

Influence of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Pseudomonas fluorescens* on growth of soybean (*Glycine max* L.)

Utjecaj ko-inokulacije sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens* na rast soje (*Glycine max* L.)

Sanja KAJIĆ¹, Bernarda LENKERT², Sanja SIKORA¹, Ivana RAJNOVIĆ¹ (✉)

¹ University of Zagreb Faculty of Agriculture, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Croatia

² Novartis Hrvatska d.o.o., Radnička cesta 38B, 10000 Zagreb, Croatia

✉ Corresponding author: irajnovic@agr.hr

Received: February 6, 2023; accepted: May 29, 2023

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L.) is a very important legume in the human diet as well as fodder crop. Previous studies have reported that co-inoculation with PGPR (plant growth-promoting bacteria) and rhizobia promotes symbiotic nitrogen fixation efficiency, increases plant nitrogen content and reduces the occurrence of soybean diseases, thus reducing pesticide use, and protecting the environment. The aim of this study was to determine the impact of co-inoculation of soybean seeds with different strains of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* as well as PGPR (*Pseudomonas fluorescens*). Indigenous strains of beneficial bacteria used in this research were isolated from different locations in Croatia. Isolates were identified by performing 16S rRNA gene sequencing. The application of different strains of nodule bacteria resulted in a statistically justified effect on all investigated properties, with the exception of root length. A positive influence of *P. fluorescens* on the increase in shoot dry weight was observed with the co-inoculation with the reference strain *B. japonicum* and two indigenous strains. The application of *P. fluorescens* did not show statistically justified differences in any of the investigated properties. Co-inoculation of nodules and PGPR bacteria is a very important biotechnological tool in agriculture, which is why research in this area should definitely be continued and expanded to a larger number of *P. fluorescens* strains.

Keywords: beneficial association, symbiotic efficiency, PGP bacteria, *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum*

SAŽETAK

Soja (*Glycine max* L.) je vrlo važna mahunarka u ljudskoj prehrani te kao krmna kultura. Prethodna istraživanja pokazala su da ko-inokulacija s rizobijama i PGPR-om (bakterijama koje potiču rast bilja, engl. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) potiče učinkovitost simbiotske fiksacije dušika, povećava sadržaj dušika u biljkama i smanjuje pojavu bolesti soje, čime se smanjuje upotreba pesticida i štiti okoliš. Cilj ovih istraživanja bio je utvrditi utjecaj koinokulacije sjemena soje različitim sojevima kvržičnih bakterija *Bradyrhizobium japonicum* kao i bakterijama koje potiču rast biljaka (PGPR) (*Pseudomonas fluorescens*). Autohtoni sojevi korisnih bakterija korišteni u ovom istraživanju izolirani su s različitih lokacija u Hrvatskoj. Izolati su identificirani sekvenciranjem 16S rRNA gena. Primjena različitih sojeva kvržičnih bakterija rezultirala je statistički opravdanim učinkom na sva ispitivana svojstva, izuzetak je bila duljina korijena. Pozitivan utjecaj *P. fluorescens* na povećanje mase suhe tvari nadzemnog dijela biljke uočen je kod koinokulacije s referentnim sojem *B. japonicum* i dva autohtona soja. Primjena *P. fluorescens* nije pokazala statistički opravdane razlike ni za jedan od ispitivanih svojstava. Koinokulacija kvržičnih i PGPR bakterija vrlo je važan biotehnološki alat u poljoprivredi, zbog čega istraživanja u ovom području svakako treba nastaviti i proširiti na veći broj sojeva *P. fluorescens*.

