

## UTICAJ POJEDINAČNIH I ZDRUŽENIH INOKULANATA NA KLIJANJE I POČETNI RAST ŽUTOG ZVEZDANA

Mirjana Jarak<sup>1</sup>, Simonida Đurić<sup>1</sup>, Marija Jević<sup>1</sup>

### REZIME

*U radu je ispitivan međusobni odnos Rhizobium loti, Azotobacter chroococcum i Actinomyces sp. kao i njihov uticaj pojedinačno i u kombinacijama na klijanje i porast mlade biljke žutog zvezdana.*

*Kulture rizobiuma su umnožavane u YM podlozi po Vincentu, azotobakter u tečnoj podlozi po Fjodorovu, a aktinomicete na podlozi po Krasiljnikovu, pri čemu je konačni broj ćelija rizobiuma bio 10<sup>8</sup> u ml, azotobaktera 10<sup>6</sup> u ml i broj spora aktinomiceta 10<sup>6</sup> u ml. Njihovi međusobni odnosi određivani su metodom diskova očitavanjem zone inhibicije ili stimulacije. Za ispitivanje uticaja mikroorganizama na klijanje i porast biljke žutog zvezdana korišteno je po 0,5 ml inokuluma po semenci. Na seme kontrolnih varijanti dodata je sterilisana voda. Varijante ogleda bile su sledeće: 1.) Rhizobium loti; 2.) Azotobacter chroococcum; 3.) Actinomyces; 4.) Rhizobium loti + Azotobacter chroococcum; 5.) Rhizobium loti + Actinomyces sp.; 6.) Actinomyces sp. + Azotobacter chroococcum; 7.) Rhizobium loti + Actinomyces sp. + Azotobacter chroococcum; 8.) Kontrola. Efekat inokulacije praćen je tokom 10 dana.*

*Između rizobiuma i aktinomiceta je došlo do inhibicije a između azotobaktera i aktinomiceta u nekim kombinacijama je došlo do stimulacije a u nekim nije bilo uticaja.*

*Klijavost semena je bila 70–90% a najbolja je bila na varijanti samo sa rizobiumom kao i na varijanti gde su primenjene sve tri vrste mikroorganizama. Porast biljčice nakon deset dana na svim varijantama je bio bolji nego na kontroli. Bolji efekat su dali monovalentni inokulumi a od kombinovanih najbolji efekat dobijen je združenim inokulumom sve tri vrste mikroorganizama.*

*Ključne reči: žuti zvezdan, aktinomicete, azotobakter, rizobium*

<sup>1</sup> Dr Mirjana Jarak, red. profesor, mr Simonida Đurić, asistent, mr Marija Jević, stipendista Ministarstva, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

## UVOD

Žuti zvezdan (*Lotus corniculatus*) ima široku amplitudu prilagođavanja kako u pogledu geografskih širina i nadmorskih visina tako i u pogledu zemljišta. Uspeva na nadmorskim visinama i do 2.800 m. Dobro podnosi alkalnu reakciju, pH do 9 kao i kiselu do pH 4, dobro izdržava i delimično zaslanjena zemljišta – do 1 % škodljivih soli (Đukić, 2002). Kao i druge leguminoze, žuti zvezdan ima odlično razvijenu simbiozu sa odgovarajućim rizobiumima a rizoferno zemljište obiluje i raznovrsnim mikroorganizmima (Jarak i Čolo, 2007). Osnovni značaj mikroorganizama je obezbeđenje biljke hranivima, a mnogi proizvode materije rasta tipa giberelina i auksina. Biotičke materije koje proizvode mikroorganizmi, razlikuju se po sastavu i količini i zavise od vrste mikroorganizama, uslova spoljne sredine i prisustva hranljivih materija. Tako rizobiumi (kvržične bakterije) sintetišu tiamin, riboflavin, pantotensku kiselinu, vitamin B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i dr. (Denison and Kiers, 2004). Azotobakter i neke aktinomicete sintetišu vitamine, auksine, gibereline, biotin, pirodaksin i nikotinsku kiselinu (Berg et al., 2001; Dobbelaere et al., 2003.) Primenom ovih mikroorganizama stimuliše se klijanje i početni rast biljke (Jarak et al., 2007) ali se mora obratiti pažnja na međusobne odnose između primenjenih mikroorganizama. Da bi se izbeglo antagonističko dejstvo između mikroorganizama, u proizvodnji mikrobioloških preparata se češće koristi jedna vrsta mikroorganizama (monovalentni inokulum), mada združene kulture (polivalentni inokulum) mogu dati bolje rezultate.

