

## Aklimatizacija biljaka malina iz TIB sustava inokuliranih s *Bradyrhizobium sp.* i rizobakterijama promotorima biljnog rasta (PGPR)

Aleksandar Stanisavljević<sup>1</sup>, Ivna Štolfa<sup>2</sup>, Brigita Popović<sup>1</sup>, Dejan Bošnjak<sup>1</sup>,  
Toni Kujundžić<sup>1</sup>, Branka Viljanac<sup>2</sup>, Tihana Teklić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku, Vladimira Preloga 1,  
31000 Osijek, Hrvatska (astanis@pfos.hr)

<sup>2</sup>Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Cara Hadrijana 8 / A, 31000  
Osijek, Hrvatska

### Sažetak

Adaptacija biljaka na *ex vitro* uvjete predstavlja posljednju i najosjetljiviju fazu u mikropropagaciji voćnog sadnog materijala. Aplikacija kompetitivne mikroflore putem PGPR u rizosferu korijena presadnica malina (*Rubus idaeus* L.) iz TIB sustava provedena je na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku s ciljem bolje adaptacije biljaka u fazi aklimatizacije. Tretmani su uključivali aplikaciju PGPR roda *Bacillus sp.* i *Bradyrhizobium sp.*, te njihovu međusobnu kombinaciju u usporedbi s kontrolnom varijantom (bez bakterija). Nakon 30 dana izvršeno je mjerenje stope preživljavanja biljaka i morfoloških parametara (visina presadnica, broj izdanaka, broj i veličina listova). Tretman s *Bacillus sp.* (FB) i kontrolni tretman (K) rezultirao je značajno većom stopom preživjelih biljaka u odnosu na ostale tretmane. Tretman kombinacija oba roda bakterija (MIX) rezultirao je značajno većim biljkama (visina) u odnosu na sve tretmane, te značajno većim brojem izdanaka u odnosu na tretman s *Bradyrhizobium sp.* (PFOS). Na tretmanu MIX zabilježena je najznačajnija stopa mortaliteta. Tretman s *Bradyrhizobium sp.* (PFOS) rezultirao je značajno većim listovima ali je njihov broj značajno manji u odnosu na sve ostale tretmane. Broj listova značajno je veći na tretmanu s *Bacillus sp.* (FB) i kontrolnoj varijanti (K). Dobiveni rezultati ukazuju potencijal aplikacije kompetitivne mikroflore na bazi *Bacillus sp.* sojeva u aklimatizaciji maline iz TIB sustava. Daljnja istraživanja potrebno je usmjeriti na određivanje povoljnih koncentracija i mehanizama djelovanja, uključujući i antioksidativni status tretiranih biljaka.

**Ključne riječi:** malina, TIB, aklimatizacija, PGPR

### Uvod

Mikroorganizmi povezani s biljkom, posebice endofiti oduvijek se apostrofiraju kao uzročnici problema kontaminacije (Leifert i sur., 1994.) i predmet su istraživanja mnogih protokola njihove eliminacije prilikom uvođenja inicijalnog materijala u *in vitro* kulturu (Stanisavljević i sur., 2017.). Neki od tih organizama predstavnici su korisne biljne bakterijske mikroflore koji mogu poboljšati performanse nekih biljaka, odnosno voćnih vrsta u stresnom okruženju što u konačnici ima odraz na rast, sadržaj nutritivnih elemenata i prinos (Karlidag i sur., 2007, Esikten i sur., 2009, Karakurt i sur., 2011.). U rizosferi odvijaju se vrlo intenzivne i važne interakcije biljka – tlo – mikroorganizmi – mikrofauna koje mogu značajno utjecati na budući rast i razvoj biljnog materijala. U rizosferi bakterije su najbrojniji mikroorganizmi, a rhizobakterije su kompetentne bakterije rizosfere koje agresivno koloniziraju korijen biljke u svim fazama rasta (Antoun i Kloepper, 2001.). Svega 2-5% rizogenih bakterija možemo nazvati rizobakterijama promotorima biljnog rasta ili PGPR (*eng.* Plant Growth Promoting Rhizobacteria) jer sadrže kompetitivnu miklofloru koja ima pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljaka (Kloepper i Schroth, 1978.). Izvorna definicija ih obilježava kao slobodno živuće bakterije (Kloepper i sur., 1989.), a neke od njih napadaju

