Bioraznolikost i simbiozna učinkovitost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju grah (Phaseolus vulgaris L.)

Rajnović, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:937978

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Ivana Rajnović

BIORAZNOLIKOST I SIMBIOZNA UČINKOVITOST PRIRODNIH POPULACIJA RIZOBIJA KOJE NODULIRAJU GRAH (*Phaseolus vulgaris* L.)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana Rajnović

BIODIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF INDIGENOUS RHIZOBIAL POPULATIONS NODULATING BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

IVANA RAJNOVIĆ

BIORAZNOLIKOST I SIMBIOZNA UČINKOVITOST PRIRODNIH POPULACIJA RIZOBIJA KOJE NODULIRAJU GRAH (*Phaseolus vulgaris* L.)

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof.dr.sc. Sanja Sikora

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana Rajnović

BIODIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF INDIGENOUS RHIZOBIAL POPULATIONS NODULATING BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Sanja Sikora, PhD

Zagreb, 2017.

Bibliografska stranica

Bibliografski podaci:

- **Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
- **Znanstveno polje:** Poljoprivreda (agronomija)
- **Znanstvena grana:** Ekologija i zaštita okoliša
- **Institucija:** Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za mikrobiologiju
- **Voditelj doktorskog rada:** prof. dr. sc. Sanja Sikora
- **Broj stranica:** 157
- **Broj slika:** 23
- **Broj tablica:** 35
- **Broj priloga:** 4
- **Broj literaturnih referenci:** 199
- **Datum obrane doktorskog rada:** 19. srpnja 2017.
- **Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:**

  1. Prof. dr. sc. Milan Poljak
  2. Izv. prof. dr. sc. Nina Toth
  3. Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4, p.p.550, 10 000 Zagreb
Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 06.12.2016., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 14. veljače 2017.

Ocjena doktorskog rada

Doktorski rad je obranjen na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, 19.07.2016. pred povjerenstvom u sastavu:

Prof. dr. sc. Milan Poljak _____

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Izv. prof. dr. sc. Nina Toth _____

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Prof. dr. sc. Ksenija Markov _____

Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Informacije o mentoru

Sanja Sikora rođena je 6. rujna 1959. u Osijeku. Fakultet poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1978. godine. Diplomirala je 1983. godine, magistrirala 1990. iz područja mikrobiologije tla, a doktorsku disertaciju iz područja simbiozne fiksacije dušika obranila je 1996. godine. Od 1986. godine do danas zaposlena je na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. U znanstveno nastavno zvanje redoviti profesor u trajnom zvanju izabrana je u veljači 2016. godine. Sudjeluje u izvođenju nastave iz područja opće mikrobiologije, mikrobiologije tla, biološke fiksacije dušika i biotehnologije tla na modulima preddiplomskog, diplomskog i poslijediplomskog doktorskog studija na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Voditelj je diplomskog studija Agroekologija- Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Sudjelovala je u izvođenju nastave na Međusveučilišnom studiju „Mediteranska poljoprivreda“ kao i na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru gdje je bila nositelj modula na perddiplomskom i diplomskom studiju. Svoju opsežnu nastavnu aktivnost potvrđuje i većim brojem mentorstva obranjenih diplomskih i magistarskih kao i doktorskih disertacija. Znanstveni interes prvenstveno je usmjeren na područje mikrobiologije tla i mikrobne ekologije sa posebnim naglaskom na simbioznu fiksaciju dušika i bioraznolikost prirodnih populacija mikroorganizama. Kao suradnik, sudjelovala je u realizaciji deset znanstvenih projekata dok je bila voditelj tri nacionalna znanstvena projekta te četiri stručna. Kao suradnik, sudjelovala je u međunarodnom znanstvenom projektu "Physiology of Soybean Nitrogen Nutrition".

Kao autor odnosno koautor do sada je objavila 58 znanstvenih radova. Kao prvi autor ili koautor aktivno je sudjelovala na 74 znanstvena skupa (38 međunarodna i 36 nacionalna znanstvena skupa). Boravila je na specijalizaciji u laboratoriju "Elchrom Scientific AG" Cham, Švicarska kao i u Nacionalnoj kolekciji poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama u Budimpešti te u Laboratoriju za biotehnologiju tlu (Embrapa Soybean Center; Londrina, PR, Brazil). Sudjelovala je u osnivanju Laboratorija za molekularnu identifikaciju mikroorganizama u Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu 1993. godine. Aktivno je sudjelovala u formiranju Nacionalne kolekcije simbioznih fiksatora dušika. Stručna djelatnost obuhvaća izradu više studija, projekata i ekspertiza iz područja mikrobiologije tla.

Bila je član Nacionalnog koordinacijskog odbora za provođenje UNEP-GEF projekta „Razvitak okvira nacionalne biološke sigurnosti u Republici Hrvatskoj“ te Savjetodavnog vijeća Hrvatske agencije za hranu kao i član Odbora za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama. Surađivala je sa Hrvatskim zavodom za norme te je bila u dva navrata član tehničkog odbora HZN/TO 190, Kakvoća tla, a 2004. godine izabrana je za predsjednicu pododbora DZNM/TO 190/PO3 Kakvoća tla- Biološke metode ispitivanja.

Član je Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta, Odbora za nastavu i izbor nastavnika, a bila je član Odbora za međunarodnu suradnju i Odbora za poslijediplomske doktorske studije i doktorate te je sudjelovala u radu nekoliko Povjerenstava na Fakultetu. Od 2006.-2015. godine bila je predstojnik Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta.

Član je više znanstvenih društava: Hrvatskog mikrobiološkog društva, Hrvatskog tloznanstvenog društva, Hrvatskog agronomskog društva te Hrvatskog društva za biotehnologiju.

Zahvala

Svojoj mentorici, profesorici dr.sc. Sanji Sikora, iskreno zahvaljujem na povjerenju koje mi je ukazala još za vrijeme dodiplomskog studija. Zahvaljujem joj na prilici da radim u ovom području istraživanja kojem je doprinijela svojim dugogodišnjim iskustvom i vrijednim znanjima, dok je mom znanstvenom radu pružala podršku na svakom koraku. Veliko hvala za brojne savjete tokom izrade cjelokupnog rada te što je u više navrata poticala moj boravak u inozemnim institucijama.

Od srca zahvaljujem profesorici dr.sc. Encarnacion Velazquez Perez što me primila u svoj tim suradnika s kojima sam provela prekrasne trenutke svog istraživačkog rada te što je nesebično dijelila svoja znanja i pomogla u interpretaciji rezultata. Hvala dr.sc. Alvaru Peixu na stručnim savjetima, a dr.sc. Marthi Heleni Ramirez-Bahena i dr.sc. Fernandu Sanchez Juanez na pomoći u eksperimentalnom radu. Paula i Esther, hvala vam što ste uvijek blizu, iako daleko. Rebeca, hvala ti na gostoprimstvu punom veselja koje je postalo pravo prijateljstvo.

Veliko hvala prof.dr.sc. Milanu Poljaku, prof.dr.sc. Nini Toth i prof.dr.sc. Kseniji Markov na vremenu i trudu koje su uložili kao članovi povjerenstva za ocjenu ovog rada. Svi vaši prijedlozi i sugestije bili su mi od velike koristi u pisanju disertacije.

Najiskrenije zahvaljujem prof.dr.sc. Mariji Pecina za statističku obradu podataka te na uloženom trudu vezanom za dodatna pojašnjenja.
Hvala prof.dr.sc. Stjepanu Husnjaku na suradnji i pomoći oko uzorkovanja i određivanja sistematske pripadnosti tala.
Veliko hvala na pomoći i dr. sc. Branki Mihaljević sa Instituta Ruđer Bošković.

Svim dragim kolegicama sa Zavoda za mikrobiologiju hvala na potpori koju su uvijek pružale.
Sanji Kajić, Salihi Kruško, Dragici Hradec i Sandri Matijević posebno zahvaljujem na pomoći i brizi oko vegetacijskih pokusa.

Mojim princezama Lori i Jani hvala što mom životu i radu daju poseban smisao, a maloj bubici hvala što prve trenutke svog života provodi u trbuhu samnom za računalom. Suprugu Ivanu hvala na beskrajnom strpljenju i razumijevanju. Njegovim roditeljima hvala što su olakšali moj rad preuzevši većinu ostalih obaveza.

Najveća hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi i osloncu u životu.

Ovaj doktorski rad izrađen je i financiran od strane Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom profesorice dr.sc. Sanje Sikora. Dio eksperimentalnog rada izrađen je u Departamento de Microbiología y Genética Univerzidad de Salamanca, Španjolska, pod vodstvom profesorice dr.sc. Encarnacion Velazquez Perez.

SAŽETAK

Putem simbiozne fiksacije dušika mahunarke mogu zadovoljiti velik dio svojih potreba za dušikom na učinkovit i ekološki prihvatljiv način. Rizobije su skupina bakterija tla sa jedinstvenom sposobnošću tvorbe kvržica na korijenu mahunarki u kojima pomoću enzima nitrogenaze konvertiraju inertan atmosferski dušik u biljkama pristupačan amonijačni oblik. Zbog svog vrlo vrijednog hranidbenog sastava, grah se smatra jednom od najvažnijih mahunarki u ljudskoj prehrani. Unatoč vrlo povoljnim agroekološkim uvjetima, uzgoj graha u Republici Hrvatskoj je zanemaren i u stalnom padu. Brojne vrste rizobija mogu tvoriti simbiozne odnose sa grahom, međutim u tlu su često prisutni kompetitivni autohtoni sojevi tih bakterija koji su dobro prilagođeni na nepovoljne uvjete, no njihova simbiozna učinkovitost je uglavnom nepoznata. Glavne pretpostavke ovih istraživanja su da u tlima sjeverozapadne Hrvatske postoje autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju grah te da se oni značajno razlikuju po genotipskim i fenotipskim svojstvima te po učinkovitosti u simbioznoj fiksaciji dušika. U cilju odabira najkvalitetnijih sojeva rizobija sakupljeni su uzorci tla iz područja sjeverozapadne Hrvatske u kojem postoji dugogodišnja tradicija uzgoja graha. Iz 27 uzoraka tala izolirano je 45 autohtonih sojeva rizobija koji su zatim identificirani molekularnim metodama. Izolati su najprije identificirani MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) masenom spektrometrijom koja se bazira na analizi ukupnih ribosomalnih proteina. U dosadašnjim istraživanjima potvrđena je pouzdanost ove brze i osjetljive metode za identifikaciju brzorastućih i spororastućih rizobija. Pomoću RAPD (engl. *random amplified polymorphic DNA)* metode dobiven je uvid u genetsku raznolikost izolata te izvršeno grupiranje u 15 skupina iz kojih su odabrani reprezentativni izolati za daljnja istraživanja. Ona su uključila sekvenciranje 16S rRNA, *atpD*, *recA* i *nodC* gena što danas predstavlja standard u identifikaciji rizobija. Fenotipska karakterizacija uključila je utvrđivanje rasta na različitim temperaturama, pH vrijednostima, koncentracijama NaCl-a, sposobnosti iskorištavanja različitih izvora ugljika te otpornosti na antibiotike. U vegetacijskom pokusu ispitana je simbiozna učinkovitost 15 odabranih sojeva koja je uspoređena sa referentnim sojem, nebakteriziranom kontrolom te nebakteriziranom kontrolom uz dodatak mineralnog dušika. Drugi faktor pokusa bile su tradicionalne hrvatske sorte graha, Trešnjevac i Slavonski zeleni. Rezultati identifikacije autohtonih sojeva ukazuju na vrlo veliku raznolikost rizobija koji noduliraju grah u tlima sjeverozapadne Hrvatske. Rezultati MALDI-TOF MS analize pokazuju da se izolati iz ovog istraživanja podudaraju s vrstama *Rhizobium leguminosarum, Rhizobium sophoriradicis, Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium ecuadorense*, *Rhizobium acidisoli*, *Rhizobium indigoferae* i *Rhizobium pisi*. Neke od ovih vrsta imaju gotovo identične 16S rRNA gene zbog čega je bilo neophodno analizirati sekvence njihovih konstitucijskih gena *atpD* i *recA.* Prema tim analizama, najzastupljenije vrste iz uzorkovanih tala su *R. leguminosarum* i *R. hidalgonense* koja je tek nedavno otkrivena u američkim tlima. Sekvence *atpD* i *recA* gena velikog broja sojeva (35 %) značajno se razlikuju od najbližih srodnih vrsta zbog čega se može pretpostaviti da predstavljaju potencijalno novu vrstu unutar roda *Rhizobium.* Analiza *nodC* gena pokazala je da svi izolati pripadaju simbiovaru phaseoli, a u ovom istraživanju prvi put je utvrđeno postojanje simbiovara phaseoli kod vrste *R. pisi*. Dokazana je različita otpornost sojeva na stresne uvjete u tlu od čega je najznačajnija karakteristika otpornost na nizak pH jer su brojna tla u Hrvatskoj kisela. Rezultati vegetacijskog pokusa pokazuju da je najveća masa suhe tvari kvržica utvrđena primjenom sojeva 26T (*R. hidalgonense*) i 22AT (*R. pisi*). Na biljkama bakteriziranim sojevima vrste *R. leguminosarum* (16T, 23T, 1AT i 2Z) utvrđena je najveća masa suhe tvari kao i najveća količina dušika u suhoj tvari biljke što upućuje na njihovu veću simbioznu učinkovitost. Zbog toga bi ove sojeve bilo korisno uključiti u daljnje programe selekcije.

Ključne riječi: simbiozna fiksacija dušika, *Rhizobium*, grah (*Phaseolus vulgaris*), MALDI-TOF MS, RAPD, *rrs*, *atpD*, *nodC*, simbiozna učinkovitost

PROŠIRENI SAŽETAK

Biodiversity and symbiotic efficiency of indigenous rhizobial populations nodulating bean (P*haseolus vulgaris* L.)

Symbiotic nitrogen fixation enables legumes to supply most of their needs for nitrogen in efficient and ecological manner. Rhizobia are group of prokaryotic organisms with the unique ability to form symbiotic relationships with legume roots. In this relationship a new organ called nodule is formed, in which conversion of atmospheric nitrogen into ammonia, which is available to plants, occurs. Besides the significant quantities of nitrogen fixed in a symbiotic relationship, utilization of this process in legume production enables improvement of soil fertility and reduction of mineral fertilizer application costs.

Bean (P*haseolus vulgaris* L.) is very valuable and economically important culture. It is rich in proteins, fiber, potassium, phosphorus and B vitamin and recently, it has been discovered that bean consumption can contribute to health improvement. However, bean production in Croatia is limited to small-scale farmers and generally neglected despite favourable environmental conditions.

Numerous rhizobial species can nodulate bean. Competitive indigenous strains of these bacteria which are well adapted to soil stress conditions can often be present in the soil. Their symbiotic efficiency is usually unknown.

It is assumed that native rhizobial populations are also present in Croatian soils and that they contain strains resistant to stressful soil conditions and hidden potential for efficient nitrogen fixation.

The aim of this study was to assess genotypic, phenotypic and symbiotic features of indigenous rhizobia isolated from soils of Northwestern Croatia.

Soil samples were collected from 27 different locations in Northwestern region of Croatia. Trapping host method was performed to obtain 45 isolates of indigenous bean symbionts. The identification of isolates was first performed by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) which is based on the characteristic protein profiles for each microorganism. Protein profiles obtained from isolates were compared to those contained in database created in Salamanca University, containing the type strains of all currently described species from the Family *Rhizobiaceae*. The results of identification by MALDI-TOF MS were further compared to those based on gene analysis. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method was employed to assess rhizobial genetic diversity and to choose representative strains for further analysys of gene sequences.

Since the proposal for using the 16S rRNA (*rrs*) gene as universal tool for classification and identification of bacteria, this gene is the basis for rhizobial classification. Therefore, the sequence analysis of this gene was performed in this research to classify isolates obtained from bean nodules. In many studies it was shown that the analysis of the *rrs* gene is not sufficient for accurate differentiation among rhizobial species since several species with identical *rrs* gene sequences have been described untill now. These species are distinguishable on the basis of the housekeeping *recA* and *atpD* genes analysis, which are the most useful phylogenetic markers for the identification of rhizobial isolates. Sequence analysis of those two genes were further step in identification of rhizobia at species level.

Bean is a legume nodulated by several fast growing species of family *Rhizobiaceae*, mainly belonging to genus *Rhizobium*. Some of those species contained several symbiovars being the symbiovar phaseoli most usually present. *NodC* gene is the commonly used phylogenetic marker to define symbiovars within species of genus *Rhizobium* and its sequences were analysed to study simbiovars within species of indigenous rhizobia isolated from Croatian soils.

Phenotypic characterization of isolates included testing the tolerance to unfavorable soil conditions such as high levels of NaCl, different pH values and temperatures as well as intristic antibiotic resistance and assimilation of different carbon sources.
Greenhouse experiment was setup using two factors (2 x 18) on the basis of a completely randomized block design with three replications. The first factor in the experiment were two traditional Croatian landraces of bean, Trešnjevac and Slavonski zeleni. The second factor were 15 indigenous rhizobial strains selected from different RAPD groups, reference strain used to inoculate plants, negative control (uninoculated plants) and positive control (uninoculated plants with addition of 0,05 % KNO_3). At the flowering stage plants were collected and afterwords nodule dry mass, dry aerial biomass and total N in each plant were measured in order to estimate symbiotic efficiency of indigenous strains. Analysis of variance was performed with the statistical package SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc.
According to our hypothesis, indigenous rhizobial strains nodulating bean have been found in the soils of Northwestern Croatia.
The results obtained with MALDI-TOF MS methodology showed that the strains from this study matched with different species from the *Rhizobium leguminosarum* phylogenetic group with score values higher than 2.0. Using this criterion investigated isolates were identified as *Rhizobium leguminosarum, Rhizobium sophoriradicis, Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium ecuadorense*, *Rhizobium acidisoli*, *Rhizobium indigoferae* i *Rhizobium pisi*.
The results of the RAPD analysis showed a high diversity among the isolated strains and the existence of 15 groups with similarity lower than 70 % from which representative strains were selected for core and symbiotic gene analyses.
The *rrs* gene sequences were firstly compared to those available in Genbank and the results showed that all strains from this study belong to genus *Rhizobium* being their closest related species those of the phylogenetic group of *R. leguminosarum*.
Similarity values of 100 % were found between 11 strains with *R. leguminosarum* and *R. hidalgonense* and between 1 strain (22BZ) with *R. pisi*.
The rest of the strains, namely 8Z, 9T and 13T presented similarity values higher than 99 %, but lower than 100 % with *R. leguminosarum*, *R. pisi* and *R. etli* respectively.
Nine out of 11 strains that were closely related to the *R. leguminosarum* phylogenetic group were identified as this species after the analysis of the *atpD* and *recA* housekeeping genes (similarity value higher than 98 %). Other two strains (25T and 26T) were identified as *R. hidalgonense*, a species recently isolated in America from *P. vulgaris* nodules.
The strain 8Z formed an independent lineage more closely related to the species *R. ecuadorense*, but the similarity values were lower than 97 % in *recA* and *atpD* genes indicating that the strains represented by 8Z probably belong to a new species within genus *Rhizobium*. Analysis of *recA* and *atpD* gene sequence of strain 22BZ indicates that this strain belongs to the species *R. pisi*. Strains 9T and 13T formed an independent branch in the phylogenetic tree of housekeeping genes which was most closely related to *R. sophoriradicis*, but with similarity values lower than 98 %. Further research is needed to assign this strain to this species or to new phylogenetic lineage.
The results of the *nodC* gene analysis of indigenous rhizobial strains isolated from Croatian soils showed that all of them belong to the symbiovar phaseoli which has previously been found in different *Rhizobium* species. Nevertheless we have found for the first time this symbiovar in the species *R. pisi*.
Some differences were found between isolates regarding their phenotypic characteristic. Resistance to low pH is one of the most important traits of isolates since many Croatian soils are acid.
Results of greenhouse experiment showed that both Croatian landraces were compatible with indigenous rhizobial strains. Significant differences were found between strains in their symbiotic performance. Nodule dry weight is parameter indicating nodulation capacity of strain. The highest nodule dry weight was obtained when Slavonski zeleni was inoculated with indigenous strain 26T (*R. hidalgonense*). No significant differences were found between this strain and strain 22AT (*R. pisi*).

Symbiotic efficiency was estimated by comparison of dry aerial biomass of plants inoculated with indigenous rhizobial strains with dry aerial biomass of uninoculated plants. In this sence, the most efficient were strains 23T and 16T, both belonging to *R. leguminosarum,* species. The highest total N content was obtained in plants inoculated with strain 16T indicating this strain was most efficient in nitrogen fixation while similar values were obtained with strains 2Z, 23T i 1AT. Six out of 15 strains showed higher symbiotic fixation efficiency than positive control, while similar values for this parameter were obtained for five more strains. Least efficient were strains of species *R. hidalgonense* (20Z and 26T).
Besides being highly efficient in symbiotic nitrogen fixation, strains 1AT and 2Z (*R. leguminosarum*) showed significant tolerance to unfavourable conditions such as high NaCl concentrations and high temperatures. Therefore, these strains should be included in further investigation in order to select high quality strain for application as biofertilizer for sustainable bean production.
Given that the knowledge about the natural population of rhizobia that nodulate bean in Croatia is very limited, these study provided an insight into the composition and characteristic of this group of microorganisms.

Key words: symbiotic nitogen fixation, *Rhizobium*, bean (*Phaseolus vulgaris*), MALDI-TOF MS, RAPD, *rrs*, *atpD*, *nodC*, symbiotic efficiency

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Hipoteze i ciljevi 4

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 5

2.1. Biološka fiksacija dušika 5

2.1.1. Simbiozna fiksacija dušika 6

2.1.1.1. Uspostava simbioznog odnosa 7

2.1.1.2. Uloga nodula u simbioznoj fiksaciji dušika 8

2.1.2. Značaj biološke i simbiozne fiksacije dušika 10

2.1.3. Predsjetvena bakterizacija mahunarki 12

2.1.4. Čimbenici koji utječu na bakterizaciju i simbioznu fiksaciju dušika 12

2.2. Makrosimbionti-mahunarke 17

2.2.1. Grah 19

2.2.1.1. Podrijetlo graha 19

2.2.1.2. Hranidbena i funkcionalna vrijednost graha 22

2.2.1.3. Morfološka svojstva 26

2.2.1.4. Biološka svojstva 27

2.2.1.5. Uzgoj graha 28

2.2.1.6. Istraživanja u Republici Hrvatskoj 31

2.3. Mikrosimbionti-kvržične bakterije 32

2.3.1. Genom rizobija 32

2.3.2. Taksonomija rizobija 34

2.3.2.1. Sekvenciranje 16S rRNA gena 35

2.3.2.2. Ostali konstitutivni geni koji se koriste u taksonomskim i filogenetskim istraživanjima 36

2.3.2.3. *NodC* gen i simbiovari rizobija 36

2.3.2.4. "Klasične" i „nove" rizobije 37

2.3.3. Rod *Rhizobium* 39

2.3.4. Proučavanje raznolikosti rizobija 40

2.3.4.1. Fenotipske metode 41

2.3.4.2. Genotipske metode 41

2.3.4.3. MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) ... 45
2.3.4.4. Raznolikost rizobija koje noduliraju grah ... 47
2.3.4.5. Proučavanje raznolikosti rizobija u Republici Hrvatskoj ... 51
3. MATERIJAL I METODE ... 53
3.1. Uzorkovanje tla i pedološke analize ... 53
3.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija ... 56
3.2.1. Čuvanje autohtonih sojeva rizobija ... 57
3.3. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija ... 57
3.3.1. Identifikacija primjenom metode MALDI-TOF MS ... 57
3.3.1.1. Priprema uzoraka za MALDI-TOF MS analizu ... 57
3.3.1.2. Mjerenje MALDI TOF masenom spektrometrijom i analiza podataka ... 58
3.3.2. Izolacija genomske DNK ... 58
3.3.3. RAPD analiza ... 59
3.3.4. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena ... 60
3.3.5. Amplifikacija i sekvenciranje *recA, atpD* i *nodC* gena ... 61
3.3.6. Filogenetska analiza ... 63
3.4. Fenotipska karakterizacija izolata ... 63
3.4.1. Rast na različitim temperaturama ... 63
3.4.2. Rast na različitim pH vrijednostima ... 63
3.4.3. Rast pri različitim koncentracijama NaCl ... 64
3.4.4. Otpornost na antibiotike ... 64
3.4.5. Iskorištavanje različitih izvora šećera ... 65
3.5. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija ... 66
3.5.1. Vegetacijski pokus ... 66
3.5.2. Masa suhe tvari kvržica i suhe tvari biljke ... 69
3.5.3. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke ... 70
3.5.4. Učinkovitost sojeva u fiksaciji dušika ... 70
3.5.5. Statistička analiza ... 70
4. REZULTATI ... 71
4.1. Analize tla ... 71
4.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija ... 80
4.3. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija ... 81
4.3.1. Identifikacija primjenom metode MALDI-TOF MS ... 81

4.3.2. RAPD analiza 84
4.3.3. Analiza sekvenci 16S rRNA (*rrs*) gena 86
4.3.4. Analiza sekvenci *atpD* i *recA* gena 89
4.3.5. Analiza simbioznog *nodC* gena 93
4.4. Fenotipska karakterizacija izolata 96
4.5. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija 100
4.5.1. Masa suhe tvari kvržica 101
4.5.2. Masa suhe tvari biljke 103
4.5.3. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke 104
4.5.4. Učinkovitost sojeva u fiksaciji dušika 106
5. RASPRAVA 107
5.1. Analize tla i izolacija autohtonih sojeva rizobija 107
5.2. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija 108
5.2.1. Identifikacija na razini vrste 108
5.2.2. Identifikacija na razini simbiovara / simbiovar phaseoli 113
5.3. Fenotipska karakterizacija izolata 115
5.4. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija 118
6. ZAKLJUČCI 122
7. POPIS LITERATURE 124
ŽIVOTOPIS 142
PRILOZI 144

Popis kratica

α-HCCA alfa-cijano-4-hidroksicinamična kiselina
CFU/ml broj mikroorganizama u mililitru (engl. *Colony Forming Units/ml*)
EDTA etilen-diamin-tetra-octena kiselina
HCl klorovodična kiselina
HGT horizontalni prijenos gena (engl. *Horizontal Gene Transfer*)
IAR otpornost mikroorganizama na antibiotike (engl. *Intrinsic Antibiotic Resistance*)
MALDI-TOF matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem s tandem analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta iona
MLSA analiza sekvenci više lokusa (engl. *Multilocus Sequence Analysis*)
MS masena spektrometrija
NaCl natrijev klorid
NaOH natrijev hidroksid
PCR lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
PMF otisak peptidnih masa (engl. *Peptide Mass Fingerprint*)
RAPD nasumična amplifikacija polimorfne DNA (engl. *Random Amplification of Polymorphic DNA*)
ROS reaktivni oblik kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)
TBE tris borat etilen-diamin-tetra-octena kiselina
TFA trisfluorooctena kiselina
TRIS tris hidroksimetil amino-metan

Popis priloga

Prilog 1. Rezultati MALDI TOF MS analize prikazani kao karakteristični spektri peptidnih masa pojedinih izolata uspoređeni sa najsličnijom vrstom.

Prilog 2. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije Sorta x Soj na masu suhe tvari kvržica (P= 0,0218*).

Prilog 3. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije Sorta x Soj na masu suhe tvari biljke (P=0,0318*).

Prilog 4. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije Sorta x Soj na količinu ukupnog dušika u biljci (P= 0,0059*).

Popis tablica

Tablica 1. Primjeri rodova mikroorganizama koji fiksiraju atmosferski dušik u različitim odnosima sa biljkama domaćinima.
Tablica 2. Količine fiksiranog dušika izmjerene u raznim sustavima biološke fiksacije te za različite usjeve.
Tablica 3. Upotreba različitih vrsta mahunarki.
Tablica 4. Prednosti i nedostaci MALDI-TOF MS metode.
Tablica 5. Lokacije sa kojih su uzeti uzorci tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.
Tablica 6. Sastav hranjive podloge YMA (Yeast Mannitol Agar).
Tablica 7. Sastav TY hranjive podloge.
Tablica 8. Sastav tekuće TY hranjive podloge.
Tablica 9. Uvjeti amplifikacije za RAPD analizu.
Tablica 10. Uvjeti amplifikacije za analizu 16S rRNA gena.
Tablica 11. Uvjeti amplifikacije za analizu *recA, atpD* i *nodC* gena.
Tablica 12. Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje navedenih gena.
Tablica 13. Sastav YMB (Yeast Mannitol Broth) hranjive podloge.
Tablica 14. Sastav hranjive podloge bez ugljikohidrata.
Tablica 15. Sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma.
Tablica 16. Sastav hranjive otopine za ishranu biljaka tijekom vegetacije.
Tablica 17. Kombinacije u pokusu.
Tablica 18. Sistematska pripadnost uzorkovanih tala.
Tablica 19. Tekstura istraživanih tala.
Tablica 20. Kemijske karakteristike uzorkovanih tala: sadržaj humusa i reakcija tla.
Tablica 21. Kemijske karakteristike uzorkovanih tala: sadržaj fiziološki aktivnog kalija i fosfora te sadržaj ukupnog dušika.
Tablica 22. Autohtoni sojevi rizobija izolirani iz kvržica na grahu.
Tablica 23. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija primjenom MALDI-TOF masene spektrometrije.
Tablica 24. Sojevi grupirani prema sličnosti RAPD profila i sojevi odabrani za analizu gena.
Tablica 25. Matrica udaljenosti istraživanih sojeva i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *rrs* gena.
Tablica 26. Matrica udaljenosti istraživanih sojeva i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *atpD* i *recA* gena.
Tablica 27. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija na temelju MALDI-TOF masene spektrometrije te na temelju sekvenciranja *atpD* i *recA* gena.
Tablica 28. Matrica udaljenosti istraživanih sojeva i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *nodC* gena.
Tablica 29. Rezultati ispitivanja rasta sojeva na različitim temperaturama, pH vrijednostima te sadržaju NaCl.
Tablica 30. Rezultati ispitivanja prirodne otpornosti na antibiotike te na iskorištavanje različitih izvora ugljika.
Tablica 31. Rezultati analize varijance za ispitivana svojstva. Opravdanost djelovanja faktora i interakcije na ispitivana svojstva uz navedene P vrijednosti.

Tablica 32. Masa suhe tvari kvržica (mg/biljci).
Tablica 33. Masa suhe tvari biljke (mg).
Tablica 34. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci).
Tablica 35. Indeks učinkovitosti istraživanih sojeva uključenih u vegetacijski pokus.

Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz procesa nodulacije i simbiozne fiksacije dušika.
Slika 2. Determinirani (lijevo) i nedeterminirani (desno) noduli.
Slika 3. Izgled cvijeta podporodica a) *Dialioideae* b) *Caesalpinoideae* c) *Papillionoideae.*
Slika 4. Tri centra podrijetla graha prema Debouck i sur. (1993).
Slika 5. Podjela polifenolnih skupina.
Slika 6. Učinak konzumiranja graha na smanjenje nastanka bolesti krvožilnog sustava, dijabetesa i karcinoma.
Slika 7. Grafički prikaz genetskih bazena u genomu prokariota.
Slika 8. Filogenetsko stablo alfa-, beta- i gama- proteobakterija. Podebljano su označeni rodovi koji uključuju simbiozne fiksatore dušika.
Slika 9. Izgled kolonija rizobija na YMA hranjivom mediju uz dodatak indikatora congo red. A) tipski sojevi rodova: 1. *Rhizobium phaseoli* 2. *Ensifer meliloti* 3. *Mesobacterium loti* 4. *Bradyrhizobium elkanii* 5. *Phyllobacterium trifolii* 6. *Azorhizobium caulinodans* 7. *Devosia neptuniae* B) tipski sojevi roda *Rhizobium*: 1. *R. hainanense* 2. *R. leguminosarum* 3. *R. galegae* 4. *R. etli* 5. *R. lusitanum* 6. *R. loessense* 7. *R. giardinii* 8. *R.mongolense* 9. *R. indigoferae* 10. *R. tropici* 11. *R. yanglingense* 12. *R. huautlense* 13. *R. gallicum* 14. *R. cellulosilyticum*.
Slika 10. Tri glavna dijela operona: geni koji kodiraju za 16S rDNA (*rrs*), 23S rDNA (*rrl*) i ITS (engl. *Internally Transcribed Spacer*) regiju.
Slika 11. a) Shema MALDI TOF MS instrumenta s osnovnim dijelovima (izvor ionizacije, analizator masa i detektor) b) shema koja prikazuje tijek analize MALDI-TOF MS metodom.
Slika 12. Karta lokacija uzorkovanja tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.
Slika 13. Sjeme sorte Trešnjevac.
Slika 14. Sjeme sorte Slavonski zeleni.
Slika 15. a) Priprema inokuluma za bakterizaciju sjemena graha b) postavljen pokusa u plasteniku.
Slika 16. Mikromonoliti uzoraka tala pod oznakom: a) pseudoglej (uzorak M11), b) livadsko fluvijalno tlo (M1A), c) hipoglej (M3).
Slika 17. RAPD profili dobiveni korištenjem početnice M13 i označene skupine sojeva (sličnost $<$ 70 %).
Slika 18. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu sekvenci *rrs* gena.
Slika 19. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu analize sekvenci *atpD* i *recA* gena.
Slika 20. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu analize sekvenci *nodC* gena
Slika 21. a) Noduli na korijenu graha sorte Trešnjevac 14 dana nakon inokulacije, b) presjek nodula u fazi pune cvatnje (6 tjedana nakon inokulacije).
Slika 22. Nodulacija korijena graha sojem 26T kojim je dobivena najveća masa suhe tvari kvržica (u pokusu je ovaj soj imao oznaku 14) (lijevo) te sojem 12Z koji je dao najmanju masu suhe tvari kvržica (oznaka 4 u pokusu) (desno).
Slika 23. Razlika u rastu biljaka i boji lišća. Lijevo: svijetlozeleno lišće i niže biljke na kontrolnoj varijanti bez bakterizacije (negativna kontrola). Desno: varijanta bakterizirana autohtonim sojem rizobija.

1. **UVOD**

Porast svjetske populacije posljednjih godina sve više budi svijest o potrebi za proizvodnjom dovoljne količine hrane, istovremeno namećući pitanja kakav će utjecaj na okoliš imati intenzivirana poljoprivredna proizvodnja te postoji li mogućnost smanjenja uporabe mineralnih gnojiva.
Dušik je jedno od najvažnijih biljnih hraniva o kojem ovisi rast i razvoj biljaka, no često je glavni ograničavajući čimbenik za postizanje visokih prinosa. Naime, atmosfera sadrži oko 78 % dušika, no on se nalazi u inertnom obliku (N_2) u kojem ga biljke ne mogu iskorištavati. Za sintezu nukleinskih kiselina, aminokiselina i bjelančevina, biljke koriste amonijačni ili nitratni oblik dušika koji je rijetko prisutan u rezervama tla pa ga je najčešće potrebno nadomijestiti putem mineralnih dušičnih gnojiva. Međutim, problem nastaje njihovom prekomjernom uporabom zbog koje dolazi do gubitka dušika iz sustava biljka-tlo, a time i do ispiranja, otjecanja i emisije štetnih plinova u atmosferu. Gubitak dušika iz agro-ekosustava, osim ekoloških implikacija koje se odnose na onečišćenje podzemnih voda, kisele kiše i stakleničke plinove, dovodi i do gubitka plodnosti tla te predstavlja prijetnju za sigurnost proizvodnje hrane. Uz nastojanje da korištenje mineralnih dušičnih gnojiva bude stručno i znanstveno opravdano, nudi se i alternativa njihovoj primjeni u vidu biološke fiksacije dušika.

Biološka fiksacija dušika je proces u kojem inertni atmosferski dušik prelazi u reducirani, amonijačni oblik djelovanjem enzima nitrogenaze kojeg posjeduju brojni prokariotski organizmi. Rizobije su jedna od skupina tih mikroorganizama sa jedinstvenom sposobnošću tvorbe simbioznih odnosa sa korijenjem mahunarki (leguminoza) putem kojeg biljka može zadovoljiti većinu svojih potreba za dušikom. Procijenjene godišnje količine fiksiranog dušika putem simbioze mahunarki i rizobija iznose oko 30-150 kg/ha (Unkovich i Pate, 2000), a osim tih značajnih količina, ovim putem tlo se obogaćuje dušikom koji će koristiti budući usjevi, poboljšava se plodnost tla, ali i smanjuju troškovi primjene mineralnih gnojiva.

Grah (*Phaseolus vulgaris* L.) je vrlo vrijedna i gospodarski vrlo važna kultura. Iz Amerike je u Afriku, Aziju i Europu pa tako i u Hrvatsku donesen preko Španjolske u 16. stoljeću. U našoj prehrani, najzastupljeniji je grah zrnaš, sa zdravstvenog gledišta vrlo kvalitetna namirnica bogata bjelančevinama, vlaknima, kalijem, fosforom te vitaminima B skupine. U novije vrijeme otkriveno je da osim hranjive vrijednosti, konzumacija graha može

pridonijeti poboljšanju zdravlja zahvaljujući optimalnom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu te zahvaljujući prisutnosti brojnih fenolnih spojeva (Camara i sur., 2013).

Grah se u svijetu uzgaja na površinama od 25689000 ha s prosječnim prinosom 6,9 t/ha (Lešić i sur., 2004). Međutim, uzgoj graha u Hrvatskoj ograničen je na male površine, koje se najčešće oslanjaju na prirodnu plodnost tla ili na sposobnost graha da fiksira dušik u simbiozi sa autohtonim sojevima rizobija.

Autohtoni sojevi simbioznih fiksaatora dušika (rizobija) su najčešće vrlo kompetitivni zbog dobre prilagođenosti na uvjete kakvi mogu prevladavati u tlu poput nepovoljne temperature, pH ili sadržaja vlage, međutim njihova učinkovitost je često nepoznata te predstavlja izazov za istraživanje. Upravo je jedan od najčešćih limitirajućih čimbenika za uspješnu simbioznu fiksaciju dušika nedovoljan broj učinkovitih rizobija u tlu, a kao rješenje nudi se mogućnost inokulacije mahunarki sa komercijalnim biognojivima na bazi rizobija. Problem kod njihove primjene je što takvi pripravci mogu sadržavati sojeve koji nisu dobro prilagođeni na lokalne uvjete tala pa se velik broj istraživanja temelji na pronalasku što učinkovitijih sojeva iz prirodne populacije, koji su istovremeno otporni na nepovoljne uvjete u tlu.

Poznavanje genetske raznolikosti rizobija preduvjet je za selekciju visoko učinkovitih sojeva. Prva klasifikacija rizobija temeljila se na unakrsnoj inokulaciji rizobija i biljaka domaćina, generacijskom vremenu rizobija te na drugim fiziološkim svojstvima. Upitna pouzdanost ovakvih pristupa otvorila je mogućnost za primjenu brojnih molekularnih metoda koje su se razvile posljednjih desetljeća.

Sekvenciranje ribosomalnih (*rrs*) gena najčešće se koristi za identifikaciju bakterija, ali se ovom metodom često ne mogu razlikovati bliske vrste rizobija (Ramirez-Bahena i sur., 2008). Stoga se trenutno identifikacija rizobija na razini vrste temelji na analizama sekvenci osnovnih (engl. *core*) gena, visoke varijabilnosti poput *atpD*, *recA*, *dnaK* ili *glnII*, koji se nazivaju i konstitutivni (engl. *housekeeping*) jer su uključeni u osnovne funkcije neophodne za bakterijski rast.

Za razlikovanje podgrupa unutar iste vrste rizobija koji tvore simbiozne odnose sa određenim biljkama-domaćinima, Rogel i sur. (2011) predlažu termin simbiovar. Najveći broj dosad definiranih simbiovara temeljen je na različitim biljkama koje mogu nodulirati te na analizi nodulacijskih (*nod*C) gena.

Metoda MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) bazira se na analizi ukupnih ribosomalnih proteina. Pouzdanost ove brze i osjetljive metode u identifikaciji brzorastućih i spororastućih rizobija potvrdili su Ferreira i sur. (2011) i Sanchez-Juanes i sur. (2013) te proširili bazu podataka koja je do tada sadržavala samo informacije o kliničkim izolatima.

Najveći broj do sada opisanih simbioznih fiksatora dušika razmješten je unutar jedanaest rodova alfaproteobakterija, a među njima je i rod *Rhizobium* u koji ubrajamo mikrosimbionte graha. Najzastupljenije vrste rizobija koje noduliraju grah su *Rhizobium etli* (dominantna u zemljama podrijetla graha), *Rhizobium leguminosarum* i *Rhizobiu phaseoli* (također rasprostranjene u zemljama podrijetla graha te u Africi i Europi).

U Republici Hrvatskoj provedena su istraživanja o raznolikosti prirodnih populacija rizobija koje noduliraju soju (Sikora i sur., 2003), grašak (Blažinkov, 2006) i lucernu (Donnaruma i sur., 2014). Populacija rizobija koja nodulira grah u Hrvatskoj nije dovoljno proučena. U svom doktorskom radu, Pohajda (2011) je u samo pet od 25 analiziranih uzoraka tala sa područja Zagrebačke županije utvrdila prisutnost autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju grah.

Iako može stvoriti simbiozne odnose sa brojnim vrstama rizobija, grah se smatra slabim fiksatorom dušika u usporedbi sa drugim leguminozama (Hardarson i sur., 1994). Neka istraživanja pokazuju i da daje slab odgovor na inokulaciju u polju, a pretpostavlja se da je razlog tome brojna, ali neučinkovita populacija rizobija prisutnih u tlu (Graham, 1981). Nasuprot tome, neki znanstvenici su pronašli sojeve koji imaju dobar potencijal za fiksaciju dušika u simbiozi s grahom. Takav primjer su sojevi vrste *Rhizobium tropici* koji mogu dati sličan prinos zrna kao i primjena mineralnih dušičnih gnojiva u Brazilu (Hungria i sur., 2000), *Rhizobium gallicum* u Tunisu (Mrabet i sur., 2005) i *R. leguminosarum* u Španjolskoj (Mulas i sur., 2011).

Ovo dokazuje da je proučavanje prirodnih populacija rizobija važno u nastojanju da se pronađe soj koji je dobro prilagođen na stresne uvjete u tlu, kompatibilan sa tradicionalnim sortama graha i učinkovit u fiksaciji dušika, kako bi se predsjetvenom bakterizacijom povećao održiv uzgoj ove vrlo vrijedne kulture u Hrvatskoj.

1.1. Hipoteze i ciljevi

Pretpostavlja se da u tlima sjeverozapadne Hrvatske postoje autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju grah te da na njihovu rasprostranjenost i raznolikost utječu agroekološki uvjeti ovoga područja. Pretpostavka je da su sojevi unutar prirodne populacije tla genotipski i fenotipski različiti te da postoje sojevi sa potencijalom za učinkovitu fiksaciju dušika koji su istovremeno i otporniji na stresne uvjete tla.

Ciljevi ovih istraživanja su:

1. Identificirati autohtone rizobije izolirane iz različitih tala sjeverozapadne Hrvatske i utvrditi genotipsku raznolikost prirodnih populacija.
2. U laboratorijskim uvjetima utvrditi njihovu otpornost na stresne uvjete tla.
3. U vegetacijskom pokusu odrediti njihovu simbioznu učinkovitost i kompatibilnost sa dvije sorte graha.
4. Odabrati najkvalitetnije sojeve u svrhu korištenja u daljnjim istraživanjima.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Biološka fiksacija dušika

Pretvorba inertnog atmosferskog dušika u spojeve koje mogu asimilirali biljke, važan je dio globalnog ciklusa dušika i osnova za poljoprivrednu proizvodnju.

Razvoj industrijskog procesa kojim se dušik reducira u amonijak korištenjem vodika pod visokim pritiskom i temperaturom, poznatim kao Haber-Boschov proces, doveo je do naglog povećanja poljoprivredne proizvodnje od sredine dvadesetog stoljeća. Iako ovaj proces podmiruje velik dio potreba za dušikom rastuće ljudske populacije, on podrazumijeva značajan utrošak energije dobivene iz fosilnih goriva. Stoga je cilj sve više koristiti alternativne načine za proivodnju hrane na siguran i ekološki prihvatljiv način.

U prirodi postoje dva osnovna puta kojima se fiksira atmosferski dušik; u manjoj mjeri to je oksidacija N_2 pri udaru munje u višim slojevima atmosfere te u većoj mjeri redukcija N_2 u amonijski oblik djelovanjem enzima nitrogenaze koju nalazimo u brojnim prokariotskim organizmima. Ove prokariotske mikroorganizme koji mogu fiksirati atmosferski dušik nazivamo diazotrofi. Neki od njih dušik fiksiraju u slobodnoživućem stanju (asimbiozni fiksatori), dok ga ostali fiksiraju tvoreći asocijativne ili pak simbiozne odnose sa raznim biljkama. Različit stupanj odnosa diazotrofa i biljaka prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Primjeri rodova mikroorganizama koji fiksiraju atmosferski dušik u različitim odnosima sa biljkama domaćinima.

Tip odnosa	Mikroorganizam	Biljka domaćin
Asimbiozni (slobodnoživući)	*Clostridium*	ne tvore odnos sa domaćinom
	Frankia	
	Azospirillum	
	Azotobacter	
	Derxia	
	Cijanobakterije	
Asocijativni	*Azospirillum*	žive oko korijena raznih vrsta biljaka
	Paenibacillus	
Endofiti	*Herbaspirillum*	šećerna trska
	Acetobacter	tropske travnate vrste
Simbiozni	*Frankia*	*Alnus, Myrica, Casuarina*
	Bradyrhizobium	Brojne mahunarke
	Mesorhizobium	
	Rhizobium	
	Sinorhizobium	
	Methylobacterium	*Mimosa sp.*
	Devosia	*Phaseolus sp.*
	Anabaena azollae	*Azolla sp.*

2.1.1. Simbiozna fiksacija dušika

Glavni način na koji dušik dospjeva u zemljinu biosferu je fiksacija putem simbioznog odnosa bakterija i biljaka. Stvaraju ga aktinorize roda *Frankia* sa brojnim vrstama biljaka, cijanobakterije roda *Nostoc* sa biljkama iz roda *Azolla*, a najpoznatiji simbiozni odnos je onaj između rizobija i mahunarki koji ima i najveću važnost u poljoprivrednoj proizvodnji.
Rizobije (određene vrste alfa- i beta- proteobakterija) inficiraju korijen mahunarki putem korijenovih dlačica te nakon prijenosa signala, u korijenu biljke tvore specijalizirane strukture nazvane kvržice ili noduli. Tako formirani organi mjesta su u kojima dolazi do izmjene fotosintetski fiksiranog ugljika kojeg biljka predaje bakteriji dok zauzvrat od nje prima reducirani atmosferski dušik. Zahvaljujući ovom procesu moguće je uzgajati brojne mahunarke poput graha, graška, soje i leće diljem svijeta čak i na tlima koja su iscrpljena i siromašna dušikom.

2.1.1.1. Uspostava simbioznog odnosa

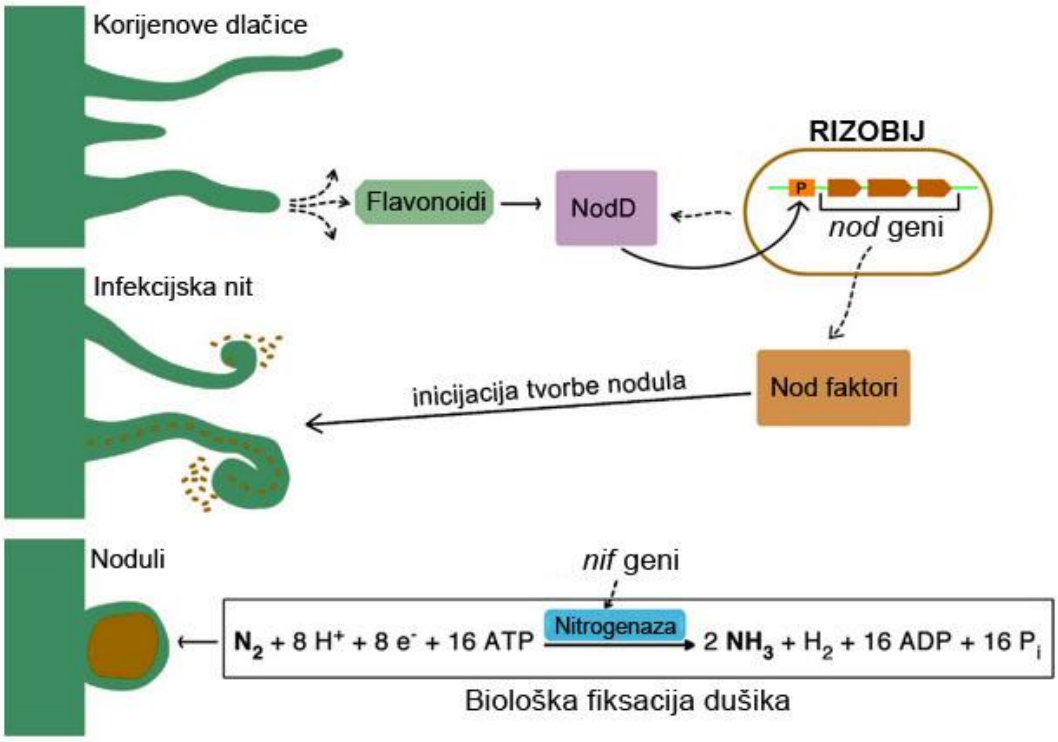
Preduvjet za uspostavu simbioznog odnosa je izmjena signala između bakterija i biljaka čija specifičnost omogućuje da samo određena kombinacija bakterije i biljke stvori uspješnu simbiozu. Preko svog korijena, biljke otpuštaju u rizosferu flavonoide, a kako se oni razlikuju između biljnih vrsta, služe kao prvi korak u odabiru mikrosimbionta koji će inficirati biljku. Kao reakcija na biljne flavonoide, kod mikrosimbionta (rizobija) dolazi do produkcije i aktivacije signalnih molekula - Nod faktora.

Tada dolazi do prve faze infekcije u kojoj se rizobij prihvaća za površinu korijenove dlačice zahvaljujući adhezijskim proteinima na površini stanice, ali i zahvaljujući biljnim lektinima koji se vežu za šećerne skupine na površini stanica rizobija (Laranjo i sur., 2014).

Prema osnovnoj strukturi, Nod faktori su lipo-hito-oligosaharidi, no postoje varijacije u acilnoj skupini ili drugim mjestima oligosaharida kod različitih vrsta i sojeva rizobija. Zbog toga su uz flavonoide i Nod faktori odgovorni za specifičnost u odabiru simbioznih partnera. Enzime odgovorne za sintezu Nod faktora kodiraju *nodABC* geni koji su prisutni kod svih rizobija.

Prepoznavanjem Nod faktora od strane biljke dolazi do deformacije korjenovih dlačica koje se u prisutnosti rizobija počnu izduživati i kovrčati što će na kraju zarobiti bakteriju (slika 1). Iz tog mjesta započet će infekcija okolnih stanica korijena djelovanjem brojnih hidrolitičkih enzima. Nakon što rizobije prođu kroz staničnu stijenku dolazi do stvaranja infekcijske niti (cjevaste invaginacije na mjestu razaranja stanične stijenke) koje se izdužuje kroz korijenovu dlačicu do meristemskih stanica gdje se formira primordijalna kvržica.

Biljke su vrlo osjetljive na određene Nod faktore te već pri nanomolarnim koncentracijama (Heidstra i sur., 1994) dolazi do diobe stanica u kori korijena i tvorbe primordijalne kvržice. Kada putem infekcijske niti rizobije dođu do primordijalne kvržice, dolazi do njihovog razmnožavanja unutar biljnih stanica koje se također ubrzano dijele.



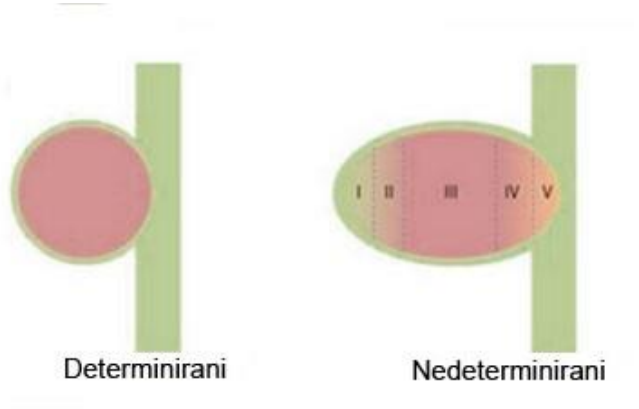
Slika 1. Shematski prikaz procesa nodulacije i simbiozne fiksacije dušika. Prilagođeno iz Laranjo i sur. (2014).

U stanicama primordijalne kvržice, rizobije se diferenciraju u bakteroide inkapsulirane unutar peribakteroidne membrane (PBM, engl. *peribacteroid membrane*) tvoreći strukture nazvane simbiosomi (Young i Haukka, 1996). Bakteroidi mijenjaju metaboličke i molekularne procese u stanici i uzrokuju njeno povećanje.

2.1.1.2. Uloga nodula u simbioznoj fiksaciji dušika

Kod različitih biljnih vrsta možemo pronaći dva osnovna tipa kvržica (nodula) koja razlikujemo s obzirom na aktivnost meristema nakon završetka formiranja nodula. To su determinirani i nedeterminirani noduli. Kod nedeterminiranih nodula vršni meristem ostaje aktivan za cijelog životnog vijeka nodula. U takvim se nodulima formiraju različite zone sa različitim funkcijama, a proces simbiozne fiksacije odvija se u samoj sredini nodula u kojoj su se smjestili bakteroidi. Zbog tih zona, nedeterminirani noduli imaju izdužen oblik (slika 2), a javljaju se kod nekih biljnih vrsta poput lucerne i graška. Kod determiniranog tipa

nodula, aktivnost meristema prestaje u ranoj fazi razvoja nodula, okruglog je oblika i nema vidljivih zona pa se fiksacija dušika odvija u cijelom nodulu.



Slika 2. Determinirani (lijevo) i nedeterminirani (desno) noduli. Determinirani ne sadrže apikalni meristem i kod njih ne dolazi do apikalnog gradijenta u razvoju za razliku od determiniranih u kojima se jasno ističu zone rasta (I-V).

Osim toga uočene su jasne razlike između efikasnih i neefikasnih nodula. Efikasne su velike i crvene boje dok neefikasne ostaju male i bijele. U efikasnim kvržicama odvija se simbiozna fiksacija dušika koju katalizira enzim nitrogenaza prema sljedećoj kemijskoj jednadžbi:

$$N_2 + 8\,H^+ + 8e^- + 16\,ATP \xrightarrow{\text{nitrogenaza}} 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$$

Središnji dio zrele i efikasne kvržice, osigurava sve potrebno za ovaj proces; održava mikroaerobne uvjete kakve zahtjeva enzim nitrogenaza istovremeno osiguravajući velike količine potrebne energije u obliku ATP-a dobivenog aerobnom respiracijom. Ovako složene zahtjeve održava biljni protein leghemoglobin koji ima visok afinitet prema kisiku i zato ga vrlo brzo veže, a s druge strane vrlo sporo ga otpušta (Rashid i sur., 2015).

