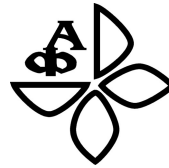




UNIVERZITET U  
KRAJUJEVCU  
AGRONOMSKI FAKULTET U  
ČAČKU



UNIVERSITY OF  
KRAJUJEVAC  
FACULTY OF  
AGRONOMY  
ČAČAK

---

# XXVII SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA -



---

Čačak, 25 - 26. mart 2022. godine

## POTENCIJAL RIZOSFERE SOČIVICE (*LEMNA MINOR* L.) ZA PRODUKCIJU AUKSINA BAKTERIJSKOG POREKLA

*Olga Radulović<sup>1</sup>, Tatjana Popržen<sup>1</sup>, Marija Marković<sup>1</sup>*

**Izvod:** Cilj ovog rada je bila analiza rizosfere sočivice kao mesta aktivne produkcije auksina bakterijskog porekla, primarno indol-3-acetatne kiseline (IAA). Produkcija IAA je testirana na 21 različitom bakterijskom soju. Četiri bakterijska soja: *Pseudomonas oryzae* 15, *Pseudomonas putida* 23, *Hafnia paralvei* 43 i *Pseudomonas yamanorum* 47 odabrana su na osnovu povećane produkcije IAA u odnosu na ostale testirane sojeve. Ovi sojevi su pokazali neprekinutu produkciju IAA i pod nepovoljnim uslovima: u kiseljoj i baznoj sredini, kao i u hipersalinoj sredini. Naši rezultati sugerišu da ovi sojevi mogu imati biotehnošku primenu u zaštiti biljaka i povećanju prinosa putem produkcije auksina kao centralnih regulatora rasta i razvića biljaka.

**Ključne reči:** auksini, indol-3-acetatna kiselina, bakterije, sočivica, stres

### Uvod

Auksini, čiji je glavni predstavnik indol-3-acetatna odnosno indol-3-sirćetna kiselina (IAA), značajni su regulatori rasta i razvića biljaka (Saini i sar. 2013). S obzirom na klimatske promene koje su obeležile početak 21. veka, raste potreba za primenom prirodnog regulisanja rasta biljaka kako bi se umanjio negativan efekat na životnu sredinu (Shah i sar. 2021). Nagle klimatske promene podrazumevaju globalno povećanje temperature vazduha, zemlje i vode, i promene pH vrednosti i saliniteta zemljišta i vode (Ullah i sar. 2021). Povišene temperature imaju izrazitiji efekat na biljke u reproduktivnoj, nego u vegetativnoj fazi, te stoga globalno zagrevanje može smanjiti prinose i do 90% u odnosu na normalni temperaturni režim (Hatfield i Prueger, 2015).

Svi ovi faktori uglavnom deluju istovremeno, drastično smanjujući prinose, što predstavlja ozbiljan egzistencijalni i ekonomski izazov, pogotovo u zemljama u razvoju (Shah i sar. 2021, Ullah i sar. 2021).

Kao prirodni regulatori rasta biljaka mogu se iskoristiti korisne bakterije koje naseljavaju neposrednu okolinu biljaka, pogotovo korena. Ove nepatogene bakterije imaju direktne i indirektne pozitivne efekte na rast biljaka, koje ostvaruju putem: produkcije jedinjenja koja deluju kao fitohormoni (auksini, giberelini, citokinini, jasmonati, i sl.); azotofiksacije; pretvaranja fosfornih jedinjenja, kao i gvožđa i cinka, u oblik dostupan biljkama; antimikrobnih faktora koji usporavaju

---

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Bulevar Despota Stefana 142, Beograd, Srbija (olga.radulovic@ibiss.bg.ac.rs)

rast nepoželjnih, patogenih mikroorganizama (Shah i sar. 2021). U biotehnologiji, bakterije se koriste i u svrhu bioremedijacije – uklanjanja štetnih jedinjenja iz životne sredine, i to često u sinergiji sa biljkama (Radulović i sar. 2020). Stoga se sve više istraživanja usmerava ka izučavanju složenih interakcija bakterija i biljaka i identifikaciji korisnih bakterijskih sojeva sa mogućom primenom u agrikulturni.

