

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 40/12-6.5.
Датум: 25.4.2012. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета" број 131/06), дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата мр ЈЕЛЕНЕ МАРИНКОВИЋ.

Кандидат **мр ЈЕЛЕНА (Бранко) МАРИНКОВИЋ**, пријавила је докторску дисертацију под називом: «Биохемијска и молекуларна карактеризација симбиозне заједнице соје (*Glycine max*. L.) и различитих сојева *Bradyrhizobium japonicum* у условима суше»,

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 7.12.2011. године, својим актом 02 број 06-8226/20 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «**БИОХЕМИЈСКА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИМБИОЗЕ СОЈЕ И РАЗЛИЧИТИХ СОЈЕВА *Bradyrhizobium japonicum* (Kihner) Jordan у УСЛОВИМА СУШЕ**»

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације мр ЈЕЛЕНЕ МАРИНКОВИЋ образована је на седници одржаној 21.3.2012. године, број 40/11-6.4., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Биљана Вуцелић-Радовић, редовни професор, биохемија,
2. др Слађана Станојевић, доцент, биохемија,
3. др Нада Милошевић, научни саветник, микробиологија,
4. др Драгана Јошић, виши научни сарадник, микробиологија,
5. др Радмила Стикић, редовни професор, физиологија гајених биљака.

Наставно-научно веће факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 25.4.2012. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Небојша Ралевић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 40/12-6.5.
Датум: 25.04.2012. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 73. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 25.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **мр ЈЕЛЕНА МАРИНКОВИЋ** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«БИОХЕМИЈСКА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИМБИОЗЕ СОЈЕ И РАЗЛИЧИТИХ СОЈЕВА *Bradyrhizobium japonicum* (Kirkner) Jordan у УСЛОВИМА СУШЕ»**

II Универзитет је дана **07.12.2011.** године, својим актом 02 број **06-8226/20** дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Balešević-Tubić, S., Đukić, V., **Marinković Jelena**, Dozet, G., Petrović, K., Tatić, M., (2011): African Journal of Microbiology Research, Vol. 5(27), pp. 4909-4916.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Небојша Ралевић)

Доставити: кандидату, ментору проф. др Биљани Вуцелић-Радовић, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

Наставно- научном већу
Пољопривредног факултета
Универзитета у Београду
Београд- Земун
22.03.2012.

Предмет: Извештај Комисије о урађеној докторској дисертацији Мр Јелене Маринковић

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, бр. 40/11-6.4. од 21.03.2012. године одређена је комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације коју је поднела **мр ЈЕЛЕНА МАРИНКОВИЋ**, под насловом **„БИОХЕМИЈСКА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИМБИОЗЕ СОЈЕ И РАЗЛИЧИТИХ СОЈЕВА *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan У УСЛОВИМА СУШЕ“**. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Јелене Маринковић написана је на 161 страници текста илустрованог са 72 слике и 10 табела. Прилог садржи 80 табела. Поред тога, теза садржи извод на српском и енглеском језику. Теза се састоји од следећих поглавља: *Увод* (стр. 1-2), *Преглед литературе* (стр. 3-26), *Циљ истраживања* (стр. 27), *Материјал и методе рада* (стр. 28-37), *Резултати* (стр. 38-87), *Дискусија* (стр. 88-108), *Закључак* (стр. 109-110), *Литература* (стр. 111-136), *Списак скраћеница* (стр. 137) и *Прилог* (стр. 138-161). У оквиру поглавља *Преглед литературе*, *Материјал и методе истраживања*, *Резултати* и *Дискусија* постоји више подпоглавља.

2. Приказ и анализа докторске дисертације

2.1. Увод

У уводу је укратко указано на значај биофертилизатора. Обзиром да је азот најзначајнији хранљиви елемент који ограничава принос гајених биљака, потрошња минералних азотних ђубрива је у сталном порасту. Скупа производња и негативне еколошке последице њихове примене истичу економски и еколошки значај симбиозне азотофиксације у пољопривреди. Примена симбиозних азотофиксирајућих бактерија у облику микробиолошких ђубрива, неопходна је мера у производњи легуминозних биљака. Ефекат примене биофертилизатора зависи од бактеријског соја, концентрације ћелија у инокулуму, агротехничких мера, биотичких и абиотичких фактора.