Ključne riječi: korisne asocijacije, simbiotska učinkovitost, PGPR bakterije, *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum*

DETAILED ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L.) is a very important legume used for human nutrition as well as fodder crop. Soybean–rhizobia symbiotic nitrogen fixation has been of considerable significance for improving agricultural productivity. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are particularly important in agricultural systems, and previous studies have reported that co-inoculation with PGPR and rhizobia enhances rhizobial colonization of the legumes, increases the number of nodules, improves the nitrogen fixation efficiency and increases plant nitrogen content. The co-inoculation with PGPR and rhizobia can reduce the occurrence of soybean diseases, thus reducing pesticide use, improving yield, and protecting the environment. PGP rhizobacteria consist of numerous genera with *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Azospirillum* being the most represented. The aim of this research was to determine if the co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Pseudomonas fluorescens* strains can additionally improve seed yield and macronutrient uptake, compared to rhizobial inoculation alone. For this purpose, soil samples were taken from the arable horizon of different locations in Croatia and chemical properties of the soils were determined. Rhizobia strains were isolated following the trap host method and 16S rRNA gene sequencing was performed in order to identify rhizobia. Two-factorial vegetation experiment was set up in a growth chamber using a random block arrangement scheme in three repetitions and factors included different strains of rhizobia and PGPR bacterium *P. fluorescens*. In the full flowering phase, the number of nodules per plant, nodules dry matter weight and the shoot dry weight were measured. The influence of *P. fluorescens* on improving the growth of soybean plants was determined by measuring the root length. Statistical analysis was performed using the software package SAS 9.4 for Windows. Regardless of the dominance of the acidic soils, rhizobial strains were isolated from all soil samples. All tested strains were able to establish a symbiotic relationship with the soybean variety used. The highest number of nodules per plant was determined using strain B4. This strain, together with B3 resulted in the most effective infection and nodulation. Applying strains B5 and B6 in combination with *P. fluorescens* resulted in an increase in the number of nodules, which can be attributed to the positive effect of this PGP bacterium, although the differences were not statistically significant. The nodule dry matter weight per plant was significantly higher while using strain B4 compared to the other strains. A positive influence of *P. fluorescens* on the increase in shoot dry weight was observed with the co-inoculation with the reference strain *B. japonicum* 344 and strains B5 and B6. The greatest root length was recorded with the application of strain B3, although there were no statistically justified differences in root length. In the case of some strains, co-inoculation with PGPR bacteria led to a reduction in the number of nodules, shoot dry weight and nodule dry matter weight. Such results indicate the occurrence of competition between the strains of *B. japonicum* and *P. fluorescens*. The obtained results also indicate the need for further testing with more included strains of these beneficial bacteria.

UVOD

U suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji, prekomjerno korištenje mineralnih gnojiva, najviše dušičnih, dovodi do značajnog onečišćenja okoliša. Najveća opasnost krije se u tome što proizvodnja mineralnih gnojiva značajno iscrpljuje neobnovljive izvore energije i time predstavlja veliku opasnost ne samo za okoliš već i za ljudsko zdravlje (Gupta i sur., 2015). Kako proizvodnja mineralnih gnojiva nema uporište u ekološkim, energetske i ekonomskim značajkama, biološka fiksacija dušika predstavlja značajnu alternativu njihovu korištenju. Biološka fiksacija dušika jedan je od najviše istraživanih mikrobioloških procesa i kao takva igra vrlo značajnu ulogu u procesu kruženja dušika u prirodi.

Mahunarke danas imaju neizostavnu ulogu u održivoj poljoprivredi i plodoredu zbog svoje jedinstvene sposobnosti opskrbe dušikom. Za mahunarke se zna da ulaze u simbiozne odnose s bakterijama tla koje se odlikuju jedinstvenom sposobnošću fiksacije atmosferskog dušika, kojeg predaju biljci, a ona ga koristi za svoj rast i razvoj (Stagnari i sur., 2017). Posebno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji pripada soji (*Glycine max* L.) koja se danas ističe kao jedna od najznačajnijih leguminoznih usjevima. Zrno soje posjeduje visokovrijedne proteine i ulja, zbog čega je soja poznata kao visoko kvalitetan izvor ljudske i stočne hrane (Habibi i sur., 2017). Bakterizacija različitih sorti soje s vrlo učinkovitim autohtonim sojevima rizobija može dati slične prinose zrna kao i primjena mineralnih dušičnih gnojiva. Takve rezultate pokazala su brojna istraživanja poput Redžepović i sur. (2006) za *B. japonicum* u Hrvatskoj, Hungria i sur. (2015) za *B. japonicum* i *B. diazoefficiens* u Brazilu, Koziel i sur. (2013) za *B. japonicum* u Poljskoj, Leggett i sur. (2017) za *B. japonicum* u Argentini, Thuita i sur. (2018) za *B. japonicum* i *B. diazoefficiens* u Keniji. Glavni cilj bakterizacije je reducirati unos mineralnih dušičnih gnojiva, mobilizaciju dušičnih spojeva u vode i tlo, kao i reducirati troškove uzgoja usjeva (Reinprecht i sur., 2020).

