobakterija stvara crvene kolonije. Ne podnose koncentracije soli od 2% NaCl naviše. Prema morfološkim karakteristikama to su štapići veličine između 0.5 – 3.0 µm. Kolonije *B. japonicum* karakterizira neprozirnost ili poluprozirnost, bijela boja i konveksna forma. Kolonije nikada nisu veće od 1 mm u promjeru, nakon inkubacije od 5 – 6 dana. U tekućoj podlozi zamućenost se javlja nakon 3 – 4 dana, a generacijsko vrijeme ove vrste je između 9 – 18 sati (DeLong et al. 2014.).

Jedna vrlo važna biotehnološka karakteristika bakterija roda *Bradyrhizobium* je sposobnost proizvodnje vodotopivih ekstracelularnih polisaharida. Ti polisaharidi štite biljku od mnogih ekoloških čimbenika kao što je suša, predacija ili efekt antibiotika (Donot et al., 2012.).

Biljke domaćini bakterijskoj vrsti *Bradyrhizobium japonicum* su sljedeće*: Glycine max, Glycine soja, Macroptilium atropurpureum, Lupinus spp., Arachis hypogaea, Aeschynomene americana, Rhynchosia minima, Crotalaria hyssopifolia, Bryaspis lupulina, Sesbania rostrata, Chamaecrista sp., Cassia absus, Acacia spp.*(DeLong et al., 2014.)

2.3.2. Kvržična bakterija *Sinorhizbium* spp.

Porodica *Rhizobiaceae* pripada redu *Rhizobiales* te razredu *Alphaproteobacteria*. Neke članove porodice *Rhizobiaceae* karakterizira njihova sposobnost uspostavljanja simbioznih odnosa sa biljkama domaćinima i razvijanje procesa biološke fiksacije dušika dok neki imaju sposobnost razvijanja patogenosti prema biljaka. Neki rodovi porodice *Rhizobiaceae* imaju metabolizam koji omogućava razgradnju potencijalno toksičnih molekula te se može koristiti kao biomarker u bioremedijaciji (DeLong et al., 2014.).

Prema današnjoj klasifikaciji porodica sadrži 5 rodova: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Carbophilus*, *Kaistia* i *Shinella.* Porodica *Rhizobiaceae* obuhvaća saprofitne vrste te one koje su u mogućnosti uspostaviti korisne ili štetne interakcije sa biljkama (Ferreira et al., 2011.). Proučavanje mikrobiologije i taksonomije *Rhizobiaceae* počelo je istraživanjima Hellriegela i Wilfartha

1988. godine. Oni su utvrdili da mikroorganizmi dopuštaju nekim mahunarkama usvajanje dušika iz atmosfere putem kvržica na korijenu. Naknadno je Bejierinck 1888. godine izolirao i kultivirao te bakterije time potvrđujući njihovu ulogu u fiksaciji dušika.

Sinohizobium spp. su Gram-negativne bakterije te aerobni. Mobilne su zbog posjedovanja 1 – 2 polarne flagele ili 1 – 6 petirtihnih flagela te oblino proizvode vodotopivi polisaharid. On ima važnu ulogu za razvoj kvržica na korijenu mahunarki (Masson-Bovin et al., 2009.). S obzirom na pH vrijednost pokazuje vrlo dobru toleranciju prema širokom spektru pH vrijednosti (4 – 10). Udio G+C kod *Sinorhizobium* iznosi između 57 i 66%. Kao izvor C koriste razne ugljikohidrate i soli iz organskih kiselina, dok za izvor dušika koriste amonijeve soli, nitrate te nekoliko aminokiselina (Kuykendall, 2005.). Prilikom kultivacije ne mogu rasti na hranjivom mediju koji sadrži 2% NaCl pa naviše.

Po građi to su pleomorfni štapići veličine 0,5 – 3,0 µm, izgledom naliče slovu Y. Na YMA podlogama s 0,025% Congo Red-a stvaraju bijele kolonije. Kolonije su u promjeru 2 – 4 mm nakon 3 – 5 dana inkubacije. Kolonije su okrugle i konveksne neprozirne ili poluprozirne, bijele ili svijetlo bež boje. Optimalne temperature za rast su od 25 do 30 ˚C, no postoje sojevi koji toleriraju temperature od 10 ˚C, 35 ˚C, 42 – 44 ˚C. Optimalan pH je 6 – 8.

2.4. Značaj ko-inokulacije

Veliki značaj za biljnu proizvodnju imaju bakterije koje slobodno žive u rizosfernom dijelu tla, a imaju dobar međuodnos sa biljkama (Bashan i de-Bashan, 2005.; Park et al., 2005.; Lugtenberg i Kamilova, 2009.; Schoebitz et al., 2009.). Najrašireniji mikroorganizmi koji progresivno koloniziraju površinu korijena ili intercelularne prostore korijena biljke su bakterije, tj. rizobakterije (Glick, 2014., Lucas et al., 2004.). Produktima svoga metabolizma stimuliraju rast biljaka (Schoebitz et al.,2013., Kloepper i Schroth, 1978.; Sandheep, 2013.; Srivastava et al., 2010.; Esitken et al., 2010.). Takve rizobakterije označavaju se kao promotori rasta ili u engleskom jeziku Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Kloepper i Schroth 1978.).

Rizobakterije utječu na rast biljke direktno i indirektno. Direktan utjecaj je proizvodnja stimulatora rasta, poboljšanje dostupnosti biljnih hranjiva (oslobađanje fosfata i

mikronutrijenata iz netopivih izvora), snižavanje razine etilena u biljkama, poticanje sistemične rezistencije. Indirektni utjecaji su proizvodnja antibiotika, proizvodnja bioloških kontrolnih agensa i degradacija ksenobiotika. Većinu mikroorganizama koji su promotori rasta odlikuje barem 2 od sljedećih kriterija: agresivna kolonizacija, stimulacija rasta biljke i biološka kontrola patogenih mikroorganizama (Preston, 2004.; Vessey, 2003.). Prema Sahni et al. (2008.) PGPR bakterije koje se koriste kao mikrobiološko gnojivo kod biljke potiču usvajanje hrane. Dok neki posjeduju nekoliko uloga i karakteristika poticanja rasta biljaka (Haas i Défago, 2005.; Lahan et al., 2012.).
Prasad et al. (2017.) ističe kako primjena mikrobiološkog gnojiva koje sadrži PGPR bakterije potiče nicanje sjemena terast i razvoj korijenova sustava.

Neke rizosferne bakterije imaju sposobnost nesimbiozne fiksacije dušika (Pedraza 2008.; Lucas et al., 2004.), otapanja fosfata (Rodriguez et al. 2006.; Zaidi et al. 2009.), proizvodnje raznih fitohormona koji poboljšavaju rast korijena (giberelin i IAA) te proizvodnju vitamina, apsorpciju vode i nutrijenata (Dobbelaere et al. 2001.; Spaepen et al. 2007.). PGPR bakterije također predstavljaju zaštitnike okoliša i biološke kontrolne agense (Šperanda, 2017.). Osim što djeluju stimulativno na rast i razvoj biljaka, one također stimulativno djeluju na autohtone mikrobne populacije čime se povećava biogenost zemljišta i nivo organske tvari u tlu (Burd et al., 2000.), tipove mikrobioloških procesa u tlu. Proizvode sluzaste tvari koje pomažu agregaciji mikročestica tla u makročestice te time doprinose boljoj strukturi tla (Sandheep et al.,2013.).

Rizobakterije pripadaju rodovima: *Serratia, Bacillus, Psuedomonas, Burkholderia, Enterobacter, E<Yrwinia, Klebsiella, Flavobacterium* i *Gluconaetobacter, Rhizobium, Achromobacter,Agrobacterium, Micrococcus, Aerobacter* te *Citrobacter* (Glick, 2012.; Dozet et al., 2015.).

Yadav et al. (2013.): provodili su istraživanje utjecaja ko-inokulacije s *Trichoderma, Pseudomonas* i *Rhizobium* na rast slanutka i graha. Utvrdili su da ko-inokulacija poboljšava klijanje sjemena i rast klijanaca kod slanutka i crvenog graha, te da je ko-inokulacija itekako poželjna kao agrotehnička mjera zbog svojih višestrukih pozivitnih utjecaja na biljku. Prema Ahmad et al. (2012.): ko-inokulacija kvržičnim bakterijama i rizobakterijama *Pseudomonas* poboljšala je rast i produktivnost mungo graha (*Vigna radiata* L.) koji je bio izložen

kontroliranim uvjetima stresa. Singh et al. (2013.) pokazao je kako kombinirana primjena *Trichoderme*, *Pseudomonasa* i sojeva kvržičnih bakterija može pomoći u zaštiti slanutka od infekcije korijenovog vrata patogenom *Sclerotium rolfsii*.