Суша је у свету један од најзначајнијих стресних фактора који ограничава биљну производњу. У нашој земљи, недостатак зимских падавина заједно са летњим сушним периодима смањује производњу и редукује принос гајених биљака. Соја, као једна од

најзначајнијих гајених легуминоза, осетљива је на недостатак влаге, а негативне последице суше одражавају се и на микросимбионте. Како би се превазишле негативне последице суше, стварају се толерантнији генотипови гајених биљака и побољшавају се агротехничке мере. Селекција ефективних сојева ризобиума толерантнијих на водни дефицит свакако је мера која може повећати азотофиксацију и унапредити производњу соје у условима суше.

2.2. Преглед литературе

Кандидаткиња је у овом поглављу, на основу консултовања савремене релевантне научне литературе која је блиско везана за циљ и предмет њене дисертације приказала резултате истраживања других аутора групишући их у шест потпоглавља и то: 2.2.1. Значај биолошке азотофиксације, 2.2.2. Формирање, грађа и функционисање квржица, 2.2.3. Утицај суше на симбиозну заједницу и азотофиксацију, 2.2.4. Селекција сојева толерантнијих на сушу, 2.2.5. Молекуларна карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum* и 2.2.6. PGPR карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum*.

У првом потпоглављу су укратко сумирана новија сазнања о значају биолошке азотофиксације и микросимбионтима соје. Напоменуто је да је примена микробиолошких ђубрива која садрже селекционисане и ефективне сојеве *Bradyrhizobium japonicum* уведена као редовна мера у гајењу соје. У другом потпоглављу приказано је успостављање и функционисање симбиозне заједнице између легуминоза и ризобиа које започиње молекуларном комуникацијом између биљке домаћина и бактерије. Детаљно је описана улога ензимских комплекса у фиксацији ваздушног азота. У следећем потпоглављу описан је утицај стресних фактора, посебно водног дефицита, на ефективност симбиозе и истакнута је одбрамбена улога антиоксидативних система које чине ензимски и неензимски антиоксиданти. Наредно потпоглавље говори о критеријумима и савременим методама које се користе у селекцији сојева толерантнијих на сушу. У следећем поглављу описани су досадашњи резултати молекуларне карактеризације генома сојева *Bradyrhizobium japonicum*. Последње потпоглавље обрађује механизми који омогућују ризосферним бактеријама да стимулишу раст биљака.

2.3. Циљ истраживања

Кандидат наводи да је циљ ове докторске дисертације био да се испита утицај суше на антиоксидативну активност у симбиозној заједници биљака соје комерцијалне сорте Мели и одабраних сојева симбиозних бактерија *Bradyrhizobium japonicum* различите толерантности на водни дефицит. Добијени резултати пружили би могућност сагледавања улоге бактеријског соја у антиоксидативној активности симбиозне заједнице. Имајући у виду да се значај симбиотске азотофиксације у пољопривредној производњи огледа у повећању фиксираниог азота и биљне масе, за циљ рада постављено је и испитивање утицаја бактеријског соја на ове параметре продуктивности.

Обзиром на изузетну осетљивост симбиозне заједнице на сушу и кључну улогу антиоксидативних система у условима стреса, истраживања су требала да обезбеде теоријску основу за даља истраживања у селекцији сојева толерантнијих на недостатак воде. Применом ових сојева могао би се смањити негативан утицај суше на азотофиксацију и постићи успешније везивање атмосферског азота у стресним условима спољашње средине.

Како сојеви из колекције Института за ратарство и повртарство нису до сада генетски окарактерисани, за циљ рада постављена су и молекуларно-генетичка истраживања којима би се показао диверзитет сојева.

2.4. Материјал и методе

У истраживањима су коришћени сојеви *Bradyrhizobium japonicum* из колекције Института за ратарство и повртарство из Новог Сада и комерцијална сорта соје Мели, 00 групе зрења селекционисана у Одсеку за соју, Института за ратарство и повртарство.