Aktivnost kompleksa enzima nitrogenaze sastoji se od dva koraka, a povezana je s njenom građom:

- u prvom koraku feredoksin prenosi elektrone na komponentu II nitrogenaze (dinitrogenase reduktaze)
- u drugom koraku se ti elektroni prenose na komponentu I (dinitrogenazu)

Za prijenos svakog elektrone potrebne su dvije molekule ATP-a, a koraci se ponavljaju dok se ne postigne redoks potencijal koji će omogućiti redukciju N_2 i H^+ u NH_3 i H_2.
Izvor elektrona su produkti fotosinteze koji iz lišća dospijevaju do korijena.
NH_3 nastao simbioznom fiksacijom dušika se preko peribakteroidne membrane premješta u citoplazmu domaćina. Nakon toga ugrađuje se u aminokiseline i djelomično transformira u ureide (alantoin i alantoičnu kiselinu). Ovi produkti se zatim transportiraju u nadzemne dijelove biljke gdje služe za sintezu proteina i ostalih dušičnih spojeva.

2.1.2. Značaj biološke i simbiozne fiksacije dušika

Povećana upotreba mineralnih dušičnih gnojiva potrebna je kako bi se osigurala kvantitativna i kvalitativna proizvodnja hrane za rastuću svjetsku populaciju. Međutim, njihova primjena mora biti optimizirana uz tendenciju iskorištavanja alternativnih načina unosa dušika u tlo kakav nudi simbiozna fiksacija. Brojne su prednosti ovog procesa koji predstavlja neizostavan dio održive poljoprivredne proizvodnje.
Na prvom mjestu, ovaj proces je od velikog ekološkog značaja jer smanjuje onečišćenje podzemnih voda do kojih dolazi zbog prekomjernog korištenja mineralnih dušičnih gnojiva. Biljke mogu apsorbirati samo mali dio apliciranih dušičnih gnojiva, a Jensen i sur. (2012) procjenjuju da se čak 30-50 % gubi iz tla u podzemne vode uzrokujući globalno onečišćenje. Višak dušika u tlu razlažu mikroorganizmi u procesu denitrifikacije kojim nastaje N_2O. Prema US Environmental Protection Agency (EPA) N_2O ima 294 puta viši potencijal kojim pridonosi globalnom zatopljenju nego CO_2 (Biswas i Gresshoff, 2014). Stoga, iskorištavanje prirodnog procesa simbiozne fiksacije dušika pridonosi očuvanju kvalitete tla te smanjenju emisije stakleničkih plinova.
Proizvodnja mineralnih dušičnih gnojiva zahtjeva korištenje neobnovljivih fosilnih izvora čije se zalihe sve više iscrpljuju dok potrebe za njima rastu. Nadalje, spaljevanje fosilnih goriva glavni je uzrok emisije stakleničkih plinova. U tom smislu, može se govoriti i o ekološkom i o energetskom značaju simbiozne fiksacije dušika jer ovaj proces koristi prirodan izvor-sunčevu energiju za konverziju dušika u amonijak.
Osim biološkog značenja, iskorištavanjem simbioze rizobija i mahunarki značajno se može smanjiti cijena proizvodnje tih usjeva pogotovo uzimajući u obzir površine u svijetu na kojima se uzgajaju.

Količina biološki fiksiranog dušika nedavno je procijenjena na 100 do 122 milijuna tona godišnje (Herridge i sur., 2008). Autori navode da je riječ i o nekoliko puta većim količinama, no problem za iznošenje točnih podataka je nedostatak statistike o uzgoju

krmnih kultura te usjeva za zelenu gnojidbu. U ove podatke uključili su i prirodne ekosustave i poljoprivredna zemljišta.

Uzimajući u obzir industrijski način dobivanja dušika čiji je godišnji unos 30 tisuća tona, biološka fiksacija je osnovni put kojim vezani dušik ulazi u ekosustav. U tablici 2 navedene su izmjerene količine dušika koji mogu fiksirati, asimbiozni, asocijativni i simbiozni fiksatori.

U prirodnim ekosustavima kao i u poljoprivrednim zemljištima, najveći doprinos fiksiranog dušika daje simbiozni odnos mahunarki i rizobija. Količina ovisi o vrsti mahunarke te o soju rizobija. Primjerice, prema istim autorima, od mahunarki, najveću količinu dušika fiksira soja (16,4 tisuće tona).

Tablica 2. Količine fiksiranog dušika izmjerene u raznim sustavima biološke fiksacije te za različite usjeve. Podaci su preuzeti od Unkovich i Pate (2000).

Tip biološke fiksacije dušika		Najčešće količine fiksiranog dušika (kg/ha/god)
Asimbiozni fiksatori		
Heterotrofne bakterije		<5
Cijanobakterije		10–30
Asocijativni fiksatori		
Tropske trave Razni usjevi		10-20
Razni usjevi		5-65
Simbiozni fiksatori		
Azolla		10–50
Mahunarke za zelenu gnojidbu		50-150
Krmne kulture		50-250
Drvenaste i grmolike kulture		100-200
Mahunarke za ljudsku prehranu	Soja	80-175
	Grašak	50- 83
	Grah	55-85
	Leća	58-80
	Slanutak	40-100

2.1.3. Predsjetvena bakterizacija mahunarki

Da bi se postigle optimalne količine biološki vezanog dušika potrebno je istovremeno prisustvo tri najvažnija čimbenika: odgovarajuće sorte biljke domaćina, odgovarajućeg soja rizobije i povoljni uvjeti u tlu. Ipak, jedan od najčešćih limitirajućih čimbenika za uspješnu simbioznu fiksaciju dušika je nedovoljan broj učinkovitih rizobija u tlu. Kao rješenje ovog problema, u mnogim proizvodnim područjima uobičajena je praksa unosa selekcioniranih, učinkovitih sojeva rizobija. Bakterizacija (inokulacija) je relativno jednostavan postupak koji se preporučuje u uvjetima kada se kulture uzgajaju na mjestima na kojima nisu do tada tradicionalno uzgajane ili kada nisu uzgajane duži niz godina te kada uvjeti u okolišu otežavaju razvoj prirodne populacije simbioznih fiksatora. Inokulacija sa selekcioniranim rizobijama dakle omogućava povećanje proizvodnje mahunarki te poboljšava stanja i plodnosti tla (Rashid i sur., 2015).
Postupci u odabiru rizobija za predsjetvenu bakterizaciju mahunarki podrazumijevaju njihovu izolaciju, fenotipsku i genotipsku karakterizaciju te odabir najboljih sojeva u vegetacijskim te poljskim pokusima.

Cilj selekcije rizobija je pronaći soj koji će

- biti kompetitivniji od prirodno prisutnih sojeva iste vrste kako bi inficirao određenu mahunarku i stvorio dovoljan broj učinkovitih kvržica
- se nakon uspostave odnosa pokazati kao kompatibilan za učinkovitu fiksaciju atmosferskog dušika
- biti otporan na nepovoljne uvjete u tlu.

Selekcionirane i zatim umnožene bakterijske kulture u postupku inokulacije, apliciraju se u tlo ili na sjeme. U svakom slučaju važno je da cjepivo, koje sadrži žive bakterije bude čuvano u adekvatnim uvjetima, zaštićeno od sunca i topline.

2.1.4. Čimbenici koji utječu na bakterizaciju i simbioznu fiksaciju dušika

Ponekada će doći do izostanka nodulacije čak i kada su poduzete sve mjere dobre manipulacije cjepivom. Brojni biotički i abiotički čimbenici mogu nepovoljno utjecati na bakterizaciju.
Biotički čimbenici podrazumijevaju prisutnost autohtonih sojeva rizobija koji mogu biti zastupljeni u velikom broju u tlu, no često su neučinkoviti, ali vrlo kompetitivni jer su dobro prilagođeni na uvjete koji ondje prevladavaju. Uspješna bakterizacija zahtijeva da

inokulirani soj učinkovito fiksira atmosferski dušik i bude visoko kompetitivan u odnosu na prirodno prisutne sojeve.
Kompetitivni i dominantni sojevi, tj. oni koji dominiraju u nodulima mogu se identificirati pomoću nekoliko metoda od kojih je najpouzdanija obilježavanje *Gus* gena (Wilson i sur., 1991). Ovi znanstvenici detektirali su sojeve rizobija u nodulima graha koji su poprimile plavu boju nakon inkubacije sa x-gluc puferom.

Jedan od glavnih abiotičkih čimbenika koji utječu na uspjeh bakterizacije i općenito, simbiozne fiksacije dušika je povećan salinitet tla. Zbog velikih količina soli narušena je plodnost oko 40 % površina tla u svijetu (Zahran, 1999). Visoke koncentracije soli mogu štetano utjecati na rizobije izravno, kao rezultat toksičnosti ili neizravno, kao rezultat osmotskog stresa. Kod biljaka, tolerancija na soli je složen fenomen koji uključuje brojne biokemijske procese što dovode do fizioloških i morfoloških promjena. Salinitet može smanjiti rast biljaka i prinos ovisno o vrsti usjeva, količini soli i samom ionskom sastavu soli. Štetan utjecaj saliniteta na fiksaciju N_2 izravno je povezan sa smanjenjem sadržaja suhe tvari i dušika u biljci. Leguminoze su generalno klasificirane kao usjevi osjetljivi na povišene koncentracije soli, no među njima izdavajamo grahoricu (*Vicia faba)*, grah (*Phaseolus vulgaris)* i soju (*Glycine max)* koji su relativno otporni na visok salinitet. U simbioznom odnosu, leguminoze su osjetljivije na soli i osmotski pritisak nego kvržične bakterije no između sojeva rizobija postoji značajna razlika u otpornosti na salinitet. El-Sheikh i Wood (1995) zaključuju da su brzorastući sojevi tolerantniji nego spororastući.
Salinitet utječe na inicijalnu fazu nastanka simbioznog odnosa tj. na kovrčanje korjenovih dlačica te na razvoj nastalih nodula (Bouhmouch i sur., 2004). Ova istraživačka skupina zaključuje da su biljke koje ovise o simbioznoj fiksaciji osjetljivije na salinitet nego one tretirane mineralnim dušikom. Do smanjenog kapaciteta fiksacije dušika kod stresa izazvanog viskokim salinitetom dolazi zbog smanjene sinteze leghemoglobina u nodulima. Kako bi se prilagodili na uvjete povišenog saliniteta, mnogi simbiozni fiksatori dušika nakupljaju unutarstanične tvari poput polisaharida, poliamina, amino kiselina i anorganskih kationa (pr. K+). Ovi spojevi, pod zajedničkim nazivom osmoliti djeluju tako da sprečavaju dehidraciju, održavaju nitrogenaznu aktivnost i unutarstanični pH te popravljaju ionsku nestabilnost. Sojevi različitih vrsta rizobija mijenjaju svoju morfologiju pod uvjetima visokog saliniteta: stanice postaju spiralne ili filamentozne, njihova se veličina znatno povećava, stijenka se izobličuje, a dolazi i do poremećaja u citoplazmi.
Za uspješnu predsjetvenu bakterizaciju leguminoza pod stresnim uvjetima saliniteta potrebna je kvalitetna selekcija otpornih rizobija, ali i biljaka domaćina.

Većina leguminoza zahtijeva neutralnu ili slabo kiselu reakciju tla pa je mogućnost njihovog uzgoja ograničena na brojnim površinama posebice tropskih i subtropskih regija koja se suočavaju sa kiselim tlima.

Karakteristike kiselih tala (pH < 4) su slaba opskrbljenost fosforom, kalcijem i molibdenom te toksičan učinak aluminija i mangana što utječe na biljku, na bakterije, kao i na svaki korak nastanka simbioznog odnosa. U simbioznom odnosu, mikrosimbiont (kvržična bakterija) je najčešće pH-osjetljiviji partner (Hungria i Vargas, 2000). Nizak pH tla smanjuje otpuštanje flavonoida i aktivaciju Nod faktora kod soja *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (McKay i Djordjevic, 1993), a time onemogućuje infekciju korijenovih dlačica.

Utjecaj alkalnih tala na simbioznu fiksaciju dušika mnogo je manje proučavan od utjecaja kiselih tala. Ipak, poznato je da alkalna tla (pH > 8) sadrže veliku količinu natrij (Na+), klorida (Cl-), bikarbonata (HCO_3) i borata (BO_3) koji također nepovoljno utječu na fiksaciju.

Pretpostavlja se da otpornost na promjene pH vrijednosti kod rizobija ovisi o sposobnosti da održe unutarstanični pH između 7.2 i 7.5 (Hungria i Vargas, 2000), a kod mahunarki o povećanoj proizvodnji zaštitnih spojeva poput limunske, jabučne, aspartanske i drugih kiselina u eksudatima korijena.

Za rješavanje problema kiselosti tla općenito su predložene dvije strategije koje su primjenjive i za uspješnu bakterizaciju, a to je izbor tolerantnih biljaka i kalcifikacija. Kalcifikacija je bitna za rast i nodulaciju leguminoza ne samo zbog povisivanja pH nego i zbog povećane dostupnosti kalcija za biljke i rizobije važnog za održavanje integriteta stanične stijenke, nekih enzima i transporta kroz membranu.

Sadržaj vode u tlu također može imati utjecaj na rast rizobija i na simbioznu fiksaciju dušika. Do slabe nodulacije leguminoza u suhim tlima dolazi zbog smanjenja populacije rizobija, ali i zbog utjecaj takvih uvjeta na rast i vigor biljke. Sušni uvjeti nepovoljno utječu na infekcije korijenovih dlačica i formiranje infekcijske niti što dovodi do smanjenja broja nodula (Graham, 1981). Međutim, jačina stresnog utjecaj i stopa inhibicije simbioze ovisi o fazi rasta i razvoja biljke kao i o jačini stresa. Tako npr. kod blagog stresa dolazi samo do smanjenja broja nodula na korijenu, a kod srednjeg do jakog, i do broja i veličine nodula. Što se tiče faze razvoja biljke, otkriveno je da je izvrgavanje vodnom stresu štetnije za nodulaciju i fiksaciju tokom vegetativnog rasta nego u fazi reprodukcije.

Rizobije se međusobno znatno razlikuju u otpornosti na vodni stres ali još nije utvrđena korelacija sa taksonomskom podjelom i filogenetskim odnosima. Primjerice, neki navode da su spororastući pripadnici roda *Bradyrhizobium* otporniji nego brzorastući (rod *Rhizobium*) no postoje i obrnuti rezultati (Mahler i Wollum, 1980). Općenito se može reći

da su rizobije otpornije na nedostatak vode u tlu nego sama biljka. Štoviše, pronađene su rizobije koje bolje rastu pod sušnim uvjetima (Zahran, 1999).

Kod rizobija i ostalih bakterija i stanična membrana i stanična stijenka igraju ulogu u otpornosti na vodni stres, a jedan od trenutnih odgovora rizobija na vodni stres uključuje morfološke promjene.

Optimalna temperatura za većinu kvržičnih bakterija kreće se u rasponu od 25 °C do 30 °C dok su gornje granice između 32 °C i 47 °C. Rizobije su izložene nepovoljnim temperaturama i kada žive slobodne u tlu, ali i unutar nodula. Većina istraživanja o toleranciji rizobija na temperaturni stres usmjeren je na mikrosimbionte soje i graha kao najznačajnije leguminozne usjeve u svijetu. Rizobije koje noduliraju grah mogu preživjeti do 47°C, ali se njihova simbiozna učinkovitost gubi na visokim temperaturama. Još prije nastanka nodula, temperatura rizosfere utječe na izmjenu signalnih molekula između simbioznih partnera. Visoke temperature imaju inhibitorni učinak na prijanjanje bakterija na korijenove dlačice i formiranje infekcijske niti, zatim na sintezu leghemoglobina i aktivnost nitrogenaze. Visoke temperature tla mogu pridonijeti učestaloj izolaciji neinfektivnih sojeva rizobija. Segovia i sur. (1991) utvrdili su da upravo takvi neinfektivni izolati svojom brojnošću nadmašuju one koji mogu inficirati grah.

Općenito govoreći, visoke temperatura tla dovode do smrti mnogih rizobija izoliranih iz umjerenih klimatskih područja, no sojevi iz tropskih regija uglavnom preživljavaju bolje na visokim temperaturama tla.

U rizobijama su pronađeni proteini koji nastaju kao odgovor na stres izazavan visokom temperaturom, no njihova izravna uloga u tolerantnosti ili osjetljivosti nije utvrđena.

Veći broj istraživanja pokazuje da i niske temperature u zoni korijena utječu na infekciju, proizvodnju Nod faktora, nodulaciju, kao i usporavanje ili čak zaustavljanje procesa fiksacije N_2 kad temperatura padne sa 25 °C na 15 °C (Graham, 1981).

Niske količine nitrata ili amonijaka prisutnog u tlu mogu potaknuti nodulaciju, dok su visoke koncentracije mineralnog dušika jedan od čestih uzročnika koji mogu ograničiti uspjeh simbioze mahunarki i rizobija. Dokazano je da NO_3 zaustavlja infekciju korijena, razvoj nodula i aktivnost nitrogenaze. Pretpostavlja se da do inhibitornog učinka dušika na nodulaciju dolazi posredstvom biljke, međutim, postoje i razlike u djelovanju s obzirom na oblik dušika; nitrati imaju veći inhibitorni učinak od amonijačnog, posebno ako se dodaju neposredno nakon sjetve (Muller i Perreira, 1995).

Pretpostavka je da do inhibitornog učinka nitrata na fiksaciju N_2 dolazi zbog izravne kompeticije nitrat reduktaze i nitrogenaze za redukciju dušika ili zato što nitrit kao

nusprodukt nitrat reduktaze inhibira funkciju nitrogenaze ili leghemoglobina (Becana i Sprent, 1987).

Postoje znatne razlike između sojeva rizobija u njihovoj otpornosti na inhibitorni učinak mineralnog dušika na rast njihove populacije u tlu.

Uvjeti koji prevladavaju u okolišu odlučujući su za preživljavanje rizobija pa tako i na uspjeh bakterizacije i simbiozne fiksacije dušika. Promjene u rizosfernom okolišu mogu utjecati na rast, saprofitsku kompetenciju i perzistentnost. S ciljem poboljšanja prinosa leguminoznih usjeva u promjenjivom okolišu, trebalo bi kombinirati otporne sorte sa rizobijama otpornim na stres.

2.2. Makrosimbionti-mahunarke

Mahunarke su skupina biljaka koja pripada radzjelu Magnoliophyta, razredu Magnoliopsidae i redu *Fabales* te porodici *Fabaceae* (*Leguminosae*). Daljnja podjela porodice *Fabaceae* je na potporodice *Detarioideae, Cercidoideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Caesalpinoideae* i *Papillionoideae* (LPWG, 2017).

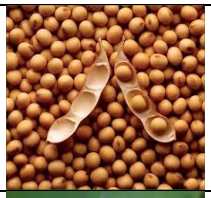
Slika 3. Izgled cvijeta podporodica a) *Dialioideae* b) *Caesalpinoideae* c) *Papillionoideae.*

Najznačajniji poljoprivredni usjevi poput soje (*Glycine max*), graha (*P. vulgaris*) i slanutka (*Cicer arietinum*) spadaju u potporodicu *Papilionoideae* a čak oko 95 % vrsta iz porodice *Papilionideae* može tvoriti simbiozne odnose sa rizobijama. Nedavno je otkriveno da vrstu *Mimosa* spp., noduliraju rizobije iz razreda betaproteobakterija (Chen i sur., 2005), dok sa vrstama iz potporodice *Caesalpinioideae,* u koju ubrajamo uglavnom tropske drvenaste vrste tek nekoliko rodova rizobija može tvoriti simbiozne odnose.

Mahunarke i žitarice su prvi usjevi koje su ljudi počeli uzgajati, oko 8000. pr.n.e. o čemu svjedoče fosilni ostaci iz dolina rijeka u zapadnoj Aziji. Iz tog područja mahunarke su se, zahvaljujući sposobnosti prilagodbe na različite uvjete kao i velikoj raznolikosti vrsta, proširile na sva područja od tropskih do umjerenih zona i od nizina do velikih nadmorskih visina.

Šireći se tako, mahunarke su postale glavni izvor biljnih proteina, čak i jedini za brojnu populaciju ljudi zemalja u razvoju. Za ljudsku prehranu najčešće se uzgaja suho sjeme ili mahune i nezrelo sjeme. Osim kao ljudska hrana, mahunarke imaju velik ekonomski značaj što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Upotreba različitih vrsta mahunarki.

Upotreba	Objašnjenje	Vrste	Slika
Ljudska hrana	Izvor proteina i škroba ulje	***Glycine max*** *Arachis hypogaea, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Cicer arietinum, Lens culinaris*	
Stočna hrana i /ili zelena gnojidba	Izvor proteina, međuusjevi	***Trifolium arvense*** *Medicago sativa* *Onobrychis viciifolia* *Lupinus* sp.	
Industrija	Vlakna, pigmenti	***Crotalaria juncea*** *Indigofera pinctoria*	
Medicina	Redukcija dijabetesa, antimikrobni učinci	***Trigonella foenum-graecum*** *Glycirrhiza glabr, Ononis spinosa* *Melilotus officinalis, Lotus corniculatus, Phaseolus vulgaris, Galega officinalis*	
Ostalo	Pošumljavanje, ukrasno bilje	***Robinia pseudoacacia*** *Laburnum anagyroides,* *Wisteria sinensis*	

Mahunarke uvelike doprinose održivom gospodarenju okolišem zahvaljujući sposobnosti da fiksiraju dušik sa simbioznim bakterijama pri čemu može doći do povećanog prinosa i smanjenja uporabe mineralnih gnojiva, čime se izbjegava zagađenje tla.

Međutim, u usporedbi sa žitaricama, slab je napredak postignut posljednjih desetljeća kako bi se poboljšala njihova proizvodnja. Dosadašnja saznanja pokazuju da je korištenje mahunarki za međuusjev dobra strategija za poljoprivrednu proizvodnju jer ostavljaju dovoljne količine dušika za naredne kulture. Problem u njihovom uzgoju odnosi se na nestabilan prinos, bolesti i štetnike te slabu prilagodbu (De Ron i sur., 2015). Nova istraživanja usmjerena su na razne pristupe u prevladavanju ovih nedostataka kao i na specifičnost njihovog odnosa sa rizobijama.

2.2.1. Grah

Danas je poznato više od pedeset vrsta roda *Phaseolus*, no samo ih je četiri kultivirano. To su: *P. vulgaris* L. (običan grah), *P. coccineus* L. (mnogocvjetni grah), *P. acutifolius* (oštrolisni grah) i *P. lunatus* (lima grah).
Phaseolus vulgaris je najrasprostranjenija vrsta roda *Phaseolus* i porodice Fabaceae, a uzgaja se u cijelom svijetu, najviše u južnoj Americi. Prema zastupljenosti, treća je po redu mahunarka u svijetu nakon soje (*G. max* L.) i kikirikija (*Arachis hypogea* L.).

Postoji značajna raznolikost graha s obzirom na morfološka i agronomska obilježja. U našoj prehrani najviše se koristi grah zrnaš i grah mahunar. Prema građi stabljike sorte graha zrnaša i mahunara svrstane su u sljedeće kategorije (Lešić i sur., 2004)
Phaseolus vulgaris L. ssp. vulgaris var. nanus
f. fibriferris - niski grah zrnaš
f. sine fibris - niski grah mahunar
Phaseolus vulgaris L. ssp. vulgaris var. vulgaris
f. fibriferris - visoki grah zrnaš
f. sine fibris - visoki grah mahunar
Sorte se dijele i prema dužini vegetacije, obliku, boji i veličini mahuna.

2.2.1.1. Podrijetlo graha

Američki kontinent centar je podrijetla graha odakle je nakon otkrića Amerike prenesen u Europu u 16. stoljeću. Iz Europe se počeo širiti i na druge dijelove svijeta (Zeven, 1997).
Debouck i sur. (1993) razlikuju tri genska centra divljih formi graha: Srednja Amerika, Ande i sjeverni Peru–Ekvador (slika 4). Najznačajniji su srednjoamerički i andski genetski bazen, dok trećem pripadaju divlje populacije koje rastu u malom geografskom području zapadnih padina Anda, a koje se razlikuju od ostalih po specifičnom fazeolinu (glavnom skladišnom proteinu) tipa „I“.

Slika 4. Tri centra podrijetla graha prema Debouck i sur. (1993).

Noviji podatci ukazuju da je centar podrijetla graha Srednja Amerika (Bitocchi i sur., 2012). Ova istraživačka skupina proučavala je nukleotidnu raznolikost pet gena divljih uzoraka graha iz cijelog područja od sjevernog Meksika do Perua. Otkrili su manju genetsku raznolikost graha u Andama u usporedbi sa Srednjom Amerikom i 4 različite genetičke grupe sa jasnom strukturom populacije koja je karakteristična za srednjeamerički genski centar. Pretpostavili su i da divlji grah koji raste u sjevernom Peruu i Ekvadoru predstavlja reliktnu populaciju koja uključuje samo mali dio genetske raznolikosti izvorne populacije, te da je fazeolin tip „I“ izčeznuo tijekom evolucije u Srednjoj Americi.

Analizom sekvenci 13 gen lokusa ustanovljeno je da je grah domestificiran odvojeno u Srednjoj Americi prije 8000 g. i u Andama prije 7000 g. Domestificirani oblici razlikuju se od divljih jer im je usporen mehanizam širenja, izgubljena dormancija sjemena, nisu osjetljivi na fotoperiod, imaju veće sjeme i kod njih se pojavljuje determinirani tip rasta (De Ron i sur., 2015). No, najznačajnija razlika je smanjena genetska raznolikost. Zaključili su to Bellucci i sur. (2014) primijenivši metodu sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. next generation sequencing) RNASeq, na 21 genotipu graha. Rezultati su pokazali da se raznolikost značajno smanjila (oko 60 %) kod pripitomljenih, ali i da je došlo do smanjenja raznolikosti ekspresije gena oko 18 %.

Prvi pisani tragovi o grahu u Europi datiraju iz sredine 16.-og stoljeća u opisima Fuchsa koji govori o 'Welsche Boonen', penjajućem grahu bijelih i crvenih cvijetova, sjemenki bijele boje, sivkaste, žute ili boje kože sa crnim točkama (Graham i Rannali, 1997).
Nakon introdukcije došlo je do prirodne selekcije na otpornost prema dugom danu, bolestima i štetnicima te raznim stresnim čimbenicima. Selekcija ljudskom aktivnošću odnosila se na vigor biljke, boju sjemena i na otpornost prema štetnicima. Međutim, na prinos se tada još nije moglo utjecati.
Sljedeća faza u širenju ove kulture bila je izmjena sjemena između sakupljača i poljoprivrednika, pa se tako vrlo brzo proširio po cijeloj Europi, Aziji i Africi.

Današnji varijeteti graha nastali su kao rezultat procesa domestifikacije i evolucije divlje vrste *P. vulgaris* var. *arborigineus,* koja potječe iz područja između Meksika i Argentine .

Populacije graha koje potječu iz različitih centara podrijetla, andskog i srednjoameričkog, razlikuju se po morfološkim, agronomskim te biokemijskim značajkama. O ovim značajkama opširan pregledni rad iznijeli su Gepts i Debouck (1991).

- Grah iz Srednje Amerike grah vjerojatno je u Europu stigao preko Španjolske i Portugala. Sadrži fazeolin „S" tipa, a sjeme je okruglo i manje od onog iz andskog centra
- Grah iz andskog centra prenesen je u Europu nešto kasnije, nakon otkrića Perua, a sjeme je veće i cilindrično te sadži fazeolin tipa „T".

U oba centra razlikuju se populacije divljih i kultiviranih varijeteta koje imaju različita morfološka, fiziološka i genetička svojstva, što je omogućilo da ova kultura uspijeva u brojnim ekološkim uvjetima od Amerike, Afrike, Kine i Europe.

U Europi je više zastupljen grah iz andskog genskog bazena, dok je primjerice u Brazilu i Kini češći srednjeamerički, a u Africi oba tipa. Dolaskom na druga područja nestajale su razlike uočene u sortama srednjeameričkih i andskih genskih centara čime je omogućeno križanje i prijenos genetskih informacija. Osim toga, jedan od načina stvaranja novih varijeteta graha je i dodavanje željenih karakteristika starih sorata novima. U Europi je ovo dovelo do rekombinacija kojima su stvorene nove sorte i lokalni varijeteti otporni na biotičke i abiotičke stresove, poput suše i nedostatka fosfora (De Ron i sur., 2015). Ta otpornost je vrlo važna u cilju osiguranja stabilnih prinosa i kvalitetnog hranidbenog sastava ove vrlo važne kulture koja je dugo zvana „hrana siromašnih".

Polimorfizam graha danas je tako velik da svaka regija ima svoje varijetete različitih naziva. Tradicijske sorte graha nastale su od starih tipova slučajnom ili ciljanom selekcijom i sada su dobro prilagođene na agroekološke uvjete u kojima se uzgajaju.
Često se grah klasificira obzirom na komercijalnu vrijednost, jer se zemlje i tržišta razlikuju prema zahtjevima za ovom kulturom. Prema FAO (2002) postoje 62 komercijalna tipa graha zrnaša, različita po veličini, obliku i boji zrna te vremenu kuhanja i mogućnosti dugotrajnog skladištenja.

2.2.1.2. Hranidbena i funkcionalna vrijednost graha

Osim da zadovolji potrebe prehrane stanovništva, grah u posljednje vrijeme privlači pozornost zbog svojih pozitivnih učinaka na zdravlje i sprečavanje nastanka bolesti što je osnovno obilježje funkcionalne hrane. Termin „funkcionalna hrana“ prvi put je uveden u Japanu sredinom 1980-ih godina kako bi se definirala hrana koja osim hranjive vrijednosti sadrži komponente posebnih bioloških funkcija. Funkcionalna hrana može pridonijeti poboljšanju zdravlja, smanjiti utjecaj bolesti i zaustaviti širenje bolesti (Luthria, 2006).
Pozitivne karakteristike graha povezane su s optimalnim kvalitativnim i kvantitativnim sastavom proteina, masti, vlakana, flavonoida, minerala i vitamina jer ovi spojevi djeluju na prevenciju kardiovaskularnih bolesti, metaboličkih poremećaja, oksidativnih stresova i karcinoma. Još uvijek nije do kraja razjašnjen mehanizam kojim pojedini sastojci utječu na zdravlje ljudi, no pretpostavlja se da brojne hranjive tvari i ostale fitotvari polučuju pozitivan učinak svojim sinergističkim djelovanjem (Camara i sur., 2013).

Najzastupljenija sastavnica suhe tvari graha su ugljikohidrati od kojih je najzastupljeniji i zdravstveno najvažniji škrob. Prema osjetljivosti na djelovanje amilaza koje ga razgrađuju, razlikuju se sporoprobavljivi, brzoprobavljivi i otporan škrob. Škrob otporan na hidrolizu mogu fermentirati bakterije probavnog sustava stvarajući masne kiseline kratkog lanca poput propionata, koji je povezan sa sniženim kolesterolom u krvi (Hayat i sur., 2014).
U ljudskom probavnom sustavu važna su i vlakna sačinjena od biljnih ugljikohidrata poput celuloze, hemiceluloze, pektina i lignina koja pomažu prolasku tvari kroz probavni sustav i reguliraju količinu glukoze u krvi. Slika 6 prikazuje mehanizam kojim konzumiranje graha može smanjiti bolesti krvožilnog sustava, dijabetes i karcinom.
Škrob, rafinoza, fruktooligosaharidi i stahiloza značajni su u grahu kao prebiotici koji poboljšavaju zdravlje domaćina. Božanić i Tratnik (1999) opisuju prebiotike kao supstrat za rast i metabolizam probiotičkih bakterija kojeg čine uglavnom neprobavljivi oligosaharidi.

Prema sadržaju proteina, grah se može grupirati zajedno s mesom, ribom i jajima. Lizin i triptofan su visoko zastupljene aminokiseline u sastavu grahu dok je metionin jedina koja nedostaje. Iako su proteini sirovog (neobrađenog) graha neprobavljivi, kuhanje i povišena temperatura mijenjaju njihovu strukturu povećavajući probavljivost, a time i biološku vrijednost. Grah ne sadrži gluten.

Vrijedan je izvor nezasićenih masnih kiselina koje čine 61 % ukupnih masnih kiselina (Hayat i sur., 2014). Polinezasićene masne kiseline štite rad srca i krvnih žila, te imaju protuupalna svojstva.

Bogata opskrbljenost mineralima poput željeza, kalcija, fosfora i cinka također je važna karakteristika hranidbene vrijednosti graha.

Od vitamina, u grahu su najzastupljeniji vitamini B kompleksa od kojih se može istaknuti folna kiselina (vitamin B9), važna kao kofaktor mnogih reakcija, a služi i za popravak i metilaciju DNK, stvaranje krvnih zrnaca i prevenciju anemije kod djece i odraslih.

Za vitamin E dokazano je antioksidativno i protuupalno djelovanje, a vitamin K je važan za zdravlje kostiju te po novijim istraživanjima ima antikancerogena svojstva (Thompson i sur., 2009). Klijanjem se povećava količina vitamina u grahu, posebno vitamina C i E.

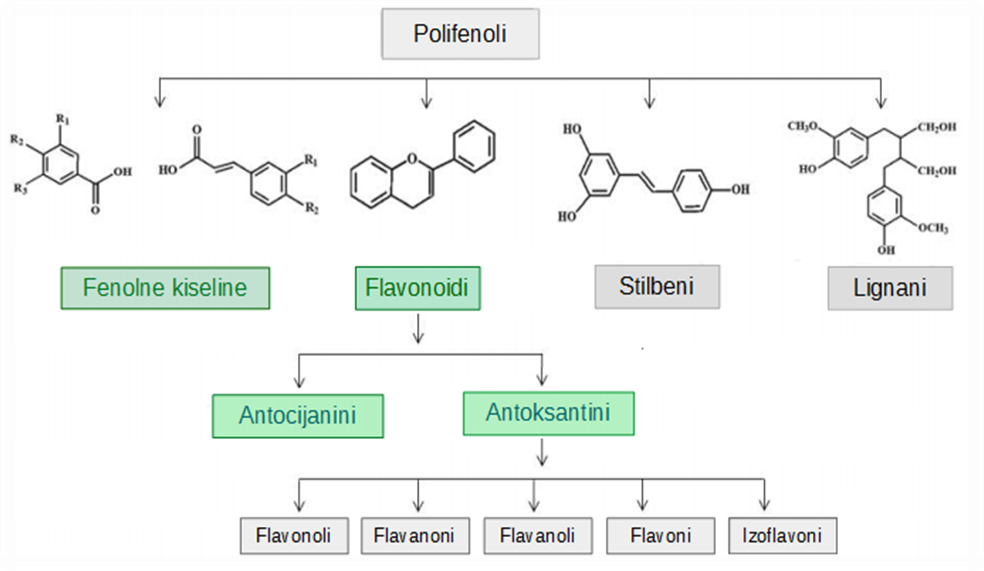
Brojni čimbenici poput sorte, agroekoloških uvjeta i agrotehničkih mjera tijekom uzgoja, kao i priprema graha, mogu utjecati na hranidbenu vrijednost graha.

Prema Hayat i sur. (2014) sastav suhog zrna raznih sorti graha iznosi:

- Ugljikohidrati 50,4 - 68,09 %
- Proteini 17,95 - 27,1 %
- Masti 0,66 - 2,8 %
- Minerali 2,83 – 5,88 %

Osim navedenih hranivih tvari, u grahu su prisutne i brojne fitotvari poput fenolnih spojeva, lignina, lecitina i inhibitora tripsina. One nemaju hranjivu vrijednost, no sudjeluju u održavanju brojnih bioloških funkcija organizma te posjeduju antioksidativna i antikancerogena svojstva.

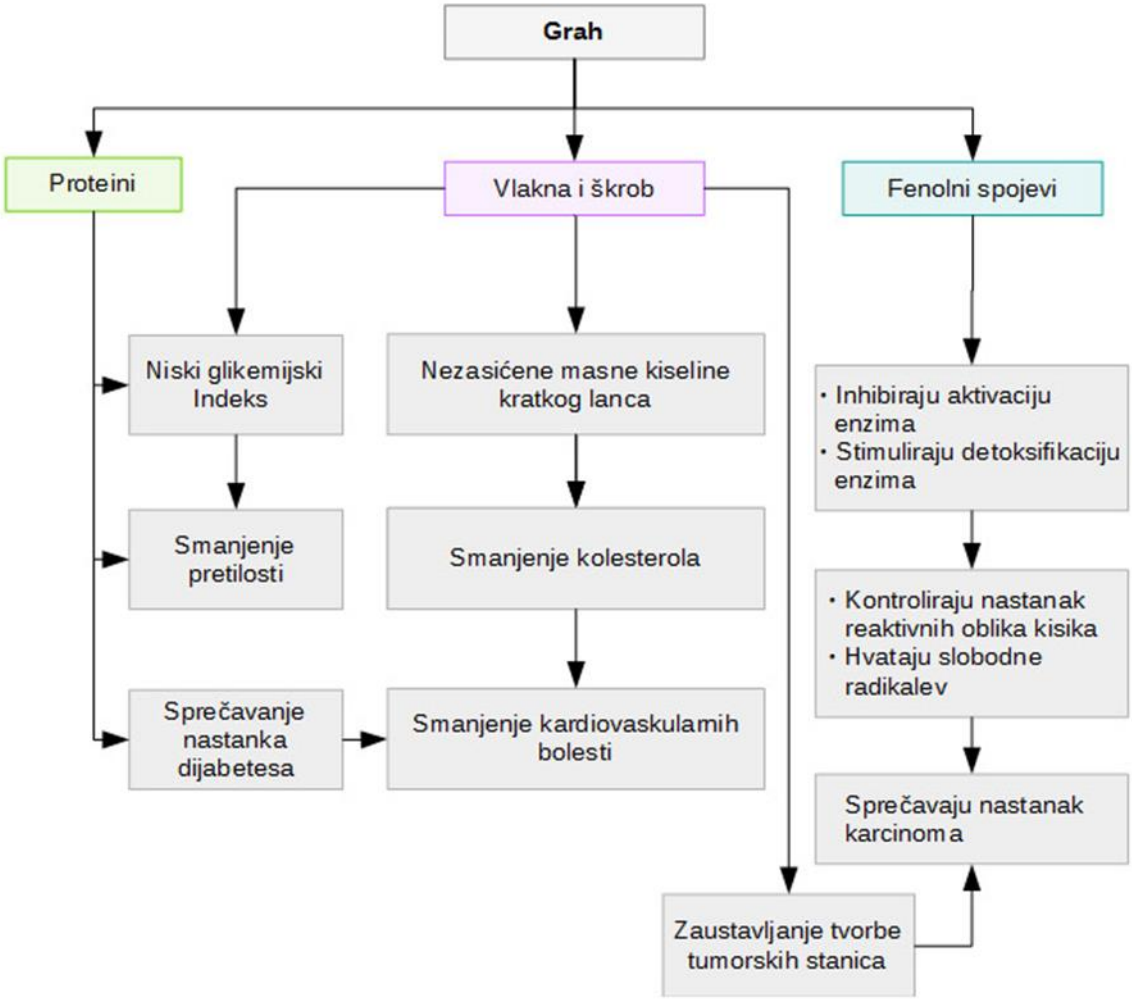
Najvažniju ulogu u zaštiti od kroničnih bolesti imaju fenolni spojevi (Del Rio i sur., 2012). Do danas je opisano više od 8000 različitih fenolnih spojeva, a razlikuju se po strukturi, kemijskim karakteristikama i funkciji. Podjela važnih polifenola prikazana je na slici 5.



Slika 5. Podjela polifenolnih skupina. Prilagođeno iz Camara i sur. (2013).

U grahu se nalazi najviše antocijanina, flavonoida, flavonola, izoflavona te fenolnih kiselina. Antocijanini su prisutni samo u sortama sa crnom i plavoljubičastom bojom sjemenke (Romani i sur., 2004). Najveća količina fenolnih spojeva sadržana je u sjemenoj ljusci, a različiti kulivari graha sadrže različite količine fenolnih spojeva. Osim toga, uvjeti proizvodnje graha mogu imati stresan učinak na biosintezu i akumulaciju sekundarnih metabolita poput fenola (Treutter, 2010).

Prije se smatralo da fenoli pridonose zdravlju čovjeka samo zbog sposobnosti vezanja slobodnih radikala, no u novijim istraživanjima dokazano je da kontroliraju stvaranje reaktivnih oblika kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*), inhibiraju aktivacijske enzime, stimuliraju detoksifikacijske enzime ili djeluju kao kelatori (Del Rio i sur., 2012).



Slika 6. Učinak konzumiranja graha na smanjenje nastanka bolesti krvožilnog sustava, dijabetesa i karcinoma. Prilagođeno iz Hayat i sur. (2014).

Najnovija epidemiološka istraživanja pokazuju da postoji povezanost između prehrane bogate grahom i ostalim mahunarkama i dugovječnosti, zdravlja srca i smanjenja rizika za mnoge tipove karcinoma. Istraživanja na laboratorijskim životinjama pokazala su da hranjenje grahom signifikantno smanjuje rak debelog crijeva u usporedbi s kontrolom te da konzumiranje graha i drugih mahunarki ima antiproliferacijski učinak na sve tumorne stanice a ovisi o konzumiranoj količini (Xu i Chang, 2012). Antikancerogeni učinak je povezan sa polifenolnim spojevima i sa masnim kiselinama kratkog lanca nastalim razgradnjom škroba graha (Feregrino-Perez i sur., 2008).

2.2.1.3. Morfološka svojstva

Phaseolus vulgaris je diploidna jednogodišnja vrsta. Najčešće je samooplodna, a ovisno o sorti može doći do stranooplodnje. U tropskim krajevima može doći do križanja, primjerice između vrsta *P. vulgaris* i *P. coccineus* (Graham i Ranalli, 1997).
Među najvažnijim svjetskim prehrambenim usjevima, grah se ističe najvećom raznolikošću s obzirom na oblike rasta, karakteristike sjemena i vrijeme dozrijevanja. Ova obilježja omogućila su da se uzgaja u najrazličitijim agroekološkim uvjetima.

Nakon klijanja, grah stvara glavni korijen, a ubrzo se pojavljuje i bočno korijenje. Korijenov sustav u povoljnim uvjetima u tlu doseže dubinu do 1,5 m no najveća korijenova masa nalazi se u površinskih 15-20 cm.
Na početku vegetacije, stabljika graha je zeljasta, a kasnije, djelovanjem viših temperatura može dosegnuti promjer do 1,5 cm u i stvoriti vanjski drvenasti sloj. Stabljika može biti glatka ili prekrivena sitnim dlačicama čija je uloga odbijanje uzročnika bolesti i štetnika (Mmbaga i Steadman, 1992). Po boji se razlikuju tamno zelena i crvenkasta stabljika, ponekad sa nijansama ljubičaste boje.
Stabljika graha može biti grmoliko razgranata (determinirani-dovršeni rast) ili duljine do 3 m (nedeterminirani-nedovršeni rast). Biljke s determiniranim tipom rasta prvo narastu do određene visine, a zatim razviju cvat, nakon čega prestaju rasti. Ovakav tip karakteriziraju nešto niže stabljike (30 do 60 cm) koje su čvršće i imaju veću mogućnost grananja. Za nedeterminirani tip rasta karakteristično je da stabljike na vršnom dijelu imaju vegetativni meristem zbog kojeg stabljika može dalje rasti u visinu i nakon lateralne pojave cvata. Takve stabljike se ovijaju oko potpore.

Listovi se razvijaju se nodijima. Kod graha se razlikuju dva tipa listova: primarni koji se razviju iz klicinih listića i jednostavni su, a ostali su neparno perasti i sastoje se od tri liske.

Liske su većinom srcolike i pokrivene sitnim dlačicama, svijetlozelenih do tamnozelenih nijansi (Lešić i sur., 2004).

Cvjetovi se javljaju bočno ili terminalno na koljencima iz pazušca lisnih peteljki, po jedan ili dva, rjeđe tri do četiri. Leptiraste su građe i veličine od 1,0-1,5 cm, a imaju 5 lapova, 5 latica, tučak i 10 prašnika (Lešić i sur., 2004). Cvjetovi su dvospolni. Do samooprašivanja dolazi dan prije otvaranja cvijeta kada pelud pada na njušku tučka. Pod određenim uvjetima može doći i do stranooplodnje i križanja. Cvijetovi mogu biti bijele, ružičaste do ljubičaste boje.

Nakon oplodnje počinju se razvijati plodovi, mahune. Razlikuju se po boji (tamnozelene do svjetlozelene, žutozelene, žute ili ljubičaste), veličini (4-20 cm x 1-3 cm), obliku (ravne ili zakrivljene) te po prisutnosti i boji pigmenata. Mahuna je pokrivena dlačicama i u njoj se razvije do 12 sjemenki, a najviše sorata ima 4-6 sjemenki.

Grah zrnaš i grah mahunar razlikuju se po sadržaju celuloze u mahuni. U unutrnašnjosti mahune kod zrnaša postoje celulozne niti po šavovima te čvrsti pergamentni sloj koji omogućuje pucanje. Grah mahunar nema tog sloja kao ni celuloznih niti, a mahuna je u nezrelom stanju ispunjena parenhimskim tkivom. Za ljudsku prehranu najviše se uzgaja grah zrnaš za upotrebu kao mlado ili suho zrno. Kod graha mahunara, mahune se jedu dok su zelene i mekane ili se zamrzavaju i konzerviraju.

Prema Gepts i Debouck (1991) sjemenke graha mogu biti različitog oblika: okrugle, eliptične, spljoštene ili izduženo zaobljene, različitih boja (bijele, sive, ružičaste, crvene, žute, smeđe, crne) i veličine (1-2 cm x 0,5-1 cm i debljine oko 0,5 cm). Boja sjemena nije genetski povezana sa bojom cvijeta, ali je česta pojava da sorte bijelog cvijeta imaju i bijelo sjeme i isto tako da se obojeno sjeme javi kod obojenog cvijeta. Masa 1000 zrna je od 150 – 900 g.

Nalijevanje sjemena također ovisi o sorti; 23 dana kod sorti determiniranog rasta do 50 dana kod sorti nedeterminiranog rasta. Fiziološka zrelost nakon koje više ne dolazi do povećanja mase suhe tvari može se pojaviti 50 dana nakon sjetve kod sorti kratke vegetacije, odnosno 250 dana kod sorti primjerenih za područja hladnije klime i velikih nadmorskih visina (Graham i Ranalli, 1997).

2.2.1.4. Biološka svojstva

Zahvaljujući kratkoj vegetaciji grah se može uzgajati u različitim klimatskim uvjetima. Kao termofilna kultura, grah za klijanje zahtijeva minimalnu temperaturu od 8 °C do 10 °C, dok je optimum 18 °C do 22 °C. Do klijanja graha dolazi 8-10 dana nakon sjetve, kada se na površini tla pojavljuju kotiledoni.

Cvatnja započinje 28-42 dana nakon sjetve, a to vrijeme ovisi o sorti, temperaturi i fotoperiodu. Najkraće je kod sorti determiniranog tipa rasta. Sorte nedeterminiranog tipa rasta produžuju cvatnju narednih 15-30 dana (Graham i Ranalli, 1997).

Iako je grah biljka kratkog dana, današnje sorte su uglavnom neutralne na dužinu dana pa većina biljaka cvjeta čim fiziološki sazri.

Za cvatnju i zametanje mahuna optimum je oko 23 °C, a cijeli generativni razvoj graha je jako osjetljiv na temperaturu. Pri temperaturama nižim od 15 °C i višim od 35 °C zaustavlja se cvatnja i dolazi do propadanja sjemena (Hampton i sur., 2013). Općenito, temperaturna kolebanja u ovim fazama mogu nepovoljno utjecati na prinos.

Faza cvjetanja osjetljiva je i na nedostatak vlage u zraku. To je faza u kojoj je evapotranspiracija najveća. Transpiracijski koeficijent (količina vode potrebna za izgradnju 1 kg suhe organske tvari) graha, po Briggs i Shantzu je 748.

Budući da je korijen graha pretežno u površinskom sloju, za dobar rast i razvoj potrebno je oko 250 – 400 mm padalina ili 2500 – 4000 m^3 vode po hektaru (Lešić i sur., 2004).

Suša može dovesti do kašnjenja klijanja i do mjesec dana, a nepovoljan utjecaj ima i na cvatnju i sazrijevanja mahuna, međutim, i prevelika vlaga tla može uzrokovati uvenuća sjemena, korijena i mladih biljčica.

Problemi sa sušom prisutni su u više od polovice proizvodnog područja zemalja u razvoju, ali pravilno gospodarenje vodom je odlučujuće za proizvodnju graha u ostalim dijelovima svijeta.

Svjetlost je kritičan čimbenik u početnoj fazi razvoja graha čiji izostanak dovodi do izduženja mladih biljaka.

2.2.1.5. Uzgoj graha

Za visoke prinose grahu je potrebno osigurati duboka, srednje teška, rastresita, dobro aerirana i umjereno vlažna tla pH-vrijednosti 6,5 – 7,5 poput černozema, aluvijalnog tla ili livadne crnice (Todorović i sur., 2008). Kisela tla (pH niži do 5) nepovoljno djeluju na rast kulture kao i na mikrosimbionte-kvržične bakterije.

Količine dušika koje grah može podmiriti putem simbiozne fiksacije vrlo su varijabilne te je za početni rast graha potrebno dodati dušik mineralnom gnojidbom. Potreba za dušikom povećana je i na kraju vegetacije zbog sinteze proteina u sjemenu. U uvjetima nedostatka dušika u tlu biljke su slabije i osjetljivije na napad štetnika. Osim dušika, u predsjetvenoj obradi tla potrebno je dodati i određene količine fosfora i kalija koje ovise o stanju tla prije sjetve. Prema Matotanu (2004) za 1 tonu prinosa graha zrnaša potrebno je dodati 49 kg N, 14 kg P_2O_5 i 46 kg K_2O.

U nekim tlima javlja se problem nedostatka hraniva (N, P, K, S, Zn, Ca i Mg) što nepogodno utječe na rast graha no to je češće u kiselim tlima zemlja Latinske Amerike i Afrike.

Grah se sije na dubini 8 – 10 cm u redove razmaka 40-60 cm najčešće početkom svibnja kada temperatura tla dosegne 10 – 12 °C (Matotan, 2004). Za jedan hektar, ovisno o sorti, veličini sjemena i klijavosti, potrebno je od 80 do 100 kg sjemena.
Grah se uzgaja u plodoredu, najbolje sa rajčicom, paprikom ili kukuruzom. Ostavlja 30 t/ha suhe tvari u organskoj masi i dio dušika vezan iz zraka putem simbiozne fiksacije (Lešić i sur., 2004). S druge strane, na kraju vegetacije iznese velike količine hraniva iz tla.

U Americi i Europi proizvodnja graha je komercijalizirana s obzirom na to da uključuje standardnu mehanizaciju za unos mineralnih gnojiva i pesticida, sjetvu te po potrebi navodnjavanje, a često i za polu-automatiziranu berbu.
Berba graha ovisi o namjeni graha. Za mahune, berba počinje dva do četiri tjedna nakon cvatnje (sedam do osam tjedana nakon sjetve). Za suho zrno berba može započeti kada mahune počnu žutiti i sjeme sazrije (sadržaj vode oko 50 %), no najčešće se obavlja kada se sjeme osuši do 15 %. Ako se mahune previše osuše, same se otvaraju i može doći do gubitka sjemena. Nakon berbe, nastavlja se fiziološko i biokemijsko sazrijevanje sjemena. Kada sadržaj vode dosgne 11-12 % sjeme se treba adekvatno uskladištiti u hladnim prostorijama kako bi mu se očuvala kvaliteta (FAO, 1999).

Problemi kod uzgoja graha javljaju se u svim područjima. Bolesti koje se prenose sjemenom najveći su ograničavajući čimbenik u uzgoju graha. Najznačajniji bolesti na grahu su: bakterijska prstenasta pjegavost (*Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola), smeđa pjegavost graha (*Colletotrichum lindemuthianum*), palež (*Fusarium oxysporum* sp. Phaseoli), hrđa graha (*Uromyces appendiculatus* var. Appendiculatus), bijela trulež (*Sclerotinia sclerotiorum*), antraknoza (*Ascochyta spp*.), siva plijesan (*Botrytis cinerea*), i Virus običnog mozaika graha (BCMV, Bean common mosaic virus). Ove bolesti češći su problem u tropskim uvjetima jer se patogeni ondje razvijaju brže. Također, na malim uzgojnim područjima poljoprivrednicima je ograničena mogućnost plodoreda, a cijena kvalitetnog sjemena otpornih sorti je previsoka.
Jedan od značajnih bioloških čimbenika koji negativno utječe na rast graha je prisutnost korova. Kontrola korova najvažnija je pri planiranju usjeva, a njihova štetnost ovisi o proizvodnom sustavu. Sorte determiniranog tipa rasta slabije su otporni na korove jer ih oni mogu nadrasti.

Kao rješenje navedenih problema u svijetu su razvijeni programi oplemenjivanja kako bi se stvorile sorte otporne na nepovoljne biotičke i abiotičke čimbenike.
Prvi ciljevi oplemenjivanja bili su poboljšanje otpornosti na bolesti i prilagodba na uvjete okoliša. Sljedeći cilj bio je selekcionirati biljke determiniranog tipa rasta s manje grananja, kraćim internodijima, neosjetljive na fotoperiod i koje više biomase nakupljaju u reproduktivnim organima. Što se tiče većih prinosa, oni su često postignuti križanjem srednjeameričkih i andskih sorti. U takvim hibridnim populacijama nestale su razlike malog i velikog sjemena. Krajem prošlog stoljeća, oplemenjivanje je bilo usmjereno na kvalitetu proteina, odnosno, na optimalan sastav esencijalnih aminokiselina te na zadovoljavanje zahtjeva tržišta za određenom veličinom, bojom i kvalitetom sjemena (De Ron i sur., 2015).
Današnji izazov je otkrivanje novih gena koji kontroliraju važna proizvodna svojstva što zahtijeva povezivanje fenotipskih karakteristika sa funkcionalnim genima.

Grah je najvažnija mahunarka u ljudskoj prehrani, čija se svjetska proizvodnja procjenjuje na preko 26 milijuna tona. Prema statistici FAO iz 2016, najveći proizvođači su Mianmar (4,5 milijuna tona), India (4,1 mil tona), Brazil (3,3 mil.tona) Meksiko (1,27 mil.tona).
Grah se u Republici Hrvatskoj uzgaja tek na malim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima korištenjem tradicionalnih poljoprivrednih tehnologija u proizvodnim sustavima sa niskim ulaganjima (Vidak i sur., 2015).

U gotovo cijelom području Hrvatske postoje dobri agroklimatski uvjete za uzgoj graha. Najpogodnije su ravnice istočne Slavonije, dok je u krškim područjima Dalmatinske Zagore potrebno navodnjavanje (Lešić, 1984). U hrvatskim tlima, rijetko se javlja nedostatak mikroelementa, osim u pjeskovitim tlima u kojima može doći do nedostatka magnezija, mangana, cinka, sumpora i bakra. S obzirom na različite klimatske prilike, postoji nekoliko optimalnih rokova sjetve: za mediteransku Hrvatsku 10. – 15., za istočni dio kontinentalne Hrvatsku od 25. travnja na dalje te za sjeverozapadnu Hrvatsku od početka do kraja svibnja (Pavlek, 1972).