DeMeyer et al. (1998.): pretpostavlja da je poboljšani rast usjeva rezultat poticanja rezistentnosti biljaka, dok Szczech i Shoda (2004.): nadodaju kako je poboljšani rast rezultat proizvodnje ekstracelularnih enzima, antifungicida i antibiotika, koji su zaslužni za umanjivanje negativnog utjecaja biotoskog stresa na biljku.

Primjena PGPR bakterija pronašla je svoje mjesto u sustavima održive poljoprivrede (Sturz i Nowak, 2000.; Schoebitz et al., 2009.). Različite PGPR bakterije se danas koriste diljem svijeta u cilju povećanja biljne proizvodnje (Burd et al., 2000.). Primjenom mikrobioloških gnojiva koji sadrže PGPR bakterije smanjuje se potreba za unosom dušičnih gnojiva, omogućava se biljci lakše usvajanje fosfora te utječe na pravac i dinamiku mikrobnih procesa koji će posredno utjecati na održavanje i povećavanje plodnosti tla (Mrkovački et al., 2012.a).

2.4.1. Fiksacija dušika

Asimbiozne bakterije koje fiksiraju dušik su *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus* i *Klebsiella* koriste se za inokulaciju neleguminoznih biljaka kao što su kukuruz, pšenica, krumpir, šećerna repa i suncokret). Biljke variraju u sposobnosti akumulacije dušičnih spojeva iz tla, kada NO_3^- nije dominantni oblik dušika u tlu. Samu fiksaciju dušika obavlja endosimbiont u kvržicama korijena (Reddy et al., 1997.; Hirsch et al, 2001.; Lindström et al., 2010.). Inokulacija mahunarki rizobijama predstavlja jedan od najstarijih agrobiotehnoloških zahvata, te samo saznanje o njegovoj važnosti datira još od 1888. godine kad je Beijerinck potvrdio da je mikroorganizam, kasnije identificiran kao bakterija, zaslužan za formiranje kvržica na korijenu mahunarki (Crawford et al., 2000.).

2.4.2. Biodostupnost fosfora

Bakterije koje imaju sposobnost transformacije netopivih fosfata u biljci pristupačne oblike pripadaju rodovima: *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Achromobacter,*

Agrobacterium, Micrococcus, Aerobacter, Flavobacterium, Serratia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Pseudomonas, Azotobacter (Dozet et al., 2015.; Richardson et al., 2009.). Osim bakterija, fosfate mogu još transformirati aktinomicete te različite gljive rodova *Aspergillus, Trichoderma* i *Penicillium* (Richardson et al., 2009.). Aplikacija samih bakterija koje otapaju fosfate ili zajedno sa kvržičnim bakterijama je vrlo povoljna za pamuk i pšenicu (Zaidi i Khan 2005.). Kombinirani bakterijski preparati koji sadrže kvržične bakterije i rizobakterije povećavaju nodulaciju i dostupnost fosfora u tlu te sveukupno povećavaju prinos. Prema Gamalero i Glick (2015.) izravni učinak pokazuju povećavajući topivost fosfora, fitohormonima i proizvodnjom siderofora. Indirektan učinak očituje se u inhibiciji rasta patogena. PGPR bakterije štite biljku od štetnog utjecaja stresa iz okoliša pomoću nekoliko mehanizama (Singh et al., 2010.):

- Smanjuju koncentraciju etilena koji se proizvodi u stresu
- Proizvode egzopolisaharide koji reguliraju unos hranjivih tvari
- Povećavaju aktivnost antioksidativnih enzima

Bakterije iz rodova *Bacillus* i *Azotobacter* mogu sintetizirati organske kiseline i fosfataze koje će nepristupačni oblik fosfora transformirati u oblik pristupačan biljci (Cherr et al., 2006.; Wilhelm et al., 2007.). Velike rezerve fosfora u tlu ne mogu se usvojiti od strane biljaka pa mikroorganizmi imaju nezamijenjivu ulogu u razlaganju tih oblika. Dio kruženja fosfora koji je bitan za biljke i mikroorganizme tla vezan je transformaciju teško topivih oblika fosfora u lakše topive oblike (Mrkovački et al, 2012.b). Mikroorganizmi utječu na stupanj opskrbljenosti biljke fosforom putem mineralizacije organskih spojeva koji sadrže fosfor, imobilizacijom pristupačnog fosfora te transformiranjem netopivih mineralnih oblika fosfora (helatni oblici). Mineralizacija i imobilizacija su dva procesa koji se istovremeno odvijaju u tlu, a koji će od ta dva procesa biti dominantni zavisi od zastupljenosti fosfora u organskom materijalu koji se razlaže (Lucy et al., 2004.). Mikroorganizmi koji transformiraju organske i anorganske fosfate pripadaju grupi mikroorganizama koji za biljku teško dostupne oblike fosfata prevode u lako dostupne oblike (eng. PSM)(Rodrigez i Fraga, 1999.).

2.4.3. Proizvodnja fitohormona

Pojedine rizosferne bakterije imaju sposobnost proizvodnje fitohormona kao što su auksini, giberelini, citokinini, etilen te abscizinska kiselina (Patten i Glick, 1996.; Nadeem et al., 2013.). Fitohormoni imaju pozitivan učinak na diobu stanice, povećanje stanice, klijavost sjemena, formiranje korijena i produženje stabljike (Aeron et al., 2011). Auksin kontrolira nekoliko stadija rasta biljaka: elongaciju, diobu stanica, diferencijaciju tkiva. Indol octena kiselina stimulira brz porast (diobu stanica u duljinu) i dugotrajni rast (diobu stanica i diferencijaciju)(Goswani, et al. 2016.). Biljke na koje dulje vrijeme djeluje IAA pokazuju vrlo dobro razvijen korijen koji biljci omogućava bolje iskorištavanje hrane (Aeron et a., 2011.).
Mnoge bakterije proizvode antifungalne metabolite kao što su cijanovodična kiselina, feazin, pirolnitrin, 2,4-diactilfloroglukinol, pioluteorin, viskosinamid i tenzin (Ahemad i Kibert, 2014.). Interakcije korisnih mikroorganizama i korijena izazivaju rezistenciju na patogene bakterije, gljive i viruse. Taj se fenomen naziva inducirana sistemska otpornost. To uključuje lučenje hormona koji stimuliraju otpornost domaćina na mnoge biljne patogene (Glick, 2012.).

2.4.4. Rizobakterija *Pseudomonas fluorescens*

Bakterijska vrsta *P.fluorescens* obuhvaća grupu ne patogenih saprofita koji koloniziraju tlo, vodu i površinu biljke (Ganeshan i Kumar,2006.). Primjena bioloških kontrolnih agensa često je proces koji se ne može regulirati jer jedan biološki agens nije u stanju biljci pomoći da preživi sve nepovoljne uvjete tla i ekosustava. Pozitivna interakcija između sojeva koji se nalaze u mikrobiološkom preparatu može itekako djelovati stimulativno na rast biljke (Sandheep et al.,2013.).

Rizobakterija *P. fluorescens* ima puno pozitivnih karakteristika kao što su: proizvodnja siderofora, proizvodnja antibiotika, otpuštanje HCN-a (Yu et al., 2011.; O'Sullivan i O'Gara, 1994.), indukcija sistemične rezistencije i kompetitvna kolonizacija korijena biljke (Viswanathan i Samiyappan, 2005.). Po svojim fenotipskim karakteristikama to je gram negativna bakterija, štapičastog oblika. Otpušta vodotopiv zelenkasti florescenti pigment, zvan floresein, prema čemu je dobila svoj naziv *P.fluorescens*. Sekrecija pigmenta događa se u uvjetima male dostupnosti željeza. Prema metaboličikm zahtjevima obligatni je aerob, dok

par sojevima ima sposobnost iskorištavanja NO_3^- kao akceptora elektrona umjesto O_2. Mobilnost mu daje više polarnih flagela. *P.fluorescens* može iskoristiti širok spektar ugljikohidrata kao izvor C. Njihova glavna primjena je za biološko suzbijanje patogena te u bioremedijaciji (Ganeshan i Kumar, 2006.).

Određeni pripadnici *P.fluorescens* pokazuju potencijal zaštite biljke od gljivičnih infekcija. Poznato je da potiču rast biljaka te ublažavaju posljedice mnogih gljivičnih bolesti (Hoffland et al., 1996.; Wei et al., 1996.). Ovo svojstvo je posljedica proizvodnje brojnih sekundarnih metabolita kao što su antibiotici, siderofori i hirodgen cijanidi (O'Sullivan i O'Gara, 1994.). Kompetitvnu nadomć nad patogenom bakterija *P.fluorescens* postiže brzom kolonizacijom rifosfere.

Pojedini sojevi *P.fluorescens* sprječavaju infekcije korijena biljaka. Metabolit koji posjeduje fungicidno djelovanje je –diacetil florofukinol (Delany et al., 2000.). Utvrđeno je da posjeduje sposobnost usporavanja rasta patogena tla (Carisse et al., 2003.), kompeticijom i prozivodnjom različitih antimikrobnih tvari te pojačavanjem imunog odgovora.