Cilj ovih istraživanja je bio da se ispituju međusobni odnosi rizobiuma, aktinomiceta i azotobaktera kao i njihov uticaj (pojedinačno i u kombinacijama) na klijavost zrna i na početni rast žutog zvezdana.

## MATERIJAL I METOD RADA

Za ispitivanje međusobnih odnosa korišćene su tri vrste mikroorganizama: *Actinomyces sp.* (5,9k, R1), *Azotobacter chroococcum* (Az 1, Az 2, Az 3, Az 4) i *Rhizobium loti* (Z1 i Z 2). Kulture rizobiuma su umnožavane u YM podlozi po Vincentu, azotobakter u tečnoj podlozi po Fjodorovu, a aktinomicete na podlozi po Krasiljnikovu (Jarak i Đurić, 2004), pri čemu je konačni broj ćelija rizobiuma bio 10<sup>8</sup> u ml, azotobaktera 10<sup>6</sup> u ml i broj spora aktinomiceta 10<sup>6</sup> u ml. Njihovi međusobni odnosi određivani su metodom diskova očitavanjem zone inhibicije ili stimulacije (Jarak i Đurić, 2004).

Za ispitivanje uticaja mikroorganizama na klijanje i porast biljke žutog zvezdana odabrani su sojevi koji nisu bili antagonisti: (*Actinomyces*, soj 9k., *Rhizobium loti*, soj 2z i *Azotobacter chroococcum*, soj Az 2). Seme žutog zvezdana sorte „Bokor“, sterilisano je 0,2% rastvorom HgCl<sub>2</sub> i 70% alkoholom, te više puta isprano destilovanom vodom. Na seme je sterilnom pipetom naneto po 5 ml odgovarajućeg inokuluma. Na seme kontrolnih varijanti dodata je sterilisana voda. Varijante ogleđa bile su sledeće:

1. *Rhizobium loti* (Z2)
2. *Azotobacter chroococcum* (Az2)
3. *Actinomyces* (9K)
4. *Rhizobium loti* + *Azotobacter chroococcum*
5. *Rhizobium loti* + *Actinomyces sp.*
6. *Actinomyces sp.* + *Azotobacter chroococcum*
7. *Rhizobium loti* + *Actinomyces sp.* + *Azotobacter chroococcum*
- 8.) Kontrola

U pojedinačne Petri-kutije sa sterilisanim i nakvašenim filter papirom semenke su ostavljene na naklijavanje na sobnoj temperaturi. Klijanje i dužina klice praćena je tokom deset dana.

## REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

### Međusobni odnosi aktinomiceta, rizobiuma i azotobaktera

Mikroorganizmi u zemljištu i drugim prirodnim sredinama žive u posebnim zajednicama koje se zovu mikrobiocenoze. Kao rezultat složenih uslova koji vladaju u tim sredinama, odnosi unutar mikrobiocenoze mogu biti korisni, štetni ili neutralni (bez uticaja). Poznavanje odnosa između mikroorganizama je veoma značajno prilikom proizvodnje polivalentnih mikrobioloških đubriva kako bi se izbegle kombinacije mikroorganizama koji su međusobni antagonisti.

U ovim istraživanjima između rizobiuma i aktinomiceta je došlo do inhibicije (izuzev kombinacije 9k-Z2), a između azotobaktera i aktinomiceta u nekim kombinacijama je došlo do stimulacije a u nekim nije bilo uticaja (tab. 1).

Tabela 1. Međusobni odnosi rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta (+, stimulacija; -, inhibicija; Ø, bez uticaja)

Table 1. The relationship between rhizobia, azotobacter and actinomycetes (+, stimulation; -, inhibition; Ø, no effect)

<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Rhizobium loti</i>		<i>Azotobacter chroococcum</i>			
	Z1	Z2	Az1	Az2	Az3	Az4
5	- (4 mm)	-	Ø	+	+	+(2 mm)
9K	- (4 mm)	Ø	(- i +)	+	+	Ø
R1	- (4 mm)	-	+(2 mm)	+	+	Ø
L1	- (4 mm)	- (4 mm)	+(2 mm)	+	+	+(2 mm)

### Uticaj inokulacije na klijanje i porast biljke žutog zvezdana

Na seme mikroorganizmi dospevaju u toku proizvodnje, dorade i čuvanja, a nakon setve i iz zemljišta. Većina ovih mikroorganizama su korisni ali ima i onih koji uzrokuju biljne bolesti. Kako bi se ispitao efekat ispitivanih mikroorganizama, seme je prethodno dezinfikovano i tek onda inokulisano. Ispitivane kulture mikroorganizama, i pojedinačne i združene, nisu imale značajnijeg uticaja na klijavost (tab. 2). Klijavost se kretala od 70% do 90%, što je u domenu deklarisanе klijavosti za datu sortu. Obolela zrna su se javila u beznačajnom broju, i verovatno nisu rezultat dejstva ispitivanih mikroorganizama.