Сојеви *Bradyrhizobium japonicum* гајени су у течной манитној подлози са екстрактом квасца (YEM) (Vinsent, 1970) на оптималној температури 28°C. Толерантност сојева на сушу испитивана је додавањем различитих концентрација (9, 17, 24%) полиетиленгликол 6000 (PEG) у YEM подлогу (Rasanen *u cap.*, 2004). Раст сојева утврђен је преко броја формираних колонија (CFU) на агаризованој YEM подлози (YMA). Према способности раста у присуству различитих концентрација PEG-а, сојеви су разврстани у пет група и из сваке групе изабран је по један репрезентативни сој, којим ће се инокулисати семе соје.

Како би се биљкама обезбедили услови што приближнији условима у пољу, оглед је изведен у полуконтролисаним условима Одсека за соју, Института за ратарство и повртарство у Новом Саду, а као супстрат коришћено је стерилисано земљиште, типа чернозем (најчешћи тип обрадивог, пољопривредног земљишта у Војводини). Биљке су гајене у судовима, а семе је инокулисано одабраним сојевима *Bradyrhizobium japonicum*.

Између Р3 и Р5 фазе развоја соје, када је процес азотофиксације у квржицама најинтензивнији, биљке су изложене водном дефициту.

Оглед је постављан по случајном блок систему у три понављања и 20 варијанти - 5 сојева и 4 режима наводњавања. Примењена су 3 нивоа стреса суше: 80%, 65% и 55% пољског водног капацитета. Садржај влаге у земљишту одређиван је директно гравиметријском методом (Evet, 2008).

Након завршетка експеримента са корена биљака одстрањене су квржице и заједно са делом корена одмах замрзнуте у течном азоту и чуване на -80°C, за касније одређивање укупних растворљивих протеина и антиоксидативне активности. Надземни део биљке и остатак корена сушени су се на 50°C током 24 часа до константне масе, а затим је мерена маса суве материје биљаке. Методом AOAC 972.43:2000 Елементарном анализом, ELEMENTAR VARIO III, одређен је садржај азота у надземном делу биљака и корену.

Садржај растворљивих протеина у корену и квржицама одређен је стандардном методом по Lowry-у. Антиоксидативна активност у квржицама и корену биљака одређивана је преко укупне антиоксидативне активности, активности ензима пероксидазе и јонски везане пероксидазе ћелијског зида. Укупна антиоксидативна активност одређена је по методи Miller *u cap.* (1996), модификованој од стране Bohm *u cap.* (2002). Активност ензима пероксидазе одређена је спектрофотометријски.

Карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum* вршена је молекуларно-генетичком карактеризацијом. Молекуларна карактеризација обухватила је анализе засноване на PCR – методи ланчаног умножавања DNK. У оквиру гер-PCR анализа коришћени су прајмери ERIC, BOX и (GTG)₅, за RAPD карактеризацију коришћен је прајмер AP-10. Карактеризација сојева употпуњена је одређивањем нуклеотидне секвенце унутар 16S-23S интеррегиона.

Сви резултати обрађени су одговарајућим статистичким методама помоћу програма Statistica 8.0.

2.5. Резултати истраживања

Добијени резултати приказани су кроз девет потпоглавља. У целини посматрано, обимни резултати ове дисертације су веома прегледно и на правилан начин приказани, а такође студиозно анализирани и интерпретирани.

2.5.1. Селекција сојева *Bradyrhizobium japonicum* према толерантности на осмотски стрес

У овом потпоглављу приказани су резултати испитиваних сојева *Bradyrhizobium japonicum* у реакцији на осмотски стрес изазван полиетиленглоколом, на основу којих је извршен избор сојева за постављање огледа.

2.5.2. Утицај нивоа суше на биохемијске параметре у квржицама и корену соје

У овом потпоглављу приказани су двогодишњи резултати одређивања активности слободне пероксидазе, јонски везане пероксидазе ћелијског зида, антиоксидативне активности и садржаја растворљивих протеина у квржицама и корену соје, при различитим интензитетима суше.