Unatoč povoljnim uvjetima, proizvodnja graha u Hrvatskoj je zanemarena i kontinuirano se smanjuje. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku (2016), proizvodnja graha u Hrvatskoj iznosi nešto više od 6000 t godišnje, ako se u obzir uzme proizvodnja graha za suho zrno te za svježe zrno i mahune. Prosječni prinosi graha za suho zrno iznosili su od 0,6 do 1,3 t/ha što predstavlja četverostruko niže prinose od svjetskog prosjeka.

Uzroci niskih domaćih prinosa graha posljedica su malog udjela komercijalne proizvodnje za veće potrebe tržišta te sjetva sjemena starih sorti koje nisu prikladne za mehaniziranu žetvu (Matotan, 2004).

2.2.1.6. Istraživanja u Republici Hrvatskoj

Dosadašnja istraživanja vezana za grah u Republici Hrvatskoj odnosila su se na utjecaj roka sjetve, sklopa i sorte na prinos mahuna, zelenu masu te krupnoću sjemena (Pavlek, 1972), zatim na utjecaj duljine vegetacije na mogućnost kontinuiranog dozrijevanja niskih sorti graha i na utjecaj temperatura i oborina na rast i prinos niskog graha mahunara (Borošić, 1992). Britvec i sur. (1993) proučavali su kvantitativne razlike sjemene ljuske graha te ih povezali sa tehnološko-prehrambenim vrijednostima proučavanih populacija i sorata.

Značajan doprinos spoznajama o ovoj kulturi su istraživanja u sklopu projekta „Genetska osnova količine bioaktivnih hranivih tvari hrvatskih tradicijskih kultivara graha“ voditeljice doc.dr.sc. Klaudije Carović-Stanko kojima je cilj utvrditi podrijetlo, genetsku raznolikost te sadržaj bioaktivnih hranivih tvari hrvatskih tradicijskih kultivara (sorti) graha.
Hrvatski tradicijski kultivari, nastali dugotrajnom prilagodbom na okoliš pokazuju veliku raznolikost u morfološkim i agronomskim svojstvima. Dosadašnji rezultati ukazuju da većina (279 od 300) uzoraka (primki) graha prikupljenih iz svih dijelova Hrvatske pripada tradicijskim kultivarima/morfotipovima udomaćenih imena: Trešnjevac, Zelenčec (Slavonski zeleni), Biser, Dan noć, Puter, Tetovac i Kukuruzar te da se oni bitno razlikuju prema sadržaju ukupnog dušika u sjemenu te po sadržaju ukupnih proteina (Carović-Stanko i sur., 2015). Osim toga, ovi kultivari razlikuju se i u brojnim kvalitativnim svojstvima, od čega su najveće morfološke razlike u sjemenoj ljusci te u kvantitativnim svojstvima prema kojima najznačajniju varijabilnost pokazuju u trajanju cvatnje (Vidak i sur., 2015). U svijetu, prinos tradicijskih kultivara iznosi 0,4 do 2,9 t/ha i sve više se potiče njihovo očuvanje čemu pridonosi interes mnogih sjemenskih kuća za proizvodnjom i otkupom (De Ron i sur., 2015). Kako su hrvatski tradicijski kultivari u velikoj opasnosti od izumiranja, rezultati ovog projekta trebali bi potaknuti njihovo očuvanje i promociju njihovog uzgoja.

Kako u Hrvatskoj postoje vrlo povoljne agroekološke prilike za uzgoj graha, očekuje se da istraživanja provedena ovom disertaciji također doprinesu promociji uzgoja tradicijskih sorti, Trešnjevca i Slavonskog zelenog na ekološki prihvatljiv način.

2.3. Mikrosimbionti-kvržične bakterije

Rizobija je zajednički naziv za bakterije tla koje mogu fiksirati atmosferski dušik u simbioznom odnosu sa mahunarkama. Prema *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* rizobije su aerobne, pokretljive, Gram-negativne, štapićaste bakterije koje mogu formirati specifične strukture-kvržice (nodule) na korijenu mahunarki i nekih drugih biljaka (Kuykendall, 2005). U tako formiranim novi organima dolazi do konverzije atmosferskog dušika u amonijski oblik koji asimilira biljka opskrbljujući zauzvrat bakteriju hranjivima i pružajući joj zaštitu unutar nodula.

2.3.1. Genom rizobija

Genom rizobija sastoji se od kružnog kromosoma, megaplazmida (poput *Sym* plazmida) i ostalih plazmida čiji broj i veličina variraju između vrsta i sojeva. Rizobije imaju jedan do 10 plazmida. Genom rizobija podijeljen je na kromosomalni genom koji sadrži gene odgovorne za osnovne funkcije poput rasta i razmnožavanja te na plazmidni genom povezan sa prilagodbom na uvjete u okolišu (Dresler-Nurmi i sur., 2009).

Kod brzorastućih rizobija roda *Rhizobium* i *Ensifer*, geni za nodulaciju (*nod*), strukturu nitrogenaze (*nif*) i simbioznu fiksaciju (*fix*) smješteni su na plazmidima nazvanim simbiozni plazmidi (pSym). Kod roda *Bradyrhizobium* (i nekih vrsta roda *Mesorhizobium*) simbiozni geni su kromosomalni, grupirani u fragmente od oko 500 kbp te se nazivaju simbiozni otoci (engl. *symbiosis islands*) (Gottfert i sur., 2001).

Genom rizobija može se također podijeliti u osnovni (engl. *core*) i pomoćni (engl. *accessory*). Osnovni genom sadrži konstitutivne (engl. *housekeeping*) gene, dakle one uključene u osnovne metabolizam, izmjenu informacija itd..

Zbog prisutnosti kod svih bakterija, jedan od konstitutivnih gena, 16S rRNA (*rrs*) je najčešće korišten gen za proučavanje filogenetičkih odnosa. Međutim, kod ribosomalnih gena rizobija može doći do rekombinacije i polimorfizma zbog čega je proučavanjem samo *rrs* gena teško odrediti njihovog zajedničkog pretka (Vinuesa i sur., 2005).

U genomu rizobija, zbog konzerviranosti i sveprisutnosti, važni su još neki kromosomalni konstitutivni („housekeeping“) geni:

- *atp*D- kodira za beta podjedinicu ATP sintaze zbog čega je važan u proizvodnji energije
- *rec*A- kodira dio sustava za rekombinaciju i popravak DNK
- *dna*K- kodira šaperon koji sprečava agregaciju proteina i pomaže u strukturiranju oštećenih proteina

- *gln*II- kodira za glutamin sintetazu II, ključni enzim za asimilaciju dušika

Za razliku od konstitutivnih gena, pomoćni („accessory“) geni razlikuju se između sojeva iste vrste. U pomoćne gene ubrajamo one odgovorne za fiksaciju dušika. Podijeljeni su u dvije skupine: *nif* geni homologni onima koje u svom sustavu posjeduju i asocijativni i asimbiozni fiksatori dušika i *fix* geni odgovorni isključivo za simbioznu fiksaciju dušika. Razvoj i metabolizam bakteroida (rizobija nakon ulaska u korijen biljke domaćina) regulira heterogena skupina *fix* gena (Dresler-Nurmi i sur., 2009).
Od *nif* gena važno je navesti:

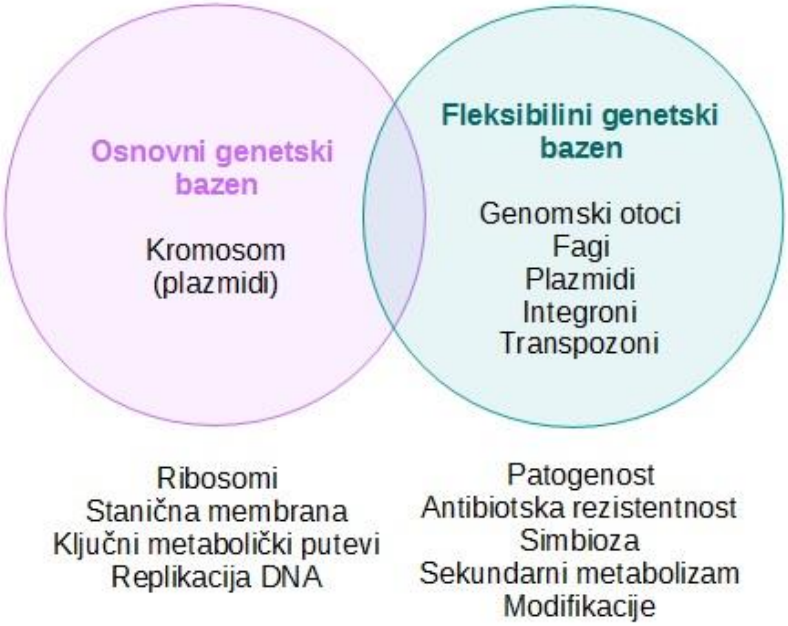
- *nif*H koji kodira za dvije identične podjedinice komponente II enzima dinitrogenaze reduktaze
- *nif*D- kodira za alfa podjedinicu komponente I nitrogenaze reduktaze

Nodulacijski geni svojim različitim sekvencama utječu na proizvodnju različitih Nod faktora. Kao rezultat toga, svaka vrsta rizobija odabire različiti broj i različite vrste domaćine koje može nodulirati. Građa *nod* gena, njihova pozicija u genomu, prisustvo ili odsustvo te broj kopija vrlo se razlikuje između sojeva rizobija.
Nodulacijski geni mogu biti regulatorni, opći (engl. *common*) i specifični za domaćina (engl. *host specific*):

- *nodD*- regulatorni gen, kodira za aktivatore ostalih nodulacijskih gena. Rizobije imaju 1-5 kopija ovog gena
- *nodC*- kodira za N-acetilglukozaminil transferazu, što je prvi korak u stvranju Nod faktora. Ovo utječe na duljinu hitin oligosaharidnog lanca i odabir domaćina
- *nodA* kodira enzim acilo-transferazu koji prenosi masne kiseline u Nod faktor. Taj gen osnova je specifičnosti za domaćina

Horizontalni transfer nekih pomoćnih gena česta je pojava između različitih sojeva. Lateralni odnosno horizontalni (HGT engl. *horizontal gene transfer*) razlog je nastajanju novih sojeva. Takav prijenos gena povezan je s prisutnošću tzv. premještajućih elemenata (engl. *transposable* elements) tj. DNA sekvenci koje mogu mijenjati svoju poziciju unutar genoma. Prijelazni genetički elementi čine fleksibilni genetski bazen prokariota (slika 7), a uključuju umetnute sekvence, transpozone, integrone, bakteriofage, plazmide i genetske otoke, poput onih za patogenost ili simbiozu. Kao što patogene bakterije posjeduju fleksibilni set gena odgovoran za virulenciju i invazivnost koji određuju njihovu patogenost, tako je i kod rizobija prisutan set gena koji im omogućavaju da uspostave simbiozni odnos (Hacker i Carniel, 2001).

Zahvaljujući horizontalnom transferu gena, dolazi do nasljeđivanja i ekspresije svojstava vezanih za interakciju s biljkom, adaptaciju i kompeticiju.



Slika 7. Grafički prikaz genetskih bazena u genomu prokariota. Geni su smješteni u općem i fleksibilnom genetskom bazenu. Navedene su funkcije za koje kodiraju geni iz svakog od ova dva bazena. Prilagođeno iz: Hacker i Carniel (2001).

2.3.2. Taksonomija rizobija

Krajem 19. stoljeća, nizozemski mikrobiolog i botaničar, Martinus Willem Beijerinck izolirao je bakterije iz kvržica na korijenu graška i povezao ih sa sposobnošću biljke da fiksira dušik. Frank je ove bakterije svrstao u rod koji je nazvao *Rhizobium* i opisao prvu vrstu - *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889) nakon čega su sve otkrivene vrste koje noduliraju biljke pripadale rodu *Rhizobium*.

U istraživanjima početkom 20. stoljeća, klasifikacija rizobija se temeljila na vrsti mahunarki koje mogu nodulirati pa su na toj osnovi definirane unakrsno inokulacijske skupine. Tada je bilo poznato samo pet vrsta rizobija: *Rhizobium meliloti* (kao mikrosimbiont lucerne), *Rhizobium trifolii* (djeteline), *Rhizobium phaseoli* (graha), *Rhizobium lupini (lupine) i Rhizobium japonicum* (soje).

Ubrzo je Wilson predložio da se ovakav pristup napusti jer su pronađene brojne vrste koje mogu nodulirati biljke izvan ovako definiranih skupina (Wilson, 1944).

Dalje je uslijedila podjela rizobija na temelju brzine njihovog rasta na hranjivom mediju u dvije skupine: brzorastući (*Rhizobium*) i spororastući (*Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984). Generacijsko vrijeme brzorastućih je manje od 6 sati i na hranjivom mediju tvore kolonije promjera 2-4 mm za 2-5 dana, dok je generacijsko vrijeme spororastućih više od 6 sati, a kolonije se pojavljuju nakon više od 5 dana pri standardnim uvjetima.
Paralelno su se za opisivanje novih taksa počele koristiti brojne fenotipske i genotipske metode nakon otkrića da su nodulacijski geni smješteni na plazmidima te da je moguć njihov prijenos između bakterija u tlu (Dresler-Nurmi i sur., 2009) što je dodatno potvrdilo nepouzdanost dotadašnjeg pristupa taksonomiji.
Analizom više od 200 fenotipskih karakteristika izolata rizobija i upotrebom komparativne gel elektroforeze staničnih proteina te rRNA-DNA hibridizacije Dreyfus i sur. (1988) su opisali rod *Azorhizobium.*

2.3.2.1. Sekvenciranje 16S rRNA gena

Svojevrsna revolucija u taksonomiji rizobija započela je 1984. godine, kada je Whoese svrstao bakterije koje noduliraju leguminoze u razred alfaproteobakterija temeljem analize sekvenci 16S rRNA gena (Woese i sur., 1984). Od tada je sekvenciranje ovih gena postalo osnovna metoda koja je omogućila identifikaciju brojnih novih vrsta i rodova, ali i dovela do nekoliko značajnih promjena u klasifikaciji rizobija.

16S rRNA gene ubrajamo u konstitutivne gene, smješteni su na kromosomima prokariota i kodiraju proteine uključene u održavanju fizioloških funkcija prokariota (Dresler-Nurmi i sur., 2009). *Rhizobium tropici* je prva vrsta u čijem je opisu korišteno sekvenciranje 16S rRNA gena (Martinez-Romero i sur., 1991).
De Lajudie i sur. (1992) izolirali su šest bakterija iz kvržica tropske leguminoze *Neptunia natans.* Zaključili su da su izolati fenotipski i genotipski različiti od do tada poznatih vrsta i svrstali ih u novi rod- *Allorhizobium.*
Rod *Mesorhizobium* opisali su Jarvis i sur. (1997) te potvrdili da vrste *Rhizobium loti*, *Rhizobium ciceri* i *Rhizobium meditteraneum* u stvari pripadaju ovom rodu. Druge dvije vrste iz roda *Rhizobium* (*Rhizobium fredii* i *Rhizobium meliloti*) reklasificirane su u rod *Sinorhizobium* koji je kasnije preimenovan u *Ensifer*.

2.3.2.2. Ostali konstitutivni geni koji se koriste u taksonomskim i filogenetskim istraživanjima

Iako je sekvenciranje 16S rRNA gena osnovna metoda u identifikaciji bakterija i ona ima svoje nedostatke, posebno u primjeni kod skupine rizobija. Naime, brojne vrste rizobija (posebno onih iz *R. leguminosarum-Rhizobium etli* filogenetičke skupine) imaju identične 16S rRNA gene (Velazquez i sur., *u postupku objave*) zbog čega se temeljem njihovih sekvenci ne mogu razlikovati bliske vrste (Ramirez-Bahena i sur., 2008; Saidi i sur., 2014). Razlog je vjerojatno njegova evolucijska konzerviranost, a kao rješenje ovog problema nameće se sekvenciranje drugih konstitutivnih gena. Gaunt i sur. (2001) prvi su analizirali *recA* i *atpD* gene četiri različite vrste rizobija.

U identifikaciji rizobija danas se najčešće koristi analiza sekvenci više lokusa (MLSA, engl. *Multilocus Sequence Analysis*). Iako je od strane odbora za definiranje vrsta u bakteriologiji predloženo da se u MLSA analizu uključi barem pet konstitucijskih gena, taj broj još nije točno definiran, a neki smatraju da je minimum od tri gena potreban za MLSA. Ovim pristupom nedavno su opisana dva nova roda *Neorhizobium* (Mousavi i sur., 2014) i *Pararhizobium* (Mousavi i sur., 2015).

2.3.2.3. *NodC* gen i simbiovari rizobija

Neki znanstvenici su u MLSA uključili i simbiozne gene poput *nodA*, *nifH* ili *nodC* koje nazivamo pomoćni (engl. *auxiliary*, *accessory*). Analize ovih gena nisu pronašle primjenu u taksonomiji, ali su vrlo korisni u proučavanju biogeografije izolata.
Osim toga, oni su osnova za definiranje simbioznih biovarijeteta, grupe sojeva unutar iste vrste koji mogu uspostaviti simbiozni odnos sa odeđenom leguminozom. U počecima istraživanja rizobija, Jordan je ovakve grupe nazvao „biovar“ uočivši da se nodulacijski plazmidi mogu prenositi između sojeva (Jordan, 1984). Prema biljkama koje mogu nodulirati, definirao je biovare viciae, trifolii i phaseoli unutar vrste *R. leguminosarum.*
U narednom razdoblju, analiza *nifH* gena korištena je za opisivanje nekih novih biovara, te za razlikovanje između biovara giardini i gallicum pronađenih kod vrsta *Rhizobium giardinii* i *Rhizobium gallicum* (Amarger i sur., 1997).
Analizom sekvenci *nodC* gena mogu se razlikovati biovari phaseoli i gallicum (vrste *Rhizobium gallicum*) i bv. giardinii (vrste *Rhizobium giardinii*) koji noduliraju grah (Laguerre i sur., 2001). Vinuesa i sur. (2005) su ovom metodom opisali prvi biovar iz roda *Bradyrhizobium,* vrste *Bradyrhizobium japonicum*.

Godine 2011. na prijedlog Rogel i sur. (2011) prihvaćen je termin „simbiovar“ koji zamjenjuje dotadašnji „biovar“.
Analizom sekvenci nekih od spomenutih gena (*nod*A, *nif*H, *nod*C) potvrđeno je da neke vrste rizobija poput *R. leguminosarum*, *R. etli, R. gallicum*, *R. giardini*, *E. meliloti* itd. imaju dva ili više simbiovara.
Danas je najveći broj simbiovara rizobija definiran na temelju leguminoza koje mogu nodulirati te na temelju analize *nod*C gena koja omogućuje razlikovanje simbiovara svih vrsta rizobija (Peix i sur., 2015).

2.3.2.4. “Klasične“ i „nove“ rizobije

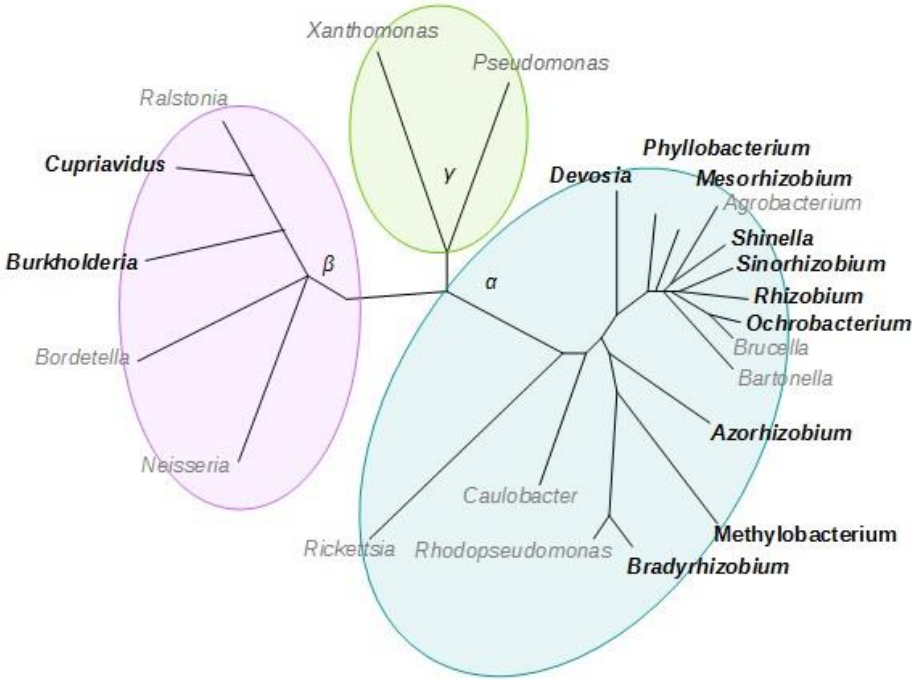
Nakon brojnih promjena do kojih je došlo kroz desetljeća istraživanja raznolikosti rizobija, ni danas njihova taksonomija nije jednoznačno prihvaćena. Dok neki znanstvenici pod pojmom rizobija i dalje smatraju sve bakterije koje mogu nodulirati biljke, za druge je jasna podjela između „klasičnih“ i „novih“ rizobija (Peix i sur., 2015; Velazquez i sur., *u postupku objave*). Prema takvoj podjeli, u klasične rizobije ubrajaju se vrste rodova *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* i *Rhizobium*. Ovi rodovi pripadaju porodici Rhizobiaceae*,* redu *Rhizobiales*, razredu alfaproteobakterija.
Klasične rizobije dakle uključuju rodove čije su vrste prvotno opisivane kao simbionti leguminoza iako su do danas iz tih rodova izolirane i neke saprofitne ili čak patoge vrste. Brojne vrste izolirane su i iz drugih izvora poput piljevine topole, bioreaktora, pijeska i morske vode (Liu i sur., 2015).

Peix i sur. (2015) „novim“ rizobijama nazivaju netipične bakterije koje mogu nodulirati biljke. Pripadaju alfaproteobakterijama, ali porodicama koje ne uključuju klasične rodove rizobija. Takav primjer je *Methylobacterium nodulans* iz roda *Methylobacterium* i porodice Methylobacteriaceae. Iako je ovo otkriće promijenilo koncept sistematike rizobija, još je više iznenadila spoznaja da leguminoze mogu nodulirati i vrste iz razreda Betaproteobakterija, što je objavljeno u časopisu *Nature* (Moulin i sur., 2001). Ovi autori identificirali su vrste roda *Burkholderia*, izolirane iz kvržica *Mimosa* spp*.* Otkrili su da te vrste sadrže nodulacijske *nodABC* gene što potvrđuje teoriju o horizontalnom prijenosu gena u rizosferi između alfa- i beta- proteobakterija (Velazquez i sur., *u postupku objave*).
Okriveno je da su betaproteobakterije rasprostranjene u nodulima nekoliko redova leguminoza (Lemaire i sur., 2015).

Današnje „nove“ rizobije uključuju rodove:

- *Aminobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* i *Shinella* iz razreda alfaproteobacteria i
- *Burkholderia*, *Paraburkholderia* (prije *Burkholderia*) i *Cupriavidus* iz razreda betaproteobacteria

Do danas je opisano više od 130 vrsta rizobija koje su razvrstane u 15 rodova. Do naglog porasta broja novootkrivenih vrsta došlo je zbog sve većeg broja istraživanja mikrosimbionata nekih egzotičnih vrsta mahunarki ali i zbog proučavanja sve većeg broja različitih izvora bioraznolikosti. Osim toga, zbog velikog napretka u metodama često dolazi do reklasifikacija, reorganizacija unutar rodova i porodica te promjena kriterija za opisivanje pojedinih taksonomskih jedinica. Budućnost na ovom području je sekvenciranje genoma koje će zasigurno dati i bolji uvid u interakcije leguminoza i rizobija. Za neke tipske sojeve rizobija koji noduliraju leću i soju već su dostupne informacije o sekvencama genoma (Rashid i sur., 2015).



Slika 8. Filogenetsko stablo alfa-, beta- i gama- proteobakterija. Podebljano su označeni rodovi koji uključuju simbiozne fiksatore dušika. Preuzeto iz: Berrada i Fikri-Benbrahim (2014).

2.3.3. Rod *Rhizobium*

Osnovne karakteristike roda *Rhizobium* opisane su u *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Kuykendall, 2005).

Bakterije koje ubrajamo u rod *Rhizobium* su Gram negativni štapići dimenzija 0.5-1.0 x 1.2-3.0 µm. Struktura stanične stijenke tipične je građe za Gram negativne bakterije, uz napomenu da sastav lipopolisaharida varira između sojeva. Membranski fosfolipidi složeno su građeni i u uvjetima nedostatka fosfora mogu biti zamijenjeni lipidima koji ne sadrže fosfor (Lopez-Lara i sur., 2003). Oni su važni za prianjanje bakterije na biljku.

Rizobije ne tvore spore, a pokreću se pomoću jedne do šest peritrihnih flagela. Aerobne su pa je kisik terminalni akceptor elektrona u respiratornom metabolizmu. Optimalna temperatura rasta je 25°-30°C. Rijetki sojevi rastu na temperaturi od 4 °C dok neke vrste mogu rasti i na temperaturi od 40°C. Do sada istraženi sojevi *R. leguminosarum* rastu na temperaturama 20°-28 °C sa gornjom granicom 38 °C.

Rizobije rastu u rasponu pH vrijednosti 4-10, no optimalni pH za rast je 6–7.

Generacijsko vrijeme varira od 1,5 do 5 sati. Nakon tri do pet dana uzgoja na 28 °C na krutom hranjivom mediju sa kvasnim ekstraktom i manitolom tvore kolonije koje su poluprozirne, bijele ili bež, okrugle, konveksne, malo izdignute, promjera 2-4 mm. Izgled kolonija nekih rizobija prikazan je na slici 9.

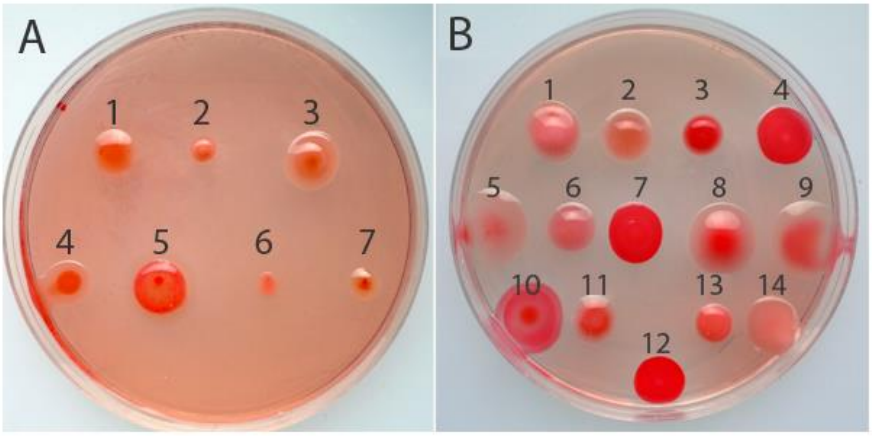
Kemoorganotrofi su organizmi koji iskorištavaju širok raspon ugljikohidrata i soli organskih kiselina kao izvor ugljika (Vincent, 1970). U hranjivom mediju sa mineralnim solima i manitolom izazivaju kiselu reakciju.

Neki sojevi poput onih vrste *R. leguminosarum* sadrže metakromatske granule koje se sastoje od poli-β-hidroksibutirata, koji se može dokazati bojanjem (Kuykendall, 2005).

Sojevi *Rizobium* imaju urođenu otpornost na širok spektar antibiotika. Postoje značajne razlike između sojeva, ali općenito su osjetljiviji na tetracikline, penicilin, vankomicin i streptomicin u odnosu na sojeve roda *Bradyrhizobium*.

Mogu živjeti potpuno slobodno u tlu kao saprofiti, no tada su zastupljeni u mnogo manjem broju nego u rizosferi biljaka. Na korijenu biljaka žive kao endofiti u formi koju nazivamo bakteroid.

Tipska vrsta roda je *R. leguminosarum* (Frank, 1889). Rod *Rhizobium* sadrži više od 70 vrsta, a one uključuju sojeve koji na korijenu induciraju kvržice u kojima može i ne mora doći do simbiozne fiksacije dušika.



Slika 9. Izgled kolonija rizobija na YMA hranjivom mediju uz dodatak indikatora congo red. A) tipski sojevi rodova: 1. *Rhizobium phaseoli* 2. *Ensifer meliloti* 3. *Mesobacterium loti* 4. *Bradyrhizobium elkanii* 5. *Phyllobacterium trifolii* 6. *Azorhizobium caulinodans* 7. *Devosia neptuniae* B) tipski sojevi roda *Rhizobium*: 1. *R. hainanense* 2. *R. leguminosarum* 3. *R. galegae* 4. *R. etli* 5. *R. lusitanum* 6. *R. loessense* 7. *R. giardinii* 8. *R.mongolense* 9. *R. indigoferae* 10. *R. tropici* 11. *R. yanglingense* 12. *R. huautlense* 13. *R. gallicum* 14. *R. cellulosilyticum*. Preuzeto iz: Robledo i sur. (2012).

2.3.4. Proučavanje raznolikosti rizobija

Rizobije su bakterije tla koje u simbioznom odnosu sa leguminozama mogu fiksirati značajne količine atmosferskog dušika. Osnova za učinkovitu fiksaciju dušika je kompatibilnost biljke domaćina i odgovarajućeg soja kvržičnih bakterija te povoljni uvjeti u tlu. Često je međutim, zastupljenost ovih bakterija u tlu vrlo mala, a kada su prisutne, imaju slab kapacitet za fiksaciju dušika što zahtijeva unošenje učinkovitih sojeva u tlo koji su istovremeno dobro prilagođeni na uvjete u okolišu. Izboru takvih sojeva prethodi dugotrajno istraživanje usmjereno na njihovu raznolikost i ekologiju.

Brojnost i raznolikost rizobija ponekad se može podcijeniti zbog mnogih čimbenika ili svojstava tala kao i zbog neadekvatnog izbora biljke domaćina za izolaciju (Sadowsky i Graham, 1998). Primjerice, veličina agregata tala može utjecati na raspodjelu rizobija kao i na njihov rast (Mendes i Bottomley, 1998). U svom istraživanju, Palmer i Young (2000) su otkrili veću raznolikost rizobija *R. leguminosarum* bv. *viciae* u obradivim tlima nego u travnjacima. Brojne danas dostupne fenotipske i genotipske metode osnova su za proučavanje raznolikosti rizobija.

2.3.4.1. Fenotipske metode

U počecima istraživanja o rizobijama fenotipska karakterizacija je bila osnova za grupiranje sojeva. Ona uključuje brojne morfološke, biokemijske i fiziološke karakteristike i danas je neizostavan dio pri opisivanju novih vrsta i rodova.

Najznačajnije morfolološke karakteristike su veličina, boja i oblik kolonija, veličina i oblik stanice, bojanje po gramu, tvorba endospore, prisutnost flagela. Biokemijski i fiziološki testovi uključuju ispitivanje rasta bakterija na različitim temperaturama, pH vrijednostima, koncentracijama soli te metabolizam različitih spojeva. Osim toga, fenotipska karakterizacija davala je uvid o utjecaju domaćina i okoliša na strukturu njihove populacije u tlu. U tu svrhu, Beynon i Josey (1980) ispitivali su otpornost rizobija na antibiotike (IAR engl. *Intrinsic Antibiotic Resistance*) i otkrili visoku heterogenost sojeva unutar vrste *R. leguminosarum*.

Znanstvenici su ubrzo zaključili da upotreba tih klasičnih metoda može dovesti do pogrešne identifikacije izolata pa predlažu da se u klasifikaciji rizobija koriste metode bazirane na analizi enzima poput elektroforeza multi-lokus enzima (MLEE, engl. *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (Pinero is sur., 1988).

Jarvis i sur. (1997) su koristili analizu staničnih masnih kiselina (FAME, engl. *fatty acids methyl esters*) za razlikovanje vrsta rodova *Agrobacterium*, *Rhizobium* i *Sinorhizobium*. Uspješno su identificirali 94 % izolata, međutim, ova metoda nije razlikovala vrste *R. etli* od *R. leguminosarum* zbog čega predlažu da ju treba koristiti kao dio polifaznog pristupa u identifikaciji rizobija.

Dvodimenzionalnom poliakrilamid gel elektroforezom ukupnih proteina (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), de Lajudie i sur. (1992) su grupirali sojeve nekih tropskih leguminoza, a korištenjem drugih metoda u istom radu opisali novu vrstu *Mesorhizobium plurifarium*. Iako je korištena i u drugim istraživanjima za razlikovanje unutar vrsta rizobija (Roberts i sur., 1980; Sikora, 1996) ova metoda nije postala popularna jer zahtjeva standardizirane uvjete elektroforeze, a u usporedbi s drugim metodama pokazala se nedovoljno preciznom za razlikovanje vrlo sličnih sojeva.

2.3.4.2. Genotipske metode

Kako bi se nadomjestio nedostatak fenotipskih metoda, u primjenu su posljednjih nekoliko desetljeća ušle metode bazirane na analizi nukleinskih kiselina zahvaljujući sve bržem razvoju područja molekularne biologije.

Jedna od neizostavnih metoda koja se koristi pri opisivanju novih vrsta bakterija je ispitivanje sadržaja gvanina i citozina. Taj sadržaj u bakterijskom genomu varira od 16 do

75 %. Kako bi soj pripadao nekoj vrsti može imati najviše 3 % razlike u sadržaju G+C i najviše 10 % kako bi pripadao određenom rodu (Lightfield i sur., 2011). Sadržaj G+C u genomu rizobija iznosi 57-66 % (Kuykendall, 2005). Metoda se koristi i za razlikovanje sojeva koji imaju vrlo slične fenotipske karakteristike, no kao osnovni nedostatak navodi se to što sadržaj nukleotida nije temeljen na njihovom broju već se procjenjuje iz fizioloških svojstava koje inducira u ekstrahiranoj ili digestiranoj genomskoj DNK (Meier-Kolthoff i sur., 2014).

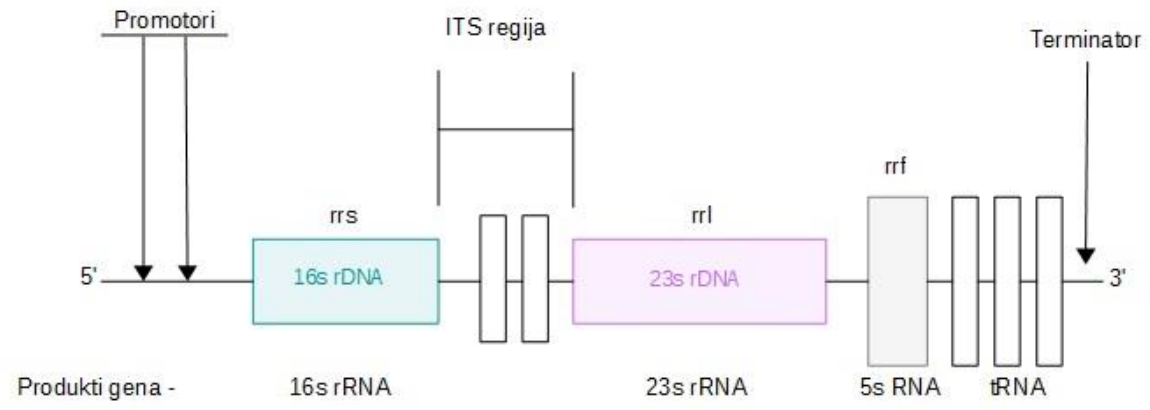
DNA-DNA hibridizacija (DDH) je metoda kojom se mjeri sličnost genoma dvaju organizma, a temelji se na mjerenju količine topline potrebne da se raskinu vodikove veze između dvostrukih uzvojnica hibridne DNK nastale sparivanjem DNK poznatog i nepoznatog mikroorganizma. Određeni soj pripada nekoj vrsti ako ima 70 % ili više DNA-DNA povezanosti (sličnosti) i ΔTm 5 °C ili manje (Meier-Kolthoff i sur., 2014). Ova metoda ima brojne nedostatke; zahtijeva značajan utrošak rada i vremena i stručnost osoblja zbog čega su u različitim laboratorijima dobiveni drugačiji rezultati (Mousavi i sur., 2014). Još od 1987. godine ova metoda je obavezna za sve vrste opisane u časopisu *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Raznolikost rizobija ovom metodom proučavali su de Lajudie i sur. (1992) i Laguerre i sur. (1993).

Corich i sur. (2001) uspješno su analizirali profile plazmida elektroforezom DNK u promjenjivom električnom polju (PFGE engl. *pulsed-field gel electrophoresis*) što je omogućilo diferencijaciju sojeva vrste *R. leguminosarum* bv. *viciae*. U svrhu proučavanja genetske raznolikosti rizobija i drugi autori su analizirali profile njihovih plazmida, međutim, nedostatak ove metode je što nemaju svi sojevi rizobija plazmide ili, ako ih imaju, mogu ih izgubiti (Garcia-Fraile, 2008).

Do velikog napretka u istraživanjima populacija rizobija došlo je nakon otkrića lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) kojom se u vrlo kratkom vremenu dobiva velik broj kopija željenog odsječka DNK. U osnovi, ovo je vrlo jednostavna metoda koja podrazumijeva promjenu temperaturnih profila kroz niz ciklusa u kojima prvo dolazi do denaturacije dvolančane DNK, zatim do sparivanja početnica te na kraju produljivanje novonastalog lanca DNK. Nakon toga, umnoženi produkti se bojaju bojom koja se veže za DNK te potom razdvajaju elektroforezom u poliakrilamidnom, agaroznom ili nekom drugom gelu što omogućava vizualizaciju formiranih bandova odnosno DNK profila.

Brojne inačice ove metode pronašle su primjenu u proučavanju raznolikosti rizobija, poput PCR-RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) u kojoj se produkti

dobiveni PCR-om cijepaju pomoću restrikcijskih enzima. Metodom PCR-RFLP najviše su analizirani geni koji kodiraju za različite regije ribosomalne RNK, a organizirani su u tzv. operon (Slika 10). Za razlikovanje rizobija na razini vrste (ili viših taksonomskih jedinica) najčešće je korištena PCR-RFLP analiza 16S rDNA (Laguerre i sur., 1996; Sliva i sur., 2003). Ova metoda vrlo je korisna za proučavanje filogenetskih odnosa, ali se njome ne mogu razlikovati srodni sojevi. Navarro i sur. (1992) predlažu ITS regiju koja je više varijabilna nego *rrs* pa je i PCR-RFLP ITS regije osjetljivija i pouzdanija metoda za diferencijaciju sojeva.



Slika 10. Tri glavna dijela operona: geni koji kodiraju za 16S rDNA (*rrs*), 23S rDNA (*rrl*) i ITS (engl. *Internally Transcribed Spacer*) regiju.

Rep-PCR (engl. *repetitive sequence-based*) je metoda u kojoj se koriste kratke ponavljajuće početnice prisutne u genomu u velikom broju kopija. U proučavanju raznolikosti rizobija najčešće su upotrebljavane sljedeće ponavljajuće sekvence: GTG_5, BOX, REP (engl. *repetitivne extragenic palindromic sequence*) i ERIC (engl. *enterobacterial repetitive intergenic consensus*). Neka istraživanja (Versalovic i sur., 1994; Vinuesa i sur., 1998) su koristili ovu vrlo osjetljivu i reproducibilnu tehniku za proučavanje genetske raznolikosti sojeva rizobija.

RAPD (engl. *random amplified polymorphic DNA*) je metoda u kojoj se nasumični odsječci genomske DNK amplificiraju PCR-om uz upotrebu krakih početnica proizvoljne sekvence. Williams i sur. (1990) navode da se korištenjem samo jedne takve početnice mogu dobiti polimorfni otisci genoma. Kao nedostatak ove, inače vrlo osjetljive i brze metode, navodi se problem reproducibilnosti već pri maloj promjeni uvjeta reakcije zbog čega su u

narednom razdoblju znanstvenici optimizirali protokol (Chen i sur., 1994) omogućivši primjenu RAPD-a u istraživanja biljnih i životinjskih patogena, u humanoj medicini, forenzici itd.. RAPD metodom Paffetti i sur. (1996) proučavali su 96 sojeva *Rhizobium meliloti* koji noduliraju lucernu iz različitih regija Italije, a Valverde i sur. (2011) 179 izolata različitih vrsta rizobija graha u Portugalu.

Rivas i sur. (2001) modificirali su RAPD metodu u kojoj se koristi jedna kratka početnica. Metoda koju su nazvali TP-RAPD (engl. *two primers*-RAPD) razlikuje se od standardne po upotrebi dvije veće početnice (20 nukleotida) te po tome što su ove početnice korištene za amplifikaciju 16S rDNA. Metodu smatraju brzom, pouzdanom i pogodnom za taksonomska i ekološka istraživanja.

Osim rep-PCR i RAPD, metoda AFLP (engl. *amplified fragment length polymorphism*) temelji se na analizi (bakterijskog) genoma. Kod AFLP metode međutim, prvo dolazi do restrikcije DNK i spajanje s početnicama, a zatim do umnažanja restrikcijskih fragmenata prije analize u gelu. AFLP otisci (profili) omogućili su Terefework i sur. (2001) da razlikuje sojeve *Rhizobium galegae* koji noduliraju mahunarku *Galega officinalis* i *Galega orientalis*. Aserse i sur. (2012) ovom metodom su proučavali raznolikost rizobija koji noduliraju grah u Etiopiji, a Donnaruma i sur. (2014) diferencirali 123 izolata *S. meliloti* iz tri različite regije Hrvatske.

Kao što je već objašnjeno, sekvenciranje gena je danas osnova za određivanje taksonomske pripadnosti bakterija. Granica kojom se potvrđuje pripadnost soja nekoj vrsti iznosi 98 % sličnost sekvenci 16S rRNA gena, a rodu 95 %. Komparativna analiza bakterijskih 16S rDNA sekvenci i podataka koji su danas lako dostupni u bazama uz odgovarajuće softverske alate omogućuju brzu identifikaciju brojnih izolata rizobija na razini roda i vrste.

Međutim, mnogi navode da sekvenciranje samo 16S rRNA gena nije dovoljno za identifikaciju rizobija, a razlog tome je malen polimorfizam sekvenci tog gena što onemogućava razlikovanje nekih bliskih vrsta (Vinuesa i sur., 2005; Ramirez-Bahena i sur., 2008). Gaunt i sur. (2001) su predložili da se za razlikovanje rizobija na razini vrste koriste drugi osnovni (konstitutivni) geni. Sekvenciranjem *atpD* i *glnII* Silva i sur. (2003) su proučavali evolucionarnu genetiku i biogeografsku strukturu promiskuitetne vrste *R. gallicum*.

Vrlo detaljnom MLSA analizom 16S-23S rRNA, ITS i *atpD*, *recA*, *dnaK* i *glnII* sekvenci, te nodulacijskih gena (*nodA*, *nodZ*, *nolL*, *noeI*), Stepkowski i sur. (2005) zaključuju da su

sojevi *Bradyrhizobium* u Australiju i Južnu Afriku iz Europe slučajno prenijeti sjemenom lupine.

Konstitutivni geni su trenutno osnova za razlikovanje vrsta (Peix i sur., 2015) a u analizama ih je potrebno kombinirati kako bi se što točnije mogle odrediti filogenetske grupe. „Pomoćni geni“ su specifični za soj i odgovorni su za prilagodbu na uvjete okoliša zbog čega su prikladni za dobivanje biogeografskih obrazaca kada se pročava velik broj izolata.

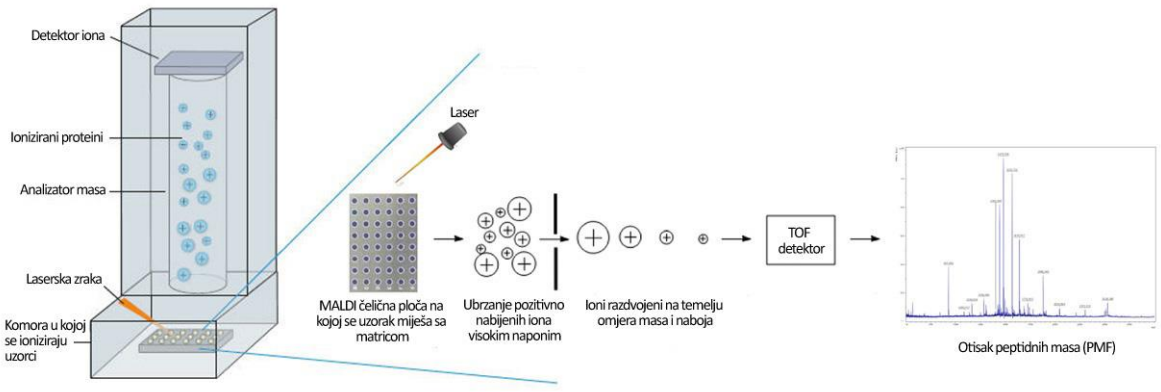
2.3.4.3. MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Masena spektrometrija (MS, engl. *Mass Spectrometry*) je metoda kojom se kemijski spojevi ioniziraju u nabijene molekule te se potom mjeri omjer njihovih masa i naboja (m/z, engl. *mass to charge ratio*). Osnovne komponente svakog spektrometra masa prikazane su na slici 11a, a čine ih izvor ionizacije, analizator masa koji razdvaja i mjeri m/z ioniziranog analita te sustav za detekciju (Aebersold i Mann, 2003).

Postoji nekoliko različitih metoda ionizacije i analizatora (masa) koji se koriste, a njihovim kombiniranjem dobivamo različite izvedbe spektometara masa.

Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI, engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*) jedna je od primarnih analitičkih metoda masene spektrometrije za identifikaciju i kvantifikaciju proteina i peptida koja svoju primjenu pronalazi u biologiji. Primanjem ili otpuštanjem jednog ili više protona, proteini i peptidi prelaze u nabijeno (ionizirano) stanje pri čemu ne dolazi do njihovih funkcionalnih promjena (Yates i sur., 2009).

Uzorci za analizu MALDI-TOF MS metodom miješaju se s matricom-otopinom koja pomaže pri ionizaciji te služi za apsorpciju energije lasera. Nakon sušenja, uzorak i matrica kristaliziraju na čeličnoj ploči te slijedi desorpcija i ionizacija laserskom zrakom čime nastaju protonizirani ioni koji se odvajaju jer imaju različitu masu; ioni manje mase imaju veću brzinu, a ioni veće mase manju brzinu. U mikrobiologiji se uglavnom koristi analizator vremena leta (TOF, engl. *time of flight*) tako nabijenih analita. On mjeri vrijeme koje je potrebno ionima da putuju duljinom cijevi. Rezultat mjerenja je prikazan kao karakterističan spektar nazvan otisak peptidnih masa (PMF, engl. *Peptide Mass Fingerprinting*) (Slika 11 b).



A B

Slika 11. a) Shema MALDI TOF MS instrumenta s osnovnim dijelovima (izvor ionizacije, analizator masa i detektor) b) shema koja prikazuje tijek analize MALDI-TOF MS metodom. Prilagođeno iz Singhal i sur. (2015).

Svaki dobiveni spektar masa predstavlja jedinstveni proteinski profil analiziranog izolata. Identifikacija mikroorganizama primjenom MALDI-TOF MS-a vrši se usporedbom PMF uzorka sa PMF-ovima prethodno karakteriziranih izolata sadržanim u bazama podataka. Za identifikaciju mikroorganizama na razini vrste koristi se tipični raspon masa 2-20 kDa što predstavlja ukupne ribosomalne proteine i nekoliko konstitutivnih. Ribosomalni proteini predstavljaju 60-70 % mase suhe tvari mikrobne stanice (Murray, 2012).

Iako uvjeti uzgoja mikroorganizama u laboratoriju mogu jako utjecati na njihovu fiziologiju i ekspresiju proteina, oni ne utječu na identifikaciju MALDI-TOF MS-om što je dodatna prednost ove metode uz brojne ostale navedene u tablici 4.
Identifikacija izolata moguća je na razini roda i u mnogim slučajevima na razini vrste i soja.

Među prvim pokušajima klasifikacije rizobija MALDI-TOF metodom bila su istraživanja Prabhu i sur. (2007) u kojima su sojeve roda *Rhizobium* uspješno razlikovali od *Agrobacterium*. Nakon toga sve više raste interes za ovom metodom. Ziegler i sur. (2012) uspjeli su identificirati rizobije *in situ* odnosno direktno iz nodula, naglašavajući kao najveću prednost što su ovom metodom izbjegli dugotrajan korak izolacije i kultivacije rizobija.
Najveća postignuća u primjeni ove metode za identifikaciju brzorastućih i spororastućih rizobija ostvarila je istraživačka skupina iz Salamance (Španjolska) predvođena sa prof. dr. sc. Encarnom Velazquez proširivši bazu podataka koja je do tada sadržavala

uglavnom spektre masa kliničkih izolata. Njihova baza podataka uključuje sve tipske sojeve trenutno prihvaćenih vrsta porodice Rhizobiaceae koje su potvdili sekvenciranjem njihovih *rrs*, *recA* i *atpD* gena (Ferreira i sur., 2011; Sanchez-Juanes i sur., 2013).

Tablica 4. Prednosti i nedostaci MALDI-TOF MS metode.

Prednost	**Nedostaci**
Brza (do 96 uzoraka po analizi)	
Precizna	Ne može identificirati neke vrlo bliske vrste
Vrlo jeftina	Skupa početna oprema (uređaj)
Ne zahtijeva posebno osposobljavanje osoblja	
Baza podataka se nadograđuje	Identifikacija ograničena na postojeće izolate
Ne zagađuje okoliš	
Primjenjiva za identifikaciju gljiva i bakterija	

2.3.4.4. Raznolikost rizobija koje noduliraju grah

Srednja Amerika i dio južne Amerike (područje Anda) centri su podrijetla graha u kojima je udomaćen prije više od četiri tisućljeća i odakle se proširio na brojna područja u svijetu. Kao i za druge mahunarke, prednosti simbiozne fiksacije dušika prepoznate su i za grah, no ubrzo je primijećeno da on ima najslabiji kapacitet za fiksaciju dušika među mahunarkama. Razlog tome je kasnija pojava nodula na korjenovom sustavu, manja masa nodula i njihova neučinkovitost (Hardarson, 1994).

Međutim, grah je vrlo promiskuitetna kultura koja može uspostaviti simbiozne odnose sa brojnim vrstama rizobija. Smatra se da je razlog tome izlučivanje različitih flavonoida iz korijena i sjemena koji potiču ekspresiju nodulacijskih gena rizobija (Garcia-Fraile, 2008).

Raznolikost rizobija koje noduliraju grah proučava se diljem svijeta te su tako sakupljene vrijedne informacije o dominantnosti vrsta i sojeva u pojedinim regijama. Poznavanje genetske strukture populacija pomaže u pronalasku učinkovitih sojevi za inokulaciju graha sa kvalitetnim rizobijama u poljoprivrednoj praksi.

Dokazano je da na područjima podrijetla postoje mikrosimbionti koje grah preferira, dok na mjestima gdje je introduciran još više dolazi do izražaja neselektivnost za mikrosimbionta zbog čega se koristi kao „trap-host“ biljka (Michelis i sur., 1998).

U počecima istraživanja sve rizobije koje noduliraju grah bile su zvane *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984). Nakon toga, slijedila su istraživanja u kojima je otkrivena raznolikost između sojeva tih bakterija. Tek je 1991. istraživačka grupa predvođena Esperanzom Martinez-Romero iz Meksika opisala vrstu *R. tropici* koja se od *R. leguminosarum* razlikuje po otpornosti na visoke temperature, kiselost tla i simbioznoj stabilnosti (Martinez-Romero i sur., 1991).

Znanstvenici iz istog laboratorija opisali su vrstu *R. etli* na temelju analize sekvenci 16S rDNA po kojima se ova vrsta (dotada heterogena skupina sojeva) razlikovala od *R.leguminosarum* biovar *phaseoli* (Segovia i sur., 1993).

U Brazilu je nedavno otkriveno da određeni sojevi *R. tropici*, zapravo tvore nove vrste; *R. freirei* i *Rhizobium paranaense* (Dall'Agnol i sur., 2014) jer se od *R. tropici* razlikuju na temelju sekvenci određenih gena. Obje vrste su vrlo učinkovite u fiksiranju dušika.

Iz različitih lokacija u Francuskoj izoliran je 31 soj rizobija iz nodula graha (Amarger i sur., 1997). Na temelju razlika u fenotipskim i genetopskim obilježjima opisali su nove vrste: *R. gallicum* i *R. giardinii*. U svakoj od ovih vrsta uočene su dvije skupine (podvste) koje se razlikuju po 16S rDNA sekvencama i simbioznim karakteristikama (odabiru domaćina i učinkovitosti fiksacije dušika). Svaka od podvrsta imala je simbiozne karakteristike kao *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* i *R. etli* biovar *phaseoli*, a druga fenotip i genotip specifičan za tu vrstu. Stoga su predložili dvije vrste i dva biovara: *R. gallicum* biovar gallicum i *R. gallicum* biovar phaseoli; te *R. giardinii* biovar giardinii i *R. giardinii* biovar phaseoli.

Najnovija taksonomska istraživanjima, sekvenciranje 16S rRNA, *atpD*, *glnA*, *glnII*, *recA*, *rpoB*, i *thrC* gena pokazala su da *R. giardinii* pripada novoopisanom rodu *Pararhizobium* (Mousavi i sur., 2015).

Proučavajući raznolikost simbioznih fiksatora dušika na grahu u Arcos de Valdevez, sjeverozapadnoj regiji Portugala, Valverde i sur. (2006) otkrili su vrstu *Rhizobium lusitanum.*

Dvije godine kasnije ponovno je opisana vrsta *Rhizobium phaseoli*. Naime, Jordan (1984) je predložio da se u *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ova vrste uvede kao *R.leguminosarum* bv. *phaseoli* no Ramirez-Bahena i sur. (2008) su na temelju analize 16S-23S ITS regije, *rrs*, *recA* i *atpD* gena te DNA-DNA-hibridizacije, dokazali da se ipak radi o zasebnoj vrsti. *R. phaseoli* slabije je zastupljena vrsta, a izolirana je iz nekih zemalja centara podrijetla graha i Etiopije (Aserse i sur., 2012).

Iz tropskih područja u Kini izolirana je vrsta *Rhizobium vallis* koja nodulira grah i neke druge mahunarke (*Mimosa pudica*, *Indigofera spicata*) (Wang i sur., 2011).

Najnovije vrste rizobija koji noduliraju grah izolirane su iz tala Ekvadora, *Rhizobium ecuadorense* (Ribeiro i sur., 2015), iz kiselih tala Meksika; *Rhizobium acidisoli* (Roman-Ponce i sur., 2016) i *Rhizobium hidalgonense* (Yan i sur., 2017).

Nakon što su iznijete dosad otkrivene vrste rizobija koje mogu nodulirati grah, proučavanjem literature može se zaključiti o onim najzastupljenijima u područjima u kojima je grah značajna kultura, a to su *R. etli*, *R. leguminosarum* i *R. tropici*.

Vrsta *R. etli* dominantna je u Meksiku, Argentini i ostalim zemljama podrijetla graha (Martinez-Romero, 2003). Međutim, prisutnost, čak dominantnost ove vrste zabilježena je i u Tunisu, Austriji, južnoj Španjolskoj i Jordanu (Tamimi i Young, 2004). Zbog toga je i danas prisutna pretpostavka da je ova vrsta rizobija zajedno sa grahom prenijeta iz Amerike preko Španjolske i Portugala u Europu te preko Kanarskih otoka u Afriku (Perez-Ramirez i sur., 1998).