Porast biljke u toku deset dana bio je različit po varijantama ali je nakon deset dana na svim varijantama dužina bila veća nego na kontroli (tab. 2). Najbolji efekat inokulacije sa monovalentnim inokulumom dobijen je s rizobiumom i aktinomicetom a najbolji rezultat polivalentnog inokuluma dobijen je združenim kulturama sve tri vrste mikroorganizama. Povećanje dužine biljke na svim varijantama u odnosu na kontrolu bilo je statistički značajno ( $P > 0,01$ ).

Dobijeni rezultati su pokazali da se primenom odgovarajućih mikroorganizama i njihovih kombinacija može uticati na početni rast i razvoj biljaka. Stimulacija rasta žutog

zvezdana njegovim mikrosimbiontom je i očekivana, obzirom da rizobiumi svoje makrosimbionte obezbeđuju azotom ali i pospešuju njihov rast produktima svog metabolizma. Tako zahvaljujući tiaminu i riboflavinu, koje proizvode kvržične bakterije, klice inokulisanih biljaka nekoliko puta brže rastu od neinokulisanih (Jević, 2006) što je potvrđeno i u ovim istraživanjima.

Tabela 2. Uticaj pojedinačnih i združenih inokuluma na klijanje i porast biljke žutog zvezdana  
 Table 2. The effect of single and polyvalent inoculum on the emergence and growth of plant of *Lotus corniculatus*

Varijante Variants	Klijanje / emergence %	Dužina biljke / Length of plant (cm)			
		3. dan 3. day	5. dan 5. day	7. dan 7. day	9. dan 9. day
<i>Rhizobium loti</i> (Z 2)	90	7,27	11,94	38,09	47,31
<i>Azotobacter chroococcum</i> (Az 2)	76	5,57	12,34	40,89	43,37
<i>Actinomyces</i> sp. (9k)	86	3,68	10,07	38,78	46,85
<i>Rhizobium loti</i> (Z 2) + <i>Actinomyces</i> sp. (9k)	70	5,68	17,65	31,23	33,19
<i>Rhizobium loti</i> (Z 2) + <i>Azotobacter chroococcum</i> (Az 2)	80	5,15	12,55	26,98	31,02
<i>Azotobacter chroococcum</i> (Az 2) + <i>Actinomyces</i> sp. (9K)	80	6,49	14,50	33,24	34,53
<i>Rhizobium loti</i> (z2) + <i>Azotobacter chroococcum</i> (Az 3) + <i>Actinomyces</i> sp. (R1)	90	6,48	19,83	36,92	40,65
Kontrola – Control	70	3,00	9,33	23,00	29,00
LSD 1%		0,362	0,473	4,276	0,714
LSD 5%		0,261	0,341	3,081	0,514

Primena polivalentnog inokuluma koji sadrži mikroorganizme mutualiste, a koji uz to proizvode i biološki aktivne materije, može dati još bolje rezultate. Tako inokulacijom pasulja združenim kulturama rizobiuma i azotobaktera dobija se veći sadržaj azota u zrnu a poboljšava se vrednost i drugih parametara prinosa (Jarak i sar., 2005). Inokulacijom graška združenim kulturama rizobiuma, aktinomiceta i azotobaktera ubrzan je porast biljke (Jarak i sar., 2006). Isto tako združene kulture ovih mikroorganizama u kombinaciji s kalcifikacijom pozitivno utiču na prinos crvene deteline i lucerke (Jarak i Đurić, 2006). Svi ovi mikroorganizmi se u većem ili manjem broju nalaze u zemljištu i nakon setve dospevaju na seme i koren biljke. Međutim, inokulacijom semena selekcionisanim mikroorganizmima, u biljnoj proizvodnji pa tako i u proizvodnji žutog zvezdana sigurno se postižu bolji rezultati.