2.5.3. Утицај нивоа суше на параметре ефективности азотофиксације

У овом поглављу приказани су двогодишњи резултати одређивања садржаја азота и масе суве материје надземног дела биљке, корена и целе биљке соје при различитим интензитетима суше.

2.5.4. Утицај сојева *Bradyrhizobium japonicum* на биохемијске параметре у квржицама и корену биљка соје

У овом потпоглављу приказани су двогодишњи резултати утицаја примењених сојева *Bradyrhizobium japonicum* на активност слободне пероксидазе, јонски везане пероксидазе ћелијског зида, антиоксидативну активност и садржаја растворљивих протеина у квржицама и корену соје.

2.5.5. Утицај сојева *Bradyrhizobium japonicum* на параметре ефективности азотофиксације

У овом потпоглављу приказани су двогодишњи резултати утицаја примењених сојева *Bradyrhizobium japonicum* на промене садржаја азота и масе суве материје надземног дела биљке, корена и целе биљке соје.

2.5.6. Утицај нивоа суше и сојева *Bradyrhizobium japonicum* на биохемијске параметре у квржицама и корену биљака соје

У овом потпоглављу приказани су двогодишњи резултати утицаја примењених сојева *Bradyrhizobium japonicum* на активност слободне пероксидазе, јонски везане пероксидазе ћелијског зида, антиоксидативну активност и садржаја растворљивих протеина у квржицама и корену соје, при испитиваним нивоима суше.

2.5.7. Утицај нивоа суше и сојева *Bradyrhizobium japonicum* на параметре ефективности азотофиксације

У овом потпоглављу приказани су двогодишњи резултати утицаја примењених сојева *Bradyrhizobium japonicum* на промене садржаја азота и масе суве материје надземног дела биљке, корена и целе биљке соје, при испитиваним нивоима суше.

2.5.8. Молекуларна карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum* PCR методом

Ово потпоглавље обухвата молекуларну карактеризацију испитиваних сојева коришћењем различитих PCR метода: анализу насумично умножене полиморфне ДНК (RAPD) и анализу репетитивних елемената (rep-PCR). У оквиру rep-PCR упоређивани су профили добијени умножавањем помоћу ERIC сета прајмера и два BOX прајмера (BOX A1R и GTG₅). Појединачне амплификације резултовале су профилима са различитим степеном сличности изолата при анализи информативних продуката до 3000 базних парова. Коефицијенти сличности добијени комбинованом анализом у оквиру rep-PCR упоређени су са коефицијентима сличности на основу амплификације AP10 прајмером у оквиру RAPD.

Као додатни параметар, коришћењем сета прајмера FGPS1490/ FGPS132'-38 амплификовани су интергенски региони (ITS) између 16S rDNA и 23S rDNA рибозомалних гена, као мање конзервативни региони који могу допринети бољој процени генетичких разлика између сојева. Секвенце су после секвенцирања упоређене међусобно, као и са секвенцама из GenBank – NCBI базе података.

2.5.9. PGPR карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum*

Испитивање особина ризобактерија које условљавају стимулацију раста биљака (PGPR) обухватило је продукцију сидерофора, солубилизацију две врсте нерастворних фосфата и способност хидролизе урее.

2.6. Дискусија резултата

Дискусија резултата изложена је у шест потпоглавља. Дискусију је водила правилно, објашњавајући своје резултате савременим сазнањима и упоређујући их са резултатима других аутора.

2.6.1. Толерантност сојева ризобиума према осмотском стресу

У условима водног дефицита код *Bradyrhizobium japonicum* повећава се експресија гена који кодирају ензиме укључене у синтезу трехалозе, антиоксидативних ензима, хит-шок протеина, протеина који штите ћелијску мембрану, ензима одговорних за модификацију нуклеинских киселина, синтезу и транспорт егзополисахарида. Специфичне разлике у структури и експресији ових гена могу објаснити утврђене разлике у толерантности сојева исте врсте ризобиа на услове водног дефицита. Најтолерантнији на осмотски стрес био је сој D216, чији је раст смањен за 13%, а најосетљивији сој 511 са смањењем раста за 97%.

