

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina Demšar

**VPLIV RIZOSFERNIH BAKTERIJ NA RAST SADIK PARADIŽNIKA
(*Solanum lycopersicum* L.)**

MAGISTRSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF RHIZOBACTERIA ON GROWTH OF TOMATO
PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.)**

M.SC. THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek Podiplomskega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, Kmetijskem inštitutu Slovenije in na Plant Protection Service, Wageningen.

Senat Biotehniške fakultete je dne 14. 12. 2009 za mentorico magistrskega dela imenoval prof. dr. Majo Ravnika in za somentorico prof. dr. Majo Rupnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: prof. dr. Maja RUPNIK
Zavod za zdravstveno varstvo Maribor
Medicinska fakulteta Maribor, Univerza v Mariboru
Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov

Član: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 15. 5. 2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tina Demšar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 581.5:582.926.2:561.23(043.2)=163.6
KG paradižnik/ rizobakterije/ PGPR
AV DEMŠAR, Tina, univ. dipl. biol
SA RAVNIKAR, Maja (mentorica)/RUPNIK, Maja (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij biotehnologije
LI 2014
IN VPLIV RIZOSFERNIH BAKTERIJ NA RAST SADIK PARADIŽNIKA
(*Solanum lycopersicum* L.)
TD Magistrsko delo
OP XII, 93 str., 16 pregl., 19 sl., 7 pril., 76vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Rizobakterije (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) se uporabljajo za pospeševanje rasti rastlin in za biokontrolo pred različnimi rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi tako v kmetijstvu kot gozdarstvu. Paradižnik je ekonomsko pomembna rastlina v Sloveniji, gojimo ga v rastlinjakih in tunelih, kar je prednost pri morebitni aplikaciji bakterijskih izolatov za pospešeno rast rastlin in zaščito pred rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi. V rastlinskih poskusih smo preverili pozitiven učinek izoliranih bakterij iz rizosfere paradižnika na rast rastlin paradižnika in sposobnosti inhibicije treh patogenih bakterij *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Xanthomonas vesicatoria in vitro*. Pri nekaterih bakterijskih izolatih iz rodu *Pseudomonas* smo opazili tako pozitiven učinek na rast sadik paradižnika kot tudi sposobnost inhibicije na nekatere testirane patogene rastlinske bakterije, zato bi bili ti bakterijski izolati uporabni za nadaljne raziskave inhibicije pred rastlinskimi patogenimi bakterijami *in vivo* in kasneje za ugotavljanje pozitivnega učinka na rast rastlin paradižnika v poljskih poskusih. Izolirane bakterije smo identificirali z analizo profila maščobnih kislin, z metodo BIOLOG in sekvenciranjem 16S rRNA ter rezultate primerjali z drugimi identifikacijskimi metodami (rast na gojišču, biokemijskimi testi,...). Ugotovili smo, da nobena izmed preizkušenih metod sama zase ne omogoča zanesljive identifikacije izolatov iz rodu *Pseudomonas*, temveč je za zanesljivejšo določitev potrebno uporabiti več metod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDK 581.5:582.926.2:561.23(043.2)=163.6
CX tomato/ rhizobacteria/ PGPR
AU DEMŠAR, Tina
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/RUPNIK, Maja (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study in Biotechnology
PY 2014
TI EFFECT OF RHIZOBACTERIA ON GROWTH OF TOMATO PLANTS
(*Solanum lycopersicum* L.)
DT M.Sc. Thesis
NO XII, 93 p., 16 tab., 19 fig., 7 ann., 76ref.
IJ sl
JI sl/en
AI Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are used for biocontrol against various plant pathogens and to promote plant growth in both agriculture and forestry. Tomatoes are economically important plants in Slovenia, cultivation in the greenhouse and plastic tunnels is an advantage in potential application of bacterial isolates to improve plant growth and protect against plant pathogens. The positive effect on the growth of tomato plants of several bacterial isolates from the rhizosphere of tomato was examined and their ability to inhibit three pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria in vitro* was tested. In some bacterial isolates of the genus *Pseudomonas*, we noticed a positive effect on the growth of tomato plants as well as their ability to inhibit some plant pathogenic bacteria tested, so these bacterial isolates are useful for the further research of inhibition against plant pathogenic bacteria *in vivo* and subsequently to identify a positive effect on the growth of tomato plants in field trials. Isolated bacteria were identified by fatty acid profile analysis, BIOLOG and sequencing of 16S rRNA and the results were compared with other identification methods (growth on different medium, biochemical tests,...). We found out that none of the tested methods does not allow reliable identification of bacterial isolates from the genus *Pseudomonas*. For reliable identification more than one method should be used.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RIZOSFERA	3
2.2 BAKTERIJE, KI POSPEŠUJEJO RAST RASTLIN (PGPR)	4
2.3 MEHANIZMI POSPEŠEVANJA RASTI	6
2.3.1 Neposredno delovanje	6
2.3.2 Posredno delovanje	10
2.4 KOLONIZACIJA KORENIN S PGPR	13
2.5 BOLEZNI PARADIŽNIKA	14
2.6 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ	15
2.6.1 Analiza metabolnega profila s sistemom BIOLOG	17
2.6.2 Analiza profila maščobnih kislin	17
2.6.3 16S rRNA sekvenciranje	18
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI	19
3.2 INHIBICIJA PATOGENIH MIKROORGANIZMOV IN VITRO	23
3.3 RASTLINSKI POSKUSI, UGOTAVLJANJE POZITIVNEGA UČINKA NA RAST RASTLIN	24
3.3.1 Primerjava PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov – Poskus A	25
3.3.2 Ugotavljanje PGPR učinka v pogojih z in brez hranil - Poskus B	27
3.3.3 Presejalni test za PGPR učinek - Poskus C	27

3.4	IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV	28
3.4.1	Profil maščobnih kislin	28
3.4.1.1	Priprava bakterijskih izolatov	28
3.4.1.2	Saponifikacija	29
3.4.1.3	Metilacija	30
3.4.1.4	Ekstrakcija	30
3.4.1.5	Spiranje ekstrakta	30
3.4.1.6	Analiza na plinskem kromatografu	31
3.4.2	Analiza metabolnega profila s sistemom BIOLOG	31
3.4.3	Sekvenciranje 16S rRNA	33
3.4.3.1	Pomnoževanje gena za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	33
3.4.3.2	Agarozna gelska elektroforeza	34
3.4.3.3	Izolacija specifičnih produktov PCR in ugotavljanje nukleotidnega zaporedja DNA	35
3.4.3.4	Primerjava nukleotidnih zaporedij	35
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	35
4	REZULTATI	36
4.1	INHIBICIJA PATOGENIH MIKROORGANIZMOV IN VITRO	36
4.2	RASTLINSKI POSKUSI, UGOTAVLJANJE POZITIVNEGA UČINKA NA RAST RASTLIN	38
4.2.1	Primerjava PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov - Poskus A	38
4.2.2	Ugotavljanje PGPR učinka v pogojih z in brez hranil - Poskus B	43
4.2.3	Presejalni test za PGPR učinek - Poskus C	48
4.2.3.1	Podposkus C.1	48
4.2.3.2	Podposkus C.2	53
4.2.3.3	Podposkus C.3	57
4.3	IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV	64
4.3.1	Profil maščobnih kislin	64
4.3.2	Analiza metabolnega profila, BIOLOG	67
4.3.3	Sekvenciranje 16S rRNA	69

4.3.4	Primerjava vseh identifikacijskih metod	71
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	74
5.1	RAZPRAVA	74
5.1.1	Inhibicija patogenih mikroorganizmov in vitro	74
5.1.2	Rastlinski poskusi, ugotavljanje pozitivnega učinka na rast rastlin	77
5.1.3	Identifikacija bakterijskih izolatov	80
5.2	SKLEPI	84
6	POVZETEK (SUMMARY)	85
6.1	POVZETEK	85
6.2	SUMMARY	86
7	VIRI	87

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Komercialno dostopne PGPR (Podile in Kishore, 2006).....	6
Pregl. 2: Podatki o izbranih bakterijskih izolatih izoliranih iz rizoplana paradižnika (Kubik, 2002) za preizkus inhibicije patogenih mikroorganizmov <i>in vitro</i> in za presejalni test za PGPR učinek.....	19
Pregl. 3: Podatki o uporabljenih referenčnih bakterijskih sevih.....	22
Pregl. 4: Podatki o preizkušenih bakterijskih izolatih in številu tretiranih rastlin v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov - poskus A	26
Pregl. 5: Analizirani bakterijski izolati pri testu profila maščobnih kislin.....	28
Pregl. 6: Podatki o analiziranih izolatih bakterij z analizo metabolnega profila, BIOLOG in za sekvenciranje 16S rRNA.....	32
Pregl. 7: Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR (Bianciotto in sod., 1996)	33
Pregl. 8: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR (Bianciotto in sod., 1996)	33
Pregl. 9: <i>In vitro</i> inhibicija bakterijskih izolatov iz rizoplana paradižnika na izbrane patogene bakterije.....	36
Pregl. 10: Podatki o skupnih svežih in suhih masah rastlin v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov – Poskus A	39
Pregl. 11: učinek na rast rastlin glede na svežo in suho maso korenin in zg. delov rastlin v presejalnem testu za PGPR učinek - poskus C skupaj z identifikacijo bakterijskih izolatov	62
Pregl. 12: Rezultati analize profila maščobnih kislin analiziranih bakterijskih izolatov (identifikacija, podobnostni indeksi) po različnih bazah in končna identifikacija v laboratoriju PPS, Wageningen na podlagi profila maščobnih kislin in nekaterih biokemijskih testih.....	64
Pregl. 13: Rezultati analize metabolnega profila BIOLOG po 24 urah.....	67
Pregl. 14: Rezultati analiz pridobljeni s sekvenciranjem 16S rRNA	70
Pregl. 15: Primerjava rezultatov vseh identifikacijskih metod.....	71
Pregl. 16: skupna tabela vseh testiranih bakterijskih izolatov z rezultati PGPR učinka na rast rastlin - poskus C, inhibicije patogenih bakterij <i>in vitro</i> in identifikacije	73

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Inhibicija patogene bakterije <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> na KB gojišč: vidne cone inhibicije rasti patogene bakterije, ki so jo povzročili trije različni bakterijski izolati	38
Sl. 2: Povprečje skupne sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 5 različnimi bakterijskimi izolati v hranilni raztopini v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov - poskus A	40
Sl. 3: Povprečje skupne suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 5 različnimi bakterijskimi izolati v hranilni raztopini v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov – poskus A	42
Sl. 4: Rastline v poskusu ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil - poskus B po 5 tednih gojenja. Od leve proti desni: 1. NIB Z143 v hranilni raztopini, 2. NIB Z143 v vodi, 3. negativna kontrola-voda, 4. negativna kontrola-hranilna raztopina ..	44
Sl. 5: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini in v vodi v poskusu ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil – poskus B	45
Sl. 6: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini in v vodi v poskusu ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil – poskus B	46
Sl. 7: Predstavniki rastlin vsake skupine tretiranih rastlin poskusa ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil – poskus B. Od leve proti desni: 1. NIB Z143 v hranilni raztopini, 2. NIB Z143 v vodi, 3. negativna kontrola-voda, 4. negativna kontrola-hranilna raztopina.....	47
Sl. 8: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1	49
Sl. 9: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1	50

Sl. 10: tretirane rastline v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1: levo tretirane z vodo, desno tretirane z izolatom NIB Z141	51
Sl. 11: predstavnice rastlin presejalnega testa za PGPR učinek - podposkus C.1: levo rastlina tretirana z vodo, desno tretirana s bakterijskim izolatom NIB Z141	51
Sl. 12: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2	53
Sl. 13: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2	54
Sl. 14: tretirane rastline v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2: levo tretirane z izolatom NIB Z148, desno tretirane z vodo	55
Sl. 15: predstavnice rastlin presejalnega testa za PGPR učinek - podposkus C.2: levo rastlina tretirana z vodo, desno tretirana s bakterijskim izolatom NIB Z148.....	55
Sl. 16: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3	58
Sl. 17: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3	59
Sl. 18: tretirane rastline v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3: levo tretirane z izolatom NIB Z153, desno tretirane z vodo	60
Sl. 19: predstavnice rastlin presejalnega testa za PGPR učinek - podposkus C.3: levo rastlina tretirana z vodo, desno tretirana s bakterijskim izolatom NIB Z153.....	60

KAZALO PRILOG

- Priloga A Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini v poskusu B
- Priloga B Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v sterilni vodi v poskusu B
- Priloga C Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih s hranilno raztopino v poskusu B
- Priloga D Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih s sterilno vodo v poskusu B
- Priloga E Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v podposkusu C.1
- Priloga F Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v podposkusu C.2
- Priloga G Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v podposkusu C.3

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACC	1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminaza
AHL	<i>N-acyl</i> homoserin lakton
BF	Biotehniška fakulteta
bp	bazni par
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
CMC	karboksimetil celuloza
DAPG	2,4-diacetil-floroglusinol
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat (deoxyribonucleotide triphosphate)
DRB	rizobakterije, ki zavirajo rast rastlin (deleterious rhizobacteria)
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina (ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISA	encimski imunoserološki test (enzyme linked immunosorbent assay)
EU	Evropska skupnost (European Union)
F	smiselni začetni oligonukleotid (forward primer)
FAP	analiza profila maščobnih kislin
IAA	indol-3-ocetna kislina
ISR	inducirana sistemska odpornost (Induced Systemic Resistance)
JA	jasmonska kislina
Kb	kilobaza
LPS	lipopolisaharid
M	enota za molarnost (mol/l)
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
NCBI	Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (National Centre for Biotechnology Information)
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
O-antigen	O-polisaharid, polimer glikana znotraj lipopolisaharida
PBS	fosfatni pufer z NaCl (phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PGPR	rizobakterije, ki pospešujejo rast rastlin (plant growth promoting rhizobacteria)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov (potential of hydrogen)
PPS	Plant Protection Service, Wageningen
R	protismiselni končni oligonukleotid (reverse primer)
SA	salicilna kislina
SSB	phosphate solubilizing bacteria
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomska RNA (ribosomal RNA)

1 UVOD

Bakterije, ki pospešujejo rast rastlin (angl. *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR)) so vse tiste rizobakterije, ki izpolnjujejo vsaj dva od treh kriterijev: kompetitivno kolonizirajo korenine rastlin, stimulirajo rast rastlin in inhibirajo patogene mikroorganizme. V terminu »biognojilo« zdužujemo vse PGPR, ki pospešujejo rast rastlin. Mehanizem delovanja v tem primeru je fiksacija dušika, dostopnost raztopljenega fosfata, produkcija rastlinskih hormonov in prisotnost hlapnih pospeševalcev rasti. Pri drugi skupini PGPR, ki jo označujemo pod terminom »biopesticid«, pa je v ospredju njihova vloga antagonist patogenih mikroorganizmov. Inhibicija patogenih mikroorganizmov je posledica tekmovanja za dostopnost hranil, preprečitve kolonizacije korenin, produkcije sekundarnih metabolitov, produkcije sideroforov, litičnih encimov in indukcija inducirane sistemske rezistence.

Rizobakterije so v uporabi za pospeševanje rasti rastlin in za biokontrolo pred različnimi patogenimi mikroorganizmi tako v kmetijstvu kot gozdarstvu. Študije so večinoma opravljene v treh korakih: izolacija bakterijskih sevov iz rizosfere, selekcija sevov na uporabne značilnosti in aplikacija izbranih sevov v poljskih poskusih. Zadnji korak je najtežji, ker morajo rizobakterije uspešno kolonizirati rizosfero, da so učinkovite. Rizobakterije lahko dodamo direktno na semena ali v substrat. Kolonizacijo korenin lahko povečamo z večanjem doze rizobakterij, z uporabo mešanic različnih sevov ali z gensko modifikacijo sevov. Uporaba rizobakterij je ustrezna alternativa ali dopolnitev uporabi pesticidov in umetnih gnojil, zato pričakujemo v prihodnosti povečano uporabo rizobakterij za pospeševanje rasti rastlin in pri biokontroli. Številne študije rizobakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika so osredotočene na fluorescentne pseudomonade in na njihov vpliv na rast rastlin paradižnika in inhibicijo patogenih bakterij. Rizosferne mikrobne populacije so zelo dobro proučene za številne kmetijske rastline (pšenica, koruza, krompir). Za študijo smo izbrali paradižnik kot modelno rastlino, ker je malo znanega o prevladujočih bakterijskih vrstah v njegovi rizosferi. Paradižnik je ekonomsko pomembna rastlina v Sloveniji, gojimo jo v rastlinjakih ali tunelih, kar je prednost pri morebitni aplikaciji bakterijskih izolatov za pospešeno rast rastlin in zaščito pred rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi.

1.1 CILJI

Med predhodno izoliranimi in identificiranimi bakterijskimi izolati iz rizosfere paradižnika bomo poskušali izbrati sev, ki bo imel pozitiven učinek na rast sadik paradižnika in ki bo imel sposobnost inhibicije rasti patogenih rastlinski bakterij. Tak bakterijski izolat bi lahko bistveno prispeval k zmanjšanju uporabe kemičnih pripravkov in umetnih gnojil pri gojenju paradižnika.

Preverili bomo različne metode za identifikacijo bakterijskih izolatov in izbrali kombinacijo tistih, ki so potrebni za zanesljivo identifikacijo.

1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo, da bo med bakterijskimi izolati prisoten takšen izolat, ki bo imel pozitiven učinek na rast sadik paradižnika in ki bo imel sposobnost inhibicije rasti patogenih rastlinskih bakterij.

Za identifikacijo bakterijskih izolatov bomo uporabili različne laboratorijske metode. Predvidevamo, da bomo s pomočjo primerjave rezultatov ugotovili katera metoda ali kombinacija metod je najboljša za identifikacijo preučevanih bakterij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RIZOSFERA

Leta 1904 je nemški agronom in rastlinski fiziolog Lorenz Hiltner prvi skoval izraz "rizosfera" za opis rastlin korenin. Beseda izvira delno iz grške besede "rhiza", kar pomeni korenina. Hiltner je rizosfero opisal kot območje okoli korenine rastlin, ki je naseljen z edinstveno populacijo mikroorganizmov, ki je odvisna od kemikalij, ki se sproščajo iz korenin (Hartmann in sod, 2008). Danes definicijo rizosfere razumemo kot okolico korenine, na katero neposredno ali posredno, preko delovanja mikroorganizmov, vpliva korenina. Rizosfero sestavljajo tri območja. Endorizosfera vključuje dele skorje in endoderm. Rizoplan je sredinsko območje in vključuje koreninsko povrhnjico in sluz. Ektorizosfera pa se razteza od rizoplana navzven (Baudoin in sod., 2002).

Rizosfera je zapleteno, dinamično in heterogeno mikrookolje, ki je ključno za mineralno prehrano in zdravje rastline, biološko raznolikost mikrobne rizosferne združbe ter kroženje elementov (Weller in Thomashow, 1994). Obrobne celice koreninske čepice z eksocitozo navzven izločajo sluz, ki vsebuje polisaharide, organske kisline, vitamine in amino kisline. Te snovi predstavljajo odlično okolje za rast mikroorganizmov, ki z medsebojnim delovanjem spreminjajo biološke, biokemijske in fizikalne lastnosti rizosfernih tal (Bais, 2006).

Mikroorganizmi v rizosferi so lahko prosto živeči, parazitski ali saprofitski in sicer bakterije, glive, virusi, členonožci, amebe in bičkarji (Weller in Thomashow, 1994). Njihova diverziteteta se dinamično spreminja tako v strukturi združb kot v pojavljanju vrst. Pomembna skupina teh mikrobnih združb, ki pozitivno vpliva na rast rastlin, je bila prvič definirana leta 1978 (Kloepper in Schroth, 1978) in imenovana kot bakterije, ki pospešujejo rast rastlin (plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)). Rast rastlin, pospešena s PGPR, se kaže v povečani biomasi, močnem povečanju koreninskega sistema, boljšem kaljenju semen in pojavu sadik, krepkem izgledu rastlin in povečanem pridelku pri različnih rastlinskih vrstah.

2.2 BAKTERIJE, KI POSPEŠUJEJO RAST RASTLIN (PGPR)

Pozitivni učinek PGPR na rast rastlin je posledica proizvodnje rastnih hormonov, inhibicije rastlinskih patogenih mikroorganizmov, raztapljanja mnogih hranil in inducirane odpornosti rastlin. PGPR se v nekaterih državah že uporabljajo za biokontrolo ali kot biognojila v gozdarstvu in kmetijstvu. Komercialno se rizobakterije uporabljajo za biološko kontrolo že od leta 1985, na Kitajskem pa že več kot 20 let na 20 milijonih hektarov površin. (Walters in Daniell, 2007).

Med PGPR spadajo bakterije iz rodov *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* in *Serratia*. Njihova diverziteteta v rizosferi variira glede na vrsto rastline, vrsto tal in dostopnost hranil. Največ študij je bilo narejenih na rodovih *Pseudomonas* in *Bacillus*, ki sta najbolj razširjena. Pomembna skupina PGPR je tudi rod *Azospirillum*. Med PGPR uvrščamo tudi seve *Rhizobium*, ki kolonizirajo korenine nestročnic iz družin trav (*Gramineae*) in križnic (*Brassicaceae*), ki pospešujejo rast rastlin z drugimi mehanizmi kot je biološka fiksacija dušika (Podile in Kishore, 2006). V današnjem času pa nam vpogled na diverziteteto bakterij v rizosferi prinaša metagenomika (študije celotnega genoma ekosistema), ki vključuje tudi organizme, ki jih ne moremo gojiti v laboratoriju (Leveau, 2007).

PGPR so vse tiste rizobakterije, ki izpolnjujejo vsaj dva od treh kriterijev: kompetitivno kolonizirajo korenine rastlin, stimulirajo rast rastlin in inhibirajo patogene mikroorganizme. V terminu »biognojilo« zdužujemo vse PGPR, ki pospešujejo rast rastlin. Mehanizem delovanja v tem primeru je fiksacija dušika, dostopnost raztopljenega fosfata, produkcija rastlinskih hormonov (avksini, citokinini) in prisotnost hlapnih pospeševalcev rasti (etilen, 2,3-butanediol). Pri drugi skupini PGPR, ki jo označujemo pod terminom »biopesticid«, pa je v ospredju njihova vloga antagonist patogenih mikroorganizmov (bakterij in gliv) (Haas s sod., 2005).

Inhibicija patogenih mikroorganizmov je posledica tekmovanja za dostopna hranila, preprečitve kolonizacije, produkcije sekundarnih metabolitov (antibiotikov, cianidov), produkcija sideroforjev, litičnih encimov in indukcija inducirane sistemske rezistence (Van Wees in sod., 1999). Rizobakterije so v uporabi za pospeševanje rasti rastlin in za biokontrolo pred različnimi patogenimi mikroorganizmi tako v kmetijstvu kot gozdarstvu (Duponnois in Garbaye, 1991). Uporabljajo se tudi za varstvo žit pred boleznimi (Kremer in Kennedy, 1996) in za bioremediacijo strupenih snovi (Zhuang in sod., 2007). Študije so opravljene v treh korakih: izolacija bakterijskih sevov iz rizosfere, selekcija sevov na uporabne značilnosti in aplikacija izbranih sevov v poljskih poskusih. Zadnji korak je najtežji, ker moramo rizobakterije uspešno kolonizirati, da so učinkovite (Kumari in Srivastava, 1999).

Rizobakterije lahko dodamo direktno na semena ali v tla. Kolonizacijo korenin lahko povečamo z večanjem doze rizobakterij, z uporabo mešanic sevov ali z gensko modifikacijo sevov. Kljub vsem problemom, pričakujemo povečano rabo rizobakterij, ker so ustrezna alternativa pesticidom in umetnim gnojilom. Številne študije rizobakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika so osredotočene na fluorescentne pseudomonade in na njihov vpliv na rast rastlin paradižnika (Kumar in Dube, 1991). Nekaj je tudi študij v povezavi z inhibicijo patogenih bakterij (JianHua in sod., 2004, Nishiyama in sod., 1999). V teh dveh študijah so ugotovili tako prisotnost inhibicije PGPR sevov na bakterijo *Ralstonia solanacearum* kot tudi pozitiven vpliv na rast rastlin.

V EU so trenutno dovoljeni naslednji sevi za biokontrolo: *Ampelomyces quisqualis*, *Coniothyrium minitans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Gliocladium catenulatum*, *Bacillus subtilis*, *Paecilomyces lilacinus*, *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, *Beauveria bassiana*, *Cydia pomonella Granulovirus*, *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Phlebiopsis gigantea*, *Pythium oligandrum*, *Streptomyces*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma harzianum rifai*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma gamsii*, *Verticillium albo-atrum* (Aneks I EEC direktiva 91/414). Med njimi so tudi PGPR bakterije. V ZDA,

Avstraliji in na Novi Zelandiji je uporaba mikrobioloških produktov za kontrolo rastlinskih boleznih veliko bolj razširjena.

V zadnjih 30 letih je bilo narejenih veliko študij za identifikacijo PGPR pri različnih rastlinah in kmetijskih površinah (Kloepper in sod., 1991, Vessey, 2003, Zahir in sod., 2004 in Ping in Boland, 2004). Na podlagi teh študij so PGPR dobili svoje mesto kot agronomsko koristne bakterije in so nekatere tudi komercialno dostopne (glej Preglednica 1).

Preglednica 1: Komercialno dostopne PGPR (Podile in Kishore, 2006)

Table 2: Commercially available PGPR (Podile and Kishore, 2006)

Trgovsko ime	PGPR sev	Uporaba
Bioboost	<i>Delftia acidovorans</i>	Tretiranje semen ogrščice
Bioplin	<i>Azotobacter</i> spp.	Zalivanje tal pri sončnicah in paradižnikih
Bioyield	<i>Bacillus</i> spp.	Tretiranje semen paradižnika, tobaka, kumar in paprike
Compete	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> in <i>Streptomyces</i> spp.	Zalivanje travnih ruš v nasadih in rastlinjakih
Kodiak	<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Tretiranje semen sadja in zelenjave

2.3 MEHANIZMI POSPEŠEVANJA RASTI

Glede na mehanizem delovanja ločimo PGPR, ki pospešujejo rast rastlin z neposrednim ali posrednim delovanjem.

2.3.1 Neposredno delovanje

PGPR vplivajo na pospeševanje rasti rastlin s produkcijo rastlinskih hormonov, s povečanjem oskrbe rastlin s hranili preko povišanja dostopnosti topnega fosforja in železa (s produkcijo kompleksa železo-siderofor).

a.) Sinteza rastlinskih hormonov

Rastlinski hormoni, ki jih proizvajajo PGPR povečujejo število in dolžino koreninskih laskov. Tako povečana površina koreninskega sistema izboljša dotok vode in mineralov iz širšega območja rastline (Volkmar in Bremer, 1998).

Tretiranje rastlin z rizobakterijami, ki proizvajajo rastlinske hormone, pospešuje rast rastlin (Vessey, 2003). Indol-3-ocetna kislina (IAA) je rastlinski hormon iz skupine avksinov, ki pospešuje rast rastlin. Vpliv koreninskih eksudatov na produkcijo IAA z rizobakterijo *Pseudomonas fluorescens* je preučeval Beniziri s sodelavci (1998). Prisotnost IAA so zasledili v kulturah seva *Pseudomonas fluorescens* M.3.1., ki je rasel na koreninskih eksudatih koruze. Torej je možno, da koreninski eksudati sproščeni v rizosfero stimulirajo sposobnost seva, da proizvaja IAA v bližini korenine, ker v prisotnosti in odsotnosti seva M.3.1. v hranilni raztopini brez koreninskih eksudatov niso zasledili IAA. Asghar s sod. (2004) poroča o pozitivni povezavi med produkcijo avksinov s strani PGPR in povečanjem razvejanosti rastlin in vsebnosti olja pri rastlinah *Brassica napus*, ki so bile tretirane s PGPR.

Vessey (2003) navaja, da rizobakterije, ki proizvajajo IAA pospešujejo rast rastlin in sicer: *Aeromonas veronii* in *Enterobacter cloacae* pri rižu, *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes piechaudii* in *Comamonas acidovorans* pri solati, *Azospirillum brasilense* pri pšenici, *Bradyrhizobium* sp. in *Rhizobium leguminosarum* pri radiču in *Enterobacter* sp. pri sladkornem trsu.