tkiva biljaka i izazivaju neprimjetne i asimptomatske infekcije (Sturz i Nowak, 2000.). Izvorna definicija rod *Rhizobia* i *Bradyrhizobia* ne uvrštava u PGPR, a sama fiksacija dušika u nodulama leguminoza ne pripisuje se mehanizmu djelovanja PGPR (Bashan i sur., 2004.) nego uspostavljanja simbioze s homolognom biljkom domaćinom. Asocijativne dušično-fiksirajuće bakterije koje ne izazivaju morfološke promjene na biljci domaćinu smatraju se PGPR. PGPR utječu na određene pozitivne promjene u biljaka izravnim ili neizravnim načinom djelovanja (Lazarovits i Nowak, 1997.). Izravni mehanizmi uključuju proizvodnju bakterijsko stimulativnih hlapljivih tvari i fitohormona, snižavanje razine etilena u biljci, poboljšanje dostupnosti hranjivih tvari (oslobađanje fosfata i mikronutrijenata iz netopivih izvora; nesimbiotska fiksacija dušika - biofertilizanti) i stimulacija mehanizama otpornosti na bolesti (inducirana sistemska otpornost - fitostimulatori). Neizravnim djelovanjem PGPR djeluju kao biokontrolni agensi koji smanjuje obolijevanja - biopesticidi, stimuliraju druge korisne simbioze ili štite biljku na zagađenim tlima - rhizoremedijatori (Somers i sur., 2004.).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi adaptibilnost presadnica malina proizvedenih na tekućem mediju (TIB sustav) upotrebom bakterija iz grupe PGPR na *ex vitro* uvjete. Svrha ovog istraživanja je moguća supstitucija za korištenje standardnih fungicida i gnojiva te izbjegavanje njihovog potencijano toksičnog djelovanja u fazi inicijacije korijena maline.

### Materijal i metode

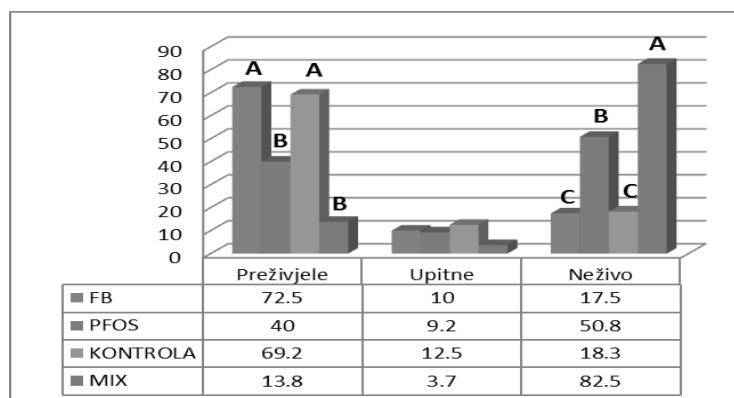
Aplikacija kompetitivne mikroflore putem PGPR u rizosferu korijena presadnica malina (*Rubus idaeus* L.) iz TIB sustava provedena je na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku (zaštićeni prostor unutar fakulteta) s ciljem bolje adaptacije biljaka u fazi aklimatizacije. Tretmani su uključivali aplikaciju bakterija roda *Bacillus* sp. (komerijalno sredstvo na bazi sojeva *Bacillus supstilus*  $1,10 \times 10^8/\text{cm}^3$ , *Bacillus megaterium*  $1,24 \times 10^7/\text{cm}^3$  i *Saccharomyces* sp.  $1,16 \times 10^6/\text{cm}^3$  spora - tretman FB), bakterija iz roda *Bradyrhizobium* sp. (sastav zaštićen patentom - tretman PFOS), te njihovu međusobnu kombinaciju (tretman MIX) u usporedbi s kontrolnom varijantom (tretman K - bez bakterija). Biljke su proizvedene u suvremenom TIB sustavu SETIS, uzgajane su na tekućoj DKW podlozi u fazi multiplikacije, odnosno na podlozi MS u fazi ukorijenjavanja s imerzijom (potapanje) četiri puta u danu po 3 minute. Korijen presadnica je prije sadnje potapan u 0,25%-tne suspenzije navedih bakterija (tretmana) koji su nakon sadnje još dodatno putem aplikatora ubrizgani u rizogeno područje supstrata. Pokus je postavljen po bloknom sustavu u 3 ponavljanja. Svaki tretman je uključivao 60 biljaka ( $3 \times 20 = 60$  biljaka/tretman). Nakon pikanja u perlitne kontejnere uspostavljen je kontrolirani režim vlage, temperature ( $24\text{ }^\circ\text{C}$ ) i svjetla (16/8). Početni režim vlage iznosio je 90% (7 dana) nakon čega je smanjen na 80% (7 dana) i stabiliziran do kraja ciklusa na 70%. Po završetku promatranog ciklusa (30 dana) izvršeno je mjerenje stope preživljavanja biljaka i morfoloških parametara (visina presadnica, broj izdanaka, broj i veličina listova)