2.6.2. Утицај суше и примењених сојева *Bradyrhizobium japonicum* на параметре ефективности азотофиксације

Преко масе суве материје и концентрације азота у надземном делу биљке и корену, испитивана је ефективност примењених сојева, а разлике између биљака инокулисаних различитим сојевима *Bradyrhizobium japonicum* показују да је примењени сој значајно утицао на азотофиксацију код биљака соје. Биолошка азотофиксација главни је извор азота за легуминозе, чиме је директно повезана са масом суве материје биљке, на шта указује висока позитивна корелација између ова два параметра, што потврђују и резултати добијени у овим истраживањима. Маса суве материје надземног дела и целе биљке у позитивној је корелацији са концентрацијом азота у надземном делу и креће се од 54% до 64%, у зависности од године, што указује на значајну повезаност ова два параметра. Ова истраживања су показала да је у условима суше маса суве материје и садржај азота у биљкама зависила од примењеног соја *Bradyrhizobium japonicum*. Обе године истраживања, применом сојева 3, 6 и 518 маса биљака значајно се смањила после пет дана суше, док се код биљака које су инокулисане сојевима D216 и 511 маса значајно смањује тек после седам дана. Седам дана водног дефицита најмање је утицало на масу биљака које су инокулисане сојем D216. У условима стреса, обе године, најмање азота у надземном делу и корену имале су биљке инокулисане сојем 511.

2.6.3. Утицај суше и сојева *Bradyrhizobium japonicum* на биохемијске параметре у квржицама и корену соје

Резултати ових истраживања показали су да је у квржицама и корену биљака на активност пероксидазе у условима суше значајно утицао примењени сој ризобиа. Из добијених резултата не може јасно издвојити сој који је обе године у условима стреса и у квржицама и корену имао највећу пероксидазну активност. Међутим, одређена правилност

запажа се у квржицама и корену биљака инокулисаних сојем 511 које су условима суше показале ниску активност слободне пероксидазе.

У првој години није забележена корелација између активности слободне пероксидазе у квржицама и корену биљака, док је у другој години степен корелације између ових параметара 45%. Корелације у активности јонски везане пероксидазе квржица и корена, у првој години, није било, док је у другој години степен корелације 33%. Сличан однос, у активности слободне и јонски везане пероксидазе, указује на повезну активност фракција овог ензима. Ова веза потврђује се и високим степеном корелације између активности слободне и јонски везане пероксидазе у квржицама, 74% у првој и 55% у другој години. Одређена зависност у активности ових ензима постоји и у корену, али је нижа него у квржицама, у првој години степен корелације је 32%, а у другој 37%. Између укупне антиоксидативне активности у квржицама и активности слободне и јонски везане пероксидазе постоји значајна корелација која се креће од 30% до 52% у зависности од године. Слична корелација забележена је и у корену, где је корелација варијала од 23% до 55%. Ове значајне корелације између активности ензимских антиоксиданата и способности неутралисања слободних радикала указују на повезан антиоксидативни одговор биљака у условима стреса. Повећан садржај протеина у условима стреса може се објаснити синтезом протеина који учествују у антиоксидативном одговору биљке и акумулацијом протеина укључених у адаптацију на услове суше, што потврђује значајна корелација између садржаја протеина и активности слободне и везане пероксидазе у корену и квржицама. У одбрамбеном одговору корена и квржица учествују и ензими и протеини који нису били укључени у ова истраживања, али значајно повећање садржаја протеина указује да се у стресним условима повећала синтеза ових антиоксиданата.

2.6.4. Молекуларна карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum*

Молекуларна карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum* је показала да је сваки сет прајмера детектовао одређене разлике у геному испитиваних сојева. У оквиру гер-PCR комбиновани резултати добијени BOX A1R, GTG₅ и ERIC прајмерима потврдили су јасно издвајање соја D216 као и при појединачним анализама. Велика генетска удаљеност соја D216 утврђена је и на основу RAPD методе и анализе секвенци ITS региона. Највећу сличност соју D216 испољио је 518, што се потврдило и при биохемијској карактеризацији сојева у симбиозној заједници. Све коришћене молекуларне технике установиле су највећу генетску удаљеност између сојева D216 и 511, што је у складу са разликама на биохемијском нивоу у условима суше и ефективности сојева.