R. tropici učinkovito fiksira dušik u uvjetima visoke temperature i niskog pH zbog čega se smatra da je porijeklom iz tropskih regija južne Amerike. Izolirana je iz kiselih tala Francuske i Kenije, a tek sporadično iz neutralnih tala Afrike, Argentine, Meksika, Španjolske i Južne Amerike (Martinez-Romero, 2003). Smatra se promiskuitetnom vrstom rizobija jer osim graha nodulira više leguminoza.

Alvarez-Martinez i sur. (2009) iznose pretpostavku da je *R. leguminosarum* sv. phaseoli autohtona europska vrsta. Garcia-Fraile i sur. (2010) su u tlima sjeverne Španjolske pronašli samo izolate koji pripadaju ovoj vrsti. Iako je izolirana i iz tala Južne i Srednje Amerike, ovi autori također tvrde da joj je podrijetlo Europa jer su pronašli *nodC* gene različite od onih iz američkih sojeva. U daljnjem radu, ova istraživačka skupina prvi puta dokazuje da je učinkovitost simbioznog odnosa autohtone vrste *R. leguminosarum* i graha u Europi odgovarajuća da zamijeni mineralno gnojivo (Mulas i sur., 2011).

Pretpostavka da bi se i u tlima Republike Hrvatske mogao naći autohtoni soj učinkovit u fiksaciji dušika bila je temelj za istraživanje provedeno u ovoj disertaciji.

Grah mogu nodulirati i vrste drugih rodova. Primjerice, pronađeni su neki sojevi *Sinorhizobium fredii*, mikrosimbionta soje, koji mogu nodulirati grah i otporni su na visoke koncentracije soli (Herrera-Cervera i sur., 1999). Iz slanih tala Tunisa, Mnasri i sur. (2007) su izolirali 40 sojeva rizobija iz nodula graha. Među izolatima, velik broj je pripadao i *Sinorhizobium meliloti* koji inače noduliraju lucernu. Ovu vrstu su pronašli i Zurdo- Pineiro i sur. (2009) u tlima Kanarskih otoka.

Sojevi roda *Bradyrhizobium* također su izolirani iz nodula graha (Han i sur., 2005). Identificirani su primjenom SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina i analizom 16S rRNA gena. Na temelju rezultata navedenog istraživanja autori iznose pretpostavku da je

paralelno došlo do evolucije mahunarki i rizobija jer su populacije rizobija koje noduliraju grah u kineskim tlima potpuno drugačije od onih izoliranih iz Meksika.

Kao što je već spomenuto, grah mogu nodulirati i vrste iz razreda betaproteobakterija (tzv. „nove rizobije“). Iz rizosfere i rizoplana rajčice izolirana je vrsta koja može učinkovito nodulirati grah-*Burkoholderia caballeronis* (Martinez-Aguilar i sur., 2013). Da Silva i sur. (2012) identificirali su vrstu *Cupriavidus necator* izoliranu iz nodula graha te utvrdili da posjeduje *nodC* i *nifH* gena.

U brojnim istraživanjima dokazana je značajna raznolikost rizobija koje noduliraju grah. U 12 provincija Irana, Rahmani i sur. (2011) identificirali su 10 grupa što dokazuje znatnu raznolikosti rizobija u toj zemlji sa nekoliko izolata koji imaju dobra simbiozni potencijal. Aserse i sur. (2012) u Etiopiji i Adhikari i sur. (2012) u Nepalu, također su selekcionirali učinkovite izolate iz vrlo raznolikih populacija. Wang i sur. (2016) svjedoče o najvećoj raznolikosti rizobija do sada, pronađenoj u provinciji Shaanxi u Kini. Iz nodula graha izolirali su 15 vrsta od kojih su neki novi i nedefinirani, a neki poput *Ensifer fredii* i *Ensifer kummerowiae* prvi put pronađeni na grahu. Osim toga veliku raznolikost pronašli su i na razini simbioznih gena tj. simbiovara. Proučavali su i utjecaj vlage, temperature, međuusjeva, karakteristika tla i hranjiva u tlu i zaključili da najveći utjecaj na raznolikost rizobija ima pH tla.
Međutim, u dva također novija istraživanja, raznolikost rizobija graha bila je neznatna. U istraživanju Junier i sur. (2014) na području središnjeg Čilea, biljke su bile vrlo restriktivne u izboru mikrosimbionta iako se radi o vrlo promiskuitetnoj kulturi koju noduliraju i *Rhizobium* i drugi rodovi.
Samo dvije vrste rizobija, *R. leguminosarum* bv. phaseoli i *R. etli* u poljima s organskim uzgojem u Minnesoti, identificirali su Wongphatcharachai i sur. (2015).

Za razliku od proučavanja genetske raznolikosti rizobija koja je danas moguća zahvaljujući brojnim lako dostupnim i brzim metodama, svega je nekoliko istraživanja koja povezuju njihovu raznolikost sa ekološkim faktorima. Andrade i sur. (2002) obrazlažu to činjenicom da je teško povezati utjecaj tih faktora zbog kompleksnosti interakcije između tla, biljke i mikroorganizama te ostalih čimbenika koji mogu trenutno djelovati. Ovi autori istraživali su populacije *R. tropici* u Brazilu i zaključili da je pod velikim utjecajem pH. To je potvrđeno i u istraživanju (Verastegui-Valdes i sur., 2014); u kiselim tlima najzastupljeniji su bili sojevi srodni sa *R. leguminosarum* sv. phaseoli i *R. grahamii*, a u alkalnim tlima sa *E. americanum* sv. mediterranense. To je prvo istraživanje uopće u

kojem su izolirani *R. leguminosarum* i *E. americanum* kao mikrosimbionti graha u Meksiku.
U tlima Maroka, gdje simbiozna fiksacija dušika ovisi o prisutnosti sojeva otpornih na sol, najzastupljenije su vrste *R. etli* i *R. phaseoli* (Faghire i sur., 2012).
U Keniji, Kaschuk i sur. (2006) se susreću s problemom interpretacije svojih rezultata koji pokazuju visoku varijabilnost sojeva, a slabu varijabilnost vrsta u neobrađenim tlima dok su u tlima pod konvencionalnom obradom našli više različitih vrsta rizobija.

2.3.4.5. Proučavanje raznolikosti rizobija u Republici Hrvatskoj

Prvi dostupan literaturni zapis o proučavanju raznolikosti simbioznih fiksatora dušika u našoj zemlji je disertacija Strunjak (1965) koja je serološkim metodama identificirala rizobije sa djeteline i lucerne. Sredinom 80.-ih godina prošlog stoljeća javlja se velik interes za proučavanje simbiozne fiksacije dušika na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta. Istraživanja su se u početku odnosila na kompatibilnost sorata soje sa inokuliranim sojevima *B. japonicum* te na utjecaj mineralnog dušika na rast tih vrsta simbioznih fiksatora dušika (Redžepović i sur.,1986; Redžepović i sur., 1990). Ova istraživanja su bila osnova za nekoliko znanstvenih i stručnih projekata kojima je uvelike pridonio razvoj molekularnih metoda. U Hrvatskoj ih je za istraživanje rizobija prva primijenila Sikora (1996) u svojoj disertaciji u kojoj je ispitivala simbioznu učinkovitost 13 izolata *B. japonicum*. Određivala je i njihovu otpornost na antibiotike, SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina i analizirala RAPD profile. Utvrdila je da je RAPD najosjetljivija i najpouzdanija metoda za identifikaciju sojeva *B. japonicum*, a izdvojila je referentni soj te tri autohtona (koja čine izdvojenu skupinu) sa najvećom simbioznom učinkovitošću. Tijekom narednih godina karakterizirane su populacije rizobija koji noduliraju soju izolirane iz različitih regija Hrvatske (Sikora, 1996; Sikora i sur., 2002; 2003). Nakon niza poljskih i vegetacijskih pokusa selekcionirani su i visokoučinkoviti sojevi koji se koriste za pripremu inokuluma za predsjetvenu bakterizaciju soje.
Gene za nodulaciju autohtonih sojeva *R. leguminosarum* koji noduliraju grašak i grahoricu proučavali su Žafran i sur. (1996). Kao nastavak ovog istraživanja Žafran Novak (2000) je proučavala povezanost genetske strukture s biološkim karakteristikama sojeva navedene vrste. Istraživanje na simbioznom odnosu graška i vrste *R. leguminosarum* bv. viciae provela je i Blažinkov (2006). Dokazala je prisutnost te vrste u hrvatskim tlima metodom PCR-RFLP *nodD* gena. Prilikom korištenja metode DGGE s ciljanim klicama, unatoč uspješnoj amplifikaciji, nije došlo do razdvajanja produkata što je dovelo do zaključka ove autorice da DGGE nije dobar genski marker za detekciju raznolikosti rizobija.

Istraživanja na sojevima koji noduliraju lucernu (vrsta *S. melilotii*) započeli su Bradić i sur. (2003). Huić Babić (2011) je metodom kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR) uspješno kvantificirala gene uključene u ciklus dušika. Time je dokazala da različita simbiozna učinkovitost sojeva *S. meliloti* primijenjenih na lucernu ne utječe samo na brojnost fiksatora dušika, već i brojnost ostalih funkcionalnih skupina mikroorganizama (poput nitrifikatora i denitrifikatora) u rizosferi biljke. U vrlo opsežnom radu (Donnarumma i sur., 2014) istraživana je povezanost genetske raznolikosti, geografske distribucije, karakteristike tala i fenotipske karakteristike 123 izolata *S. meliloti* iz tri različite regije Hrvatske korištenjem AFLP metode kojom se pretražuje genom. Temeljem rezultata autori zaključuju da su izolati grupirani prema regiji iz koje su izolirani te da se ovdje može govoriti o njihovom biogeografskom strukturiranju, a ne o utjecaju tipa tla i lokalnim uvjeti na njihovu fenotipsku i genotipsku raznolikost.

Prva istraživanja autohtone populacije rizobija koje noduliraju grah u Hrvatskoj započela je Pohajda (2011). Utvrdila je vrlo slabu zastupljenost sojeva u istraživanim tlima, točnije, u samo pet od ukupno 23 uzoraka tala s područja Zagrebačke županije. Izostanak sojeva može se povezati sa činjenicom da na tim lokacijama nikada nisu bile uzgajane mahunarke. Međutim, predsjetvena bakterizacija sjemena graha sa dva odabrana autohtona soja, rezultirala je obilnijom nodulacijom u odnosu na bakterizaciju referentnim sojem, posebno u uvjetima kisele reakcije tla, što dokazuje njihovu sposobnost adaptacije na nepovoljne uvjete sredine.

U ovom doktorskom radu bit će obuhvaćeno šire geografsko područje, a simbiozni fiksatori dušika koji noduliraju grah bit će izolirani iz većeg broja uzoraka tala. Osim toga, uzorci tala će se sakupiti iz područja sjeverozapadne Hrvatske koje je značajno za uzgoj graha zbog svog velikog potencijala za uspješnu proizvodnju ove kvalitetne kulture. Ovakvo polazište bi trebao pridonijeti pronalasku učinkovitih i prilagođenih sojeva rizobija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje tla i pedološke analize

Uzorci tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljeni su sa površina obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava koje se bave uzgojem graha. Reprezentativni uzorci tala uzeti su iz oraničnog horizonta dubine 0-30 cm. Od ukupno 27 različitih lokacija uzorkovanja većina ih pripada Koprivničko-križevačkoj županiji, zatim Varaždinskoj, Bjelovarsko-bilogorskoj te Međimurskoj županiji (tablica 5, slika 12).

U Zavodu za pedologiju Agronomskog fakulteta određivane su fizikalno-kemijske karakteristike tala te njihova sistematska pripadnost. Ove analize obuhvatile su:

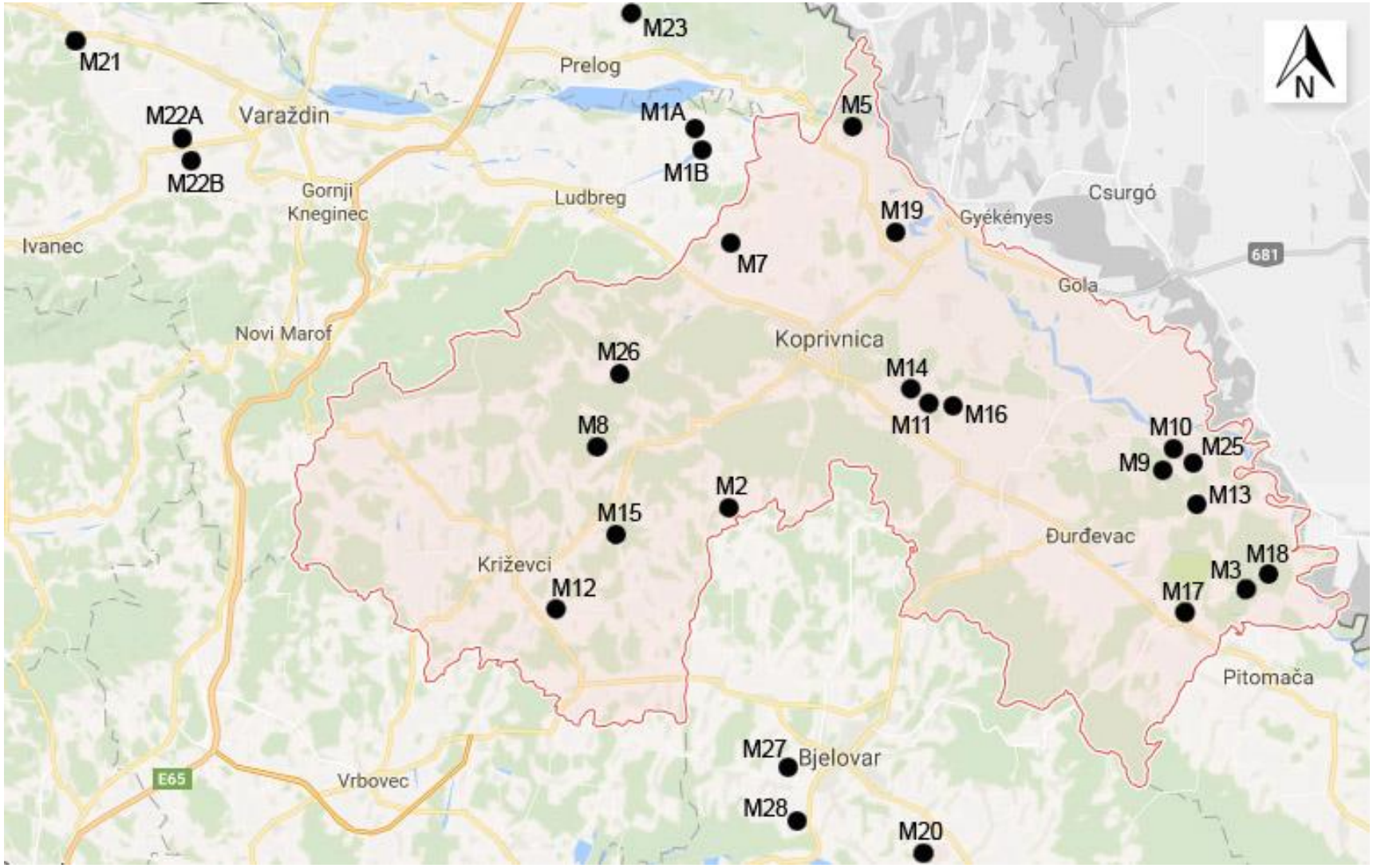
- pripremu uzoraka za fizikalno–kemijske analize prema HRN ISO 11464:2009.
- određivanje raspodjele veličine čestica (mehaničkog sastava) u mineralnom dijelu tla metodom prosijavanja i sedimentacije (modificirana metoda HRN ISO 10390:2005).
- određivanje pH-vrijednosti tla u H_2O i KCl-u (HRN ISO 10390:2005).
- određivanje količine humusa (Bikromatna metoda po Tjurinu, JDPZ, 1966).
- određivanje fiziološki aktivnog P_2O_5 i K_2O (Al-metoda, JDPZ, 1966).
- određivanje sadržaja ukupnog dušika suhim spaljivanjem, “elementarna analiza” (prilagođena HRN ISO 138781261:2004).

Tablica 5. Lokacije sa kojih su uzeti uzorci tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.

Županija, lokacija	Koordinate (WGS84)		Oznaka uzorka
	ϕ	λ	
VŽ, Mali Bukovec	46,295789	16,733198	M1A
VŽ, Mali Bukovec	46,291487	16.733.270	M1B
KKŽ (Z), Ladislav Sokolovački	46.052.706	16.719.289	M2
KKŽ (I), Podravske Sesvete	45,985963	17,224962	M3
KKŽ (S), Legrad	46,295192	16,876803	M5
KKŽ (S), Grabaševac	46,211383	16,748604	M7
KKŽ (Z), Čabraji	46.087.200	16.582.318	M8
KKŽ (I), Novo Virje	46,102678	17,124045	M9
KKŽ (I), Novo Virje	46,102587	17,141452	M10
KKŽ (C), Jeduševac	46,130593	16,938195	M11
KKŽ (Z), Trema	46.160.958	16.667.643	M12
KKŽ (I), Ferdinandovac	46,058644	17,185969	M13
KKŽ (C), Koprivnički Bregi	46,135415	16,889364	M14
KKŽ (Z), Lemeš Križevački	46.016.920	16.593.118	M15
KKŽ (C), Delovi	46,114587	16,951373	M16
KKŽ (I), Kloštar Podravski	45,958985	17,156149	M17
KKŽ (I), Mekiš-Brodić	46,018797	17,253803	M18
KKŽ (S), Đelekovac	46,255794	16.876.480	M19
BBŽ, Hercegovac	45,659873	17,015204	M20
VŽ, Petrijanec	46,346586	16,248861	M21
VŽ, Zamlaća	46,278281	16,262552	M22A
VŽ, Vidovec	46,279401	16,248253	M22B
MŽ, Hodošan	46,410034	16,662429	M23
KKŽ (I), Novo Virje	46,111394	17,090059	M25
KKŽ (Z), Veliki Poganec	46,150064	16,616946	M26
BBŽ, Gudovec	45,883445	16,784479	M27
BBŽ, Velike Sredice	45,884456	16,81724	M28

KKŽ-Koprivničko-križevačka županija; S-sjever, Z-zapad, I-istok, C-centar, BBŽ-Bjelovarsko-bilogorska županija, MŽ-Međimurska županija, VŽ-Varaždinska županija.

Slika 12. Karta lokacija uzorkovanja tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.



3.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija

U cilju izolacije autohtonih sojeva rizobija, postavljen je vegetacijski pokus u plasteniku Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu.
Prikupljeni uzorci tla su usitnjeni i zatim tri dana sušeni na zraku. Nakon prosijavanja pomiješani su s perlitom i kvarcnim pijeskom radi bolje drenaže u omjeru 1:1:4 (perlit: pijesak: tlo).
Površinski dezinficirano sjeme graha, sorte Trešnjevac i Slavonski zeleni, posijano je u prethodno dezinficirane lonce s tlom na čijem dnu su postavljene kuglice od ekspandirane gline radi očuvanja vlage.

U fazi pune cvatnje graha, koja je nastupila sedam tjedana nakon sjetve, sakupljene su kvržice (nodule) s korijenja biljki graha. Sa svake biljke odabrano je deset kvržica. Čiste kulture rizobija izolirane su standardnim protokolom (Vincent, 1970).
Kvržice su najprije isprane vodom kako bi se maknuli ostaci tla. Zatim je slijedila površinska sterilizacija kvržica koja uključuje trenutno namakanje u 96 % etanolu, zatim namakanje u 3 % natrijevom hipokloritu 3 minute te ispiranje ostataka natrijevog hipoklorita u šest serija sterilne vode. Sterilne kvržice sakupljene su u sterilne tubice u kojima je sadržaj mehanički oslobođen pomoću plastičnog sterilnog štapića. Sadržaj iz kvržica potom je razmazan na pripremljenu hranjivu podlogu YMA (sastav je naveden u tablici 6). Uslijedila je inkubacija na temperaturi 28 °C pet dana nakon čega su nasumično odabrane kolonije. Iz svakog uzorka odabrane su 2-3 kolonije temeljem morfoloških karakteristika (boja, veličina, oblik, tekstura) nakon čega je slijedilo bojanje po Gramu i mikroskopiranje. Kolonije odabrane za daljnu analizu, pročišćene su metodom iscrpljenja kako bi se dobile čiste kulture.

Tablica 6. Sastav hranjive podloge YMA (Yeast Mannitol Agar).

Sastav	Količina	Proizvođač
K_2HPO_4	0.5 g	*VWR Chemicals*
$MgSO_4$	0.2 g	*VWR Chemicals*
NaCl	0.1 g	*VWR Chemicals*
Manitol	10.0 g	*VWR Chemicals*
Kvasni ekstrakt	0.4 g	*BioLife*
Agar	15.0 g	*BioLife*
Destilirana voda	1000 ml	

3.2.1. Čuvanje autohtonih sojeva rizobija

Za rutinsko korištenje, izolati su čuvani na YMA hranjivim podlogama pri temperaturi od 4 °C. Za dugotrajno čuvanje, izolati su pohranjeni na temperaturi -20 °C. Kao krioprotektor korištena je 20 % sterilna otopina glicerola.
Od čiste kulture svakog izolata pripremljena je suspenzija stanica u sterilnoj vodi koja je dodana u kriotube sa glicerolom.

3.3. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija

3.3.1. Identifikacija primjenom metode MALDI-TOF MS

3.3.1.1. Priprema uzoraka za MALDI-TOF MS analizu

Kulture su uzgajane 24 sata pri temperaturi od 28 °C na TY hranjivoj podlozi (Beringer i sur., 1974) čiji je sastav prikazan u tablici 7. Kao što je preporučeno od strane proizvođača, 5 do 100 mg biomase pojedinog izolata je preneseno sa petrijevih ploča u 1,5 ml tubice (Eppendorf, Njemačka) pomoću nastavaka za mikropipete. Dodano je 300 µl vode i dobro pomiješano kako bi se resuspendirale bakterijske stanice. Svakom uzorku dodano je 900 µl čistog etanola te je mješavina centrifugirana 2 minute pri 15,500 g. Odbačen je supernatant, a pelet je sušen na zraku pri sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon toga, na pelet je dodano 50 µl mravlje kiseline (70 % v/v) te je mješavina dobro pomiješana. Mješavini je dodano 50 µl acetonitrila te je ponovo centrifugirana 2 minute pri 15,500 g. Po 1 µl supernatanta odpipetirano je na označeno mjesto čelične ploče MALDI TOF uređaja i ozatim osušen na zraku pri sobnoj temperaturi. Za svaki uzorak napravljeno je ponavljanje. Svaki uzorak prekriven je sa 1 µl matrice.
Matrica se sastoji od: zasićene otopina α-HCCA (alfa-cijano-4-hidroksicinamična kiseline), 50 %-tnog acetonitrila i 2,5 % TFA (trisfluorooctena kiselina)

Tablica 7. Sastav TY hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
Kvasni ekstrakt	3g	*Difco*
Tripton iz kazeina	5g	*Difco*
$CaCl_2$	0,5g	*Codex*
Agar	15 g	*Conda*
Destilirana voda	1000 ml	

3.3.1.2. Mjerenje MALDI TOF masenom spektrometrijom i analiza podataka

Priprema uzoraka kao i mjerenje MALDI TOF MS-om izvršeno je kako je opisano u radu Ferreira i sur. (2011). Korišten je Autoflex III MALDITOF/TOF maseni spektrometar (Bruker Daltonics, Leipzig, Njemačka) uređaj opremljenom sa 200-Hz laserom (*smartbeam laser*). Kao kalibracijske mase korišteni su navedeni Bruker Bacterial Test Standards (BTS) (izražene kao prosjeci masa): RL36, 4365,3 Da; RS22, 5096,8 Da; RL34, 5381,4 Da; RL33meth, 6255,4 Da; RL29, 7274,5 Da; RS19, 10300,1 Da; RNase A, 13683,2 Da myoglobin, 16952,3 Da. Spektri su snimljeni u linearnom pozitivnom modu sa frekvencijom lasera 200 Hz. Za dobivanje svakog spektra, analizirano je 500 udaraca lasera.

Za identifikaciju sojeva korištena je baza podataka porodice *Rhizobiaceae* kreirana 2011 (Ferreira i sur., 2011) koja je sustavno nadograđivana unosom spektra novih vrsta otkrivenih nakon navedene godine.
Rezultati su interpretirani prema vrijednosti podudarnosti otisaka peptidnih masa izolata (PMF, engl. *peptide mass fingerprint*) sa onima koje sadži baza podataka i to prema uputama proizvođača;

- vrijednosti između 2,300 i 3,000 upućuju na identifikaciju na razini vrste;
- vrijednosti između 2,000 i 2,299 upućuju na identifikaciju na razini roda i moguću identifikaciju na razini vrste,
- vrijednosti između 1,700 i 1,999 upućuju na identifikaciju na razini roda
- vrijednosti <1,700 upućuju da nije moguće identificirati izolat

3.3.2. Izolacija genomske DNK

Za izolaciju ukupne genomske DNK, sojevi su uzgajani 48 sati na 28 ºC u TY tekućoj hranjivoj podlozi (Beringer, 1974) (Tablica 8). Nakon toga, stanice su prikupljene centrifugiranjem u mikrospin centrifugi (Eppendorf, Njemačka) pri 5000 g. Uslijedilo je ispiranje sa 200 µl 0,1 % vodene otopine sarkozila. Dodano je 100 µl 0,05 mol l^{-1} NaOH (pročišćene od DNA). Mješavina je zagrijavana na 100 °C 4 minute. Potom je dodano 900 µl vode u svaku mikrotubicu i ponovno je centrifugirano 3 minute na 4000 g. DNK je sadržana u supernatantu te je iz svakog uzorka pohranjeno 700 µl na -20 ºC.

Tablica 8: Sastav tekuće TY hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
Kvasni ekstrakt	4 g	*Difco*
Tripton iz kazeina	5 g	*Difco*
$CaCl_2$	0,9 g	*Codex*
Destilirana voda	1000 ml	

3.3.3. RAPD analiza

Za analizu bioraznolikosti sojeva iz ovih istraživanja korištena je početnica M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Rivas i sur., 2006).

Za PCR amplifikaciju korišten je GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) kit. Amplifikacija je provedena u volumenu 50 μl koji sadrži sljedeće komponente

- Pufer 1x
- $MgCl_2$ 2,5 mM
- 0,2 mM svakog dNTP
- GoTaq® DNA Polymerase 1,25 U
- M13 početnica 0,4 μM
- 30 ng originalne DNA

Amplifikacija je provedena u PCR termobloku (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems), a temperaturni profili navedeni su u tablici 9.

Tablica 9: Uvjeti amplifikacije za RAPD analizu.

Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	9
35	Denaturacija DNA	95	1
	Sparivanje početnice s alupm	45	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	75	2
1	Završno produljenje lanaca	72	7

Elektroforeza produkata rađena je u 1,5 % agaroznom gelu, u TBE puferu (100 mM Tris, 83 mM borne kiseline, 1 mM EDTA, pH 8.5)

Korišteno je 10 µl svakog PCR produkta pri 6 V/cm, zatim bojano u otopini koja sadrži 0.5 g/ml etidij bromida te fotografirano pod UV svjetlom.

Kao marker korišten je Standard VI (Roche, SAD).
Dendrogram je konstruiran na temelju matrice dobivene UPGMA metodom i Jaccard-ovim koeficijentom korištenjem programa Bionumerics, verzije softvera 4.0 (Applied Maths, Austin, Teksas)

3.3.4. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena

Za PCR amplifikaciju 16S rRNA gena također je korišten GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) kit ili REDExtract-N-Amp PCR Kit (Sigma) prema uputama proivođača.
Početnice su korištene u konačnim koncentracijama 0.2 µmol l^{-1} a njihove karakteristike su navedene u tablici 12.
U tablici 10 su navedeni temperaturni profili za amplifikaciju 16S rRNA gena.

Tablica 10. Uvjeti amplifikacije za analizu 16S rRNA gena.

Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	9
35	Denaturacija DNA	95	1
	Sparivanje početnice s kalupm	54	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	2
1	Završno produljenje lanaca	72	7

Elektroforeza produkata rađena je u 1 % agaroznom gelu, u TBE puferu (100 mM Tris, 83 mM borne kiseline, 1 mM EDTA, pH 8.5)
Korišteno je 10 µl svakog PCR produkta pri 6 V/cm, zatim bojano u otopini koja sadrži 0.5 g/ml etidij bromida te fotografirano pod UV svjetlom.

Fragmenti DNA su pročišćavani direktno iz gela eluiranjem (ispiranjem) izrezanog fragmenta i filtracijom kroz kolone sa silikagelom. Korišten je Qiaquick DNA Gel Extraction Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Gen 16S rRNA je sekvenciran korištenjem početnica navedenih u tablici 12. Sekvenciranje je provedeno u ABI PRISM 3100 sekvenceru korištenjem BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., SAD).

3.3.5. Amplifikacija i sekvenciranje *recA, atpD* i *nodC* gena.

Početnice za amplifikaciju *recA*, *atpD* i *nodC* gena opisane su u tablici 12. Koncentracija početnica za amplifikaciju svakog pojedinog gena iznosila je 0,2 µmol l^{-1}
U tablici 11 su navedeni temperaturni profili za amplifikaciju navedenih gena.

Tablica 11. Uvjeti amplifikacije za analizu *recA, atpD* i *nodC* gena.

Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	9
35	Denaturacija DNA	95	1
	Sparivanje početnice s alupm	54	1
	Sinteza komplementarnih anaca	72	1
1	Završno produljenje lanaca	72	7

Pročišćavanje fragmenata DNA i uvjeti elektroforeze bili su isti kao oni navedeni za 16S rRNA gen.
Za sekvenciranje *recA*, *atpD* i *nodC* gena korištene su iste početnice koje su opisane za njihovu amplifikaciju. Korištena je ista oprema kao za sekvenciranje16S rRNA gena.

Tablica 12. Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje navedenih gena.

Gen	Oznaka početnice	Sekvenca	Referenca
16S rDNA (amplifikacija)	27F (Escherichia coli positions 8-27)	5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'	Rivas i sur. (2002)
	1522R (E. coli positions 1509-1522)	5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'	
16S rDNA (sekvenciranje)	32-52	5'-AACGCTGGCGGCRKGCYTAA-3'	Rivas i sur. (2001)
	336-356	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	
	356-336	5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	
	512-532	5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'	
	782-803	5'-CAGGATTAGATACCCTGGTAG-3'	
	1173-1194	5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGTC-3'	
recA	recA-Rh-1F	5'-CGK CTS GTA GAG GAY AAA TCG GTG GA-3'	Gaunt i sur. (2001)
	recA-Rh-3R	5'-CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT-3'	
atpD	atpD-Rh-1F	5'-SCT GGG SCG YAT CMT GAA CGT-3'	Gaunt i sur. (2001)
	atpD-Rh-3R	5'-GCC GAC ACT TCC GAA CCN GCC TG-3'	
nodC	NodCF	5'-AYG THG TYG AYG ACG GTTC-3'	Laguerre i sur. (2001)
	NodCI	5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3'	

3.3.6. Filogenetska analiza

Dobiveni sekvencijski kromatogrami ručno su poravnati uz pomoć Clustal W software (Thompson i sur., 1997). Dobiveni oligonukleotidni slijedovi fragmenta ciljanog gena uspoređeni su sa onima koje se nalaze u GenBank korištenjem BLASTN programa (Altschul i sur., 1990).

Udaljenost izračunata prema Kimura's two-parameter modelu (Kimura, 1980) korištena je kako bi se konstruiralo filogenetsko stablo metodom pridruživanja susjednih parova (engl. *neighbour joining method*) (Saitou i Nei, 1987) pomoću MEGA5 softvera (Tamura i sur., 2011). Pouzdanost vrijednosti za grananje u filogenetskim stablima je dobivena bootstrap analizom uz permutaciju 1000 podataka.

3.4. Fenotipska karakterizacija izolata

Sva ispitivanja fenotipskih karakteristika rizobija rađena su u 3 ponavljanja.

3.4.1. Rast na različitim temperaturama

U svrhu ispitivanja rasta istraživanih sojeva, pripremljene su YMA hranjive podloge prethodno sterilizirane 15 minuta na 121 °C pri 1ATM, pH vrijednost podešena na 6,8.

Sojevi su nacijepljeni te inkubirani na temperaturama od 4 °C, 10 °C, 37 °C i 42 °C, dok je kao pozitivna kontrola zabilježen njihov rast na 28 °C. Nakon 4 dana očitani su rezultati u vidu prisustva (+) odsustva (-) ili slabog rasta (s).

3.4.2. Rast na različitim pH vrijednostima

Optimalne pH vrijednosti za rast rizobija su 6–7, a u ovom istraživanju ispitivana je sposobnost njihovog rasta na pH 4, 5, 6, 8 i 9.

U tu svrhu, standardnoj YMA podlozi dodavan je natrijev hidroksid (1M NaOH) za postizanje alkalne reakcije ili klorovodična kiselina (1M HCl) za postizanje kisele reakcije što je mjereno pH metrom.

Na tako pripremljenim sterilnim podlogama sojevi su inkubirani na temperaturi od 28°C, a rezultati (u vidu prisustva (+), odsustva (-) ili slabog rasta (s)) očitani su nakon 4 dana. Pozitivnu kontrolu predstavlja rast na standardnoj podlozi (pH 6,8).

3.4.3. Rast pri različitim koncentracijama NaCl

U standardnoj YMA podlozi koncentracija NaCl-a je 0,1 %. Kako bi se ispitao rast sojeva uključenih u ova istraživanja u uvjetima povišene koncentracije soli, standardnoj YMA podlozi dodavane su sljedeće koncentracije NaCl; 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 % i 3%.
Sojevi su inkubirani 4 dana na temperaturi od 28°C, a zatim su očitani rezultati u vidu prisustva (+) odsustva (-) ili slabog rasta (s).

3.4.4. Otpornost na antibiotike

Za ispitivanje otpornosti pojedinog izolata na određene doze antibiotika korišteni su test diskovi BD Sensi-Disc™ (Becton Dickinson GmbH). Korišteni su sljedeći antibiotici u navedenim koncentracijama:

- streptomicin (10 µg/disku)
- eritromicin (15 µg/disku)
- ampicilin (10 µg/disku)
- kanamicin (30 µg/disku).

Izolati su uzgajani u 5 ml tekuće YMB hranjive podloge (u tablici 13 naveden je njen sastav) 4 dana na temperaturi 28°C.
Nakon toga, 100 µl kulture svakog izolata prenijeto je na YMA te razmazano L-stapićem. Zatim su dodani diskovi sa različitim antibioticima.
Inkubacija je trajala 4 dana nakon čega su očitani rezultati; vidljive zone inhibicije oko diska mjerene u mm.
Rast oko diska označava otpornost izolata na ispitivanu dozu antibiotika, dok zone inhibicije koje tvore prsten oko diska, gdje bakterije ne rastu, ukazuju na njihovu osjetljivost. Raspon djelovanja za svaki disk tj.antibiotik predložen je od proizvođača no odnosi se na kliničke izolate te je prilagođen za rizobije (Eaglesham, 1987).
Rezultati su očitani ovisno o polumjeru zone oko diska: za streptomicin, eritromicin i ampicilin kao otporni (+) su identificiran sojevi koji su tvorili zone manje od 4 mm, 5-8 mm slabo otporni (s) i osjetljivi (-) zone veće od 8mm. Za kanamicin, te veličine su iznosile: za (+) do 6 mm, (s) 7-10 mm i (-) veće od 10 mm.

Tablica 13. Sastav YMB (Yeast Mannitol Broth) hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
K_2HPO_4	0.5 g	*VWR Chemicals*
$MgSO_4$	0.2 g	*VWR Chemicals*
NaCl	0.1 g	*VWR Chemicals*
Manitol	10.0 g	*VWR Chemicals*
Kvasni ekstrakt	0.4 g	*BioLife*
Destilirana voda	1000 ml	

3.4.5. Iskorištavanje različitih izvora šećera

Izolati su zajedno sa referentnim sojevima ispitivani na sposobnost iskorištavanja ugljika iz različitih izvora. U tu svrhu korištena je hranjiva podloga bez ugljikohidrata (Somasegaran i Hoben, 1994) u kojoj je kvasni ekstrakt reduciran na 0.05 g/L (tablica 14).

Termostabilni ugljikohidrati (fruktoza, glukoza, laktoza, saharoza i manitol) zasebno su sterilizirani u autoklavima pri 121 °C, 15 min i 1 atm, dok su termolabilni ugljikohidrati (galaktoza, maltoza, arabinoza i rafinoza) sterilizirani filter-sterilizacijom korištenjem Chromafil Xtra PET-20/25 (Macherey-Nagel) filtera sa poliesterskom membranom, veličine pora 0,2 µm.
Šećeri su dodani u hranjivu otopinu u konačnoj koncentraciji 1 % (w/v).
Kao pozitivna kontrola korištene su hranjive podloge bez ugljikohidrata u koje je dodan manitol, a kao negativna kontrola ista podloga bez dodanog ugljikohidrata.
Nakon inkubacije od 4 dana na 28 °C zabilježeni su rezultati (+, -, s).

Tablica 14. Sastav hranjive podloge bez ugljikohidrata.

Sastav	Količina	Proizvođač
K_2HPO_4	0.5 g	*VWR Chemicals*
$MgSO_4$	0.2 g	*VWR Chemicals*
NaCl	0.1 g	*VWR Chemicals*
Kvasni ekstrakt	0.05 g	*BioLife*
Agar	15.0 g	*BioLife*
Destilirana voda	1000 ml	

3.5. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija

3.5.1. Vegetacijski pokus

U plasteniku Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu postavljen je dvofaktorijalni pokus (2 x 18) po shemi slučajnog bloknog rasporeda u tri ponavljanja. Pokus je postavljen 20.04.2016.

Faktor Sorta predstavljen je dvjema tradicijskim sortama niskog graha zrnaša: „Trešnjevac“ i „Slavonski zeleni“.
Sorta Trešnjevac ima stabljiku prosječne visine 31,09 cm s prosječnim brojem fertilnih nodija 3,5. Cvatnja počinje između 35 i 39 dana nakon nicanja i traje 16 do 28 dana. Vegetacijsko razdoblje ove sorte traje oko 89 dana, obzirom da sazrijevanje nastupa između 83 i 89 dana nakon nicanja.
Cvjetovi su svijetlo ružičaste boje. Mahune su ravne do blago savijene, duljine 10,50 cm i širine 1,075 cm s prosječnih 4,34 zrna. Zrna su eliptičnoga oblika blijedo-ružičaste boje, prošarana tamno crvenim mrljama (slika 13). Masa 1000 zrna iznosi 329,7 g. Prinosi sjemena kreću se od 1.067 do 1.267 kg/ha. U odnosu na ostale sorte, Trešnjevac sadrži znatno veće količine proteina (oko 28,8 %) prema Vidović i Todorović (1988).
Jedan je od najrasprostranjenijih sorti graha na području kontinentalne Hrvatske.

Sorta Slavonski zeleni niskog je i slabo bujnog rasta sa stabljikom visine 32,83 cm s 3,24 fertilnih nodija. Cvatnja započinje od 33 do 37 dana nakon nicanja i traje 18 do 28 dana. Cvijetovi su bijele boje. Vegetacijsko razdoblje traje 89 dana. Mahune su zelene boje i blago svijene, duljine 9,12 cm i širine 1,025 cm. Sadrže 3,82 zrna eliptičnog oblika, zelenkasto-žućkaste boje (slika 14). Prosječna masa 1000 zrna je 333,6 g. Prinosi ove sorte su između 978 i 1307 kg/ha (Vidović i Todorović, 1988; Lešić i sur., 1984).
Sorta Slavonski zeleni upisana je na Sortnu listu Republike Hrvatske.

Slika 13. Sjeme sorte „Trešnjevac“. Slika 14. Sjeme sorte „Slavonski zeleni“. Foto: I. Rajnović, 2016.

Faktor Soj predstavljen je s ukupno 18 razina i to: 15 autohtonih sojeva odabranih iz grupa dobivenih temeljem RAPD analize te referentnim sojem 3622 (*R. leguminosarum*). Osim sojeva u pokus je uključena negativna (nebakterizirana) kontrola (0) te pozitivna kontrola (N) koja je također nebakterizirana, ali je dodan mineralni dušik u hranjivu otopinu (0,05 % KNO_3) (Aserse i sur., 2012).
U tablici 17 navedeno je 36 (2 x 18) kombinacija u pokusu Sorta x Soj.

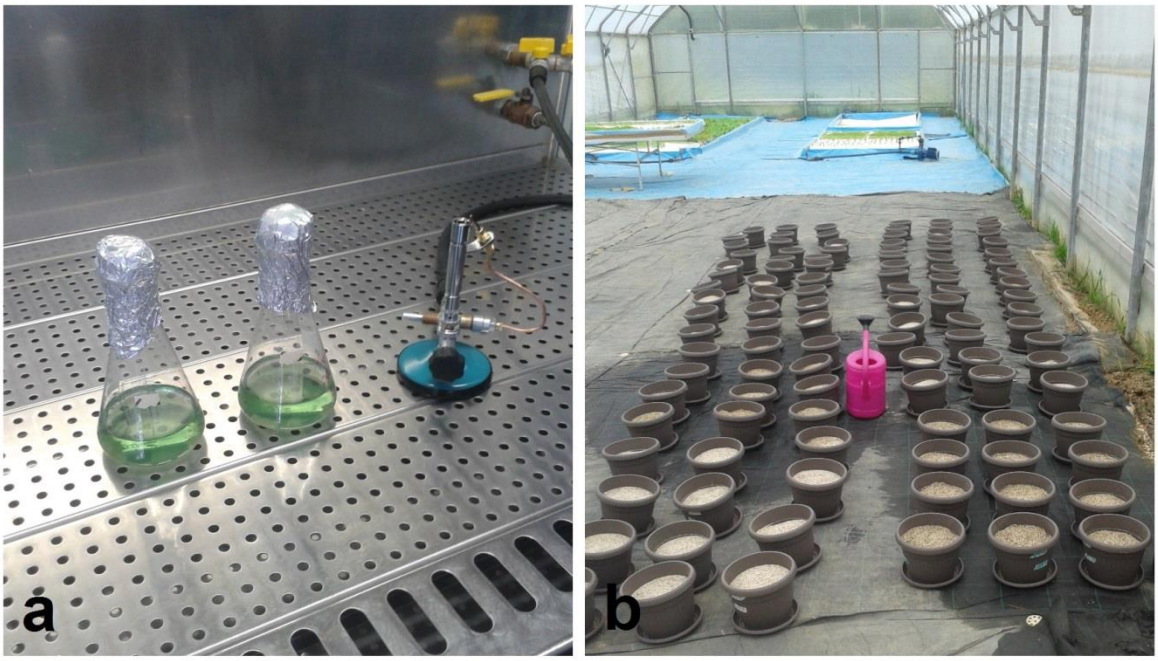
Za pripremu inokuluma, čiste kulture svakog soja razmnožene su u 120 ml tekuće hranjive podloge (tablica 15, slika 15a). Odabrani sojevi rasli su 6 dana na 28 °C kako bi se postigao broj stanica 10^8 CFU/ml.

Tablica 15. Sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma.

Sastav	Količina	Proizvođač
K_2HPO_4	1,0 g	*VWR Chemicals*
KH_2PO_4	0,5 g	*VWR Chemicals*
K_2SO_4	0,25 g	*VWR Chemicals*
$CaCl_2$	0,1 g	*VWR Chemicals*
NaCl	0,1 g	*BioLife*
$FeSO_4$	0,01 g	*BioLife*
$MnSO_4$	0,01 g	*Kemika*
$Na_2B_4O_7$	u tragu	*Kemika*
Na_2MoO_4	u tragu	*Kemika*
D – manitol	10, 0 g	*VWR Chemicals*
Kvasni ekstrakt	50 ml	*BioLife*
Bromthymol blau	1,0 ml	*Alfa Aesar*
Destilirana voda	950 ml	

Sjeme obje sorte graha površinski je dezinficirano prema Somasegaran i Hoben (1994). Prvo je uronjeno 1 minutu u 96 % etanol, zatim 3 minute u 5 % natrijev hipoklorit, nakon čega je uslijedilo šest serija ispiranja sterilnom vodom.

Lonci promjera 24 cm, dezinficirani su, označeni i napunjeni kvarcnim pijeskom (granulacije 0,5-2 mm). Sjeme graha inokulirano je sa 2 ml inokuluma po sjemenki, nakon čega je svaki lonac pokriven tankim slojem pijeska (slika 15b).



Slika 15. a) Priprema inokuluma za bakterizaciju sjemena graha b) postavljen pokusa u plasteniku. Foto: I. Rajnović, 2016.

Tijekom vegetacije biljke su zalijevane bezdušičnom hranjivom otopinom čiji je sastav naveden u tablici 16 (Macary, 1989).

Tablica 16. Sastav hranjive otopine za ishranu biljaka tijekom vegetacije.

Reagens	Stock otopina g/L	Količina za 1L hranjive otopine	Konačna koncentracija pojedinog elementa (µg/ml)
KH_2PO_4	136,1	1ml	P: 62
K_2HPO_4	174,2	1ml	K. 156,5
K_2SO_4	87,1	1ml	Ca: 40
$CaCl_2$	73,5	2ml	Mg: 12,3
$MgSO_4$× 7H2O	123,2	1ml	S: 32, 2

Tablica 17. Kombinacije u pokusu.

Kombinacija Sorta x Soj	Faktor Sorta	Faktor Soj
1	Trešnjevac	0
2	Trešnjevac	N
3	Trešnjevac	3622(ref)
4	Trešnjevac	1BZ
5	Trešnjevac	3T
6	Trešnjevac	7Z
7	Trešnjevac	12Z
8	Trešnjevac	1AT
9	Trešnjevac	15Z
10	Trešnjevac	16T
11	Trešnjevac	17T
12	Trešnjevac	18T
13	Trešnjevac	20Z
14	Trešnjevac	22AT
15	Trešnjevac	23T
16	Trešnjevac	2Z
17	Trešnjevac	26T
18	Trešnjevac	9T
19	Slavonski zeleni	0
20	Slavonski zeleni	N
21	Slavonski zeleni	3622(ref)
22	Slavonski zeleni	1BZ
23	Slavonski zeleni	3T
24	Slavonski zeleni	7Z
25	Slavonski zeleni	12Z
26	Slavonski zeleni	1AT
27	Slavonski zeleni	15Z
28	Slavonski zeleni	16T
29	Slavonski zeleni	17T
30	Slavonski zeleni	18T
31	Slavonski zeleni	20Z
32	Slavonski zeleni	22AT
33	Slavonski zeleni	23T
34	Slavonski zeleni	2Z
35	Slavonski zeleni	26T
36	Slavonski zeleni	9T

3.5.2. Masa suhe tvari kvržica i suhe tvari biljke

U fazi pune cvatnje koje je nastupila oko sedam tjedana nakon sjetve (10.06.2016.) slijedila je berba biljaka. Kako bi se procijenila učinkovitost u fiksiranju dušika svakog soja,

sakupljene su kvržice sa korijenja, a masa im je određivana uz sušenje do konstantne težine na sobnoj temperaturi.
Masa nadzemnog dijela biljnog materijala određivana je nakon sušenja u sušioniku na 70 °C do konstantne mase. Iz dobivenih vrijednosti određen je prinos mase suhe tvari biljaka (g) i suhe tvari kvržica (mg/ biljci).

3.5.3. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke

Osušeni biljni materijal mljeven je i homogeniziran, a sadržaj N (mg/biljci) određen je u analitičkom laboratoriju Zavoda za ishranu bilja Agronomskog fakulteta u Zagrebu metodom po Kjeldahlu (AOAC, 1995). Količina ukupnog (akumuliranog) dušika u nadzemnom dijelu biljke dobivena je umnoškom N (%) x ST (%) (sadržaj N x masa suhe tvari biljke).

3.5.4. Učinkovitost sojeva u fiksaciji dušika

Indeks učinkovitosti svakog izolata izračunat je prema formuli (Rahmani i sur., 2011):

$$Indeks\ učinkovitosti\ soja\ \mathrm{a}\ (\%) = \frac{(N\ (\mathrm{a}) - N\ (0))}{(N\ (N) - N\ (0))}\ x\ 100$$

Gdje je N (*a*)- količina dušika u biljkama inokuliranim sa sojem *a*
N(0) – količina dušika u neinokuliranim biljkama
N(N) – količina dušika u neinokuliranim biljkama tretiranim sa dušičnom otopinom

3.5.5. Statistička analiza

Na dobivenim podacima (masa suhe tvari biljaka (g), masa suhe tvari kvržica (mg/biljci) i količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci)) provedena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) prema modelu slučajnog bloknog rasporeda (RCBD) dvofaktorijelnog pokusa (Soj x Sorta). Razlike između prosjeka razina faktora Soj testirani su Tukeyevim testom višestrukih usporedbi. Svi dobiveni rezultati obrađeni su korištenjem statističkog programskog paket SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc. 2013. SAS® 9.4. Cary, NC, USA).

4. REZULTATI

4.1. Analize tla

Za uzorkovanje tla odabrane su poljoprivredne površine na kojima se tradicionalno uzgaja grah. Fizikalne i kemijske analize tla te pregled mikromonolita na dubini 0-100 cm omogućili su određivanje sistematske pripadnosti istraživanih tala. Prema klasifikaciji Husnjak (2014) ova tla sistematizirana su unutar sedam tipova (tablica 18).

Tip tla: **Eutrično smeđe tlo (eutrični kambisol)**

Ovaj tip tla pripada razredu tipična kambična tla i redu tersetrička tla. Tipična kambična tla nastaju na područjima koja karakteriziraju veća vlažnost i toplina te silikatno-karbonatni ili silikatni matični supstrati bogati bazama. U takvim uvjetima, pri većoj dubini i povoljnim hidrotermičkim svojstvima dolazi do kemijskog i biološkog trošenja mineralne tvari, raspada primarnih minerala i tvorbe sekundarnih minerala gline. Željezni oksidi se oslobađaju sa primarnih minerala i vežu za površinu sekundarnih pa ta zona poprima crvenkasto do žućkasto smeđu boju od koje i dolazi naziv „smeđe“. Istovremeno s nastajanjem oglinjenog eutričnog kambičnog horizonta odvija se razvoj humusno akumulativnog horizonta, a humifikacija odumrle organske tvari se odvija pri uvjetima neutralne do slabo kisele reakcije pri čemu nastaje blagi humus.

Klasifikacija na podtipove vrši se prema vrsti matičnog supstrata, na varijetete prema stupnju razvoja, a na forme prema teksturi i dubini podzemne vode.

Ovaj tip tla u Hrvatskoj najviše nalazimo u Panonskoj regiji. Tlo nastaje na rastresitim supstratima što omogućava dublje zakorjenjavanje bilja, povoljnih je fizikalnih i kemijskih svojstva koja omogućavaju intenzivnu biološku aktivnost. Stoga je i proizvodni potencijal ovakvog tla vrlo visok.

U ovaj tip tla svrstana su dva uzorka iz zapadnog dijela Koprivničko-križevačke županije (M2 i M26).

Tip tla: **Lesivirano tlo (luvisol)**

Lesivirano tlo također ubrajamo u red terestričkih, ali u razred eluvijalno-iluvijalnih tala. Naziv mu dolazi od francuske riječi „lessive“ koja se odnosi na ispiranje i nakupljanje čestica gline.

Tlo uglavnom nastaje na zaravnjenim do blago valovitim terenima nizinskog i brežuljkastog područja s dobrom do umjereno dobrom dreniranošću. Klasifikacija na podtipove vrši se na temelju matičnog supstrata. Kriterij za razvrstavanje na varijetete su

stadij razvoja i pojava podzemne vode, a podjela na forme vrši se prema teksturi i skeletnosti. Niže pedosistematske jedinice karakterizira znatna različitost fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava zbog čega je i proizvodni potencijal jako varijabilan.
Važno je napomenuti da je lesivirano tlo najrasprostranjeniji tip tla u Hrvatskoj i zauzima 11,75 % površine.
Tri preostala uzorka iz zapadnog dijela (M8, M12 i M15) te jedan uzorak iz istočnog dijela Koprivničko-križevačke županije (M17) svrstana su u ovaj tip tla.

Tip tla: **Pseudoglej**
Ovaj tip tla pripada redu semiterestričkih (hidromorfnih) tala i razredu preudo i stagnoglejnih tala (slika 16a) Obilježava ga izmjena faze redukcije i oksidacije Fe i Mn spojeva u unutrašnjost agregata kojeg karakterizira dijagnostički horizont mramornog izgleda.
Zbog nepovoljnih vodozračnih odnosa, kisele reakcije i niske biološke aktivnosti, svrstavamo ga u skupinu tala s niskim proizvodnim potencijalom.
U taj tip tala ubrajamo uzorke M20 i M28 iz Bjelovarsko-bilogorske županije.

Tip tla: **Fluvijalno tlo (fluvisol)**
Spada u red hidromorfnih i razred inicijalnih (nerazvijenih) tala. Iz ovog tla uzet je uzorak sa kranjeg sjevera Koprivničko-križevačke županije (M5). Takav tip tla nastaje na terenima plavljenim izlijevanjem rijeka iz korita. Heterogenih je fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava pa mu i proizvodni potencijal također varira, a na većem dijelu takvog tla uzgajaju se ratarske i povrćarske kulture.

Tip tla: **Livadsko fluvijalno tlo**
Također spada u red hidromorfnih, ali razredu semiglejnih tala (slika 16b).
Ovom tipu pripada najveći broj uzorkovanih tala. Od toga, uzorci M1A, M1B i M21 prikupljeni su iz Varaždinske županije, M9, M10, M13 i M25 sa vrlo male udaljenosti istočnog dijela Koprivničko-križevačke županije dok su sjevernog dijela iste županije prikupljeni uzorci M7 i M19.
Ovo tlo nastaje na bivšim poplavnim terenima (polojima rijeka); njihovim izlijevanjem nošen je materijal koji se taložio i stvorio matični supstrat. Naziv „livadsko“ potječe od vegetacije. Podzemne vode ne uzrokuju prekomjerno vlaženje već povoljno utječu na režim vlažnosti. Matični supstrat su fluvijalni nanosi, dobre vodopropusnosti. Livadsko tlo može sadržavati različit broj slojeva s različitim fizikalnim, kemijskim i morfološkim svojstvima. Klasifikacija na podtipove vrši se prema prisutnosti karbonatra, na varijetete prema pojavi zaslanjenosti i alkaliziranosti, a na forme prema dominantnoj teksturi.

Rasprostranjeno je na području bivših poplavnih terena uz rijeke. Obilježavaju ga heterogena fizikalna i kemijska svojstva, povoljnih je vodozračnih odnosa, tekstura je praškasto ilovasta, a struktura stabilna, mrvičasta do graškasta. Sadržaj hraniva je od osrednjeg do niskog, no ipak, ovo tlo svrstano je skupinu naših najpogodnijih tala za poljoprivrednu proizvodnju.

Tip tla: **Hipoglej**

Pripada redu hidromorfnih, a razredu hipoglejnih tala (slika 16c).