Rizosfera je neposredno okruženje korena biljaka koje je definisano visokom metaboličkom aktivnošću korena biljke i mikroorganizama koji ulaze u privremene ili trajne interakcije sa korenom biljke. U biotehnološkim istraživanjima, sve više se koriste vrste iz porodice sočivica, pre svega, mala sočivica (*L. minor* L.) kao idealni model organizam (Acosta i sar. 2021). Prednost ove vodene vrste je brza multiplikacija, jednostavna manipulacija *in vitro*, pojednostavljena morfologija i vegetativna reprodukcija, kao i sposobnost preživljavanja u vrlo nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, što podrazumeva i imunitet prema različitim mikroorganizmima i preživljavanje u veoma zagađenim vodama.

U ovom radu, kod 21 različitog bakterijskog soja izolovanog iz rizosfere sočivice (*L. minor* L.) testirana je sposobnost produkcije IAA kako bi se analizirali neki aspekti biotehnološke primenljivosti rizosfere kao izvora bakterijskih auksina.

### Materijal i metode rada

**Održavanje bakterijskih kultura** Štokovi bakterijskih kultura održavani su u Luria-Bertani (LB) podlozi sa 30% glicerola na temperaturi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Privremene kulture bakterija korišćenih u eksperimentima održavane su na LB agaru, kao što je opisano prethodno (Radulović i sar. 2020).

#### Ekperiment sa rastom bakterija pod različitim uslovima

Svi sojevi (ukupno 21) su uzgajani u neutralnoj (pH 7.0) LB tečnoj podlozi na temperaturama od  $+28\text{ }^{\circ}\text{C}$  koja predstavlja temperaturni optimum za bakterije izolovane iz prirodne sredine. Najbolji proizvođači IAA pod ovim uslovima su izabrani za dalje eksperimente. Kao referentan soj za izraženu produkciju IAA izabran je *Pseudomonas oryzae*, soj 15, jer je ova vrsta poznata po sposobnosti sinteze različitih indolnih jedinjenja, uključujući i IAA (Leontidou i sar. 2020). Izabrani bakterijski sojevi su uzgajani tokom  $72\text{ h}$  pri temperaturi od  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  i rotaciji od 180 rpm u tečnoj LB podlozi sa različitim karakteristikama: 1) pH 4.5 2) pH 7.0 3) pH 9.0 4) u LB tečnoj hipersalinoj podlozi (sa 10 puta većom koncentracijom natrijum-hlorida u odnosu na standardnu LB podlogu) 5) u LB tečnoj podlozi sa 0.1% triptofana koji služi kao prekursor za sintezu IAA i 6) na  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

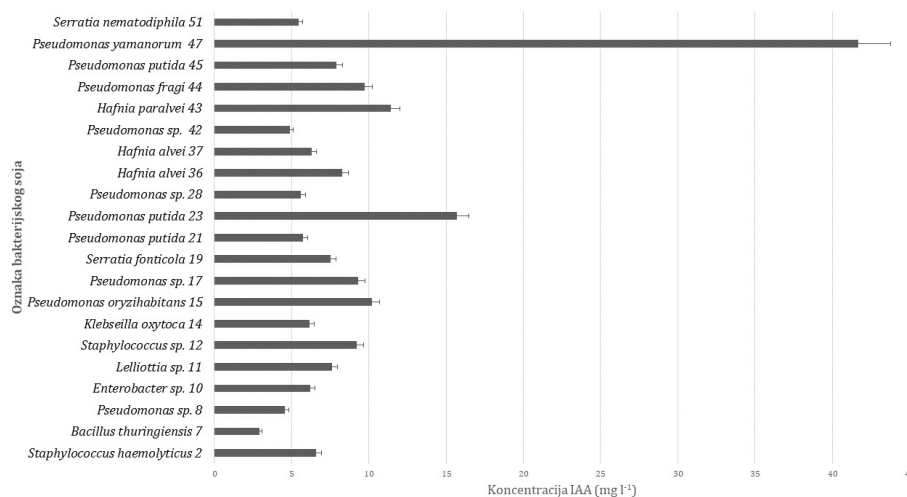
**Kvantifikacija bakterijske IAA** izvodi se spektrofotometrijskim merenjem obojenog hemijskog kompleksa koji nastaje posle dodavanja Salkowski reagensa (gvožđe (III) hlorid, 70% perhlorna kiselina) uzorku, u odnosu 1:2. Kvantifikacija je izvedena na mikrotitarskoj ploči (Sarwar i Kremer, 1995). Ukratko, 100  $\mu\text{l}$  supernatanta je pomešano sa 200  $\mu\text{l}$  Salkowski reagensa i reakcija je obavljena u mraku na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Posle ovog perioda, apsorbance su