Парцијалне секвенце ITS региона депоноване су под бројевима JQ818426 - JQ818430 у GenBank – NCBI и упоређене са секвенцама из те базе података нуклеотидних секвенци. Утврђена је хомологија сојева 3, 6, 511 и 518 са депонованим секвенцама сојева који припадају *Bradyrhizobium japonicum*. Поред сличности са *Bradyrhizobium japonicum*, установљен је висок степен сличности соја 216 са већим бројем некултурабилних *Bradyrhizobium* sp. клоновима, али не и са сојевима 3, 6, 511 и 518.

2.6.5. PGP карактеризација сојева *Bradyrhizobium japonicum*

У оквиру карактеризације сојева испитане су особине које доприносе стимулацији раста биљака и бољој еколошкој адаптабилности. Установљено је да су сојеви испољили слабу фосфосолубилизациону способност: само сој 518 вршио је солубилизацију трикалцијум фосфата, док је солубилизација гвожђе (II) фосфата изостала. Иако су сви сојеви слабије расли на уреа агар медијуму, хидролиза уреје забележена је само код сојева 511 и 518.

Продукција сидерофора на CAS агару није детектована. Најбоља адаптабилност и PGP особине установљене су код соја 518.

2.6.6. Селекција ефективних сојева, толерантнијих на сушу

У течној култури осмотски стрес изазван PEG-ом најмање је утицао на преживљавање и раст соја D216, високу толерантност показао је и сој 518, а сој 511 показао се као најосетљивији. Поједини сојеви су се издвојили по високим односно ниским антиоксидативним карактеристикама и концентрацији протеина у корену и квржицама у условима суше. Према већини испитиваних параметара као најефикасији показали су се сој D216 у квржицама и сој 518 у корену, док се сој 511 и у квржицама и у корену издвојио као најмање ефикасан. Ефективност сојева одређена је на основу масе суве материје и концентрације азота у надземном делу и корену биљака. У надземном делу и корену сој 511 показао се као најмање ефикасан, сој D216 показао је најбољу ефективност у наземном делу биљке, док је сој 3 имао већи ефекат у корену. Резултати указују да сојеви са високом толерантношћу на осмотски стрес у култури задржавају своје особине и у симбиози у условима стреса. Резултати молекуларне карактеризације сојева, указују на велику генетску удаљеност соја D216 од осталих сојева. највећа генетска удаљеност забележена је између сојева D216 и 511, што је потврђено разликама на биохемијским нивоу у условима суше и у ефективности ових сојева. По молекуларно-генетичким анализама најближи соју D216 био је сој 518, што се потврдило и у биохемијској карактеризацији сојева у симбиозној заједници.

2.7. Закључак

У закључном разматрању докторант, сумирајући резултате, истиче важније сегменте рада међу којима се посебно могу издвојити следећи ставови.

Између сојева *Bradyrhizobium japonicum* установљене су значајне разлике у реакцији на осмотски стрес изазван полиетиленглоколом. Најтолерантнији на осмотски стрес био је сој D216, чији је раст смањен за 13%, а најосетљивији сој 511 са смањењем раста за 97%.

Стрес суше је утицао на значајно смањење биомасе надземног дела биљке соје у обе испитиване године. Најмању масу суве материје надземног дела, имале су биљке инокулисане сојем 511, док се маса биљака инокулисаних сојевима 3, 6, 518 и D216 није значајно разликовала. Биомаса корена у условима водног дефицита повећала се у односу на контролу у обе године. Најмању масу корена имале су биљке инокулисане сојем 511, у обе године.