Nasprotno o izgubi sposobnosti rasti korenin poroča Xie s sod. (1996), ko so poskušali ugotoviti povezavo med produkcijo IAA v PGPR bakteriji in učinkom pospeševanja rasti. Ugotovili so, da so rastline strniščne repe (*Brassica campestris*) izgubile sposobnost indukcije rasti korenin, če so bile tretirane z mutanto seva *Pseudomonas putida*, s štirikrat višjo produkcijo IAA. Pri rastlinah, ki so bile tretirane z mutanto ali z divjim sevom pa je rast rastlin, produkcija sideroforjev in 1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminaze (ACC) ostala nespremenjena.

Poleg avksinov pa PGPR proizvajajo tudi citokinine, ki pospešujejo rast rastlin. Vessey (2003) navaja naslednje PGPR, ki proizvajajo citoknine: *Paenibacillus polymyxa* pri pšenici, *Pseudomonas fluorescens* pri soji, *Rhizobium leguminosarum* pri solati.

Iz rizosfere jelše *Alnus glutinosa* so izolirali PGPR *Bacillus pumilus* in *Bacillus licheniformis*, ki proizvajata visoko količino fiziološko aktivnih giberelinov, ki nakazujejo na vlogo pri pospešeni rasti rastlin (Gutierrez-Manero s sod., 2001). Gil-Jae J., 2009 pa prvič navaja sev *Burkholderia* sp. izoliran iz kumar in zlatih krizantem *Chrysanthemum coronarium*, ki proizvaja fiziološko aktiven giberelin. Aminociklo-propan 1-karboksilna kislina (ACC) je prekursor etilena, rastlinskega hormona. Etilen se sprošča ob ranitvi rastlin in inhibira rast korenin. Encim ACC deaminaza pa hidrolizira ACC v amonij in α -ketobutirat, kar povzroči zmanjšano sintezo etilena. Torej rizobakterije z aktivnim encimom ACC deaminaza zmanjšajo učinek etilena na rastlino. Vessey (2003) poroča o različnih PGPR z ACC deaminazno aktivnostjo (*Alcaligenes* sp., *Bacillus pumilus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* sp., *Variovorax paradoxus* pri rastlinah graha (*Pisum sativum*) in rjavi gorjušici (*Brassica juncea*), *Pseudomonas cepacia* pri soji (*Glycine max*), *Pseudomonas putida* pri Mungo fižolu (*Vigna radiata*).

b.) Raztapljanje fosfatov

Fosfor je pomemben za rast rastlin, vendar je tudi v tleh bogatih s fosforjem, večina elementa v netopni obliki kot železov in aluminijev fosfat v kisljih tleh in kot kalcijev fosfat v bazičnih tleh. Le približno 0,1 % fosforja je dostopen rastlinam. Kar $\frac{3}{4}$ fosforja iz fosfatnih gnojil ponovno precipitira v netopno obliko in poveča povpraševanje rastline za fosforjem. Bakterije, ki raztapljajo fosfat (angl. *phosphate solubilizing bacteria* (PSB)) izločajo organske kisline in fosfataze, ki spremenijo netopen fosfat v topne monobazične (H_2PO_4^-) in dibazične (HPO_4^{2-}) ione. Ta proces raztapljanja mineralnega fosfata v rizosferi poveča dostopnost in sprejem fosfatov za rastlino. Med PSB bakterije uvrščamo bakterije iz rodov *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* spp.

Organske kisline kot so citrat, laktat, sukcinat, ki jih izločajo PSB pripomorejo k raztapljanju fosfata v rizosferi. 2-keto-glukonska kislina, ki je najpomembnejša organska kislina, ki raztaplja fosfate, nastaja kot produkt oksidacije glukoze. Proces oksidacije katalizira encim glukoza dehidrogenaza. Mutante *Enterobacter asburiae*, ki nimajo aktivnosti tega encima, so nezmožne sproščati fosfat iz bazičnih tal (Gyaneshwar in sod., 1999).

Mio-inositol heksakisfosfat (fitat) in encimi fitaze (razgrajujejo fitat v fosfatne estre in mio-inositol in fosfor) vplivajo na sprejem fosforja v rastline. Fitaze so izolirali iz bakterij *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* in *Enterobacter* spp. Ob prisotnosti fitata v fosfat omejujočem mediju je PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 s fitazno aktivnostjo pospešila rast rastlin koruze. Mutanta FZB45/M2, ki ni imela fitazne aktivnosti, ni pospešila rasti rastlin (Idriss in sod., 2002).

c.) Sprejem železa

Železo je zelo pomemben mikroelement za rastline. Deluje kot kofaktor mnogih encimov z redoks aktivnostjo. Velik delež železa je v zemlji v obliki netopnega železovega hidroksida, zato je železo omejujoč faktor za rast rastlin tudi v tleh bogatih z železom. Razpoložljivost železa v raztopini zemlje je 10^{-18} M, kar ne zadošča niti za rast mikroorganizmov. Nekaj talnih mikroorganizmov proizvaja sideroforje, komponente z nizko molekularno maso in visoko afiniteto za železo, ki vežejo netopno obliko železa. Kompleks železo-siderofor se preko membranskega receptorja transportira v bakterijsko celico, kjer železo Fe^{3+} postane dostopno za metabolne procese. Veliko število rastlinskih vrst lahko absorbira bakterijski kompleks železo-siderofor (Raaijmakers in sod., 1995).

Buyer in sod. (1993) so z uporabo monoklonskih protiteles dokazali produkcijo sideroforjev pri PGPR v rizosferi pri železo limitirajočih pogojih. *Pseudomonas* spp. proizvajajo sideroforje kot so: pseudobaktin, piohelin, pioverdin, quinolobactin in salicilna kislina. Struktura proteinskih receptorjev zunanje membrane je komplementarna tem sideroforjem (David in sod., 2005). Na produkcijo sideroforjev vpliva tudi dostopnost

hranil. Znano je, da Co^{2+} , fruktoza, manitol in glukoza povečujejo *in vitro* produkcijo piohelina z *Pseudomonas fluorescens*, medtem ko $\text{NH}_4\text{Mo}^{2+}$, glicerol in glukoza povečajo produkcijo njihovega prekursorja salicilne kisline.

d.) Vpliv hlapnih snovi

Sevi PGPR izločajo različne hlapne snovi, ki pospešujejo rast rastlin. Hlapne snovi (3-hidroksi-2-butanone ali acetoin, 2,3-butandiol), ki jih izločata *Bacillus subtilis* in *B. amyloliquefaciens*, pospešujejo rast *Arabidopsis thaliana* v *in vitro* poskusih. Tako pospešena rast rastlin je regulirana z aktivacijo citokinin signalne poti (Ryu in sod., 2003).

Te hlapne snovi niso bile prisotne pri sevih, kjer niso opazili pospešene rasti. Mutacija pri *B. subtilis*, ki je preprečila produkcijo 2,3-butandiola ne pa acetona, je upočasnila pospešeno rast rastlin. Pospešena rast je bila odvisna od doze 2,3-butandiola, ki je bila eksogeno aplicirana na rastline *A. thaliana*.

Pri rastlinah *A. thaliana*, ki so bile izpostavljene hlapnim snovem iz *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens*, so opazili bolj blago obliko bolezenskih znakov, ki jih povzroča patogena bakterija *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Stopnja zaščite pred boleznijo je bila direktno povezana s produkcijo hlapnih komponent iz bakterije *B. subtilis*. Prav tako so opazili, da je signalna pot aktivirana z hlapnimi snovmi odvisna od etilena in neodvisna od signalne poti salicilne kisline ali jasmonske kisline. (Ryu in sod., 2004).

2.3.2 Posredno delovanje

a.) Antibiotiki

Različni PGPR antagonistično delujejo na rastlinske patogene mikroorganizme z enim ali več ugotovljenimi mehanizmi, na primer s sintezo hlapnih ali nehlapnih antibiotikov, sideroforov, encimov in drugih sekundarnih metabolitov kot je HCN. Produkcija le teh je močno povezana s kvalitativno in kvantitativno dostopnostjo hranil. Najpogostejši antibiotiki, ki jih proizvajajo različne antagonistične bakterije so: butrolaktoni, 2,4-diacetil-

floroglusinol (DAPG), kanosamin, oligomicin A, oomicin A, fenazin-1-karboksilna kislina, pioluteorin, pirolnitrin, viskoznamid, ksantobacin, zvitermicin A (Whipps, 2001). Mnogo od teh antibiotikov ima širok spekter delovanja, največ študij pa je bilo opravljenih na DAPG. Siderofori, ki jih proizvajajo PGPR inhibirajo koreninske patogene mikroorganizme z nastankom okolja, kjer primankuje železa.

Nekatere PGPR proizvajajo hlapne antibiotike, na primer HCN, ki inhibira citokrom oksidazo mnogih organizmov. Ti sevi imajo alternativno cianid rezistentno citokrom oksidazo in so relativno neobčutljivi na HCN. Mutante *P. fluorescens* CHAO, ki niso proizvajale HCN so bile manj učinkovite pri zatiranju črne žitne noge (povzročitelj bolezni je gliva *Gaeumannomyces graminis*) pri pšenici in črne koreninske gnilobe tobaka (povzročitelj bolezni je gliva *Thielaviopsis basicola*). Če pa so v te mutante klonirali *hcn*⁺ gene so sevi pridobili sposobnost biozaščite rastlin.

b.) Tekmovanje

PGPR tekmujejo z rizobakterijami, ki zavirajo rast rastlin (angl. *deleterious rhizobacteria*) (DRB) in patogenimi mikroorganizmi za hranila. Ločeno od kolonizacije korenin naj bi PGPR bile zmožne tekmovati za hranila z naravnimi mikrobnimi populacijami v rizosferi in tako uspešno eliminirati patogene mikroorganizme. Produkcija sideroforjev PGPR, ki patogene mikroorganizme privede do stradanja z železom, je glavni dodatek k supresiji patogenih mikroorganizmov (O' Sullivan in O' Gara, 1992).

c.) Parazitizem ali liza

PGPR proizvajajo hidrolitične encime, ki razgrajujejo celično steno gliv. Hitinaze, hidrolitični encimi, razgrajujejo hitin, glavni gradnik celične stene fitopatogenih gliv. Druga skupina hidrolitičnih encimov so glukanaze, ki razgrajujejo β -1,3-glukan celične stene gliv (Podile in Kishore, 2006).

d.) Inhibicija encimov ali toksinov, ki jih proizvajajo patogeni mikroorganizmi

Patogene glive proizvajajo ekstracelularne hidrolitične encime (pektolitični encimi kot so ekso- in endo-poligalakturonaze, pektin liaze in celulaze ter kutinaze), ki razgrajujejo polimere prisotne v rastlinski celični steni in tako pospešujejo glivno infekcijo z dezintegracijo celične stene. Redukcija aktivnosti teh encimov je v povezavi z redukcijo virulence (Podile in Kishore, 2006).

e.) Inducirana sistemska odpornost

Nekateri sevi rizobakterij so zmožni aktivirati odgovor rastlin proti zelo širokemu spektru rastlinskih patogenih mikroorganizmov, to je inducirana sistemska odpornost (ISR-Induced Systemic Resistance). ISR je gensko določena. PGPR sprožijo odgovor rastline preko dveh različnih signalnih poti: prva je odvisna od salicilne kisline (SA), druga pa je neodvisna od SA. Kasnejše poti vključujejo še jasmonsko kislino (JA) in etilen (Pieterse in sod., 2001).

Signalne molekule kot so SA, JA in etilen se kopičijo v aktiviranih rastlinah in koordinirajo odgovor rastline. Te signalne molekule aktivirajo specifične sete genov, ki so povezani z obrambo. SA tako inducira gene, ki kodirajo proteine povezane s patogenezo (angl. *pathogenesis related proteins*). JA in etilen pa inducirata gene, ki kodirajo tri antimikrobne proteine (*Hel*, *ChiB*, *Pdf1.2*) (Podile in Kishore, 2006).

Bakterijske determinante ISR vključujejo lipopolisaharide (LPS), siderofore (van Loon in sod., 1998) ter SA in so tudi odvisne od gostiteljske rastline, kar so potrdile številne raziskave. Mutanta *Pseudomonas aeruginosa* KMPCH inducira rezistenco paradižnika na *Botrytis cinerea* s produkcijo SA in skozi aktivacijo signalne poti, ki je odvisna od SA (Audenaert in sod., 2002). Podobno je na fižolu dokazal De Meyer s sodelavci, 1999. Vloga LPS pri ISR je bila potrjena tudi v raziskavi, kjer je mutanta *Pseudomonas fluorescens* WCS417r brez O-antigenske stranske verige LPS, izgubila sposobnost obrambe pred patogeno bakterijo *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na paradižniku.

Obratno so pri tretiranju korenin z celično steno bakterije *Pseudomonas fluorescens* WCS417r opazili 20% zmanjšanje bolezenskih znakov (Duijff, 1997).

2.4 KOLONIZACIJA KORENIN S PGPR

To je zelo kompleksen večstopenjski proces odvisen od številnih lastnosti bakterij (giblјivost, flageli, pili in O-antigen LPS), koreninskega eksudata in signaliziranja med bakterijo in rastlino. Drugi pomembni faktorji so še sestava koreninskega eksudata in interakcije gostitelj – PGPR – okolje.

a.) Bakterijske lastnosti

Flageli, pili, LPS in eksopolisaharidi so pomembni za kolonizacijo korenin. Pripomorejo k vezavi PGPR na površino korenin. Pil tipa IV na površini *Pseudomonas fluorescens* ima vlogo pri kompetitivni kolonizaciji koreninske čepice (Lugtenberg in sod., 2001).

Eksopolisaharidi sodelujejo pri pritrtanju na korenino rastlin. LPS pa omogočajo rast in preživetje bakterij, ker pomagajo pri kolonizaciji in vzpostavljanju mikro-okolja in predstavljajo oviro pred rastlinskimi obrambnimi spojinami. Z mutantami v sintezi O-antigena LPS pri *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas putida* so dokazali pomembno vlogo LPS pri kolonizaciji korenin (Podile in Kishore, 2006).

b.) Koreninski eksudat

Rastline izločajo vrstno specifične eksudate iz korenin, ki vsebujejo karbohidrate, proteine, amino kisline, organske baze, vitamine in druga hranila, ki vplivajo na rast in fiziologijo populacij rizobakterij. Primarna mikrobna združba je določena s sestavo koreninskega eksudata in posledično z bakterijami, ki so sposobne razgrajevati ta raznolika hranila. *Pseudomonas* spp. zelo dobro kolonizirajo korenine, prav zaradi njihove izjemne sposobnosti razgrajevanja zelo raznolikih hranil in kompeticije pri omejenih virih ogljika (Lugtenberg in sod., 2001).

c.) PGPR biofilmi

PGPR tvorijo biofilme na površini korenin. Gre za goste skupke bakterijskih celic, ki so prekrte s plastjo eksopolisaharidov. Produkcija antibiotikov in sekundarnih metabolitov pri PGPR je pod kontrolo »quorum sensing«, bakterijskega intercelularnega komunikacijskega mehanizma, ki kontrolira gensko ekspresijo v povezavi s populacijsko gostoto (Somers in sod, 2004). Študije »quorum sensing« so bile opravljene tako pri po Gram negativnih kot pri po Gram pozitivnih bakterijah. *N-acyl* homoserin laktoni (AHLs) igrajo vlogo signalne molekule pri Gram negativnih bakterijah in oligopeptidi pri Gram pozitivnih bakterijah. Oboji so sensorji populacijske gostote, olajšajo komunikacijo med različnimi vrstami bakterij, ki kolonizirajo rizosfero. AHLs se kopičijo v okolju, ki obdaja bakterije in ko doseže določen prag, sproži specifični odgovor bakterij. AHL se veže na svoj receptor in ta kompleks aktivira ali inaktivira ekspresijo tarčnega gena. Pogosto je regulatorni mehanizem del velikega kompleksa regulatornih kaskad z glavnim dvo-komponentnim sistemom GacS/GacA. Ta regulatorni sistem vpliva na ekspresijo tarčnega gena na posttranslacijskem nivoju, ki zajema mRNA tarčno sekvenco, dva RNA vezavna proteina (RSm in RsmE) in regulator RNA (RsmZ), ki je sposoben vezave RsmA (Haas in sod., 2002).

2.5 BOLEZNI PARADIŽNIKA

Paradižnik okužujejo številne patogene bakterije, glive in virusi (Koiike in sod., 2007).

Bakterijski rak paradižnika je bil prvič opisan leta 1909 in je danes še vedno pomembna bolezen razširjena po celem svetu. Povzročča jo karantenska bakterija *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*, ki je prisotna tako v zemlji kot v samem semenu. Osnovno bolezensko znamenje je sistemsko venenje rastlin.

Bakterijsko venenje paradižnika povzročča *Ralstonia solanacearum*, karantenska patogena bakterija, ki okužuje različne rastlinske vrste. Njeni najpomembnejši gostitelji so krompir, paradižnik, jajčevci, tobak, banane in pelargonije. Ponavadi bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* okužijo rastlino preko ran na koreninah (nastale pri

presaditvi ali z insekti in nematodi). Širi se sistemsko po ksilemu in povzroča veneje rastlin.

Bakterijsko pegavost paradižnika povzroča karantenska bakterija *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin *et al.*, ekonomsko pomembna bolezen paprike in paradižnika. Primarna bolezenska znamenja so nekrotične lezije na listih, stebli, plodovih in cvetovih. Plodovi z ogromno madežev niso več primerni za prodajo.

Bakterijske madeže na paradižniku povzroča bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye and Wilkie, ki je razširjena po celem svetu in je relativno blaga bolezen. Bolezenska znamenja se kažejo v temno rjavih do črnih pegah oziroma lezijah na listih, stebli in plodovih.

Nekatere glive, ki okužujejo paradižnik so: *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *C. dematium*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Phytophthora capsici*, *P. infestans*, *Sclerotinia minor*, *Verticillium dahliae*.

Med virusi pa so najpomembnejši: alfaalfa mosaic virus, beet curly top virus, potato virus Y, cucumber mosaic virus, tobacco mosaic virus, tomato mosaic virus, tomato spotted wilt virus, tomato yellow leaf curl virus.

2.6 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

S tradicionalnimi identifikacijskimi metodami določamo fenotipske značilnosti izoliranih bakterijskih sevov (Janse, 2005):

- a. Morfologija bakterijskih kolonij (oblika, barva, vonj, produkcija pigmentov na različnih gojiščih);
- b. Morfologija bakterijskih celic (Barvanje po Gramu odkriva pomembno informacijo o zgradbi bakterijske stene, ugotovimo pa lahko tudi osnovne morfološke lastnosti bakterijske celice (velikost, obliko, razporejanje);

- c. Fiziološke značilnosti (rast pri različnih temperaturah, pri različnih koncentracijah natrijevega klorida, produkcija toksinov, rezistenca na antibiotike);
- d. Biokemijske značilnosti, kjer s substrati za različne encime ugotavljamo metabolne značilnosti bakterij (na primer oksidazni test, katalazni test, ureazni test, fermentacija sladkorjev, hidroliza pektina, redukcija nitrata, denitrifikacija);
- e. Serološke značilnosti (s protitelesi lahko razlikujemo številne podvrste. Z ustrezno izbranimi protitelesi je mogoče ugotavljati tudi antigene, značilne za posamezno vrsto ali širšo skupino bakterij. Največ se uporabljajo aglutinacijski testi, precipitacijski testi, test imunofluorescence, ELISA test).

Med novejšje identifikacijske metode pa vključujemo:

- a. Specialne serološke tehnike, v kombinaciji z drugimi (imuno-elektroforeza, monospecifična protitelesa (monoklonalna ali poliklonalna protitelesa proti specifičnim komponentam na primer proteinom ali polisaharidom);
- b. DNA/RNA hibridizacije (uporabne za enostavno identifikacijo izbranih odsekov nukleinskih kislin, ki so značilni za neko skupino bakterij);
- c. FISH (angl. *Fluorescence in situ hybridization*) z uporabo rRNA (rDNA) oligonukleotidnih sond proti 16S ali 23S ribosomalni RNA/DNA;
- d. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času;
- e. Ločevanje proteinov in nukleinskih kislin v električnem polju /elektroforeza
 - Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE)
 - Imunoelektroforeza
 - Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP))
 - Naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. *Random amplified polymorphism DNA* (RAPD))
 - Pomnoževanje kratkih ponavljajočih sekvenc (angl. *Repetitive sequence-based fingerprinting PCR* (rep-PCR)), ki vključuje REP, ERIC in BOX-PCR
 - Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP))

- f. Ločevanje bakterijskih komponent s pomočjo kromatografije (na primer analiza aminokislin s tankoplastno kromatografijo, analiza izoprenoidnih kinonov z visoko zmogljivo tekočinsko kromatografijo, analiza profila maščobnih kislin s plinsko kromatografijo);
- g. Sekvenciranje nukleotidnih zaporedij za posamezne gene (pri bližje sorodnih bakterijah so razlike manjše, zato je za njihovo razlikovanje smiselno primerjati nukleotidna zaporedja genov, ki se v evoluciji hitro spreminjajo. Nasprotno je pri genetsko oddaljenih bakterijah bolje primerjati nukleotidna zaporedja genov, ki se počasi spreminjajo, na primer tistih za ribosomsko RNA in za ribosomske proteine).

Trenutna shema za identifikacijo različnih rizobakterij zajema štiri kategorije, ki temeljijo na: 1. tradicionalnih biokemijskih, morfoloških in fizioloških značilnostih, 2. komercialnih izvedbah biokemijskih testov (API, VITEK kartice, BIOLOG), 3. kemotaksonomskih značilnostih (PAGE in FAME profili) in 4. genomskih značilnostih (16S rRNA sekvenciranje) (Vale Barreto Figueiredo in sod., 2010).

2.6.1 Analiza metabolnega profila s sistemom BIOLOG

BIOLOG programska oprema omogoča izdelavo metabolnega profila bakterije glede na njeno sposobnost razgradnje 95 različnih virov ogljika (Jones s sod., 1999). Primerjava z metabolnimi profili drugih bakterij, ki jih vsebuje baza podatkov, omogoča identifikacijo bakterije (Bochner B.R, 1989).

2.6.2 Analiza profila maščobnih kislin

Različne vrste bakterij se razlikujejo po kvalitativni in kvantitativni sestavi specifičnih maščobnih kislin, ki so prisotne v celičnih membrani in lipopolisaharidih. S pomočjo plinske kromatografije je mogoče določiti profile maščobnih kislin in z njihovo primerjavo določiti podobnost bakterij. Za analizo čisto kulturo bakterije namnožimo na gojišču TSBA v standardiziranih pogojih. Maščobne kisline umilimo in jih nato metiliramo in ekstrahiramo v organskem topilu. Ekstrakte primerjamo z znanim profilom kontrolne bakterije (knjižnica) (Sasser, 1990).

2.6.3 16S rRNA sekvenciranje

Gen za 16S rRNA najprej namnožimo s PCR z uporabo specifičnih oligonukleotidov, nato pomnožen gen ločimo z gelsko elektroforezo, izrežemo iz gela in očistimo. Tako pripravljen gen za 16S rRNA je pripravljen za sekvenciranje po na primer Sanger metodi, kjer je sekvenca določena z uporabo radioaktivnega oligonukleotida. Z uporabo statističnih orodij lahko na podlagi pridobljenih sekvenc izrišemo filogenetsko drevo (Janse, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI

Bakterijski izolati so bili izolirani iz rizoplana paradižnika, Preglednica 2 (Kubik, 2002). Od 40 bakterijskih izolatov smo na podlagi njihove identifikacije (Kubik, 2002) izbrali 21 bakterijskih izolatov za nadaljne poskuse. Izbrali smo takšne bakterijske izolate, ki naj bi po zbrani literaturi imeli pozitiven učinek na rast rastlin.

Preglednica 2: Podatki o izbranih bakterijskih izolatih izoliranih iz rizoplana paradižnika (Kubik, 2002) za preizkus inhibicije patogenih mikroorganizmov *in vitro* in za presejalni test za PGPR učinek

Table 2: Information on bacterial isolates from tomato rhizoplane (Kubik, 2002) used for *in vitro* inhibition of plant pathogen bacteria and for screening for PGPR effect

Oznaka izolata v diplomski nalogi (Kubik, 2002)	Oznaka zbirke na BF	Oznaka zbirke na NIB	Identifikacija (Kubik, 2002)	Preizkušeni bakterijski izolati pri testu inhibicija patogenih mikroorganizmov <i>in vitro</i>	Preizkušeni bakterijski izolati v presejalnem testu za PGPR učinek-Poskus C (oznaka podposkusa)
2-8	L113	NIB Z 129	<i>Pseudomonas</i> sp. (FAP: <i>Pseudomonas corrugata</i>)	✓	C.1
1-3	L100	NIB Z 138	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	✓	C.1
1-4	L101	NIB Z 139	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	✓	C.1
1-0	L97	NIB Z 140	podoben <i>Brevundimonas diminuta</i>	✓	C.1
1-1	L98	NIB Z 141	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓	C.1
1-5	L102	NIB Z 142	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: <i>Pseudomonas fluorescens</i>)	✓	C.1
3-16	L133	NIB Z 143	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ali <i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar V ali <i>Pseudomonas putida</i> (FAP: <i>Pseudomonas putida</i>)	✓	C.1
2-12	L117	NIB Z 144	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	✓	C.2

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Podatki o izbranih bakterijskih izolatih izoliranih iz rizoplana paradižnika (Kubik, 2002) za preizkus inhibicije patogenih mikroorganizmov *in vitro* in za presejalni test za PGPR učinek

Oznaka izolata v diplomski nalogi (Kubik, 2002)	Oznaka zbirke na BF	Oznaka zbirke na NIB	Identifikacija (Kubik, 2002)	Preizkušeni bakterijski izolati pri testu inhibicija patogenih mikroorganizmov <i>in vitro</i>	Preizkušeni bakterijski izolati v presejalnem testu za PGPR učinek-Poskus C (oznaka podposkusa)
1-6	L103	NIB Z 145	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓	C.2
3-0	L119	NIB Z 146	<i>Pseudomonas</i> sp.	✓	C.2
2-13	L118	NIB Z 147	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	✓	C.3
2-11	L116	NIB Z 148	Ni identifikacije	✓	C.2
3-13	L130	NIB Z 149	<i>Pseudomonas</i> sp.	✓	C.2
2-9	L114	NIB Z 150	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	✓	C.2
2-10	L115	NIB Z 151	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: ni identifikacije)	✓	C.3
1-7	L104	NIB Z 152	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓	C.3
2-7	L112	NIB Z 153	<i>Pseudomonas putida</i>	✓	C.3
3-10	L128	NIB Z 154	<i>Pseudomonas</i> sp.	✓	C.3
3-6	L124	NIB Z 155	<i>Pseudomonas putida</i>	✓	C.3
3-4	L123	NIB Z 156	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)	✓	C.3
1-2	L99	NIB Z 157	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)	✓	C.2
3-8	Nimamo podatka	Ni v zbirki	<i>Bacillus</i> sp.	✓	/

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Podatki o izbranih bakterijskih izolatih izoliranih iz rizoplana paradižnika (Kubik, 2002) za preizkus inhibicije patogenih mikroorganizmov *in vitro* in za presejalni test za PGPR učinek

Oznaka izolata v diplomski nalogi (Kubik, 2002)	Oznaka zbirke na BF	Oznaka zbirke na NIB	Identifikacija (Kubik, 2002)	Preizkušeni bakterijski izolati pri testu inhibicija patogenih mikroorganizmov <i>in vitro</i>	Preizkušeni bakterijski izolati v presejalnem testu za PGPR učinek-Poskus C (oznaka podposkusa)
2-0	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
2-1	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
2-2	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
2-3	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
2-4	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
2-5	Nimamo podatka	Ni v zbirki	podoben <i>Brevundimonas diminuta</i>	✓	/
2-6	Nimamo podatka	Ni v zbirki	<i>Bacillus mycoides</i>	✓	/
3-1	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
3-2	Nimamo podatka	Ni v zbirki	podoben <i>Burkholderia cepacia</i>	✓	/
3-3	Nimamo podatka	Ni v zbirki	<i>Bacillus cereus</i>	✓	/
3-5	Nimamo podatka	Ni v zbirki	polzeča bakterija	✓	/
3-7	Nimamo podatka	Ni v zbirki	<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup 2	✓	/
3-9	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
3-11	Nimamo podatka	Ni v zbirki	podoben <i>Brevundimonas vesicularis</i>	✓	/

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Podatki o izbranih bakterijskih izolatih izoliranih iz rizoplana paradižnika (Kubik, 2002) za preizkus inhibicije patogenih mikroorganizmov *in vitro* in za presejalni test za PGPR učinek

Oznaka izolata v diplomski nalogi (Kubik, 2002)	Oznaka zbirke na BF	Oznaka zbirke na NIB	Identifikacija (Kubik, 2002)	Preizkušeni bakterijski izolati pri testu inhibicija patogenih mikroorganizmov <i>in vitro</i>	Preizkušeni bakterijski izolati v presejalnem testu za PGPR učinek-Poskus C (oznaka podposkusa)
3-12	Nimamo podatka	Ni v zbirki	polzeča bakterija	✓	/
3-14	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/
3-15	Nimamo podatka	Ni v zbirki	<i>Arthrobacter</i> sp.	✓	/
3-17	Nimamo podatka	Ni v zbirki	Ni identifikacije	✓	/

Simboli: / ni preizkušeno

Uporabljeni so bili naslednji referenčni sevi (glej Preglednica 3).