#### ZAKLJUČAK

- Između rizobiuma i aktinomiceta je došlo do inhibicije (izuzev kombinacije 9k-Z2)
- Između azotobaktera i aktinomiceta u nekim kombinacijama je došlo do stimulacije a u nekim nije bilo uticaja

- Kljavost se kretala od 70 do 90%, a obolela zrna su se javila u beznačajnom broju
- Porast biljke u toku deset dana bio je različit po varijantama ali je nakon deset dana na svim varijantama dužina bila veća nego na kontroli. Najbolji efekat inokulacije sa monovalentnim inokulumom dobijen je s rizobiumom i aktinomicetom, a najbolji rezultat polivalentnog inokuluma dobijen je združenim kulturama sve tri vrste mikroorganizama.

## LITERATURA

1. Berg, G., Marten, P., Minkewity, A., Brukner, S. (2001): Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. *Zeitschrift für Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz*, 108, 1–10.
2. Denison R.F., Kiers E.T. (2004): Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic. *Microbes and infections*, 6, 1235/1239.
3. Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon, Y. (2003): Plant growth promoting effect of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant science*, 22, 107–149.
4. Đukić, D., Moissuc, A., Janjić, V., Kišgeci, J. (2002): Biljke za proizvodnju stočne hrane. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad., 169–178.
5. Jarak, M., Đurić S. (2004): Praktikum iz mikrobiologije, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
6. Jarak Mirjana., Zdravković M., Đurić Simonida, Damjanović M. (2005): Response of beans to inoculation and fertilizers. 8<sup>th</sup> International symposium on interdisciplinary regional research (Hungary – Romania – Serbia and Montenegro), Proceedings, Section 2 – Ecology and Environmental Protection, EEP22 (CD), Szeged, Hungaria, 19–21.april.
7. Jarak Mirjana, Jević Marija, Đurić Simonida (2006): Primena združene inokulacije u proizvodnji graška. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu*. God. 30, No 1, 53–60.
8. Jarak Mirjana, Đurić Simonida (2006): Growth promoting of alfalfa and red clover by rhizobia, azotobacter and actinomycetes. 7th European Nitrogen Fixation Conference, 22–26.juli, Aarhus, Danska, Abstract book, p.116.
9. Jarak Mirjana, Čolo J. (2007). *Mikrobiologija zemljišta*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1–209.
10. Jarak Mirjana, Đurić Simonida, Dragan Đ (2007): Uticaj inokulacije na klijanje i početni rast i razvoj lucerke i crvene deteline. *Zbornik radova naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, Vol 44, No 1, 415–421.
11. Jević Marija (2006): Efekat primene rizobia i aktinomiceta u proizvodnji graška. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

**THE EFFECT OF SINGLE AND COMBINED INOCULATION  
ON THE EMERGENCE AND EARLY GROWTH  
OF BIRDSFOOT TREFOIL (*Lotus corniculatus*)**

by

*Mirjana Jarak, Simonida Đurić, Marija Jević*

**ABSTRACT**

The research consisted of investigating the effect of rhizobia, azotobacter and actinomycetes, both individually and combined, on the emergence and growth of the plants of *Lotus corniculatus*, as well as on the interaction between microorganisms. Rhizobia were grown in YM medium according to Vincent, azotobacter in broth medium according to Fjodorov, and actinomycetes in a medium according to Krasiljnikov. The number of cells of rhizobia was  $10^8$ /ml, azotobacter  $10^6$ /ml and the number of spores of actinomycetes was  $10^6$ /ml. Their relationship was determined by the method of discs, by measuring the zone of inhibition or stimulation. The effect of inoculation on the emergence and growth of the plants was determined during the first 10 days. The seed of *Lotus corniculatus* was inoculated with 5 ml of inoculum. Sterilized water was added into the seed of the control plant. The variants were the following: 1.) *Rhizobium loti*; 2.) *Azotobacter chroococcum*; 3.) *Actinomyces*; 4.) *Rhizobium loti* + *Azotobacter chroococcum*; 5.) *Rhizobium loti* + *Actinomyces sp.*; 6.) *Actinomyces sp.* + *Azotobacter chroococcum*; 7.) *Rhizobium loti* + *Actinomyces sp.* + *Azotobacter chroococcum*; 8.) Inhibition occurred between rhizobia and actinomycetes.

Between actinomycetes and azotobacter, in some cases stimulation occurred and in some cases there was no effect. The emergence of seed was 70-90 % and the best result was achieved in the variant with rhizobia as well as in the variant with the combination of all three species of microorganisms. Considering the growth of the plants, the best result was also achieved when rhizobia was applied and when the combination of all three species of microorganisms was applied.

*Key words:* actinomycetes, rhizobia, azotobacter, *Lotus corniculatus*

Primljeno: 11.06.2007.

Prihvaćeno: 01.07.2007.