To je tlo u kojem je stalno prisutna podzemna voda te stalno dominiraju anaerobni uvjeti (pravo glejno, močvarno-glejno). Može se razviti humusno-akumulativni horizont u uvjetima prekomjernog vlaženja zbog čega se razgradnja i humifikacija organske tvari odvija u anaerobnim uvjetima te nastaje akvatični humus. Podzemna voda ima smanjen sadržaj kisika pa su često prisutni redukcijski procesi zbog kojih ta zona poprima plavičasto zelenkastu sivkastu boju-glejno redukcijski pothorizont.

Klimatska obilježja nemaju utjecaj na postanak ovakvog tla, ono nastaje na području mikrodepresija s plitkim podzemnim vodama. Matični supstrat čine uglavnom lakši fluvijalni nanosi pjeskovite do glinasto ilovaste teksture, dobre vodopropusnosti.

Klasifikacija na podtipove vrši se na temelju prisutnosti karbonata, na varijetete prema sadržaju humusa, a na forme prema intenzitetu vlaženja podzemnom vodom te prema zaslanjenosti i alkaliziranosti.

Zbog česte pojave podzemne vode u rizosfernom dijelu ovo tlo ima nepovoljan režim vlažnosti i nepovoljnu ekološku dubinu, te mu je sadašnji proizvodni potencijal dosta nizak. Tlo karakterizira slabo kisela do kisela reakcija te sadržaj humusa koji može varirati od nekoliko postotaka do 30 %.

Ovaj tip tla pronađen je na različito raspoređenim lokacijama Varaždinske (M22A i M22B), Međimurske (M23) te istočnog dijela Koprivničko-križevačke županije (M3 i M18).

Tip tla: **Pseudoglej-glej**

Također iz reda hidromorfnih te iz razreda amfiglejnih tala.

Tlo se najvećim djelom vlaži oborinskim vodama, a slivene vode se javljaju uz brežuljkaste terene. Ovo tlo javlja se na području humidne klime. Kao i kod pseudogleja dolazi do stalne izmjene mokre te vlažne i suhe faze, a time i do izmjene redukcijsko-oksidacijskih procesa koji tvore karakteristične nakupine.

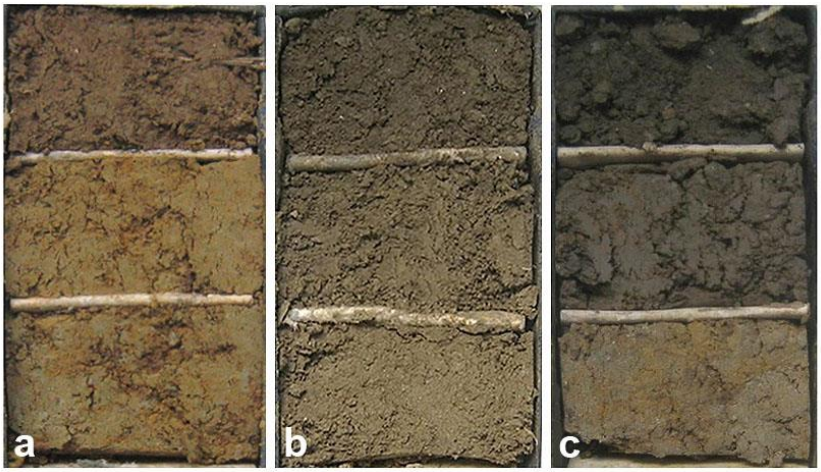
Ukratko se može reći da ovaj tip tla karakterizira pseudoglejno vlaženje u gornjem dijelu profila i plitko semiglejno u donjem dijelu. To je tlo nepovoljnih fizikalnih i bioloških svojstava. Sve to svrstava ga u tla s niskim proizvodnim potencijalom.

Klasifikacija na podtipove vrši se prema dubini javljanja slabo propusnog horizonta, na varijetete prema dubini javljanja glejnog redukcijskog pothorizonta a na forme prema reakciji tla.

Ovom tipu pripadaju uzorci M14 i M16 iz centralnog dijela Koprivničko-križevačke županije te M27 iz Bjelovarsko-bilogorske županije.

Tablica 18: Sistematska pripadnost uzorkovanih tala.

Oznaka uzorka	Lokacija	Tip tla	Razred	Red
M26	KKŽ (Z), Veliki Poganec	Eutrično smeđe tlo (eutrični kambisol)	Tipična kambična tla	I. Terestrička tla
M2	KKŽ (Z), L.Sokolovački			
M17	KKŽ (I), Kloštar Podravski	Lesivirano tlo (luvisol)	Eluvijalno-iluvijalna tla	
M8	KKŽ (Z), Čabraji			
M12	KKŽ (Z), Trema			
M15	KKŽ (Z), Lemeš Križevački			
M28	BBŽ, Velike Sredice	Pseudoglej	Pseudo i stagnoglejna tla	II. Semiterestrička (hidromorfna) tla
M20	BBŽ, Hercegovac			
M11	KKŽ (C), Jeduševac			
M5	KKŽ (S), Legrad	Fluvijalno tlo (fluvisol)	Inicijalna (nerazvijena tla)	III. Hidromorfna tla
M1A	VŽ, Mali Bukovec	Livadsko fluvijalno tlo	Semiglejna tla	
M1B	VŽ, Mali Bukovec			
M7	KKŽ (S), Grabaševac			
M9	KKŽ (I), Novo Virje			
M10	KKŽ (I), Novo Virje			
M13	KKŽ (I), Ferdinandovac			
M19	KKŽ (S), Đelekovac			
M21	VŽ, Petrijanec			
M25	KKŽ (I), Novo Virje			
M22A	VŽ, Zamlaća	Hipoglej	Hipoglejna tla	
M22B	VŽ, Vidovec			
M3	KKŽ (I), Podravske Sesvete			
M23	MŽ, Hodošan			
M18	KKŽ (I), Mekiš-Brodić			
M16	KKŽ (C), Delovi	Pseudoglej-glej	Amfiglejna tla	
M14	KKŽ (C), Koprivnički Bregi			
M27	BBŽ, Gudovec			



Slika 16. Mikromonoliti uzoraka tala pod oznakom: a) pseudoglej (uzorak M11), b) livadsko fluvijalno tlo (M1A), c) hipoglej (M3). Foto: S. Husnjak, 2016.

Fizikalne i kemijske analize tla napravljene su za prosječan uzorak svakog lokaliteta, dobiven uzimanjem s tri mjesta, dijagonalno na odabranoj parceli, iz površinskog sloja (dubine 0-30 cm).

Fizikalne analize tla pokazuju da najveći broj uzoraka (19 od 27) ima teksturnu oznaku praškasto ilovasto što je određeno prema sadržaju mehaničkih čestica (krupnog pijeska, sitnog pijeska, krupnog praha, sitnog praha i gline). Pet uzoraka ima praškastu teksturu (M7, M17, M20, M26, M28), dva praškasto glinasto ilovastu (M3 i M16), dok samo jedan uzorak ima pjeskovito ilovastu (M5). Ova tla uzorkovana su u različitim županijama, a pripadaju različitim tipovima tla. U tablici 19 navedene su fizikalne karakteristike istraživanih tala.

Kemijske analize pokazuju da dominiraju kisela tla. Za više od 50 % uzoraka izmjeren je pH u KCl-u $<$ 6,44. Od toga je čak osam tala jako kiselo (M8, M12, M16, M17, M22A, M23 M28), a takva tla su zastupljena u svim županijama uzorkovanja. Tri tla su kisela (pH vrijednosti od 4,74 do 5,34). To su uzorci sa sjevera Koprivničko-križevačke županije (M7), iz Varaždinske (M22B) i Bjelovarsko-bilogorske županije (M27). Četiri slabo kisela (M3, M13, M15 i M20) također su uzorkovana na različitim udaljenostima.

Alkalična tla (M1A, M5, M9, M18, M19, M25) i neutralna tla (M1B, M2, M10, M11, M21, M26) brojnošću su jednako zastupljena, a lokacije njihovog uzorkovanja također su različito raspoređene po županijama.

Tla sa sličnom pH reakcijom različito su raspoređena po županijama, a gledajući njihovu sistematsku pripadnost također možemo zaključiti da pripadaju različitim tipovima tala.

Što se tiče sadržaja humusa, 18 uzoraka tala je slabo humozno, 8 dosta humozno, a samo uzorak M3 je jako humozan.

Prema sadržaju ukupnog dušika, većina tala (njih 14) spada u tla dobro opskrbljena dušikom dok ih je 10 bogato ospskrbljeno. Tri tla (M3, M16 i M26) iz različitih dijelova Koprivničko-križevačke županije, vrlo su bogato opskrbljena dušikom. Prema sistematskoj pripadnosti, ova tla razvrstana su u različite tipove.

Većina istraživanih tala je slabo opskrbljeno kalijem (10 uzoraka). Osam uzoraka je dobro opskrbljeno, šest bogato opskrbljeno, a tek tri vrlo bogato opskrbljeno (uzorci M9, M22B i M26). Tla su različito opskrbljena fosforom; šest uzoraka je vrlo slabo opskrbljeno, četiri slabo, osam dobro opskrbljeno, šest bogato, a tri vrlo bogato. Ni za ove karakteristike nije utvrđna povezanost sa lokacijama uzorkovanja niti sa tipovima tala.

Kemijske karakteristike uzorkovanih tala navedene su u tablicama 20 i 21.

Tablica 19. Tekstura istraživanih tala.

Oznaka uzorka	Lokacija	Sadržaj mehaničkih čestica tla (%)					Teksturna oznaka*
		Krupni pijesak 2,0-0,2 mm	Sitni pijesak 0,2-0,063 mm	Krupni prah 0,063-0,02 mm	Sitni prah 0,02-0,002 mm	Glina <0,002 mm	
M1A	VŽ, Mali Bukovec	1,8	32,2	35,4	22,1	8,5	PrI
M1B	VŽ, Mali Bukovec	2,7	31,0	35,4	24,8	6,1	PrI
M2	KKŽ (Z), L. Sokolovački	0,6	4,5	52,1	30,0	12,8	PrI
M3	KKŽ (I), Podravske Sesvete	0,8	2,0	20,6	41,1	35,5	PrGI
M5	KKŽ (S), Legrad	5,3	45,6	32,2	14,3	2,6	PI
M7	KKŽ (S), Grabaševac	0,5	6,7	46,9	34,5	11,4	Pr
M8	KKŽ (Z), Čabraji	16,3	19,5	26,4	23,7	14,1	PrI
M9	KKŽ (I), Novo Virje	1,0	11,9	28,4	44,9	13,8	PrI
M10	KKŽ (I), Novo Virje	0,5	19,4	29,9	36,8	13,4	PrI
M11	KKŽ (C), Jeduševac	4,2	16,3	22,7	34,0	22,8	PrI
M12	KKŽ (Z), Trema	0,3	4,4	48,2	35,0	12,1	PrI
M13	KKŽ (I), Ferdinandovac	0,6	20,2	28,4	33,5	17,3	PrI
M14	KKŽ (C), Koprivnički Bregi	2,9	16,9	47,5	23,2	9,5	PrI
M15	KKŽ (Z), Lemeš Križevački	1,0	4,7	49,1	32,2	13,0	PrI
M16	KKŽ (C), Delovi	7,1	1,2	10,9	45,7	35,1	PrGI
M17	KKŽ (I), Kloštar Podravski	1,5	7,1	59,4	22,6	9,4	Pr
M18	KKŽ (I), Mekiš-Brodić	1,1	5,7	22,5	56,3	14,4	PrI
M19	KKŽ (S), Đelekovac	4,2	14,1	37,9	35,5	8,3	PrI
M20	BBŽ, Hercegovac	2,3	3,3	50,5	34,1	9,8	Pr
M21	VŽ, Petrijanec	3,1	18,4	30,2	37,1	11,2	PrI
M22A	VŽ, Zamlaća	3,9	6,7	40,5	35,7	13,2	PrI*
M22B	VŽ, Vidovec	5,6	6,6	39,7	37,2	10,9	PrI
M23	MŽ, Hodošan	1,2	7,9	27,9	37,4	25,6	PrI
M25	KKŽ (I), Novo Virje	1,1	13,6	44,9	33,0	7,4	PrI
M26	KKŽ (Z), Veliki Poganec	1,9	3,5	50,4	34,2	10,0	Pr
M27	BBŽ, Gudovec	1,9	2,7	45,7	35,4	14,3	PrI
M28	BBŽ, Velike Sredice	1,7	3,1	52,1	32,5	10,6	Pr

** PrI: praškasto ilovasto, PrGI: praškasto glinasto ilovasto, PI: pjeskovito ilovasto, Pr: praškasto*

Tablica 20: Kemijske karakteristike uzorkovanih tala: sadržaj humusa i reakcija tla.

Oznaka uzorka	Lokacija	Sadržaj humusa		pH (reakcija tla)		
		%	Interpretacija	H_2O	KCl	Interpretacija
M1A	VŽ, Mali Bukovec	2,0	slabo humozno	7,94	7,25	alkalična
M1B	VŽ, Mali Bukovec	2,4	slabo humozno	7,85	7,10	neutralna
M2	KKŽ (Z), L. Sokolovački	2,0	slabo humozno	7,42	6,57	neutralna
M3	KKŽ(I),Podravske Sesvete	6,7	jako jumozno	7,22	6,03	slabo kisela
M5	KKŽ (S), Legrad	1,5	slabo humozno	7,97	7,48	alkalična
M7	KKŽ (S), Grabaševac	2,0	slabo humozno	6,46	5,01	kisela
M8	KKŽ (Z), Čabraji	1,3	slabo humozno	6,06	4,36	jako kisela
M9	KKŽ (I), Novo Virje	3,3	dosta humozno	7,77	7,23	alkalična
M10	KKŽ (I), Novo Virje	3,4	dosta humozno	7,66	7,06	neutralna
M11	KKŽ (C), Jeduševac	3,4	dosta humozno	7,56	6,67	neutralna
M12	KKŽ (Z), Trema	1,7	slabo humozno	5,84	4,12	jako kisela
M13	KKŽ (I), Ferdinandovac	2,8	slabo humozno	7,28	6,44	slabo kisela
M14	KKŽ (C), Koprivnički Bregi	1,9	slabo humozno	5,27	3,95	jako kisela
M15	KKŽ (Z), Lemeš Križevački	2,2	slabo humozno	6,67	5,62	slabo kisela
M16	KKŽ (C), Delovi	4,7	dosta humozno	5,34	4,00	jako kisela
M17	KKŽ (I), Kloštar Podravski	1,1	slabo humozno	4,89	3,60	jako kisela
M18	KKŽ (I), Mekiš-Brodić	2,9	slabo humozno	7,89	7,32	alkalična
M19	KKŽ (S), Đelekovac	2,1	slabo humozno	8,01	7,42	alkalična
M20	BBŽ, Hercegovac	2,2	slabo humozno	6,87	6,05	slabo kisela
M21	VŽ, Petrijanec	3,0	slabo humozno	7,70	7,06	neutralna
M22A	VŽ, Zamlaća	3,8	dosta humozno	5,65	4,07	jako kisela
M22B	VŽ, Vidovec	3,4	dosta humozno	6,02	4,74	kisela
M23	MŽ, Hodošan	3,3	dosta humozno	5,62	4,06	jako kisela
M25	KKŽ (I), Novo Virje	2,2	slabo humozno	7,92	7,33	alkalična
M26	KKŽ (Z), Veliki Poganec	4,6	Dosta humozno	7,16	6,65	neutralna
M27	BBŽ, Gudovec	2,6	Slabo humozno	6,57	5,34	kisela
M28	BBŽ, Velike Sredice	1,5	Slabo humozno	5,01	3,77	jako kisela

Tablica 21. Kemijske karakteristike uzorkovanih tala: sadržaj fiziološki aktivnog kalija i fosfora te sadržaj ukupnog dušika.

Uzorak	Lokacija	Sadržaj K_2O		Sadržaj P_2O_5		Sadržaj ukupnog dušika	
		mg/100g tla	Interpretacija	mg/100g tla	Interpretacija	%	Interpretacija
M1A	VŽ	14,5	Dobro	26,14	Bogato	0,18	Dobro opskrbljeno
M1B	VŽ	8,9	Slabo	16,03	Dobro	0,18	Dobro opskrbljeno
M2	KKŽ (Z)	13,0	Slabo	4,05	Vrlo slabo	0,16	Dobro opskrbljeno
M3	KKŽ (I)	15,8	Dobro	8,25	Slabo	0,43	Vrlo bogato opskrbljeno
M5	KKŽ (S)	9,4	Slabo	20,29	Dobro	0,12	Dobro opskrbljeno
M7	KKŽ (S)	12,2	Slabo	6,23	Slabo	0,18	Dobro opskrbljeno
M8	KKŽ (Z)	10,2	Slabo	1,55	Vrlo slabo	0,11	Dobro opskrbljeno
M9	KKŽ (I)	>40,0	Vrlo bogato	27,96	Bogato	0,27	Bogato opskrbljeno
M10	KKŽ (I)	11,0	Slabo	5,96	Vrlo slabo	0,25	Bogato opskrbljeno
M11	KKŽ (C)	32,0	Bogato	21,84	Dobro	0,24	Bogato opskrbljeno
M12	KKŽ (Z)	9,8	Slabo	3,03	Vrlo slabo	0,14	Dobro opskrbljeno
M13	KKŽ (I)	14,5	Dobro	14,32	Dobro	0,21	Bogato opskrbljeno
M14	KKŽ (C)	30,5	Bogato	31,65	Bogato	0,14	Dobro opskrbljeno
M15	KKŽ (Z)	21,5	Dobro	32,13	Bogato	0,18	Dobro opskrbljeno
M16	KKŽ (C)	28,5	Bogato	7,84	Slabo	0,34	Vrlo bogato opskrbljeno
M17	KKŽ (I)	11,0	Slabo	11,00	Dobro	0,12	Dobro opskrbljeno
M18	KKŽ (I)	39,5	Bogato	20,00	Dobro	0,23	Bogato opskrbljeno
M19	KKŽ (S)	18,4	Dobro	25,80	Dobro	0,19	Dobro opskrbljeno
M20	BBŽ	35,0	Bogato	29,91	Bogato	0,17	Dobro opskrbljeno
M21	VŽ	38,0	Bogato	48,41	Vrlo bogato	0,24	Bogato opskrbljeno
M22A	VŽ	11,8	Slabo	3,88	Vrlo slabo	0,25	Bogato opskrbljeno
M22B	VŽ	>40,0	Vrlo bogato	27,58	Bogato	0,24	Bogato opskrbljeno
M23	MŽ	14,5	Dobro	7,00	Slabo	0,22	Bogato opskrbljeno
M25	KKŽ (I)	13,5	Slabo	4,20	Vrlo slabo	0,17	Dobro opskrbljeno
M26	KKŽ (Z)	>40,0	Vrlo bogato	50,45	Vrlo bogato	0,32	Vrlo bogato opskrbljeno
M27	BBŽ	16,7	Dobro	43,68	Vrlo bogato	0,20	Bogato opskrbljeno
M28	BBŽ	18,7	Dobro	25,60	Dobro	0,14	Dobro opskrbljeno

4.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija

Kvržice za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljene su sa korijena dviju sorti graha posijanih u lonce sa 27 uzoraka tla. Simbiozni fiksatori dušika izolirani su iz kvržica u fazi pune cvatnje biljaka.

Odabrane su bjelkaste do prozirne kolonije koje su odgovarale tipičnoj morfologiji rizobija. Odabrano je ukupno 50 izolata. Nakon bojanja po Gramu i mikroskopskog pregleda, utvrđeno je da su 45 izolata sa YMA hranjivih podloga Gram negativni štapići, dok su ostali izolati isključeni iz daljnjih analiza.

U svim istraživanim uzorcima tla pronađeni su autohtoni sojevi, osim iz onih pod oznakom M10 i M28 gdje se na biljkama nisu razvile kvržica. Uzorak M10 pripada livadsko-fluvijalnim tlima koje karakterizira visok proizvodni potencijal, a uzorak M28 pseudogleju, tipu tla sa niskim proizvodnim potencijalom, što pokazuje da ova karakteristika tla nije imala utjecaj na prisutnost rizobija. Izolati dobiveni iz ostalih uzoraka i njihovo podrijetlo navedeni su u tablici 22.

Tablica 22. Autohtoni sojevi rizobija izolirani iz kvržica na grahu.

Podrijetlo autohtonih sojeva		Oznake izolata
Lokacija	Oznaka lokacije	
VŽ, Mali Bukovec	M1A	1AT
VŽ, Mali Bukovec	M1B	1BZ, 1BT
KKŽ (Z), L. Sokolovački	M2	2Z, 2T
KKŽ (I), Podravske Sesvete	M3	3Z, 3T
KKŽ (S), Legrad	M5	5Z, 5T
KKŽ (S), Grabaševac	M7	7Z, 7T
KKŽ (Z), Čabraji	M8	8Z, 8T
KKŽ (I), Novo Virje	M9	9T
KKŽ (C), Jeduševac	M11	11Z, 11T
KKŽ (Z), Trema	M12	12Z, 12T
KKŽ (I), Ferdinandovac	M13	13Z, 13T
KKŽ (C), Koprivnički Bregi	M14	14Z
KKŽ (Z), Lemeš Križevački	M15	15Z
KKŽ (C), Delovi	M16	16T
KKŽ (I), Kloštar Podravski	M17	17Z, 17T
KKŽ (I), Mekiš-Brodić	M18	18Z, 18T
KKŽ (S), Đelekovac	M19	19Z, 19T
BBŽ, Hercegovac	M20	20Z, 20T
VŽ, Petrijanec	M21	21Z, 21T
VŽ, Zamlaća	M22A	22AT, 22AZ
VŽ, Vidovec	M22B	22BT, 22BZ
MŽ, Hodošan	M23	23Z, 23T
KKŽ (I), Novo Virje	M25	25Z, 25T
KKŽ (Z), Veliki Poganec	M26	26Z, 26T
BBŽ, Gudovec	M27	27Z, 27T

4.3. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija

4.3.1. Identifikacija primjenom metode MALDI-TOF MS

Za identifikaciju sojeva metodom MALDI TOF MS izolati su uzgajani 24 sata na temperaturi 28°C. Za razliku od standardne YMA podloge koja se koristi za uzgoj rizobija, na TY podlozi dolazi do znatno manje produkcije egzopolisaharida koji mogu ometati dobivanje pouzdanog spektra.

Izolirane kvržične bakterije prvo su identificirane MALDI-TOF analizom koja se bazira na usporedbi spektra izolata sa onima iz aktualizirane baze podataka koju se kreirali Ferreira i sur. (2011). U prilogu 1 prikazani su spektri peptidnih masa pojedinih izolata uspoređeni sa najsličnijom vrstom.

Dobiveni rezultati pokazuju da svi izolati pripadaju rodu *Rhizobium* jer je za sve sojeve dobivena vrijednost podudarnosti sa spektrima poznatih vrsta, veća od 2,000. Poznato je za ovu metodu da vrijednosti veće od 2,300 upućuju na sigurnu identifikaciju na razini vrste, a te vrijednosti dobivene su za 40 % izolata (tablica 23). Od toga, 8 izolata identificirano je kao *R. leguminosarum*, a 10 kao *R. hidalgonense*.

Ferreira i sur. (2011) procjenjuju da za brzorastuće rizobije i vrijednosti između 2.000 i 2,300 upućuju na identifikaciju na razini vrste. Na temelju tih vrijednosti izolati iz ovog istraživanja pokazivali su najveću podudarnost sa vrstama: *Rhizobium leguminosarum* (8 izolata), *Rhizobium sophoriradicis* (7), *Rhizobium phaseoli* (5), *Rhizobium ecuadorense* (1), *Rhizobium acidisoli* (2), *Rhizobium indigoferae* (2) i *Rhizobium pisi* (2).

MALDI-TOF masena spektrometrija pokazala je da sojevi iz ovog istraživanja pripadaju rodu *Rhizobium* koji uključuje vrste koje je često teško razlikovati čak i na osnovu analize *rrs* gena. U cilju dobivanja što pouzdanijih rezultata, daljnja identifikacija vrlo srodnih izolata rizobija uključila je analizu sekvenci konstitucijskih gena *rrs*, *atpD* i *recA*.

Tablica 23. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija primjenom MALDI-TOF masene spektrometrije.

Soj	Identifikacija prema	Vrijednost podudarnosti
	MALDI-TOF MS	
1AT	*Rhizobium leguminosarum*	2,367
1BT	*Rhizobium phaseoli*	2,268
1BZ	*Rhizobium phaseoli*	2,205
2T	*Rhizobium leguminosarum*	2,146
2Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,388
3T	*Rhizobium leguminosarum*	2,270
3Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,360
5T	*Rhizobium phaseoli*	2,266
5Z	*Rhizobium phaseoli*	2,256
7T	*Rhizobium leguminosarum*	2,250
7Z	*Rhizobium indigoferae*	2,250
8T	*Rhizobium indigoferae*	2,237
8Z	*Rhizobium acidisoli*	2,233
9T	*Rhizobium phaseoli*	2,138
11T	*Rhizobium sophoriradicis*	2,160
11Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,462
12T	*Rhizobium ecuadorense*	2,214
12Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,153
13T	*Rhizobium sophoriradicis*	2,256
13Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,138
14Z	*Rhizobium hidalgonense*	2,557
15Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,368
16T	*Rhizobium leguminosarum*	2,377
17T	*Rhizobium leguminosarum*	2,403
17Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,373
18T	*Rhizobium acidisoli*	2,271
18Z	*Rhizobium sophoriradicis*	2,206
19T	*Rhizobium sophoriradicis*	2,250
19Z	*Rhizobium sophoriradicis*	2,198
20T	*Rhizobium hidalgonense*	2,577
20Z	*Rhizobium hidalgonense*	2,473
21T	*Rhizobium sophoriradicis*	2,236
21Z	*Rhizobium leguminosarum*	2,202
22AT	*Rhizobium pisi*	2,168
22AZ	*Rhizobium hidalgonense*	2,450
22BT	*Rhizobium hidalgonense*	2,431
22BZ	*Rhizobium pisi*	2,118
23T	*Rhizobium leguminosarum*	2,234
23Z	*Rhizobium hidalgonense*	2,445
25T	*Rhizobium hidalgonense*	2,440
25Z	*Rhizobium sophoriradicis*	2,232
26T	*Rhizobium hidalgonense*	2,490
26Z	*Rhizobium hidalgonense*	2,450
27T	*Rhizobium leguminosarum*	2,150
27Z	*Rhizobium hidalgonense*	2,485

4.3.2. RAPD analiza

Metoda RAPD uz korištenje početnice M13 primijenjena je u ovom istraživanju za početno grupiranje sojeva. Za 45 istraživanih sojeva dobiven je 31 RAPD profil temeljem kojih su sojevi grupirani u skupine sa sličnošću manjom od 70 %.

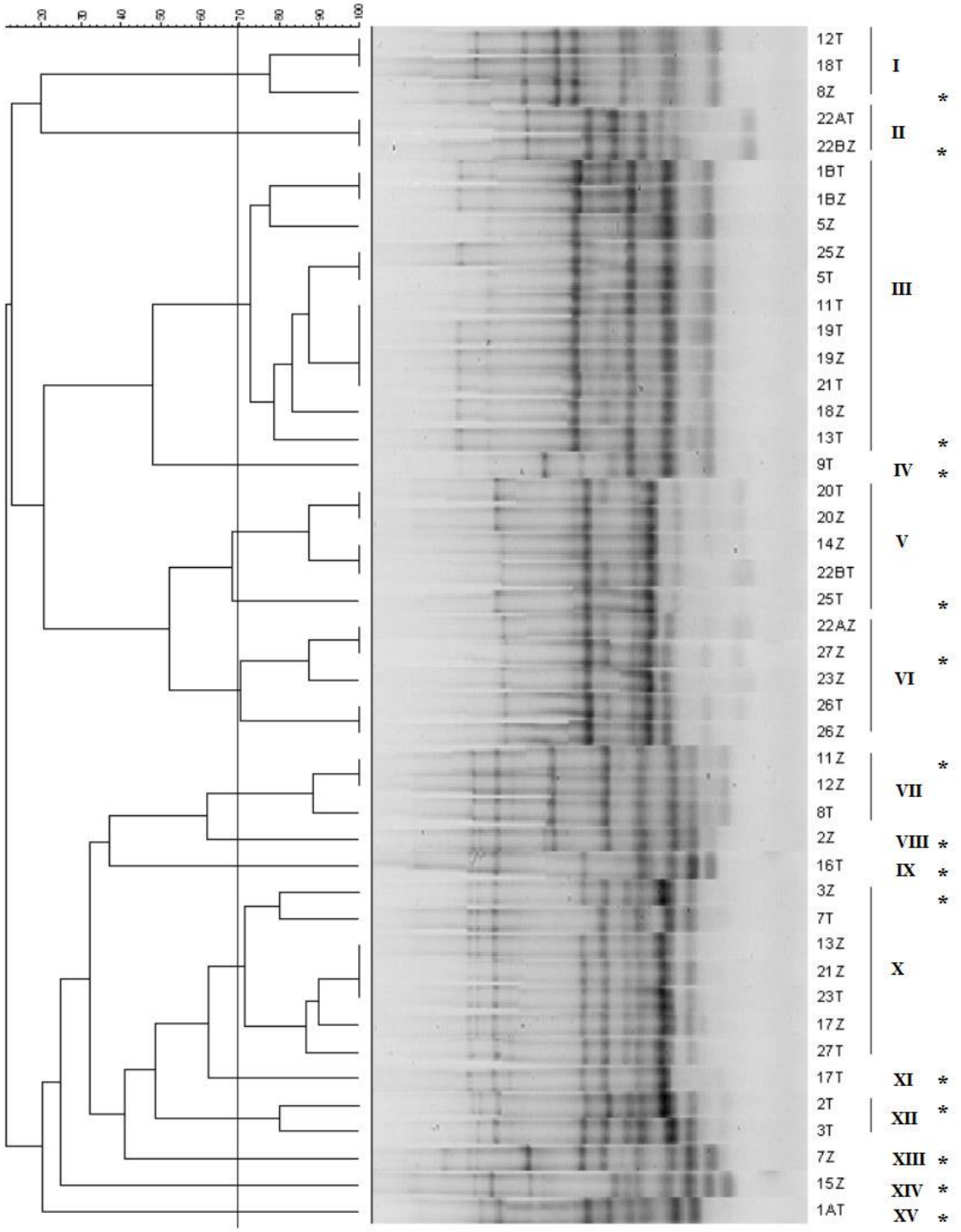
Dobiveni RAPD profili međusobno su se razlikovali u broju i veličini polimorfnih fragmenata što je prikazano u obliku dendrogramu na slici 17. Ovi rezultati ukazuju na visoku raznolikost između sojeva.

Najveća skupina izolata je pod brojem III koja uključuje 11 sojeva izoliranih iz različitih uzoraka tala, skupina X uključuje sedam izolata, skupine V i VI po pet izolata dok su neki RAPD profili predstavljeni sa samo jednim sojem te ih nazivamo linije.

Iz svake skupine te za linije, odabran je po jedan reprezentativan soj za daljnju identifikaciju temeljem analize gena što je prikazano u tablici 24.

Tablica 24. Sojevi grupirani prema sličnosti RAPD profila i sojevi odabrani za analizu gena.

RADP skupina/linija	Sojevi	Reprezentativni soj
I	8Z, 12T, 18T	8Z
II	22AT, 22BZ	22BZ
III	1BT, 1BZ, 5Z, 5T, 11T, 13T, 18Z, 19T, 19Z, 21T, 25Z	13T
IV	9T	9T
V	14Z, 20T, 20Z, 22BT, 25T	25T
VI	22AZ, 23Z, 26T, 26Z, 27Z	26T
VII	8T, 11Z, 12Z	11Z
VIII	2Z	2Z
IX	16T	16T
X	3Z, 7T, 13Z, 17Z, 21Z, 23T, 27T	3Z
XI	17T	17T
XII	2T, 3T	2T
XIII	7Z	7Z
XIV	15Z	15Z
XV	1AT	1AT



Slika 17. RAPD profili dobiveni korištenjem početnice M13 i označene skupine sojeva (sličnost < 70 %).

4.3.3. Analiza sekvenci 16S rRNA (*rrs*) gena

Tri osnovna konstitucijska gena (*rrs*, *atpD* i *recA*) reprezentativnih izolata, analizirana su sekvenciranjem i daljnjom obradom podataka.

Nakon usporedbe dobivenih sekvenci *rrs* gena 15 izolata sa poznatim sekvencama iz Genbank, dobiveni su rezultati koji pokazuju da svi istraživani izolati pripadaju rodu *Rhizobium*, a najveći broj je onih čiji su najbliži srodnici vrste iz filogenetske skupine *R. leguminosarum*.

Prema matrici udaljenosti reprezentativni sojevi 1AT, 2T, 2Z, 3Z, 7Z, 11Z, 15Z, 16T, 17T, 25T i 26T pokazuju 100 % sličnosti sa tipskim sojevima vrsta *R. leguminosarum* i *R. hidalgonense* (tablica 25).

Sličnost soja 8Z sa nekim vrstama iz ove filogenetske skupine je viša od 99 %, a manja od 100 % te on tvori izdvojenu granu na filogenetskom stablu (slika 18).

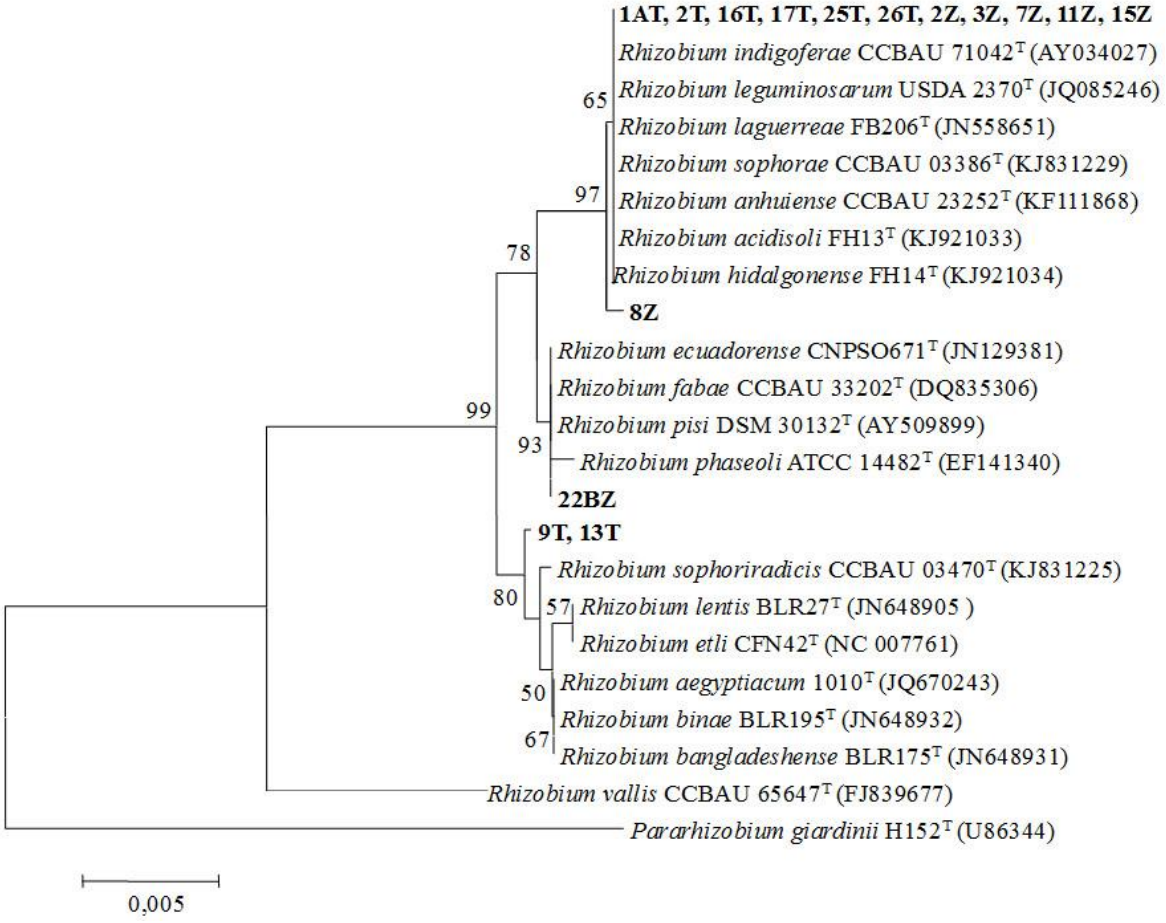
Soj 22BZ je 100 % sličan vrstama *R. pisi* i *R.ecuadorense* čiji su *rrs* geni također 100 % slični.

Sojevi 9T i 13T (RAPD grupa III I linija IV) bliske su vrstama iz filogenetskih skupine *R. etli* i *R. phaseoli*, međutim, i ove skupine sadrže vrste koje nije moguće razlikovati samo temeljem analize *rrs* gena.

Ovi rezultati potvrdili su da sojeve iz skupina koje su filogenetski bliske *R. leguminosarum* nije moguće razlikovati temeljem analize sekvenci *rrs* gena pa su dalje analizirani drugi konstitucijski geni.

Tablica 25. Matrica udaljenosti istraživanih sojeva i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *rrs* gena.

	Pararhizobium giardinii	R. vallis	8z	2T	26T	7Z	16T	11Z	1AT	3Z	25T	15Z	2Z	R. leguminosaru	R. laguerreae	R. anhuiense	17T	R. indigoferae	R. hidalgonense	R. acidisoli	R. sophorae	R. sophoriradicis	R. phaseoli	22BZ	R. pisi	R. ecuadorense	R. fabae	9T	13T	R. aegyptiacum	R. binae	R. bangladeshen	R. lentis	R. etli
Pararhizobium giardinii		95,5	96,54	96,62	96,62	96,62	96,61	96,62	96,62	96,62	96,62	96,62	96,62	96,73	96,73	96,72	96,55	96,37	96,31	96,31	96,35	96,17	95,85	96,39	96,53	96,59	96,22	96,41	96,41	96,29	96,38	96,38	96,38	96,39
R. vallis	95,5		97,83	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,76	97,72	97,64	97,62	97,62	97,65	98,45	98,26	98,41	98,41	98,22	98,3	98,48	98,48	98,55	98,55	98,55	98,41	98,48
8z	96,54	97,83		99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,85	99,92	99,92	99,92	99,12	99,3	99,29	99,3	99,6	99,26	99,08	99,08	99,15	99,15	99,15	99,08	99,08
2T	96,62	97,76	99,93		100	100	100	100	100	100	100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
26T	96,62	97,76	99,93	100		100	100	100	100	100	100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
7Z	96,62	97,76	99,93	100	100		100	100	100	100	100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
16T	96,61	97,76	99,93	100	100	100		100	100	100	100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,36	99,37	99,68	99,33	99,15	99,15	99,08	99,08	99,08	99,01	99,01
11Z	96,62	97,76	99,93	100	100	100	100		100	100	100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
1AT	96,62	97,76	99,93	100	100	100	100	100		100	100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
3Z	96,62	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100		100	100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
25T	96,62	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100	100		100	100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
15Z	96,62	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100	100	100		100	**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
2Z	96,62	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100	100	100	100		**100**	100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	99,37	99,37	99,37	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,09	99,09	99,02	99,02
R. leguminosarum	96,73	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	99,93	100	100	100	99,04	98,64	99,37	99,39	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,12	99,12	99,05	98,92
R. laguerreae	96,73	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	99,93	100	100	100	99,04	98,64	99,37	99,39	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,12	99,12	99,05	98,92
R. anhuiense	96,72	97,76	99,93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	99,93	100	100	100	99,04	98,71	99,37	99,39	99,68	99,33	99,16	99,16	99,09	99,12	99,12	99,05	99,05
17T	96,55	97,72	99,93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	99,12	99,35	99,35	99,35	99,68	99,33	99,14	99,14	99,07	99,07	99,07	99	99
R. indigoferae	96,37	97,64	99,85	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	100		100	100	100	99,11	99,26	99,26	99,26	99,68	99,33	99,04	99,04	98,97	98,97	98,97	98,89	98,89
R. hidalgonense	96,31	97,62	99,92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	99,08	99,31	99,31	99,31	99,67	99,31	99,08	99,08	99	99	99	98,93	98,93
R. acidisoli	96,31	97,62	99,92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	99,08	99,31	99,31	99,31	99,67	99,31	99,08	99,08	99	99	99	98,93	98,93
R. sophorae	96,35	97,65	99,92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		99,09	99,32	99,32	99,32	99,67	99,32	99,09	99,09	99,02	99,02	99,02	98,94	98,94
R. sophoriradicis	96,17	98,45	99,12	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,04	99,12	99,11	99,08	99,08	99,09		99,56	99,56	99,56	99,68	99,63	99,78	99,78	99,71	99,71	99,71	99,78	99,78
R. phaseoli	95,85	98,26	99,3	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	98,64	98,64	98,71	99,35	99,26	99,31	99,31	99,32	99,56		99,86	99,12	99,92	99,85	99,65	99,65	99,09	98,91	98,91	98,84	98,65
22BZ	96,39	98,41	99,29	99,37	99,37	99,37	99,36	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,35	99,26	99,31	99,31	99,32	99,56	99,86		100	100	99,93	99,79	99,79	99,72	99,72	99,72	99,58	99,65
R. pisi	96,53	98,41	99,3	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,37	99,39	99,39	99,39	99,35	99,26	99,31	99,31	99,32	99,56	99,12	100		100	99,93	99,79	99,79	99,72	99,73	99,73	99,59	99,53
R. ecuadorense	96,59	98,22	99,6	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,68	99,67	99,67	99,67	99,68	99,92	100	100		100	99,76	99,76	99,68	99,68	99,68	99,6	99,6
R. fabae	96,22	98,3	99,26	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,33	99,31	99,31	99,32	99,63	99,85	99,93	99,93	100		99,7	99,7	99,63	99,63	99,63	99,63	99,56
9T	96,41	98,48	99,08	99,16	99,16	99,16	99,15	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,14	99,04	99,08	99,08	99,09	99,78	99,65	99,79	99,79	99,76	99,7		100	99,79	99,79	99,79	99,79	99,86
13T	96,41	98,48	99,08	99,16	99,16	99,16	99,15	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,16	99,14	99,04	99,08	99,08	99,09	99,78	99,65	99,79	99,79	99,76	99,7	100		99,79	99,79	99,79	99,79	99,86
R. aegyptiacum	96,29	98,55	99,15	99,09	99,09	99,09	99,08	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,07	98,97	99	99	99,02	99,71	99,09	99,72	99,72	99,68	99,63	99,79	99,79		100	100	99,86	99,93
R. binae	96,38	98,55	99,15	99,09	99,09	99,09	99,08	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,12	99,12	99,12	99,07	98,97	99	99	99,02	99,71	98,91	99,72	99,73	99,68	99,63	99,79	99,79	100		100	99,86	99,93
R. bangladeshense	96,38	98,55	99,15	99,09	99,09	99,09	99,08	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,09	99,12	99,12	99,12	99,07	98,97	99	99	99,02	99,71	98,91	99,72	99,73	99,68	99,63	99,79	99,79	100	100		99,86	99,93
R. lentis	96,38	98,41	99,08	99,02	99,02	99,02	99,01	99,02	99,02	99,02	99,02	99,02	99,02	99,05	99,05	99,05	99	98,89	98,93	98,93	98,94	99,78	98,84	99,58	99,59	99,6	99,63	99,79	99,79	99,86	99,86	99,86		99,93
R. etli	96,39	98,48	99,08	99,02	99,02	99,02	99,01	99,02	99,02	99,02	99,02	99,02	99,02	98,92	98,92	99,05	99	98,89	98,93	98,93	98,94	99,78	98,65	99,65	99,53	99,6	99,56	99,86	99,86	99,93	99,93	99,93	99,93	



Slika 18. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu sekvenci *rrs* gena.

4.3.4. Analiza sekvenci *atpD* i *recA* gena

S obzirom da rezultati o filogenetskoj poziciji nekih sojeva mogu ovisiti o pojedinom analiziranom genu, pretpostavlja se da je točnije i jednostavnije zaključiti pripada li soj nekoj vrsti temeljem zajedničke analize *atpD* i *recA* gena.

Rezultati takve analize pokazuju da su istraživani sojevi grupirani slično kao nakon analize *rrs* gena. Devet sojeva (1AT, 2T, 2Z, 3Z, 7Z, 11Z, 15Z, 16T i 17T) pripada *R. leguminosarum* sa više od 98 % sličnosti tipskom soju *R.leguminosarum* USDA 2370^{T} (AJ294376, AJ294405) (tablica 26). Preostala dva soja koja su prema analizi *rrs* gena također pripadala filogenetskoj skupini *R. leguminosarum* (sojevi 25T i 26T) na temelju ove analize možemo identificirati kao *R. hidalgonense.* Utvrđena sličnost sojeva 25T i 26T sa ovom nedavno opisanom vrstom bila je viša od 99 %.

Soj 8Z (RAPD grupa I) nakon analize *atpD* i *recA* gena tvori nezavisnu skupinu koja je najbliža vrsti *R. ecuadorense*. Međutim, sličnost između ovog soja i navedene vrste iznosi manje od 97 % što znači da izolati iz ove RAPD grupe (8Z, 12T i 18T) vjerojatno predstavljaju novu vrstu unutar roda *Rhizobium*.

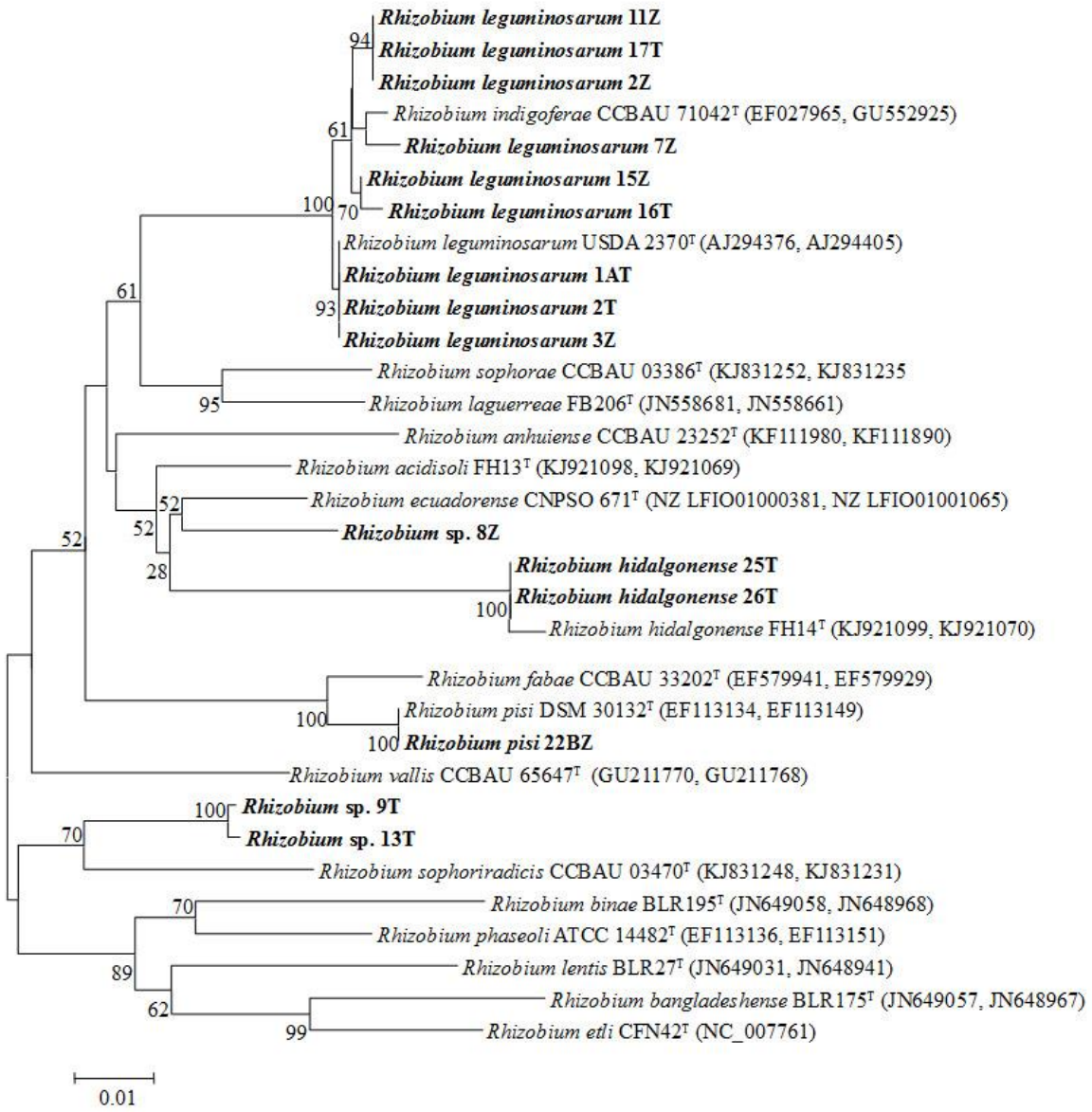
Sekvence gena *atpD* i *recA* soja 22BZ 99 % su slični istim genima vrste *R. pisi*. S obzirom na ovaj postotak sličnosti, predstavnici grupe 22BZ (22AT i 22BZ) identificirani su kao *R. pisi*.

Kao i kod analize *rrs* gena, sojevi 9T i 13T tvorili su zasebnu skupinu nakon analize *recA* i *atpD* gena. Ova linija je najbliže povazana sa vrstom *R. sophoriradicis*, no sličnost je u oba slučaja 95,35 % što je manje od 98 % dovoljnih za razgraničenje vrsta (tablica 26, slika 19).

U tablici 27 prikazani su rezultati identifikacije izolata dobiveni na osnovu primijenjenih metoda MALDI-TOF MS i sekvenciranje konstitucijskih gena.

Tablica 26. Matrica udaljenosti istraživanih sojeva i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *atpD* i *recA* gena.

	R. lentis	R. bangladeshense	R. etli	R. vallis	R. sophoriradicis	9T	13T	R. binae	R. phaseoli	R. fabae	R. Pisi	22BZ	R. anhuiense	R. sophorae	R. laguerreae	R. Hidalgonense	25T	26T	11Z	17T	2Z	1AT	3Z	R. leguminosarum	2T	15Z	16T	R. indigoferae	7Z	R. acidisoli	R. ecuadorense	8z
R. lentis		92.45	93.99	90.82	91.79	91.52	91.52	92.93	93.40	91.41	91.52	91.52	91.18	91.38	90.86	90.33	91.28	91.28	90.58	90.58	90.43	90.94	91.10	90.99	91.17	90.88	90.54	90.72	90.93	91.97	91.52	91.99
R. bangladeshense	92.45		95.17	89.95	88.92	89.86	89.74	91.86	91.16	90.64	91.27	91.27	90.03	89.47	89.00	89.95	90.57	90.57	89.50	89.50	89.35	89.71	89.88	89.76	89.86	89.56	89.54	89.40	89.62	90.32	90.45	91.16
R. etli	93.99	95.17		91.19	90.42	91.39	91.29	92.34	91.77	91.28	91.70	91.63	91.57	90.29	89.88	90.98	91.45	91.67	90.95	90.92	90.73	91.08	91.23	90.99	91.40	90.90	90.82	90.35	91.27	91.21	91.96	91.64
R. vallis	90.82	89.95	91.19		92.89	95.17	94.74	90.69	91.80	92.04	91.68	91.68	92.08	92.34	92.70	92.25	92.57	92.57	92.90	93.00	92.68	93.15	93.27	93.19	93.44	92.76	92.48	92.88	93.07	93.63	92.78	92.41
R. sophoriradicis	91.79	88.92	90.42	92.89		95.35	95.35	91.79	93.71	91.79	92.07	92.07	92.20	93.02	92.48	91.24	91.66	91.66	91.66	91.66	91.66	92.20	92.20	92.20	92.20	91.93	91.66	91.79	92.07	92.75	92.48	92.89
9T	91.52	89.86	91.39	95.17	95.35		99.77	93.40	94.58	92.07	91.73	91.73	92.34	92.34	91.48	91.11	91.85	91.85	93.23	93.23	93.09	93.43	93.42	93.46	93.57	92.94	92.81	92.79	93.46	92.87	93.00	92.65
13T	91.52	89.74	91.29	94.74	95.35	99.77		93.17	93.69	91.91	91.97	91.85	92.34	92.34	91.48	90.98	92.09	92.09	93.52	93.44	93.27	93.71	93.70	93.57	93.74	93.23	93.11	92.73	93.74	92.87	92.80	92.75
R. binae	92.93	91.86	92.34	90.69	91.79	93.40	93.17		94.70	91.54	91.52	91.52	91.05	90.15	89.51	89.57	90.11	90.11	89.99	89.99	89.83	90.21	90.37	90.26	90.46	89.93	89.68	89.88	89.99	91.59	91.28	91.40
R. phaseoli	93.40	91.16	91.77	91.80	93.71	94.58	93.69	94.70		91.91	91.47	91.67	92.34	91.52	90.25	90.98	91.58	91.58	90.37	90.95	90.75	91.24	91.38	91.28	91.58	91.05	90.72	90.94	91.12	92.61	91.21	91.53
R. fabae	91.41	90.64	91.28	92.04	91.79	92.07	91.91	91.54	91.91		97.85	97.85	93.34	92.48	93.12	91.68	92.07	92.07	92.41	92.39	92.18	92.65	92.78	92.69	92.97	92.26	91.95	92.40	92.71	93.07	92.54	92.29
R. pisi	91.52	91.27	91.70	91.68	92.07	91.73	91.97	91.52	91.47	97.85		99.89	93.10	92.89	93.83	91.74	93.01	92.98	93.51	93.44	93.27	93.82	93.93	93.68	93.85	93.34	93.23	92.85	93.78	93.38	93.32	93.37
22BZ	91.52	91.27	91.63	91.68	92.07	91.73	91.85	91.52	91.67	97.85	99.89		93.10	92.89	93.83	91.74	92.88	92.88	93.50	93.48	93.31	93.76	93.86	93.68	93.85	93.27	93.16	92.85	93.66	93.38	93.28	93.46
R. anhuiense	91.18	90.03	91.57	92.08	92.20	92.34	92.34	91.05	92.34	93.34	93.10	93.10		93.71	93.54	92.21	92.59	92.59	93.36	93.36	93.21	93.47	93.59	93.50	93.74	93.56	93.31	93.74	93.87	94.62	94.38	94.51
R. sophorae	91.38	89.47	90.29	92.34	93.02	92.34	92.34	90.15	91.52	92.48	92.89	92.89	93.71		96.44	91.79	92.20	92.20	94.39	94.39	94.39	94.94	94.94	94.94	94.94	94.53	94.25	94.39	94.25	93.84	94.80	93.71
R. laguerreae	90.86	89.00	89.88	92.70	92.48	91.48	91.48	89.51	90.25	93.12	93.83	93.83	93.54	96.44		91.97	92.35	92.35	94.44	94.44	94.44	94.94	94.94	94.94	94.94	94.57	94.57	94.82	94.57	93.98	94.81	93.95
R. hidalgonense	90.33	89.95	90.98	92.25	91.24	91.11	90.98	89.57	90.98	91.68	91.74	91.74	92.21	91.79	91.97		99.62	99.62	91.49	91.49	91.33	91.91	92.06	91.95	91.91	91.55	91.48	91.61	91.74	94.14	94.41	93.65
25T	91.28	90.57	91.45	92.57	91.66	91.85	92.09	90.11	91.58	92.07	93.01	92.88	92.59	92.20	92.35	99.62		100.00	92.87	92.84	92.71	93.25	93.36	93.10	93.30	92.90	92.88	92.31	93.12	94.52	94.91	94.53
26T	91.28	90.57	91.67	92.57	91.66	91.85	92.09	90.11	91.58	92.07	92.98	92.88	92.59	92.20	92.35	99.62	100.00		92.87	92.84	92.71	93.25	93.36	93.10	93.30	92.90	92.88	92.31	93.09	94.52	95.18	94.53
11Z	90.58	89.50	90.95	92.90	91.66	93.23	93.52	89.99	90.37	92.41	93.51	93.50	93.36	94.39	94.44	91.49	92.87	92.87		100.00	99.67	99.54	99.55	99.53	99.44	99.33	99.43	99.05	99.34	94.39	94.72	94.63
17T	90.58	89.50	90.92	93.00	91.66	93.23	93.44	89.99	90.95	92.39	93.44	93.48	93.36	94.39	94.44	91.49	92.84	92.84	100.00		99.67	99.54	99.55	99.53	99.44	99.33	99.43	99.05	99.34	94.39	94.75	94.57
2Z	90.43	89.35	90.73	92.68	91.66	93.09	93.27	89.83	90.75	92.18	93.27	93.31	93.21	94.39	94.44	91.33	92.71	92.71	99.67	99.67		99.54	99.21	99.18	99.10	99.00	99.42	98.67	99.01	94.25	94.59	94.41
1AT	90.94	89.71	91.08	93.15	92.20	93.43	93.71	90.21	91.24	92.65	93.82	93.76	93.47	94.94	94.94	91.91	93.25	93.25	99.54	99.54	99.54		100.00	100.00	100.00	99.54	99.43	99.25	99.20	94.96	95.31	94.79
3Z	91.10	89.88	91.23	93.27	92.20	93.42	93.70	90.37	91.38	92.78	93.93	93.86	93.59	94.94	94.94	92.06	93.36	93.36	99.55	99.55	99.21	100.00		100.00	100.00	99.44	99.43	99.26	99.21	95.05	95.39	94.87
R. leguminosarum	90.99	89.76	90.99	93.19	92.20	93.46	93.57	90.26	91.28	92.69	93.68	93.68	93.50	94.94	94.94	91.95	93.10	93.10	99.53	99.53	99.18	100.00	100.00		100.00	99.65	99.41	99.25	99.18	94.99	95.44	94.81
2T	91.17	89.86	91.40	93.44	92.20	93.57	93.74	90.46	91.58	92.97	93.85	93.85	93.74	94.94	94.94	91.91	93.30	93.30	99.44	99.44	99.10	100.00	100.00	100.00		99.44	99.42	99.28	99.22	95.03	95.42	94.87
15Z	90.88	89.56	90.90	92.76	91.93	92.94	93.23	89.93	91.05	92.26	93.34	93.27	93.56	94.53	94.57	91.55	92.90	92.90	99.33	99.33	99.00	99.54	99.44	99.65	99.44		99.77	99.39	99.11	94.49	94.89	94.60
16T	90.54	89.54	90.82	92.48	91.66	92.81	93.11	89.68	90.72	91.95	93.23	93.16	93.31	94.25	94.57	91.48	92.88	92.88	99.43	99.43	99.42	99.43	99.43	99.41	99.42	99.77		99.37	99.08	94.27	94.72	94.41
R. indigoferae	90.72	89.40	90.35	92.88	91.79	92.79	92.73	89.88	90.94	92.40	92.85	92.85	93.74	94.39	94.82	91.61	92.31	92.31	99.05	99.05	98.67	99.25	99.26	99.25	99.28	99.39	99.37		99.40	94.52	94.52	94.28
7Z	90.93	89.62	91.27	93.07	92.07	93.46	93.74	89.99	91.12	92.71	93.78	93.66	93.87	94.25	94.57	91.74	93.12	93.09	99.34	99.34	99.01	99.20	99.21	99.18	99.22	99.11	99.08	99.40		94.39	95.09	94.76
R. acidisoli	91.97	90.32	91.21	93.63	92.75	92.87	92.87	91.59	92.61	93.07	93.38	93.38	94.62	93.84	93.98	94.14	94.52	94.52	94.39	94.39	94.25	94.96	95.05	94.99	95.03	94.49	94.27	94.52	94.39		96.18	96.31
R. ecuadorense	91.52	90.45	91.96	92.78	92.48	93.00	92.80	91.28	91.21	92.54	93.32	93.28	94.38	94.80	94.81	94.41	94.91	95.18	94.72	94.75	94.59	95.31	95.39	95.44	95.42	94.89	94.72	94.52	95.09	96.18		96.66
8z	91.99	91.16	91.64	92.41	92.89	92.65	92.75	91.40	91.53	92.29	93.37	93.46	94.51	93.71	93.95	93.65	94.53	94.53	94.63	94.57	94.41	94.79	94.87	94.81	94.87	94.60	94.41	94.28	94.76	96.31	96.66	



Slika 19. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu analize sekvenci *atpD* i *recA* gena.