Svi utvrđeni rezultati su analizirani uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS Software 9.3, programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su slijedeće statističke metode: analiza varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (*eng.* Least Significant Difference) ( $p \leq 0.05$ ).

### Rezultati i rasprava

Najveća stopa preživjelih biljaka zabilježena je na tretmanu s aplikacijom sojeva *Bacillus* sp. (FB). Tretman *Bacillus* = PGPR (FB – 72,5%) i kontrolni tretman (K – 69,2%) rezultirali su značajno većom stopom preživjelih biljaka i brojem listova (FB – 9,21 i K – 9,25) u odnosu na ostale tretmane (Grafikon 1, Tablica 1). Uspjeh tretmana FB pripisujemo vrstama

iz roda *Bacillus sp.* za koje Jetiyanon i sur., (2003.) navode njihov pozitivan učinak u biološkoj kontroli protiv paleži, antraknoze, mozaične bolesti, naročito *Bacillus megaterium* kao antimikotik za Phytophthoru (Jung i Kim, 2003.). *Bacillus supstilus* također sintetizira antimikotik koji inhibira rod *Fusarium* (Kumar, 1999.), a soj RB14 *Rhizoctonia solani* (Asaka i Shoda, 1996.).



Grafikon 1. Stopa preživjelih presadnica po tretmanima (<sup>AB</sup> razina  $p \leq 0.05$ )

Tablica 1. Utjecaj pojedinih tretmana na promatrane morfološke parametre presadnica

|                                    | Visina                  | Izdanci                 | Listovi                 | Velicina lista           |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| FB ( <i>Bacillus sp.</i> )         | 3,03 <sup>B</sup>       | 3,07 <sup>AB</sup>      | <b>9,21<sup>A</sup></b> | 24,36 <sup>B</sup>       |
| PFOS ( <i>Bradyrhizobium sp.</i> ) | 2,98 <sup>B</sup>       | 2,26 <sup>B</sup>       | 7,11 <sup>B</sup>       | <b>27,08<sup>A</sup></b> |
| MIX                                | <b>4,21<sup>A</sup></b> | <b>3,54<sup>A</sup></b> | 4,29 <sup>C</sup>       | 23,24 <sup>B</sup>       |
| KONTROLA                           | 2,87 <sup>B</sup>       | 2,97 <sup>AB</sup>      | <b>9,25<sup>A</sup></b> | 23,13 <sup>B</sup>       |
| <i>F-test</i>                      | 10,67                   | 3,16                    | 21,51                   | 5,98                     |
| <i>p</i>                           | <,0001                  | 0,0296                  | <,0001                  | 0,0010                   |

\* Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne, <sup>AB</sup> razina  $p \leq 0,05$

Tretman kombinacijom oba roda bakterija (MIX) rezultirao je značajno većim biljkama (4,21 cm) u odnosu na sve ostale tretmane (Tablica 1), te značajno većim brojem izdanka (3,54) u odnosu na tretman s *Bradyrhizobium sp.* (PFOS). Na tretmanu MIX zabilježena je najznačajnija stopa mortaliteta u odnosu na sve ostale tretmane od čak 82,5% (Grafikon 1). Tretman s *Bradyrhizobium sp.* (PFOS) rezultirao je značajno većim listovima (27,08 cm) ali je njihov broj (4,29) značajno manji u odnosu na sve ostale tretmane. Nekolicina istraživača navodi da pojedini predstavnici roda *Rhizobia sp.* mogu proizvesti fitohormone, siderofore, HCN te mogu kolonizirati korijen mnogih ne-leguminoznih biljaka (Reiter i sur., 2002.; Chaintreuil i sur., 2000.). Rod *Rhizobia sp.* ima dobar potencijal uporabe u biološkoj kontroli protiv nekih biljnih patogena (Bardin i sur., 2004; Reitz i sur., 2000.)

## Zaključak

U suvremenoj rasadničarskoj proizvodnji ulimativni cilj je smanjiti upotrebu pesticida i kemijskih gnojiva koja se koriste u fazi aklimatizacije, pri čemu bakterije iz skupine PGPR pokazuju veliki potencijal kako u biološkoj kontroli bolesti i štetnika, tako i u promociji rasta te povećanju prinosa i kvalitete. Tretman s bakterijama iz roda *Bacillus sp.* (*Bacillus supstilus* i *Bacillus megaterium*) rezultirao je najvećom stopom preživljavanja (72,5%).

Pretpostavka je da osim posrednog učinka putem stvaranja specifičnih metabolita svoju efikasnost ispoljava i kompetitivnom kolonizacijom u rizogenoj zoni. Tretman s bakterijama iz roda *Bradyrhizobium sp.* očekivano nije rezultirao pozitivnim utjecajem na rizogenezu pikiranih biljaka, niti sinergističkim učinkom u kombinaciji s bakterijama iz roda *Bacillus sp.* (naveća stopa mortaliteta 82,5%). Međutim, kombinacija oba roda bakterija nakon 30 dana rezultirala je značajno pozitivnim razlikama u mjerenim morfološkim parametrima (visina i broj izdanaka presadnica). Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu daljnjih ispitivanja u stvaranju kompetitivne mikroflore na bazi *Bacillus sp.* u aklimatizaciji maline ali i drugih srodnih vrsta. Analiza antioksidativnog statusa tretiranih biljaka (indikator stresa) može ukazivati na mehanizam djelovanja i poslužiti kao koristan alat u daljnjoj standardizaciji protokola.

### Napomena

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu VIP projekta „Suvremene tehnologije proizvodnje voćnih sadnica“ (broj 2016-14-55).