U selekciji autohtonih sojeva kvržičnih bakterija glavnu ulogu igra njihova sposobnost kolonizacije korijena biljke domaćina, adaptacija kvržičnih bakterija

na uvjete sredine, sposobnost uspostavljanja simbioznog odnosa s biljkom domaćinom te sposobnost učinkovitog usvajanja dušika kao i poticanje rasta i razvitka biljaka. Jedan od novijih načina primjene mikroorganizama u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji je ko-inokulacija s PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) i kvržičnim bakterijama. PGPR bakterijama pripadaju različiti rodovi bakterija i gljiva koje se učinkovito mogu koristiti za povećanje rasta i prinosa brojnih leguminoznih usjeva. Korištenje PGPR bakterija ima višestruku učinkovitost kao što je zaštita leguminoznih usjeva od patogenih gljiva i bakterija, proizvodnja fitohormona koji promoviraju biljni rast i razvitak kao i opskrba biljaka teško dostupnim hranjivim tvarima (Yegorenkova i sur., 2016). Osim što promoviraju biljni rast i razvitak, PGPR bakterije pozitivno djeluju i na autohtone mikrobne populacije tla što rezultira povećanjem biogenosti i sadržaju organske tvari u tlu (Zeffa i sur., 2020). Jedno od važnih svojstava PGPR bakterija je proizvodnja egzopolisaharide koji igraju vrlo važnu ulogu u agregaciji mikročestica u makročestice tla što u konačnici rezultira boljom strukturom tla (Chibeba i sur., 2018).

Glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj bakterizacije sjemena soje različitim sojevima kvržičnih bakterija kao i bakterijama promotorima biljnog rasta i razvitka biljaka na simbioznu učinkovitost i rast soje.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje tla i kemijske analize

Uzorci tla za analizu uzeti su s različitih lokacija iz oraničnog horizonta (0-30 cm) (Tablica 1).

Analiza kemijskih svojstava uzoraka tala obuhvaćala je: određivanje reakcije tla u vodi i 1 M KCl-u, sadržaj humusa (%) metodom Tjurina, sadržaj ukupnog dušika (%) mikro Kjeldahlovom metodom te opskrbljenost fiziološki aktivnim hranjivima – fosforom (mg P₂O₅/100 g tla) i kalijem (mg K₂O/100 g tla) AL metodom (Tablica 2).

Table 1. Origin and designation of rhizobial isolates used in this study**Tablica 1.** Podrijetlo i oznake izolata rizobija korištenih u ovom istraživanju

Sampling site	Coordinates	Representative stains designation
Mjesto uzorkovanja	Koordinate	Oznaka reprezentativnog soja
Andrijaševci, Eastern Croatia	45° 15' 41" N	B1
Andrijaševci, Istočna Hrvatska	18° 46' 54" E	
Retkovci, Eastern Croatia	45° 13' 36" N	B2
Retkovci, Istočna Hrvatska	18° 40' 35" E	
Bobota, Eastern Croatia	45° 27' 13" N	B3
Bobota, Istočna Hrvatska	18° 51' 40" E	
Orlovača, Eastern Croatia	45° 24' 7" N	B4
Orlovača, Istočna Hrvatska	18° 56' 1" E	
Mlinski vinogadi, North Western Croatia	45° 40' 21" N	B5
Mlinski vinogadi, Sjeverozapadna Hrvatska	16° 55' 13" E	
Bočkovec, North Western Croatia	46° 4' 30" N	B6
Bočkovec, Sjeverozapadna Hrvatska	16° 29' 43" E	