Preglednica 3: Podatki o uporabljenih referenčnih bakterijskih sevih

Table 3: Data on the reference material strain used

Oznaka zbirke NIB	Ime referenčnega bakterijskega seva	Oznaka zbirke ATCC oz. CFBP
NIB Z 844	<i>Pseudomonas putida</i> A	ATCC 12633
NIB Z 845	<i>Pseudomonas putida</i> B	CFBP 11370 alias G176
NIB Z 846	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	ATCC 17415
NIB Z 847	<i>Pseudomonas corrugata</i>	CFBP 2431
NIB Z 848	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	CFBP 2088
NIB Z 849	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	ATCC 9446

Vsi bakterijski izolati so bili gojeni na gojišču King B:

Proteazni pepton	Oxoid, L85	20 g
K ₂ HPO ₄	Kemika/Merck	1,5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Kemika/Merck	1,5 g
Glicerol	Difco glicerol, 228220	15 ml (18,9 g)
Agar	Oxoid agar No. 3	15 g
ddH ₂ O		1000 ml
pH = 7,0 – 7,2		

3.2 INHIBICIJA PATOGENIH MIKROORGANIZMOV *in vitro*

Da bi preverili sposobnost bakterijskih izolatov, da inhibirajo rast patogenih mikroorganizmov *in vitro*, smo izbrali tri pogoste patogene mikroorganizme, ki povzročajo bolezni paradižnika: *Ralstonia solanacearum* (NCPPB 909), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (NCPPB 2979) in *Xanthomonas vesicatoria* (NCPPB 2573).

Na gojišču King B smo naredili razmaz z vatenko za konfluentno rast patogenih mikroorganizmov. Po 24 urah inkubacije smo na vsako četrtino gojišča cepili v ravni črti izolirane PGPR bakterijske izolate (24 ur stara kultura). Gojišča smo inkubirali 2 dni pri 25 °C. Opazovali smo cone inhibicije rasti. Poskus smo pri nekaterih izolatih ponovili.

Analizirani bakterijski izolati so podani v Preglednici 2.

3.3 RASTLINSKI POSKUSI, UGOTAVLJANJE POZITIVNEGA UČINKA NA RAST RASTLIN

Za rastlinski poskus smo uporabili semena paradižnika *Solanum lycopersicum* L. kultivarja Moneymaker (Bruno Nebelung).

Izvedli smo tri različne rastlinske pokuse. V prvem poskusu smo primerjali PGPR učinek različnih izbranih bakterijskih izolatov (Poskus A), v drugem poskusu smo ugotavljali kakšen je PGPR učinek v pogojih z in brez hranil (Poskus B) in v tretjem poskusu smo naredili velik presejalni test za PGPR učinek na 21 bakterijskih izolatih (Poskus C).

Za vse pokuse smo semena paradižnika najprej površinsko sterilizirali 1 min v 70 % etanolu in 45 min v 1,5 % natrijevem hipokloritu. Po površinski sterilizaciji smo semena še trikrat sprali v sterilni ddH₂O. Za kontrolo sterilizacije smo 5 tretiranih semen položili na gojišče King B in inkubirali do 7 dni pri 25 °C. Po 7 dneh inkubacije v petrijevkah s King B gojiščem nismo opazili rasti bakterij.

Nato smo pripravili suspenzije bakterijskih izolatov v 1 % raztopini karboksimetil celuloze (CMC, Carboxymethyl Cellulose, Sigma C4888) tako, da smo 10 µl inokuluma (48 ur stare kolonije iz gojišča King B) resuspendirali v 20 ml 1 % CMC v petrijevki. V vsako petrijevko smo dodali po 25 površinsko steriliziranih semen. CMC smo uporabili za namen boljše oprijemljivosti bakterijskih izolatov na semena. Petrijevke smo inkubirali čez noč na stresalniku 50 obratov/min pri sobni temperaturi. Za negativno kontrolo smo uporabili 20 ml 1 % CMC v katero smo dodali 25 površinsko steriliziranih semen. Po 24 urah stresa smo semena ločeno prenesli v novo petrijevko. Petrijevke smo čez noč pustili v laminariju z odprtimi pokrovi, da so se semena posušila. Uspešnost kolonizacije semen smo preverjali samo med poskusom C in sicer tako, da smo po 2 semeni dali v 5 ml PBS pufra, zvorteksirali in naredili serijske redčine od 10⁻¹ do 10⁻⁶ v PBS pufra. Po 100 µl pripravljenih redčin od 10⁻² do 10⁻⁶ smo s sterilno palčko razmazali na 2 plošči gojišča King B. Gojišča smo inkubirali 2 dni pri 25 °C.

Kolonizirana semena smo posejali v steriliziran pesek (avtoklavirano pri 134 °C, 100 min), pokrili s PVC vrečko in zalivali na 2 dni s suspenzijami bakterijskih izolatov v sterilni pitni vodi iz vodovodnega omrežja (v nadaljevanju sterilni pitni vodi) ali sterilni ddH₂O ali sterilni hranilni raztopini (avtoklavirano pri 121 °C, 20 min) tako, da smo polno ploščo inokuluma bakterijskih izolatov 2 dni starih kultur na gojišču King B resuspendirali v 250 ml sterilne pitne vode ali sterilne ddH₂O ali sterilne hranilne raztopine. Po 2 tednih smo rastline presadili v posamezne lončke s steriliziranim peskom. Rastline smo zalivali na 2 dni s suspenzijami bakterijskih izolatov v sterilni pitni vodi ali sterilni ddH₂O ali sterilni hranilni raztopini. Za negativno kontrolo smo rastline zalivali s sterilno pitno vodo ali sterilno ddH₂O ali sterilno hranilno raztopino. Po 5 tednih smo posamezne rastline ločili na korenine, stebila in liste ali korenine in zgornje dele (steblo in listi) in tehtali svežo maso. Rastlinski material smo sušili v sušilniku 5 dni pri 100 °C nato pa tehtali suho maso.

Uspešnost sterilizacije peska smo predhodno preverili tako, da smo tretiran pesek zvorteksirali v 5ml PBS pufra, inkubirali 30 min in po 100 µl suspenzije s sterilno palčko razmazali na 2 plošči gojišča King B in inkubirali do 7 dni pri 25 °C. Po 7 dneh inkubacije v petrijevkah s King B gojiščem nismo opazili rasti bakterij.

3.3.1 Primerjava PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov – Poskus A

V poskusu A smo glede na identifikacijo (Kubik, 2002) in glede na literaturo o PGPR preizkusili 5 različnih PGPR bakterijskih izolatov in njihov možen pozitiven učinek na rast rastlin. Na posamezen bakterijski izolat smo uporabili 17-20 rastlin (Preglednica 4).

Preglednica 4: Podatki o preizkušeni bakterijskih izolatih in številu tretiranih rastlin v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov - poskus A

Table 4: Data on the bacterial strains tested and the number of treated plants in experiment of comparison of PGPR effect of different bacterial isolates - experiment A

Oznaka izolata v diplomski nalogi Kubik, 2002	Oznaka zbirke na BF	Oznaka zbirke na NIB	Identifikacija (Kubik, 2002)	Število tretiranih rastlin
2-8	L113	NIB Z 129	<i>Pseudomonas</i> sp. (FAP: <i>Pseudomonas corrugata</i>)	18
2-9	L114	NIB Z 150	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19
2-10	L115	NIB Z 151	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: ni identifikacije)	17
3-8	Nimamo podatka	Ni v zbirki	<i>Bacillus</i> sp.	19
1-2	L99	NIB Z 157	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)	20

Rastline smo zalivali z bakterijskimi suspenzijami v hranilni raztopini 5 tednov na vsake 2 dni. Za negativno kontrolo smo uporabili 22 rastlin, ki smo jih zalivali s sterilno hranilno raztopino. Po 5 tednih smo vse rastline ločili na korenine, stebila in liste in tehtali skupno svežo in skupno suho maso posameznih tretiranih skupin.

10x hranilna raztopina, pH = 5,5:

KNO ₃	3,03 g
NH ₄ NO ₃	2,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,455 g
KH ₂ PO ₄	680 mg
H ₃ BO ₄	13,6 mg
NaFe EDTA	44 mg
MnSO ₄	Odpipetiraš 1 ml 68 mg/10 ml
CuSO ₄	Odpipetiraš 1 ml 39 mg/10 ml
ZnSO ₄	Odpipetiraš 0,1 ml 107 mg/10 ml
Na ₂ MoO ₄	Odpipetiraš 0,1 ml 11 mg/100 ml
ddH ₂ O	1000 ml

3.3.2 Ugotavljanje PGPR učinka v pogojih z in brez hranil - Poskus B

V poskusu B smo preizkusili bakterijski izolat NIB Z143 (L133, 3-16). Izolat NIB Z143 smo izbrali na podlagi rezultata testa inhibicije na patogene bakterije *in vitro*. Izolat NIB Z143 inhibira rast vseh treh patogenih bakterij in spada med pseudomonade. V poskusu B nas je zanimalo, kako se bodo rastline obnašale v pogojih z in brez hranil. Rastline smo zalivali z bakterijskimi suspenzijami v hranilni raztopini (16 rastlin) ali ddH₂O (17 rastlin) 5 tednov na vsake 2 dni. Za negativno kontrolo smo uporabili rastline, ki smo jih zalivali s sterilno hranilno raztopino (17 rastlin) in rastline, ki smo jih zalivali s sterilno ddH₂O (16 rastlin). Po 5 tednih smo vse rastline ločili na korenine, stebila in liste in tehtali svežo in suho maso posameznih tretiranih rastlin.

3.3.3 Presejalni test za PGPR učinek - Poskus C

Poskus C smo naredili na podlagi rezultatov poskusa A in B. V poskusu C smo naredili velik presejalni test za PGPR učinek in preizkusili 21 različnih bakterijskih izolatov, ki bi glede na identifikacijo (Kubik, 2002) lahko bili PGPR. Poskus smo zaradi velikega števila preizkušenih izolatov razdelili na 3 podposkuse (C.1, C.2, C.3), kjer smo preizkusili po 7 bakterijskih izolatov naenkrat (glej Preglednica 2).

Rastline smo zalivali z bakterijskimi suspenzijami v sterilni pitni vodi (po 12 rastlin na bakterijski izolat) 5 tednov na vsake 2 dni. Za negativno kontrolo smo uporabili rastline, ki smo jih zalivali s sterilno pitno (12 rastlin). Po 5 tednih smo vse rastline ločili na korenine in zgornje dele (stebila in liste) in tehtali svežo in suho maso posameznih tretiranih rastlin. Kolonizacijo korenin s posameznim bakterijskim izolatom smo preverili pri podposkusih C.2 in C.3 tako, da smo izolirali bakterije iz rizoplana korenine ene od rastlin iz vsake skupine tretiranih rastlin. Košček korenin (približno 0,5 g) smo 4x sprali v sterilni fiziološki raztopini in dali v epruvete s 3 ml fiziološke raztopine in steklenimi kroglicami. Vorteksirali smo 1 min in naredili serijske redčitve od 10⁻¹ do 10⁻⁴. Po 100 µl pripravljenih redčin smo s sterilno palčko razmazali na 2 plošči gojišča King B in inkubirali 2 dni pri 25 °C.

3.4 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV

3.4.1 Profil maščobnih kislin

Protokol za to identifikacijsko metodo je MIDI metoda (Microbial Identification System, Microbial ID Inc., Newark, Delaware).

3.4.1.1 Priprava bakterijskih izolatov

Analizirani bakterijski izolati so podani v Preglednici 5.

Preglednica 5: Analizirani bakterijski izolati pri testu profila maščobnih kislin

Table 5: Analyzed bacterial isolates in fatty acid profile test

Oznaka zbirke na NIB	Oznaka zbirke na BF	Oznaka izolata v diplomski nalogi (Kubik, 2002)
NIB Z 129	L113	2-8
NIB Z 138	L100	1-3
NIB Z 139	L101	1-4
NIB Z 140	L97	1-0
NIB Z 141	L98	1-1
NIB Z 142	L102	1-5
NIB Z 143	L133	3-16
NIB Z 144	L117	2-12
NIB Z 145	L103	1-6
NIB Z 146	L119	3-0
NIB Z 147	L118	2-13
NIB Z 148	L116	2-11
NIB Z 149	L130	3-13
NIB Z 150	L114	2-9
NIB Z 151	L115	2-10
NIB Z 152	L104	1-7
NIB Z 153	L112	2-7
NIB Z 154	L128	3-10
NIB Z 155	L124	3-6
NIB Z 156	L123	3-4
NIB Z 157	L99	1-2

Najprej smo vse bakterijske izolate precepili na gojišče NA potem pa na gojišče TSBA, kjer smo jih inkubirali 24 ur pri temperaturi 28 °C. Po inkubaciji smo iz TSBA plošč prenesli polno 10 µl plastično ezo inokuluma v stekleno epruveto z navojem.

Gojišče NA:

Nutrient broth	Difco, 0003	8 g
Agar	Difco	15 g
ddH ₂ O		1000 ml
pH = 7,2 - 7,4		

Gojišče TSBA:

Trypticase Soy Broth (Soybean-Casein Digest Broth)	BD: BBL 211768	30 g
Agar	Difco, 0118	15 g
ddH ₂ O		1000 ml
pH = 7,2 -7,4		

3.4.1.2 Saponifikacija

V vsako epruveto smo dodali po 1 ml reagenta 1 in zvorteksirali, da je inokulum odstopil od stene epruvete. Potem smo epruvete inkubirali 5 min v vreli vodni kopeli pri 100 °C. Epruvete smo zvorteksirali in jih inkubirali 25 min v vreli vodni kopeli pri 100 °C. Epruvete smo nato ohladili pod tekočo vodo na sobno temperaturo.

Reagent 1:

NaOH	J.T. Baker, 0288	45 g
Metanol	J.T. Baker, 8402	150 ml
ddH ₂ O		150 ml

3.4.1.3 Metilacija

Postopek metilacije smo izvedli v digestoriju. Epruветam smo dodali po 2 ml reagenta 2. Epruветe smo dobro zvorteksirali in jih inkubirali 10 min v vodni kopeli pri 80 °C na stresalniku. Po inkubaciji smo epruветe ohladili pod tekočo vodo na sobno temperaturo.

Reagent 2:

Metanol	J.T. Baker, 8402	220 ml
HCl, 36%-38%	J.T. Baker, 6081	260 ml

3.4.1.4 Ekstrakcija

Epruветam smo dodali 1,6 ml reagenta 3 in stresali 10 min na stresalniku pri 20 obratih/min. Maščobne kisline se raztopijo v reagentu 3. Po stresanju smo previdno s stekleno pipeto odstranili spodnjo plast tekočine.

Reagent 3:

95% n-heksan	J.T. Baker, 9262-02	200 ml
Butilmetileter	J.T. Baker, 9042	200 ml

3.4.1.5 Spiranje ekstrakta

V vsako epruветo smo dodali po 3 ml reagenta 4 in inkubirali 5 min na stresalniku pri 20 obratih/min. Potem smo odvzeli po 600 µl zgornje faze tekočine v GC ampulo. Ampule smo zaprli in zaplombirali.

Reagent 4:

NaOH	J.T. Baker, 0288	5,4 g
NaCl	Merck	65 g
ddH ₂ O		450 ml

3.4.1.6 Analiza na plinskem kromatografu

Tako pripravljene vzorce smo analizirali s plinskim kromatogramom 5890 series II Gas Chromatography Plus, Agilent Technologies. Vzorce lahko pred analizo in po analizi shranimo pri -20 °C.

Uporabili smo komercialni kalibracijski miks od Agilent Technologies. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili bakterijo *Xanthomonas maltophaga* (PD 1542 Ref).

Analize smo izvedli na Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska.

3.4.2 Analiza metabolnega profila s sistemom BIOLOG

Identifikacija bakterijskih izolatov po metodi BIOLOG je bila izvedena na mikroploščah (Biolog, kataloška številka 1011) po navodilih Biolog. Najprej smo bakterijske izolate nacepili na gojišče BUG agar (Biolog, kataloška številka 70101) in jih inkubirali 24 ur pri temperaturi 30 °C. Z aparatom za merjenje transmittance (Biolog, kataloška številka 3531) smo s pomočjo standarda GN-NENT (Biolog, kataloška številka 3411) in negativne kontrole GN/GF inokulacijske tekočine (Biolog, kataloška številka 72101) umerili transmittanco na 52%. Nato smo s pomočjo vatenk naredili uniformne suspenzije bakterijskih izolatov v GN/GF inokulacijski tekočini in z aparatom za merjenje transmittance umerili njihovo transmittanco na $52\% \pm 2\%$. Po 150 μ l pripravljene suspenzije smo nacepili v vsako luknjico mikroplošče GN2 MicroPlate™. Mikroplošče smo inkubirali 16-24 ur pri 30 °C. Rezultate (obarvanost luknjic) smo odčitavali manualno in jih zapisovali v Biolog bazo.

Obarvanost luknjic odčitavamo glede na negativno kontrolo v luknjici na poziciji A1, ki mora biti neobarvana. Vse luknjice, ki so podobne luknjici A1 imajo negativen rezultat in vse luknjice, ki so obarvane violečno so pozitivne. Tiste luknjice, ki so medlo obarvane, odčitamo kot »na meji« (/). Rezultate na vsaki mikroplošči smo odčitavali večkrat.

Analizirani bakterijski izolati so podani v Preglednici 6.

Preglednica 6: Podatki o analiziranih izolatih bakterij z analizo metabolnega profila, BIOLOG in za sekvenciranje 16S rRNA

Preglednica 6: The data of used bacterial isoaltes for metabolic profile BIOLOG and for sequencing 16S rRNA

NIB zbirka	Oznaka BF zbirke/oznaka v diplomski nalogi Kubik, 2002
NIB Z 129	L113/2-8
NIB Z 138	L100/1-3
NIB Z 139	L101/1-4
NIB Z 140	L97/1-0
NIB Z 141	L98/1-1
NIB Z 142	L102/1-5
NIB Z 143	L133/3-16
NIB Z 144	L117/2-12
NIB Z 145	L103/1-6
NIB Z 146	L119/3-0
NIB Z 147	L118/2-13
NIB Z 148	L116/2-11
NIB Z 149	L130/3-13
NIB Z 150	L114/2-9
NIB Z 151	L115/2-10
NIB Z 152	L104/1-7
NIB Z 153	L112/2-7
NIB Z 154	L128/3-10
NIB Z 155	L124/3-6
NIB Z 156	L123/3-4
NIB Z 157	L99/1-2
NIB Z 844 referenčni sev	<i>P. putida</i> biovar A, ATCC 12633
NIB Z 845 referenčni sev	<i>P. putida</i> biovar B, CFBP 11370 alias G176
NIB Z 846 referenčni sev	<i>P. aureofaciens</i> , ATCC 17415
NIB Z 847 referenčni sev	<i>P. corrugata</i> , CFBP 2431
NIB Z 848 referenčni sev	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> , CFBP 2088
NIB Z 849 referenčni sev	<i>P. chlororaphis</i> , ATCC 9446

3.4.3 Sekvenciranje 16S rRNA

3.4.3.1 Pomnoževanje gena za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Analizirani bakterijski izolati so podani v Preglednici 6.

Uporabili smo evbakterijske začetne oligonukleotide za 16S rRNA (Bianciotto in sod, 1996), pri čemer smo dobili 1473 bp dolge fragmente. Začetni oligonukleotidi so podani v Preglednici 7, sestava PCR mešanice pa v Preglednici 8.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR (Bianciotto in sod., 1996)

Table 7: Oligonucleotide primers for PCR reaction (Bianciotto et all, 1996)

Oznaka	Zaporedje oligonukleotidov (5'-3')
27 fevb	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
1495 revb	CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA

Preglednica 8: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR (Bianciotto in sod., 1996)

Table 8: PCR reaction mixture (Bianciotto et all, 1996)

	končna koncentracija	μl na reakcijo
ddH ₂ O		35,875
10x PCR pufer	1x	5
25mM MgCl ₂	1,5mM	3
10mM dNTP	0,2mM	4
27fevb 10pmol/μl	0,1pmol/μl	0,5
1495 revb 10pmol/μl	0,1pmol/μl	0,5
Ampli Taq polimeraza (5U/μl), ABI	0,0125U/μl	0,125
Suspenzija bakterij v ddH ₂ O		1

PCR mešanici smo dodali po 1 μl suspenzije bakterijskih izolatov, ki smo jih predhodno gojili na gojišču King B, 24 ur (0,5 μl cepilne zanke v 500 μl ddH₂O). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili referenčne bakterijske seve. Negativna kontrola je vsebovala 1 μl ddH₂O.

Protokol za PCR, ki smo ga izvajali v termobloku GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA), je bil (Bianciotto in sod., 1996):

- 94 °C, 4 min (začetna denaturacija)
- 5 ciklov:
 - 94 °C, 30 s (denaturacija)
 - 60 °C, 30 s (vezava začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 4 min (izgradnja komplementarne verige)
- 5 ciklov:
 - 94 °C, 30 s (denaturacija)
 - 55 °C, 30 s (vezava začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 4 min (izgradnja komplementarne verige)
- 30 ciklov:
 - 94 °C, 30 s (denaturacija)
 - 50 °C, 30 s (vezava začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 4 min (izgradnja komplementarne verige)
 - 72 °C, 7 min (končno podaljševanje verige)
 - 4 °C, ∞ (podaljšana inkubacija)

3.4.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

PCR produkte smo preverjali s pomočjo gelske elektroforeze na agaroznem gelu.

Pripravili smo ustrezno količino 1 % agaroznega gela:

- 1 x modificiran TAE pufer ((400 mM Tris-acetat pH 8,0 in 0,1 mM EDTA)
- 1 % agarozna (Sigma, A-6013)
- 1 µl etidijevga bromida (založna raztopina 10 mg/ml) na 20 ml agaroznega gela

Pripravljeno raztopino agaroze smo vlili v nosilec, v katerega smo prej vstavili glavniček s poljubnim številom zobcev. V ohlajen gel smo skupaj z nanašalnim pufrom (bromfenol modro, ksilen cianol FF, glicerol) nanесли po 18 µl vzorca ter 1 µl lestvice nukleinskih

kislin (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus, Fermentas). Elektroforeza je potekala v elektroforetskem aparatu (Biorad) pri napetosti 100 V, 35 do 45 min. Po poteku elektroforeze smo gel pregledali pod UV svetlobo in slikali s CCD kamero.

3.4.3.3 Izolacija specifičnih produktov PCR in ugotavljanje nukleotidnega zaporedja DNA

S skalpelom smo specifičen produkt, dolg približno 1473 bp, izrezali iz 1 % agaroznega gela z modificiranim TAE pufrom. Izrezane produkte smo s pinceto prenesli v kolone za izolacijo produktov PCR iz gela (DNA Gel Extraction Kit (Milipore, ZDA)). Kolono smo vstavili v 1,5 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 min pri 5000 g. Po koncu centrifugiranja smo kolono zavrgli, izolirane specifične produkte PCR pa poslali v sekvenciranje (ugotavljanje nukleotidnega zaporedja DNA po Sangerju) komercialnemu ponudniku te storitve (Macrogen INC, Korea).

3.4.3.4 Primerjava nukleotidnih zaporedij

Primerjavo nukleotidnih zaporedij specifičnih produktov med seboj in s podatki v genski banki smo izvedli z uporabo orodij na naslednjih web straneh:

- National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- National Centre for Biotechnology Information BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke svežih in suhih mas iz rastlinskih poskusov ugotavljanja pozitivnih učinkov na rast rastlin smo statistično obdelali. Z analizo variance smo najprej preverili, če obstajajo razlike v sveži in suhi masi med bakterijskimi izolati ne glede na del rastline in potem, če obstajajo razlike v sveži in suhi masi med deli rastline ne glede na bakterijski izolat. Kjer so bili rezultati statistično značilni, smo naredili še Dunnetov test, s katerim smo preverjali, ali so razlike med posameznim obravnavanjem statistično značilno različne od kontrole. Kjer je bilo potrebno, smo naredili Tukey test, kjer smo med seboj primerjali posamezna obravnavanja in iskali značilne razlike med njimi.

4 REZULTATI

4.1 INHIBICIJA PATOGENIH MIKROORGANIZMOV *in vitro*

Želeli smo preveriti ali imajo izbrane bakterije, izolirane iz rizoplana paradižnika, sposobnost, da zavirajo rast patogenih mikroorganizmov *in vitro* (Slika 1).

Le šest bakterijskih izolatov izmed 40 testiranih izolatov je šibko zaviralo rast bakterije *Ralstonia solanacearum*, od tega pa le trije izolati (NIB Z151, NIB Z149, NIB Z143) v ponovljenem poskusu. Inhibicija *in vitro* v tem poskusu je bila povsod šibka. 17 izolatov je imelo sposobnost, da zavirajo rast patogene bakterije *Xanthomonas vesicatoria*, od tega največ fluorescentnih pseudomonad (glej Preglednico 9). 13 izolatov je zaviralo rast bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, spet največ Gram negativnih fluorescentnih izolatov. Pri treh bakterijskih izolatih (NIB Z143, NIB Z 156 in NIB Z157) smo opazili veliko cono inhibicije. Iz Preglednice 9 je razvidno, da izolat NIB Z143 inhibira rast vseh treh testiranih patogenih bakterij. Tudi izolat NIB Z151 inhibira rast vseh treh patogenih bakterij vendar šibkeje kot izolat NIB Z143.