očitanje na 530 nm. Koncentracije IAA su određene na osnovu standardne krive sa poznatim koncentracijama IAA i predstavljene grafički. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost 3 merenja ± standardnu grešku.

Statistička analiza rezultata obavljena je u programu GraphPad Prism, verzija 9.3.1. Statistički značajne razlike uzete su pri  $p < 0.05$ . Statistička značajnost izračunata je pomoću jednosmernog ANOVA testa.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Od 21 testiranog soja, svi su proizveli detektabilnu količinu IAA u LB hranljivoj podlozi bez dodatog triptofana, pri temperaturi od +28 °C (Graf. 1).



Graf. 1. Koncentracija IAA (mg l<sup>-1</sup>) proizvedena od strane testiranih bakterijskih sojeva

Graph. 1. IAA concentration (mg l<sup>-1</sup>) produced by tested bacterial strains

Samo još 3 soja su proizvela veću koncentraciju IAA od referentnog soja, *P. oryzae* 15: *Pseudomonas putida* 23, *Hafnia paralvei* 43 i *Pseudomonas yamanorum* 47.

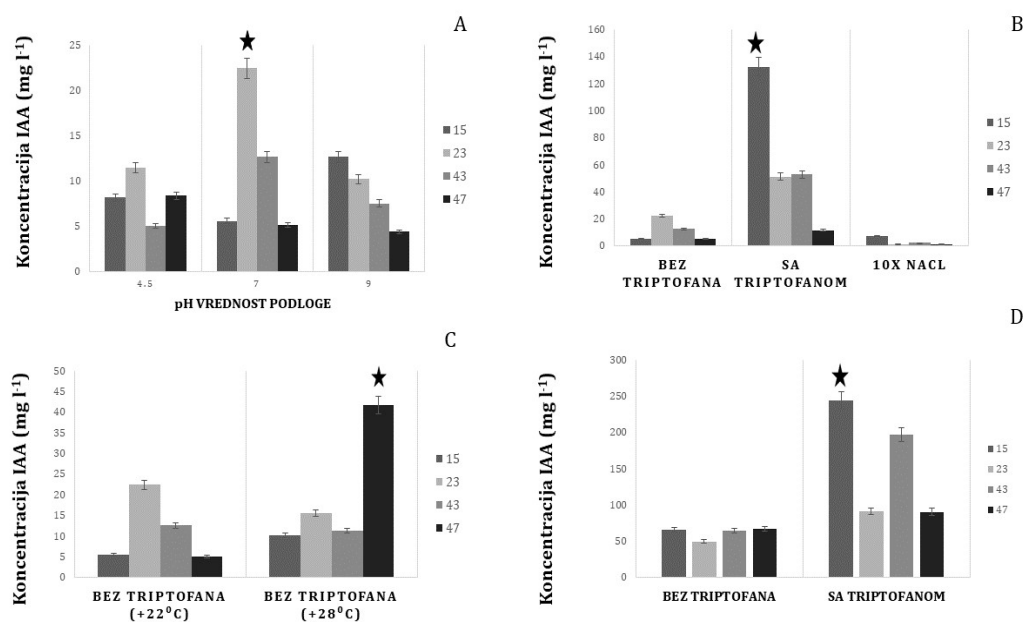
S obzirom da se auksini smatraju ključnim za razvoj korena, pridaje im se ogroman značaj u poboljšanju preživljavanja nepovoljnih uslova spoljašnje sredine kod biljaka (Saini i sar. 2013). Iako većina testiranih bakterijskih sojeva u ovom radu (80%) ne proizvodi veće količine IAA, poznato je da IAA čak i pri niskim koncentracijama utiče na regulaciju genske ekspresije kod biljaka i time kontroliše odgovor na različite uslove životne sredine (Gomes i Scortecchi, 2021).