Tablica 27. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija na temelju MALDI-TOF masene spektrometrije te na temelju sekvenciranja *atpD* i *recA* gena.

Soj	RAPD grupa	Identifikacija na temelju MALDI-TOF MS	Identifikacija na temelju sekvenci *atpD* i *recA* gena
1AT	XV	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
2T	XII	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
2Z	VIII	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
3Z	X	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
7Z	XIII	*Rhizobium indigoferae*	*Rhizobium leguminosarum*
8Z	I	*Rhizobium acidisoli*	*Rhizobium* sp.
9T	IV	*Rhizobium phaseoli*	*Rhizobium* sp.
11Z	VII	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
13T	III	*Rhizobium sophoriradicis*	*Rhizobium* sp.
15Z	XIV	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
16T	IX	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
17T	XI	*Rhizobium leguminosarum*	*Rhizobium leguminosarum*
22BZ	II	*Rhizobium pisi*	*Rhizobium pisi*
25T	V	*Rhizobium hidalgonense*	*Rhizobium hidalgonense*
26T	VI	*Rhizobium hidalgonense*	*Rhizobium hidalgonense*

4.3.5. Analiza simbioznog *nodC* gena

Nodulacijski gen *nodC* ključan je za odabir domaćina i najčešće je korišten filogenetski marker za razlikovanje simbiovara. Korišten je u ovom istraživanju kako bismo razlikovali simbiovare identificiranih vrsta.

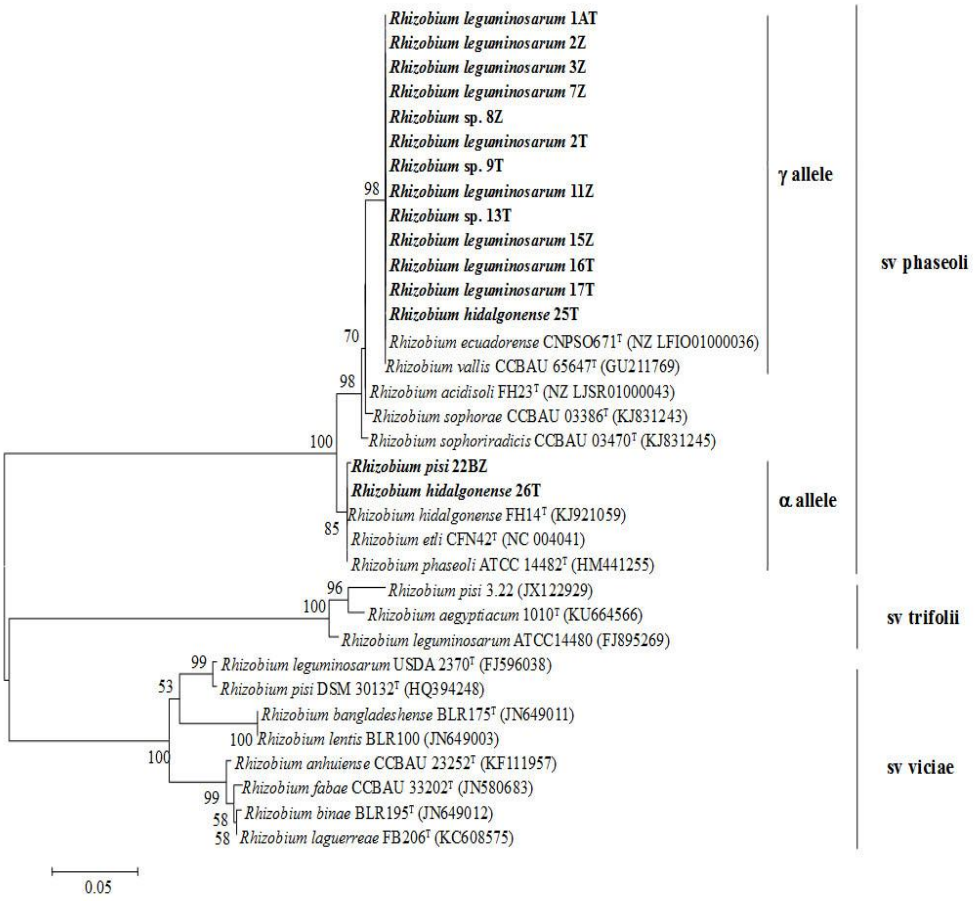
Rezultati analize nodC gena pokazuju da svi izolati pripadaju simbiovaru phaseoli. Sličnost izolata 1AT, 2T, 2Z, 3Z, 7Z, 8Z, 9T, 11Z, 13T 15Z, 16T, 17T i 25T sa tipskim sojevima vrsta *R. ecuadorense* i *R. vallis* iznosi od 99 do 100 % (tablica 28). Kod navedenih vrsta utvrđen je γ alel nodC gena te stoga zaključujemo da i izolati iz ovog istraživanja nose taj alel.

Filogenetsko stablo dobiveno analizom sekvenci *nodC* gena (slika 20) pokazuje da su izolati 22BZ (*R. pisi*) i 26T (*R. hidalgonense*) najsrodniji tipskim sojevima vrsta *R. etli*, *R. phaseoli* i *R. hidalgonense.* Ove vrste nose α alel *nodC* gena.

U ovom istraživanju prvi puta je pronađen simbiovar phaseoli kod vrste *R. pisi*.

Tablica 28. Matrica udaljenosti istraživanih sojeva i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *nodC* gena.

	22BZ	R. etli	R. phaseoli	26T	R. hidalgonense	13T	25T	R. vallis	2Z	R. ecuadorense	16T	15Z	9T	8Z	1AT	3Z	7Z	2T	11Z	17T	R. sophoriradicis	R. acidisoli	R. sophorae	R.pisi bv. trifolii	R. aegyptiacum	R. bangladeshense	R. lentis	R. binae	R. laguerreae	R. fabae	R. anhuiense	R. pisi
22BZ		99.88	99.65	99.77	99.82	94.33	96.59	96.38	96.61	96.77	96.77	96.77	96.77	96.77	96.77	96.71	96.77	96.77	96.57	96.76	96.57	97.35	96.95	68.86	69.36	72.07	73.53	73.78	71.65	74.71	72.80	71.38
R. etli	99.88		99.54	99.88	100.00	92.99	96.71	95.96	96.70	97.00	96.89	96.50	96.90	96.91	96.90	96.85	96.89	96.92	96.70	96.88	96.76	97.22	97.14	63.78	69.27	72.07	73.53	73.78	71.26	75.00	72.80	71.38
R. phaseoli	99.65	99.54		100.00	100.00	92.69	96.53	96.64	96.18	96.32	96.32	96.32	96.32	96.32	96.32	96.71	96.32	96.32	96.45	96.59	96.76	96.89	97.14	68.01	69.15	71.95	73.39	73.63	70.44	74.96	72.80	71.25
26T	99.77	99.88	100.00		100.00	94.37	96.59	96.71	96.58	96.73	96.73	96.73	96.73	96.73	96.73	96.71	96.73	96.73	96.55	96.73	96.76	97.31	97.14	69.04	69.41	71.95	73.39	73.63	71.60	74.63	72.80	71.25
R. hidalgonense	99.82	100.00	100.00	100.00		96.63	96.27	96.72	96.58	96.63	96.63	96.63	96.63	96.63	96.63	96.58	96.63	96.63	96.34	96.63	96.73	97.52	97.12	69.15	69.30	72.73	72.73	73.31	73.45	73.05	72.80	73.67
13T	94.33	92.99	92.69	94.37	96.63		99.75	99.82	95.17	95.75	95.73	95.74	95.75	95.74	95.74	96.89	95.74	95.74	96.99	97.15	97.71	94.83	98.48	65.29	66.30	70.17	72.69	72.44	68.76	73.38	71.23	69.75
25T	96.59	96.71	96.53	96.59	96.27	99.75		99.63	100.00	99.75	99.75	99.75	99.75	99.75	99.75	100.00	99.75	99.75	99.73	99.75	97.33	98.74	98.10	67.64	67.88	72.21	72.41	72.15	71.67	72.82	70.84	71.83
R. vallis	96.38	95.96	96.64	96.71	96.72	99.82	99.63		100.00	99.12	99.82	99.82	99.82	99.82	99.82	100.00	99.82	99.82	100.00	100.00	97.62	97.89	98.41	67.54	67.05	71.06	71.06	71.06	71.26	71.25	71.23	72.07
2Z	96.61	96.70	96.18	96.58	96.58	95.17	100.00	100.00		99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	99.87	98.31	98.98	98.52	66.75	68.18	71.98	73.38	73.32	70.81	74.41	72.08	71.35
R. ecuadorense	96.77	97.00	96.32	96.73	96.63	95.75	99.75	99.12	99.87		100.00	99.56	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	97.71	98.50	98.48	63.00	67.73	71.57	72.69	72.44	70.68	73.55	71.23	71.01
16T	96.77	96.89	96.32	96.73	96.63	95.73	99.75	99.82	99.87	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	97.71	99.00	98.48	66.96	67.73	71.57	72.69	72.44	70.62	73.25	71.23	71.01
15Z	96.77	96.50	96.32	96.73	96.63	95.74	99.75	99.82	99.87	99.56	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	97.71	98.58	98.48	67.10	67.73	71.57	72.69	72.44	70.68	73.29	71.23	71.01
9T	96.77	96.90	96.32	96.73	96.63	95.75	99.75	99.82	99.87	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	97.71	99.00	98.48	67.00	67.73	71.57	72.69	72.44	70.65	73.38	71.23	71.01
8Z	96.77	96.91	96.32	96.73	96.63	95.74	99.75	99.82	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	97.71	99.01	98.48	67.18	67.73	71.57	72.69	72.44	70.68	73.29	71.23	71.01
1AT	96.77	96.90	96.32	96.73	96.63	95.74	99.75	99.82	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	97.71	99.00	98.48	67.04	67.73	71.57	72.69	72.44	70.68	73.33	71.23	71.01
3Z	96.71	96.85	96.71	96.71	96.58	96.89	100.00	100.00	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	98.31	99.08	98.52	67.54	68.46	72.11	73.38	73.32	71.62	74.41	72.08	71.48
7Z	96.77	96.89	96.32	96.73	96.63	95.74	99.75	99.82	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	97.71	99.00	98.48	66.89	67.73	71.57	72.69	72.44	70.58	73.33	71.23	71.01
2T	96.77	96.92	96.32	96.73	96.63	95.74	99.75	99.82	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	97.71	99.01	98.48	67.22	67.73	71.57	72.69	72.44	70.68	73.33	71.23	71.01
11Z	96.57	96.70	96.45	96.55	96.34	96.99	99.73	100.00	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	97.71	99.02	98.47	66.87	67.73	71.57	72.69	72.44	71.03	73.36	71.11	71.06
17T	96.76	96.88	96.59	96.73	96.63	97.15	99.75	100.00	99.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		97.71	98.96	98.48	67.25	67.73	71.57	72.69	72.44	70.96	73.07	71.23	71.01
R. sophoriradicis	96.57	96.76	96.76	96.76	96.73	97.71	97.33	97.62	98.31	97.71	97.71	97.71	97.71	97.71	97.71	98.31	97.71	97.71	97.71	97.71		98.86	98.48	67.43	68.00	72.03	72.03	72.41	72.57	72.76	71.98	72.95
R. acidisoli	97.35	97.22	96.89	97.31	97.52	94.83	98.74	97.89	98.98	98.50	99.00	98.58	99.00	99.01	99.00	99.08	99.00	99.01	99.02	98.96	98.86		99.62	63.00	68.32	71.57	72.83	73.04	70.92	74.35	72.21	71.01
R. sophorae	96.95	97.14	97.14	97.14	97.12	98.48	98.10	98.41	98.52	98.48	98.48	98.48	98.48	98.48	98.48	98.52	98.48	98.48	98.47	98.48	98.48	99.62		67.43	68.00	72.22	72.22	72.61	72.76	72.57	71.78	73.14
R.pisi bv. trifolii	68.86	63.78	68.01	69.04	69.15	65.29	67.64	67.54	66.75	63.00	66.96	67.10	67.00	67.18	67.04	67.54	66.89	67.22	66.87	67.25	67.43	63.00	67.43		96.57	74.31	74.65	74.37	74.74	74.68	72.99	75.52
R. aegyptiacum	69.36	69.27	69.15	69.41	69.30	66.30	67.88	67.05	68.18	67.73	67.73	67.73	67.73	67.73	67.73	68.46	67.73	67.73	67.73	67.73	68.00	68.32	68.00	96.57		74.44	74.51	73.93	74.19	73.98	72.60	75.64
R. bangladeshense	72.07	72.07	71.95	71.95	72.73	70.17	72.21	71.06	71.98	71.57	71.57	71.57	71.57	71.57	71.57	72.11	71.57	71.57	71.57	71.57	72.03	71.57	72.22	74.31	74.44		100.00	91.70	92.14	91.80	91.15	93.89
R. lentis	73.53	73.53	73.39	73.39	72.73	72.69	72.41	71.06	73.38	72.69	72.69	72.69	72.69	72.69	72.69	73.38	72.69	72.69	72.69	72.69	72.03	72.83	72.22	74.65	74.51	100.00		91.70	91.88	91.80	91.15	93.70
R. binae	73.78	73.78	73.63	73.63	73.31	72.44	72.15	71.06	73.32	72.44	72.44	72.44	72.44	72.44	72.44	73.32	72.44	72.44	72.44	72.44	72.41	73.04	72.61	74.37	73.93	91.70	91.70		99.85	98.93	98.15	94.67
R. laguerreae	71.65	71.26	70.44	71.60	73.45	68.76	71.67	71.26	70.81	70.68	70.62	70.68	70.65	70.68	70.68	71.62	70.58	70.68	71.03	70.96	72.57	70.92	72.76	74.74	74.19	92.14	91.88	99.85		98.78	98.00	95.01
R. fabae	74.71	75.00	74.96	74.63	73.05	73.38	72.82	71.25	74.41	73.55	73.25	73.29	73.38	73.29	73.33	74.41	73.33	73.33	73.36	73.07	72.76	74.35	72.57	74.68	73.98	91.80	91.80	98.93	98.78		99.41	94.93
R. anhuiense	72.80	72.80	72.80	72.80	72.80	71.23	70.84	71.23	72.08	71.23	71.23	71.23	71.23	71.23	71.23	72.08	71.23	71.23	71.11	71.23	71.98	72.21	71.78	72.99	72.60	91.15	91.15	98.15	98.00	99.41		94.57
R. pisi	71.38	71.38	71.25	71.25	73.67	69.75	71.83	72.07	71.35	71.01	71.01	71.01	71.01	71.01	71.01	71.48	71.01	71.01	71.06	71.01	72.95	71.01	73.14	75.52	75.64	93.89	93.70	94.67	95.01	94.93	94.57	



Slika 20. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu analize sekvenci *nodC* gena.

4.4. Fenotipska karakterizacija izolata

Fenotipski testovi su neophodni za karakterizaciju i selekciju rizobija te za uvid u mogućnost njihove prilagodbe na nepovoljne uvjete okoliša.

Ispitivanjenjem rasta na različitim temperaturama utvrđena je znatna raznolikost rizobija. Niti jedan soj nije rastao na temperaturi od 4°C. Nekoliko sojeva toleriralo je sve ostale ispitivane temperature (10°C, 37°C, 42°C). To su sojevi 1AT, 2Z, 3Z i 7T koji pripadaju vrsti *R. leguminosarum* te 8Z i 18T koji predstavljaju potencijalne nove vrste.
Sojevi 12T, 15Z, 16T, 20T, 22AZ, 22BT, 26Z, 26T, 27Z i 27T su najosjetljiviji na promjene temperature jer nisu rasli ni na jednoj od ispitivanih temperatura višoj ili nižoj od optimuma. Ovi sojevi pripadaju različitim vrstama i izolirani su iz tala različitih lokacija. Rezultati ispitivanja rasta izolata na pojedinim temperaturama prikazani su u tablici 29.

Sadržaj NaCl-a u standardnim YMA hranjivim podlogama za uzgoj rizobija iznosi 0, 01 %. Izolati su testirani na sposobnost rasta u znatno većim koncentracijama soli (0,5 % 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 % i 3 %). Niti jedan izolat nije rastao na koncentracijama 3 % i 2,5 % dok su samo izolati 1AT, 2Z i 3Z, koji pripadaju vrsti *R. leguminosarum*, rasli pri koncentraciji 2 % i 1,5 %. Ova tri izolata i još nekoliko njih (7T, 12T, 20Z 20T i 22BZ) iskazivalo je slab ili dobar rast pri 0,5 % i 1 % NaCl (Tablica 29).

Optimalni pH za rast rizobija je 6–7, a u ovom istraživanju ispitivan je rast izolata na pH vrijednostima 4, 5, 6, 8 i 9. Na pH 4 uočen je tek slab rast tri izolata (1BT, 15Z i 21T). Nije uočena povezanost sposobnosti rasta ovih izolata na niskom pH u laboratorijskim uvjetima sa reakcijom tla iz kojih su izolirani. Izolat 1BT i 21T izolirani su iz tala neutralne reakcije, a 15Z iz tla slabo kisele reakcije. Na vrijednostima pH 6 i 8, što je blizu optimumu svi sojevi dobro su rasli. Dobar rast većine sojeva uočen je i na ostalim ispitivanim pH vrijednostima, s tim da sojevi 5Z, 13T i 21Z nisu rasli na kiselom mediju (pH 5), a izolati 1BZ, 8T, 22BT i 22BZ nisu rasli na alkalnom mediju (pH 9).

Prema pojavama različitih veličina zona oko diskova s antibioticima može se zaključiti da su ispitivani sojevi najmanje osjetljivi na ampicilin. U prisustvu koncentracije 10 µg/disku ovog antibiotika nisu rasli sojevi 11Z i 12Z, 16 izolata je pokazivalo slab rast i 28 je dobro raslo. Nešto manja otpornost uočena je za streptomicin, zatim za kanamicin, dok su ispitivani izolati najosjetljiviji na eritromicin.

Između izolata može se izdvojiti nekoliko njih koji općenito pokazuju bolju otpornost na antibiotike jer su rasli do minimalnih zona oko diskova. To su izolati 1BZ, 1BT, 5Z, 5T, 7Z, 9T, 11T, 12T, 13T, 18Z,19Z, 19T i 22BZ. Rezultati su prikazani u tablici 30.

Svi izolati iskorištavali su manitol, saharozu, glukozu, maltozu, rafinozu, arabinozu, galaktozu i fruktozu kao izvore ugljika što je bilo vidljivo iz njihovog rasta na hranjivim podlogama koje sadrže navedene šećere. Sojevi 1AT, 1BZ, 12T, 19Z i 19T nisu rasli u prisutnosti laktoze, a 5Z i 5T su slabo rasli u prisustvu tog disaharida (tablica 30).

Tablica 29. Rezultati ispitivanja rasta sojeva na različitim temperaturama, pH vrijednostima te sadržaju NaCl.

	NaCl						Temperature				pH				
	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%	4	10	37	42	4	5	6	8	9
1 AT	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
1 BZ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
1 BT	-	-	-	-	-	-	-	s	+	+	s	+	+	+	+
2 Z	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
2 T	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
3 Z	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
3 T	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
5 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
5 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
7 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
7 T	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
8 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
8 T	-	-	-	-	-	-	-	+	s	s	-	+	+	+	-
9 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
11 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	s	s	-	+	+	+	+
11 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
12 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	s	s	-	+	+	+	+
12 T	+	s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
13 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
13 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
14 Z	s	-	-	-	-	-	-	-	s	+	-	+	+	+	+
15 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	s	+	+	+	+
16 T	-	-	-	-	-	-	-	s	-	-	-	+	+	+	+
17 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
17 T	-	-	-	-	-	-	-	+	s	s	-	+	+	+	+
18 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
18 T	s	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
19 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
19 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
20 Z	s	s	-	-	-	-	-	s	+	+	-	+	+	+	+
20 T	s	s	-	-	-	-	-	s	s	s	-	+	+	+	+
21 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
21 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	s	+	+	+	+
22 AT	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
22 AZ	-	-	-	-	-	-	-	s	s	s	-	+	+	+	+
22 BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
22 BZ	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
23 Z	-	-	-	-	-	-	-	+	s	s	-	+	+	+	+
23 T	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
25 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
25 T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
26 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
26 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
27 Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
27 T	-	-	-	-	-	-	-	s	-	-	-	+	+	+	+
3622	-	-	-	-	-	-	-	+	s	s	-	+	+	+	+

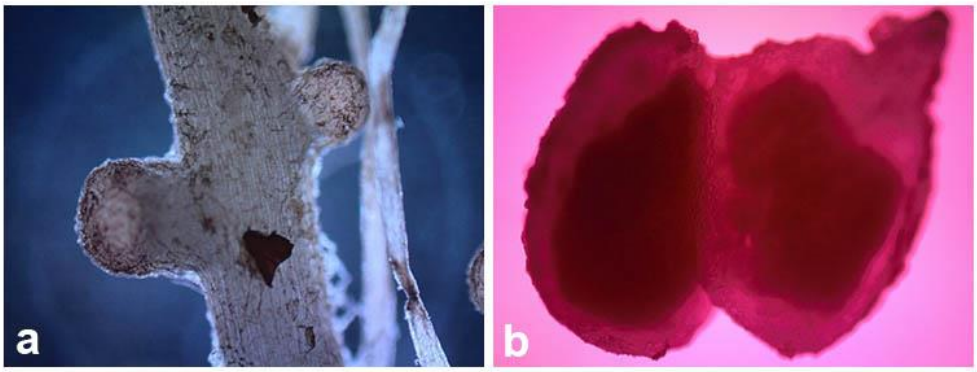
Tablica 30. Rezultati ispitivanja prirodne otpornosti na antibiotike te na iskorištavanje različitih izvora ugljika.

	Antibiotici				Šećeri								
	streptomicin	eritromicin	ampicilin	kanamicin	manitol	saharoza	glukoza	maltoza	rafinoza	arabinoza	galaktoza	fruktoza	laktoza
1 AT	s	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1 BZ	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1 BT	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 Z	s	-	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 T	+	-	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 Z	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 T	+	-	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 Z	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s
5 T	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s
7 Z	s	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 T	+	-	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 Z	+	-	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 T	+	-	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9 T	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 Z	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 T	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 Z	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 T	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13 Z	+	-	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13 T	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 Z	s	-	s	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 Z	s	-	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 T	s	-	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17 Z	s	-	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17 T	s	-	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18 Z	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18 T	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19 Z	s	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19 T	s	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20 Z	s	-	s	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20 T	s	s	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21 Z	+	-	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21 T	s	s	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22 AT	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22 AZ	s	s	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22 BT	s	-	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22 BZ	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23 Z	s	s	s	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23 T	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 Z	s	-	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 T	s	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26 Z	s	-	s	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26 T	s	s	s	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27 Z	s	s	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27 T	s	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3622	s	-	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.5. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija

U vegetacijskom pokusu procijenjena je simbiozna učinkovitost 15 reprezentativnih autohtonih sojeva rizobija, jednog referentnog soja, negativne kontrole (bez bakterizacije) i pozitivne kontrole (bez bakterizacije sa dodatkom mineralnog dušika). Ovi tretmani ispitivani su na dvije sorte graha, Trešnjevac i Slavonski zeleni.

Uzorci biljnog materijala sakupljeni su u fazi pune cvatnje, a prisutnost leghemoglobina koji daje crvenu boju kvržicama indikacija je njihove aktivnosti (slika 21).



Slika 21. a) Noduli na korijenu graha sorte Trešnjevac 14 dana nakon inokulacije, b) presjek nodula u fazi pune cvatnje (6 tjedana nakon inokulacije). Fotografije dobivene fazno kontrastnim mikroskopom. (Foto: I. Rajnović, 2016).

Određivana su sljedeća svojstva: masa suhe tvari kvržica, masa suhe tvari biljaka, te količina ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke. Rezultati analize varijance pokazuju da su utvrđene signifikantne razlike za sva ispitivana svojstva ovisno o primijenjenom soju, sorti i njihovoj interakciji osim za djelovanje sorti na masu suhe tvari kvržica (tablica 31).

Tablica 31. Rezultati analize varijance za ispitivana svojstva. Opravdanost djelovanja faktora i interakcije na ispitivana svojstva uz navedene P vrijednosti.

Izvor varijabilnosti	Masa suhe tvari kvržica	Masa suhe tvari biljke	Količina ukupnog dušika
Soj	<0.0001 (***)	<0.0001 (***)	<0.0001 (***)
Sorta	0.5136 (ns)	<0.0001 (***)	<0.0001 (***)
Soj x Sorta	0.0218 (*)	0.0318 (*)	0.0059 (**)

* signifikantno na razini 5%; *** signifikantno na razini 0,1%; ns – nije signifikantno

4.5.1. Masa suhe tvari kvržica

Statističkom obradom podataka o masi suhe tvari kvržica po biljci utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva i interakcije sorte i soja. Djelovanje sorti nije bilo statistički opravdano iako je na sorti Trešnjevac utvrđena nešto veća masa suhe tvari kvržica. U tablici 32 prikazane su prosječne vrijednosti mase suhe tvari kvržica po biljci.

Tablica 32. Masa suhe tvari kvržica (mg/biljci).

Soj		Sorta		Prosjek sojeva	#Sig. (Soj)
		Slav. Zeleni	Trešnjevac		
26T	*R. hidalgonense*	240,00	200,42	220,21	A
22AT	*R. pisi*	188,79	162,78	175,79	AB
20Z	*R. hidalgonense*	146,58	161,17	153,87	BC
3622	referentni soj	119,58	180,00	149,79	BC
9T	*Rhizobium* sp.	131,48	146,48	138,98	BC
1AT	*R. leguminosarum*	149,92	101,63	125,77	BC
17T	*R. leguminosarum*	124,42	115,79	120,11	C
7Z	*R. leguminosarum*	127,51	110,77	119,14	C
3T	*R. leguminosarum*	104,44	130,75	117,60	C
23T	*R. leguminosarum*	124,67	107,83	116,25	C
18T	*Rhizobium* sp.	117,98	111,38	114,68	C
15Z	*R. leguminosarum*	110,36	118,67	114,51	C
2Z	*R. leguminosarum*	115,41	112,16	113,78	C
1BZ	*Rhizobium* sp.	86,11	138,81	112,46	C
16T	*R. leguminosarum*	91,43	122,44	106,94	C
12Z	*R.leguminosarum*	96,98	110,68	103,83	C
	Prosjek sorti:	**115,31**	**118,43**		

Sig. Prosjeci sojeva označeni istim slovom signifikantno se ne razlikuju ($p>0,05$–Tukey's HSD test).

Masa suhe tvari kvržica je svojstvo koje ukazuje na sposobnost nodulacije nekog soja odnosno na njegovu infektivnost. Soj koji je tvorio najveću masu kvržica je 26T (220,21 mg), pripada vrsti *R. hidalgonense* i signifikantno se razlikovao od svih ostalih sojeva osim od soja 22AT (*R. pisi*). Sljedeću grupu su tvorili referentni soj *R. leguminosarum* (3622) te izolati 1AT (*R. leguminosarum*), 20Z (*R. hidalgonense*) i 9T (*Rhizobium* sp.) koji su se prema sposobnosti nodulacije razlikovali od signifikantno boljeg soja 26T te od ostalih ispitivanih sojeva koji su stvorili manju masu kvržica, no bez statističke

opravdanosti. Među njima je i soj 12Z koji je dao prosječno najnižu masu suhe tvari kvržica po biljci (103,83 mg). Na slici 22. prikazan je korijen graha noduliran sa sojevima koji su dali najmanji i najveću masu suhe tvari kvržica.
S obzirom da između 13 autohtonih sojeva i referentnog soja razlika u masi suhe tvari kvržica nije statistički opravdana, može se zaključiti da je sposobnost nodulacije ispitivanih sojeva dosta ujednačena.

Na kontrolama bez bakterizacije kao ni na kontrolama bez bakterizacije sa dodanim mineralnim dušikom nije utvrđena nodulacija.
Interakcija sojeva i sorti imala je signifikantan utjecaj na masu suhe tvari kvržica, a od svih ispitivanih kombinacija, najveća masa je utvrđena primjenom soja 26T na sortu Slavonski zeleni. Prosjek ove kombinacije je signifikantno veći od svih ostalih, osim kada je sorta Slavonski zeleni inokulirana sa sojem 22AT, i sorta Trešnjevac sa sojem 20Z, 22AT, 26T i referentnim sojem. U navedenim slučajevima različite su razine značajnosti (prilog 2). Najmanja masa kvržica utvrđena je primjenom sojeva 1BZ, 12Z i 16T na sortu Slavonski zeleni. U navedenim kombinacijama, sojevi su pripadali različitim vrstama.

Slika 22. Nodulacija korijena graha sojem 26T kojim je dobivena najveća masa suhe tvari kvržica (u pokusu je ovaj soj imao oznaku 14) (lijevo) te sojem 12Z koji je dao najmanju masu suhe tvari kvržica (oznaka 4 u pokusu) (desno).

4.5.2. Masa suhe tvari biljke

Najveća masa suhe tvari biljke dobivena je primjenom soja 23T (1453,33 mg). Prema ovoj analizi, slična masa suhe tvari biljke dobivena je i primjenom mineralnog dušičnog gnojiva na ispitivane sorte graha te primjenom sojeva 3T, 12Z, 1AT, 16T, 17T, 18T, 22AT, 2Z i 9T. U odnosu na te sojeve, niži prinosi utvrđeni su uz primjenu referentnog soja te sojeva 1BZ, 7Z, 15Z, 20Z i 26Z, koji pripadaju različitim vrstama, međutim te razlike nisu statistički opravdane. Statistički opravdana razlika utvrđena je jedino između neinokulirane kontrole i sojeva u grupi A (Tablica 33) koju čine pozitivna kontrola te sojevi 3T, 12Z, 1AT, 16T, 17T, 18T, 22AT, 2Z, 9T i 23T koji također predstavljaju različite vrste.

Tablica 33. Masa suhe tvari biljke (mg).

Soj		Sorta		Prosjek sojeva	#Sig. (Soj)
		Slav. Zeleni	Trešnjevac		
23T	*R. leguminosarum*	1453,33	1507,50	1480,4	A
N	pozitivna kontrola	1487,30	1373,60	1430,5	A
16T	*R. leguminosarum*	1184,93	1632,77	1408,9	A
2Z	*R. leguminosarum*	1294,07	1402,40	1348,2	A
1AT	*R. leguminosarum*	1411,90	1257,53	1334,7	A
17T	*R. leguminosarum*	1242,50	1421,70	1332,1	A
12Z	*R.leguminosarum*	1166,17	1446,03	1306,1	A
18T	*Rhizobium* sp.	1317,23	1248,33	1282,8	A
3T	*R. leguminosarum*	927,77	1636,67	1282,2	A
9T	*Rhizobium* sp.	1153,33	1309,53	1231,4	A
22AT	*R. pisi*	1252,17	1200,00	1226,1	A
7Z	*R. leguminosarum*	1023,80	1292,30	1158,1	AB
20Z	*R. hidalgonense*	970,83	1338,83	1154,8	AB
1BZ	*Rhizobium* sp.	1069,43	1233,90	1151,7	AB
15Z	*R. leguminosarum*	1060,70	1239,63	1150,2	AB
3622	referentni soj	869,47	1380,00	1124,7	AB
26T	*R. hidalgonense*	1066,20	1156,67	1111,4	AB
0	negativna kontrola	545,83	953,97	749,9	B
	Prosjek sorti:	**1138,72**	**1335,08**		

Sig. Prosjeci sojeva označeni istim slovom signifikantno se ne razlikuju ($p>0,05$–Tukey's HSD test).

Signifikantno veća masa suhe tvari biljaka utvrđena je za sortu Trešnjevac u odnosu na Slavonski zeleni.

Interakcija sorte i soja za ovo svojstvo je također signifikantna i pokazuje da je najveći prinos dobiven bakterizacijom sorte Trešnjevac sa sojem 3T (1636,67 mg), a slična vrijednost dobivena je i kada je bakterizirana sojem 16T. Utvrđena je statistički opravdana razlika između te dvije navedene najbolje kombinacije i kombinacije Slavonski zeleni x negativna kontrola, Trešnjevac x negativna kontrola, Slavonski zeleni x 20Z i Slavonski zeleni x referentni (prilog 3). Najniži prinos zelene mase utvrđen je za kombinaciju Slavonski zeleni i negativna kontrola.

Premda utjecaj inokulacije graha sa različitim sojevima na masu suhe tvari biljke nije bio statistički opravdan, ipak možemo izdvojiti sojeve vrste *R. leguminosarum* (23T, 16T, 2Z, 1AT, 17T i 12Z) čijom primjenom je dobivena veća masa nego primjenom drugih sojeva iste vrste ili sojeva drugih vrsta i referentnog soja. Za ovo svojstvo izraženiji je bio utjecaj interakcije sorte i soja što se najbolje vidi na primjeru inokulacije sorte Slavonski zeleni sa referentnim sojem (869,47 mg) i sorte Trešnjevac sa *R. leguminosarum* (3T) (1636,67 mg).

4.5.3. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke

Količina ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke prikazana je u tablici 34. Najveća količina dušika utvrđena je primjenom soja 16T (*R. leguminosarum*). Ovaj soj signifikantno je bolji od 22AT (*R. pisi*), 20Z i 26T (*R. hidalgonense*) te od negativne kontrole. Nisu utvrđene statistički opravdane razlike između različitih sojeva vrste *R. leguminosarum*. Ipak, uz soj 16T značajna količina dušika u nadzemnom dijelu biljke dobivena je i bakterizacijom sa sojevima 2Z, 23T i 1AT.

Razlike između varijanti s negativnom kontrolom i bakteriziranih, u pokusu su se mogle uočiti po različitoj boji lišća i habitusu biljaka (slika 23).

Tablica 34. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci).

Soj		Sorta		Prosjek sojeva	#Sig. (Soj)
		Slavonski zeleni	Trešnjevac		
16T	*R. leguminosarum*	28,97	43,58	36,27	A
2Z	*R. leguminosarum*	31,37	37,34	34,36	AB
23T	*R. leguminosarum*	29,48	39,22	34,35	AB
1AT	*R. leguminosarum*	32,77	31,90	32,34	AB
3T	*R. leguminosarum*	22,05	42,38	32,21	AB
17T	*R. leguminosarum*	28,14	34,95	31,55	AB
N	pozitivna kontrola	33,16	29,38	31,27	AB
1BZ	*Rhizobium* sp.	28,33	34,05	31,19	AB
12Z	*R.leguminosarum*	24,75	36,95	30,85	AB
18T	*Rhizobium* sp.	31,05	30,15	30,60	AB
15Z	*R. leguminosarum*	26,70	31,56	29,13	AB
7Z	*R. leguminosarum*	22,84	33,97	28,40	AB
9T	*Rhizobium* sp.	24,68	30,00	27,34	AB
3622	referentni soj	18,45	34,67	26,56	AB
22AT	*R. pisi*	25,11	25,67	25,39	B
26T	*R. hidalgonense*	20,62	29,41	25,02	B
20Z	*R. hidalgonense*	18,70	29,04	23,87	B
0	negativna kontrola	10,33	14,11	12,22	C
	Prosjek sorti:	**25,42**	**32,68**		

Sig. Prosjeci sojeva označeni istim slovom signifikantno se ne razlikuju ($p>0,05$-Tukey's HSD test).

Slika 23. Razlika u rastu biljaka i boji lišća. Lijevo: svijetlozeleno lišće i niže biljke na kontrolnoj varijanti bez bakterizacije (negativna kontrola). Desno: varijanta bakterizirana autohtonim sojem rizobija. Foto: I. Rajnović, 2016.

Utvrđena je statistički opravdana razlika između sorti. Kod sorte Trešnjevac utvrđena je signifikantno viša količina dušika u nadzemnom dijelu biljke.
Interakcija sorte i soja je značajna i za ovo svojstvo i utvrđene su velike razlike između kombinacija. Najveća ukupna količina dušika u nadzemnom dijelu biljke dobivena je bakterizacijom sorte Trešnjevac sa sojem 16T te sa sojem 3T.
Ova kombinacija je bolja (uz različite stupnjeve signifikantnosti) od negativne kontrole i soja 22AT sa obje istraživane sorte te od kombinacije sorte Slavonski zeleni i sojeva 3T, 7Z, 12Z, 20Z, 2Z i 26T (prilog 4).

4.5.4. Učinkovitost sojeva u fiksaciji dušika

Indeks učinkovitosti sojeva u fiksaciji dušika izračunat je iz odnosa količine dušika u nadzemnom dijelu inokuliranih biljaka i kontrolnih varijanti i prikazan je u tablici 35.
Ovi rezultati ukazuju na veliku raznolikost između sojeva u njihovoj sposobnosti fiksacije atmosferskog dušika. Od 15 sojeva njih 6 je fiksiralo veće količine dušika od pozitivne kontrole dok je pet sojeva bilo vrlo blizu te vrijednosti.
Najučinkovitiji soj je 16T dok su tek nešto manje učinkoviti bili sojevi 2Z i 23T. Najmanje učinkoviti sojevi bili su 20Z i 26-T, a tek nešto bolji 22AT. Svi sojevi ovdje navedeni kao visoko učinkoviti u fiksaciji atmosferskog dušika pripadaju vrsti *R. leguminosarum*, dok slabije učinkoviti sojevi pripadaju vrstama *R. pisi* i *R. hidalgonense*.

Tablica 35. Indeks učinkovitosti istraživanih sojeva uključenih u vegetacijski pokus.

Tretman	Vrsta	Indeks učinkovitost (%)
1BZ	*Rhizobium* sp.	99,59
3T	***Rhizobium leguminosarum***	**104,95**
7Z	*Rhizobium leguminosarum*	84,95
12Z	*Rhizobium leguminosarum*	97,80
1AT	***Rhizobium leguminosarum***	**105,59**
15Z	*Rhizobium leguminosarum*	88,76
16T	***Rhizobium leguminosarum***	**126,25**
17T	***Rhizobium leguminosarum***	**101,44**
18T	*Rhizobium* sp.	96,49
20Z	*Rhizobium hidalgonense*	61,17
22AT	*Rhizobium pisi*	69,15
23T	***Rhizobium leguminosarum***	**116,17**
2Z	***Rhizobium leguminosarum***	**116,19**
26T	*Rhizobium hidalgonense*	67,17
9T	*Rhizobium* sp.	79,38
3622	*Rhizobium leguminosarum*	75,28

5. RASPRAVA

5.1. Analize tla i izolacija autohtonih sojeva rizobija

Unatoč vrlo povoljnim agroekološkim uvjetima, uzgoj graha u Republici Hrvatskoj je zanemaren i ograničen na mala obiteljska poljoprivredna gospodarstva. Jedno od važnijih područje na kojima se uzgaja je sjeverozapadna Hrvatska zbog čega je upravo to područje odabrano za uzorkovanje tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija. Uzorci tala uzeti su sa površina obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava na kojima je grah bio sijan u plodosmjeni u posljednje tri godine što se razlikovalo od pristupa Pohajda (2011) koja je u cilju izolacije simbioznih fiksatora dušika koji noduliraju grah uzorkovala tla na kojima duži period nije bilo poljoprivredne proizvodnje ili na kojima su uzgajane različite druge ratarske i povrtlarske kulture. U takvim tlima utvrđena je vrlo slaba zastupljenost prirodnih populacija kvržičnih bakterija graha.

Za ova istraživanja odabrano je 27 lokacija (tablica 5, slika12), od kojih najviše pripada Koprivničko-križevačkoj, zatim Bjelovarsko-bilogorskoj, Varaždinskoj te Međimurskoj županiji. Tla uzorkovana na ovim lokacijama razlikuju se po svojoj sistematskoj pripadnosti te po fizikalno-kemijskim karakteristikama. Tla su sistematizirana u tri reda (tablica 18), što govori o kategorijama koje se razlikuju po režimu vlaženja te kemijskom sastavu vode kojom se tla vlaže. Prema nižim jedinicama, razredima i tipovima, izolirana tla su pokazivala značajnu raznolikost, a najveći broj ih je pripadao livadsko fluvijalnom tipu koji svrstavamo u skupinu naših najpogodnijih tala za poljoprivrednu proizvodnju.

Kao što prikazuje tablica 19, tla su se značajno razlikovala i prema fizikalnim (sadržaju mehaničkih čestica te analogno teksturnim oznakama) te kemijskim karakteristikama koje su se odnosile na pH reakciju, sadržaj fiziološki aktivnog kalija i fosfora te sadržaj ukupnog dušika i humusa (tablice 20 i 21).

Autohtoni sojevi rizobija izolirani su metodom kojom se sjeme graha sije u lonce sa prikupljenim uzorcima tla. Alberton i sur. (2006) smatraju da je ovaj pristup, u kojem se koristi biljka domaćin (engl. *trapping host method*), bolji za izolaciju autohtonih rizobija u usporedbi sa direktnim sakupljanjem noduliranih biljaka iz polja kada je cilj pronaći kompetitivne sojeve. Za daljnja istraživanja je odabrano ukupno 45 izolata rizobija (tablica 22).

Iz uzoraka M10 (istočni dio Koprivničko-križevačke županije) i M28 (Bjelovarsko-bilogorska županija) nisu izolirani sojevi rizobija jer nije došlo do nodulacije biljaka. Ovo ne možemo povezatni sa fizikalnim karakteristikama tala jer uzorak M10 ima teksturnu oznaku praškasto ilovasto, a M28 praškasto, no istu oznaku imaju i druga istraživana tla iz

kojih su autohtoni sojevi uspješno izolirani. Što se tiče kemijskih karakteristika, uzorak M10 je slabo opskrbljen kalijem i vrlo slabo opskrbljen fosforom, ali bogato opskrbljen dušikom. Poznato je da takva karakteristike nepovoljno utječu na rast i razvoj rizobija, no i druga uzorkovana tla imala su slične karakteristike, a u njima su bile zastupljeni autohtone rizobije. Uzorak M28 sistematiziran je u tip pseudoglej koji prema Husnjaku (2014) pripada skupini tala s niskim proizvodnim potencijalom zbog nepovoljnih vodozračnih odnosa i niske biološke aktivnosti. Neke od ovih karakteristika, kao i drugi nepovoljni čimbenici koji nisu ispitivani u ovom radu, mogli su utjecati na izostanak nodulacije biljaka iz tih uzoraka poput suše ili prisutnosti soli u tlu koja negativno utječe na pojavu prirodnih populacija kvržičnih bakterija (Zahran, 1999).

Još jedan značajan ograničavajući čimbenik za rast i razvoj rizobija je nizak pH odnosno kisela reakcija tla. Simbiozni fiksatori dušika koji noduliraju grah osjetljiviji su na nizak pH nego oni koji noduliraju primjerice soju, lucernu i grašak (Graham, 1981; Zahran, 1999). Velik broj uzorkovanih tala imao je slabo kiselu, kiselu i čak jako kiselu reakciju, no i iz takvih tala izolirani su autohtoni sojevi rizobija. U istraživanjima provedenim na drugim kulturama u Republici Hrvatskoj, autorice također navode da nije utvrđena korelacija između fizikalnih, kemijskih svojstva tla i prisutnosti simbioznih fiksatora koji noduliraju soju (Sikora, 1996), lucernu (Bradić i sur., 2003) i stočni grašak (Blažinkov, 2006).

S obzirom da su autohtoni sojevi iz ovog istraživanja izolirani iz različitih tipova tala s različitim fizikalno-kemijskim karakteristikama može se zaključiti da su oni vrlo dobro prilagođeni na brojne, često nepovoljne okolišne uvjete. Upravo je adaptacija autohtonih sojeva rizobija na nizak pH tla jedno od najvažnijih svojstava koje treba ispitati prilikom njihovog odabira u svrhu primjene za inokulaciju mahunarki.

5.2. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija

5.2.1. Identifikacija na razini vrste

Krajnji cilj ovog rada bio je odabrati najkvalitetnije sojeve unutar prirodne populacije rizobija koji noduliraju grah i koji bi nakon daljnjih istraživanja mogli naći primjenu u uzgoju graha na ekološki prihvatljiv i ekonomski opravdan način. U pronalasku takvih sojeva neophodna je analiza bioraznolikosti prirodne populacije prisutne u tlu.

Od kada su Woese i suradnici (1984) predložili da se 16S rRNA (*rrs*) gen koristi kao univerzalan marker za klasifikaciju i identifikaciju bakterija, ovaj gen je prihvaćen i kao osnova za klasifikaciju rizobija iz porodice *Rhizobiaceae* (Kuykendall, 2005). Ova

porodica uključuje prije opisane rodove *Rhizobium*, *Allorhizobium* i *Ensifer* kao i neke novo opisane poput *Shinella* (An i sur., 2016), *Neorhizobium* (Mousavi i sur., 2014) i *Pararhizobium* (Mousavi i sur., 2015). Opis ovih rodova temeljen je na analizi *rrs* gena što dokazuje da je upravo taj pristup osnova za klasifikaciju novih izolata iz nodula mahunarki na razini roda.

Međutim, u posljednje vrijeme se pokazalo da analiza *rrs* gena nije dovoljna za razlikovanje vrsta rizobija jer su opisane neke nove vrste koje imaju identične *rrs* gene poput *R. laguerreae* (Saidi i sur., 2014), *R. sophorae* (Jiao i sur., 2015), *R. acidisoli* (Roman-Ponce i sur., 2016) i *R. hidalgonense* (Yan i sur., 2017). Ove vrste imale su identičan *rrs* gen i kao tipske vrste *R. leguminosarum* i *Rhizobium indigoferae,* međutim, uspješno su diferencirane temeljem analize konstitucijskih gena *recA* i *atpD* koji su do tada korišteni u proučavanju rizobija (Gaunt i sur., 2001).

Ove gene nazivamo konstitucijskim jer su uključeni u osnovne funkcije važne za rast bakterija, a omogućavaju grupiranje sojeva na razini vrste i na nižim razinama. U slučaju vrste *R. leguminosarum*, sekvence *recA* i *atpD* gena pokazale su da sadrži vrlo različite sojeve koji noduliraju djetelinu (Ramirez-Bahena i sur., 2008), grahoricu (Alvarez-Martinez i sur., 2009) i grah (Garcia-Fraile i sur., 2010).

Uzevši u obzir da su geni *recA* i *atpD* sekvencirani za većinu vrsta roda *Rhizobium* te da je iz nodula graha izolirano nekoliko vrsta koje imaju identične *rrs* gene (kao npr. *R. acidisoli* i *R. hidalgonense*), ovi se geni trenutno smatraju najboljim filogenetskim markerom za identifikaciju rizobija.

Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI-TOF) masena spektrometrija brza je i pouzdana metoda za identifikaciju bakterija, a temelji se na karakterističnim profilima proteina za svaki mikroorganizam. Procijenjeno je da je do 99 % sojeva ispravno identificirano korištenjem ove tehnologije, a usporedba je rađena sa komercijalnim fenotipskim testovima i sa sekvenciranjem *rrs* gena (Schulthess i sur., 2013) te je stoga MALDI-TOF MS metoda s velikim potencijalom za identifikaciju bakterija. Međutim, do danas se uglavnom primjenjivala za identifikaciju kliničkih izolata jer mnoge izolirane bakterijske vrste iz drugih izvora nisu zabilježene u bazama podataka. To je bio poticaj da se 2011 godine na Sveučilištu Salamanca, (Španjolska), stvori novu baza podataka koja sadrži sojeve vrsta iz porodice *Rhizobiaceae* (Ferreira i sur., 2011). Od tada, baza podataka je sustavno aktualizirana uvođenjem spektra novih vrsta iz roda *Rhizobium* koje noduliraju različite mahunarke.

Stoga je u ovom radu primijenjena MALDI-TOF MS metoda kako bi se identificirale rizobije koje noduliraju grah, te kako bi se usporedili rezultati sa onima dobivenim na osnovi analize gena.

U istraživanju Ferreira i sur. (2011) dokazano je da se vrste iz porodice *Rhizobiaceae* sa filogenetski različitim konstitucijskim genima mogu razlikovati primjenom MALDI-TOF MS metode. Međutim, u tom radu je zapravo korišten po jedan (tipski) soj svake vrste dok je u tek nekoliko istraživanja cilj bio ovom metodom identificirati veću kolekciju kvržičnih bakterija (Lopez Diez i sur., 2016; Martinez-Molina i sur., 2016). U jednom od tih istraživanja, proučavani su sojevi izolirani iz nodula *P. vulgaris*, iz tri tla sjeverne Španjolskoj. Pokazalo se da se većina izolata podudara s prethodno izoliranima iz jednog od tih tala, a koji imaju različite *recA* i *atpD* gene (Garcia-Fraile i sur., 2010).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da svi sojevi pripadaju rodu *Rhizobium* jer su u svim slučajevima dobivene vrijednosti za sličnost sa različitim vrstama iz roda više od 2.0 (tablica 23).

Prema proizvođaču MALDI-TOF MS uređaja i softvera, samo vrijednosti podudarnosti (odnosno sličnosti) veće od 2.3 mogu biti pouzdane za identifikaciju na razini vrste. U ovom istraživanju, te su vrijednosti dobivene za oko 40 % sojeva, što je znatno niže od 99 % kliničkih sojeva koji su ispravno identificirani MALDI-TOF MS-om u istraživanjima Bizzini i sur. (2010). Međutim, Ferreira i sur. (2011) su u svom radu zaključili da su i vrijednosti u rasponu od 2.000 do 2.3000 također pokazale dobru identifikacije na razini vrste u slučaju brzorastućih sojeva rizobija. Prema tom kriteriju, svi izolati iz ovog istraživanja ispravno su identificirani MALDI-TOF MS metodom. Međutim, moramo napomenuti da su sve te identificirane vrste pripadale filogenetskoj skupini *R. leguminosarum*, koja sadrži vrste koje imaju vrlo slične ili čak iste sekvence *rrs* gena i koje su uglavnom opisane nakon objave rada Ferreira i sur. (2011).

Stoga je analiza konstitutivnih gena sojeva iz ovog istraživanja bila potrebna kako bi se ponovno procijenio raspon vrijednosti koji bi davao dobru identifikaciju na razini vrste unutar roda *Rhizobium* MALDI-TOF MS metodom.

U cilju analize genetske raznolikosti sojeva rizobija izoliranih iz graha te za odabir reprezentativnih sojeva za sekvenciranje gena korištena je RAPD metoda (Valverde i sur., 2011). Ovo je jedna od najčešće korištenih i najučinkovitijih metoda za proučavanje raznolikosti bakterija koja je ujedno vrlo jednostavna jer daje informacije o složenom bakterijskom genomu bez potrebe za prethodnim znanjem o njemu (Williams i sur., 1990). Nasumičnom amplifikacijom DNK sekvenci dobivamo DNA fragmente koji se potom razdvajaju na gelu. Rezultat tog razdvajanja su karakteristični profili koji se razlikuju između sojeva istih vrsta.