Preglednica 9: *In vitro* inhibicija bakterijskih izolatov iz rizoplana paradižnika na izbrane patogene bakterije
Table 9: *in vitro* inhibition of bacterial isolates from tomato rhizosphere against selected pathogenic bacteria

Izolat	NCPPB 909 / Rs	NCPPB 2573 /Cv	NCPPB 2979 /Cmm
NIB Z129 (2-8)	-(-)	+/-	^F - (^F -)
NIB Z138 (1-3)	-	-	*-
NIB Z139 (1-4)	-(-)	+ (+)	+ (+)
NIB Z140 (1-0)	-	-	-
NIB Z141(1-1)	+/- (-)	-	-
NIB Z142 (1-5)	-(-)	+ (+)	(+)
NIB Z143 (3-16)	+/- (+/-)	+/- (+)	++(++)
NIB Z144 (2-12)	-(-)	+/- (+)	+ (+)
NIB Z145 (1-6)	-	-	-
NIB Z146 (3-0)	-(-)	+ (+)	+/- (+)
NIB Z147 (2-13)	-(-)	+/- (+)	+ (+)
NIB Z148 (2-11)	+/- (-)	+/- (+/-)	-

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 9: *In vitro* inhibicija bakterijskih izolatov iz rizoplana paradižnika na izbrane patogene bakterije

Izolat	NCPPB 909 / Rs	NCPPB 2573 / Xv	NCPPB 2979 / Cmm
NIB Z149 (3-13)	+/- (+/-)	+/-	+/-
NIB Z 150 (2-9)	-(-)	+/- (+/-)	-(-)
NIB Z151 (2-10)	+/- (+/-)	+ (+)	+ (+)
NIB Z152 (1-7)	-	-	-
NIB Z153 (2-7)	-	-	-
NIB Z154 (3-10)	-(-)	+/- (+/-)	F ₋
NIB Z155 (3-6)	-	-	-
NIB Z156 (3-4)	-(-)	+ (+)	++ (++)
NIB Z157(1-2)	-(-)	*	++ (++)
2-0	-	1 ₋	1 ₋
2-1	-	1 ₋	1 ₋
2-2	-	+/-	-
2-3	-	1 ₋	1 ₋
2-4	-	1 ₋	1 ₋
2-5	-	-	-
2-6	-	-	-
3-1	-	-	-
3-2	-	-	-
3-3	-	-	-
3-5	-(-)	+/- (+/-)	+(+)
3-7	-	-	F ₋
3-8	-(-)	-(+/-)	+/- (+)
3-9	-	-	-
3-11	F ₋	-	-
3-12	-(-)	+/- (+/-)	+(+)
3-14	+/- (-)	-	2 ₋
3-15	-	-	-
3-17	F ₋	-	-

Simboli: - ni inhibicije, +/- šibka inhibicija (rast patogene bakterije do testnega izolata), + inhibicija, ++ vidna velika cona inhibicije, * testni izolat se je močno razrasel, F₋ pojav obraten od inhibicije, saj je rast patogene bakterije okoli testiranega izolata boljša, 1 slabša rast patogene bakterije, vendar je vidno, da do inhibicije ni prišlo, 2 rast testiranega izolata je zelo slaba, ni tipična. Znaki v oklepajih so rezultati ponovljenega poskusa. NCPPB 909- *Ralstonia solanacearum*, NCPPB 2573-*Xantomonas vesicatoria*, NCPPB 2979-*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*



Slika 1: Inhibicija patogene bakterije *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* na KB gojišč: vidne cone inhibicije rasti patogene bakterije, ki so jo povzročili trije različni bakterijski izolati

Figure 1: Inhibition of pathogenic bacteria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* on KB medium: visible zones of growth inhibition of pathogenic bacteria caused by 3 different bacterial isolates

4.2 RASTLINSKI POSKUSI, UGOTAVLJANJE POZITIVNEGA UČINKA NA RAST RASTLIN

4.2.1 Primerjava PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov - Poskus A

V poskusu A smo glede na identifikacijo (glej Preglednica 4) in glede na literaturo o PGPR preizkusili 5 različnih PGPR bakterijskih izolatov in njihov možen pozitiven učinek na rast rastlin.

Podatki o skupnih svežih in suhih masah rastlin tretiranih z različnimi bakterijskimi izolati so prikazani v Preglednici 10.

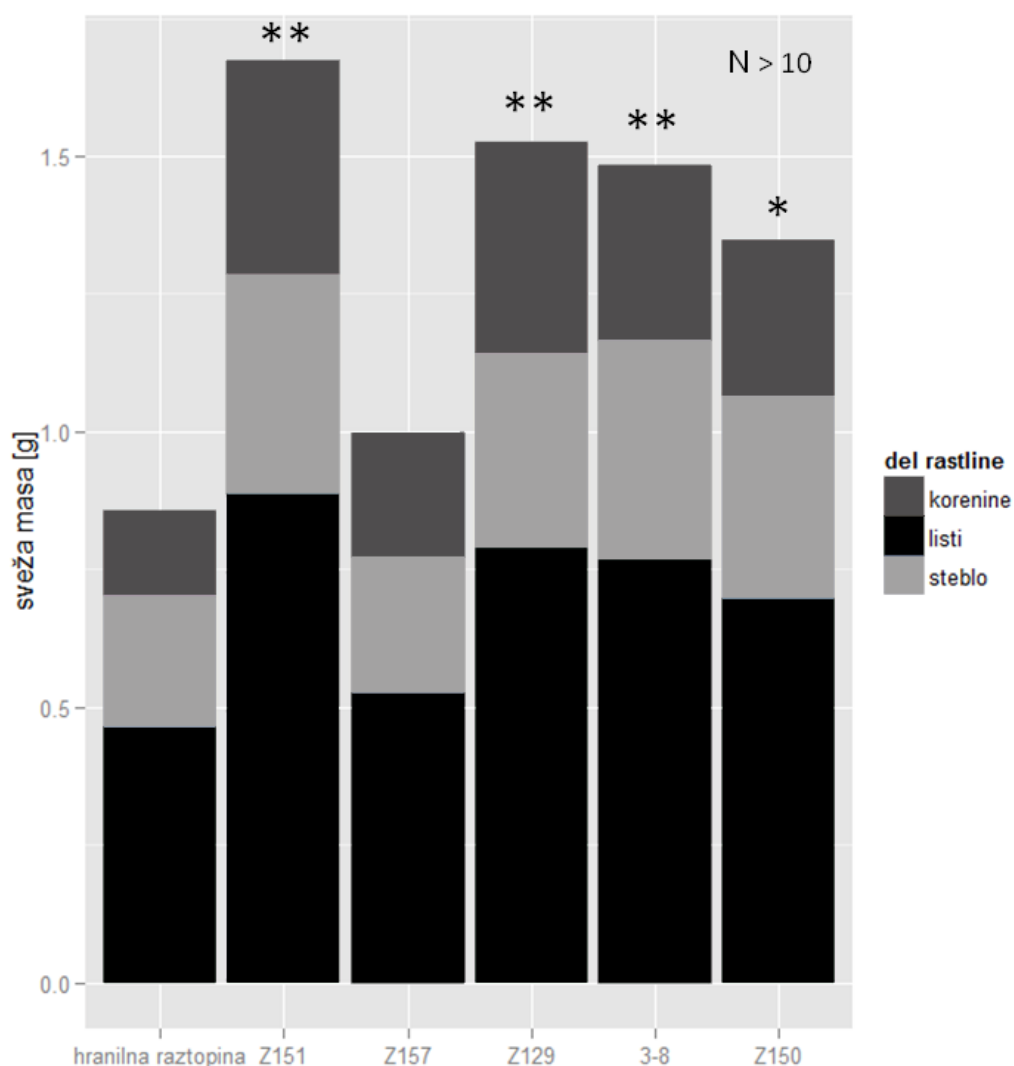
Preglednica 10: Podatki o skupnih svežih in suhih masah rastlin v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov – Poskus A

Table 10: Data on overall fresh and dry mass of plants in experiment of comparison of PGPR effect of different bacterial isolates - experiment A

Bakterijski izolat	Število testiranih rastlin	Deli rastline	Skupna sveža masa vseh rastlin (g)	Skupna suha masa vseh rastlin (g)	Povprečna skupna sveža masa na rastlino (g)	Povprečna skupna suha masa na rastlino (g)
NIB Z151 /2-10	17	listi	15,080	2,170	0,887	0,128
		steblo	6,783	0,561	0,399	0,033
		korenine	6,556	1,465	0,386	0,086
NIB Z157 / 1-2	20	listi	10,505	1,585	0,525	0,079
		steblo	4,926	0,410	0,246	0,021
		korenine	4,509	1,284	0,225	0,064
NIB Z129 / 2-8	18	listi	14,165	2,144	0,787	0,119
		steblo	6,356	0,489	0,353	0,027
		korenine	6,924	1,839	0,385	0,102
3-8	19	listi	14,538	2,049	0,765	0,108
		steblo	7,624	0,580	0,401	0,031
		korenine	6,008	1,203	0,316	0,063
NIB Z150 /2-9	19	listi	13,197	1,637	0,695	0,086
		steblo	6,988	0,466	0,368	0,025
		korenine	5,358	1,671	0,282	0,088
hranilna raztopina	22	listi	10,145	1,413	0,461	0,064
		steblo	5,294	0,437	0,241	0,020
		korenine	3,371	0,914	0,153	0,042

Vrednosti za svežo in suho maso glede na del rastline predstavljajo povprečje vseh meritev (Preglednica 10). Zato smo analizo variance naredili z združenimi podatki za vsak del rastline. V grobem je sveža masa listov predstavljala 50% celokupne sveže mase, sveža masa stebel in korenin pa po 25% celokupne sveže mase. Suha masa listov predstavlja 50% celokupne suhe mase, suha masa stebel in korenin pa po 15% in 35% celokupne suhe mase.

Povprečna skupna sveža masa je bila statistično značilno različna (p -vrednost $< 0,01$) od kontrole (hranilna raztopina) pri rastlinah, ki smo jih tretirali s tremi (NIB Z151, NIB Z129 in 3-8) od petih preizkušanih izolatov (Slika 2) in statistično različna (p -vrednost $< 0,05$) pri rastlinah, ki smo jih testirali z izolatom NIB Z150 (Slika 2).



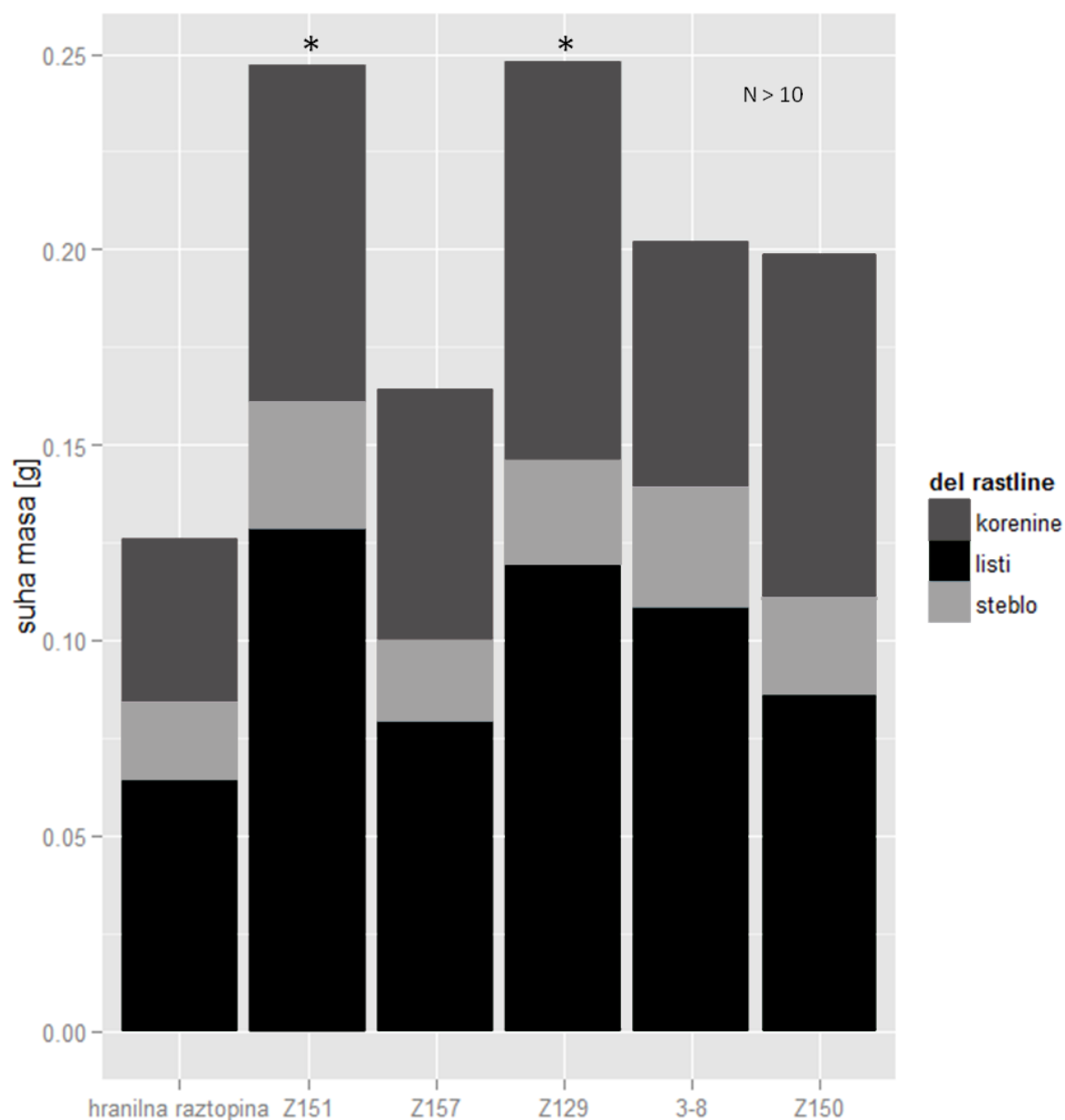
Slika 2: Povprečje skupne sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 5 različnimi bakterijskimi izolati v hranilni raztopini v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov - poskus A (**-statistično značilno različna povprečna sveža masa glede na kontrolo (hranilna raztopina), $p < 0,01$; *-statistično značilno različna povprečna sveža masa glede na kontrolo (hranilna raztopina), $p < 0,05$)

Figure 2: Average of total fresh mass of tomato plants treated with 5 different bacterial isolates in nutrient solution in experiment of comparison of PGPR effect of different bacterial isolates - experiment A. (**-statistically significant difference in average fresh mass according to control (nutrient solution), $p < 0,01$; *-statistically significant difference in average fresh mass according to control (nutrient solution), $p < 0,05$)

Izbira bakterijskega izolata torej značilno vpliva na rast rastlin, kar se vidi pri povprečni skupni sveži masi po petih tednih (Slika 2). Le zalivanje z izolatom NIB Z157 ni različno od kontrole (hranilna raztopina) glede na povprečno skupno svežo maso rastlin (Slika 2), pri vseh ostalih pa je povprečna skupna sveža masa rastlin zaradi zalivanja s PGPR izolati večja (Slika 2).

Glede na Tukey test se povprečna skupna sveža masa listov statistično značilno razlikuje od povprečne skupne sveže mase korenin (p -vrednost je $<0,01$), prav tako se povprečna skupna sveža masa stebel statistično značilno razlikujejo od povprečne skupne sveže mase listov (p -vrednost je $<0,01$). Ni pa statistično značilnih razlik v povprečni skupni sveži masi med stebлом in koreninami.

Pri povprečni skupni suhi masi rastlin se le rastline tretirane z bakterijskim izolatom NIB Z129 in NIB Z151 značilno razlikujejo od kontrole (hranilna raztopina), vendar ta razlika ni izrazita ($p=0,02$, Slika 3).



Slika 3: Povprečje skupne suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 5 različnimi bakterijskimi izolati v hranilni raztopini v poskusu primerjave PGPR učinka različnih bakterijskih izolatov – poskus A (*-statistično značilno različna povprečna suha masa glede na kontrolo (hranilna raztopina), $p < 0,05$)

Figure 3: Average of total dry mass of tomato plants treated with 5 different bacterial isolates in nutrient solution in experiment of comparison of PGPR effect of different bacterial isolates - experiment A (*-statistically significant difference in average dry mass according to control (nutrient solution), $p < 0,05$)

Glede na Tukey test se povprečna skupna suha masa stebel statistično značilno razlikujejo od povprečne skupne suhe mase listov (p-vrednost je $<0,01$), prav tako se povprečna skupna suha masa stebel značilno razlikuje od povprečne skupne suhe mase korenin (p-vrednost je $<0,01$). Povprečna skupna suha masa listov pa se ravno tako statistično značilno razlikujejo od povprečne skupne suhe mase korenin, vendar manj izrazito (p-vrednost $<0,05$).

Izolat NIB Z129 smo identificirali s profilom maščobnih kislin in nekaterimi biokemijskimi testi kot *Pseudomonas fluorescens*, z BIOLOG kot *Pseudomonas corrugata* (Preglednica 15). V diplomski nalogi (Kubik, 2002) je bil izolat identificiran kot *Pseudomonas corrugata*. Izolat NIB Z151 s profilom maščobnih kislin nismo identificirali, z metodo BIOLOG kot *Pseudomonas chlororaphis*, s sekvenciranjem 16S rRNA kot *Pseudomonas* sp. ali *Pseudomonas aureofaciens* (Preglednica 15). V diplomski nalogi (Kubik, 2002) je bil izolat identificiran kot *Pseudomonas aureofaciens*, s profilom maščobnih kislin tudi takrat ni bil identificiran.

Izolat NIB Z157 smo s profilom maščobnih kislin identificirali kot *Pseudomonas* sp. (verjetno *Pseudomonas chlororaphis*). Metoda BIOLOG nam ni dala zanesljive identifikacije za *Pseudomonas* sp. V diplomski nalogi (Kubik, 2002) je bil izolat identificiran kot *Pseudomonas fluorescens*, oziroma s profilom maščobnih kislin kot *Pseudomonas chlororaphis* (Preglednica 15).

4.2.2 Ugotavljanje PGPR učinka v pogojih z in brez hranil - Poskus B

V tem poskusu so bile rastline paradižnika tretirane z izolatom NIB Z143. Izolat NIB Z143 inhibira rast vseh treh patogenih bakterij (Preglednica 9) in spada med *Pseudomonas* sp. (Preglednica 15). Rastline smo gojili v pogojih z ali brez hranil (Slika 4).

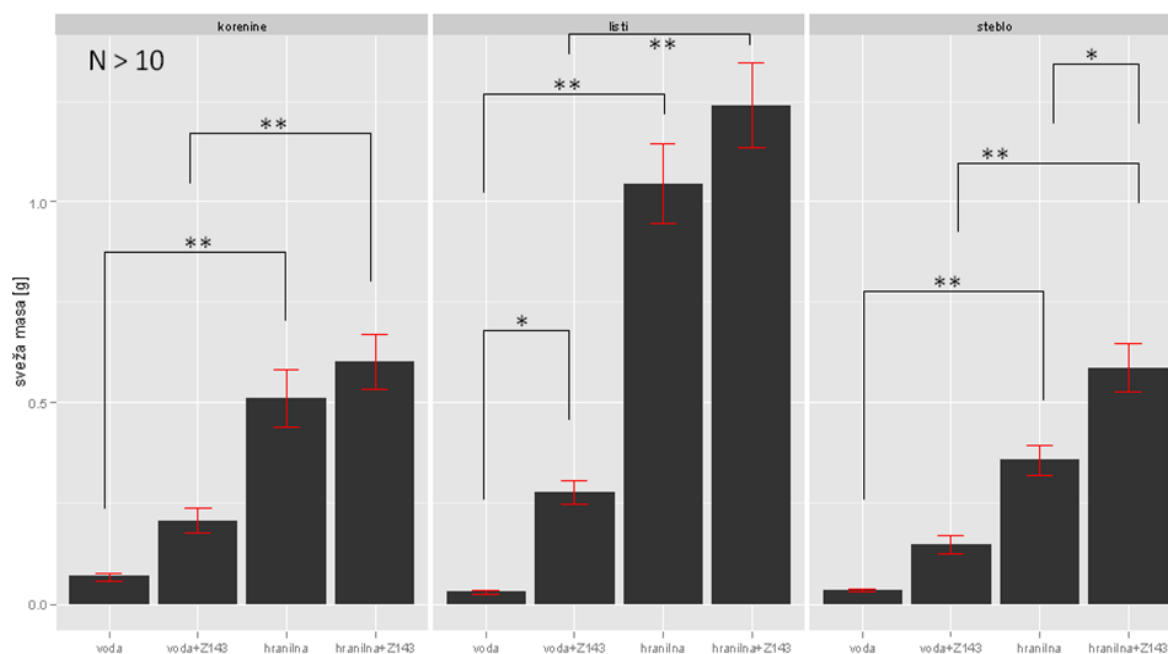


Slika 4: Rastline v poskusu ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil - poskus B po 5 tednih gojenja. Od leve proti desni: 1. NIB Z143 v hranilni raztopini, 2. NIB Z143 v vodi, 3. negativna kontrola-voda, 4. negativna kontrola-hranilna raztopina

Figure 4: Plants from experiment of determination of PGPR effect with and without nutrients – experiment B after 5 weeks cultivation. From left to right: 1. NIB 143 in nutrient solution, 2. NIB 143 in water, 3. negative control, water, 4. negative control, nutrient solution

V poskusu nas je zanimalo, kako se bodo rastline obnašale v pogojih brez hranil. Podatki o svežih in suhih masah so zbrani v Prilogah A, B, C in D. Izolat NIB Z143 je *Pseudomonas* sp, glede na analizo profila maščobnih kislin verjetno *Pseudomonas putida* (Preglednica 15).

Pri sveži masi korenin, listov in stebel (Slika 5) opazimo statistično značilne razlike med rastlinami tretiranimi s hranilno raztopino in rastlinami tretiranimi samo z vodo ($p < 0,01$).



Slika 5: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini in v vodi v poskusu ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil – poskus B (**-statistično značilno različna sveža masa, $p < 0,01$; *- statistično značilno različna sveža masa, $p < 0,05$)

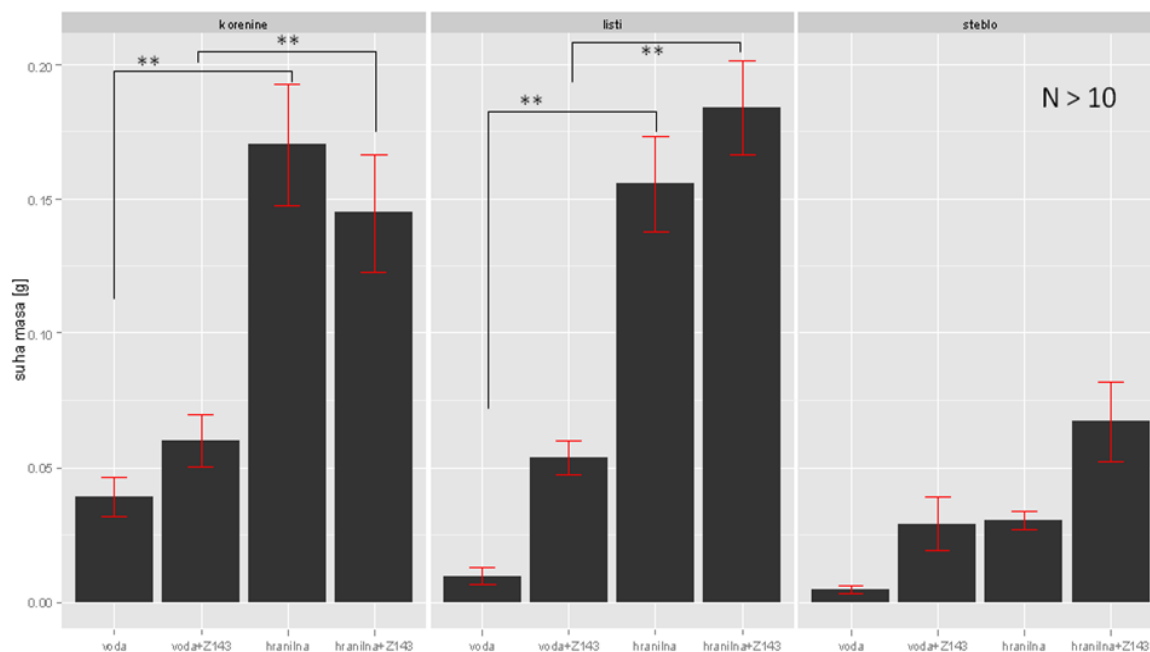
Figure 5: Average and standard error of fresh mass of tomato plants treated with the bacterial isolate NIB 143 in nutrient solution and in the water in experiment of determination of PGPR effect with and without nutrients – experiment B (**- statistically significant difference in fresh mass, $p < 0,01$, (*- statistically significant difference in fresh mass, $p < 0,05$)

Iz Slike 5 je razvidno, da se le sveža masa listov rastlin tretiranih z vodo in dodatkom bakterijskega izolata statistično značilno razlikuje od sveže mase listov rastlin tretiranih samo z vodo ($p < 0,05$).

Pri sveži masi korenin, listov in stebel tretiranih s hranilno raztopino in dodatkom bakterijskega izolata opazimo statistično značilne razlike od rastlin tretiranih z vodo in dodatkom bakterijskega izolata ($p < 0,01$) (Slika 5).

Samo pri sveži masi stebel rastlin tretiranih s hranilno raztopino z dodatkom bakterijskega izolata opazimo statistično značilno različno svežo maso glede na stebela rastlin tretiranih samo s hranilno raztopino ($p < 0,05$) (Slika 5).

Pri suhi masi korenin in listov (Slika 6) opazimo statistično značilne razlike med rastlinami tretiranimi s hranilno raztopino in rastlinami tretirani samo z vodo ($p < 0,01$).



Slika 6: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini in v vodi v poskusu ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil – poskus B (**-statistično značilno različna suha masa, $p < 0,01$)

Figure 6: Average and standard error of dry mass of tomato plants treated with the bacterial isolate NIB 143 in nutrient solution and in water in experiment of determination of PGPR effect with and without nutrients – experiment B (**-statistically significant difference in dry mass, $p < 0,01$)

Pri suhi masi stebel (Slika 6) ni statistično značilnih razlik med rastlinami tretiranimi s hranilno raztopino in rastlinami tretiranimi z vodo.

Pri suhi masi rastlin tretiranih s hranilno raztopino in dodatkom bakterijskega izolata opazimo statistično značilne razlike od rastlin tretiranih z vodo in dodatkom bakterijskega izolata ($p < 0,01$), vendar le pri koreninah in listih (Slika 6).

Opazili smo morfološke spremembe pri koreninah rastlin tretiranih z izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini in v vodi (Slika 7).



Slika 7: Predstavniki rastlin vsake skupine tretiranih rastlin poskusa ugotavljanja PGPR učinka v pogojih z in brez hranil – poskus B. Od leve proti desni: 1. NIB Z143 v hranilni raztopini, 2. NIB Z143 v vodi, 3. negativna kontrola-voda, 4. negativna kontrola-hranilna raztopina

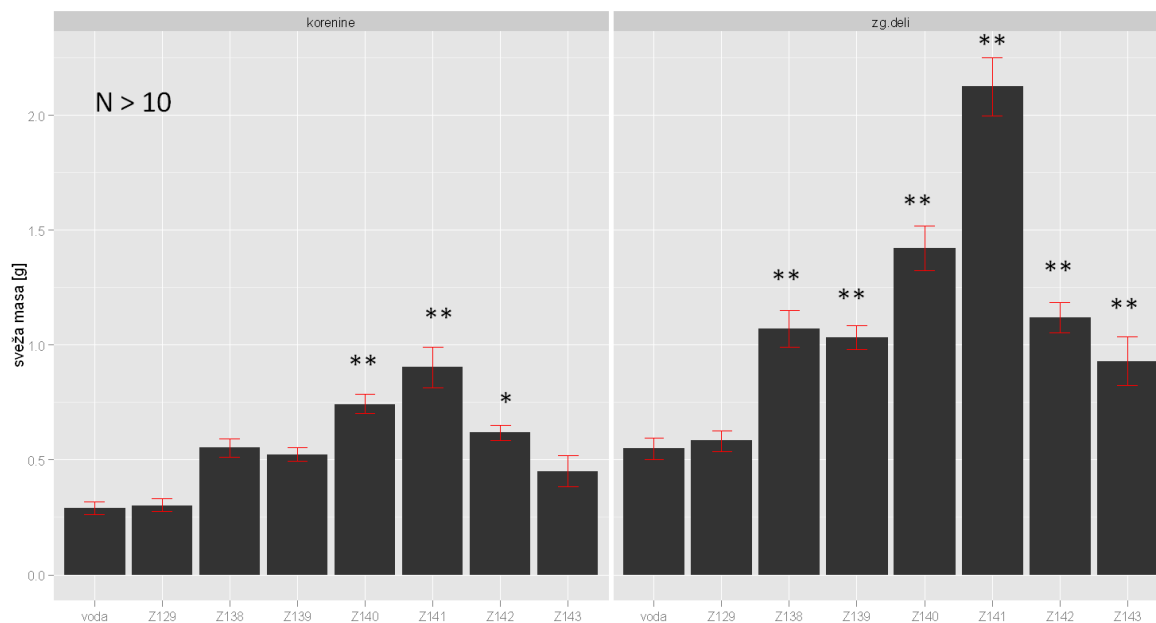
Figure 7: Representatives of the plants from each group of treated plants in experiment of determination of PGPR effect with and without nutrients – experiment B. From left to right: 1. NIB 143 in nutrient solution, 2. NIB 143 in water, 3. negative control, water, 4. negative control, nutrient solution

4.2.3 Presejalni test za PGPR učinek - Poskus C

4.2.3.1 Podposkus C.1

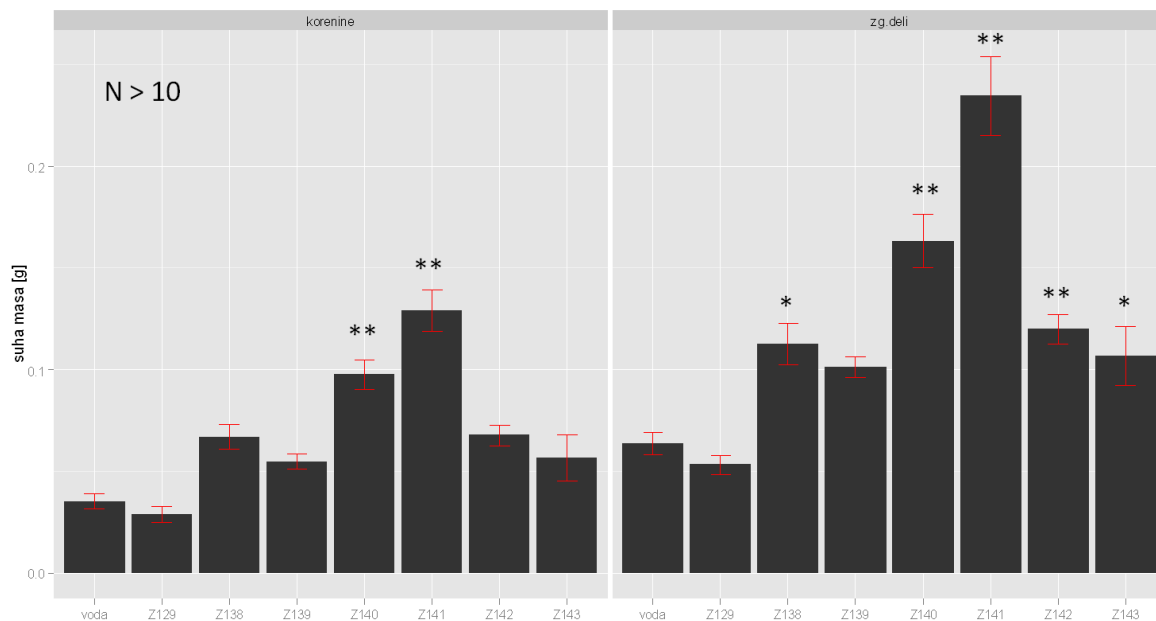
V tem podposkusu so bile rastline paradižnika tretirane z izolati NIB Z129, NIB Z138, NIB Z139, NIB Z140, NIB Z141, NIB Z142 in NIB Z143. Rastline smo tretirali v pogojih z dodanim izolatom v sterilno pitno vodo. Podatki o svežih in suhih masah so zbrani v Prilogi E. Pri kontroli uspešnosti kolonizacije semen s testiranim bakterijskim izolatom nismo opazili rasti pri izolatih NIB Z139 in NIB Z142 kakor tudi pri negativni kontroli. To sta izolata, ki jih z metodo BIOLOG in profilom maščobnih kislin nismo uspeli identificirati (Preglednica 11, Preglednica 15). V diplomski nalogi (Kubik, 2002) sta bila izolata identificirana kot *Pseudomonas aureofaciens* (Preglednica 11, Preglednica 15).