Table 2. Chemical and nutrient characteristics of the soil of sampling sites**Tablica 2.** Kemijske karakteristike i sastav hranjiva tla

Bacterial strain	pH	pH	w(hummus)/%	w(P ₂ O ₅)	w(K ₂ O)	w (total nitrogen)/%
Soj bakterije	(H ₂ O)	(1M KCl)	w(humus)/%	(mg/100 g)	(mg/100 g)	w(ukupni dušik)%
B1	7.11	6.02	2.38	26.0	26.6	0.13
B2	6.41	4.80	2.33	24.92	24.0	0.14
B3	8.07	7.48	3.36	63.80	40.0	0.19
B4	7.61	7.09	2.82	15.83	26.0	0.15
B5	5.10	3.98	2.17	17.39	23.5	0.14
B6	5.81	4.41	3.13	3.69	12.2	0.20

Izolacija autohtonih sojeva rizobija

Površinski sterilizirano sjeme soje sorte AFZG Ana posijano je u tlo koje je prikupljeno sa navedenih lokacija (Tablica 1). Kad je nastupila faza pune cvatnje sakupljene su kvržice iz kojih su se potom izolirali autohtoni sojevi (Vincent, 1970).

Vegetacijski pokus

U vegetacijski pokus bilo je uključeno 6 reprezentativnih autohtonih sojeva *B. japonicum*, referentni soj *B. japonicum* (BJ344) (Zavod za mikrobiologiju, AGR), soj *P. fluorescens* (Zavod za mikrobiologiju, AGR) i nebakterizirana kontrola (B0).

Kako bi se provjerila simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva postavljen je dvofaktorijalni (8 x 2) vegetacijski pokus koristeći shemu slučajnog blok rasporeda u tri ponavljanja. Pokus je postavljen u komori rasta Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 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. Faktori pokusa uključivali su različite sojeve kvržičnih bakterija kao i PGPR bakteriju *P. fluorescens* (Tablica 3. Kao supstrat korišten je vermikulit (Agra-vermiculite, Pull Rhenen, Nizozemska) koji je prethodno steriliziran gama zračenjem (60 °C).

Table 3. Combinations in vegetation experiment

Tablica 3. Kombinacije u pokusu

Combination	Strain <i>B. japonicum</i>	Co-inotulation with <i>P. fluorescens</i>
Kombinacija	Soj <i>B.japonicum</i>	Koinokulacija s <i>P. fluorescens</i>
1	B0 (kontrola)	NO NE
2	B1	NO NE
3	B2	NO NE
4	B3	NO NE
5	B4	NO NE
6	B5	NO NE
7	B6	NO NE
8	B0	YES DA
9	B1	YES DA
10	B2	YES DA
11	B3	YES DA
12	B4	YES DA
13	B5	YES DA
14	B6	YES DA

Vegetacijski pokus postavljen je u komori rasta u kontroliranim uvjetima gdje je vlažnost zraka iznosila 70%, dok je temperatura zraka iznosila 25 °C dnevna (16 h) i 18 °C (8h) noćna. Sjeme sorte AFZG Ana površinski je sterilizirano (Vincent, 1970) i posijano u lonce sa sterilnim supstratom. Prije sjetve obavljena je inokulacija sjemena nalijevanjem tekućeg bakterijskog inokuluma direktno na sjeme čime se osiguran optimalan broj vijabilnih stanica bakterija oko sjemena, raniji početak infekcije korijena kao i ubrzanje procesa nodulacije. Za vrijeme trajanja vegetacijskog pokusa biljke su zalijevane bezdušičnom hranjivom otopinom (Macary, 1989.). Šest tjedana nakon sjetve nastupila je faza pune cvatnje u kojoj je pokus prekinut, nakon čega je izvršena procjena simbiozne učinkovitosti na temelju broja kvržica po biljci, mase suhe tvari kvržica po biljci i masi nadzemnog dijela biljke. Utjecaj *P. fluorescens* na poboljšanje rasta biljaka soje određen je mjerenjem duljine korijena. Na dobivenim podacima provedena je analiza varijance (ANOVA) slučajnog blokno rasporeda (RCBD) dvofaktorijalnog pokusa. Podaci dobiveni mjerenjem spomenutih svojstava obrađeni su korištenjem statističkog programskog paket SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc. 2013. SAS® 9.4. Cary, NC, USA).