Sandheep et al. (2013.) utvrdili su da ko-inokulacija sjemena vanilije(*Vanilla planfolia*) s *Pseudomonas fluorescens* i *Trichodermom harzianum* daje biljke najdulje stabljike, bijke koje su najbolje opskrbljene dušikom, sa najbolje razvijenim korijenovim sustavom, te je kombinacija ova dva biološka kontrolna agena bila superiorna nad svim ostalim kombinacijama. Biljke vanilije inokulirane s *P. fluorescens* pokazale su najbolje usvjanje dušika tokom pokusa u odnosu na sve ostale kombinacije inokulacije.

Primjenom ko-inokulacije *P.fluorescens* na tlu s visokim sadržajem $Ca_3(PO_4)_2$ postiže se razlaganje ovih spojeva koje je direktno povezano s produkcijom organskih kiselina (Vyas i Gulati, 2009.). Prilikom ko-inokulacije soje i djeteline s kvržičnim bakterijama i sojevima roda *Pseudomonas* zabilježenen je veći broj kvržica koje su posjedovale veću masu suhe tvari. Ko-inokulacija soje s *B.japonicum* i bakterijama koje imaju sposobnost otapanja Ca spojeva znatno je povećala visinu biljke, masu svježih kvržica, broj mahuna po biljci, broj sjemenki po mahuni i po biljci, prinos sjemena, te masu ukupnog N i P u usporedbi s ostalim kombinacijama (Tytova et al., 2013.).

Paul i Nair (2008.): utvrdili su da *P. fluorescens* MSP-393 proizvodi proteine uvjetovane osmotskim stresom te time može nadvladati negativni utjecaj soli, dok je nekoliko bakterija istoimenog roda odgovorno za toleranciju biljaka uvjetovanu 2,4-diacetilfloroglukinola (Indiragandhi et al., 2008.).

2.5. Endofiti

Endofite se često opisuje kao ne patogene bakterije ili gljive koje koloniziraju i rastu intra ili ekstracelularno u zdravim tkivima biljke (Bacon i White 2000.; Schultz i Boyle, 2006.; Farrar et al., 2014.), pritom ne izazivjući nikakvu štetu domaćinu. Endofiti pospješuju prilagođavanje biljke na okolišne čimbenike, klijanje i rast biljaka aridnih i semiaridnih podneblja (Punete i Bashan 1993.; Lima et al., 2015.; Soussi et al., 2015.). Za rizosferu se pretpostavlja da obiluje endofitima. Neki rizosferni endofiti mogu pod prirodnim uvjetima ući u korijen biljke, proširiti se u razna biljna tkiva te na kraju doći do reproduktivnih organa biljke (Compant et al., 2010.).

Endofitni mikroorganizmi imaju velik potencijal za primjenu u medicini, biotehnologiji i poljoprivredi. Direktno i indirektno utječu na rast biljaka time što biljci osiguravaju hranjiva kao što je željezo, fosfor i dušik, te sintetiziraju hormone kao što je auksin i etilen (Ahemad i Kibret 2014.; Brader et al., 2014.; Santoyo et al., 2016.; Seo 2010.). Osim što koloniziraju istu ekološku nišu kao i fitofagni mikroorganzmi, endofiti sintetiziraju sekundarne metabolite koji imaju antimikrobno djelovanje i poboljšavaju sistemičnu otpornost i rast biljke domaćina (Compant et al., 2010.; Glick 2012.; Hardoim et al., 2011., Freisen et al., 2011.). Smatraju se jednom od alternativnih zamjena u ostvarenju cilja smanjenja unosa mineralnih gnojiva i pesticida.

Vjeruje se kako endofiti u biljci potječu iz epifitnih populacija tla ili površine lista, no najčešće iz rizosfere (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006.). Ulaze u tkivo biljke kroz prostore između korijenovih dlačica te se tlo smatra glavni izvorom bakterija u biljci (James et al., 2002.; Hardoim et al., 2008.; Compant et al., 2010.). Truyens et al. (2015.) navodi kako su bakterije pronađene u sjemenskome materijalu te da mehanizam endofita predstavlja alternativni način kolonizacije biljke. Endofitne bakterije koje se nalaze u sjemenu mogu prijeći s majčinske biljke na potomstvo, potičući klijanje sjemena, razvoj klijanaca i kasnije biljke (Compant et al., 2010., Truyens et al., 2016.).

Klijanjem sjemena endofitne bakterije unutar sjemena mogu postati važni utemeljitelji mikrobne zajednice klijanaca ili te bakterije mogu koristiti sjeme kao vektor prilikom disperzije i kolonizacije novih okoliša (Gao i Shi, 2018.).
Nije razjašnjeno da li bakterijski endofiti koloniziraju sjeme iz rizosfere ili endofitnih zajednica na korijenu biljke. Također su specifični bakterijski rodovi i vrste koji preživljavaju u sjemenu određene biljke najčešće nepoznati (Di Bella et al., 2013., Turner et al., 2013.).

Najčešće otkriveni rodovi bakterijskih endofita su *Azospirillum, Enterobacterium, Erwinia, Pantoea, Pseudomonas, Flavobacterium* i *Bacillus* (Hameed et al., 2015.; Huang et al., 2016.; Johnston-Monje i Raizada 2011.; Vaughan et al., 2015.).

Gao i Shi(2018.) su proučavali endofitne bakterijske populacije uskolisnog rogoza. Uspoređivanjem genoma koje su dobili sekvenciranjem 16S rRNA gena uvidjeli su kako se endofitna bakterijska zajednica tla, korijena i sjemena uskolisnog rogoza ne razlikuje po svome sastavu, no pokazuje neke razlike u svojstvima samih zajednica. Usporedba genoma rizosferne populacije, populacije endosfere korijena i populacije sjemena pokazala je promjenu bakterijskih svojstava kako bi se zajednice prilagodile staništu.

3. Materijali i metode

3.1. Sorta soje

Za vegetacijski pokus odabrano je sjeme soje sorte AFZG Ana. Prema grupi zriobe ova sorta pripada vegetacijskoj skupini 0, preporučeni sklop je 580.000 do 650.000 biljaka/ha. Čvrste je stabljike i otporna na polijeganje. Potencijalna rodnost joj iznosi 5 t/ha. Ima dobru otpornost na plamenjaču. Sadržaj ulja joj iznosi 19-23%, dok je sadržaj bjelančevina 35-40%. List ima izdužene liske, boja dlačica je siva, boja cvijeta je ljubičasta a smjene je okruglo i sivog hiluma (Lakić, 2016.).

3.2. Bakterijski sojevi korišteni u istraživanju

U istraživanje je uključeno šest sojeva rizobija izoliranih iz kvržica soje. Od kvržične bakterije *B. japonicum* odabrani su sljedeći sojevi: 344 (referentni soj), 3/1 i 2/5, 15/1 te 24/6. Za pokus su uzeta dva soja *Sinorhizobium spp.* 10/3 i 11/5. Za ko-inokulaciju korištena je PGPR bakterija *P. flourescens*.

Sojevi 10/3 i 11/5 izolirani su s područja Vukovarsko-srijemske županije, iz tla alkalne i neutralne reakcije. U vegetacijskim pokusima testovima verifikacije dobivene su jako zelene biljke te je nodulacija bila obilna. Fenotipskim testovima utvrđeno je da rastu pri pH vrijednostima od 4,5 do 11 te je sekvenciranjem *rrs* gena utvrđeno da se radi o sojevima *Sinorhizobium spp.*. U cilju potpune identifikacije potrebno je provesti daljnje analize.

Sojevi 3/1 i 2/5 izolirani su s područja Vukovarsko-srijemske županije iz slabo kiseloga i kiselog tla. U vegetacijskim pokusima testovima verifikacije dobivene su jako zelene biljke s velikim krvžicama na korijenu. Fenotipskim testovima utvrđeno je da rastu pri pH vrijednostima od 4,5 do 11 te je sekvenciranjem *rrs* gena utvrđeno da se radi o spororastućim sojevima *B. japonicum*.

Soj 15/1 izoliran je s područja Bjelovarsko-bilogorske županije iz jako kiselog tla. U vegetacijskim pokusima testovima verifikacije dobivene su jako zelene biljke te je nodulacija bila obilna. Fenotipskim analizama uvtrđeno je da raste pri pH vrijednostima od 4,5 do 11 te je sekvenciranjem *rrs* gena utvrđeno da se radi o soju *B. japonicum.*

Soj 24/6 izoliran je s područja Koprivničko-križevačke županije iz tla jako kisele reakcije. U vegetacijskim pokusima testovima verifikacije dobivene su jako zelene biljke s puno sitnih kvržica. Fenotpiskim analizama uvtrđeno je da raste pri blago kiselim, neutralnim i blago alkalnim reakcijama te je sekvenciranjem *rrs* gena utvrđeno je da se radi o soju *B. japonicum*.