Kiselost, odnosno baznost sredine značajno deluje na produkciju IAA, i to kod soja 23, *P. putida*. Optimalna pH vrednost sredine za ovaj soj je 7 (Grafikon 2A). Iako je za većinu mikroorganizama optimum za produkciju IAA oko pH 7, pojedine bakterijske vrste pokazuju efikasniju produkciju u baznoj ili kiseljoj sredini (Leontidou i sar. 2020).

Triptofan je značajno povećavao produkciju IAA, i to posebno kod soja 15, vrste *P. oryzae* i na temperaturi od +37 °C (Graf. 2B i 2D). Triptofan-zavisni metabolizam auksina je glavni put sinteze ovih fitohormona (Naveed i sar. 2015). Kako se u bogatoj hranljivoj podlozi kao što je LB podloga nalazi izvesna količina triptofana, u našim eksperimentima bile su uključene i podloge bez i sa triptofanom.

Hipersalinitet (100 g l<sup>-1</sup> NaCl) bio je izrazito štetan za izabrane bakterijske sojeve. Uprkos tome, detektovana je IAA, pogotovo kod *P. oryzae*, soj 15 (Graf. 2B). U prethodnim studijama, *P. oryzae* je opisan kao bakterija rizosfere halofita, biljaka slanih zemljišta (Leontidou i sar. 2020).

Temperature od +28 °C i +37 °C povećavale su produktivnost sojeva u odnosu na +22 °C (Graf. 2C i 2D). Maksimum produktivnosti postignut je sa dodatim triptofanom na +37 °C (Graf. 2D). S obzirom da su testirane bakterije poznate kao mezofili (metabolički aktivne u opsegu od +10 do +45 °C), ovo je bio očekivan rezultat.



Graf. 2. Bakterijska produkcija IAA pod različitim uslovima rasta  
*Graph. 2. Bacterial production of IAA under different growth conditions*

A – u kiseloj (4.5), neutralnoj (7) i baznoj (9) sredini; B – sa dodatim triptofanom; bez triptofana; sa dodatim NaCl (100 g l<sup>-1</sup>); C – bez triptofana na +22 °C i na +28 °C; D – bez triptofana i sa triptofanom na +37 °C. Eksperimenti su izvedeni na na +22 °C osim kada je naznačeno drugačije. Legenda: oznake testiranih bakterijskih sojeva (15 – *P. oryzae*, 23 – *P. putida*, 43 – *H. paralvei*, 47 – *P. yamanorum*). Statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) označene su pomoću \*. Statistička značajnost izračunata je pomoću jednosmernog ANOVA testa.

## Zaključak

U predstavljenom radu, identifikovana su 4 bakterijska soja sa izraženom produkcijom IAA. Ovaj fitohormon ima ogroman potencijal za povećanje prinosa, sa obzirom da je jedan od centralnih regulatora rasta i razvića biljaka. Produkcija IAA kod ovih bakterijskih sojeva je najbolja pri temperaturi od +37 °C, uz dodatak triptofana, i u neutralnoj sredini. Iako hipersalinitet značajno smanjuje produkciju IAA, ona ostaje detektabilna. Naši rezultati ukazuju na to da sojevi izolovani iz rizosfere sočivice: *P. oryzihabitans* 15, *P. putida* 23, *H. paralvei* 43 i *P. yamanorum* 47 imaju značajan potencijal produkcije auksina i pod nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, te mogu imati biotehnološku primenu u poljoprivredi. S obzirom da je sočivica lako dostupna biljka sa nizom povoljnih osobina za propagaciju *in vitro*, naši rezultati pokazuju da njena rizosfera može biti alternativni i jeftini izvor raznovrsnih bakterijskih regulatora rasta i razvića biljaka.