REZULTATI I RASPRAVA

Kemijske analize pokazuju dominantnost kiselih tala. Kod tri uzoraka izmjeren je pH u KCl-u < 6.02. Jako kisela tla zastupljena su u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (B5 i B6) te jednom uzorku istočne Hrvatske (B2), dok su ostali uzorci bili blago kiseli do alkalni. U pogledu sadržaja humusa, četiri uzorka tla bila su slabo humozna, dok su uzorci B3 (istočna Hrvatska) i B6 (sjeverozapadna Hrvatska) bili dosta humozni. Kemijske analize istraživanih tala pokazale su različitu opskrbljenost fosforom. Dva uzorka (B1 i B3) karakterizirana su kao bogato i vrlo bogato opskrbljena fosforom, dok je uzorak B6 bio slabo opskrbljen. Što se tiče kalija, najviše se ističu uzorci B3 i B4 koji su bili vrlo bogato opskrbljeni kalijem, dok se najlošijim opet pokazao uzorak B6 koji je uzet s područja sjeverozapadne Hrvatske. Rezultati sadržaja ukupnog dušika pokazuju da su svi uzorci uzetih tala dobro opskrbljeni dušikom.

Najveću količinu dušika imao je uzorak tla B6 koji je uzet s područja istočne Hrvatske.

U cilju procjene utjecaja bakterizacije soje s različitim sojevima kvržičnih bakterijama i PGPR bakterije *P. fluorescens* na simbioznu učinkovitost i rast soje postavljen je vegetacijski pokus u komori rasta. Vegetacijski pokus je pokazao da svi istraživani sojevi imaju sposobnost nodulacije kao i da uspostavljaju simbiozni odnos s korištenom sortom soje. Rezultati broja kvržica po biljci prikazani su u tablici 4.

Najveći broj kvržica po biljci utvrđen je primjenom soja B4. Razlika u broju kvržica uz primjenu sojeva 344, B1, B2, B3, B5 i B6 nisu utvrđene statistički značajne razlike. Broj kvržica uz primjenu soja *P. fluorescens* u ko-inokulaciji nije pokazao statistički značajne razlike u odnosu na broj kvržica primjenom samo autohtonih sojeva rizobija. Ipak, primjenom sojeva B1, B5 i B6 u kombinaciji s *P. fluorescens* došlo je do stvaranja većeg broja kvržica, što se može pripisati pozitivnom učinku *P. fluorescens*. Rezultati provedene statističke analize pokazuju kako su u infekciji i nodulaciji najefikasniji bili sojevi B3 i B4 (tablica 4).

Najveća masa suhe tvari kvržica po biljci utvrđena je primjenom soja B4 dok je najmanja masa kvržica utvrđena primjenom referentnog soja *B. japonicum* 344. Masa suhe tvari kvržica po biljci primjenom soja B4 značajno se razlikovala u odnosu na mase suhe tvari kvržica po biljci pri primjeni ostalih sojeva. Nisu utvrđene značajne razlike između sojeva B1, B2, B3 i B6. Kada su biljke koinokulirane s *P. fluorescens*, uočen je porast mase suhe tvari kvržica u usporedbi s onim tretmanima u kojima je primijenjen samo referentni soj *B. japonicum* 344 te sojevi B5 i B6. Pozitivan utjecaj *P. fluorescens* na porast istovremenom primjenom autohtonih sojeva *B. japonicum* i *P. fluorescens* uočena je značajna razlika u duljini korijena. Pozitivan učinak *P. fluorescens* na duljinu korijena vidljiv je uz istovremenu primjenu sojeva B3, B4, B5 i B6. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti kako je istovremena primjena sojeva B3, B4, B5 i B6 s *P. fluorescens* imala najučinkovitiji utjecaj na razvitak korijena. Istovremenom primjenom referentnog soja *B. japonicum* 344 i *P. fluorescens*