Najbolj opazna statistično značilna razlika v sveži in suhi masi korenin in zgornjih delov rastlin je bila pri skupini rastlin tretiranih z izolatom NIB Z141 (identificiran kot *Stenotrophomonas maltophilia*, glej Preglednica 11, Preglednica 15) in pri skupini rastlin tretiranih z izolatom NIB Z140 glede na kontrolo (rastline zalivane samo z vodo) (Sliki 8 in 9).



Slika 8: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1 (**-statistično značilno različna sveža masa glede na kontrolo (voda), $p < 0,01$; *-statistično značilno različna sveža masa glede na kontrolo (voda), $p < 0,05$)

Figure 8: Average and standard error of fresh mass of tomato plants treated with 7 different isolates of bacteria in the water in screening for PGPR effect – experiment C.1 (**-statistically significant difference in fresh mass according to control (water), $p < 0,01$; *- statistically significant difference in fresh mass according to control (water), $p < 0,05$)



Slika 9: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1 (**-statistično značilno različna suha masa glede na kontrolo (voda), $p < 0,01$; *- statistično značilno različna suha masa glede na kontrolo (voda), $p < 0,05$)

Slika 9: Average and standard error of dry mass of tomato plants treated with 7 different isolates of bacteria in the water in screening for PGPR effect - experiment C.1 (**-statistically significant difference in dry mass according to control (water), $p < 0,01$; *- statistically significant difference in dry mass according to control (water), $p < 0,05$)

Skupina rastlin tretiranih z izolatom NIBZ141 in kontrola (skupina rastlin tretiranih samo z vodo) so prikazane na Sliki 10.



Slika 10: tretirane rastline v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1: levo tretirane z vodo, desno tretirane z izolatom NIB Z141

Figure 10: treated plants from screening for PGPR effect - experiment C.1: left-treated with water, right-treated with the strain NIB 141

Predstavnica skupine rastlin tretiranih z izolatom NIBZ141 in kontrola (predstavnica skupine rastlin tretiranih samo z vodo) so prikazane na Sliki 11.



Slika 11: predstavnice rastlin presejalnega testa za PGPR učinek - podposkus C.1: levo rastlina tretirana z vodo, desno tretirana s bakterijskim izolatom NIB Z141

Figure 11: Representative plants from screening for PGPR effect - experiment C.1: left-plant treated water, right-treated with bacterial strain NIB 141

Pri rastlinah tretiranih z izolatoma NIB Z138, NIB Z142 smo tudi opazili statistično značilno povečano suho in svežo maso zg. delov rastlin (Sliki 8 in 9). Rastline tretirane z izolatoma NIB Z138 niso imele statistično značilne povečane sveže in suhe mase korenin, medtem ko smo pri rastlinah tretiranih z izolatoma NIB Z142 opazili le statistično značilno povečano svežo maso korenin, ne pa tudi suhe mase korenin.

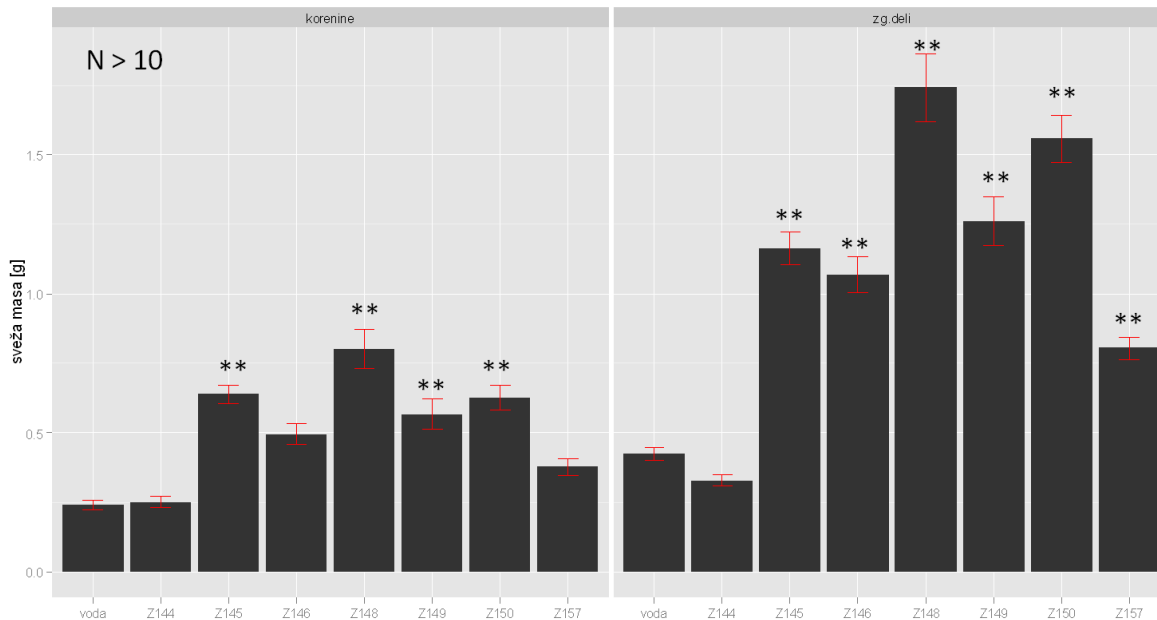
Rastline tretirane z izolatoma NIB Z139 so imele samo statistično značilno povečano svežo maso zg. delov rastlin (Slika 8).

Rastline tretirane z izolatoma NIB Z143 so imele le statistično značilno povečano svežo in suho maso zg. delov rastlin ne pa tudi korenin (Sliki 8 in 9).

Le pri rastlinah tretiranih z izolatoma NIB Z129 do statistično značilnega povečanja sveže in suhe mase korenin in zg. delov rastlin ni prišlo (Sliki 8 in 9).

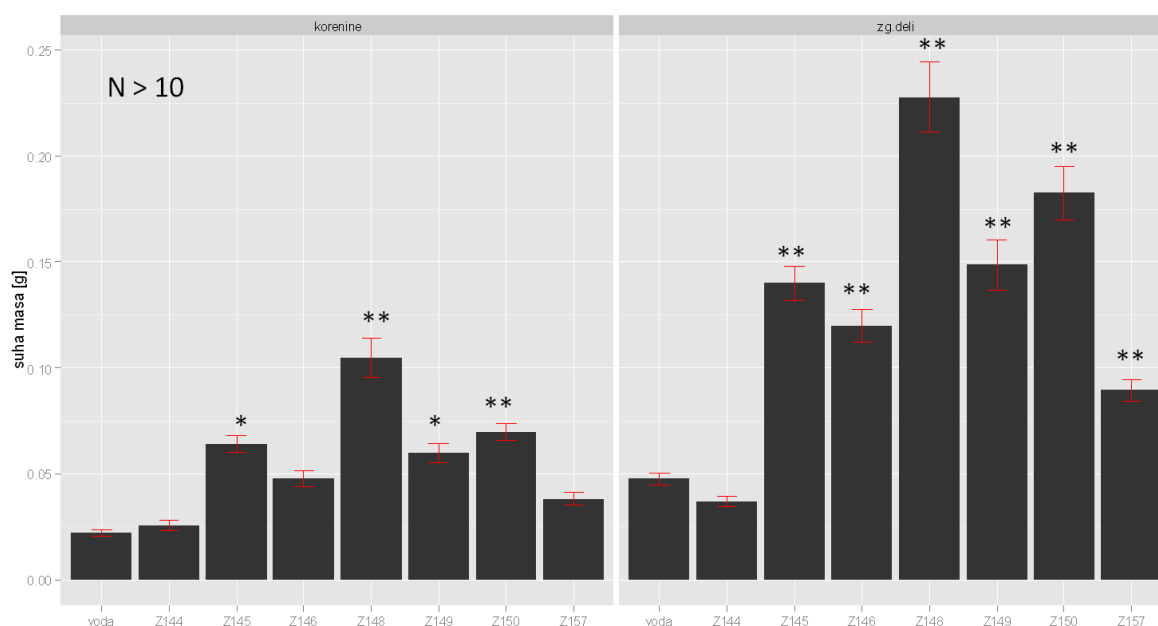
4.2.3.2 Podposkus C.2

V tem podposkusu so bile rastline paradižnika tretirane z izolati NIB Z144, NIB Z145, NIB Z146, NIB Z148, NIB Z149, NIB Z150 in NIB Z157. Rastline smo tretirali v pogojih z dodanim izolatom v sterilno pitno vodo. Podatki o svežih in suhih masah so zbrani v Prilogi F. Pri kontroli uspešnosti kolonizacije semen s testiranim bakterijskim izolatom nismo opazili rasti pri izolatih NIB Z 144, NIB Z148, NIB Z149, NIB Z150 kakor tudi pri negativni kontroli. Izolat NIB Z144 z metodo BIOLOG in profilom maščobnih kislin nismo identificirali (Preglednica 11, Preglednica 15). V diplomski nalogi (Kubik, 2002) je bil izolat identificiran kot *Pseudomonas aureofaciens*. Izolati NIB Z148, NIB Z149 in NIB Z 150 so bili identificirani s profilom maščobnih kislin kot *Pseudomonas putida* (Preglednica 11, Preglednica 15). Najbolj opazna statistično značilno razlika v sveži in suhi masi korenin in zgornjih delov rastlin je bila pri skupini rastlin tretiranih z izolatoma NIB Z148 in NIB Z150 glede na kontrolo (rastline zalivane samo z vodo) (Sliki 12 in 13).



Slika 12: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2 (**-statistično značilno različna sveža masa glede na vodo, $p < 0,01$)

Figure 12: Average and standard error of fresh mass of tomato plants treated with 7 different isolates of bacteria in the water in screening for PGPR effect - experiment C.2 (**-statistically significant difference in fresh mass according to water, $p < 0,01$)



Slika 13: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2 (**-statistično značilno različna suha masa glede na vodo, $p < 0,01$; *- statistično značilno različna suha masa glede na vodo, $p < 0,05$)

Slika 13: Average and standard error of dry mass of tomato plants treated with 7 different isolates of bacteria in the water in screening for PGPR effect - experiment C.2 (**-statistically significant difference in dry mass according to water, $p < 0,01$; *- statistically significant difference in dry mass according to water, $p < 0,05$)

Izolata NIB Z148 in NIB Z150 smo identificirali s profilom maščobni kislin kot *Pseudomonas putida* (Preglednica 11, Preglednica 15).

Skupina rastlin tretiranih z izolatom NIBZ148 in kontrola (skupina rastlin tretiranih samo z vodo) so prikazane na Sliki 14.



Slika 14: tretirane rastline v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2: levo tretirane z izolatom NIB Z148, desno tretirane z vodo

Figure 14: treated plants from screening for PGPR effect - experiment C.2: left-treated with isolate 148 NIB, right-treated with water

Predstavnica skupine rastlin tretiranih z izolatom NIBZ148 in kontrola (predstavnica skupine rastlin tretiranih samo z vodo) so prikazane na Sliki 15.



Slika 15: predstavnice rastlin presejalnega testa za PGPR učinek - podposkus C.2: levo rastlina tretirana z vodo, desno tretirana s bakterijskim izolatom NIB Z148

Figure 15: Representative plants from screening for PGPR effect - experiment C.2: left-plant treated water, right-treated with bacterial isolate NIB 148

Pri rastlinah tretiranih z izolatoma NIB Z145 in NIB Z 149 smo tudi opazili statistično značilno povečano suho in svežo maso korenin in zg. delov rastlin (Sliki 12 in 13).

Pri rastlinah tretiranih z izolatoma NIB Z146 in NIB Z157 je prišlo do statistično značilnega povečanja sveže in suhe mase zg. delov rastlin, ne pa tudi do statistično značilnega povečanja sveže in suhe mase korenin (Sliki 12 in 13).

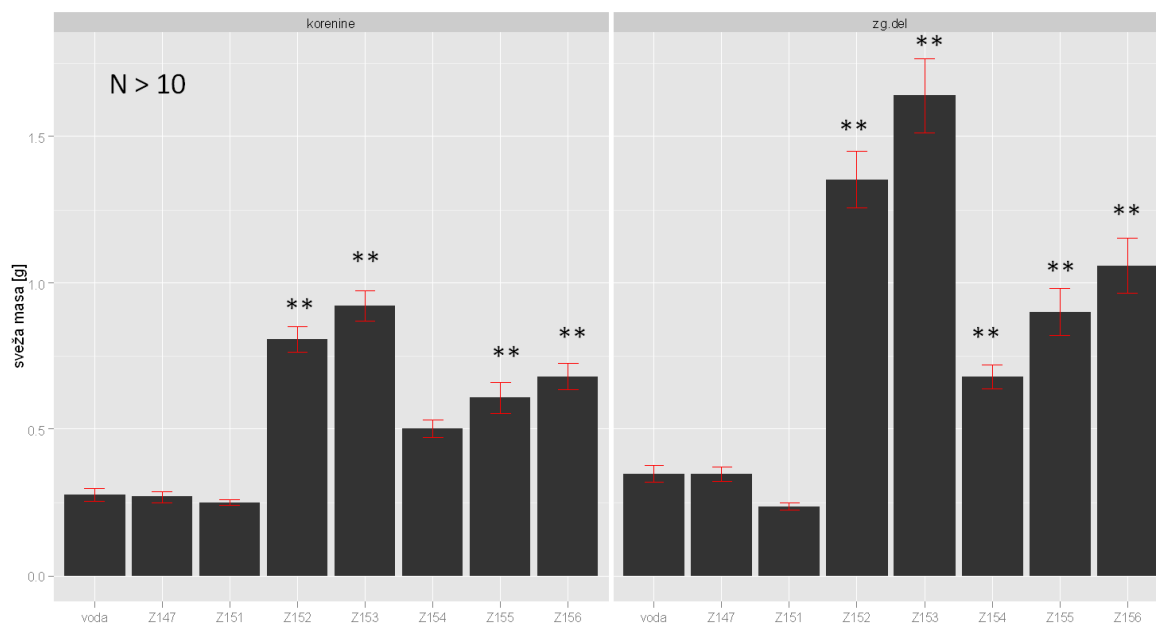
Le pri rastlinah tretiranih z izolatom NIB Z144 do statistično značilnega povečanja sveže in suhe mase korenin in zg. delov rastlin ni prišlo (Sliki 12 in 13).

Potrdili smo tudi uspešno kolonizacijo korenin s testiranimi bakterijskimi izolati.

4.2.3.3 Podposkus C.3

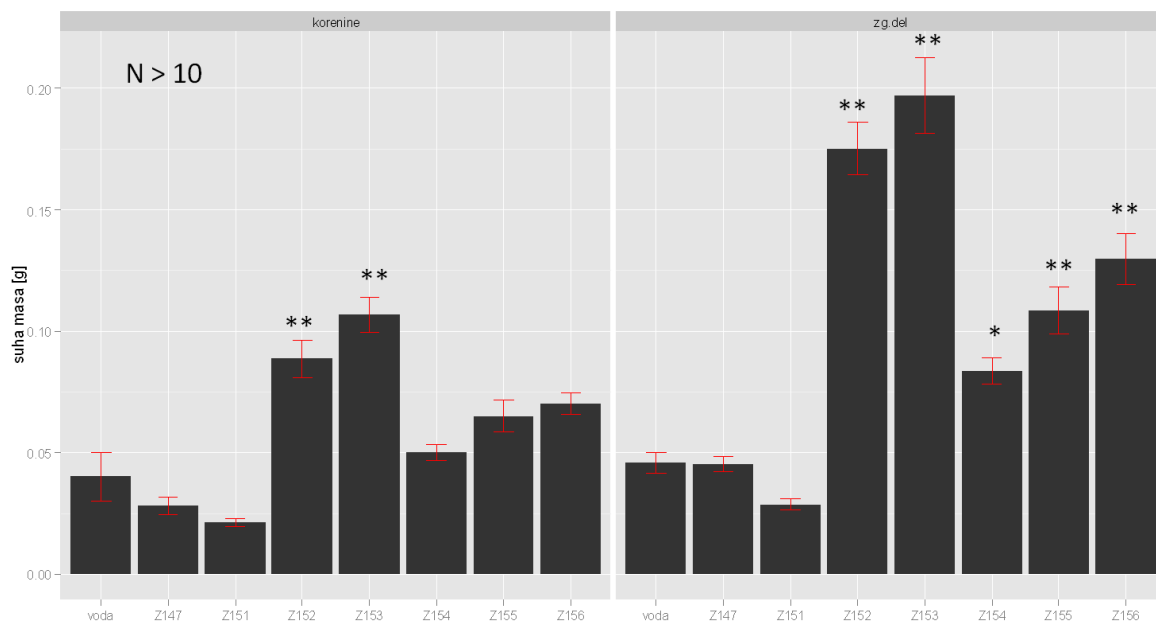
V tem podposkusu so bile rastline paradižnika tretirane z izolati NIB Z151, NIB Z152, NIB Z153, NIB Z154, NIB Z155, NIB Z156 in NIB Z147. Rastline smo tretirali v pogojih z dodanim izolatom v sterilno pitno vodo. Podatki o svežih in suhih masah so zbrani v Prilogi G. Pri kontroli uspešnosti kolonizacije semen s testiranim bakterijskim izolatom nismo opazili rasti pri izolatih NIB Z147, NIB Z 151, NIB Z153, NIB Z155, kakor tudi pri negativni kontroli. Izolat NIB Z147 smo identificirali kot *Pseudomonas chlororaphis*, v diplomski nalogi (Kubik, 2002) pa kot *Pseudomonas aureofaciens* (Preglednica 11, Preglednica 15). Izolat NIB Z151 s profilom maščobnih kislin ni bil identificiran, z BIOLOG kot *Pseudomonas chlororaphis*, s sekvencami 16S rRNA kot *Pseudomonas* sp. oziroma *Pseudomonas aureofaciens* (tudi v diplomski nalogi Kubik, 2002). Izolat NIB Z153 je bil identificiran kot *Pseudomona putida*. Izolat Z155 pa kot *Pseudomonas* sp., v diplomski nalogi (Kubik, 2002) kot *Pseudomonas putida* (Preglednica 11, Preglednica 15).

Najbolj opazna statistično značilna razlika v sveži in suhi masi korenin in zgornjih delov rastlin je bila pri skupini rastlin tretiranih z izolatoma NIB Z152 in NIB Z153 glede na kontrolo (rastline zalivane samo z vodo) (Sliki 16 in 17).



Slika 16: Povprečje in standardna napaka sveže mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3 (**-statistično značilno različna sveža masa glede na vodo, $p < 0,01$)

Figure 16: Average and standard error of fresh mass of tomato plants treated with 7 different isolates of bacteria in the water in screening for PGPR effect - experiment C.3 (**-statistically significant difference in fresh mass according to water, $p < 0,01$)



Slika 17: Povprečje in standardna napaka suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v vodi v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3 (**-statistično značilno različna suha masa glede na vodo, $p < 0,01$; *- statistično značilno različna suha masa glede na vodo, $p < 0,05$)

Figure 17: Average and standard error of dry mass of tomato plants treated with 7 different isolates of bacteria in the water in screening for PGPR effect - experiment C.3 (**-statistically significant difference in dry mass according to water, $p < 0,01$; *- statistically significant difference in dry mass according to water, $p < 0,05$)

Izolat NIB Z152 je identificiran kot *Stenotrophomonas maltophilia* (Preglednica 11, Preglednica 15). Izolat NIB Z153 je bil identificiran kot *Pseudomonas putida*.

Skupina rastlin tretiranih z izolatom NIBZ153 in kontrola (skupina rastlin tretiranih samo z vodo) so prikazane na Sliki 18.



Slika 18: tretirane rastline v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3: levo tretirane z izolatom NIB Z153, desno tretirane z vodo

Figure 18: treated plants from screening for PGPR effect - experiment C.3: left-treated with isolate 153 NIB, right-treated with water

Predstavnica skupine rastlin tretiranih z izolatom NIBZ153 in kontrola (predstavnica skupine rastlin tretiranih samo z vodo) so prikazane na Sliki 19.



Slika 19: predstavnice rastlin presejalnega testa za PGPR učinek - podposkus C.3: levo rastlina tretirana z vodo, desno tretirana s bakterijskim izolatom NIB Z153

Slika 19: Representative plants from screening for PGPR effect - experiment C.3: left-plant treated water, right-treated with bacterial isolate NIB 153

Pri rastlinah tretiranih z izolatoma NIB Z155 in NIB Z156 smo tudi opazili statistično značilno povečano svežo in suho maso zg. delov rastlin in samo statistično značilno povečano svežo maso korenin (Sliki 16 in 17).

Pri rastlinah tretiranih z izolatom NIB Z154 je prišlo le do statistično značilne povečane suhe in sveže mase zg. delov rastlin, ne pa tudi korenin (Sliki 16 in 17).

Le pri izolatih NIB Z151 in NIB Z147 do statistično značilnega povečanja sveže in suhe mase korenin in zg. delov rastlin ni prišlo (Sliki 16 in 17).

Potrdili smo tudi uspešno kolonizacijo korenin s testiranimi bakterijskimi izolati.

Skupni rezultati presejalnega testa za PGPR učinek - poskus C skupaj z identifikacijo bakterijskih izolatov so podani v Preglednici 11.

Preglednica 11: učinek na rast rastlin glede na svežo in suho maso korenin in zg. delov rastlin v presejalnem testu za PGPR učinek - poskus C skupaj z identifikacijo bakterijskih izolatov

Table 11: effect on plant growth on the fresh and dry mass of roots and upper parts of plants in the screening test for PGPR effect - experiment C together with the identification of bacterial isolates

Oznaka NIB zbirka	Učinek na rast rastlin v rastlinskem poskusu C		Identifikacija			
	sveža masa korenin / zg. delov rastlin	suha masa korenin / zg. delov rastlin	Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov	BIOLOG	sekvenciranje 16S rRNA	diplomska naloga (Kubik, 2002)
NIB Z 129	-/-	-/-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	/	<i>Pseudomonas</i> sp. (FAP: <i>Pseudomonas corrugata</i>)
NIB Z 138	-/++	-/+	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NIB Z 139	-/++	-/-	Ni identifikacije	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 140	+/+++	+/+++	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Ni identifikacije	/	podoben <i>Brevundimonas diminuta</i>
NIB Z 141	+++ / +++	+++ / +++	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 142	+/++	-/++	Ni identifikacije	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
NIB Z 143	-/++	-/+	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ali <i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar V ali <i>Pseudomonas putida</i> (FAP: <i>Pseudomonas putida</i>)
NIB Z 144	-/-	-/-	Ni identifikacije	verjetno <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 145	+/++	+/++	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 146	-/++	-/++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 147	-/-	-/-	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> / <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 148	+++ / +++	+++ / +++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	Ni identifikacije
NIB Z 149	+/++	+/++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 150	+/+++	+/+++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Simboli: - ni povečano glede na kontrolo, + rahlo povečanje glede na kontrolo, ++ povečanje glede na kontrolo, +++ močno povečanje glede na kontrolo

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 11: učinek na rast rastlin glede na svežo in suho maso korenin in zg. delov rastlin v presejalnem testu za PGPR učinek - poskus C skupaj z identifikacijo bakterijskih izolatov

Oznaka NIB zbirka	Učinek na rast rastlin v rastlinskem poskusu C		Identifikacija			
	sveža masa korenin / zg. delov rastlin	suha masa korenin / zg. delov rastlin	Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov	BIOLOG	sekvenciranje 16S rRNA	diplomska naloga (Kubik, 2002)
NIB Z 151	-/-	-/-	Ni identifikacije	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: ni identifikacije)
NIB Z 152	++/+++	++/+++	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 153	+++ / +++	+++ / +++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	<i>Pseudomonas putida</i> / <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 154	-/++	-/+	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip F	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 155	++/++	-/++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije	Uncultured soil bacterium / <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 156	++/++	-/++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	Uncultured soil bacterium / <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)
NIB Z 157	-/++	-/++	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije, najbližje <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)

4.3 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV

4.3.1 Profil maščobnih kislin

S profilom maščobnih kislin smo analizirali 21 bakterijskih izolatov, ki bi lahko, glede na identifikacijo (Kubik, 2002), bili PGPR. Rezultati so zbrani v Preglednici 12.

Izolate NIB Z141, NIB Z145 in NIB Z 152 je sistem identificiral kot *Stenotrophomonas maltophilia* s podobnostnim indeksom 0,8 (razen v bazi PD (baza narejena v laboratoriju Plant Protection Service, Wageningen), kjer so izolati identificirani kot *Xanthomonas campestris* pv. *fragariae* z nizkim podobnostnim indeksom). Izolat NIB Z140 je identificiran kot *Chryseobacterium indologenes*. Vsi ostali 13 izolati so identificirani kot *Pseudomonas*. Pri vseh teh smo opazili razlike v identifikaciji med različnimi bazami podatkov (baza TSBA, baza PD in baza CLIN). Vse podatkovne baze izolate sicer identificirajo kot *Pseudomonas*, vendar različne vrste, zato smo naredili nekaj biokemijskih testov in identifikacijo zaključili na osnovi rezultatov le-teh. Štiri izolate (NIB Z139, NIB Z142, NIB Z144 in NIB Z151) z analizo profila maščobnih kislin nismo mogli identificirati, ker ni bilo ustrezne primerjave (glej Preglednica 12).