## Napomena

Istraživanja u ovom radu finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Ugovor br. 451-03-68/2020-14/200007 (Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“).

## Literatura

- Acosta K., Appenroth K.J., Borisjuk L., Edelman M., Heinig U., Jansen M.A.K., Oyama T., Pasaribu B., Schubert I., Sorrels S., Sree K.S., Xu S., Michael T.P., Lam E. (2021). Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. *The Plant Cell*, 33(10), 3207–3234. Oxford University Press (OUP).
- Gomes G.L.B., Scortecci K.C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, 23(6), 894–904. Wiley.
- Hatfield J.L., Prueger J.H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4–10. Elsevier BV.
- Leontidou K., Genitsaris S., Papadopoulou A., Kamou N., Bosmali I., Matsi T., Madesis P., Vokou D., Karamanoli K., Mellidou I. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria isolated from halophytes and drought-tolerant plants: genomic characterisation and exploration of phyto-beneficial traits. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. Springer Science and Business Media LLC.
- Naveed M., Qureshi M.A., Zahir Z.A., Hussain M.B., Sessitsch A., Mitter B. (2015). L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by Burkholderia phytofirmans PsJN. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1381–1389. Springer Science and Business Media LLC.

- Radulović O., Stanković S., Uzelac B., Tadić V., Trifunović-Momčilov M., Lozo J., Marković M. (2020). Phenol Removal Capacity of the Common Duckweed (*Lemna minor* L.) and Six Phenol-Resistant Bacterial Strains From Its Rhizosphere: In Vitro Evaluation at High Phenol Concentrations. *Plants*, 9(5), 599. MDPI AG.
- Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati, P.K. (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant cell reports*, 32(6), 741–757. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1430-5>
- Shah A., Nazari M., Antar M., Msimbira L. A., Naamala J., Lyu D., Rabileh M., Zajonc J., Smith, D.L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>
- Sarwar M., Kremer R. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, 20(5), 282–285. Wiley.
- Ullah A., Bano A., Khan N. (2021). Climate Change and Salinity Effects on Crops and Chemical Communication Between Plants and Plant Growth-Promoting Microorganisms Under Stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. Frontiers Media SA.

## POTENTIAL OF THE RHIZOSPHERE OF DUCKWEED (*LEMNA MINOR* L.) FOR THE PRODUCTION OF AUXINS OF BACTERIAL ORIGIN

*Olga Radulović<sup>1\*</sup>, Tatjana Popržen<sup>1</sup>, Marija Marković<sup>1</sup>*

### Abstract

The aim of this study was to analyze the rhizosphere of duckweed as a site of active production of auxins of bacterial origin, primarily indole-3-acetic acid (IAA). IAA production was tested on 21 different bacterial strains. Four bacterial strains: *Pseudomonas oryzae* 15, *Pseudomonas putida* 23, *Hafnia paralvei* 43 and *Pseudomonas yamanorum* 47 were selected based on increased IAA production compared to other strains tested. These strains showed continuous production of IAA even under unfavorable conditions: in acidic and basic environments, as well as in hypersaline environments. Our results suggest that these strains may have biotechnological applications in plant protection and increase yields through auxin production as central regulators of plant growth and development.

**Key words:** auxins, indole-3-acetic acid, bacteria, duckweed, stress

---

<sup>1</sup>University of Belgrade, Faculty of Biology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", 142 Bulevar Despota Stefana, Belgrade, Serbia (olga.radulovic@ibiss.bg.ac.rs)