### Literatura

- Antoun H. and Klopper J. W. (2001). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), in: Encyclopedia of Genetics, Brenner, S. and Miller, J.H., eds., Academic Press, N.Y., pp.1477-1480.
- Asaka O. and Shoda M. (1996). Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14, Appl. Environ. Microbiol. 62:4081-4085.
- Bardin S. D., Huang H.-C., Pinto J., Amundsen E. J., and Erickson R. S. (2004). Biological control of Pythium damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae, Can. J. Bot. 82: 291-296.
- Bashan Y., Holguin G., and de-Bashan L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), Can. J. Microbiol.50:521-577.
- Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J. Bâ A., Gillis M., de Lajudie P., and Dreyfus B. (2000). Photosynthetic bradyrhizobia as natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*, Appl. Environ. Microbiol. 66: 5437-5447.
- Esitken A., Yildiz H.E., Ercisli S., Figen Donmez M., Turan M., Gunes A. (2009). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. Scientia Horticulturae 124 (2010) 62–66, doi:10.1016/j.scienta.2009.12.012
- Jetiyanon K., Fowler W. D. and Klopper J. W. (2003). Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand, Plant Dis. 87:1390-1394.
- Jung H.-K. and Kim S.-D. (2003). Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-pepper phytophthora blight disease, Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 31:235-241.
- Karakurt H., Kotan R., Dadaşoğlu F., Aslantaş R., Şahin F. (2011). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). Turk J Biol 35, 283-291, TÜBİTAK, doi:10.3906/biy-0908-35
- Karlidag H., Esitken A., Turan M., Sahin F. (2007). Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. Scientia Horticulturae 114 (2007) 16–20, doi:10.1016/j.scienta.2007.04.013
- Klopper J. W. and Schroth M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes in: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Vol 2. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France, pp. 879-882.
- Klopper J. W., Lifshitz R. and Zablutowicz R. M. (1989). Free-living bacterial inocula forenhancing crop productivity, Trends Biotechnol. 7:39-44.
- Kumar B. S. D. (1999). Fusarial wilt suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chick pea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris, Biol. Fert. Soils. 29: 87-91.

- Lazarovits G. and Nowak J. (1997). Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment, *HortScience* 32:188-192.
- Leifert C., Morris C. E., Waites W. M. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems in vitro. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:139-183.
- Reiter B., Pfeifer U, Schwab H., and Sessitsch A. (2002). Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2261-2268.
- Reitz M., Rudolph K., Schröder I., Hoffmann-Hergarten S., Hallmann J., and Sikora R. A. (2000). Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3515-3518.
- Somers E., Vanderleyden J., and Srinivasan M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet, *Crit. Rev. Microbiol.* 30:205-240.
- Stanisavljević A., Bošnjak D., Štolfa I., Vuković R., Kujundžić T., Drenjančević M. (2017). Sterilization of different explant types in micropropagation of CAB-6P and Gisela 6 cherry rootstock. *Poljoprivreda*, Vol.23 No.2 Prosinac 2017. <https://doi.org/10.18047/poljo.23.2.5>
- Sturz A.V. and Nowak J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops, *Appl. Soil Ecol.* 15:183-190.

## **Acclimatization of raspberry plants from TIB system inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and plant growth promoting bacteria (PGPR)**

### **Abstract**

Adaptation of plants to *ex-vitro* conditions represents the last and most sensitive phase in micropropagation of fruit planting material. The application of competitive microflora via PGPR in the rhizosphere of the raspberry plants (*Rubus idaeus* L.) from the TIB system was carried out at the Faculty of Agriculture in Osijek with the aim of better adaptation of the plants in the phase of acclimatization. The treatments included the PGPR genus *Bacillus* sp. and *Bradyrhizobium* sp., and their mutual combination compared to the control variant (without bacteria). After 30 days, we measured the survival rate of plants and morphological parameters (seedlings height, number of shoots, leaf number and size). Treatment with *Bacillus* sp. (FB) and control (K) resulted in significantly higher survival rates compared to other treatments. Treatment of the combination of both genera (MIX) resulted in significantly larger plants (height) in relation to all treatments, and significantly higher number of shoots compared to treatment with *Bradyrhizobium* sp. (PFOS). The most significant mortality rate was recorded on MIX treatment. Treatment with *Bradyrhizobium* sp. (PFOS) resulted in significantly larger leaves but their number is significantly smaller than all other treatments. The number of leaves is significantly higher in the treatment with *Bacillus* sp. (FB) and the control variant (K). The obtained results indicate the potential of competing microflora application on *Bacillus* sp. grows in the acclimatization of raspberries from the TIB system. Further studies should be directed to the determination of favorable concentrations and mechanisms of action, including the antioxidant status of the treated plants.

**Key words:** raspberry, TIB, acclimatization, PGPR