Preglednica 12: Rezultati analize profila maščobnih kislin analiziranih bakterijskih izolatov (identifikacija, podobnostni indeksi) po različnih bazah in končna identifikacija v laboratoriju PPS, Wageningen na podlagi profila maščobnih kislin in nekaterih biokemijskih testih

Table 12: The results of the fatty acids profile analyzed bacterial isolates (identification, similarity index) across different databases and final identification in the laboratory PPS, Wageningen on the basis of fatty acid profile and some biochemical tests

Bakterijski izolat (oznaka NIB zbirke)	Bakterijski izolat (oznaka BF zbirke/oznaka v diplomski nalogi Kubik, 2002)	Podatkovna baza TSBA		Podatkovna baza PD		Podatkovna baza CLIN		Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov
		Identifikacija	Podobnostni indeks	Identifikacija	Podobnostni indeks	Identifikacija	Podobnostni indeks	
NIB Z 129	L113/2-8	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>nerium</i>	0,8	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> OL48h	0,744	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,573	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxinus</i>	0,789	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> NE48h	0,517	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0,355	
NIB Z 138	L100/1-3	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,876	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,833	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,845	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,797	/	/	<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,66	
NIB Z 139	L101/1-4	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije
NIB Z 140	L97/1-0	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0,747	Ni identifikacije	/	<i>Chryseobacterium gleum</i> GC subgroup A	0,285	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
		<i>Chryseobacterium balustinum</i>	0,555	/	/	/	/	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 12: Rezultati analize profila maščobnih kislin analiziranih bakterijskih izolatov (identifikacija, podobnostni indeksi) po različnih bazah in končna identifikacija v laboratoriju PPS, Wageningen na podlagi profila maščobnih kislin in nekaterih biokemijskih testih

Bakterijski izolat (oznaka NIB zbirke)	Bakterijski izolat (oznaka BF zbirke/oznaka v diplomski nalogi Kubik, 2002)	Podatkovna baza TSBA		Podatkovna baza PD		Podatkovna baza CLIN		Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov
		Identifikacija	Podobnostni indeks	Identifikacija	Podobnostni indeks	Identifikacija	Podobnostni indeks	
NIB Z 141	L98/1-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,823	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>fragariae</i>	0,095	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,745	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		/	/	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,062	/	/	
NIB Z 142	L102/1-5	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije
NIB Z 143	L133/3-16	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,584	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,604	<i>P. putida</i> biotip A	0,488	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>
		<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>oleae</i>	0,478	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,581	/	/	
NIB Z 144	L117/2-12	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije
NIB Z 145	L103/1-6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,82	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>fragariae</i>	0,088	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,774	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		/	/	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,06	/	/	
NIB Z 146	L119/3-0	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,817	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,81	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,647	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,536	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,77	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0,479	
NIB Z 147	L118/2-13	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,592	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,12	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,282	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,306	/	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,191	
NIB Z 148	L116/2-11	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,864	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,923	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,648	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>
		/	/	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,391	
NIB Z 149	L130/3-13	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,621	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,738	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,798	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,592	/	/	<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,619	
NIB Z 150	L114/2-9	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,837	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,923	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,687	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>
		/	/	/	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,486	
NIB Z 151	L115/2-10	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije	/	Ni identifikacije
NIB Z 152	L104/1-7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,839	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>fragariae</i>	0,095	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,756	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		/	/	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,058	/	/	
NIB Z 153	L112/2-7	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,915	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,928	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,681	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>
		/	/	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,628	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,435	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 12: Rezultati analize profila maščobnih kislin analiziranih bakterijskih izolatov (identifikacija, podobnostni indeksi) po različnih bazah in končna identifikacija v laboratoriju PPS, Wageningen na podlagi profila maščobnih kislin in nekaterih biokemijskih testih

Bakterijski izolat (oznaka NIB zbirke)	Bakterijski izolat (oznaka BF zbirke/ oznaka v diplomski nalogi Kubik, 2002)	Podatkovna baza TSBA		Podatkovna baza PD		Podatkovna baza CLIN		Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov
		Identifikacija	Podobnostni indeks	Identifikacija	Podobnostni indeks	Identifikacija	Podobnostni indeks	
NIB Z 154	L128/3-10	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,711	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,841	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,562	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>
		<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>oleae</i>	0,459	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0,455	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,32	
NIB Z 155	L124/3-6	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,571	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,661	<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,821	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,517	<i>Collimonas</i> sp.	0,524	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,771	
NIB Z 156	L123/3-4	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,929	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,745	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,826	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,69	/	/	<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,712	
NIB Z 157	L99/1-2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,581	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,637	<i>Pseudomonas putida</i> biotip A	0,781	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
		<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,504	/	/	<i>Pseudomonas putida</i> biotip B	0,639	

Iz rezultatov je razvidno, da je za izbrane bakterije najbolj zanesljiva podatkovna baza TSBA, za določitev *Pseudomonas putida* pa smo vedno dobili enak zadetek tudi v podatkovni bazi CLIN, prav tako za *Stenotrophomonas maltophilia*, medtem ko je za določitev *Pseudomonas chlororaphis* najprimernejša podatkovna baza TSBA.

4.3.2 Analiza metabolnega profila, BIOLOG

Z analizo BIOLOG smo analizirali 21 izolatov, ki bi lahko, glede na identifikacijo (Kubik, 2002), bili PGPR in 6 referenčnih sevov (glej Preglednica 13).

Preglednica 13: Rezultati analize metabolnega profila BIOLOG po 24 urah

Table 13: The results of metabolic profile BIOLOG after 24 hours

NIB zbirka	Oznaka BF zbirke/oznaka v diplomski nalogi	BIOLOG rezultati identifikacija	Verjetnost (%)	Podobnostni indeks
NIB Z 129	L113/ 2-8	<i>Pseudomonas corrugata</i>	90	0,543
NIB Z 138	L100/1-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	100	0,691
NIB Z 139	L101/1-4	No ID	/	/
NIB Z 140	L97/1-0	No ID	/	/
NIB Z 141	L98/1-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	0,712
NIB Z 142	L102/1-5	No ID	/	/
NIB Z 143	L133/3-16	<i>Pseudomonas corrugata</i>	88	0,510
NIB Z 144	L117/2-12	verjetno <i>Pseudomonas</i> sp.	/	/
NIB Z 145	L103/1-6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	0,732
NIB Z 146	L119/3-0	<i>Pseudomonas corrugata</i>	87	0,700
NIB Z 147	L118/2-13	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	100	0,771
NIB Z 148	L116/2-11	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	98	0,522
NIB Z 149	L130/3-13	No ID	/	/
NIB Z 150	L114/2-9	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	100	0,624
NIB Z 151	L115/2-10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	100	0,710
NIB Z 152	L104/1-7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	0,800
NIB Z 153	L112/2-7	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	100	0,633
NIB Z 154	L128/3-10	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip F	100	0,713
NIB Z 155	L124/3-6	No ID	/	/
NIB Z 156	L123/3-4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	100	0,664
NIB Z 157	L99/1-2	No ID, najbližje <i>Pseudomonas</i> sp.	/	/
NIB Z 844	<i>P. putida</i> biovar A, ATCC 12633	<i>Pseudomonas putida</i>	100	0,879
NIB Z 845	<i>P. putida</i> biovar B, CFBP 11370 alias G176	No ID	/	/

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 13: Rezultati analize metabolnega profila BIOLOG po 24 urah

NIB zbirka	Oznaka BF zbirke/oznaka v diplomski nalogi	BIOLOG rezultati identifikacija	Verjetnost (%)	Podobnostni indeks
NIB Z 846	<i>P. aureofaciens</i> , ATCC 17415	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> biotip D	100	0,784
NIB Z 847	<i>P. corrugata</i> , CFBP 2431	<i>Pseudomonas corrugata</i>	100	0,709
NIB Z 848	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> , CFBP 2088	No ID	/	/
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	99	0,690
NIB Z 849	<i>P. chlororaphis</i> , ATCC 9446	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	96	0,622

Identifikacija ni bila mogoča pri naslednjih 6 izolatih: NIB Z139, NIB Z140, NIB Z142, NIB Z149, NIB Z155 in NIB Z845 (Preglednica 13). Izolati NIB Z141, NIB Z145 in NIB Z152 so identificirani kot *Stenotrophomonas maltophilia* tako kot z metodo profila maščobnih kislin (Preglednica 12). Vsi ostali izolati (13 izolatov) so identificirani kot *Pseudomonas* (preglednica 13). Izolati NIB Z129, NIB Z143 (edini enako identificiran s profilom maščobnih kislin po podatkovni bazi PD, Preglednica 12) in NIB Z146 so identificirani kot *Pseudomonas corrugata*. Tudi referenčni sev *Pseudomonas corrugata* NIB Z847 je identificiran kot *Pseudomonas corrugata*. Izolati NIB Z138, NIB Z 154 (edini enako identificiran s profilom maščobnih kislin po podatkovni bazi CLIN, Preglednica 12) in NIB Z156 so identificirani kot *Pseudomonas fluorescens*. Izolati NIB Z147 (enako identificiran s profilom maščobnih kislin po podatkovni bazi TSBA, Preglednica 12), NIB Z151 in referenčni sev *Pseudomonas chlororaphis* NIB Z849 so identificirani kot *Pseudomonas chlororaphis*. Vendar sta tudi referenčna seva *P. aureofaciens* NIB Z846 in *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NIB Z848 identificirana kot *Pseudomonas chlororaphis*. Izolati NIB Z148, NIB Z150, NIB Z 153 so identificirani kot *Pseudomonas putida* biovar A. Referenčni sev *Pseudomonas putida* biovar A NIB Z844 pa je identificiran le kot

Pseudomonas putida, medtem ko referenčni sev *Pseudomonas putida* biovar B NIB Z845 sploh ni identificiran. Izolata NIB Z144 in NIB Z157 sta po vsej verjetnosti *Pseudomonas* sp. (Preglednica 13). Verjetno bi bili rezultati malo drugačni, če bi uporabili avtomatični čitalec rezultatov.

4.3.3 Sekvenciranje 16S rRNA

Analizirali smo 21 izolatov, ki bi lahko, glede na identifikacijo (Kubik, 2002), bili PGPR in 6 referenčnih sevov. Pri sekvenciranju 16S rRNA je bilo 16 sekvenc od skupaj 27 primernih za poravnavo (Preglednica 14).

Velikost PCR produkta (1473bp) ne omogoča prekrivanja pri poravnavi sekvenc dobljenimi z branjem F in R oligonukleotida, ker so sekvence dolge okoli 600bp.

Glede na rezultate profila maščobnih kislin, BIOLOG in identifikacije na podlagi biokemijskih testov (Kubik, 2002) smo vedeli, da gre za bakterijske izolate iz rodu *Pseudomonas*. Sekveniranje 16S rRNA je potrdilo da vsi izolati sodijo v rod *Pseudomonas*. Na podlagi rezultatov sekvenciranja 16S rRNA referenčnih bakterij lahko sklepamo, da metoda ni najbolj primerna za določitev vrst iz rodu *Pseudomonas* saj ne razlikuje vedno med sevi iz različnih vrst iz rodu *Pseudomonas*.

Preglednica 14: Rezultati analiz pridobljeni s sekvenciranjem 16S rRNA

Table 14: Final results from 16S rRNA sequencing

Bakterijski izolat	Poravnava s sekvencami dobljenimi z branjem 27 feub	Poravnava s sekvencami dobljenimi z branjem 1495reub
Z143	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Z144	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
Z146	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Z147	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
Z151	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
Z153	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
Z154	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Z155	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Z156	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Z157	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Z844= <i>P. putida</i> A	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
Z845= <i>P. putida</i> B	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
Z846= <i>P. aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	/
Z847= <i>P. corrugata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Z848= <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. chlororaphis</i>
Z849= <i>P. chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>

4.3.4 Primerjava vseh identifikacijskih metod

Primerjava rezultatov vseh identifikacijskih metod je navedena v Preglednici 15.

Rezultati vseh metod (razen 16S rRNA sekvenciranja, ki ni bilo uspešno) so enaki za vse tri bakterijske izolate *Stenotrophomonas maltophilia* NIB Z 141, NIB Z 145 in NIB Z 152. Le en bakterijski izolat NIB Z 153 je določen enako z vsemi štirimi metodami kot *Pseudomonas putida*.

Preglednica 15: Primerjava rezultatov vseh identifikacijskih metod

Table 15: Comparison of results of all detection methods tested

Oznaka NIB zbirka	Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov	BIOLOG	sekvenciranje 16S rRNA	diplomska naloga (Kubik, 2002)
NIB Z 129	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	/	<i>Pseudomonas</i> sp. (FAP: <i>Pseudomonas corrugata</i>)
NIB Z 138	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NIB Z 139	Ni identifikacije	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 140	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Ni identifikacije	/	podoben <i>Brevundimonas diminuta</i>
NIB Z 141	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 142	Ni identifikacije	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
NIB Z 143	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ali <i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar V ali <i>Pseudomonas putida</i> (FAP: <i>Pseudomonas putida</i>)
NIB Z 144	Ni identifikacije	verjetno <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 145	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 146	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 147	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis/Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 148	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	Ni identifikacije
NIB Z 149	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 150	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NIB Z 151	Ni identifikacije	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: ni identifikacije)
NIB Z 152	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 153	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	<i>Pseudomonas putida/Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 15: Primerjava rezultatov vseh identifikacijskih metod

Oznaka NIB zbirka	Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov	BIOLOG	sekvenciranje 16S rRNA	diplomska naloga (Kubik, 2002)
NIB Z 154	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip F	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 155	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 156	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)
NIB Z 157	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije, najbližje <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)
NIB Z 844 (P. putida biovar A)	/	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas putida</i>	/
NIB Z 845 (P. putida biovar B)	/	Ni identifikacije	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas putida</i>	/
NIB Z 846 (P. aureofaciens)	/	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> biotip D	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	/
NIB Z 847 (P. corrugata)	/	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	/
NIB Z 848 (P. savastanoi pv. savastanoi)	/	Ni identifikacije / <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	/
NIB Z 849 (P. chlororaphis)	/	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> / <i>Pseudomonas corrugata</i>	/

Rezultati učinka na rast rastlin, inhibicije patogenih bakterij *in vitro* in identifikacije za vse testirane bakterijske izolate so podani v Preglednici 16.

Preglednica 16: skupna tabela vseh testiranih bakterijskih izolatov z rezultati PGPR učinka na rast rastlin - poskus C, inhibicije patogenih bakterij *in vitro* in identifikacije

Table 16: summary table of all tested bacterial isolates with results of PGPR effect on plant growth – experiment C, inhibition of pathogenic bacteria *in vitro* and identification

Oznaka NIB zbirka	Učinek na rast rastlin v rastlinskem poskusu C		Inhibicija patogenih bakterij <i>in vitro</i>			Identifikacija			
	sveža masa korenin / zg. delov rastlin	suha masa korenin / zg. delov rastlin	Rs	Xv	Cmm	Identifikacija v laboratoriju PPS na podlagi FAP in nekaterih biokemijskih testov	BIOLOG	sekvenciranje 16S rRNA	diplomska naloga (Kubik, 2002)
NIB Z 129	- / -	- / -	ni inhibicije	šibka inhibicija	ni inhibicije (F)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	/	<i>Pseudomonas</i> sp. (FAP: <i>Pseudomonas corrugata</i>)
NIB Z 138	- / ++	- / ++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije *	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NIB Z 139	- / ++	- / -	ni inhibicije	inhibicija	inhibicija	Ni identifikacije	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 140	++ / +++	++ / +++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Ni identifikacije	/	podoben <i>Brevundimonas diminuta</i>
NIB Z 141	+++ / +++	+++ / +++	šibka inhibicija (ni inhibicije)	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 142	+ / ++	- / ++	ni inhibicije	inhibicija	inhibicija	Ni identifikacije	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
NIB Z 143	- / ++	- / +	šibka inhibicija	šibka inhibicija (inhibicija)	močna inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ali <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip V ali <i>Pseudomonas putida</i> (FAP: <i>Pseudomonas putida</i>)
NIB Z 144	- / -	- / -	ni inhibicije	šibka inhibicija (inhibicija)	inhibicija	Ni identifikacije	verjetno <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 145	++ / ++	+ / ++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 146	- / ++	- / ++	ni inhibicije	inhibicija	šibka inhibicija (inhibicija)	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 147	- / -	- / -	ni inhibicije	šibka inhibicija (inhibicija)	inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> / <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 148	+++ / +++	+++ / +++	šibka inhibicija (ni inhibicije)	šibka inhibicija	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	Ni identifikacije
NIB Z 149	++ / ++	+ / ++	šibka inhibicija	šibka inhibicija	šibka inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 150	++ / +++	++ / +++	ni inhibicije	šibka inhibicija	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NIB Z 151	- / -	- / -	šibka inhibicija	inhibicija	inhibicija	Ni identifikacije	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (FAP: ni identifikacije)
NIB Z 152	++ / +++	++ / +++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 153	+++ / +++	+++ / +++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	<i>Pseudomonas putida</i> / <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 154	- / ++	- / +	ni inhibicije	šibka inhibicija	ni inhibicije (F)	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip F	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 155	++ / ++	- / ++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 156	++ / ++	- / ++	ni inhibicije	inhibicija	močna inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)
NIB Z 157	- / ++	- / ++	ni inhibicije	*	močna inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp. verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Ni identifikacije, najbližje <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (FAP: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)

Simboli: - ni povečano glede na kontrolo, + rahlo povečanje glede na kontrolo, ++ povečanje glede na kontrolo, +++ močno povečanje glede na kontrolo, F rast patogene bakterije okoli testiranega izolata boljša, * testni organizem se je močno razrasel, Rs- *Ralstonia solanacearum*, Xv-*Xantomonas vesicatoria*, Cmm-*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V nalogi so bili uporabljeni bakterijski izolati, ki so bili predhodno izolirani iz rizoplana paradižnika treh različnih rastlin, različne starosti, dveh različnih sort iz dveh različnih lokacij. Izoliranih je bilo skupaj 40 bakterijskih izolatov, ki so bili identificirani z različnimi identifikacijskimi testi opisani v Rupnik (2001). Pri 20 izolatih je bila izvedena tudi tipizacija gena za 16S rRNA s polimorfizmom dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) (Kubik, 2002).

Izbrali smo 21 izolatov za nadaljne rastlinske poskuse, ki naj bi po zbrani literaturi imeli pozitiven učinek na rast rastlin. Te izolate smo nadalje identificirali s pomočjo treh različnih laboratorijskih metod. Vseh 40 bakterijskih izolatov smo *in vitro* testirali na zmožnost inhibicije na tri patogene bakterije *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Xanthomonas vesicatoria*.

5.1.1 Inhibicija patogenih mikroorganizmov *in vitro*

Preverili smo sposobnost bakterijskih izolatov na inhibicijo rasti treh patogenih bakterij *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Xanthomonas vesicatoria in vitro*.

Selekcija PGPR za biološko varstvo rastlin najpogosteje temelji prav na antagonizmu z rastlinskimi patogenimi bakterijami *in vitro*. Nguyen in Ranamukhaarachchi (2010) sta preverjala inhibicijo bakterijskih izolatov iz tal na bakterijo *Ralstonia solanacearum in vitro*. Za poskuse sta uporabila 3 različne tehnike nanosa antagonista in patogena na ploščo agarja King B. Poleg tega sta določila optimalne pogoje za rast antagonista in njegovo inhibicijo (glede na vir ogljika in dušika, pH gojišča in temperaturo inkubacije).

V našem poskusu so le trije bakterijski izolati (NIB Z151, NIB Z143 in NIB Z149) šibko zavirali rast patogene bakterije *Ralstonia solanacearum*. Vsi trije izolati so identificirani kot *Pseudomonas* sp. Od teh imata dva izolata (NIB Z143 in NIB Z149) pozitiven učinek na rast rastlin, pri izolatu NIB Z151 pa smo opazili negativen vpliv na rast rastlin.

Največ fluorescentnih pseudomonad je imelo sposobnost, da zavirajo rast patogene bakterije *Xanthomonas vesicatoria*. Od teh se je izolat NIB Z 157 zelo močno razrasel, verjetno gre za *Pseudomonas chlororaphis*. Ta izolat tudi močno inhibira rast patogene bakterije *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Ugotovili smo tudi, da ima ta izolat tudi pozitiven učinek na rast rastlin, zato bi bil verjetno primeren za nadaljne analize.

Zelo dobro so se pri testu inhibicije na patogeno bakterijo *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* odrezali trije izolati: NIB Z 143, NIB Z156 in NIB Z157. Izolat NIB Z156 je verjetno *Pseudomonas chlororaphis*, pri katerem smo ugotovili tudi pozitiven učinek na rast paradižnika. Ta izolat inhibira tudi rast *X. vesicatoria*. Izolat NIB Z143 je po vsej verjetnosti *Pseudomonas putida*. Pri tem izolatu smo ugotovili le manjši pozitivni učinek na rast zgornjega dela rastlin paradižnika, ne pa pozitiven vpliv na rast korenin. Zanimivo pa je, da ta izolat inhibira rast vseh treh patogenih bakterij. Šibkeje kot ta izolat pa inhibira vse tri patogene bakterije izolat NIB Z151, ki nima zanesljive identifikacije (analiza profila maščobnih kislin kaže na neidentificirano vrsto). Glede na ostale analize bi lahko rekli, da gre za *Pseudomonas* sp. Pri tem izolatu smo ugotovili celo negativen vpliv na rast paradižnika, zato za nadaljne analize ni ustrezen.

Izolati *Stenotrophomonas maltophilia*, ki so pozitivno vplivali na rast paradižnika, niso imeli sposobnosti inhibicije rasti proti vsem trem patogenim bakterijam.

Testiranje bakterijskih izolatov na sposobnost inhibicije rastlinskih patogenih bakterij *in vitro*, je zelo hiter in presejalni način odkrivanja dobrih kandidatov za nadaljne rastlinske poskuse. Seveda bi bilo v tem primeru smiselno vključiti tudi najpomembnejše glive.

Med vsemi PGPR veljajo *Pseudomonas* sp. za najbolj agresivne osvajalce rizosfere pri različnih rastlinah. Njihov spekter antagonistične aktivnosti pred rastlinskimi patogeni je zelo širok (Davison, 1988).

Za nadaljne rastlinske poskuse na sevih, ki inhibirajo rast patogenih bakterij *in vitro*, bi v naslednjem koraku testirali seve *in vivo*. Nguyen in Ranamukhaarachchi (2010) sta antagonistične izolate testirala v rastlinjaku na rastlinah paradižnika in paprike in sicer v substratu, ki je bila povprej inokulirana s patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum* in v kateri sta dve generaciji zapored gojila paradižnik sorte Sida in paprika sorte NiNi, ki sta občutljivi na bakterijo *Ralstonia solanacearum*. 20 dni stare potaknjence sta posadila v okužen substrat in enkrat tedensko zalivala s suspenzijo antagonista. Razvoj bolezenskih znamenj sta spremljala po lestvici Kelman in Person (1961). Beležila sta višino rastlin, težo plodov in biomaso pridelka. Od sedmih testiranih antagonistov so bili trije sevi zelo uspešni pri zaviranju bakterije *Ralstonia solanacearu*. Pri teh treh sevih sta zabeležila najvišjo višino rastlin, največjo težo plodov in biomaso pridelka v primerjavi s kontrolo. Nato bi lahko nadaljevali s poljskimi poskusi.

Neujemanje povezave med laboratorijskimi poskusi in poljskimi poskusi je največja težava pri razvoju PGPR za biološko kontrolo ali za pospeševanje rasti rastlin (Thomashow, 1996). Laboratorijski poskusi so opravljeni v bolj kontroliranih pogojih kot poljski poskusi, kjer se sevi PGPR srečujejo s kompeticijo drugih bakterij v rizosferi. Laboratorijski poskusi so večinoma izvedeni v rastlinjakih v steriliziranem substratu, kamor se inokulirajo testirani PGPR sevi. Tudi sestavo substrata v teh primerih lahko izbiramo. V poljskih poskusih pa so testirani sevi podvrženi kompeticiji drugih rizosfernih bakterij, ki tekmujejo za dostopnost hranil in kolonizacijo korenin rastlin in so podvrženi različnim zunanjim klimatskim vplivom.

Kakšen je bil način inhibicije PGPR nismo ugotavljali. Za ugotavljanje produkcije sideroforjev pri fluorescentnih *Pseudomonas* sp. se uporablja sukcinatno gojišče (Meyer in Abdallah, 1978). Za ugotavljanje produkcije hidrogen cianida (HCN) bi lahko uporabili metodo opisano v Castric (1975). Lahko bi ugotavljali tudi različno produkcijo

antibiotikov. Fluorescentne pseudomonade proizvajajo poliketidni antibiotik DAPG. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 s produkcijo DAPG inducira sistemsko rezistenco v koreninah paradižnika in s tem inhibira nematoda *Meloidogyne javanica* (Siddiqui in Shaukat, 2003).

Pomembno je poudariti, da je tudi izbor zemlje, substrata, pomemben za uspešno biokontrolo. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 je uspešen pri obrambi pred glivami v vermikulitu (bogat z magnezijem in železom) ne pa tudi na ilitu (bogat s kalijem) (Stutz in sod., 1989 in Kell in sod., 1989).

5.1.2 Rastlinski poskusi, ugotavljanje pozitivnega učinka na rast rastlin

Za rastlinski poskus smo uporabili sterilizirana semena paradižnika *Solanum lycopersicum* L. kultivarja Moneymaker (Bruno Nebelung), ki smo jih čez noč inkubirali v suspenziji bakterijskih izolatov in jih nato posadili v steriliziran pesek. Rastline smo zalivali s suspenzijami bakterijskih izolatov 5 tednov, nato pa smo tehtali svežo in suho maso posameznih delov rastlin. Izvedli smo tri različne rastlinske poskuse. Rastline smo najprej zalivali le s suspenzijo bakterijskih izolatov v hranilni raztopini. Rastline, ki so bile tretirane z različnimi bakterijskimi izolati so bile različne od kontrole, razen pri enem izolatu, kjer nismo potrdili statističnih razlik. Ker smo ugotovili, da so razlike v suhi masi rastlin med izolati majhne, smo se za naslednji poskus odločili, da primerjamo rast rastlin tretiranih z bakterijsko suspenzijo v pogojih z in brez hranil. Izbrali smo izolat NIB Z143, ki inhibira rast vseh treh testiranih rastlinskih patogenih bakterij. Ugotovili smo, da dodatek bakterijskega izolata v hranilno raztopino ali v vodo statistično značilno ne spremeni sveže in suhe mase rastlin. Če pa zalivamo s sterilno vodo, bakterijski izolat sicer ne pripomore k povišani rasti rastlin, je pa zelo enostaven presejalni test, ko želimo ugotoviti ali bakterijski izolat pozitivno vpliva na rast rastlin. Na tak način smo v tretjem poskusu preizkusili vseh 21 različnih bakterijskih izolatov.

Največji vpliv na rast rastlin smo ugotovili pri rastlinah tretiranih z izolati NIB Z140, NIB Z141, NIB Z 148, NIB Z150, NIB Z152 in NIB Z153. Izolata Z NIB 141 in NIB Z152 sta

Stenotrophomonas maltophilia. Pri vseh treh izolatih *Stenotrophomonas maltophilia* nismo ugotovili inhibicije na testirane patogene bakterije. Ker je ta bakterija lahko patogeni oportunist, ni priporočljiva za nadaljne raziskave. Izolat NIB Z140 je glede na profil maščobnih kislin *Chryso bacterium indolgenes*, glede na identifikacije v diplomski nalogi (Kubik, 2002) pa je podoben *Brevundimonas diminuta*. Sicer ne zavira rasti testiranih patogenih bakterij *in vitro*, kljub temu je zanimiv za nadaljne raziskave.

Izolati NIB Z148, NIB Z150 in NIB Z153 spadajo med *Pseudomonas* sp. Izolat NIB Z 153 sicer ne zavira rasti testiranih patogenih bakterij *in vitro* je pa identificiran po vseh metodah kot *Pseudomonas putida*. Izolata NIB Z 148 in NIB Z150 pa šibko inhibira rast patogene *Xanthomonas vesicatoria in vitro*.

Ne tako očiten pozitiven vpliv na rast rastlin smo ugotovili pri izolatih NIB Z138, NIB Z139, NIB Z142, NIB Z145, NIB Z146, NIB Z149, NIB Z155 in NIB Z156. Od teh izolatov le izolati NIB Z 139 in NIB Z142, NIB Z146 zavirajo rast patogene *Xanthomonas vesicatoria* in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*. Izolat NIB Z156 močno inhibira patogeno bakterijo *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in šibko *Xanthomonas vesicatoria in vitro*. Izolat NIB Z149 pa šibko inhibira rast vseh treh patogenih bakterij *in vitro*, zato je prav tako primeren kandidat za nadaljne raziskave.