Rizobakterija *P. fluorescens* izolirana je iz korijena soje sorte AFZG Ana te je fenotipskim analizama utvrđeno da rastu pri kiselim pH vrijednostima. Sekvenciranjem *rrs* gena ovaj izolat identificiran je kao vrsta *P. fluorescens.*

Prethodno izolirane kulture odabranih sojeva nacijepljene su na YMA podloge te ostavljene da rastu tjedan dana, kako bi se mogle prenjeti na YMB podloge.

3.3. Hranjive podloge korištene u istraživanju

Za uzgoj bakterijske kulture koja je izolirana sa pojedinih lokacija korištena je YMA hranjiva podloga koja se priprema prema sljedećoj recepturi: u sterilnu Edelmayerovu tikvicu potrebno je odvagati sljedeće sastojke za pripremu podloge volumena 1000 ml: 10 g D-manitola, 0,5 g K_2HPO_4, 0,1 g NaCl, 0,2 g $MgSO_4$, 0,4 g kvasnog ekstrakta, 15 g agara. Podloga se sterilizira 15 minuta u autoklavu na 121˚C te njen pH iznosi 6,8.

Bakterizacija sjemena soje prilikom sjetve vršila se pomoću tekućeg inokuluma koji se dobiva uzgojem bakterijske kulture u YMB hranjivoj podlozi kroz 7 dana. Bakterijska kultura se prenjela sa YMA hranjive podloge u YMB hranjivu podlogu koja se priprema prema sljedećoj recepturi: U sterilnu Edelmayerovu tikvicu potrebno je odvagati sljedeće sastojke za pripremu podloge volumena 1000 ml: 10 g D-manitola, 0,5 g K_2HPO_4, 0,1 g NaCl, 0,2 g $MgSO_4$ te 0,4 g kvasnog ekstrakta. Podloga se sterilizira 15 minuta u autoklavu na 121˚C, te njen pH iznosi 6,8.

3.2. Priprema inokuluma za bakterizaciju soje

Narasla bakterijska kultura prenosi se s plave YMA podloge u 120 ml plave YMB podloge. Nakon što su sve kulture sojeva prenesene u tekuću podlogu stavljaju se na miješalicu i ostavljaju pri 250 okretaja/min kroz 3-5 dana za brzorastuće sojeve *Sinorhizobium spp.*, te 5-7 dana za spororastuće sojeve *Bradyrhizobium japonicum*. Nakon 5 odnosno 7 dana rasta u tekućim podlogama dobiva se tekući mikrobiološki preprarat spreman za inokulaciju sjemena.

3.3. Vegetacijski pokus

Dvofaktorijalni pokus (8 x 2) postavljan je po shemi slučajnog blok rasporeda u tri ponavljanja. Faktori pokusa bili su različiti sojevi kvržičnih bakterija te PGPR bakterija *P. fluorescens.* Sav materijal potreban za postavljanje vegetacijskog pokusa poslan je na Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Zavod za kemiju materijala u Laboratorij za radijacijsku kemiju i dozimetriju gdje je napravljena sterilizacija ionizirajućim Gama zrakama pomoću panoramskog uređaja za ozračivanje gama zrakama ^{60}Co.

Pokus je postavljen u komoru rasta s potpuno kontroliranim uvjetima koja se nalazi na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, Zavodu za ishranu bilja. Tokom pokusa vlažnost zraka održavana je na konstantnih 70% a relativna temperatura zraka bila je 25˚C dnevna (16 h) i 18˚C (8h) noćna.

Sjeme sorte AFZG Ana sterilizirano je prema sljedećem postupku:
Sjeme je momentalno umočeno u alkohol te nakon toga u 5%-tnoj otopini NaClO na 5 minuta. Nakon površinske sterilizacije sjeme je 6 puta isprano sterilnom destiliranom vodom.

Inokulacija sjemena vršila se direktno prije sjetve nalijevanjem tekućeg bakterijskog preparata. Direktna inokulacija prilikom sjetve osigurava optimalan broj viabilnih stanica rizobakterija oko sjemena te raniji početak infekcije korijena i nodulacije. Po loncu se sijalo 10 sjemenki u sterilni vermikulit prema shemi u tablici 3.4.1.

Tablica 3.4.1. Sojevi kvržičnih bakterija korišteni za bakterizaciju soje

Oznaka/redni broj lonca	Bakterijski soj koji je prisutan
1. Kontrola	B0
2.	344 (*B. japonicum)*
3.	2/5 (*B. japonicum)*
4.	3/1 (*B. japonicum)*
5.	10/3 (*Sinorhizobium spp.*)
6.	11/5 (*Sinorhizobium spp.*)
7.	15/1(*B. japonicum)*
8.	24/6(*B. japonicum)*
9.	*P.fluorescens*
10.	344 (*B. japonicum)+ P.fluorescens*
11.	2/5 (*B. japonicum)+ P.fluorescens*
12.	3/1 (*Sinorhizobium spp.*)+ *P.fluorescens*
13.	10/3 (*Sinorhizobium spp.*)+ *P.fluorescens*
14.	11/5 (*B. japonicum)+ P.fluorescens*
15.	15/1 (*B. japonicum)+ P.fluorescens*
16.	24/6 (*B. japonicum)+ P.fluorescens*

Tijekom pokusa korištena je bezdušična hranjiva otopina prema recepturi navedenoj u tablici 3.4.2. Procjena simbizone učinkovitosti temelji se na određivanju mase suhe tvari nadzemnoga dijelabiljke , masi suhe tvari i broju kvržica po biljci, dok je utjecaj *P.fluorescens* na poboljšanje rasta biljaka procjenjivan mjerenjem duljine korijena.

Tablica 3.4.2. Hranjiva otopina

Reagens	Stock otopina g/L	Količina za 1L hranjive otopine	Konačna koncentracija pojedinačnog elementa (µg/ml)
KH_2PO_4	136,1	1 ml	P:62
K_2HPO_4	174,2	1 ml	K:156,5
K_2SO_4	87,1	1 ml	Ca:40
$CaCl_2$	73,5	2 ml	Mg:12,3
$MgSO_4$ x 7 H_2O	123,2	1 ml	S:32,3

4. Rezultati i rasprava

4.1. Procjena učinkovitosti autohtonih sojeva kvržičnih bakterija i bakterije *P. fluorescens*

U tablici 4.1. prikazani su rezultati analize varijance za istraživana svojstva broj kvržica po biljci, masa suhe tvari kvržica po biljci, masa suhe tvari nadzemnoga dijela biljke i duljina korijena.

Analizom dobivenih podataka utvrđeno je statistički opravdano djelovanje inokulacije soje različitim sojevima kvržičnih bakterija na sva istraživana svojstva osim na duljinu korijena. Inokulacija soje sa bakterijom *P. fluorescens* nije rezultirala signifikantnim razlikama u većini istraživanih svojstava. Osim toga, nije utvrđeno interakcijsko djelovanje između primijenjenih sojeva rizobija i bakterije *P. fluorescens*.

Tablica 4.1. Rezultati analize varijance – opravdanost djelovanja istraživanih faktora i interakcije

Izvor varijabilnosti	Broj kvržica/biljci	Masa suhe tvari kvržica /biljci (g)	Masa suhe tvari nadzemnoga dijela biljke (g)	Duljina korijena (cm)
sojevi rizobija	*	*	*	*ns*
PGPR	*ns*	*	*ns*	*ns*
Interakcija	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*

4.1.1. Broj kvržica po biljci

Rezultati statističke analize broja kvržica po biljci prikazani su u tablici 4.1.1. Signifikantno najveći broj kvržica po biljci utvrđen je uz primjenu soja 11/5 (34,410). Broj kvržica pri primjeni soja 11/5 signifikantno se ne razlikuje od broja kvržica pri primjeni soja 10/3 (24,487). Između broja kvržica pri primjeni sojeva 344, 2/5, 3/1, 10/3, 15/1 i 24/6 nisu utvrđene statistički značajne razlike. Broj kvržica pri primjeni *P.fluorescens* u ko-inokulaciji nije pokazao statistički značajne razlike u odnosu na broj kvržica kod primjene isključivo autohtonih sojeva kvržičnih bakterija. Kod sojeva 11/5 i 10/3 broj kvržica se umanjuje pri primjeni *P.fluorescens.* Kod sojeva 2/5, 15/1 te 24/6 broj kvržica raste pri primjeni *P.fluorescens.* Iz podataka prikazani u tablici 4. može se utvrditi kako je u infekciji i nodulaciji najefikasniji bio soj 11/5 i 10/3 koji pripadaju rodu brzorastućih kvržičnih bakterija, *Sinohizobium spp*. Također je vidljivo kako je na sojeve brzorastućih rizobija *P.fluorescens* imao negativan utjecaj smanjenjem broja kvržica po biljci. Pozitivan utjecaj *P.fluorescens* na porast broja kvržica javlja se kod primjene sojeva *B. japonicum* 15/1 te 24/6.