Садржај азота у надземном делу биљака значајно је опао у обе године при 80% влажности земљишта, док је при 55% влажности био на нивоу контролираних биљака. Најнижи проценат азота имао је надземни део биљака инокулисаних сојем 511 у обе године. У другој години, значајно више азота у надземном делу имале су биљке инокулисане сојем D216. Садржај азота у корену, значајно је повећан у поређењу са контролним биљкама у обе године при свим нивоима влажности. Најнижи проценат азота у обе године имао је корен биљака инокулисаних сојем 511, а највиши сојем 518.

Стрес суше је у обе године утицао на повећање ензимске активности слободне пероксидазе, пероксидазе ћелијског зида, антиоксидативне активности и на повећање садржаја растворљивих протеина у квржицама и корену.

Инокулација различитим сојевима значајно је утицала на активност слободне пероксидазе, пероксидазе ћелијског зида, антиоксидативну активност и садржај растворљивих протеина у квржицама и корену. Примењени сој имао је већи утицај на

испитиване параметре код биљака које су биле изложене водном дефициту него код биљака које су биле оптимално обезбеђене водом. На основу добијених резултата не може се издвојити сој који је обе године у условима стреса суше и у квржицама и корену условио највишу пероксидазну активност. Међутим, утврђена је правилност за квржице и корен биљака инокулисаних сојем 511 код којих је у условима водног дефицита измерена најнижа активност слободне и јонски везане пероксидазе. Висока антиоксидативна активност и висок садржај протеина утврђена је у квржицама биљака инокулисаних сојем D216 и у корену биљака инокулисаних сојем 518. Висок садржај протеина у квржицама и корену утврђен је код биљака инокулисаних сојем D216, а низак код биљака инокулисаних сојем 511. Сојеви са високом односно ниском толерантношћу на осмотски стрес у култури задржали су своје особине и у симбиози у условима стреса суше.

Значајан степен корелације између активности слободне и јонски везане пероксидазе у квржицама и корену указује на повезну активност фракција овог ензима. Значајне корелације између антиоксидативне активности и активности слободне и јонски везане пероксидазе, у квржицама и корену, указују на повезан антиоксидативни одговор и код биљака и код симбиозе у условима стреса суше.

Коришћењем различитих молекуларних техника базираних на PCR методологији, које обухватају више нивоа анализе генома (RAPD и гер-PCR) или специфичних нуклеотидних секвенци (ITS регион), установљена је велика генетичка дивергентност соја D216 у односу на остале испитиване сојеве. RGP особине које издвајају сој 518, већа сличност соју D216 од осталих сојева и биохемијске особине у симбиозној заједници, потенцирају примену сојева D216 и 518 у условима суше.

2.8. Литература

Приликом избора теме, експерименталног рада и писања тезе, консултована је обимна инострана и домаћа литература и цитирано је укупно 246 литературних података.

2.9. Списак скраћеница

Ово поглавље садржи детаљно објашњење скраћеница које су коришћене при писању дисертације.

2.10. Прилог

У прилогу је табеларно приказана вероватноћа разлика аритметичких средина свих испитиваних хемијских и биохемијских параметара, а такође су дате корелације између примењених варијанти огледа.

3. Закључак и предлог комисије

Докторска дисертација мр Јелене Маринковић представља оригиналну, самосталну и заокружену научно-истраживачку целину.

Примењујући одговарајуће савремене инструменталне методе мр Јелене Маринковић је у оквиру постављеног циља и програма рада успешно обавила експериментални део истраживања, што је и документовала у резултатима дисертације. Дискусију резултата водила је успешно, коментаришући своје резултате са резултатима до којих су дошли други аутори. На основу изнесених експерименталних података и њихове дискусије изведени су исправни и научно доказани закључци о природи биохемијских и физиолошких промена у условима суше у биљци соје и у симбиози са различитим сојевима *Bradyrhizobium japonicum*. Установљена је различита отпорност испитиваних сојева *Bradyrhizobium japonicum* на осмотски стрес. Поред утицаја соја, установила је значајне корелације између антиоксидативне активности и активности слободне и јонски везане пероксидазе, у квржицама и корену, које указују на повезан антиоксидативни одговор биљака и симбиозе у условима стреса суше.