Nobenega učinka na rast rastlin ni bilo pri rastlinah tretiranih z izolati NIB Z129, NIB Z144, NIB Z147 in NIB Z151. Izolat NIB Z129 je verjetno *Pseudomonas corrugata* in šibko inhibira rast bakterije *Xanthomonas vesicatoria in vitro*. Izolat NIB Z144 je tudi *Pseudomonas* sp., vendar inhibira rast *Xanthomonas vesicatoria* in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*. Izolat NIB Z 147 je verjetno *Pseudomonas chlororaphis* in inhibira rast *Xanthomonas vesicatoria* in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*. Izolat NIB Z151 je *Pseudomonas* sp, vendar inhibira rast vseh treh patogenih bakterij. To je dokaz, da je pomembno testirati rizobakterije, tako na vpliv na rast rastlin kot na inhibicijo na patogene mikroorganizme, ker s tem lahko zelo hitro izločimo neprimerne izolate za nadaljne poskuse.

Gravel in sod. (2007) so ocenjevali pozitivni učinek na rast rastlin paradižnika v hidroponskih pogojih. Testirali so 5 bakterijskih izolatov (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fluorescens* podskupina G, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas putida* in *Pseudomonas syringae*) in 3 glive (*Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum* in *Trichoderma atroviride*) in ugotovili, da *Pseudomonas putida* in *Trichoderma atroviride* izboljšata pridelek. Z dodatkom l-triptofana in triptamina v gojišče so dokazali, da je proizvodnja IAA možen mehanizem za spodbujanje rasti rastlin.

Gagne in sod. (1993) so proučevali učinek PGPR na pridelek paradižnika in sicer v pomladnem in jesenskem času v toplih gredah. Medtem, ko pri spomladanskem pridelku, nobena od testiranih bakterij ni značilno vplivala na velikost plodov, so v jesenskem poskusu, kjer so rastline gojili pod neoptimalni pogoji, za sev *Pseudomonas fluorescens* ugotovili kar 11,1 % povečanje povprečne velikosti plodov.

Bakterijske seve primerne za testiranje vpliva na rast rastlin bi lahko v prihodnosti selekcionirali tudi glede na lastnosti, ki so značilne za PGPR kot so zmožnost raztapljanja fosfata po metodi Gupta in sod. (1994) ali po metodi Nautiyal in Mehta (2001). S testom opisanim v Loper in Schroth (1986) bi lahko izmerili produkcijo IAA. Biotest na semenih, ki so ga opisali Belimov in sod. (2002), bi lahko uporabili za ugotavljanje ACC deaminazne aktivnosti.

Restriksijski vzorci gena za 16S rRNA niso dovolj specifični, zato ne bi bili primerni za sledenje kolonizacije sevov v rastlinskih poskusih. Boljša potrditev kolonizacije bakterij za rod *Pseudomonas* na koreninah kot razmazi na ploščah, ki so bili uporabljeni v nalogi, bi bila pomnoževanje ITS1 regije skupaj z delom 16S rRNA, ki jo je objavil Locatelli in sod. (2002).

5.1.3 Identifikacija bakterijskih izolatov

Za identifikacijo bakterijskih izolatov smo uporabili tri različne laboratorijske metode: analizo profila maščobnih kislin, analizo metabolnega profila BIOLOG in analizo sekvenciranja 16S rRNA. Začetna identifikacija je bila opravljena že v okviru diplomske naloge (Kubik, 2002). S pomočjo primerjave vseh rezultatov smo skušali ugotoviti katera metoda ali kombinacija metod je najbolj zanesljiva za identifikacijo preučevanih bakterij.

Trenutna shema za identifikacijo različnih rizobakterij zajema štiri kategorije, ki temeljijo na: 1. tradicionalnih biokemijskih, morfoloških in fizioloških značilnostih, 2. komercialnih izvedbah biokemijskih testov (različni API testi, VITEK kartice, BIOLOG), 3. kemotaksonomskih značilnostih (PAGE in FAME profili) in 4. genomskih značilnostih (16S rRNA sekvenciranje) (Vale Barreto Figueiredo in sod., 2010). Za identifikacijo velikega števila izoliranih potencialnih PGPR je pomembno, da so testi hitri in dovolj natančni, da na hiter način pridemo do izolatov, ki so zanimivi za nadaljna testiranja njihovih vplivov na rast rastlin in inhibicijo na različne patogene mikroorganizme.

Trije izolati so pri vseh metodah, razen pri sekvenciranju 16S rRNA, ki ni bilo uspešno, identificirani kot *Stenotrophomonas maltophilia*.

Izolat NIB Z140 je bil z analizo profila maščobnih kislin identificiran kot *Chryseobacterium indolgenes*, metoda BIOLOG identifikacije ni prepoznal, sekvenciranje 16S rRNA ni bilo uspešno, v diplomski nalogi (Kubik, 2002) pa je izolat identificiran kot podoben *Brevundimonas diminuta*.

Z analizo profila maščobnih kislin nismo dobili ustreznega rezultata za 4 izolate od skupaj 21 analiziranih izolatov, ker ni bilo ustrezne primerjave.

Vsi ostali 13 izolati so identificirani kot *Pseudomonas* sp. Pri vseh teh smo opazili razlike v identifikaciji pri analizi profila maščobnih kislin med različnimi podatkovnimi bazami (baza TSBA, baza PD in baza CLIN). Vse podatkovne baze izolate sicer identificirajo kot

Pseudomonas, vendar različne vrste, zato smo naredili še nekaj biokemijskih testov in identifikacijo zaključili na osnovi rezultatov le-teh.

Pri sekvenciranju 16S rRNA je bilo 16 sekvenc od skupaj 27 primernih za poravnavo. Metoda je primerna za določitev rodu *Pseudomonas*, ne razlikuje pa vedno med sevi iz različnih vrst iz rodu *Pseudomonas*.

Pri identifikaciji bakterijskih izolatov iz rodu *Pseudomonas* smo v naši nalogi z različnimi metodami dobili različne rezultate. Iz rezultatov metabolnega profila pri referenčnih sevih lahko vidimo, da tudi metoda BIOLOG ni ločila med seboj različnih vrst iz rodu *Pseudomonas*. Mogoče bi bili rezultati bolj prepričljivi, če bi uporabljali avtomatični čitalec ploščic. Na tržišču so tudi nove izvedbe BIOLOG sistema kot na primer OMNILOG. Znano pa je, da sta oba sistema narejena za identifikacijo bakterij v kliničnih laboratorijih. V našem primeru smo BIOLOG ploščice odčitavali na oko, kar je lahko zelo subjektivno.

Pri profilu maščobnih kislin že med različnimi podatkovnimi bazami dobimo različne rezultate, zato na podlagi le teh lahko sklepamo, da metoda ni bila zanesljiva za identifikacijo različnih vrst iz rodu *Pseudomonas*. Rezultati analize maščobnega profila bi bili verjetno boljši, če bi imeli dobro bazo bakterij iz rodu *Pseudomonas*.

Iz rezultatov sekvenciranja 16S rRNA pa lahko sklepamo, da metoda ni vedno primerna za določitev vrst iz rodu *Pseudomonas* saj ne razlikuje vedno med sevi iz različnih vrst iz rodu *Pseudomonas*. Rezultati bi bili boljši, če bi pomnoževali manjši odsek 16S rRNA in bi dobili prekrivanje pri poravnavi sekvenc dobljenimi z branjem s F in R oligonukleotidom ali če bi uporabili druge začetne oligonukleotide ali drug del genoma.

Na podlagi rezultatov vseh treh identifikacijskih metod lahko sklepamo, da v našem primeru nobena izmed preizkušenih metod sama zase ne omogoča zanesljive identifikacije izolatov iz rodu *Pseudomonas*, temveč je za zanesljivejšo določitev potrebno uporabiti več metod.

Rod *Pseudomonas* pripada γ podrazredu Proteobacteria in vključuje fluorescentne pseudomonade kot tudi nekaj ne-fluorescentnih vrst. Identifikacija lahko temelji na fenotipskih značilnostih kot so morfologija, pigmentacija, obarvanja z različnimi barvili in potrebe po različnih hranilih. Ko so preučevali prehranske potrebe različnih sevov *Pseudomonas* z različnim poreklom, so za bakterije *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas putida* ugotovili, da so zelo heterogene. *Pseudomonas putida* so razdelili v dva biovarja A in B. *Pseudomonas fluorescens* pa v 7 biotipov. Pet biotipov so preimenovali v pet biovarjev (I-V). Dva biotipa pa v *Pseudomonas chlororaphis* in *Pseudomonas aureofaciens*. Slednjega so kasneje združili v *Pseudomonas chlororaphis*. Širok spekter biovarjev razkriva visoko fenotipsko heterogenost in kaže na visoko genomsko diverziteteto. Različne študije kažejo na zelo visoko gensko variabilnost znotraj biovarjev *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas putida* in obstaja velika verjetnost, da nekateri biovarji vključujejo tudi še neopisane vrste. Stopnja podobnosti izolatov iz rizosfere, ki so bili identificirani kot *Pseudomonas fluorescens* ali *Pseudomonas putida* na podlagi fenotipskih značilnosti ni bila nikoli višja od 55% v primerjavi s tipskimi sevi *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas putida* (Bossis in sod., 2000).

Najbolj zanesljiva metoda za identifikacijo rodu *Pseudomonas* je še vedno DNA-rRNA hibridizacija. Palleroni in sod. (1973) so razdelili rod *Pseudomonas* v 5 homolognih skupin.

Za identifikacijo in klasifikacijo mikroorganizmov se zelo pogosto uporabljajo nukleotidne sekvence številnih genov, zlasti tistih iz male podenote rRNA. Vsebuje mozaik sekvenc z visoko ohranjenimi regijami in regijami, ki so variabilne in hipervariabilne in so primerne za izbor različni začetnih oligonukleotidov za PCR. 16S rRNA gen iz rodu *Pseudomonas* vsebuje 1492 nukleotidov, od teh je 148 variabilnih, 65 jih je znotraj treh hipervariabilnih regij (Moore, 1996). Obširna baza podatkov 16S rRNA sekvenc je pomembna za analizo bakterijskih sevov iz okolja. Regija, ki leži med 16S in 23S (ITS1) rRNA gena je različna v velikosti in obstaja tudi variabilnost sekvenc znotraj visoko sorodnih taksonomskih skupin (Gurtler in Stanisich, 1996). Locatelli s sod. (2002) je razvil začetne oligonukleotide prav

za rod *Pseudomonas*, ki pomnožujejo ITS1 regijo skupaj z delom 16S rRNA. Ta metoda bi bila lahko primerna tudi za sledenje bakterijskih sevov v poljskih poskusih.

Zavedati se moramo tudi, da je rizosfera pomemben rezervoar oportunističnih humanih patogenov iz rodov *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* in *Stenotrophomonas* (Berg, 2005), zato sta dobra identifikacija in nadaljni zbor sevov zelo pomembna.

5.2 SKLEPI

Pri večini izoliranih bakterijskih izolatih smo potrdili pozitiven učinek na rast sadik paradižnika. Gre za bakterijske izolate iz rodu *Pseudomonas* in bakterijske izolate *Stenotrophomonas maltophilia*. Bakterijski izolati *Stenotrophomonas maltophilia* niso inhibirali testiranih patogenih rastlinskih bakterij (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*) *in vitro*. Pri nekaterih bakterijskih izolatih iz rodu *Pseudomonas* pa smo opazili tako pozitiven učinek na rast sadik paradižnika kot tudi sposobnost inhibicije na nekatere testirane patogene rastlinske bakterije.

Na podlagi rezultatov vseh treh identifikacijskih metod (profil maščobnih kislin, BIOLOG, sekvenciranje 16S rRNA) lahko sklepamo, da nobena izmed preizkušenih metod sama zase ne omogoča zanesljive identifikacije izolatov iz rodu *Pseudomonas*, temveč je za zanesljivejšo določitev potrebno uporabiti več metod. Edini izolat ki je bil v vseh primerih nedvoumno karakteriziran je bil *Stenotrophomonas maltophilia*.

6 POVZETEK (Summary)

6.1 POVZETEK

Rizobakterije, ki pospešujejo rast rastlin (PGPR) so so v uporabi za pospeševanje rasti rastlin in za biološko varstvo rastlin pred različnimi rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi tako v kmetijstvu kot gozdarstvu. Študije temeljijo na izolaciji bakterijskih sevov iz rizosfere, selekciji sevov na uporabne značilnosti in aplikaciji izbranih sevov v laboratorijskih in poljskih poskusih. Paradižnik je ekonomsko pomembna rastlina v Sloveniji, gojimo jo v rastlinjakih in tunelih, kar je prednost pri morebitni aplikaciji bakterijskih izolatov za pospešeno rast rastlin in varstvo pred rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi.

V rastlinskih poskusih smo preverili pozitiven učinek na rast rastlin paradižnika in sposobnosti inhibicije treh patogenih bakterij *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Xanthomonas vesicatoria* *in vitro*.

Pri večini izoliranih bakterijskih izolatih iz rodu *Pseudomonas* in pri vseh bakterijskih izolatih *Stenotrophomonas maltophilia* smo potrdili pozitiven učinek na rast sadik paradižnika. Bakterijski izolati *Stenotrophomonas maltophilia* nimajo sposobnosti inhibicije testiranih patogenih rastlinskih bakterij *in vitro*.

Pri nekaterih bakterijskih izolatih iz rodu *Pseudomonas* pa smo opazili tako pozitiven učinek na rast sadik paradižnika kot tudi sposobnost inhibicije na nekatere testirane patogene rastlinske bakterije, zato bi bili ti izolati uporabni za nadaljne raziskave inhibicije pred rastlinskimi patogenimi bakterijami *in vivo* in kasneje za ugotavljanje pozitivnega učinka na rast rastlin paradižnika v poljskih poskusih.

Izolirane bakterije iz rizosfere paradižnika smo nadalje identificirati z analizo profila maščobnih kislin, z BIOLOG in sekvenciranjem 16S rRNA. Nobena izmed preizkušenih metod sama zase ne omogoča zanesljive identifikacije izolatov iz rodu *Pseudomonas* temveč je za zanesljivejšo določitev potrebno uporabiti več metod.

6.2 SUMMARY

Plant growth promoting rizobacteria (PGPR) are used for biocontrol against various plant pathogenic microorganisms and to promote plant growth in agriculture and in forestry. Studies are based on bacterial strains isolated from the rhizosphere. Different bacterial strains are then selected on useful features and application of selected strains in laboratory and field experiments are done. Tomato is economically important plant in Slovenia. It is grown in the greenhouse and plastic tunnels, which is an advantage in any application of bacterial isolates for improved plant growth and protection against plant pathogens.

Positive impact on the growth of tomato plants and their ability to inhibit three pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria in vitro* were tested.

Most isolated bacterial strains of the genus *Pseudomonas*, and all bacterial strains of *Stenotrophomonas maltophilia* had a positive effect on the growth of tomato seedlings. Bacterial strains of *Stenotrophomonas maltophilia* had no ability to inhibit plant pathogenic bacteria *in vitro*.

In some bacterial strains of the genus *Pseudomonas*, we observed a positive effect on the growth of tomato plants as well as the ability to inhibit some tested plant pathogenic bacteria. These strains are useful for the further research of inhibition against plant pathogenic bacteria *in vivo* and subsequently to identify the positive impact on the growth of tomato plants in field trials.

Isolated bacteria from the rhizosphere of tomato were further identified by fatty acid profile analysis, BIOLOG and sequencing of 16S rRNA. We found out that none of the tested methods does not allow reliable identification of bacterial isolates from the genus *Pseudomonas*. For reliable identification more than one method should be used.

7 VIRI

- Audenaert K., Pattery T., Pierre Cornelis P., Höfte M. 2002. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 11: 1147–1156
- Asghar H.N., Zahir Z.A., Arshad M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and growth content of canola (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural research*, 55: 187-194
- Bais H.P., Weir T.I., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The Role of Root exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-266
- Baudoin E., Benziri E., Guckert A.V., 2002: Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil. Ecology*. 19, 135-145
- Belimov A.A., Safronova V.I., Mimura T. 2002. Response of spring rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 189-199
- Benziri E., Courtrade A., Picard C., Guckert A. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10/11: 1481-1484
- Berg G., Eberl L., Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7, 11: 1673-1685
- Bianciotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi M., Tichy H.V., Bonfante P. 1996. An Obligately Endosymbiotic mycorrhizal Fungus Itself Harbors Obligately Intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 8: 3005-3010
- Bochner B.R. 1989. Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339: 157-158
- Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20: 51-63
- Buyer J.S., Kratzke M.G., Sikora L.J. 1993. A Method for Detection of Pseudobactin, the Siderophore Produced by a Plant-Growth-Promoting *Pseudomonas* Strain, in the Barley Rhizosphere. *Applied. Environmental Microbiology*, 59, 3: 677-681

- Castric P.A. 1975. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology, 21: 613-618
- David C., Herve C., Nicolas F., Isabelle J.S., Mohamed A. A., Franc P. 2005. The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. Journal of Molecular Biology, 347: 212-134
- Davison J. 1988. Plant Beneficial Bacteria. Nature Biotechnology, 6: 282-286
- De Meyer G., Capiou K., Audenaert K., Buchala, A., Métraux J.-P., Höfte M. 1999. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway on bean. Molecular Plant-Microbe Interaction, 12: 450-459
- Duijff B.J., Gianinazzi-Pearson V., Lemanceau P. 1997. Involment of the outer membrane lipopolysaharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. New phytologist, 135: 325-334
- Duponnois R., Garbaye J. 1991. Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare-root forest nurseries. Plant and Soil, 138, 2: 169-176
- Gagne S., Dehbi L., Quere D., Cayer F., Morin J.L., Lemay L., Fournier N. 1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing media. Soil Biology and Biochemistry, 25, 2: 269-272
- Gil-Jae J., Sang-Mo K., Muhammad H., Sang-Kuk K., Chae-In N., Dong-Hyun S., In-Jung L. 2009. Burkholderia sp. KCTC 11096BP as a Newly Isolated Gibberellin Producing Bacterium. The Journal of Microbiology, 47, 2: 167-171
- Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry, 39, 8: 1968–1977
- Gupta R.S., Rehka S., Kuhad. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. Journal of General and Applied Microbiology, 40: 255-260
- Gurtler V., Stanisich V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer. Microbiology, 142: 136
- Gutierrez-Manero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F. R., Talon M. 2001. The plant-growthpromotingrhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus*

- licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111: 206–211
- Gyaneshwar P., Parekh L.J., Archana G., P Poole P.S., Collins M.D., Hutson R.A., Naresh Kumar G. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 171,1: 223-229
- Hartmann A., Rothballer M., and M. Schmid. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312: 7-14
- Haas D., Defago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 4: 307-319
- Haas D, Keel C., Reimmann C. 2002. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 385-395
- Idriss E.E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T., Borriss, R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology-Society for General Microbiology*, 148: 2097-2109
- Janse J.D. 2005. *Phytobacteriology principles and practice*. CABI Publishing, 360 str.
- Jian-Hua G., Hong-Ying Q., Ya-Hui G., Hong-Lian G., Long-Ying G., Li-Xin Z., Ping-Hua S. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29, 1: 66-72
- Jones J.B, Chase A.R., Harris G.K. 1993. Evaluation of Biolog GN microplate system for identification of some plant pathogenic bacteria. *Plant Disease*, 77: 553-558
- Kelman A., Person L.H., 1961. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopathology*, 51: 158-62
- Kloepper J.W., Schroth M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. V Proceedings of the fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Station de Patologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, France, 2: 879-892
- Kloepper J.W., Zablotowicz R. M., Tipping E. M., Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. V: The rhizosphere and plant growth. Keister D. L., Cregan P. B. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 315–326
- Koike S.T., Gladders P., Paulus A.O. 2007. *Vegetable Diseases. A color Handbook*. Academic Press, USA, 448 str.

- Kremer R.J., Kennedy A.C. 1996. Rhizobacteria as Biocontrol Agents of Weeds. *Weed Technology*, 10: 601-609
- Kubik Š. 2002. Izolacija in karakterizacija bakterij iz rizoplana paradižnika. Diplomski naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 74 str.
- Kumar B.S.D., Dube H.C. 1991. Plant Growth-Promoting Activity of A Fluorescent *Pseudomonas* from Tomato Rhizoplane. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29, 4: 366-370
- Kumari V., Srivastava J.S. 1999. Molecular and biochemical aspects of rhizobacterial ecology with emphasis on biological control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 5: 535-543
- Leveau J.H.J. 2007. The magic and menace of metagenomics: prospects for study of plant-growth promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 279-300
- Locatelli L., Tarnawski S., Hamelin J., Rossi P., Aragno M., Fromin N. 2002. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. *Systems of Applied Microbiology*, 25: 220-227
- Loper J.E., Schroth M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76: 386-389
- Lugtenberg B.:J.J., Kravchenko L.V., Simons M. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 461-490
- Meyer J.M., Abdallah M.A. 1978. The fluorescent pigment of Fluorescent *Pseudomonas*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107: 319
- Moore E.R.B. 1996. The determination and comparison of 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of natural intragenic relationships. *Systems Applied Microbiology*, 19: 478-492
- Nautiyal C.S., Mehta S. 2001. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing bacteria. *Microbiology*, 43: 51-56
- Nishiyama M., Shiomi Y., Suzuki S., Marumoto T. 1999. Suppression of growth of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings cultivated in a suppressive soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45, 1: 79-87

- Nguyen M.T., Ranamukhaarachchi S.L. 2010. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology*, 92, 2: 395-406
- O' Sullivan D.J., O' Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56: 662-676
- Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopolou R., Doudoroff M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Journal of Systematic Bacteriology*, 23: 333-339
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology*, 235: 329-344
- Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Van Wees S.C.M., Ton J., Leon-Kloosterziel K.M., Keurentjes J.J.B., Verhagen B.W.M., Knoester M., Sluis I.V., Bakker P.A.H.M., Van Loon L.C. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* 107: 51-61
- Ping L., Boland W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Science*, 9:263-269
- Podile A. R., Kishore G.K. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. V: *Plant – Associated Bacteria*. Gnanamanickam S.S. (ed.). Utrecht, Springer: 195-230
- Raaijmakers J.M., van der Sluis I., Koster M., Bakker P.A.H.M., Welsbeek P.J., Schippers B. 1995. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 126-135
- Rupnik M. 2001. Taksonomija in identifikacija. Navodila za vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 1-15
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134,3: 1017-1026
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W., Kloepper J.W. 2004. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100: 4927-4932
- Sasser M. Identification of bacteria through fatty acid analysis. 1990. V: *Methods in phytobacteriology*. Klement Z., Rudolph K., Sands D.C. (eds.). Budapest, Akademiai Kiado: 199-204

- Siddiqui I.A., Shaukat S.S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 12: 1615-1623
- Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in Microbiology*, 30: 205-240
- Stutz E., Defago G., Kern H. 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonad involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*, 76: 181-185
- Stutz E., Kahr G., Defago G. 1989. Clays involved in suppression of tobacco black rot by strain of *Pseudomonas syringae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 21: 361-366
- Thomashow L.S. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion Biotechnology*, 7: 343-347
- Vale Barreto Figueiredo M., Seldin L., Araujo F.F., Lima Ramos Mariano R. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. V: Plant Growth and Health Promoting Bacteria, *Microbiology Monographs* 18. Maheshwari D.K.(ed.). Berlin, Springer-Verlag: 21-43
- Van Loon L.C., Bakker, P. A. H. M., and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36:453-483
- VanWees S. C. M., Luijendijk M., Smoorenburg I., Van Loon L. C., Pieterse C. M. J. 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes, but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41: 537-549
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586
- Volkmar K.M, Bremer E. 1118. Effects of seed inoculation with a strain of *Pseudomonas fluorescens* on root growth and activity of wheat in well-watered and drought-stressed glass-fronted rhizotrons. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 78: 545-551
- Walters D. in Daniell T. 2007. Microbial induction of resistance to pathogens. V: Induced resistance for plant defence. A suitable approach to crop protection. Walters D., Newton A., Lyon G. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing: 143-156
- Weller D.M., Thomashow L.S. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. V: Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. *Biotechnology and release of GMOs*. O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (eds). Weinheim, VCH: 1-18

- Whipps J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511
- Xie H., Pasternak J.J., Glick B.R. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indole acetic acid. *Current Microbiology*, 32: 67-71
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255: 571-586
- Zahir Z. A., Arshad M., Frankenberger W.T. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria: perspectives and applications in agriculture. *Advances in Agronomy*. 81: 97-168
- Zhuang X.L.; Chen J.; Shim H.; Bai Z.H. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*, 33, 3: 406-413

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

svoji mentorici prof. dr. Maji Ravnikar za vzpodbudo pri delu in pisanju, za strokovni pregled, vso pomoč, ki mi jo je naklonila med delom na Nacionalnem inštitutu za biologijo;

delovni mentorici prof. dr. Maji Rupnik za strokovni pregled naloge, za vso pomoč pri načrtovanju dela na projektu Bakterije v rizosferi paradižnika;

prof. dr. Marjani Regvar in prof. dr. Davidu Stoparju za pregled naloge in vse strokovne pripombe;

Špeli Kubik za pomoč in delo na projektu Bakterije v rizosferi paradižnika;

Kmetijskemu inštitutu Slovenije za pomoč pri analizi BIOLOG, še posebno Igorju Zidariču za pomoč in nasvete pri praktičnem delu;

Bakteriološkemu laboratoriju Plant Protection Service na Nizozemskem, kjer sem lahko opravila analizo profila maščobnih kislin in takratnemu vodji dr. Jaap Janse-ju;

Ani Rotter za vse statistične obdelave, statistične komentarje, za njeno vzpodbudo in pozitivne misli;

Dr. Alešu Lapajnetu za vso njegovo pomoč pri zbirki, pri obdelavi rezultatov in za vse nasvete in vzpodbudo pri pisanju. Dr. Tomažu Rijavcu za vse debate in čas, ki mi ga je namenil;

Lidiji, da je skrbela za moje »ročce«, ko me ni bilo;

Prof. dr. Andreju Blejcu za statistično svetovanje;

Vsem GSOjevcem: še posebno Jani, Mojci, Davidu in Dejanu za njihovo podporo, skrb in pomoč, ki je neprecenljiva;

Vsem mojim nekdanjim in sedanjim cimrom, da so mi takoj priskočili na pomoč, ko sem jih prosila še posebno pa, da so pridno jedli čokolado skupaj z mano;

Sodelavcem Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo za pozitivno vzdušje;

In vsem Mojim.