Tablica 4.1.1 Utjecaj aplikacije kvržičnih bakterija i PGPR na broj kvržica/biljci

Sojevi PGPR	Bez PGPR	Sa PGPR	*Prosjek sojevi*
Kontrola	0,00	0,00	*0,00*^{c}
344	17,557	17,317	*17,437*^{b}
2/5	21,157	21,217	*21,187*^{b}
3/1	20,600	17,083	*18,842*^{b}
10/3	34,917	14,057	*24,487*^{ab}
11/5	45,310	23,510	*34,410*^{a}
15/1	17,200	22,917	*20,058*^{b}
24/6	20,333	22,667	*21,500*^{b}
Prosjek PGPR	*22,134 ns*	*17,346 ns*	

LSD za sojeve: $P_{5\%}$= 10,53

4.1.2. Masa suhe tvari kvržica po biljci

U tablici 4.1.2. prikazani su rezultati analize podataka o masi suhe tvari kvržica po biljci izraženi u g. Najveća masa suhe tvari kvržica po biljci utvrđena je uz primjenu soja 11/5 (0,062 g) koji pripada rodu *Sinorhizobium spp.* Najmanja masa kvržica izmjerena je kod primjene referentnog soja 344 (0,024 g). Masa suhe tvari kvržica po biljci pri primjeni soja 11/5 signifikantno se razlikuje od mase suhe tvari kvržica po biljci pri primjeni ostalih sojeva. Između masa suhe tvari kvržica pri primjeni sojeva 10/3, 2/5, 3/1 i 24/6 nisu utvrđene signifikantne razlike. Primjenom PGPR bakterije *P.fluorescens* uočena je signifikantna razlika u masi kvržica, te su biljke koje nisu bile inokulirane s *P.fluorescens* razvile kvržice veće mase suhe tvari od biljaka inokuliranih s *P.fluorescens.* Pozitivan utjecaj na porast mase suhe tvari kvržica može se vidjeti kod primjene sojeva 344, 15/1 te 24/6. Primjena *P.fluorescens* se negativno odrazila na mase suhe tvari kvržica kod sojeva 2/5 i 3/1 (*B.japonicmu*). sojeva 10/3 i 11/5 (*Sinorhizobium spp.*).

Tablica 4.1.2. Utjecaj aplikacije kvržičnih bakterija i PGPR na masu suhe tvari kvržica/biljci (g)

Sojevi PGPR	Bez PGPR	Sa PGPR	*Prosjek sojevi*
Kontrola	0,000	0,000	*0,000*^{e}
344	0,022	0,026	*0,024*^{d}
2/5	0,040	0,035	*0,038*^{bc}
3/1	0,047	0,033	*0,040*^{bc}
10/3	0,074	0,018	*0,046*^{b}
11/5	0,088	0,035	*0,062*^{a}
15/1	0,027	0,034	*0,030*^{cd}
24/6	0,035	0,036	*0,036*^{bcd}
Prosjek PGPR	*0,042**	*0,027*	

LSD za sojeve: $P_{5\%}$= 0,0112

4.1.3. Masa suhe tvari nadzemnog dijela biljke

Najveća masa suhe tvari nadzemnoga dijela izmjerena je kod primjene soja 11/5, međutim utvrđene vrijednosti pri primjeni ostalih izolata nisu rezultirale u signifikantnoj razlici mase suhe tvari nadzemnoga dijela biljke. Kod kontrolne varijante (0,450 g) javlja se razlika u masu nadzemnoga dijela biljke u usporedbi sa svim ostalim varijantama gdje je primjenjena bakterizacija. Primjena soja 10/3 također je dala vrlo dobre rezultate u usporedbi s primjenom ostalih sojeva u masi nadzemnoga dijela. Temeljem statističke obrade podataka nisu utvrđene znatne razlike u vrijednostima mase suhe tvari nadzemnoga dijela pri primjeni PGPR bakterije *P.fluorescens,* kao što je moguće vidjeti u tablici 6. Utvrđen je pozitivan utjecaj *P.fluorescens* na razvoj nadzemne mase kod kontorlnih biljaka, te pri primjeni sojeva 344, 2/5, 15/1 i 24/6 koji pripadaju bakterijskoj vrsti *B. japonicum*. Pri primjeni sojeva 11/5 i 10/3 (*Sinorhizobium spp.*) uočava se mase suhe tvari nadzemnoga dijela kod ko-inokulacije s *P.fluorescens.* Iz podataka prikazani u tablici 6. možemo zaključiti kako su pri primjeni *P.fluorescens* postignute veće mase nadzemnog dijela biljke kod bakteriziracije s spororastućim sojevima.

Tablica 4.1.3. Utjecaj aplikacije kvržičnih bakterija i PGPR na masu suhe tvari nadzemnog dijela biljaka (g)

Sojevi/PGPR	Bez PGPR	Sa PGPR	*Prosjek sojevi*
Kontrola	0,393	0,507	*0,450*[b]
344	0,883	1,157	*1,020*[a]
2/5	1,087	1,110	*1,098*[a]
3/1	1,373	0,950	*1,162*[a]
10/3	1,757	0,970	*1,363*[a]
11/5	1,807	1,220	*1,513*[a]
15/1	1,000	1,210	*1,105*[a]
24/6	1,007	1,063	*1,035*[a]
Prosjek PGPR	*1,163 ns*	*1,023 ns*	

LSD za sojeve: $P_{5\%}$= 0,496

4.1.4. Duljina korijena

Statističke analize podataka o duljini korijena prikazane u tablici 7. Najveća duljina korijena razvila pri primjeni soja 10/3 (27,083 cm) iako nema statistički opravdanih razlika u duljini korijena. Najkraći korijen razvio se pri primjeni referentnog soja 344 (22,00 cm). Pri utjecaju *P.fluorescens* na duljinu korijena ne uočava se signifikantna razlika. Pozitivan utjecaj *P.fluorescens* na duljinu korijena vidljiv je kod brzorastućih sojeva 10/3, 11/5, te spororastućih sojeva 15/1 i 24/6. Kod kontrolnih varijantni *P.fluorescens* također pokazuje pozitivan utjecaj na produljenje duljine korijena. Najveće smanjenje duljine korijena pri primjeni *P.fluorescens* vidljivo je kod referentnog soja 344 gdje se duljina korjena smanjuje za 9 cm. Duljina korijena pri primjeni *P.fluorescens* opada kod biljaka inokuliranih spororastućim sojevima 2/5 i 3/1. Na osnovu dobivenih rezultatamože se zaključiti kako je primjena sojeva 10/3, 3/1 i 11/5 imala najpovoljnij utjecaj na razvitak korijenova sustava dok se kod soja 344 vidi mogućnost postojanja kompeticijskog odnosa između soja kvržičnih bakterija i soja PGPR bakterije.

Tablica 4.1.4. Utjecaj aplikacije kvržičnih bakterija i PGPR na duljinu korijena po biljci (cm)

Sojevi/PGPR	Bez PGPR	Sa PGPR	*Prosjek sojevi*
Kontrola	20,900	24,200	22,55
344	26,500	17,500	22,00
2/5	26,333	26,167	26,25
3/1	27,167	26,000	26,583
10/3	26,167	28,000	27,083
11/5	25,333	27,500	26,417
15/1	24,000	26,667	25,333
24/6	22,333	24,333	23,333
Prosjek PGPR	*24,842 ns*	*25,046 ns*	*ns*

5. Zaključak

Na temelju rezultata dobivenih provedenim istraživanjem može se zaključiti sljedeće:

- Autohtoni sojevi koji noduliraju soju izolirani sa različitih lokacija Hrvatske pokazali su različitu sposobnost simbiozne učinkovitosti
- Istraživani autohtoni sojevi posjeduju bolju sposobnost infekcije i nodulacije soje u odnosu na referentni soj.
- Statističkom analizom dobivenih podataka utvrđeno je signifikantno djelovanje primjene različitih sojeva kvržičnih bakterija na sva istraživana svojstva osim duljinu korijena dok primjena *P.fluorescens* nije pokazala nikakve statistički opravdane razlike na istraživana svojstva
- Interakcijsko djelovanje između sojeva kvržičnih bakterija i PGPR bakterije je bilo nesignifikantno na sva istraživana svojstva
- Najveći broj kvržica po biljci te najveću masu suhe tvari po biljci dobiveno je primjenom brzorastućeg soja, dok je najmanji broj i masu suhe tvari kvržica dobivena pri primjeni referentnog soja
- Nisu utvrđene statistički značajne razlike u broj kvržica po biljci pri primjeni ko-inokulacije s *P.fluorescens.*
- Aplikacijom PGPR bakterije utvrđene su statistički opravdane razlike u masi suhe tvari kvržica
- Najveću masu suhe tvari nadzemnoga dijela razvijaju biljke inokulirane sa brzorastućim sojem dok najmanju masu razvijaju kontrolne biljke. Interkacija kvržičnih i PGPR bakterija ne pokazuje statistički opravdane razlike djelovanja na masu suhe tvari nadzemnoga dijela
- Najveća duljina korijena razvijena je primjenom brzorastućeg soja, dok je najmanja duljina korijena razvijena primjenom referentnog soja. Analizom podataka o duljini korijena moguće je utvrditi pozitvan *P.fluorescens* utjecaj na rast krojena kod inokulacije spororastućim sojevima sojevima te kontrolnih biljaka.
- Proučavanje utjecaja *P.fluorescens* na duljinu korijena bilo je preliminarno, jer je volumen tla dostupan za razvoj korijena u sjetvenim loncima ograničen te bi trebalo nastaviti sa daljnjim istraživanjima i karakterizacijom ove PGPR bakterije.
- Primjenom PGPR bakterije smanjuje se broj kvržica, masa suhe tvari kvržica te masa suhe tvari nadzemnoga dijela kod brzorastućih sojeva stoga je pretpostavka da je

došlo do kompeticijskog odnosa između sojeva *Sinorhizobium spp.* i *P.fluorescens*. Njihove međusobne interakcije bi se trebale podvrgnuti daljnim ispitivanjima