Коришћењем различитих молекуларних техника базираних на PCR методологији, које обухватају више нивоа анализе генома (RAPD и гер-PCR) или специфичних нуклеотидних секвенци (ITS регион), установљена је велика генетичка дивергентност соја D216 у односу на остале испитиване сојеве. Особине стимулатора раста биљака, које издвајају сој 518, већа сличност соју D216 од осталих сојева и биохемијске особине у симбиозној заједници, потенцирају примену сојева D216 и 518 у условима суше.

Мр Јелена Маринковић је у потпуности обавила истраживања планирана одобреном пријавом докторске дисертације. Дисертација је писана веома јасним стилом. Технички је веома добро организована и опремљена.

Оцењујемо да ова дисертација представља заокружену научну целину која даје теоријске основе за селекцију и примену ефективних сојева *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan који су отпорнији на стрес суше.

Сматрамо да је проблематика коју је докторанткиња одабрала, експериментално испитала и обрадила у поднетој дисертацији веома значајна, а добијени резултати и њихово тумачење представљају запажени допринос науци и пракси.

Имајући у виду све изнето, комисија позитивно оцењује докторску дисертацију **мр Јелене Маринковић** под насловом: „**Биохемијска и молекуларна карактеризација симбиозе соје и различитих сојева *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan у условима суше**“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета да прихвати предложену позитивну оцену и тиме омогући кандидаткињи да пред истом комисијом јавно брани свој рад.

Комисија:

Др Биљана Вуцелић-Радовић, редовни професор
Пољопривредни факултет-Универзитет у Београду

Др Слађана Станојевић, доцент
Пољопривредни факултет-Универзитет у Београду

Др Нада Милошевић, научни саветник
Институт за ратарство и повртарство у Новом Саду
у пензији

Др Драгана Јошић, виши научни саветник
Институт за земљиште у Београду

Др Радмила Стикић, редовни професор
Пољопривредни факултет-Универзитет у Београду

Прилог

Докторанткиња мр Јелена Маринковић је објавила један рад у часопису категорије М₂₃. Приложена је копија прве стране рада и цео рад у електронској форми (pdf format).

Balešević-Tubić, S., Đukić, V., Marinković, J., Dozet, G., Petrović, K., Tatić, M., (2011) African Journal of Microbiology Research, vol. 5(27), pp. 4909-4916.

Importance of microbiological fertilizer used in soybean production: Agronomical and biological aspects

Svetlana Balešević-Tubić¹*, Vojin Đukić¹, Jelena Marinković¹, Gordana Dozet², Kristina Petrović¹ and Mladen Tatić¹

¹Institute of Field and Vegetable Crops, M. Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia.

²Faculty of Biofarming, Marsala Tita 39, 24300 Bačka Topola, Serbia.

Accepted 30 September, 2011

Inoculation is the best way to ensure good nodulation with the proper strain of nitrogen-fixing bacteria for increased yield in an environmentally safe manner. This investigation was conducted on three-year experiment which was set up in four replications with three-crop rotation (maize-soybean-wheat) at experimental field of the Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia. Effects of application of microbiological fertilizer (with nitrogen-fixing bacteria *Bradyrhizobium japonicum*) on root mass, number and mass of nodes per plant, soil biogeneity (number of ammonifiers, *Azotobacter*, actinomycetes), as well as the effect on soybean yield were studied. Obtained results indicated positive impact of inoculation on nitrogen fixation parameters. The higher amounts of mineral nitrogen had negative impact on atmospheric nitrogen fixation, that is, by increasing preplanting mineral nitrogen amount in the soil by 1 kg, the amount of calculated nitrogen from the air was decreased by 1.72 kg. Increasing abundance of studied microorganisms in the rhizosphere, as well as soybean yield using microbiological fertilizer was stimulated by plowing under crop residues. The impact of meteorological conditions on the effects of inoculation was very significant.

Key words: Inoculation, fertilizing, nitrogen fixation, soybean, microorganisms, yield.

*Corresponding author. E-mail: svetlana.tubic@ifvcns.ns.ac.rs. Tel/Fax: +381 21 4898488.