PRILOGE

Priloga A (Annexes A):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil – poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
1	korenine	0,4145	0,08889
	listi	1,4429	0,21696
	steblo	0,522	0,0451
2	korenine	0,2815	0,0423
	listi	0,9964	0,1276
	steblo	0,6034	0,05078
3	korenine	0,1223	0,01936
	listi	0,7842	0,11297
	steblo	0,4671	0,04558
4	korenine	0,7944	0,05286
	listi	1,247	0,20169
	steblo	0,5185	0,0385
5	korenine	0,4856	0,05941
	listi	1,2967	0,16152
	steblo	0,4224	0,03636
6	korenine	0,4595	0,3312
	listi	0,6026	0,09044
	steblo	0,2591	0,02394
7	korenine	0,6498	0,11233
	listi	1,7998	0,25308
	steblo	0,6694	0,05727
8	korenine	0,5799	0,1371
	listi	1,43	0,21546
	steblo	1,302	0,074045

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v hranilni raztopini v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
9	korenine	0,7531	0,22568
	listi	1,463	0,243
	steblo	0,6577	0,06258
10	korenine	0,3734	0,07948
	listi	0,8849	0,11456
	steblo	0,612	0,27852
11	korenine	0,4125	0,1556
	listi	0,6562	0,09305
	steblo	0,5008	0,0832
12	korenine	0,8562	0,18128
	listi	1,5576	0,18258
	steblo	0,604	0,05582
13	korenine	1,134	0,18801
	listi	2,1364	0,33306
	steblo	0,9119	0,07991
14	korenine	0,5324	0,19871
	listi	0,7742	0,11322
	steblo	0,3262	0,03605
15	korenine	1,0899	0,27806
	listi	1,3157	0,2472
	steblo	0,5373	0,06257
16	korenine	0,6997	0,16708
	listi	1,4487	0,2375
	steblo	0,4817	0,04238

Priloga B (Annexes B):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v sterilni vodi v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
1	korenine	0,1003	0,02312
	listi	0,1131	0,02034
	steblo	0,1041	0,01211
2	korenine	0,1864	0,01975
	listi	0,2237	0,01543
	steblo	0,0948	0,0075
3	korenine	0,1206	0,0292
	listi	0,1562	0,01727
	steblo	0,1123	0,01393
4	korenine	0,081	0,02259
	listi	0,1958	0,03143
	steblo	0,0991	0,01054
5	korenine	0,1545	0,05004
	listi	0,3376	0,05529
	steblo	0,2408	0,09842
6	korenine	0,0405	0,01211
	listi	0,1284	0,02005
	steblo	0,0594	0,0073
7	korenine	0,0836	0,02985
	listi	0,1302	0,08405
	steblo	0,061	0,0061
8	korenine	0,4783	0,11235
	listi	0,2964	0,05691
	steblo	0,0749	0,0079
9	korenine	0,312	0,06586
	listi	0,4652	0,07051
	steblo	0,092	0,00543

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskim izolatom NIB Z143 v sterilni vodi v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
10	korenine	0,4227	0,11426
	listi	0,5282	0,08219
	steblo	0,3081	0,02726
11	korenine	0,1327	0,05529
	listi	0,1602	0,03408
	steblo	0,0839	0,00506
12	korenine	0,2135	0,03985
	listi	0,2909	0,05109
	steblo	0,1217	0,01581
13	korenine	0,2455	0,10729
	listi	0,3998	0,09242
	steblo	0,3996	0,15933
14	korenine	0,1233	0,14364
	listi	0,3363	0,07332
	steblo	0,2397	0,02918
15	korenine	0,2171	0,02989
	listi	0,1975	0,05231
	steblo	0,1196	0,04955
16	korenine	0,3499	0,08647
	listi	0,3558	0,07
	steblo	0,1723	0,02156
17	korenine	0,2335	0,0799
	listi	0,3811	0,08421
	steblo	0,1239	0,01362

Priloga C (Annexes C):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih s hranilno raztopino v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
1	korenine	0,3796	0,1974
	listi	1,1752	0,1272
	steblo	0,4314	0,02826
2	korenine	0,3155	0,06319
	listi	1,1595	0,13827
	steblo	0,4425	0,0272
3	korenine	0,1625	0,04139
	listi	0,4234	0,06215
	steblo	0,1055	0,01265
4	korenine	0,2284	0,11511
	listi	1,0034	0,15242
	steblo	0,3848	0,03987
5	korenine	0,2237	0,09694
	listi	0,9837	0,14067
	steblo	0,4187	0,03285
6	korenine	0,1639	0,05836
	listi	0,6259	0,07906
	steblo	0,2536	0,01974
7	korenine	0,6227	0,3143
	listi	0,5804	0,07334
	steblo	0,1614	0,02553
8	korenine	0,7424	0,24229
	listi	0,8976	0,12433
	steblo	0,3951	0,02725
9	korenine	0,644	0,18098
	listi	1,4304	0,19736
	steblo	0,4701	0,03357

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih s hranilno raztopino v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
10	korenine	0,4067	0,12909
	listi	1,0224	0,14642
	steblo	0,2884	0,02366
11	korenine	1,0382	0,27973
	listi	1,5211	0,22433
	steblo	0,3376	0,03091
12	korenine	0,5615	0,16047
	listi	1,6769	0,22434
	steblo	0,4413	0,03919
13	korenine	0,4985	0,21938
	listi	0,8074	0,11478
	steblo	0,3451	0,0376
14	korenine	0,7706	0,26987
	listi	0,9302	0,13134
	steblo	0,3925	0,03137
15	korenine	0,1719	0,0173
	listi	0,8272	0,32213
	steblo	0,1496	0,00789
16	korenine	1,1364	0,24161
	listi	1,9802	0,29003
	steblo	0,7643	0,06963
17	korenine	0,606	0,26582
	listi	0,7019	0,09667
	steblo	0,2762	0,02465

Priloga D (Annexes D):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih s sterilno vodo v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
1	korenine	0,1383	0,08229
	listi	0,0315	0,00599
	steblo	0,0585	0,02256
2	korenine	0,0316	0,02074
	listi	0,0309	0,00538
	steblo	0,0096	0,0005
3	korenine	0,0533	0,02677
	listi	0,0418	0,01176
	steblo	0,0291	0,00744
4	korenine	0,0592	0,03889
	listi	0,0098	0,00171
	steblo	0,0206	0,00153
5	korenine	0,0321	0,01577
	listi	0,0384	0,00697
	steblo	0,08195	0,00156
6	korenine	0,0426	0,0181
	listi	0,0334	0,00882
	steblo	0,0171	0,00022
7	korenine	0,1155	0,0862
	listi	0,0235	0,00742
	steblo	0,0177	0,00154
8	korenine	0,0435	0,01307
	listi	0,0114	0,003
	steblo	0,0237	0,00656

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih s sterilno vodo v poskusu ugotavljanja učinka PGPR v pogojih z in brez hranil - poskus B

Rastlina	Deli rastlin	Sveža masa (g)	Suha masa (g)
9	korenine	0,0338	0,00356
	listi	0,0152	0,05553
	steblo	0,0368	0,00193
10	korenine	0,0565	0,02188
	listi	0,0592	0,01581
	steblo	0,0442	0,00587
11	korenine	0,0446	0,01251
	listi	0,0306	0,007
	steblo	0,0374	0,00257
12	korenine	0,0477	0,02698
	listi	0,0321	0,00785
	steblo	0,0445	0,00346
13	korenine	0,0723	0,0665
	listi	0,0422	0,00584
	steblo	0,012	0,00082
14	korenine	0,0563	0,03175
	listi	0,0192	0,00173
	steblo	0,0409	0,00727
15	korenine	0,1118	0,0707
	listi	0,0176	0,00197
	steblo	0,0374	0,00282
16	korenine	0,1257	0,08414
	listi	0,0174	0,00635
	steblo	0,0272	0,00459

Priloga E (Annexes E):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1

Negativna kontrola, pitna voda			Bakterijski izolat: NIB Z129		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,322	0,033	1-korenine	0,357	0,024
2-korenine	0,185	0,027	2-korenine	0,373	0,034
3-korenine	0,451	0,049	3-korenine	0,218	0,016
4-korenine	0,228	0,022	4-korenine	0,398	0,036
5-korenine	0,442	0,059	5-korenine	0,117	0,01
6-korenine	0,293	0,031	6-korenine	0,334	0,032
7-korenine	0,083	0,016	7-korenine	0,452	0,062
8-korenine	0,245	0,032	8-korenine	0,238	0,024
9-korenine	0,306	0,047	9-korenine	0,268	0,023
10-korenine	0,288	0,027	10-korenine	0,2	0,018
11-korenine	0,338	0,037	11-korenine	0,321	0,03
12-korenine	0,304	0,042	12-korenine	0,35	0,036
1-zgornji deli	0,614	0,084	1-zgornji deli	0,607	0,054
2-zgornji deli	0,357	0,042	2-zgornji deli	0,644	0,061
3-zgornji deli	0,848	0,095	3-zgornji deli	0,435	0,045
4-zgornji deli	0,347	0,039	4-zgornji deli	0,576	0,051
5-zgornji deli	0,635	0,068	5-zgornji deli	0,316	0,022
6-zgornji deli	0,65	0,07	6-zgornji deli	0,805	0,073
7-zgornji deli	0,29	0,035	7-zgornji deli	0,82	0,074
8-zgornji deli	0,671	0,081	8-zgornji deli	0,493	0,046
9-zgornji deli	0,546	0,06	9-zgornji deli	0,434	0,036
10-zgornji deli	0,507	0,065	10-zgornji deli	0,473	0,045
11-zgornji deli	0,487	0,05	11-zgornji deli	0,696	0,069
12-zgornji deli	0,635	0,074	12-zgornji deli	0,677	0,061

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1

Bakterijski izolat: NIB Z138			Bakterijski izolat: NIB Z139		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,734	0,061	1-korenine	0,541	0,057
2-korenine	0,315	0,031	2-korenine	0,541	0,042
3-korenine	0,432	0,072	3-korenine	0,473	0,043
4-korenine	0,602	0,056	4-korenine	0,617	0,058
5-korenine	0,428	0,049	5-korenine	0,386	0,047
6-korenine	0,756	0,064	6-korenine	0,557	0,056
7-korenine	0,695	0,102	7-korenine	0,668	0,072
8-korenine	0,6	0,105	8-korenine	0,429	0,056
9-korenine	0,548	0,075	9-korenine	0,703	0,076
10-korenine	0,622	0,07	10-korenine	0,344	0,03
11-korenine	0,452	0,063	11-korenine	0,46	0,052
12-korenine	0,448	0,055	12-korenine	0,558	0,07
1-zgornji deli	1,59	0,187	1-zgornji deli	0,917	0,09
2-zgornji deli	0,714	0,071	2-zgornji deli	0,986	0,111
3-zgornji deli	0,665	0,068	3-zgornji deli	1,025	0,095
4-zgornji deli	1,095	0,112	4-zgornji deli	1,322	0,131
5-zgornji deli	0,786	0,082	5-zgornji deli	0,949	0,092
6-zgornji deli	1,427	0,154	6-zgornji deli	1,248	0,124
7-zgornji deli	1,145	0,125	7-zgornji deli	1,22	0,115
8-zgornji deli	1,119	0,114	8-zgornji deli	0,826	0,083
9-zgornji deli	0,983	0,092	9-zgornji deli	1,182	0,113
10-zgornji deli	1,225	0,124	10-zgornji deli	0,757	0,072
11-zgornji deli	0,878	0,091	11-zgornji deli	0,947	0,096
12-zgornji deli	1,223	0,133	12-zgornji deli	1,003	0,092

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1

Bakterijski izolat: NIB Z140			Bakterijski izolat: NIB Z141		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa(g)
1-korenine	0,925	0,101	1-korenine	0,785	0,101
2-korenine	0,566	0,065	2-korenine	1,058	0,123
3-korenine	0,795	0,073	3-korenine	1,538	0,171
4-korenine	0,761	0,066	4-korenine	0,743	0,1
5-korenine	0,743	0,083	5-korenine	1,181	0,111
6-korenine	0,708	0,098	6-korenine	0,826	0,11
7-korenine	0,831	0,13	7-korenine	1,316	0,219
8-korenine	0,904	0,124	8-korenine	0,809	0,141
9-korenine	0,724	0,138	9-korenine	0,671	0,106
10-korenine	0,484	0,094	10-korenine	0,606	0,108
11-korenine	0,577	0,077	11-korenine	0,743	0,139
12-korenine	0,885	0,122	12-korenine	0,544	0,12
1-zgornji deli	1,804	0,222	1-zgornji deli	2,028	0,226
2-zgornji deli	0,925	0,093	2-zgornji deli	2,456	0,251
3-zgornji deli	1,764	0,226	3-zgornji deli	3,034	0,388
4-zgornji deli	0,994	0,144	4-zgornji deli	1,733	0,201
5-zgornji deli	1,302	0,149	5-zgornji deli	2,289	0,259
6-zgornji deli	1,545	0,196	6-zgornji deli	2,104	0,246
7-zgornji deli	1,789	0,202	7-zgornji deli	2,782	0,33
8-zgornji deli	1,632	0,172	8-zgornji deli	1,654	0,181
9-zgornji deli	1,335	0,142	9-zgornji deli	1,854	0,181
10-zgornji deli	1,166	0,106	10-zgornji deli	2,022	0,207
11-zgornji deli	1,033	0,119	11-zgornji deli	1,785	0,189
12-zgornji deli	1,755	0,188	12-zgornji deli	1,743	0,156

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.1

Bakterijski izolat: NIB Z142			Bakterijski izolat: NIB Z143		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,62	0,055	1-korenine	0,393	0,028
2-korenine	0,616	0,066	2-korenine	0,286	0,031
3-korenine	0,542	0,061	3-korenine	0,607	0,065
4-korenine	0,497	0,053	4-korenine	0,55	0,078
5-korenine	0,4	0,03	5-korenine	0,057	0,003
6-korenine	0,841	0,067	6-korenine	0,158	0,022
7-korenine	0,717	0,07	7-korenine	0,624	0,069
8-korenine	0,533	0,076	8-korenine	0,415	0,043
9-korenine	0,7	0,101	9-korenine	0,653	0,088
10-korenine	0,635	0,066	10-korenine	0,375	0,058
11-korenine	0,657	0,078	11-korenine	0,839	0,136
12-korenine	0,646	0,087	1-zgornji deli	0,982	0,114
1-zgornji deli	1,074	0,119	2-zgornji deli	0,752	0,088
2-zgornji deli	1,01	0,119	3-zgornji deli	1,229	0,15
3-zgornji deli	0,996	0,106	4-zgornji deli	1,016	0,115
4-zgornji deli	0,814	0,081	5-zgornji deli	0,219	0,017
5-zgornji deli	0,775	0,082	6-zgornji deli	0,428	0,031
6-zgornji deli	1,557	0,154	7-zgornji deli	1,075	0,127
7-zgornji deli	1,365	0,132	8-zgornji deli	0,991	0,128
8-zgornji deli	0,949	0,092	9-zgornji deli	1,291	0,152
9-zgornji deli	1,146	0,124	10-zgornji deli	0,829	0,089
10-zgornji deli	1,291	0,151	11-zgornji deli	1,412	0,163
11-zgornji deli	1,307	0,143	/	/	/
12-zgornji deli	1,142	0,136	/	/	/

Priloga F (Annexes F):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2

Negativna kontrola, pitna voda			Bakterijski izolat: NIB Z144		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,341	0,027	1-korenine	0,182	0,017
2-korenine	0,202	0,018	2-korenine	0,221	0,019
3-korenine	0,259	0,02	3-korenine	0,343	0,037
4-korenine	0,334	0,031	4-korenine	0,161	0,017
5-korenine	0,192	0,015	5-korenine	0,187	0,018
6-korenine	0,204	0,024	6-korenine	0,277	0,028
7-korenine	0,182	0,015	7-korenine	0,173	0,014
8-korenine	0,225	0,024	8-korenine	0,297	0,031
9-korenine	0,231	0,026	9-korenine	0,287	0,035
10-korenine	0,192	0,018	10-korenine	0,283	0,026
11-korenine	0,276	0,025	11-korenine	0,351	0,038
1-zgornji deli	0,518	0,059	1-zgornji deli	0,268	0,029
2-zgornji deli	0,324	0,037	2-zgornji deli	0,36	0,036
3-zgornji deli	0,388	0,04	3-zgornji deli	0,464	0,051
4-zgornji deli	0,465	0,047	4-zgornji deli	0,215	0,02
5-zgornji deli	0,396	0,044	5-zgornji deli	0,342	0,038
6-zgornji deli	0,376	0,043	6-zgornji deli	0,361	0,043
7-zgornji deli	0,359	0,04	7-zgornji deli	0,226	0,026
8-zgornji deli	0,42	0,045	8-zgornji deli	0,298	0,033
9-zgornji deli	0,478	0,054	9-zgornji deli	0,365	0,043
10-zgornji deli	0,352	0,041	10-zgornji deli	0,34	0,039
11-zgornji deli	0,6	0,07	11-zgornji deli	0,345	0,042
12-zgornji deli	0,401	0,053	12-zgornji deli	0,349	0,043

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2

Bakterijski izolat: NIB Z145			Bakterijski izolat: NIB Z146		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,53	0,054	1-korenine	0,341	0,047
2-korenine	0,701	0,079	2-korenine	0,593	0,056
3-korenine	0,697	0,062	3-korenine	0,408	0,039
4-korenine	0,513	0,043	4-korenine	0,591	0,072
5-korenine	0,533	0,075	5-korenine	0,537	0,047
6-korenine	0,559	0,059	6-korenine	0,486	0,043
7-korenine	0,863	0,086	7-korenine	0,423	0,044
8-korenine	0,532	0,046	8-korenine	0,483	0,042
9-korenine	0,689	0,069	9-korenine	0,476	0,045
10-korenine	0,664	0,066	10-korenine	0,339	0,026
11-korenine	0,732	0,064	11-korenine	0,763	0,063
1-zgornji deli	1,061	0,117	1-zgornji deli	0,717	0,071
2-zgornji deli	1,251	0,121	2-zgornji deli	1,228	0,128
3-zgornji deli	1,438	0,172	3-zgornji deli	1,291	0,142
4-zgornji deli	1,231	0,144	4-zgornji deli	1,241	0,129
5-zgornji deli	0,961	0,12	5-zgornji deli	1,258	0,142
6-zgornji deli	0,841	0,103	6-zgornji deli	1,045	0,121
7-zgornji deli	1,402	0,174	7-zgornji deli	0,884	0,108
8-zgornji deli	1,057	0,122	8-zgornji deli	1,095	0,126
9-zgornji deli	1,237	0,172	9-zgornji deli	0,892	0,104
10-zgornji deli	1,065	0,129	10-zgornji deli	0,691	0,076
11-zgornji deli	1,436	0,181	11-zgornji deli	1,324	0,157
12-zgornji deli	0,978	0,122	12-zgornji deli	1,153	0,133

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2

Bakterijski izolat: NIB Z148			Bakterijski izolat: NIB Z149		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,84	0,096	1-korenine	0,628	0,06
2-korenine	0,541	0,056	2-korenine	0,492	0,055
3-korenine	0,694	0,077	3-korenine	0,957	0,096
4-korenine	0,599	0,064	4-korenine	0,459	0,045
5-korenine	1,267	0,134	5-korenine	0,485	0,06
6-korenine	0,677	0,095	6-korenine	0,453	0,047
7-korenine	0,962	0,13	7-korenine	0,39	0,061
8-korenine	0,522	0,116	8-korenine	0,618	0,053
9-korenine	0,743	0,111	9-korenine	0,321	0,042
10-korenine	0,87	0,12	10-korenine	0,629	0,072
11-korenine	1,1	0,154	11-korenine	0,788	0,065
1-zgornji deli	1,857	0,259	1-zgornji deli	1,137	0,129
2-zgornji deli	1,365	0,184	2-zgornji deli	1,135	0,131
3-zgornji deli	1,968	0,238	3-zgornji deli	1,795	0,225
4-zgornji deli	1,348	0,157	4-zgornji deli	1,096	0,127
5-zgornji deli	2,459	0,319	5-zgornji deli	1,552	0,19
6-zgornji deli	1,267	0,162	6-zgornji deli	1,099	0,124
7-zgornji deli	1,719	0,222	7-zgornji deli	1,485	0,168
8-zgornji deli	1,207	0,161	8-zgornji deli	1,265	0,146
9-zgornji deli	1,614	0,22	9-zgornji deli	0,692	0,076
10-zgornji deli	1,907	0,266	10-zgornji deli	1,234	0,156
11-zgornji deli	2,474	0,327	11-zgornji deli	1,381	0,162
12-zgornji deli	1,714	0,22	/	/	/

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.2

Bakterijski izolat: NIB Z150			Bakterijski izolat: NIB Z157		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,585	0,084	1-korenine	0,353	0,033
2-korenine	0,708	0,067	2-korenine	0,326	0,042
3-korenine	0,839	0,081	3-korenine	0,342	0,034
4-korenine	0,737	0,08	4-korenine	0,239	0,025
5-korenine	0,647	0,068	5-korenine	0,453	0,052
6-korenine	0,532	0,046	6-korenine	0,468	0,043
7-korenine	0,591	0,064	7-korenine	0,502	0,045
8-korenine	0,383	0,059	8-korenine	0,264	0,019
9-korenine	0,583	0,068	9-korenine	0,254	0,034
10-korenine	0,446	0,06	10-korenine	0,482	0,048
11-korenine	0,824	0,088	11-korenine	0,459	0,042
1-zgornji deli	1,492	0,153	1-zgornji deli	0,906	0,104
2-zgornji deli	1,904	0,208	2-zgornji deli	0,77	0,09
3-zgornji deli	1,925	0,224	3-zgornji deli	0,783	0,081
4-zgornji deli	1,499	0,161	4-zgornji deli	0,62	0,065
5-zgornji deli	1,199	0,131	5-zgornji deli	0,881	0,095
6-zgornji deli	1,112	0,115	6-zgornji deli	0,876	0,102
7-zgornji deli	1,693	0,202	7-zgornji deli	1,039	0,12
8-zgornji deli	1,17	0,136	8-zgornji deli	0,568	0,066
9-zgornji deli	1,659	0,208	9-zgornji deli	0,58	0,06
10-zgornji deli	1,602	0,193	10-zgornji deli	0,914	0,102
11-zgornji deli	1,974	0,265	11-zgornji deli	0,855	0,094
12-zgornji deli	1,48	0,194	12-zgornji deli	0,845	0,093

Priloga G (Annexes G):

Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3

Negativna kontrola, pitna voda			Bakterijski izolat: NIB Z151		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,381	0,038	1-korenine	0,308	0,023
2-korenine	0,334	0,033	2-korenine	0,244	0,020
3-korenine	0,258	0,026	3-korenine	0,285	0,032
4-korenine	0,201	0,029	4-korenine	0,271	0,028
5-korenine	0,209	0,028	5-korenine	0,240	0,020
6-korenine	0,250	0,024	6-korenine	0,279	0,023
7-korenine	0,327	0,029	7-korenine	0,234	0,017
8-korenine	0,272	0,028	8-korenine	0,194	0,015
9-korenine	0,268	0,033	9-korenine	0,216	0,015
10-korenine	0,152	0,0140	10-korenine	0,228	0,017
11-korenine	0,374	0,032	11-korenine	0,239	0,024
1-zgornji deli	0,388	0,054	1-zgornji deli	0,310	0,030
2-zgornji deli	0,390	0,052	2-zgornji deli	0,295	0,045
3-zgornji deli	0,307	0,036	3-zgornji deli	0,241	0,031
4-zgornji deli	0,201	0,024	4-zgornji deli	0,275	0,035
5-zgornji deli	0,240	0,028	5-zgornji deli	0,253	0,032
6-zgornji deli	0,276	0,035	6-zgornji deli	0,235	0,029
7-zgornji deli	0,417	0,058	7-zgornji deli	0,168	0,020
8-zgornji deli	0,373	0,052	8-zgornji deli	0,250	0,029
9-zgornji deli	0,395	0,048	9-zgornji deli	0,235	0,026
10-zgornji deli	0,242	0,028	10-zgornji deli	0,173	0,017
11-zgornji deli	0,501	0,068	11-zgornji deli	0,252	0,029
12-zgornji deli	0,454	0,065	12-zgornji deli	0,165	0,019

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3

Bakterijski izolat: NIB Z152			Bakterijski izolat: NIB Z153		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,722	0,066	1-korenine	0,852	0,093
2-korenine	0,740	0,072	2-korenine	0,882	0,147
3-korenine	0,622	0,052	3-korenine	0,835	0,110
4-korenine	0,602	0,064	4-korenine	0,691	0,086
5-korenine	0,734	0,099	5-korenine	0,935	0,108
6-korenine	0,844	0,077	6-korenine	0,894	0,093
7-korenine	0,878	0,093	7-korenine	0,663	0,068
8-korenine	0,781	0,104	8-korenine	0,918	0,091
9-korenine	0,901	0,103	9-korenine	1,073	0,116
10-korenine	1,020	0,101	10-korenine	1,169	0,145
11-korenine	1,038	0,143	11-korenine	1,230	0,116
1-zgornji deli	1,060	0,147	1-zgornji deli	1,442	0,194
2-zgornji deli	1,009	0,130	2-zgornji deli	1,158	0,154
3-zgornji deli	0,982	0,135	3-zgornji deli	1,991	0,250
4-zgornji deli	1,072	0,151	4-zgornji deli	1,456	0,153
5-zgornji deli	1,131	0,143	5-zgornji deli	1,398	0,169
6-zgornji deli	1,367	0,173	6-zgornji deli	1,616	0,208
7-zgornji deli	1,672	0,223	7-zgornji deli	0,932	0,102
8-zgornji deli	1,398	0,174	8-zgornji deli	1,709	0,207
9-zgornji deli	1,731	0,215	9-zgornji deli	2,213	0,273
10-zgornji deli	2,058	0,244	10-zgornji deli	2,235	0,259
11-zgornji deli	1,475	0,198	11-zgornji deli	2,217	0,254
12-zgornji deli	1,291	0,170	12-zgornji deli	1,313	0,142

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3

Bakterijski izolat: NIB Z154			Bakterijski izolat: NIB Z155		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,459	0,038	1-korenine	0,264	0,029
2-korenine	0,505	0,057	2-korenine	0,472	0,047
3-korenine	0,591	0,055	3-korenine	0,674	0,061
4-korenine	0,529	0,062	4-korenine	0,622	0,066
5-korenine	0,384	0,038	5-korenine	0,585	0,055
6-korenine	0,464	0,044	6-korenine	0,710	0,079
7-korenine	0,732	0,070	7-korenine	0,850	0,108
8-korenine	0,338	0,049	8-korenine	0,475	0,043
9-korenine	0,483	0,049	9-korenine	0,568	0,073
10-korenine	0,540	0,049	10-korenine	0,844	0,086
11-korenine	0,485	0,038	11-korenine	0,617	0,068
1-zgornji deli	0,539	0,072	1-zgornji deli	0,387	0,045
2-zgornji deli	0,639	0,082	2-zgornji deli	0,660	0,080
3-zgornji deli	0,862	0,119	3-zgornji deli	0,906	0,103
4-zgornji deli	0,744	0,097	4-zgornji deli	0,847	0,108
5-zgornji deli	0,471	0,054	5-zgornji deli	0,725	0,087
6-zgornji deli	0,619	0,074	6-zgornji deli	0,910	0,111
7-zgornji deli	0,887	0,104	7-zgornji deli	1,212	0,148
8-zgornji deli	0,488	0,059	8-zgornji deli	0,720	0,084
9-zgornji deli	0,721	0,089	9-zgornji deli	0,828	0,103
10-zgornji deli	0,816	0,097	10-zgornji deli	1,473	0,171
11-zgornji deli	0,634	0,072	11-zgornji deli	1,106	0,134
12-zgornji deli	0,717	0,084	12-zgornji deli	1,035	0,129

se nadaljuje

nadaljevanje Podatki o svežih in suhih masah rastlin tretiranih z bakterijskimi izolati v presejalnem testu za PGPR učinek - podposkus C.3

Bakterijski izolat: NIB Z156			Bakterijski izolat: NIB Z147		
št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)	št. rastline-deli rastline	sveža masa (g)	suha masa (g)
1-korenine	0,696	0,076	1-korenine	0,207	0,018
2-korenine	0,643	0,059	2-korenine	0,146	0,011
3-korenine	0,727	0,073	3-korenine	0,337	0,024
4-korenine	0,410	0,042	4-korenine	0,258	0,020
5-korenine	0,724	0,069	5-korenine	0,293	0,027
6-korenine	0,507	0,064	6-korenine	0,220	0,022
7-korenine	0,841	0,089	7-korenine	0,369	0,050
8-korenine	0,637	0,067	8-korenine	0,271	0,030
9-korenine	0,694	0,076	9-korenine	0,295	0,043
10-korenine	0,647	0,060	10-korenine	0,285	0,038
11-korenine	0,958	0,097	11-korenine	0,284	0,026
1-zgornji deli	0,954	0,118	1-zgornji deli	0,255	0,032
2-zgornji deli	0,905	0,111	2-zgornji deli	0,198	0,026
3-zgornji deli	0,915	0,119	3-zgornji deli	0,420	0,054
4-zgornji deli	0,564	0,066	4-zgornji deli	0,345	0,048
5-zgornji deli	1,115	0,149	5-zgornji deli	0,419	0,056
6-zgornji deli	0,652	0,084	6-zgornji deli	0,241	0,033
7-zgornji deli	1,159	0,148	7-zgornji deli	0,477	0,056
8-zgornji deli	0,941	0,112	8-zgornji deli	0,360	0,045
9-zgornji deli	1,300	0,159	9-zgornji deli	0,417	0,056
10-zgornji deli	1,480	0,170	10-zgornji deli	0,327	0,040
11-zgornji deli	1,728	0,194	11-zgornji deli	0,369	0,052
12-zgornji deli	0,990	0,128	12-zgornji deli	0,323	0,043