- Najefikasniji u simbioznoj učinkovitosti pri bakterizaciji soje pokazali su se brzorastući sojevi. Za korištene izolate trebalo bi provesti dodatnu karakterizaciju i selekciju.
- U ovom radu započeta su istraživanja ko-inokulacije soje sa različitim sojevima kvržičnih bakterija i bakterije *P. fluorescens* te bi ih svakako trebalo nastaviti kako bi se dobili što pouzdaniji podaci koji mogu doprinijeti održivom uzgoju soje.

6. Popis literature

1. Aeron A., Kumar S., Pandey P., Maheshwari D.K. (2011): emerging role of plant growth promoting rhizobacteria. Bacteria in Agrobiology. Crop Ecosystems, 1 – 36

2. Ahmad M., Zahir Z.A., Asghar H.N., Arshad M. (2012): The combined application of rhizobial strains and plant growth promoting rhizobacteria improves growth and productivity of mungo bean (*Vigna radiata* L.) under salt-stressed conditions. Annals of Microbiology 62:1321 – 1330
3. Ahemad M., Kibert M. (2014). Mechanism and aplications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective, J. King Saud Univ.-Sci. 26:1 – 20
4. Alves B.J.R., Boddey R.M., Urquiaga S. (2003): The success of BNF in soybean in Brazil. Plant Soil 252:1 – 9
5. Antoun H., Prevost D. (2005): Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. U: Siddiqui Z.A. (Ed.), PGPR:Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, 1 – 38
6. Bacon C.W., White J.F. (2000): Microbial Endophytes. Taylor & Francis, New York
7. Bashan Y., de-Bashan L.E. (2005): Bacteria/plant growth-promotion. U: Hillel D(ed) Encyclopedia of soils in the eviroment. Elsevier, Oxford, pp 103 – 115
8. Bauer W. D. (1981): lnfection of legumes by rhizobia. Annu. Rev. Plant Physiol. 32, 407 – 449 .
9. Beijerinck M.W. (1888): Die Bacterien der Papilionaceen-knollchen. Botanische Zeitung 46:797 – 804
10. Boddey R.M., alves B.J., Soares L.H.D.B., Jantalia C.P., Cardos P.G., Guerreiro M.C., Moreira F.M.S. (2009): Exopolysaccharides produced by symbiotic nitrogen-fixing bacteria of Leguminosae, R Bras Ci Solo 35:657 – 671
11. Bottomley P.J., Myrold D.D. (2007): Biological N inputs. U: Paul EA (ed) Soil microbiology, ecology and biochemistry. Elsevier, Burlington, MA, p 514
12. Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F., Sessitsch A. (2014): Metabolic potential of endophxtic bacteria. Curr. Opin. Biotechnol. 27:30 – 37
13. Brewin N. J. (1991): Development of the legume root nodule. Annu. Rev. Cell Biol. 7, 191-226
14. Burd G., Dixon D.G., Glick B.R. (2000): Plant growth promoting bacteria the decrease heavy metal toxicity in plants. Can J. Micorbiol 46:237 – 245
15. Callaham D.A., Torrey J.G. (1981): The structural basis of infection of root hairs of *Triolium repens* by *Rhizobium.* Can. J. Bot. 59: 1647 – 1664
16. Carisse O., Bernier J., Benhamou N. (2003): Selection of biological agents from composts for control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Plant Pathology 25:258 – 267

17. Cherr C.M., Scholberg J.M.S., McSorley R.(2006): Green menure approaches to crop production. Agronomy Journal 98:302 – 319
18. Compant S., Clément C., Sessitsch A. (2010): Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization. Mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol. Biochem. 42:669 – 678
19. Crawford N.M., Khan M.L., Leustek T., Long S.R. (2000): Nitrogen and sulfur. U: Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R. (eds) Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, p 786
20. Catroux G. (1991): Inoculant quality standards and controls in France. U: Thompson J.A., (ed), Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control, FAQ, Rome pp. 113 – 120
21. Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. (2006): Legume seed inoculation technology-a review. Soil Biology & Biochemistry 36: 1275 – 1288
22. Delany I., Sheehan M.M., Fenton A., Bardin S., Aarons S., O'Gara F.(2000): Regulation of production of the antifungal metabolite 2.3-diactlyphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: gnetic analysy of pH1F as a transcriptional repressor. Microbiol Reading 146:537 – 546
23. DeLong E., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (2014): Prokaryotes, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
24. De Meyer G., Bigirimana J., Elad Y., Hofte M. (1998): Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European J. Plant Pathol 104:279 – 286
25. Di Bella J.M., Bao Y., Gloor G.B., Reid G. (2013): high throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. J. Microbiol Methods 95:401 – 414
26. Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. (2001): Responses of agrinomically important crops to inoculation with *Azospirillum.* Aust J. Plant Physiol 28: 871 – 879
27. Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. (2012): Microbial exopolysacharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym 87:951 – 962
28. Dozet G., Cvijanović G., Milošević N., Tintor B., Ivić M. (2015): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji,

29. Esitken A., Yildiz E.H., Ercisli S., Dormez M.F., Turan M., Gunes A.(2010): Effects of plant growth promoting bacteria PGPB on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. Scientia Hort 124:62 – 66
30. Euzéby J. (2006): Validation list no. 107. List of new names and new combinations previously effectively, but no validly, published. Int J Syst Evol Microbiol 56:1 – 6
31. Farrar K., Bryant D., Cope-Selby N.(2014): Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions:plant growth promotion in energy crops. Plant Biotechnology Journal 12:1193 – 1206
32. Ferguson B.J., Indrasumunar A., Satomi H., Mengu-Han L., Yu-Hsiang L., Reid D.E., Gresshoff P.M. (2010): Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. Invited Expert Review Journal of Intergrative Plant Biology 52(1):61 – 76
33. Ferreira L., Sánchez-Juanes F., García-Fraile P., Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Gonzáles-Buitrago J.M., Velázquez E. (2011): MALDI-TOF mass spectromery is a fast and reliable platofrm for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. PloS One 6:e20223
34. Fisher R.F., Long S.R. (1992): *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature 357:655 – 660
35. Fortin M.G., Long S.R. (1992): *Rhizobium*-plant signal excange. Nature 357:655 – 660
36. Fox J.E., Guledge J., Engelhaupt E., Burrow M.E., McLachlan J.A. (2007): Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. PNAS 104:10282 – 10287
37. Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (1932): Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants, University of Wisconsin Press, Madison
38. Freisen M.L., Porter S.S., Stark S.C., Wettberg E.J.V., Sachs J.L., Martinez-Romero E. (2011): Microbially mediated plant functional traits. Annu Rev Ecol Evol Syst 42:23 – 46
39. Gage D.J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen – fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:280 – 300
40. Galiber F., Finan T.M., Long S.R., Pühler a., Abola P., Ampe F., Vandenbol M. (2001): The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti.* Science 293:668 – 672

41. Gamalero E., Glick B.R. (2015): Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. Plant Physiology 169:13 – 22
42. Ganeshan G., Kumar M. (2006): *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. Journal of Plant Interactions 1(3):123 – 134
43. Gao T., Shi X.Y. (2018): Taxonomix structure and function of seed-inhabiting bacterial microbiota from common reed (*Phragmites australis)* and narrowleaf cattail (*Typha angustifolia* L.). Springer-Verlag Germany
44. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. (2005): family VII. *Bradyrhizobiaceae fam.*nov. U: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds) Bergey's Manual of systematic bacteriology, volume two the proteobacteria, part C the alpha-, beta-, delta- and epsilonproteobacteria. Springer, New York, pp 438 – 476
45. Geurts R., Bisseling T. (2002): Rhizobium nod factor perception and signalling. Plant Cell 14 (suppl.):239 – 249
46. Glick B.R. (2012): Plant growth-promoting bacteria: mechanism and applications. Scientifica (Cairo) 2012, 1 – 15
47. Glick B.R. (2014): Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169:30 – 39
48. Goethals K., Van Morgan M., Holsters M. (1992): conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveals a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1646 – 1650
49. Goswani D., Parmar S., Vaghela H., Dhandhukia P., Thakker J. (2015): Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant gorwth promoting rhizobacteria (PGPR). Cogent Food and Agriculture 1(1):1 – 13
50. Goswani D., Thakker J.N., Dhandhukia P.C. (2016): Portraying mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Congent Food and Agriculture 2(1):1 – 19
51. Hameed A., Yeh M.W., Hseih Y.T., Chung W.C., Lo C.T., Young L.S. (2015): Diversity and functional characteriation of bacterial endophytes dwelling in various rice *(Oriza sativa*L.) tissues, and their seed-borne dissemination into rhizosphere under gnotobiotic P-stress. Plant Soil 394:177 – 197
52. Hardoim P.R., Hardoim C.C., Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D. (2008): Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth.Trends in Microbiology 16:463 – 471