pokazuje mogućnost postojanja kompeticijskog između ta dva soja jer su za neke ispitivane parametre dobivene niže vrijednosti kada su biljke koinokulirane s obje vrste. Masa suhe tvari nadzemnog dijela biljaka koinokuliranih s *Bradyrhizobium* BJ344, B1, B5 i B6 i *Pseudomonas* bila je veća od onih inokuliranih samo sa različitim sojevima rizobija. Ipak, u nekim kombinacijama (*Pseudomonas* + B2, B3 i B4) dobivena je manja masa nadzemnog dijela. Zanimljivo istraživanje proveli su Yadav i sur. (2013) o utjecaju ko-inokulacije s *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp. i *Rhizobium* sp. na rast biljaka slanutka i graha. Otkrili su da ko-inokulacija poboljšava klijanje sjemena kao i rast klijanaca slanutka i graha, zbog čega se ko-inokulacija smatra poželjnom agrotehničkom mjerom zbog svojih višestrukih pozitivnih utjecaja na biljku domaćina. Ahmad i sur. (2012) istraživali su ko-inokulaciju kvržičnim bakterijama i *Pseudomonas* sp. koja je u konačnici dovela do poboljšanja rasta i produktivnosti mungo graha (*Vigna radiata* L.). Istraživanje koje su proveli Singh i sur. (2013) pokazalo je kako zajednička primjena *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp. i različitih sojeva kvržičnih bakterija povećava biološku zaštitu slanutka od vrlo patogene gljive *Sclerotium rolfsii* koja napada korijen slanutka. Neki znanstvenici smatraju kako je bolji rast usjeva rezultat uzajamnog djelovanja PGPR i kvržičnih bakterija koje dovode povećanja rezistentnosti biljaka (DeMeyer i sur., 1998.) dok drugi smatraju kako do poboljšanja rasta dolazi zbog proizvodnje ekstracelularnih enzima kao i drugih sekundarnih metabolita od strane bakterija što u konačnici dovodi do smanjenja biotskog stresa kod biljke domaćina (Szczzech i Shoda 2004). Iz toga se može zaključiti kako primjena PGPR bakterija igra vrlo važnu ulogu u sustavima održive poljoprivrede (Sturz i Nowak, 2000; Schoebitz i sur., 2009). Zbog svega navedenog danas PGPR bakterije imaju široku primjenu su cilju povećanja biljne proizvodnje i prinosa različitih mahunarki (Burd et al., 2000). Njihovom primjenom smanjuje se potreba za unosom dušičnih gnojiva, omogućuju biljci domaćinu lakše usvajanje fosfora te također djeluje na dinamiku mikrobni procesa tla i time povećavaju njegovu plodnost (Mrkovački i sur., 2012).

Table 4. Results of statistical data processing for the number and mass of nodules, root length and dry matter mass**Tablica 4.** Rezultati statističke obrade podataka za broj i masu nodula, dužinu korijena te masu suhe tvari