U ovom slučaju, za amplifikaciju je korištena početnica M13 koja se sastoji od 15 parova baza (Rivas i sur., 2006). Analiza RAPD profila 45 izolata iz ovog istraživanja pokazuje značajnu raznolikost između izolata. Na temelju sličnosti manje od 70 % oni su grupirani u 15 skupina iz kojih je odabran po jedan reprezentativni soj za analizu gena (tablica 24, slika 17). Najvećoj skupini pripadalo je 11 izolata iz različitih uzoraka tala dok su ostale sačinjavali po 7, 5 ili manji broj izolata. Unutar tih skupina, dobiveno je i sedam jedinstvenih profila koji su tvorili zasebne linije koje predstavlja samo 1 soj (IV, VIII, IX, XI, XIII, XIV i XV). Sojevi grupirani unutar RAPD skupina izolirani su iz različitih tipova tala sa različitim fikalno-kemijskim karakteristikama. Iznimno se u RAPD grupama III, V i VI nalaze sojevi izolirani iz istog tla.

Tri konstitucijska gena koja se najčešće koriste za razlikovanje vrsta roda *Rhizobium* iz filogenetske grupe *R. leguminosarum* su *rrs*, *recA* i *atpD* (Villadas i sur., 2017). Stoga su u ovom radu analizirani ovi geni reprezentativnih sojeva iz različitih RAPD groupa izoliranih iz nodula *P. vulgaris*.

Sekvence *rrs* gena najprije su uspoređene s onima koje su dostupne u Genbank bazi, a rezultati su pokazali da svi sojevi pripadaju rodu *Rhizobium*, a njihove najsrodnije vrste su one iz filogenetske skupine *R. leguminosarum* (slika 18).
Za nekoliko sojeva dobivena je 100 % sličnost sekvenci sa vrstama *R. leguminosarum, R. hidalgonense* i *R. pisi*, dok je za neke sojeve ta vrijednosti bila veća od 99 %, ali manja od 100 % u usporedbi sa nekim vrstama filogenetskom skupine *R. leguminosarum*. Stoga su u daljnje filogenetske analize provedene u ovom istraživanju uključene sve vrste iz filogenetske skupine *R. leguminosarum*.

Rezultati filogenetske analize *rrs* gena pokazali su da većina sojeva iz ovog istraživanja pripada dvjema grupama koje su gotovo 100 % slične sa nekoliko vrsta koje imaju identičan *rrs* gen kao *R. leguminosarum* i kao *R. pisi.* Trećoj, neovisnoj grupi pripadaju sojevi RAPD skupine III i linije IV, a ta grupa je povezana sa nekoliko vrsta roda *Rhizobium*, uključujući *R. etli* i *R. phaseoli,* koje noduliraju *P. vulgaris* u Americi. Ipak, sve skupine u koje su ubrojeni sojevi iz ovog istraživanja uključuju više od jednog soja sa gotovo identičnim *rrs* genom i stoga je bilo potrebno analizirati druge, više varijabilne gene kako bi se izolati mogli dodijeliti jednoj od tih vrsta ili novoj filogenetskoj liniji.

U brojnim istraživanjima u kojima se analizira raznolikost mikrosimbionata raznih mahunarki u posljednje vrijeme se koristi MLSA (Multilocus Sequence Analysis) metoda kojom se zajedno analiziraju sekvence nekoliko gena (Stepkowski i sur., 2005; Ribeiro i

sur., 2009). Iako se čini logičnim da se pouzdanija filogenetska analiza može dobiti kombinacijom podataka dobivenih od tri gena: *rrs*, *atpD*, i *recA* (Garcia-Fraile, 2008), Gaunt i sur. (2001) su proveli takozvani test particije homogenosti (engl. *partition homogeneity*) i kombinacije podataka, kojim se procjenjuje da li su podatci dobiveni analizom pojedinačnih gena slični onima dobivenim zajedničkom analizom tih gena. Dobiveni koeficijent za *atpD* + *recA* + *rrs*, pokazao je da se sekvenca *rrs* treba tretirati odvojeno, a koeficijent za *atpD* + *recA* sugerira da se njihove sekvence analiziraju zajedno. Imajući to na umu, sekvence *recA* i *atpD* gena sojeva korištenih u ovim istraživanjima analizirane su zajedno.

Rezultati su pokazali da sojevi iz ovog istraživanja tvore grupe u skladu s onima dobivenim nakon analize *rrs* gena. Nakon analize konstitucijskih gena, možemo zaključiti da većina sojeva srodnih vrstama koje imaju identične *rrs* gene kao *R. leguminosarum* pripada upravo ovoj vrsti (slika 19). Izuzetak je soj 8Z (RAPD skupina I), koji je tvorio nezavisnu liniju srodniju sa vrstom *R. ecuadorense* prvotno izoliranu iz nodula *P. vulgaris* (Ribeiro i sur., 2015). Ipak, sličnost je bila manja od 97 % za oba gena (*recA* i *atpD*) što ukazuju da sojevi iz RAPD skupine I vjerojatno pripadaju novoj vrsti unutar roda *Rhizobium*.

Vrste koje imaju identične sekvence *rrs* gena kao *R. leguminosarum* mogu se jasno razlikovati na osnovu analize konstitucijskih gena kao što je prikazano u radovima u kojima one opisane, osim u slučaju *R. indigoferae* koja je zapravo identična *R. leguminosarum* što su otkrili Ferreira i sur. (2011) i Villadas i sur. (2017).

Devet ispitivanih sojeva, koji predstavljaju RAPD grupa skupine VI i XII i linije VII, VIII, IX, X, XIII, XIV i XV, također pripadaju ovoj vrsti sa vrijednošću sličnosti većom od 98 % za oba gena, *recA* i *atpD*, a druga dva soja, koji predstavljaju RAPD grupe V i VI, identificirana su kao *R. hidalgonense*, vrsta koja je izoliran iz *P. vulgaris* nodula u Americi i tek nedavno opisana (Yan i sur., 2017).

Soj 22BZ, koji predstavlja RAPD grupu II, sa identičnim *rrs* genom kakav ima tipski soj vrste *R. pisi* može se dodijeliti ovoj vrsti temeljem filogenetskog stabla dobivenog analizom *recA* i *atpD* gena, ali sa sličnošću nešto nižom od 99 % u ova dva gena. Takav postotak sličnosti ukazuje da sojevi iz RAPD skupine koju predstavlja soj 22BZ najvjerojatnije pripadaju vrsti *R. pisi* koji je izvorno izolirana iz nodula graška (*Pisum sativum*) (Ramirez-Bahena i sur., 2008).

Konačno, sojevi 9T i 13T (RAPD skupine III i IV), koji tvore nezavisne linije u filogenetskom stablu *rrs* gena, također tvore nezavisnu granu u filogenetskom stablu konstitucijskih gena koja je više povezana sa *R. sophoriradicis*, vrstom izvorno izoliranom

iz nodula *Sophora flavescens* (Jiao i sur., 2015), ali sa sličnošću manjom od 98 %. U ovom slučaju je sličnost u granici za razlikovanje vrsta, a iznosi 95,35 % kolika je bila dovoljna za nedavno opisane, *R. laguerreae* i *R. sophorae*.

Nakon što su autohtoni sojevi identificirani primjenom MALDI-TOF MS metode i sekvenciranjem gena, može se zaključiti da je MALDI-TOF MS pouzdana metoda za identifikaciju brzorastućih rizobija na razini vrste. Ovom metodom uspješno su razlikovane i neke vrlo bliske vrste koje nije bilo moguće razlikovati sekvenciranjem *rrs* gena. Isti slučaj primjenom ove dvije metode dobili su Martinez-Molina i sur. (2016) za vrste *R. leguminosarum* i *R. laguerreae*. Međutim, vrijednosti koje potvrđuju točnost identifikacije na razini vrste su više od 2,300 zato što je za neke sojeve dobiveno da se podudaraju sa određenom vrstom temeljem vrijednosti između 2,000 i 2,300, a nakon sekvenciranja konstitucijskih gena potvrđeno je da ne pripadaju toj vrsti.
Ovo je bio slučaj za sojeve iz RAPD grupa I i III i linije IV, a vjerojatan razlog tome je što su neke vrste roda *Rhizobium* toliko bliske da je njihova diferencijacija moguća tek nakon analize više od jednog konstitucijskog gena. U svakom slučaju, mogućnost razdvajanja bliskih vrsta unutar roda *Rhizobium* čini ovu metodu vrlo pouzdanom i prikladnom za identifikaciju izolata kvržičnih bakterija, posebno kada je potrebno analizirati veliku populaciju.

Unutar analizirane populacije dva soja koja su pripadala vrsti *R. pisi* izolirana su iz dva uzorka tla koja su po fizikalno-kemijskim karakteristikama vrlo slična, pripadaju istom tipu tla i geografski su bila vrlo bliska. Vrstu *R. hidalgonense* u ovim su istraživanjima predstavljali sojeva iz različitih uzoraka tla kao što je bio slučaj sa sojevima vrste *R. leguminosarum* i sojevima za koje se pretpostavlja da tvore novu vrstu. Ovo dokazuje da je raznolikost rizobija koji noduliraju grah u hrvatskim tlima vrlo velika te da bi se istraživanje trebalo proširiti na veći broj izolata kako bismo vidjeli postoji li biogeografsko strukturiranje populacija rizobija.

5.2.2. Identifikacija na razini simbiovara / simbiovar phaseoli

Grah je mahunarka koju nodulira nekoliko vrsta brzorastućih rizobija iz porodice *Rhizobiaceae*, većinom iz roda *Rhizobium* (Peix i sur., 2015). Neke od tih vrsta uključuju nekoliko simbiovara od kojih je simbiovar phaseoli najrašireniji.
Iako su za opisivanje simbiovara kod različitih vrsta rizobija korišteni brojni nodulacijski geni, *nodC* gen je najčešće korišten kao filogenetski marker za razlikovanje simbiovara unutar roda *Rhizobium* (Rogel i sur., 2011, Peix i sur., 2015). Analiza ovog gena

omogućila je razlikovanje između simbiovara vicia, trifolii i phaseoli vrste *R. leguminosarum* (Garcia-Fraile i sur., 2010). Simbiovar phaseoli pronađen je kod različitih *Rhizobium* vrsta (Peix i sur., 2015), a u ovom istraživanju je prvi puta utvrđen taj simbiovar kod vrste *R. pisi* (slika 20). Ova vrsta je do sada sadržavala samo simbiovare viciae i trifolii (Marek-Kozaczuk i sur., 2013).

Simbiovar phaseoli povezan je s američkim vrstama *R. etli* i *R. phaseoli* (Diaz-Alcantara i sur., 2014) i autohton je na tom kontinentu (Aguilar i sur., 2004). Pretpostavlja se da je u Europu stigao zajedno sa sjemenom graha, budući da su američki aleli α i γ, *nodC* gena pronađeni u Španjolskoj kod autohtonih sojeva *R. leguminosarum* (Garcia-Fraile i sur., 2010).

Rezultati analize *nodC* gena sojeva izoliranih u ovom radu pokazuju da svi oni pripadaju simbiovar phaseoli i da nose alel γ gena *nodC*, kojeg također predstavljaju tipski sojevi *R. ecuadorense* i *R. vallis*, izolirani iz nodula graha u Americi odnosno Aziji. Tipski sojevi drugih vrsta koje noduliraju *P. vulgaris*, kao što su *R. acidisoli*, *R. sophorae* i *R. sophoriradicis*, nose neimenovane *nodC* alele usko vezane sa γ alelima nodC gena (Roman-Ponce i sur., 2016).

Alel α *nodC* gena pronađen je samo kod soja 26T koji predstavlja RAPD grupu VI identificiranu kao *R. hidalgonense* te kod soja 22BZ koji predstavlja RAPD skupinu II identificiranu kao *R. pisi.* Tipski sojevi vrsta *R. etli*, *R. phaseoli* i *R. hidalgonense* također nosi taj alel, a svi su izolirani iz američkih tala (Segovia i sur., 1993; Ramirez-Bahena i sur. 2008; Yan i sur., 2017).

Rezultati analize *nodC* gena pokazuju da svi sojevi izolirani iz tala sjeverozapadne Hrvatske u kojima se uzgaja grah pripadaju simbiovaru phaseoli. Ovi rezultati su u skladu s onima iz prethodnih istraživanja provedenih u Španjolskoj i Portugalu, gdje su sojevi izolirani iz nodula graha, iz tala u kojima se tradicionalno uzgaja ova kultura, također pripadali simbiovaru phaseoli koji uglavnom nosi alel γ nodC gena (Garcia-Fraile i sur., 2010; Valverde i sur., 2011). Ovi rezultati podupiru hipotezu o distribuciji simbioznih gena karakterističnih za ovaj simbiovar u europske zemlje zajedno sa sjemenom graha te o njihovom prijenos na lokalno prisutne vrste rizobija, poput *R. leguminosarum* (Garcia-Fraile i sur., 2010). Ipak, otkriće drugih vrsta kao što su *R. hidalgonense* ili *R. pisi* u nodulima *P. vulgaris* u hrvatskim tlima, naglašavaju potrebu za daljnjim biogeografskim istraživanjima kako bi se razjasnilo podrijetlo vrsta koje noduliraju grah u europskim tlima.

5.3. Fenotipska karakterizacija izolata

Fenotipske karakteristike poput otpornosti na biotičke i abiotičke čimbenike mogu varirati između različitih sojeva bakterija, a nekada se smatralo da su to dovoljno dobri pokazatelji za razlikovanje sojeva rizobija iste vrste. Sojevi rizobija se značajno razlikuju u otpornosti na ekstremene temperature, pH okoliša i salinitet u tlu (Zahran, 1999).

Sposobnost rizobija da rastu na ekstremnim temperaturama je jedan od uobičajenih testova u njihovoj karakterizaciji zato što je temperatura jedan od najvažnijih čimbenika koji utječe na rast te na simbioznu fiksaciju dušika. Optimalna temperatura za rast kvržičnih bakterija je oko 28°C, a rijetko se javljaju i sojevi koji toleriraju znatno niže ili više temperature.

Svi izolati iz ovog istraživanja dobro su rasli na optimalnoj temperaturi, no na temperaturi od 4 °C nije rastao niti jedan autohtoni soj (tablica 29). Pronađeno je deset izolata koji su se pokazali kao vrlo osjetljivi na promjene temperature jer nisu rasli niti na jednoj ispitivanoj temperaturi, a tek ih je šest za koje možemo reći da su tolerirali temperaturne oscilacije jer su rasli i pri temperaturi od 10, 37 i 42 °C. Od svih ispitivanih autohtonih sojeva, 31 je slabo ili čak dobro rastao na temperaturi 42 °C što je vrlo zanimljivo ako uzmemo u obzir da su svi sojevi izolirani iz tala sjeverozapadne Hrvatske koja se nalaze u području umjereno tople klime čije se srednje temperature zraka najtoplijih mjeseci kreću od 18 do 22 ºC. Ipak, prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda, u ovom području zabilježene su maksimalne temperature zraka od 35,1 do 38,5 °C pa je sposobnost autohtonih sojeva da toleriraju tako visoke temperature vrlo značajna karakteristika. U nekim istraživanjima zabilježeno je da veći broj sojeva rizobija koji noduliraju grah rastu na temperaturi 40 °C, dok ih tek nekolicina raste na 45 °C. Međutim, riječ je o sojevima izoliranim iz toplijih područja kao što su Egipat (Zahran i sur., 2012) ili Kanarski otoci (Garcia-Fraile, 2008).

Za svaki mikroorganizam utvrđen je raspon pH vrijednosti unutar kojeg može normalno rasti, a najčešće on varira unutar 2-3 jedinice. Za rizobije, optimalan pH je 6,8, a u ovom istraživanju cilj je bio ispitati kako više i niže vrijednosti utječu na rast sojeva. Ovo je bilo važno istražiti jer na području Republike Hrvatske postoji dosta kiselih tala kakvih je bilo polovina od ispitivanih u ovom radu.

Neki sojevi rizobija mogu rasti u rasponu pH vrijednosti od 4 do10 (Zahran, 1999), no u ovom istraživanju niti jedan soj nije rastao na pH 4, osim što je slab rast primijećen kod

1BT, 15Z i 21T (tablica 29). Zanimljivo je da su uzorci tla M1B, M15 i M21, iz kojih su izolirani spomenuti sojevi, imali neutralnu ili tek slabo kiselu reakciju.
Prema rezultatima ispitivanja rasta na različitim pH vrijednostima, može se zaključiti da su ispitivani sojevi dobro prilagođeni na rast u okolišu sa kiselom, ali i alkalnom reakcijom. Većina sojeva rasla je na pH vrijednostima u rasponu od 5 do 9. Preciznije, na pH vrijednosti bližoj optimumu za rast rizobija (pH 6 i 8) rasli su svi ispitivani sojevi. Sojevi 5Z, 13T i 21Z nisu rasli na pH 5. Gledajući njihovo podrijetlo, soj 5Z izoliran je iz tla alkalne reakcije, 21Z iz tla neutralne reakcije, a 13T iz tla slabo kisele reakcije. Isto tako, na pH 9 nisu rasli sojevi 1BZ, 8T, 22BT i 22BZ, a izolirani su iz tala neutralne (1BZ), jako kisele (8T) i kisele (22BT i 22BZ) reakcije. Ovakvi rezultati pokazuju da postoji izvjesna korelacija između reakcije tla iz kojeg su izolirani sojevi i pH raspona unutar kojeg mogu rasti iako je ovo općenito gledajući vrlo varijabilano svojstvo kod nekih vrsta koje se ne može pouzdano povezati sa reakcijom u okolišu (Garcia-Fraile, 2008).

Salinitet je jedan od čimbenika koji mogu nepovoljno utjecati na simbioznu fiksaciju dušika, a mahunarke su najčešće osjetljiviji partner. Youssef i Sprent (1983) su u svom istraživanju dokazali da su mahunarke koje dušik fiksiraju u simbiozi sa rizobijama osjetljivije od onih koje ga usvajaju iz mineralnog oblika.
Za rizobije je dokazano da za razliku od svojih biljaka domaćina mogu preživjeti u prisutnosti visokih koncentracija soli. Primjerice otkriveni su mikrosimbionti lucerne koji podnose koncentracije NaCl od 300 mM i mikrosimbionti akacije koji podnose 500mM NaCl (Zeghari i sur., 2000).
Salinitet u hrvatskim tlima može značajno varirati, a povišene koncentracije NaCl-a utječu na osmotsku ravnotežu u stanici bakterija. Otpornost sojeva pripisuje se njihovoj sposobnosti da sintetiziraju topive tvari koje pohranjuju u citoplazmi te time održavaju osmotsku ravnotežu i sprečavaju dehidraciju. Prema rezultatima ovog istraživanja, malen je broj takvih izolata. Tek je 11 izolata raslo na mediju u koji je dodano 0,5 % NaCl-a (od kojih su četiri slabo rasla), a na koncentraciji 1,0 % raslo je osam izolata (tablica 29). Ipak, možemo izdvojiti tri soja, 1AT, 2Z i 3Z koje možemo smatrati vrlo otpornim na stres izazvan povišenim salinitetom jer je njihov rast zabilježen čak na 2,0 % NaCl. Niti jedan soj nije rastao na višim ispitivanim koncentracijama (2,5 % i 3,0 %) što je u skladu sa ostalim istraživanjima, kao i sa opisom u *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* u kojem je navedeno da rizobije ne rastu na koncentracijama NaCl višim od 2,0 % (Kuykendall, 2005). Ipak, iz slanih tala Maroka izolirani su mikrosimbionti graha koji podnose koncentracije NaCl 3,0 %.

U nekoliko istraživanja ispitivana je otpornost na antibiotike (IAR, engl. *intrinsic antibiotic resistance*) kao važno svojstvo za karakterizaciju rizobija (Beynon i Josey, 1980; Eaglesham, 1987). To je i danas standardni test kojim se dobiva uvid u heterogenost populacije koja dijeli isto stanište. Osjetljivost na antibiotike razlikuje se između različitih vrsta rizobija, ali i između sojeva istih vrsta. Štoviše, Eaglesham (1987) navodi da je teško pronaći sojeve sa identičnim IAR karakteristikama ako se u istraživanje uključi dovoljno velik broj antibiotika. Primjerice, 65 % sojeva rizobija koje noduliraju slanutak pokazalo je vrlo veliku otpornost na kanamicin i eritromicin, a 14-25 % na ampicilim, streptomicin (Maatallah i sur., 2002). U drugom istraživanju (Zahran i sur., 2012) mikrosimbionti različitih kultura bili su osjetljivi na tetraciklin, kanamicin i streptomicin, a znanstvenici zaključuju i da je streptomicin imao najštetniji učinak na rizobije.
Izolati iz ovog istraživanja bili su najotporniji na djelovanje ampicilina gdje je čak 28 izolata dobro raslo u njegovom prisustvu tvorivši minimalne zone oko diskova, a za njih 20 je zabilježen slab rast i tek dva soja uopće nisu rasla (tablica 30). Eritromicin je imao najštetniji učinak na ispitivane sojeve što je suprotno spomenutom istraživanju (Maatallah i sur., 2002). Međutim, sojevi rizobija koji noduliraju grah u Egiptu bili su osjetljivi na streptomicin, ampicilin i eritromicin (Elbanna i sur., 2009) no u ovom istraživanju bilo je uključeno samo pet sojeva koji su prethodno odabrani zbog učinkovite fiksacije dušika. Različiti rezultati za otpornost na djelovanje antibiotika dobiveni su čak i za mikrosimbionte istih kultura. Aoki i sur. (2010) su utvrdili da svi njihovi sojevi (izolirani iz nodula biljke *Lathyrus japonicum* iz Japana) pokazuju otpornost prema neomicinu za razliku od kanadskih sojeva koji su osjetljivi na taj antibiotik.

Iskorištavanje različitih izvora ugljika i dušika, kao važnih elemenata za brojne metaboličke procese u stanicama mikroorganizama i dalje je korisna nadopuna genotipskim analizama prilikom karakterizacije rizobija. Rizobije su kemoorganotrofni mikroorganizmi koji mogu iskorištavati velik broj ugljikovih spojeva za rast. Spektar tih komponenti ovisi o soju rizobija, a može i dati uvid u prilagodbu na rizosferu biljke domaćina ili na organske spojeve u tlu (Garcia-Fraile, 2008). U ovom istraživanju, ispitivano je iskorištavanje različitih izvora ugljik: manitola, saharoze, glukoze, maltoze, rafinoze, arabinoze, galaktoze, fruktoze i laktoze i utvrđeno je da su sojevi sposobni iskorištavati sve ove izvore ugljika, osim što pet sojeva nije raslo na hranjivim podlogama u kojima je dodana laktoza (tablica 30). Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima na rizobijama izoliranim iz nodula slanutka (Maatallah i sur., 2002) i raznih drugih brzo i sporo rastućih rizobija (Glenn i Dilworth, 1981). Također, što se tiče rizobija koji noduliraju grah, Kucuk i sur. (2006) su utvrdili da svi izolati dobro rastu u prisutnosti fruktoze, galaktoze, glukoze, manitola i saharoze.

Rezultati su pokazali da fenotipske karakteristike izolata nisu povezane sa njihovim grupiranjem temeljem genotipskih markera odnosno RAPD profila. Ovakvi rezultati dobiveni su i u brojnim drugim istraživanjima što je očekivano ako se uzme u obzir da već prilikom mutacije u samo nekoliko baza može doći do promjene nekog svojstva koje će utjecati na stvaranje drugačijeg fenotipa (Donnarumma i sur., 2014).
Kada bismo htjeli proučiti dolazi li do formiranja zajednica rizobija u tlu ovisno o njegovim karakteristikama poput pH i sadržaja NaCl, bilo bi korisno uključiti znatno veći broj sojeva po svakoj lokaciji.

5.4. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija

Sojevi istraživani u ovom radu odabrani su iz područja sjeverozapadne Hrvatske, a kriterij za odabir tog područja je duga tradicija uzgoja graha. Kao i u većem dijelu Hrvatske i ovdje postoje optimalni uvjeti za uzgoj te potencijal za unapređenje proizvodnje s ciljem očuvanja tradicijskih sorti graha.
Istraživanja brojnih autora u različitim zemljama pokazuju da se autohtoni sojevi rizobija mogu koristiti kao biognojivo, da su u brojnim slučajevima učinkovitiji od komercijalnih sojeva te da se njihovom primjenom može postići isti prinos dušika kao dodatkom mineralnog oblika tog gnojiva.
Prvi korak u selekciji sojeva koji bi se mogli koristiti kao biognojivo svakao je identifikacija nakon koje slijedi *in vitro* ispitivanje njihove otpornosti na nepovoljne uvjete te simbiozne učinkovitosti u kontroliranim uvjetima vegetacijskog pokusa. Rezultati odgovora sojeva na stresne uvjete i njihove učinkovitosti u fiksaciji atmosferskog dušika u takvim uvjetima često se vrlo razlikuju od onih u polju. Stoga su kao zadnja faza u pronalasku kvalitetnog soja višegodišnji poljski pokusi za koje se preporuča i da se provode u različitim tlima svake regije (Mulas i sur., 2011).

Kako bismo procjenili simbioznu učinkovitost sojeva postavlili smo vegetacijski pokus u plasteniku u kojem je sjeme dviju tradicijskih hrvatskih sorti, Trešnjevac i Slavonski zeleni inokulirano sa 15 odabranih sojeva i jednim komercijalnim sojem (tablica 17). Osim toga u pokus su bile uključene kontrole u kojima biljke nisu inokulirane te kontrole koje su zalijevane hranjivom otopinom sa dodatkom mineralnog dušika (0,05 % KNO_3).
Rezultati pokusa pokazali su da su obje sorte kompatibilne sa odabranim sojevima, a značajna raznolikost u simbioznoj učinkovitosti zabilježena je između sojeva. Svi izolati

tvorili su kvržice na korijenju biljaka koje su u presjeku bile crvene. Ovo je zajedno sa zelenom bojom lišća biljaka upućivalo na njihovu učinkovitost u fiksaciji dušika.
Masa suhe tvari kvržica je svojstvo koje ukazuje na sposobnost nodulacije nekog soja odnosno na njegovu infektivnost prema čemu je 26T (*R. hidalgonense*) bio najbolji soj, a nije se signifikantno razlikovao od 22AT (*R. pisi*). Prosječno najnižu masu suhe tvari kvržica dali su sojevi vrste *R. leguminosarum* 12Z i 16T (tablica 32). Kada gledamo interakciju sorte i soja, najbolji prinos suhe tvari kvržica ostvaren je primjenom kombinacije soja 26T i sorte Slavonski zeleni.

Dio dušika koji rizobije konvertiraju u simbioznom odnosu, biljke mogu koristiti za izgradnju svojih staničnih struktura što povećava masu njihovog nadzemnog dijela. Stoga se učinkovitost u simbioznoj fiksaciji dušika može procijeniti i usporedbom mase suhe tvari biljaka inokuliranih sa sojevima rizobija i mase suhe tvari koju proizvede neinokulirana biljka.
Uz primjenu svih testiranih izolata, kao i uz dodatak mineralnog dušika, dobiven je viši prinos mase suhe tvari biljke u odnosu na negativnu (nebakteriziranu) kontrolu (tablica 33). Ove su razlike bile statistički opravdane za čak 10 sojeva, a najveća masa suhe tvari biljke dobivena je sa sojevima 23T te 16T. Soj 22AT, koji je dao statistički opravdano najvišu masu suhe tvari kvržica, bio je svrstan sa najboljim sojevima u prinosu mase suhe tvari biljaka. Slične vrijednosti za ovo svojstvo dobivene su i primjenom mineralnog dušičnog gnojiva i nekih sojeva, dok je referentni soj dao niže prinose suhe tvari biljke, no bez statističke opravdanosti. Zanimljivo, primjenom soja 26T koji je stvorio najveću masu suhe tvari kvržica, dobivena je najmanja masa suhe tvari biljke.
Signifikantno veća masa suhe tvari biljaka utvrđena je kod sorte Trešnjevac u usporedbi sa Slavonski zelenim. Bakterizacija sorte Trešnjevac sa sojevima 3T i 16T pokazala se kao najbolja kombinacija za postizanje visokog prinosa suhe tvari biljke.
U slučajevima kada su autohtoni izolati dali viši (kao soj 23T vrste *R. leguminosarum*) ili sličan prinos mase suhe tvari biljke čak i od varijanti kojima je dodavan mineralni dušik, može se pretpostaviti da je riječ o nekim drugim putevima kojima rizobije potiču rast biljaka. Brojni znanstvenici bavili su se upravo proučavanjem skupine koju prema engleskom akronimu nazivamo PGPR (*plant growth promoting rhizobia*), a u preglednom radu (Gopalakrishnan i sur., 2015) pripisuju takve karakteristike rizobija njihovoj sposobnosti da poboljšavaju dostupnost hranivih tvari biljci, otapaju nedostupne oblike fosfata, proizvode fitohormone koji ubrzavaju rast biljaka ili proizvode siderofore koji olakšavaju transport hraniva.
Sojevi 16T i 23T, čijom je primjenom postignuta najveća masa suhe tvari biljke unatoč tome što su stvorili najmanju masu kvržica, vjerojatno su najbolji primjer poticanja rasta

biljke nekim od navedenih puteva, a ne simbioznom fiksacijom dušika. Drugo objašnjenje je da su ti sojevi puno učinkovitiji simbiozni fiksatori dušika od onih sojeva koji stvore veću masu kvržica, a daju manji prinos suhe tvari biljke.

Kao što je prikazano u tablici 34, primjenom soja 16T dobivena je najveća količina dušika (36,272 mg) u nadzemnom dijelu biljke. Istovremeno, primjenom istog soja postignuta je najmanja masa suhe tvari kvržica po biljci. Međutim, masa suhe tvari kvržica je svojstvo koje ukazuje na infektivnost nekog soja tj. na sposobnost nodulacije, dok sadržaj dušika u biljci pokazuje učinkovitost nekog soja odnosno sposobnost da u simbioznom odnosu pridonese konverziji atmosferskog dušika. Već je prije dokazano da ova dva svojstva ne moraju biti povezana (Jordan, 1984; Sikora, 1996) odnosno da neki sojevi očigledno tvore kvržice velike mase koje mogu nastati u velikom broju međutim u njima se fiksira manja količina dušika od one fiksirane u nekim sitnijim i malobrojnijim kvržicama. Razlog tome je što su za nastanak kvržica pa tako i njihov broj i masu odgovorni *nod* geni dok je sadržaj dušika tj. simbiozna učinkovitost regulirana *nif* genima. Iako su i *nod* i *nif* geni smješteni na plazmidima oni se ne prenose zajedno (Laguerre i sur., 2001).
U nadzemnom dijelu biljke sorte Trešnjevac utvrđena je signifikantno veća količina dušika nego kod Slavonski zeleni.

Indeks učinkovitosti sojeva u fiksaciji dušika izračunat iz odnosa količine dušika u nadzemnom dijelu inokuliranih biljaka i kontrolnih varijanti (tablica 35), korelira sa prethodno objašnjenim rezultatima. Najučinkovitiji sojevi su 16T (126,25 % učinkovitosti) 2Z (116,19 %), i 23T (116,17 %) 1AT (105,59 %) koji pripadaju vrsti *R. leguminosarum*, dok je najmanji indeks učinkovitosti dobiven za 20Z (61,17 %) i 26 T(69,15 %), sojeve vrste *R. hidalgonense*.
Proučavajući simbioznu učinkovitost rizobija koje noduliraju grah u Iranu, Rahmani i sur. (2011) dobili su slične i više vrijednosti za indeks učinkovitosti za gotovo trećinu sojeva koje su ispitivali. Sve izolate koji su bili učinkovitiji u fiksaciji dušika od pozitivne kontrole uključili su dalje u poljske pokuse koji su pokazali da je najučinkovitiji izolat u polju bio isti kao i u plasteniku. Nasuprot tome, u istraživanju Mulas i sur. (2011), indeks učinkovitosti sojeva u kontroliranim uvjetima dosegnuo je vrijednosti do 57 % dok je učinkovitost u poljskim uvjetima dvije različite lokacije u Španjolskoj bila znatno viša. U tom istraživanju korišteni su sojevi vrste *R. leguminosarum* koja je autohtona u Europi (Alvarez-Martinez i sur., 2009). Autori stoga smatraju da je upravo korištenje autohnonih vrsta rizobija u kombinaciji sa odgovarajućim domaćim sortama omogućilo pronalazak dva visoko učinkovita soja. Ovu tvrdnju podupiru i druga istraživanja; primjerice, iz prirodne populacije *R. tropici*, vrste autohtone za Južnu Ameriku odabrani su najučinkovitiji sojevi za fiksaciju

dušika u Brazilu (Hungria i sur., 2000), kao i sojevi *R. gallicum* u Africi (Mrabet i sur., 2005). U južnoj španjolskoj, Rodriguez-Navarro i sur. (2000) pronašli su slabo učinkovitu simbiozu *P. vulgaris-Rhizobium* što je možda zbog upotrebe sojeva vrsta koji su nativni za Ameriku, a ne za Europu.

Rezultati vegetacijskog pokusa ukazuju na veliku raznolikost između sojeva u njihovoj sposobnosti da fiksiraju atmosferski dušik. Od 15 sojeva, za šest ih je utvrđena veća učinkovitost u fiksaciji dušika od kontrole tretiranih mineralnim dušikom, dok je pet sojeva bilo vrlo blizu te vrijednosti. I druga istraživanja pokazala su da među autohtonim sojevima mogu postojati značajne varijacije u simbioznim svojstvima i kapacitetu fiksacije (Mostasso i sur., 2002; Garcia-Fraile 2008; Rahmani i sur., 2011).

U ovom istraživanju, sojevi koji su se pokazali kao visoko učinkoviti u fiksaciji atmosferskog dušika, odnosno oni koji su bili učinkovitiji od pozitivne kontrole (sojevi 3T, 1AT, 16T, 17T, 23T i 2Z) pripadaju vrsti *R. leguminosarum*, dok slabije učinkoviti sojevi pripadaju vrstama *R. pisi,* koja je tipični simbiont graška (*Pisum sativum*) i *R. hidalgonense* koja je nedavno izolirana iz američkih tala.

Osim što su bili visoko učinkoviti u simbioznoj fiksaciji dušika 1AT i 2Z (*R. leguminosarum*) pokazali su i značajnu otpornost prema stresnim čimbenicima toleriravši visoke koncentracije NaCl i promjene u temperaturi. Zbog toga bi ovi sojevi svakako bili dobri kandidati za buduće poljske pokuse.

Kao što je pretpostavljeno, u tlima sjeverozapadne Hrvatske pronađeni su autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju grah, međutim, nije dokazano da agroekološki uvjeti ovoga područja imaju utjecaj na njihovu rasprostranjenost i raznolikost. Izolati su pokazali značajnu raznolikost na razini fenotipa, genotipa te simbiozne učinkovitosti.

S obzirom da su sekvenciranjem gena otkriveni sojevi za koje se pretpostavlja da predstavljaju novu vrstu unutar roda *Rhizobium*, ovo bi trebalo potvrditi daljnjim detaljnim analizama prema standardnim protokolima.

Brojna dosadašnja istraživanja pokazala su da odgovarajući postupci selekcije autohtonih rizobija u svrhu njihovog korištenja kao mikrobioloških preparata za inokulaciju mahunarki, mogu pridonijeti poboljšanju kvalitete proizvodnje hrane i očuvanju okoliša. Temeljem rezultata ovog rada odabrana su četiri kvalitetna soja (16T, 23T, 1AT i 2Z) za korištenje u daljnjim istraživanjima kojima bi se moglo pridonijeti razvoju novih preparata za održiv uzgoj graha kao kulture koja ima velik proizvodni potencijal u Hrvatskoj.

6. ZAKLJUČCI

1. U gotovo svim istraživanim tlima sjeverozapadne Hrvatske utvrđeno je postojanje autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju grah što potvrđuje osnovnu pretpostavku ovih istraživanja.

2. Nije utvrđena povezanost agroekoloških uvjeta istraživanog područja sa rasprostranjenošću i sastavom prirodne populacije rizobija.

3. Unutar prirodnih populacija rizobija u tlima sjeverozapadne Hrvatske, utvrđena je znatno veća genotipska raznolikost od očekivane. Primjenom RAPD analize, istraživani sojevi grupirani u 15 skupina.

4. Primjenom metode MALDI-TOF MS izolati su pokazali najveću podudarnost sa vrstama koje pripadaju filogenetskoj skupini *R. leguminosarum.* Ova skupina uključuje vrste sa vrlo sličnim ili čak istim sekvencama *rrs* gena zbog čega je provedena analiza sekvenci njihovih konstitucijskih gena.

5. Analizom sekvenci *rrs* gena te *atpD* i *recA* gena potvrđeno je da istraživani izolati pripadaju vrstama *R. leguminosarum*, *R. pisi* i *R. hidalgonense*, dok su neki sojevi tvorili zasebne linije na filogenetskim stablima dovoljno udaljene od najbližih tipskih sojeva da se može pretpostaviti da se radi o novim vrstama roda *Rhizobium*.

6. Rezultati analize *nodC* gena pokazuju da svi sojevi izolirani iz tala sjeverozapadne Hrvatske na kojima se uzgaja grah pripadaju simbiovaru phaseoli. U ovom istraživanju je prvi puta utvrđen simbiovar phaseoli kod vrste *R. pisi*.

7. Fenotipske karakteristike izolata ukazuju na njihovu varijabilnost, ali i na značajnu otpornost prema nepovoljnim čimbenicima poput povišene temperature, povećanog sadržaja NaCl-a te niske pH vrijednosti.

8. U vegetacijskom pokusu utvrđena je kompatibilnost svih istraživanih sojeva sa sortama graha Trešnjevac i Slavonski zeleni.

9. Na osnovu svih dobivenih rezultata, kao najkvalitetniji mogu se izdvojiti četiri autohtona soja unutar vrste *R. leguminosarum*. Sojevi 16T i 23T odlikuju se najvećom simbioznom

učinkovitošću dok sojeve 1AT i 2Z karakterizira i otpornost na visok sadržaj NaCl-a i širok raspon temperatura.

10. Zbog ovih karakteristika, navedene sojeve *R. leguminosarum* (1AT, 2Z, 16T i 23T) trebalo bi uključiti u daljnja istraživanja s ciljem njihove primjene u proizvodnji inokuluma.

11. Osim toga, bilo bi korisno istraživanja proširiti na veći broj izolata te obuhvatiti i druge regije u Republici Hrvatskoj s obzirom na postojanje simbioznog potencijala prirodnih populacija rizobija čime bi se mogla značajno unaprijediti proizvodnja graha.

7. POPIS LITERATURE

1. Adhikari D., Itoh K., Suyama K. (2013). Genetic diversity of common bean (Phaseolus vulgaris L.) nodulating rhizobia in Nepal. Plant and Soil 368: 341–353.
2. Aebersold R., Mann M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422: 198-207.
3. Aguilar O.M., Riva O., Peltzer E. (2004). Analysis of Rhizobium etli and of its symbiosis with wild Phaseolus vulgaris supports coevolution in centers of host diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 13548-13553.
4. Alberton O., Kaschuk G., Hungria M. (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean Soil Biology and Biochemistry 38: 1298–1307.
5. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.
6. Alvarez-Martinez E.R., Valverde A., Ramirez-Bahena M.H., Garcia-Fraile P., Tejedor C., Mateos P.F., Santillana N., Zuniga D., Peix A., Velazquez E. (2009). The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating Vicia from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of Rhizobium leguminosarum strains together with Vicia seeds. Archives of Microbiology 191: 659-668.
7. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. (1997). Rhizobium gallicum sp. nov. and Rhizobium giardinii sp. nov., from Phaseolus vulgaris nodules. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 996-1006.
8. An D.S., Im W.T., Yang H.C., Lee S.T. (2016). Shinella granuli gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of Zoogloea ramigera ATCC 19623 as Shinella zoogloeoides sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 443-448.
9. Andrade D.S., Murphy P.J., Giller K.E. (2002). Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian oxisol. Soil Biology and Biochemistry 34: 477–485.
10. AOAC. (1995). Officinal method of analysis of AOAC International. 16th Edition, Vol. I, Arlington, USA.
11. Aoki S., Kondo T., Prevost D., Nakata S., Kajita T., Ito M. (2010). Genotypic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from Lathyrus japonicus indigenous to Japan. Systematic and Applied Microbiology 33(7): 383–397.

12. Aserse A.A., Rasanen L.A., Assefa F., Hailemariam A., Lindstrom K. (2012). Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (Phaseolus vulgaris L.) in Ethiopia. Systematic and Applied Microbiology 35: 120-131.
13. Becana M., Sprent J.I. (1987). Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. Physiologia Plantarum 70:757–765.
14. Bellucci E., Bitocchi E., Ferrarini A. (2014). Decreased nucleotide and expression diversity and modified coexpression patterns characterize domestication in the common bean. Plant Cell 26: 1901-1912.
15. Beringer J.E. (1974). R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. Journal of General Microbiology 84: 128-163.
16. Berrada H., Fikri-Benbrahim K. (2014) Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal 4(6): 616-639.
17. Beynon J.L., Josey D. P. (1980). Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. Journal of General Microbiology 118: 437-442.
18. Biswas B., Gresshoff P.M. (2014). The Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Sustainable Production of Biofuels. International Journal of Molecular Sciences 15: 7380-7397.
19. Bitocchi E., Nanni L., Bellucci E. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) is revealed by sequence data. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109: 788–E796.
20. Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G., Prod'hom G. (2010). Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. Journal of Clinical Microbiology 48(5): 1549-1554.
21. Blažinkov M. (2006). Genetička raznolikost prirodnih populacija Rhizobium leguminosarum bv. viciae u tlima ekološkog područja sjeverozapadne Hrvatske. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
22. Borošić J. (1992). Komponente priroda graha mahunara (Phaseolus vulgaris L. var. nanus Martens) u postrnim rokovima sjetve. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
23. Bouhmouch I., Souad-Mouhsine B., Brhada F., Aurag J. (2005). Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of Phaseolus vulgaris under salt stress. Journal of Plant Physiology 162: 1103–1113.
24. Božanić R., Tratnik, Lj. (1999). Prebiotički supstrati i bakterije ,liječne kiseline. Mljekarstvo 49(1): 27-46.

25. Bradić M., Sikora S., Redžepović S., Štafa Z. (2003). Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous Sinorhizobium meliloti field population. Food technology and Biotechnology 41(1): 69 – 75.
26. Britvec M., Dubravec K., Žutić I., Franjić J. (1993). Anatomska građa sjemene ljuske domaćih kultivara i populacija graha (Phaseolus vulgaris L). Poljoprivredna znanstvena smotra 58(3): 215 – 232.
27. Camara C.R.S., Urrea C.A., Schlegel V. (2013). Pinto Beans (Phaseolus vulgaris L.) as a Functional Food: Implications on Human Health. Agriculture 3: 90-111.
28. Carović-Stanko K., Herak Ćustić M., Grdiša M., Lazarević B., Vidak M. (2015). Diversity among Croatian common bean (Phaseolus vulgaris L.) landraces. Abstract book II. International plant breeding congress and EUCARPIA-oil and protein crops section conference UZUN, Antalya, Turkey, str. 203-203.
29. Chen Z., Swissheim K., Sager R. (1994). A Cautionary Note on Reaction tube for Differential Display and cDNA Amplification in Thermal Cycling. BioTechniques 16: 1003-1006.
30. Chen W.M., Faria S.M., Straliotto R., Pitard R.M., Simoes-Araujo J.L., Chou J.H., Chou Y.J., Barrios E., Prescott A.R., Elliott G.N., Sprent J.I., Young J.P.W.. James E. K. (2005) Proof that Burkholderia Strains Form Effective Symbioses with Legumes: a Study of Novel Mimosa-Nodulating Strains from South America. Applied and Environmental Microbiology 71: 7461-7471.
31. Corich V., Giacomini A., Carlot M., Simon R., Tichy H.V., Squartini A., Nuti M. P. (2001). Comparative strain typing of Rhizobium leguminosarum bv. viciae natural populations. Canadian Journal of Microbiology 47: 580-584.
32. Da Silva K., Florentino L.A., Barroso da Silva K.B., de Brandt E., Vandamme P., de Souza Moreira F.M. (2012). *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. Systematic and Applied Microbiology 35:175-182.
33. Dall'Agnol R.F., Ribeiro R.A., Delamuta J.R., Ormeno-Orrillo E., Rogel M.A., Andrade D.S., Martinez-Romero E., Hungria M. (2014). Rhizobium paranaense sp. nov., an effective N2-fixing symbiont of common bean (Phaseolus vulgaris L.) with broad geographical distribution in Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 3222-3229.
34. De Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B., Gillis M. (1992). Allorhizobium undicola gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate Neptunia natans in Senegal. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 93-96.

35. De Ron A.M, Papa R., Bitocchi E., Gonzalez A.M., Debouck D.G., Brick M.A., Fourie D., Marsolais F., Beaver F., Geffroy V., McClean P., Santalla M., Lozano R., Yuste-Lisbona F.J., Casquero P.A. (2015). Common Bean. U: Grain Legumes, Handbook of Plant Breeding (ur. De Ron A.M.), Springer Science Business Media, New York, str. 1-36.
36. Debouck D.G., Toro O., Paredes O.M. (1993) Genetic diversity and ecological distribution of Phaseolus vulgaris in northwestern South America. Economic Botany 47: 408–423.
37. Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P.E., Tognolini M., Borges G., Crozier A. (2012). Dietary polyphenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxidants Redox Signals 18(14): 1818-1892.
38. Diaz-Alcantara C.A., Ramirez-Bahena M.H., Mulas D., Garcia-Fraile P., Gomez-Moriano A., Peix A., Velazquez E., Gonzalez-Andres F. (2014). Analysis of rhizobial strains nodulating Phaseolus vulgaris from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. Systematic and Applied Microbiology 37: 149-156.
39. Donnarumma F., Bazzicalupo M., Blažinkov M., Mengoni A., Sikora S., Huić Babić K. (2014). Biogeography of Sinorhizobium meliloti nodulating alfalfa in different Croatian regions. Research in Microbiology 165: 508-16.
40. Dresler-Nurmi A., Fewer D.P., Rasanen L.A., Lindstrom K. (2009). The Diversity and Evolution of Rhizobia. U: Prokaryotic Symbionts in Plants (ur. Pawlowski K.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 3-42.
41. Dreyfus B., Garcia J.L., Gillis M. (1988). Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Sesbania rostrata. International Journal of Systematic Bacteriology 38: 89-98.
42. Eaglesham A.R.J. (1984). Tropical stress ecology of rhizobia, root-nodulation and legume nitrogen fixation. U: Current Developments in Biological Nitrogen Fixation, (ur. Subba Rao, N.S.), Edward Arnold Publishers, London, United Kingdom, str. 1-35.
43. El-Sheikh E.A.E, Wood M. (1995). Nodulation and N2 fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. Soil Biology and Biochemistry 27: 657–661.
44. Elbanna K., Elbadry M., Gamal-Eldina H. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate snap bean (Phaseolus vulgaris L.) in Egyptian soils. Systematic and Applied Microbiology 32: 522–530.

45. FAO. (1999). Phaseolus bean: Post-harvest operations INPhO Post-Harvest Compendium, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
46. FAO. (2002). FAO. Vol 56. Production yearbook. Rome, Italy.
47. FAO mrežna stranica (http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC pristupljeno: 24.02.2017.)
48. Faghire M., Mandri B., Oufdou A., Bargaz C., Ghoulam K., Ramírez-Bahena M.H., Velazquez E., Peix A. (2012). Identification at the species and symbiovar levels of strains nodulating Phaseolus vulgaris in saline soils of the Marrakech region (Morocco) and analysis of the otsA gene putatively involved in osmotolerance. Systematic and Applied Microbiology 35: 156–164.
49. Feregrino-Perez A., Berumen L.C., Garcia-Alcocer G., Guevara-Gonzalez R.G., Ramos-Gomez M., Reynoso-Camacho R., Acosta-Gallegos J., Loarca-Piña G. (2008) Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (Phaseolus vulgaris L.) on azoxymethane-induced colon cancer. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 8737–8744.
50. Ferreira L., Sanchez-Juanes F., Garcia-Fraile P., Rivas R., Mateos P.F., Martinez-Molina E. (2011). MALDI-TOFmass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. PLoSONE 6: e20223.
51. Frank B. (1889). Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 7: 332-346.
52. Garcia-Fraile P. (2008) Identificacion y Caracterizacion de Bacterias que Nodulan Phaseolus en Diferentes Regiones de Espana (Identification and Characterization of Bacteria that nodule Phaseolus in different Regions in Spain). Thesis doctoral, University of Salamanca, Spain.
53. Garcia-Fraile P., Mulas-Garcia D., Peix A., Rivas R., Gonzalez-Andres .F, Velazquez E. (2010). Phaseolus vulgaris is nodulated in northern Spain by Rhizobium leguminosarum strains harboring two nodC alleles present in American Rhizobium etli strains: biogeographical and evolutionary implications. Canadian Journal of Microbiology 56: 657-666.
54. Gaunt M. W., Turner S. L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S. A., Young J. P. W. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 2037-2048.
55. Gepts P., Debouck D. G. (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (Phaseolus vulgaris L.). U: Common beans: Research for crop

improvement (ur. van Schoohoven A., Voysest, O.), C.A.B. Int., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. str. 7-53.

56. Glenn A.R., Dilworth M. (1981). The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast- and slow-growing species of Rhizobium. Archives of Microbiology 129: 233-239.
57. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Lakshmanan K. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. Biotech 5: 355-377.
58. Gottfert M., Rothlisberger S., Kundig C., Beck C., Marty R., Hennecke H. (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the Bradyrhizobium japonicum chromosome. Journal of Bacteriology 183: 1405-1410.
59. Graham P.H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic fixation in Phaseolus vulgaris L.: a review. Field Crops Research 4: 93–112.
60. Graham P.H., Ranalli P. (1997). Common bean (Phaseolus vulgaris L.). Field Crops Research 53: 131-146.
61. Hacker J., Carniel E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. EMBO Report 2: 376-381.
62. Han S.Z., Wang E.T., Chen W.X. (2005 Diverse bacteria isolated from root nodules of Phaseolus vulgaris and species within the genera Campylotropis and Cassia grown in China. Systematic and Applied Microbiology 28: 265–276.
63. Hardarson G. (1994). International FAO/IAEA programmes on biological nitrogen fixation. U: Symbiotic Nitrogen Fixation (ur. Graham P.H., Sadowsky M.J., Vance C.P.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 189–202.
64. Hayat I., Ahmad A., Masud T., Ahmed A., Bashir S. (2014). Nutritional and Health Perspectives of Beans (Phaseolus vulgaris L.): An Overview. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 54: 580–592.
65. Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H.P., Kammen A.V., Bisseling T. (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on Vicia sativa. Plant Physiology 105: 787–797.
66. Herrera-Cervera J.A., Caballero-Mellado J., Laguerre G., Tichy H.V., Requena N., Amager N., Martínez-Romero E., Olivares J., Sanjuan J. (1999). At least five rhizobial species nodulate Phaseolus vulgaris in a Spanish soil. Fems Microbiology Ecology 30: 87-97.
67. Herridge D.F., Peoples M., Boddey R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil 311: 1–18.
68. HRN ISO 11464:2009

69. HRN ISO 10390:2005
70. HRN ISO 10390:2005
71. HRN ISO 138781261:2004
72. Huić Babić K. (2011). Utjecaj simbiozne učinkovitosti autohtonih sojeva Sinorhizobium meliloti na transformacije dušika u tlu i biljci. Doktorski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
73. Hungria M., Andrade D.S., Chueire L.M.O., Probanza A., Gutierrez-Manero F.J., Megias M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobia from Brazil. Soil Biology and Biochemistry 32: 1515-1528.
74. Hungria M., Vargas M.A.T. (2000). Environmental factors affecting N2 fxation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research 65: 151-164.
75. Husnjak S. (2014). Sistematika tala Hrvatske. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.
76. Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C., Gillis M. (1997). Transfer of Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri, Rhizobium mediterraneum, and Rhizobium tianshanense to Mesorhizobium gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 895-898.
77. JDPZ. (1966). Priručnik za ispitivanje zemljišta, knjiga I. Kemijske metode ispitivanja zemljišta, Beograd.
78. Jensen E.S., Peoples M.B., Boddey R.M.; Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves B.J.R., Morrison M.J. (2012) Legumes for mitigation of climate change and provision of feedstocks for biofuels and biorefineries. Agronomy for Sustainable Development 32: 329–364.
79. Jiao Y.S., Yan H., Ji Z.J., Liu Y.H., Sui X.H., Wang E.T., Guo B.L., Chen W.X., Chen W.F. (2015). Rhizobium sophorae sp. nov. and Rhizobium sophoriradicis sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume Sophora flavescens. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65: 497-503.
80. Jordan D.C. (1984). Family III *Rhizobiaceae.* U: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vol I (ur. Krieg N.R., Holt J.G.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, str. 234-242.
81. Junier P., Alfaro M., Guevara R., Witzel K.P, Caru M. (2014). Genetic diversity of Rhizobium present in nodules of Phaseolus vulgaris L. cultivated in two soils of the central region in Chile. Applied Soil Ecology 80: 60–66.
82. Kaschuk G., Hungria M., Andrade D.S., Campo R.J. (2006). Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (Phaseolus vulgaris L.) grown under no-

tillage and conventional systems in Southern Brazil. Applied Soil Ecology 32: 210-220.

83. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.
84. Kucuk C., Kivanc M., Kinaci E. (2006). Characterizaion of Rhizobium sp. isolated from bean. Turkish Journal of Biology 30: 127-132.
85. Kuykendall, L.D. (2005). Family I. Rhizobiaceae. In The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria, The Proteobacteria, Part C. U: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (ur. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M.), Springer, New York, str. 324-362.
86. Laguerre G., Geniaux E., Mazurier S.I., Casartelli R. R., Amarger, N. (1993). Conformity and diversity among field isolates of Rhizobium leguminosarum bv. viciae, bv. trifolii, and bv. phaseoli revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. Canadian Journal of Microbiology 39: 412–419.
87. Laguerre G., Mavingui P., Allard M.R., Charnay M.P., Louvrier P., Mazurier S.I., Rigottier-Gois L., Amarger N. (1996). Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal andsymbiotic gene regions: application to Rhizobium leguminosarum and its different biovars. Applied and Environmental Microbiology 62: 2029- 2036.
88. Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology 147:.981-993.
89. Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. Microbiological Research 169: 2–17.
90. Lemaire B., Dlodlo O., Chimphango S., Stirton C., Schrire B., Boatwright J.S., Honnay O., Smets E., Sprent J.I., James E.K., Muasya A.M. (2015). Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape subregion (South Africa). FEMS Microbiology Ecology 91: 1-17.
91. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak-Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2004). Povrćarstvo, II dopunjeno izdanje. Zrinski d.d., Čakovec.
92. Lešić R. (1984). Istraživanja i selekcioniranje visokorodnih sorti plantažnog graha koji može uspijevati u uvjetima brdsko-planinskog područja. Agronomski glasnik 46(5): 543–561.