53. Hardoim P.R., Andreote F.D., Reinhold-Hurek B., Sessitch A., Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D. (2011): Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. FEMS Microbiol. Ecol. 77:154 – 164
54. Haas D., Défango G. (2005): Biological control of soil-borne pathogens by Fluorescent Pseudomonads. Nature Reviews Microbiology 10:1 – 13
55. Hellriegel H., Wilfarth H. (1888): Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineon und Leguminosen. Beilageheft zu der Ztschr. Ver. Rübenzucer-Industrie Deutschen Reichs 1:234
56. Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M. (2008): Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural system. Plant and Soil 311:1 – 18
57. Hirsch A.M., Lum M.R., Downie J.A. (2001): What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? Plant Physiol 127:1484 – 1492
58. Hoffland E., Halilinen J., Van Pelt J.A.(1996): Comparison of systemic resistance induced by avirulant and nonpathogenic Pseudomonas species.Phytophatology 86:757 – 762
59. Howard J.B., Rees D.C. (1996): Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation, Chem. Rev.96(7):2965 – 2982
60. Huang Y., Kuan Z., Wang W., Cao L.(2016): Exploring potential bacterial and fungal biocontrol agents transmitted from seeds to sprouts of wheat. Biol Control 98:27 – 33
61. Indiragandhi P., Anandham R., Kim K., Yim W.J., Madhaiyan M., Sa T.M. (2008): Induction of defense in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropan-1-carboxylate deaminase. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:1037 – 1045
62. James E.K., Gyaneshwar P., Mantan N., Barraquio W.L., Reedy P.M.,Iannetta P.P., Olivares F.L., Ladha J.K. (2002): Infection and colonization of rice seedling by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae Z67.*Molecular Plant-Microbe Interactions 15:894 – 906
63. Jarak M., Đurić S. (2008): Mikroorganizmi u zemljištu u funkciji održive poljoprivrede, poglavlje u monografiji Đubrenje u održivoj poljoprivredi, str. 98 – 117

64. Johnston-Monje D., Raizada M.N. (2011): Conversation and diversity of seed associated endophytes in zea across boundaries of evolution, ethnography and ecology. PloS One 6:e20396.
65. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Asamizu E., Kato T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Mochizuki Y., Nakayama S., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takeuchi C., Yamada M., Tabata S. (2000): Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res 7:331 – 338
66. Kijne J.W. (1992): The *Rhizobium* infection process. U: Biological Nitrogen Fixation, Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds): New York: Chapman and Hall, pp 349 – 398
67. Kloepper J.W., Schroth M.N. (1978): Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. U: angers (Ed.) Processings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Gilbert-Clarey Tours, 879 – 882
68. Kuykendall L.D. (2005): Family I. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321. U: Brenner D.J., Krieg N.R., Stanley J.T. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2. Springer, New York, pp 324 – 361
69. Lahan J.P., Kalita R., Sudipta, Bora S., Barooah M. (2012): Screening of Potential Oleaginous Microalgae from Dhemaji District of Assam, India. Internationa Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 5:141 – 144
70. Lakić J. (2016): Iskoristivost soje razlčitih kultivara za potrebe proizvodnje biogoriva i hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
71. Lima J.V.L., Weber O.B., Correia D., Soares M.A., Senabio J.A. (2015): Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region, Plant. Soil 389:25 – 33
72. Lindemann W.C., Glover C.R. (2003): Nitrogen Fixation by Legumes, Guide A-129, College of Agriculture and Home Economics
73. Lindström K., Murwira M., Willems A., Altier N. (2010): the biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. Res Microbiol 161:453 – 463
74. Long S.R. (2001): gene and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiol 125:69 – 72
75. Lucas G.J., Probanza A., Ramos B., Colon Flores J.J., Gutierez Manero F.J. (2004): Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Lupinus albus* I. cv. Multolupa, Life Sci 7:1 – 77

76. Lucy M., Reed E., Glick B.R.(2004): Application of free living plant growth-rpomoting rhizobacteria. Anotnie van Leeuwenhoek 86:1 – 25
77. Lugtenberg B., Kamilova F.(2009): Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol 63:541 – 556
78. Luna R., Planchon C.(1995): Genotype x *Bradyrhizobium japonicum* strain interactions in dinitrogen fixation and agronomic traits of soybean (*Glycine max* L. Merr). Euphyta 86:127 – 134
79. Masson-Boivin C., Perret EGX, Batut J. (2009): Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol 17:458 – 466
80. Miao G.H., Hong Z., Verma D.P.S. (1992): topology and phoshorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribateroid membrane. J. Cell Biol. 118:481 – 490
81. Milošević N., Cvijanović G., Tintor B. (2007): Mikroorganizmi kao indikatori ekotoksičnosti zemljišta, Zbornik radova EcoIst '07, Ekološka istina Sokobanja, 247 – 251
82. Milošević N., Tintor B., Cvijanović G. (2008): Microorganisms and soil ecotoxicity. Proc XII International Eko Conference Safe Food, Novi Sad, 59 – 65
83. Moulin L., Béna G., Boivin-Masson C., Stępowski T. (2004): Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. Mol Phylogenet Evol 30:720 – 732
84. Mrkovački N., Đalović I., Jocković Đ. (2012a): PGPR as bio-fertilizers and their application in maize. I International Symphosium and XVII Scientific Conference of Agronomist of Republic of Srpska, Book of Abstracts, p302. March 19 – 22, Trebinje, Bosnia and Herzegovina
85. Mrkovački N., Jarak M., Đalović I., Jocković Đ.(2012b): Značaj i efekat primene PGPR na mikrobiološku aktivnost u rizosferi kukuruza. Ratar.Povrt 49(3):335 – 344
86. Mylona P., Pawlwski k., Bisseling T. (1995): Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell Vol. 7:869 – 885
87. Nadeem S.M., Naveed M., Zahir Z.A., Asgahr H.N. (2013): Plant-Microbe Interactions for Sustainable Agriculture: Funfamentals and Recent Advances. U:Plant Micorbe Symbiosis:Fundamentals and Advances, Chapter:Plant-Micorobe Interactions for Sustainable Agriculture: Fundamentals and Recent Advances, Springer, New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, Naveen K. Arora, 51 – 103

88. Nap J.P., Bisseling T. (1990): Developmental biology of prokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science 250:948 – 954
89. Newcomb W. Sippel D., Peterson R.L. (1979): the early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. Can j. Bot. 57:2603 – 2616
90. Oberson A., Frossard E., Bühlman C., Mayer J., Mäder P., Lüscher A. (2013): Nitrogen fixation anf transfer in grassclover lays under organic and conventional cropping systems. Plant and Soil 371:237 – 255
91. Oke V., Long S.R. (1999): Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis, Current Opinion in Microbiology 2:641 – 646
92. O'Sullivan D.B., O'Gara F.(1994): A simple assay for fluorescent siderophores produced by Pseudomonas spp. Involved in suppersion of plant root pathogens.Microbiol Rev 56:662 – 676
93. Park M., Kim C., Yang J., Lee H., Shin W., Kim S. (2005): Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiol Res 160: 127 – 133
94. Patten c.L., Glick B.R. (1996): Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology 42:207 – 220
95. Paul D., Nair S.(2008): Stress adaptions in Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. Journal of Basic Microbiology 48(5)378 – 384
96. Perdaza R.O. (2008): Recent advances in nitrogen-fixing acetic aci bacteria. Int J Food Microbiol 125:25 – 35
97. Perotto S., Donovan N., Droback B.K., Brewin N.J. (1995): Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. MOI. Plant-Microbe Intreact. In press.
98. Postgate J.R. (1982): Biological nitrogen fixation: fundamentals. Philos. Trans. R. Soc. B. 269: 387 – 395
99. Prasad S., Syed I., Anuradha P. (2017): Effects of different microbial inoculants on yield, microbial population and chemical properties in soil of groundnut growth on vertisol. International Journal of Microbiology Research
100. Preston G.M. (2004): Plant perceptions of plant growth-promoting Pseudomonas. Philosophical Transaction of the Royal Society B359:907 – 918