Strain Soj	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>				<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>			
	N(nodule) N(kvržica)	m(nodule)/g m(kvržica)/g	m (shoot dry matter)/g m(suha tvar kvržica po biljci)/g	rooth lenght/cm duljina korijena /cm	N(nodule) N(kvržica)	m(nodule)/g m(kvržica)/g	m (shoot dry matter)/g m(suha tvar kvržica po biljci)/g	rooth lenght/cm duljina korijena /cm
B0	0.00	0.00 ^e	0.393 ^b	20.900 ^{ns}	0.00	0.00 ^e	0.507 ^b	24.200 ^{ns}
BJ ₃₄₄	17.557 ^b	0.022 ^d	0.883 ^a	26.500 ^{ns}	17.317 ^b	0.026 ^d	1.157 ^a	17.500 ^{ns}
B1	21.157 ^b	0.040 ^{bc}	1.087 ^a	26.333 ^{ns}	21.217 ^b	0.035 ^{bc}	1.110 ^a	26.167 ^{ns}
B2	20.600 ^b	0.047 ^{bc}	1.373 ^a	27.157 ^{ns}	17.083 ^b	0.033 ^{bc}	0.950 ^a	26.000 ^{ns}
B3	34.917 ^a	0.074 ^b	1.757 ^a	26.167 ^{ns}	14.057 ^{ab}	0.018 ^b	0.970 ^a	28.000 ^{ns}
B4	45.310 ^a	0.088 ^a	1.807 ^a	25.333 ^{ns}	23.510 ^a	0.035 ^a	1.220 ^a	27.500 ^{ns}
B5	17.200 ^b	0.027 ^{cd}	1.000 ^a	24.000 ^{ns}	22.917 ^b	0.034 ^{cd}	1.210 ^a	26.667 ^{ns}
B6	20.333 ^b	0.035 ^{bcd}	1.007 ^a	22.333 ^{ns}	22.667 ^b	0.036 ^{bcd}	1.063 ^a	24.333 ^{ns}

* Means with the same superscript letter do not differ significantly ($P < 0.05$ - Tukey's HSD test)

* Prosjeci sojeva označeni istim slovom značajno se ne razlikuju ($P < 0,05$ - Tukey's HSD test)

ZAKLJUČAK

Aplikacija autohtonih sojeva simbioznih fiksatora dušika u ovom istraživanju poboljšala je proces infekcije i nodulacije u odnosu na aplikaciju referentnog soja. Za sva istraživana svojstva utvrđeno je značajno djelovanje primjene različitih sojeva kvržičnih bakterija. Izuzetak je bila duljina korijena koja se nije pokazala značajnom. Primjena PGPR bakterije *P. fluorescens* nije pokazala statistički opravdane razlike niti na jedno istraživano svojstvo. Interakcijsko djelovanje između sojeva kvržičnih bakterija *B. japonicum* i *P. fluorescens* za sva istraživana svojstva nije se pokazalo značajnim u ovom istraživanju. Primjenom PGPR bakterije došlo je do smanjenja broja kvržica, mase suhe tvari kvržica te mase suhe tvari nadzemnoga dijela kod soje u nekim kombinacijama.

Dobiveni rezultati ukazuju da je najvjerojatnije došlo do kompeticijskog odnosa između sojeva *B. japonicum* i *P. fluorescens*. Dobiveni rezultati također ukazuju da bi se trebala provesti daljnja ispitivanja njihove međusobne interakcije kako bi se utvrdili ovako dobiveni rezultati.

NAPOMENA

Rezultati prezentirani u ovom radu dio su rezultata iz diplomskog rada Bernarde Lenkert koji je izrađen na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod naslovom "Ko-inokulacija sjemena soje s autohtonim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* i *Pseudomonas fluorescens*".

LITERATURA

- 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.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0380-9>
- Burd, G., Dixon, D.G., Glick, B.R. (2000) Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 6, 237 – 245.
- Chibeba, A.M., Kyei-Boahen, S., De Guimarães, M.F., Nogueira, M.A., Hungria, M. (2018) Feasibility of transference of inoculation-related technologies: a case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261, 230-240.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.037>
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., Hofte, M. (1998) Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal Plant Pathology*, 104, 279 – 286.
DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008628806616>
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V. (2015) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial and Biochemical Technology*, 7, 96-102.
- Habibi, S., Ayubi, A.G., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H., Yokoyama, T. (2017) Genetic Characterization of Soybean Rhizobia Isolated from Different Ecological Zones in North-Eastern Afghanistan. *Microbes and Environments*, 32 (1), 71-79.
- Hungria, M., Nogueira, M.A., Araujo, R.A. (2015) Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability, *American Journal of Plant Sciences*, 6, 811-817.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>
- Koziel, M., Gebala, B., Martyniuk, S. (2013). Response of Soybean to Seed Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and with mixed Inoculants of *B. japonicum* and *Azotobacter chroococcum*. *Polish Journal of Microbiology*, 62 (4), 457–460.
- Leggett, M., Diaz-Zorita, M., Koivunen, M., Bowman, R., Pesek, R., Stevenson, C., Todd Leister, T. (2017) Soybean Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina. *Agronomy Journal*, 109 (3), 1031-1038.
DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2016.04.0214>
- Macary, H.S. (1989) Cultivation of legumes in laboratory. In *Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation. Legume/Rhizobium*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Mrkovački, N., Jarak, M., Đalović I., Jocković Đ. (2012) Značaj i efekat primene PGPR na mikrobiološku aktivnost u rizosferi kukuruza. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 49 (3), 335 – 344.
- Rajnović I, Ramírez-Bahena MH, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM, Kajić S, Peix A, Velázquez E, Sikora S. (2019) Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in Croatia and definition of the symbiovar phaseoli within the species *Rhizobium pisi*. *Systematic and applied microbiology*, 42 (6), 126019.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126019>
- Redžepović, S., Čolo, J., Blažinkov, M., Poljak, M., Pecina, M., Sikora, S., Šepu, M. (2006) Effect of inoculation and growth regulator on soybean yield and photosynthetic pigment content. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71 (3), 75-80.
- Reinprecht, Y, Schram, L, Marsolais, F, Smith, TH, Hill, B., Pauls, K.P. (2020) Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation in Common Bean Production. *Frontiers in plant science*, 11, 11-72.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01172>
- Schoebitz, M., Ribaud, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L., Cura, J.A. (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41 (9), 1768–1774.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031>
- Singh, S., Singh H.B., Singh, D.K. (2013) *P. Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas* sp. mediated management of *Sclerotium rolfsii* rot in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) *Bioscan*, vol. 8, pp.801-804. 2013.
- Staden, R., Judge, D.P., Bonfield, J.K. (2003) Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: Krawetz, S.A., Womble, D.D., eds. *Introduction to Bioinformatics*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 393-410.
- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A. (2017) Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 2 (2017).
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
- Sturz, A.V., Nowak, J. (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15, 183 – 190.
- Szczeczek, M., Shoda, M. (2004) Biocontrol of Rhizoctonia Damping-off of Tomato by *Bacillus subtilis* Combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology*, 152, 549–556.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00894>
- Thuita, M., Vanlauwe, B., Mutegi, B., Masso C. (2018) Reducing spatial variability of soybean response to rhizobia inoculants in farms of variable soil fertility in Siaya County of western Kenya. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 261, 153–160.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.007>
- Venette, S., Sellnow, D., & McIntyre, K. (2010) Charting new territory: Assessing the online frontier of student ratings of instruction. *Assessment & Evaluation in Higher Education*, 35 (1), 101–115.
DOI: <https://doi.org/10.1080/02602930802618336>
- Vincent, J.M. (1970) *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook No 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Yadav, S., Anushree, D., Sarkar, A., Singh, H., Birinchi, S. (2013). Co-inoculated Biopriming with *Trichoderma*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* Improves Crop Growth in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Agriculture Environment*, 6 (2), 255-259
- Yegorenkova, I.V., Tregubova, K.V., Burygin, G.L., Matora, L.Y., Ignatov, V.V. (2016) Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. *Canadian Journal of Microbiology*, 62 (3), 279-85.
DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0647>
- Zeffa, D.M., Fantin, L.H., Koltun, A., de Oliveira, A.L.M., Nunes, M.P.B.A., Canteri, M.G., Gonçalves, L.S.A. (2020) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta - analysis of studies from 1987 to 2018. *PeerJ*, 8: e7905. DOI: <https://doi.org/10.7717/PeerJ.7905>