101. Punete M.E., Bashan Y. (1993): Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). Symbiosis 15:49 – 60
102. Reddy P.M., Ladha J.K., So R.B., Hernandez R.J., Ramos M.C., Angeles O.R., Dazzo F.B., deBruijn F.J. (1997): Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonisation. Plant and Soil 194:81 – 98
103. Richardson A.E., Barea J.M., McNeill A.M., Prige T-Combaret C. (2009): Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promoting by microorganisms. Plant and Soil 321:305 – 339
104. Rodrigez M., Fraga R.(1999): Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17:319 – 339
105. Rodriguez H., Fraga R., Gonzales T., Bashan Y (2006): Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting rhizobacteria. Plant Soil 287:15 – 21
106. Rosenblueth M., Martínez-Romero E.(2006): Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions: MP MI 19:827 – 837
107. Sahni S., Sarma B.K., Singh D.P., Singh H.B., Singh K.P. (2008): Vermicompost enchances performance of plant growth-promoting rhizobacteria in *Cicer arietinum* rhizosphere against *Sclerotium rolfsii*. Crop Protection 27:369 – 376
108. Salvagiotti F., Cassman K.G., Specht J.E., Walters D.T., Weiss A., Dobermann A. (2008): Nitrogen uptake: fixation and responses to fertilizer N in Soybeans: a review. Field Crops Res. 108:1 – 13
109. Sandheep A.R., Asok A.K., Jisha M.S. (2013): Combined Inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* for Enchancing Plant Growth of Vanilla (*Vanilla planfolia*). Pakistan Journal of Biological Sciences 16(2):580 – 584
110. Sanotoyo G., Moreno-Hagelseib G., Del Carmen Orozco-Mosqueda M., Glick R.B. (2016): Plant growth-promoting bacterial endophytes. Micorbiol. Res. 183:92 – 99
111. Schoebitz M., Ribaudo C., Pardo M., Cantore M., Ciampi L., Cura J.A. (2009): Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwiggi* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biol Biochem 41: 1768 – 1774
112. Schoebitz M., López M. D., Roldán A. (2013): Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization, a review. INRA and Springer-Verlag, France

113. Schulz B., Boyle C. (2006): What are endophytes? Microbial Root Endophytes. Springer, Berlin, Heidelberg
114. Seo W.T. (2010): Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53:493 – 503
115. Singh N., Kumar s., Bajpai v.K., Dubey R.C., Maheshwari D.K., Kang S.C. (2010): biocontrol of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* PN1 and its plant gorwth promontory activity in chirpine. Crop Protection 29:1142 – 1147
116. Singh A., Sarma B.K., Upadhyay R.S., Singh H.B. (2013): Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea trough enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. Microbiological Research 100:923 – 935
117. Smith R.S. (1992): Legume inoculant formulation and application. Can J. Microbiol 38: 485 – 492
118. Solomon T., Pant L.M., Angaw T. (2012): Effects of inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybean (*Glycine max* L. Merill) varietes on nitisols of Bako, Western Ethiopia. ISRN Agron.2012:1 – 8
119. Soussi A., Ferjani R., Marasco A., Guesmi H., Cherif E., Rolli F., Mapelli H.I., Ouzari D., Daffonchio D., Cherif A. (2015): Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnical potential. Plant Soil, doi: 10.1007/s11104-015-2650-y
120. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev 31:425 – 448
121. Srivastava R., Khalid A., Singh U.S., Sharma A.K.(2010): Evaluation of arbuscular mycorhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* for the managment of tomato wilt. Bio Control 53:24 – 31
122. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (Eds.)(1992): Biological nitrogen fixation. Berlin:Springer Science and Buisness Media
123. Sturz A.V., Nowak J.(2000): Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl.Soil.Ecol.15:183 – 190
124. Subramanian S., Smith D.L. (2013): A proteomics approach to study soybean and its sybiont *Bradyrhizobium japonicum*-a review. U: Brad J. (ed), A Comprehensive Survey

if Interantional Soybean Research-Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationship. InTech.

125. Szchech M., Shoda M.(2004): Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. J. Phytopanthol 152:549 – 556
126. Šperanda K.(2017): Korisni mirkoorganizmi u održivoj biljnoj proizvodnji. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
127. Thompson J.A. (1988): Survival of root-nodule bacteria on inoculated seed. U: Murrell W.G., Kennedy I.R. (edc): Microbiology in Action, Research Studies Press, Letchworth, pp- 67– 80
128. Topol J. (2012): Značaj simbiotske fiksacije dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
129. Truyens S., Weyens N., Cuypres A., Vangronsveld J.(2015): Bacterial seed endophytes:genera, vertical transmission and interaction with plants. Enviromental Microbiology Reports7:40 – 50
130. Truyens S., Beckers B., Thijs S., Weyens N., Cuypers A., Vangronsveld J.(2016): Cadmium-induced and trans-generational changes in the cultivable and total seed endophytic community of *Aradopsis thaliana*. Plant Biol 18:376 – 381
131. Turner S.L., Young J.P.W. (2000): the glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. Mol biol Evol 17:309 – 319
132. Turner T.R., James E.K., Poole P.S. (2013): The plant microbiome. Genome Biol 14:209. https ://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209
133. Tytova L. V., Brovko I.S., Kizilova A.K., Kravchenko I.K., Iutynska G.A.(2013): Effect of Complex Microbial Inoculants on the Number and Diversity of Rhizospheric Microorganism and the Yield of Soybean. International Journal of Microbiological Research4(3):267 – 274
134. Vadez V., Beck D.P., Lasso J.H., Drevon J.J.(1997): Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N-2 fixation to limiting P nutrition in common bean. Physiol. Plant.99:227 – 232
135. Van Sponsen P.C., Bakhuizen R., Van Brussel A.A.N., Kljne J.W. (1994): Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a twostep process. Eur. J. Cell Biol. 64:88 – 94

136. Vaughan M.J., Mitchell T., McSpadden Gardener B.B. (2015): What's inside that seed we brew? A new approach to mining the coffee microbiome. Appl Environ Microbiol 81:6518 – 6527
137. Verma D.P.S. (1992): Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of Rhizobium. Plant Cell 4:373 – 382
138. Vessey K.J. (2003): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255:571 – 586
139. Viswanathan R., Samiyappan R.(2005): Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads againt red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. Crop Prot. 21:1 – 10
140. Vratarić M., Sudarić A. (2008): Soja, *Glycine max*. (L.) Merr.; IBL Osijek
141. Vukadinović V., Ločarić Z. (1997): Ishrana bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek. Drugo izmijenjeno i dopunjeno izdanje.
142. Vyas P., Gulati A.(2009): Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled enviroment by phosphate-solubilizing flourescent *Pseudomonas*. BMC Micrrobiology 9:174
143. Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S. (1996): Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant gorwth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology 86:221 – 224
144. Werner D. (1992): Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: Compartments and functions. U: Biological Nitrogen Fixation, Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. (eds.), New York: Champan and Hall, pp 399 – 431
145. Wilhelm J., Johnson M.F., Karlen L., David T.(2007): corn stover to sustain soil organic further constrains biomass supply. Agronomy Journal 99:1665 – 1667
146. Yadav K.S., Dave A., Sarkar A., Singh H.B., Sarma K.B. (2013): Co-inoculated Biopriming with *Trichoderma, Pseudomonas* and *Rhizobium* Improves Crop Growth in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Agriculutre, Envirometn & Biotechnology 6(2):255 – 259
147. Yu X., Ai C., Xin L., Zhou G.(2011): The siderophore-rpoducing bacterium, *Bacillus subtillis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology 47(2):138 – 145
148. Zaidi A., Khan M.S. (2005): Interactive effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield and nutrient uptake of weat. Journal of Plant Nutrition 28:2079 – 2092

149. Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M., Oves M. (2009): Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiol Immunol Hung 56:263 – 284
150. Zhang H., Prithiviraj B., Charles T.C., Driscoll B.T., Smith D.L. (2003): Low temeprature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved nodulation and nitrogen fixation of soybean in a short season(cool spring) area. Eur J. Agron. 19:205 – 213
151. Zimmer S., Messer M., Hasse T., Piepho H.P., Minderman A., Schulz H., Habekuβ A., Ordon F., Wilbois K.P., Heβ J. (2016): Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany, European Journal of Agronomy 72:38 – 45

Životopis

- Bernarda Lenkert je rođena u Zagrebu 08. rujna 1993. godine.
- Osnovnu glazbenu školu Vatroslav Lisinski završava 2007. godine
- Srednju poljoprivrednu školu u Zagrebu upisuje u srpnju 2007. godine te završava na ljeto 2011. godine
- Prediplomski studij Agroekologija na Agronomskom fakultetu u Zagrebu upisuje u rujnu 2011. godine te ga završava u rujnu 2015. godine
- Diplomski studij Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu u Zagrebu upisuje 2015. godine
- Tečno govori engleski jezik te im završen B2 stupanj
- Tečno govori njemački jezik te ima završen C3 stupanj