93. Lightfield J., Fram N.R., Ely B. (2011). Across Bacterial Phyla, Distantly-Related Genomes with Similar Genomic GC Content Have Similar Patterns of Amino Acid Usage. PLoS ONE 6(3): e17677.
94. Liu Y., Wang R.P., Ren C., Lai Q.L., Zeng R.Y. (2015). Rhizobium marinum sp. nov., a malachite-green-tolerant bacterium isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65: 4449-4454.
95. Lopez-Diez L.I., Sanchez Juanes F., Ramirez Bahena M.H., Gonzalez Buitrago J.M., Peix A., Velazquez E. (2016). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis of rhizobia nodulating Phaseolus vulgaris in different soils. U: Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction (ur. Gonzalez-Andres F., James E.), Springer, Switzerland, str. 73-83.
96. LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Taxonomy 66(1): 44–77.
97. Luthria D.L. (2006). Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. Journal of the Science of Food and Agriculture 86: 2266–2272.
98. Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (Cicer arietinum) growing in Moroccoan soils. Agronomie 22: 321-329.
99. Macary H.S. (1989). Cultivation of legumes in laboratory. U: Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation. Legume/Rhizobium. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
100. Mahler R. L., Wollum A. G. (1980). Influence of water potential on the survival of rhizobia in Goldsboro loamy sand. Soil Science Society of America 44: 988–992.
101. Marek-Kozaczuk M., Leszcz A., Wielbo J., Wdowiak-Wrobel S., Skorupska A. (2013). Rhizobium pisi sv. trifolii K3.22 harboring nod genes of the Rhizobium leguminosarum sv. trifolii cluster. Systematic and Applied Microbiology 36: 252-258.
102. Martinez-Aguilar L., Salazar-Salazar C., Mendez R.D., Caballero-Mellado J., Hirsch A.M., Vasquez-Murrieta M.S., Estrada-de los Santos P. (2013). Burkholderia caballeronis sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (Lycopersicon esculentum) with the ability to effectively nodulate Phaseolus vulgaris. Antonie van Leeuwenhoek 104: 1063-1071.
103. Martinez-Molina E, Sanchez Juanes F., Carro L., Flores-Felix J.D., Pilar Martinez-Hidalgo P., Cerda Castillo E., Gonzalez Buitrago J.M., Velazquez E. (2016). Identification of Rhizobial strains nodulating Pisum sativum in northern spain soils by

MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) analysis. U: Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction (ur. Gonzalez-Andres F., James E.), Springer, Switzerland, str. 37-44.

104. Martinez-Romero E. (2003). Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: overview and perspectives. Plant and Soil 252(1): 11–23.
105. Martínez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A. (1991). Rhizobium tropici: a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp. trees. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 417-426.
106. Matotan Z. (2004). Suvremena proizvodnja povrća. Nakladni zavod globus, Zagreb.
107. McKay I.A., Djordjevic M. (1993). Production and excretion of nod metabolites by Rhizobium leguminosarum biovar trifolii are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the feld. Appllied and Environmental Microbiology 59: 3385-3392.
108. Meier-Kolthoff J.P., Klenk H., Goker M. (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 352-356.
109. Mendes I.C., Bottomley P.J. (1998). Distribution of a population of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii among different size classes of soil aggregates. Applied and Environmental Microbiology 64: 970-975.
110. Michiels J., Dombrecht B., Vermeiren N., Xi C., Luyten E., Vanderleyden J. (1998). Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation. FEMS Microbiology Ecology 26: 193-205.
111. Mmbaga M.T., Steadman J.R. (1992). Nonspecific resistance to rust in pubescent and glabrous common bean genotypes. Phytopathology 82(11): 1283- 1287.
112. Mnasri B., Mrabet M., Laguerre G., Aouani M.E., Mhamdi R. (2007). Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N2-fixation with Phaseolus vulgaris constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of Sinorhizobium meliloti. Archives of Microbiology 187: 79–85.
113. Mostasso l., Mostasso F.l., Dias B.G., Vargas M.A.T., Hungria M. (2002). Selection of bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobial strains for the brazilian cerrados. Field crops research 73: 121-132.
114. Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. Nature 411: 948-950.
115. Mousavi S.A., Osterman J., Wahlberg N., Nesme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., Lindstrom K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-

Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. Systematic and Applied Microbiology 37: 208-215.

116. Mousavi S.A., Willems A., Nesme X., de Lajudie P., Lindstrom K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov, and 13 new species combinations. Systematic and Applied Microbiology 38: 84-90.
117. Mrabet M., Mhamdi R., Tajini F., Tiwari R., Trabelsi M., Aouani M.E. (2005). Competitiveness and symbiotic effectiveness of R. gallicum strain isolated from root nodule of Phaseolus vulgaris. European Journal of Agronomy 22: 209-216.
118. Mulas D., Garcia-Fraile P., Carro L., Ramirez-Bahena M.H., Casquero P., Velazquez E., Gonzalez-Andres F. (2011). Distribution and efficiency of Rhizobium leguminosarum strains nodulating Phaseolus vulgaris in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. Soil Biology and Biochemistry 43: 2283-2293.
119. Muller S.H., Pereira P.A.A. (1995). Nitrogen fixation of common bean (Phaseolus vulgaris L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. Plant and Soil 177: 55–61.
120. Murray P.R. (2012). What is newi n clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOFmas sspectrometry. The Journal of Molecular Diagnostics 14: 419–423.
121. Navarro E., Simonet P., Normand P., Bardin R. (1992). Characterization of natural populations of Nitrobacter spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal-intergenic spacer. Archives of Microbiology 157: 105-107.
122. Paffetti C., Scotti S., Gnocchi S., Fancelli F., Bazzicalupo M. (1996). Genetic diversity of an Italian Rhizobium meliloti population from different Medicago sativa varieties. Applied and Environmental Microbiology 62(7): 2279–2285.
123. Palmer K.M., Young J.P.W. (2000). Higher diversity of Rhizobium leguminosarum Biovar viciae in arable soils than in grass soils. Applied and Environmental Microbiology 66: 2445-2450.
124. Pavlek P. (1972). Utjecaj sorte, roka sjetve i sklopa na prirod mahuna, ukupne zelene mase, te krupnoću mahuna (Phaseolus vulgaris L) u jednokratnoj berbi. Poljoprivredna znanstvena smotra 28(15): 189 – 203.
125. Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Velazquez E., Bedmar E.J. (2015). Bacterial Associations with Legumes. Critical Reviews in Plant Sciences 34:1-3, 17-42.
126. Perez-Ramirez N.O., Rogel M.A., Wang E., Castellanos J.Z., Martinez-Romero E. (1998). Seeds of Phaseolus vulgaris bean carry Rhizobium etli. FEMS Microbiology Ecology 26: 289-296.

127. Pinero D., Martinez E., Selander R.K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. Applied and Environmental Microbiology 54: 2825-2832.
128. Pohajda I. (2011). Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva Rhizobium spp. izoliranih iz tala Zagrebačke županije. Disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
129. Prabhu R.R., Kulkarni M.J., Parasharami V.A., Santhakumari B., Paranjape S. (2007). An attempt at taxonomical characterization of some Rhizobial species by intact cell MALDI mass spectrometry. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 177–185.
130. Rahmani H.A., Rasanen L.A., Afshari M., Lindström K. (2011) Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of Phaseolus vulgaris L. grown in soils of Iran. Applied Soil Ecology 48(3): 287–293.
131. Ramirez-Bahena M.H., Garcia-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J.M., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Velazquez E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species Rhizobium leguminosarum (Frank 1879) Frank 1889 AL, Rhizobium phaseoli Dangeard 1926 AL and Rhizobium trifolii Dangeard 1926 AL. R. trifolii is a later synonym of R.leguminosarum. Reclassification of the strain R. leguminosarum DSM 30132 (=NCIMB 11478) as Rhizobium pisi sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 2484–2490.
132. Rashid M.H., Krehenbrink M., Akhtar M.S. (2015). Nitrogen-Fixing Plant-Microbe Symbioses. U: Sustainable Agriculture Reviews (ur. Lichtfouse E.), Springer International Publishing, Switzerland, str. 193-234.
133. Rashid M.H., Young J.P., Everall I., Clercx P., Willems A., Santhosh Braun M., Wink M. (2015). Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of Rhizobium lentis sp. nov, Rhizobium bangladeshense sp. nov. and Rhizobium binae sp. nov. from lentil (Lens culinaris) nodules. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65: 3037-3045.
134. Redžepović S., Strunjak R., Varga B., Heneberg R., Slamić F., Bašić F., Špeut M., Puhalo D., Dušanić, B. (1986). Prvi rezultati bakterizacije soje s Hup^+ sojem Bradyrhizobium japonicum u SR Hrvatskoj. Agronomski glasnik 48(1-2): 3 – 11.
135. Ribeiro R.A., Barcellos F.G., Thompson F.L., Hungria M. (2009). Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (Phaseolus vulgaris L.) reveals unexpected taxonomic diversity. Research in Microbiology 160(4): 297-306.
136. Ribeiro R.A., Martins T.B., Ormeno-Orrillo E., Marçon Delamuta J.R., Rogel M.A., Martinez-Romero E., Hungria M. (2015). *Rhizobium ecuadorense* sp. nov., an indigenous N2-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris*

L.) genetic pool. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65: 3162-3169.

137. Rivas R., Velazquez E., Valverde A., Mateos P.F., Martínez-Molina E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. Electrophoresis 22: 1086-1089.
138. Rivas R., Velazquez E., Palomo J.L., Mateos P.F., Garcia-Benavides P., Martinez-Molina E. (2002). Rapid identification of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus using two primers radom amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. European Journal of Plant Pathology 108: 179-184.
139. Rivas R., Peix A., Mateos P.F., Trujillo M.E., Martinez-Molina E., Velazquez E. (2006). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. Plant and Soil 287: 23-33.
140. Roberts G.P., Leps W.T., Silver L.E., Brill W.J. (1980). Use of Twe-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis to Identify and Classify Rhizobium strains. Applied and Environmental Microbiology 39: 414-422.
141. Robledo M.L., Rivera J., Jiménez-Zurdo I., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch A.M., Mateos P.F. (2012). Role of Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. Microbial Cell Factories 11: 125-137.
142. Rodriguez-Navarro D.N., Buendia A.M., Camacho M., Lucas M.M., Santamaria C. (2000). Characterization of Rhizobium spp. bean isolates from South-West Spain. Soil Biology and Biochemistry 32: 1601-1613.
143. Rogel M.A., Ormeno-Orrillo E., Martinez-Romero E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. Systematic and Applied Microbiology 34: 96-104.
144. Roman-Ponce B., Jing Zhang Y., Vásquez-Murrieta S.M., Hua Sui X., Feng Chen W., Padilla C.A.J., Guo X.W., Gao L.J., Yan J., Hong Wei G., Wang E.T. (2016). Rhizobium acidisoli sp. nov., isolated from root nodules of Phaseolus vulgaris in acid soils. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66: 398-406.
145. Romani A., Vignolini P., Galardi C., Mulinacci N., Benedettelli S., Heimler, D. (2004). Germplasm characterization of Zolfino landraces (Phaseolus Vulgaris L.) by flavonoid content. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 3838–3842.
146. Sadowsky M.J., Graham P.H. (1998). Soil biology of the Rhizobiaceae. U: The Rhizobiaceae: Molecular Biology of model plant-associated bacteria, (ur. Spaink H., Kondorosi A., Hooykaas J.J.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, str. 155-167.

147. Saidi S., Ramırez-Bahena M. H., Santillana N., Zuniga D., Alvarez-Martınez E., Peix A., Mhamdi R., Velazquez E. (2014). Rhizobium laguerreae sp. nov. nodulates Vicia faba in several continents. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 242–247.
148. Saitou N., Nei M. (1987). A neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.
149. Sanchez-Juanes F., Ferreira L, de la Vegad P.A., Valverde A., Barrios M.L., Rivas R., Mateos P., Martinez-Molina E., Gonzalez-Buitrago J.M., Trujillo M.E., Velázquez E. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of Bradyrhizobium species: Application to the identificationof Lupinus nodulating strains. Systematic and Applied Microbiology 36: 565–571.
150. Schulthess B., Brodner K., Bloemberg G.V., Zbinden R., Bottger E.C., Hombach M. (2013). Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. Journal of Clinical Microbiology 51: 1834-1840.
151. Segovia L., Pinero D., Palacios R., Martinez Romero E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic Rhizobium leguminosarum. Applied and Environmental Microbiology 57:426–433.
152. Segovia L., Young J.P., Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type I strains as Rhizobium etli sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 43: 374-377.
153. Sikora S. (1996). Simbiozna učinkovitost prirodne populacije *Bradyrhizobium japonicum* izolirane iz nekih tala zapadne Slavonije, Doktorska disetracija, Agronomski fakultet, Zagreb.
154. Sikora S., Redžepović S., Bradić M. (2002). Genomic fingerprinting of Bradyrhizobium japonicum isolates by RAPD and rep-PCR Microbiological Research 157(3): 213–219.
155. Sikora S., Redžepović S. (2003). Genotypic characterization of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. Food Technology and Biotechnology 41(1): 61–67.
156. Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Martinez-Romero E., Souza V. (2003). Rhizobium etli and Rhizobium gallicum nodulate common bean (Phaseolus vulgaris) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. Applied and Environmental Microbiology 69: 884-893.

157. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S. (2015) MALDITOFmass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis Frontiers in Microbiology 5: 1-16.
158. Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York.
159. Stepkowski T., Moulin L., Krzyzańska A., McInnes A., Law I.J., Howieson J. (2005). European origin of Bradyrhizobium populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. Applied and Environmental Microbiology 71(11): 7041-7052.
160. Strunjak R. (1965). Prilog poznavanja antigene strukture domaćih sojeva Rhizobium-a djeteline i lucerne, Doktorska disertacija, Zagreb.
161. Tamimi S., Young J.P.W. (2004) Rhizobium etli is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. Applied Soil Ecology 26: 193–200.
162. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
163. Terefework Z., Kaijalainen S., Lindstrom K. (2001). AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of*Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis.* Journal of Biotechnology 92: 169–180.
164. Thompson M., Brick M.A., McGinley J.N., Thompson H.J. (2009). Chemical composition and mammary cancer inhibitory activity of dry bean. Crop Sciences 49: 179–176.
165. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignement aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Research 25: 4876-4882.
166. Treutter D. (2010). Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding - Visions and constraints. International Journal of Molecular Sciences 11: 807–857.
167. Todorović J., Vasić M., Todorović V. (2008). Pasulj i boranija. Institut za ratastvo i povrtarstvo, Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, Banja Luka.
168. Unkovich J.M., Pate S.P. (2000). An appraisal of recent field measurements of symbiotic N2 fixation by annual legumes. Field Crops Research 65: 211-228.
169. Valverde A., Igual J.M., Peix A, Cervantes E., Velazquez E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 2631-2637.

170. Valverde A., Velazquez E., Cervantes E., Igual J.M.,van Berkum P. (2011) Evidence of an American Origin for Symbiosis-Related Genes in Rhizobium lusitanum Applied and Environmental Microbiology 77: 5665-5670.
171. Velazquez E., Garcia-Fraile P., Ramirez-Bahena M.H., Rivas R., Martinez-Molina E. (*u postupku objave*). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. U: Microbes for Legume Improvement 2nd edition (ur. Saghir Khan M., Zaidi A., Musarrat J.) Springer- Verlag, Germany.
172. Verastegui-Valdes M.M., Zhang Y.J., Rivera-Orduna F.N., Hai-Ping C., Sui X.H., Wang E.T. (2014). Microsymbionts of Phaseolus vulgaris in acid and alkaline soils of Mexico. Systematic and Applied Microbiology 37: 605–612.
173. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology 5: 25-40.
174. Vidak M., Malešević S., Grdiša M., Šatović Z., Lazarević B., Carović-Stanko K. (2015). Phenotypic Diversity among Croatian Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Landraces. Poljoprivredna znanstvena smotra 80: 133-137.
175. Vidović O., Todorović J. (1988). Pasulj, NIRO Zadrugar, Sarajevo.
176. Villadas P.J., Lasa A.V., Martinez-Hidalgo P., Flores-Felix J.D., Martinez-Molina E., Toro N., Velazquez E., Fernandez-Lopez M. (2017). Analysis of rhizobial endosymbionts of Vicia, Lathyrus and Trifolium species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). Systematic and Applied Microbiology 40: 92-101.
177. Vincent J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
178. Vinuesa P., Rademaker J.L.W., de Bruijn F.J., Werner D. (1998). Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. Applied and Environmental Microbiology 64: 2096-2104.
179. Vinuesa P., Silva C., Lorite M.J., Izaguirre-Mayoral M.L., Bedmar E.J. Martínez-Romero E. (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from rrs, atpD, recA and nifH sequences, and their use in the classification of Sesbania microsymbionts from Venezuelan wetlands. Systematic and Applied Microbiology 28(8): 702-716.

180. Wang F., Wang E.T., Wu L.J., Sui X.H., Li J.Y., Chen W.X. (2011). Rhizobium vallis sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61: 2582-2588.
181. Wang L., Cao Y., Wang E.T., Qiao Y.J., Jiao S., Liua,Z.S., Zhao L., Wei G.H. (2016). Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (Phaseolus vulgaris L.) in Shaanxi Province. Systematic and Applied Microbiology 39(3): 211–219.
182. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
183. Wilson J. (1944). Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. Soil Science 58(1): 61-70.
184. Wilson K., Giller K.E., Jefferson R.A. (1991). β-glucuronidase (GUS) operon fusions as a tool for studying plant-microbe interaction. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions 1: 226-229.
185. Woese C.R., Stackebrandt E., Weisburg W.G., Paster B.J., Madigan M.T., Fowler V.J., Hahn C.M., Blanz P., Gupta R., Nealson K.H., Fox G.E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. Systematic and Applied Microbiology 5: 315-326.
186. Wongphatcharachai M., Wang P., Staley C., Chun C.L., Ferguson J.A., Moncada K.M., Sheaffer C.C., Sadowsky M.J. (2015). Site-specific distribution and competitive ability of indigenous bean-nodulating rhizobia isolated from organic fields in Minnesota. Journal of Biotechnology 214(20): 158–168.
187. Xu B., Chang S.K.C. (2012). Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. Food Chemistry 134: 1287–1296.
188. Yan J., Yan H., Liu L.X., Chen W.F., Zhang X.X., Verastegui-Valdes M.M., Wang E.T., Han X.Z. (2017). Rhizobium hidalgonense sp. nov., a nodule endophytic bacterium of Phaseolus vulgaris in acid soil. Archives of Microbiology 199: 97-104.
189. Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. Annual Review of Biomedical Engineering 11: 49-79.
190. Young J.P.W., Haukka K.E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytologist 133: 87–94.
191. Youssef A.N., Sprent J.I. (1983). Effect of NaCl on growth, nitrogenincorporation and chemical composition of inoculated and NH4NO3 fertilized Vicia faba L. plants. Journal of Experimental Botany 143: 303–309.

192. Zahran H.H. (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 968–989.
193. Zahran H.H., Abdel-Fattah M., Yasser M.M., Mahmoud A.M., Bedmar, E.J. (2012). Diversity and Environmental Stress Responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain Legumes. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 6(10): 571-583.
194. Zeghari K., Aurag J., Khbaya B., Kharchaf D., Filali-Maltouf (2000). A. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating Acacia species in the arid and Saharan regions of Morocco. Lettets in Applied Microbiology 30: 351–357.
195. Zeven A.C. (1997) The introduction of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) into Western Europe and the phenotypic variation of dry beans collected in The Netherlands in 1946. Euphytica 94: 319–328.
196. Ziegler D., Mariotti A., Pfluger V., Saad M., Vogel G., Tonolla M., Perret X. (2012). In Situ Identification of Plant-Invasive Bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry PLoSONE 7(5): e37189.
197. Zurdo-Pineiro J.L., Garcia-Fraile P., Rivas R., Peix A., Leon-Barrios M., Willems A., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Velazquez, E., van Berkum P. (2009). Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate Phaseolus vulgaris have characteristics in common with Ensifer meliloti isolates from mainland Spain. Applied and Environmental Microbiology 75: 2354–2359.
198. Žafran J., Redžepović S., Gamulin V. (1996). Characterization of two new strains of Rhizobium leguminosarum biovar. viciae efficient in the nodulation of host plants Poljoprivredna znanstvena smotra. 61(3-4): 157-166.
199. Žafran Novak J. (2000). Karakterizacija autohtonih sojeva Rhizobium leguminosarum biovar. viciae efikasnih u nodulaciji biljaka domaćina. Doktorska disertacija, Zagreb.

ŽIVOTOPIS

Ivana Rajnović rođena je 12.06.1983. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i Opću gimnaziju (X. gimnazija). Diplomirala je 27.06.2008 na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, studij: bilinogojstvo, smjer: zaštita bilja. Diplomski rad pod naslovom „Izolacija i identifikacija autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum*" izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Sanje Sikora. Zapošljava se 15.09.2009. kao asistent na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine upisuje doktorski studij Poljoprivredne znanosti.
Sudjeluje u izvedbi nastave na preddiplomskom i diplomskom studiju Agronomskog fakulteta kao suradnik na modulima: Uvod u mikrobiologiju tla, Biološke osnove plodnosti tla, Mikrobiologija i biokemija tla, Uvod u opću mikrobiologiju, Korisne asocijacije biljaka i mikroorganizama, Mikrobna raznolikost prirodnih i antropogenih ekoloških sustava te Beneficial associations of plants and microorganisms. Bila je voditelj dva završna rada te kao neposredni voditelj sudjelovala u izradi tri diplomska rada.
Aktivna je članica Hrvatskog mikrobiološkog društva u kojem obavlja dužnost blagajnce i sudjeluje u organizaciji skupova te Hrvatskog tloznanstvenog društva.
Boravila je na jednomjesečnom stručnom usavršavanju u *National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms*, Budimpešta, Mađarska, zatim u *Centro Interdipartimentale per la Ricerca in Viticoltura ed Enologia* Conegliano, Italija, te u sklopu programa ERASMUS+ na kraćem znanstvenom usavršavanju u *Univerzidad de Salamanca*- Salamanca, Španjolska.
Koautorica je jednog znanstvenog rada A1 kategorije, dvaju znanstvenih radova A2 kategorije te više znanstvenih radova prezentiranih na međunarodnim kongresima.

Popis objavljenih radova:
Radovi A1 kategorije:
Pohajda, I., Huić Babić, K., **Rajnović, I.,** Kajić, S., Sikora (2016) S. Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Indigenous Common Bean Rhizobia in Croatia. Food Technology and Biotechnology 54 (4).

Radovi A2 kategorije:
Blažinkov, M., Sikora, S. Sudarić, A. Mesić, M. **Rajnović, I.** Redžepović,S. Improvement of Rhizobial Inoculants: a Key Process in Sustainable Soybean Production. Agriculturae Conspectus Scientificus. 80 (2015) , 1; 25-29
Blažinkov, M., Šnajdar, A., Barić,K., Sikora,S., **Rajnović,I**., Redžepović, S.; Utjecaj herbicida na rast sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju grašak, Agronomski glasnik 4-5/2014 (183-19) ISSN 0002-1954

Sažeci u zbornicima skupova:
Kajić, S. Hajdari, E. Komes, A. **Rajnović, I.** Sikora, Sanja. Selection of stress-tolerant indigenous rhizobia nodulating alfalfa (Medicago sativa L.) Power of Microbes in Industry and Environment 2016 Book of Abstracts. Croatian Microbiology Society (ur.). Zagreb, 2016. 77-77 (poster,domaća recenzija,sažetak).
Sikora,S Pohajda.I, Huić Babić, K,.**Rajnović I.,** Blažinkov,M. S. Kajić: Genetic diversity and simbiotic efficiency of indigenosu common bean rhizoba isolated from agricultural soils in the central Croatia. 11th European Nitrogen Fixation Conference, Tenerife, Spain, 7-10 Septemper 2014.
Sikora, Sanja; Huić Babić, Katarina; Blažinkov, Mihaela; **Rajnović, Ivana**; Donnarumma Francesca; Bazzicalupo, Marco. Phenotypic and genotypic characterization of indigenous Sinorhizobium meliloti strains isolated from different regions in Croatia. IVth International conference on environmental, industrial and applied microbiology (BioMicroWorld 2011) Terremolinos, 2011. 66-66 (poster,međunarodna recenzija).

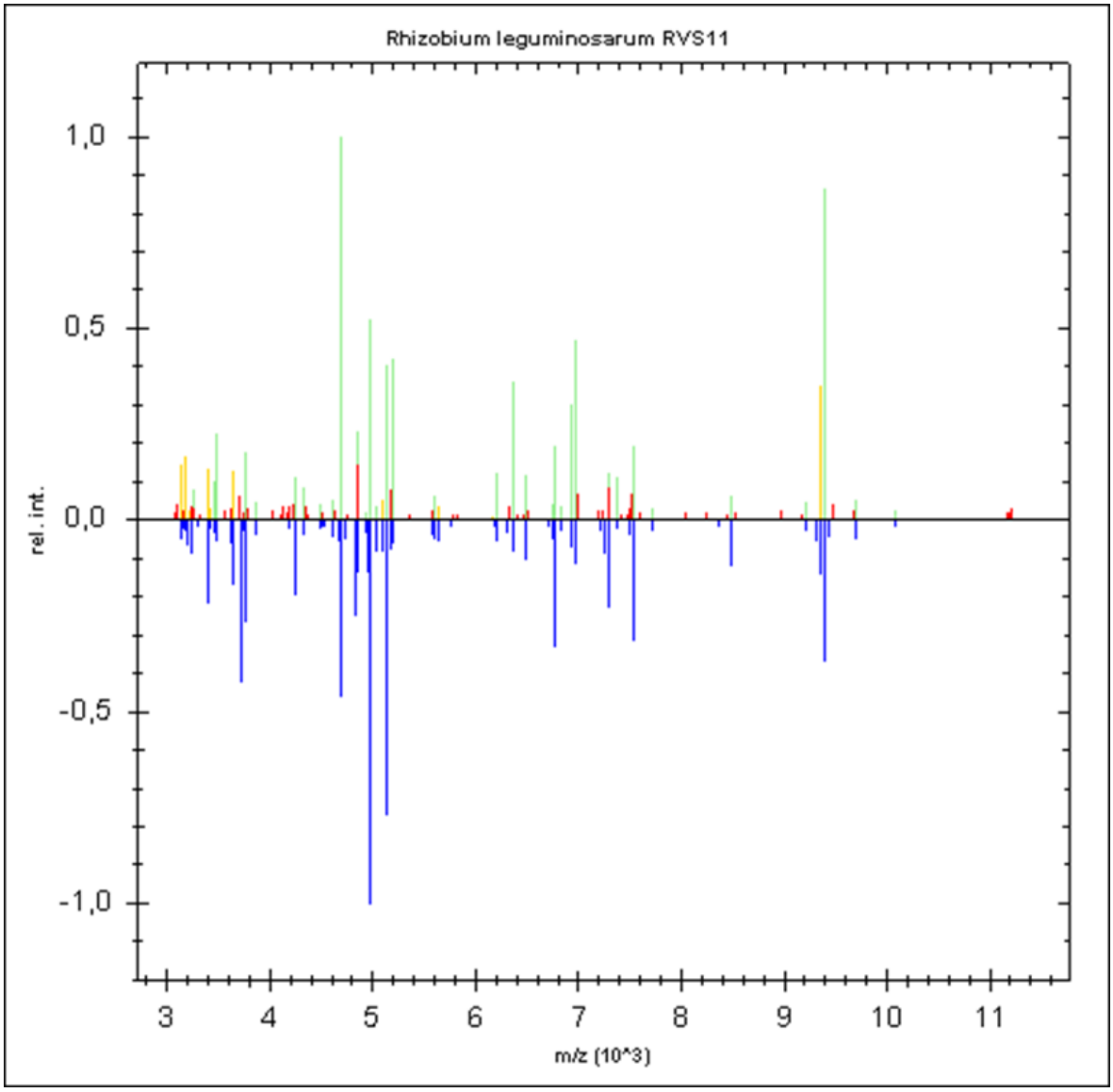
Rajnović, Ivana; Blažinkov, Mihaela; Huić Babić, Katarina; Sraka, Mario; Sikora, Sanja. Microbial abundance and activity as a response to soil covering and mineral nitrogen fertilization (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni). EUROSOIL2012, Bari, Italy

Sikora, Sanja; Huić Babić, Katarina; Blažinkov, Mihaela; **Rajnović, Ivana**; Bazzicalupo, Marco. Stress tolerance assays and genetic diversity of Sinorhizobium meliloti field population. 4th International Congress EUROSOIL 2012 Soil Science for the Benefit for the Mankind and Environment - Book of Abstracts.

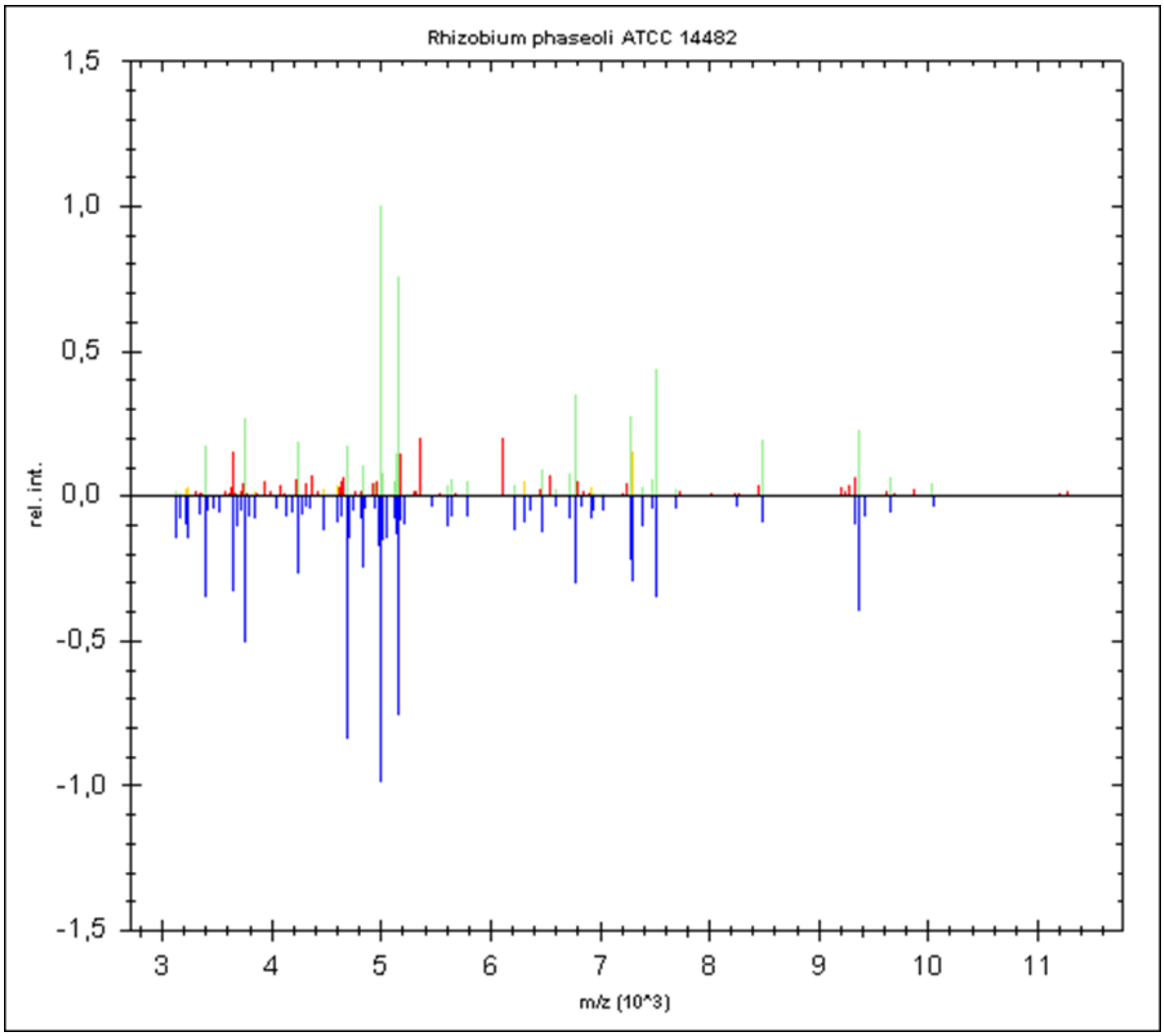
PRILOZI

Prilog 1. Rezultat MALDI TOF MS analize prikazan kao karakterističan spektar peptidnih masa pojedinih izolata uspoređenih sa najsličnijom vrstom.

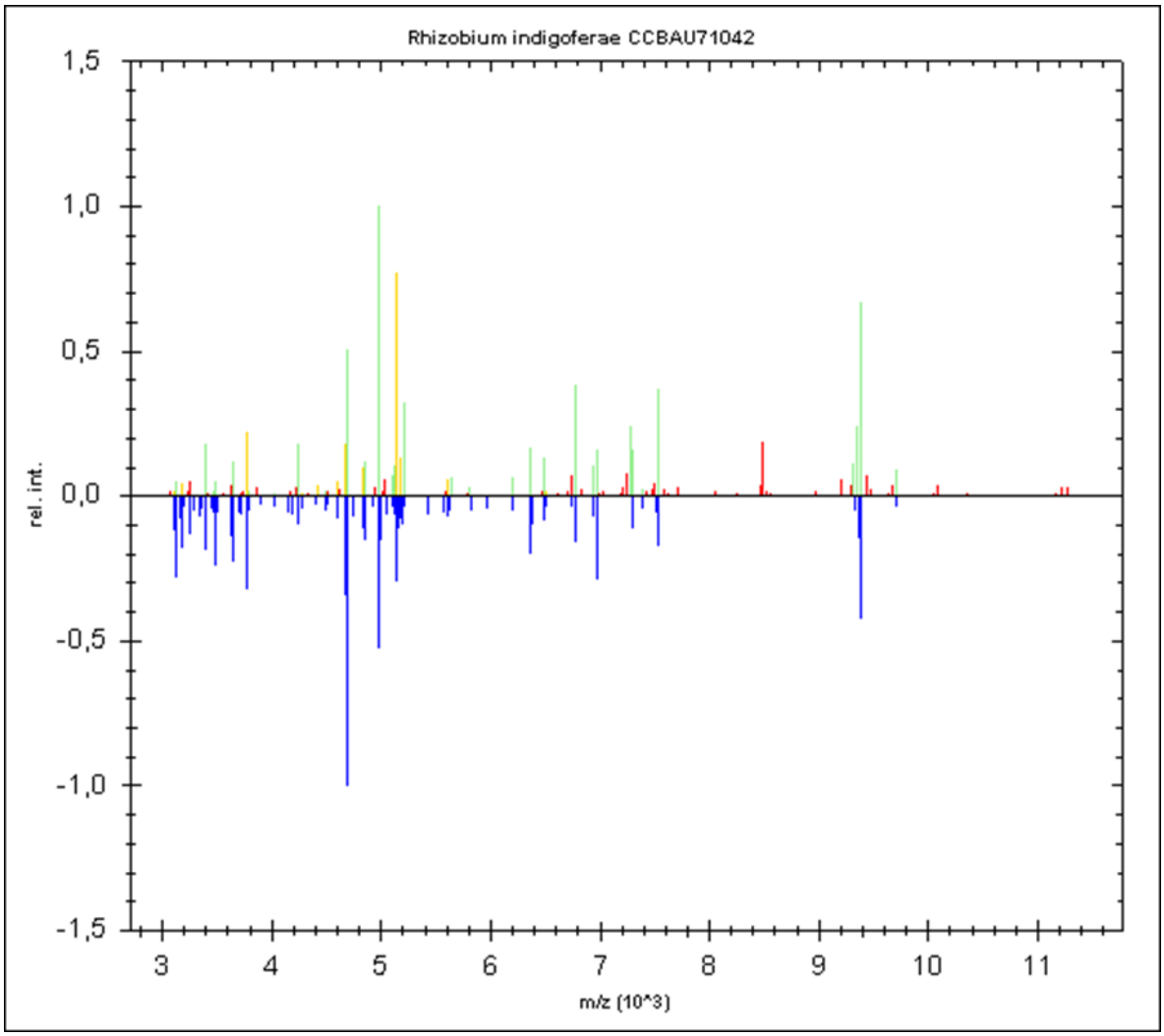
1AT



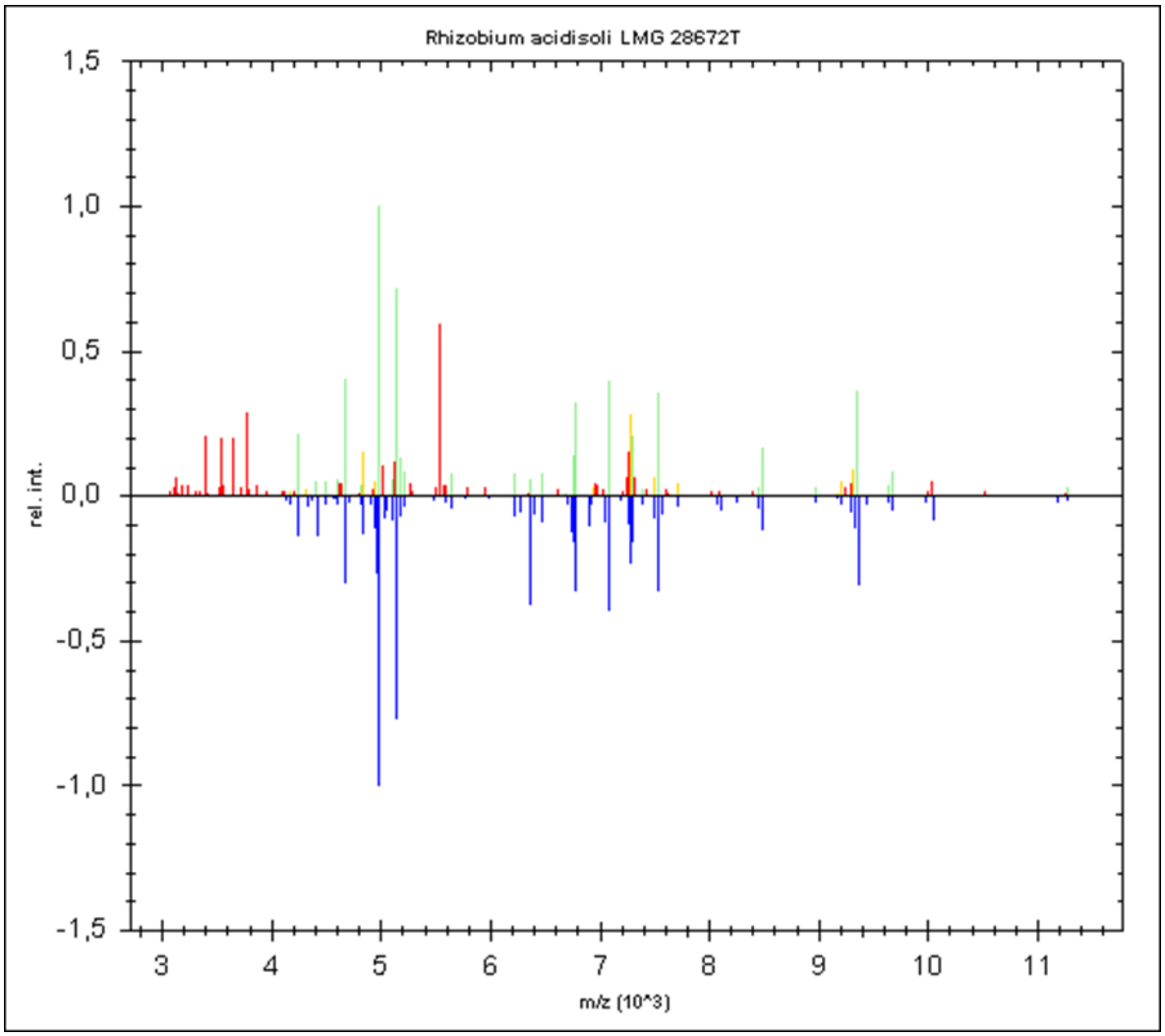
5T


Rhizobium phaseoli ATCC 14482
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

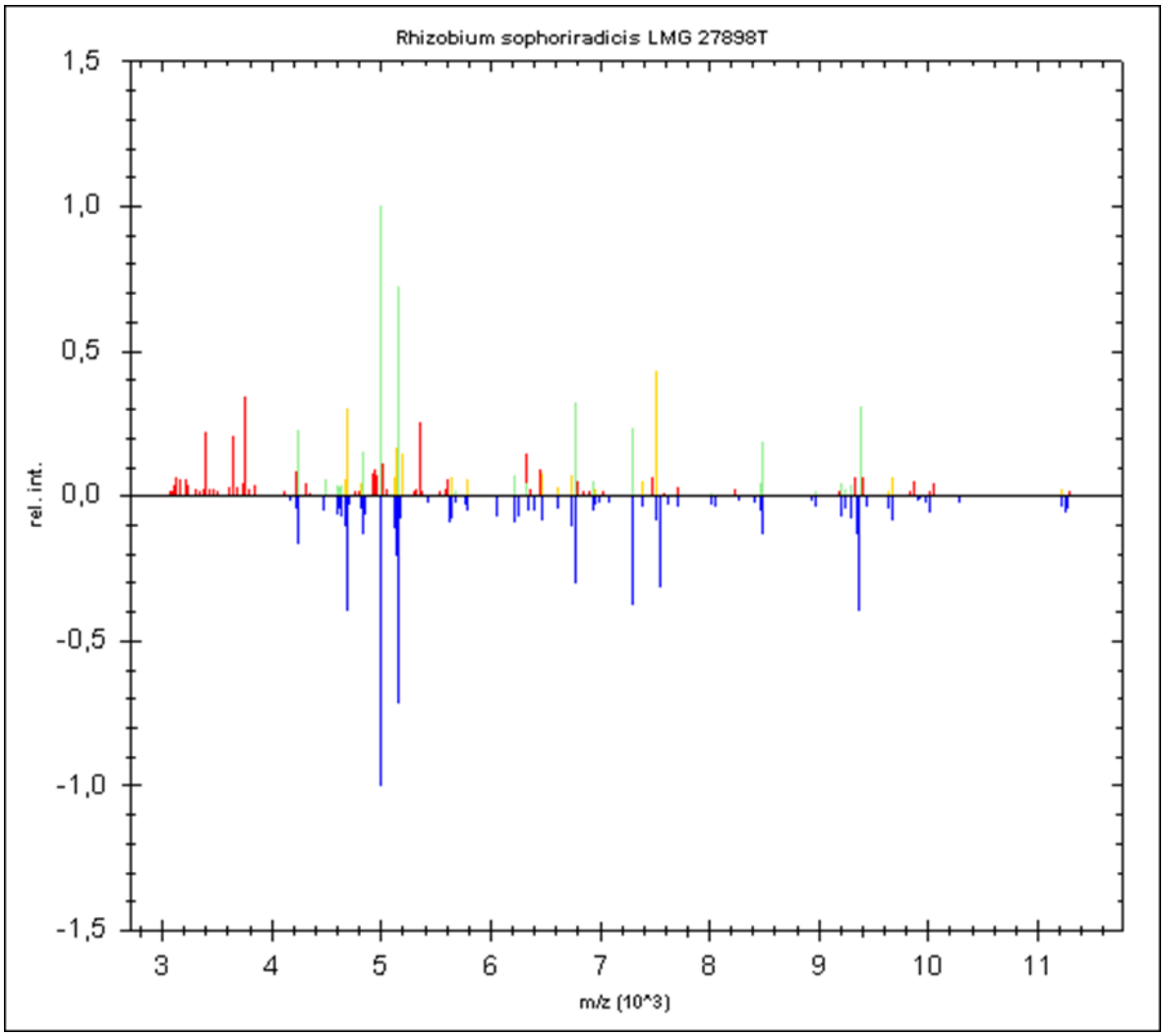
7Z


Rhizobium indigoferae CCBAU71042
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

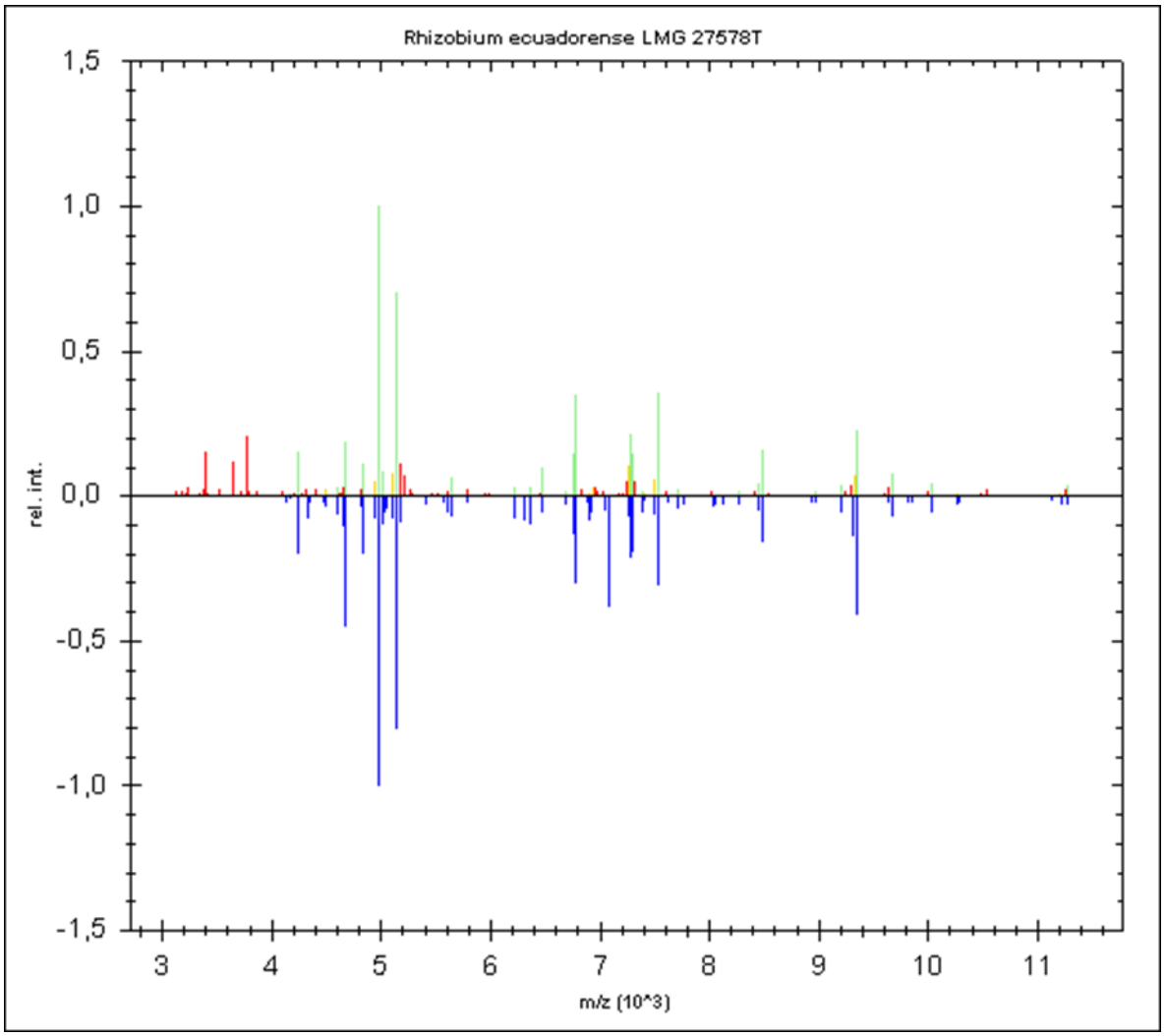
8Z


Rhizobium acidisoli LMG 28672T
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

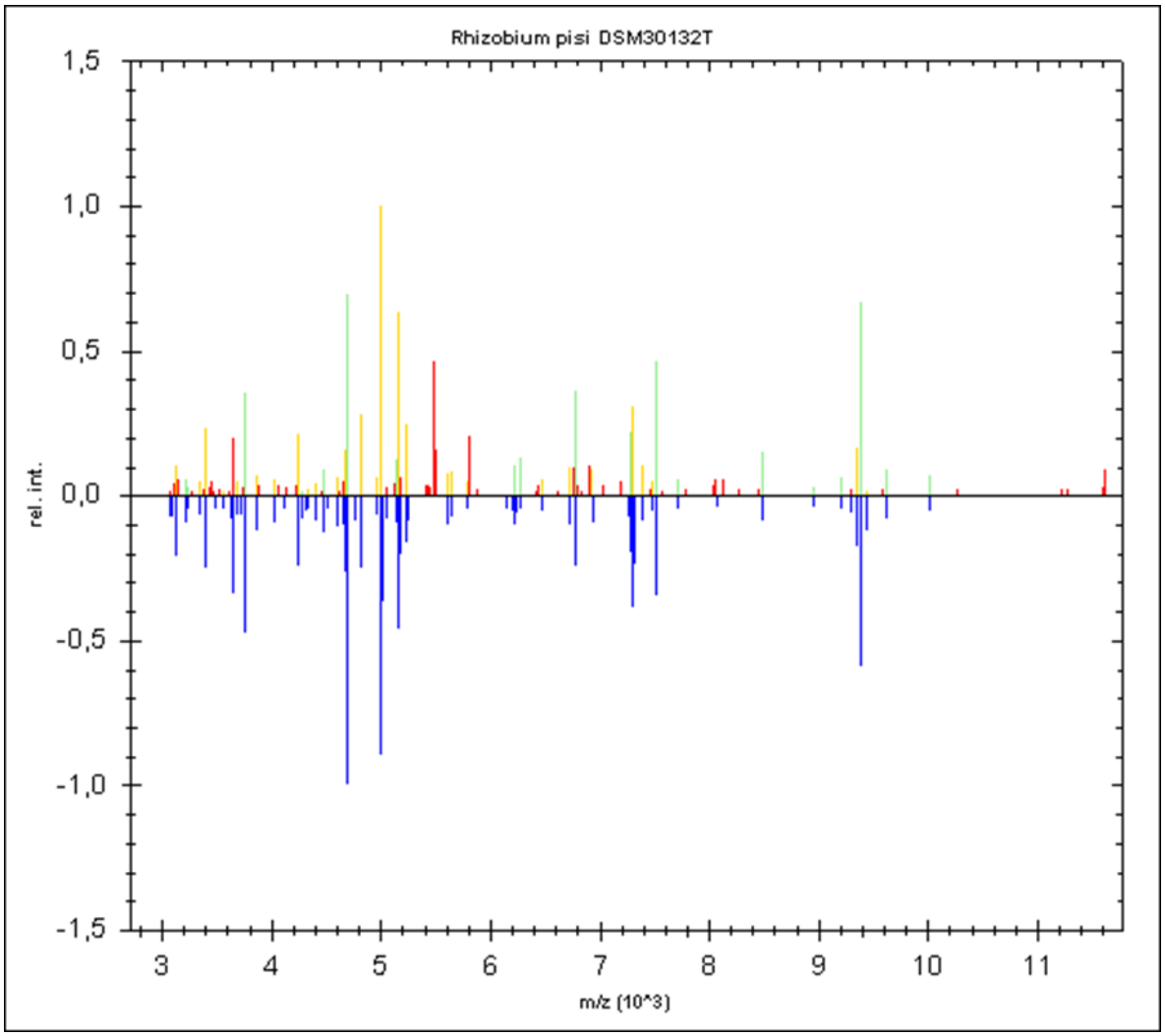
11T


Rhizobium sophoriradicis LMG 27898T
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

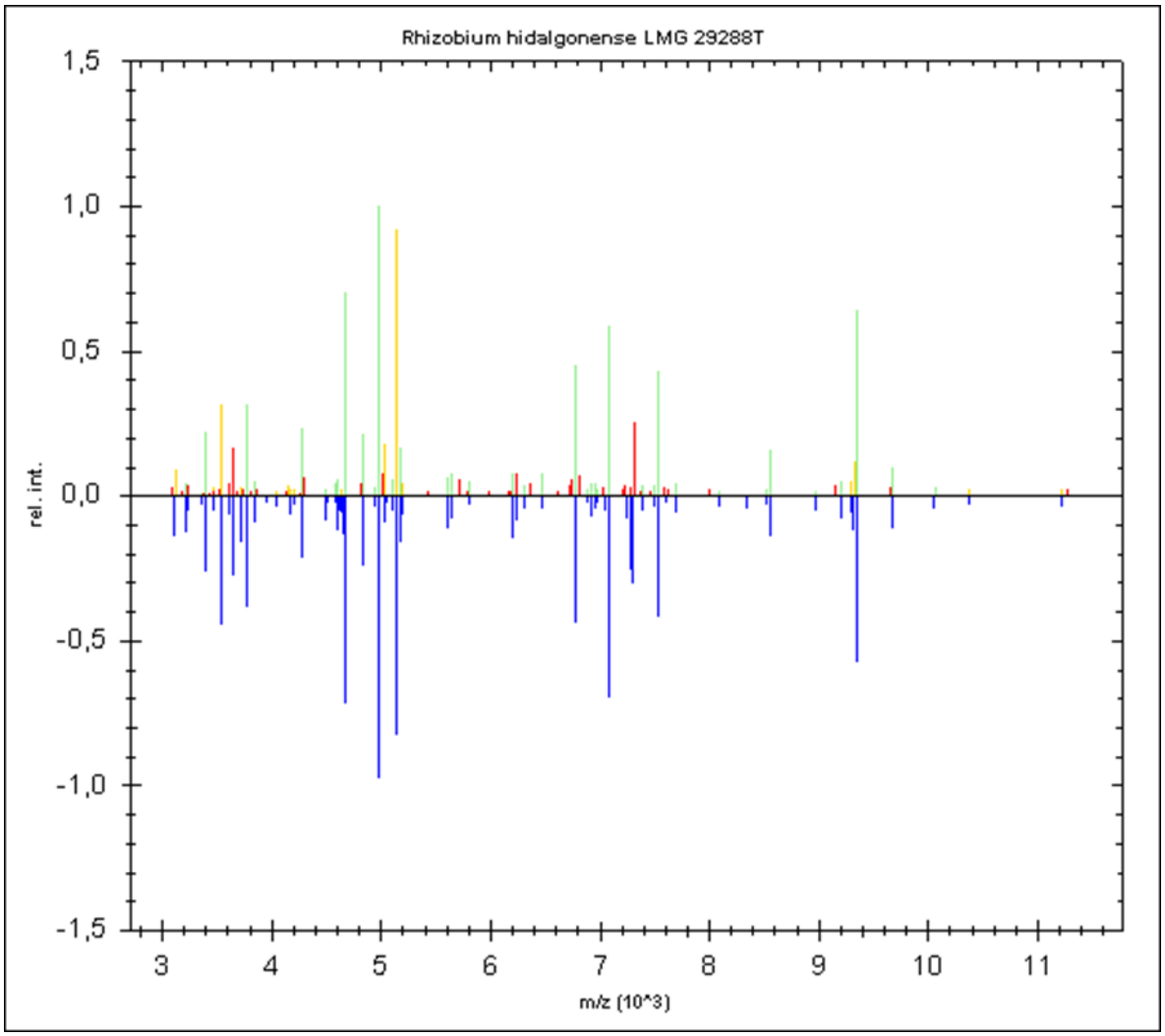
12T


Rhizobium ecuadorense LMG 27578T
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

22BZ


Rhizobium pisi DSM30132T
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

27Z


Rhizobium hidalgonense LMG 29288T
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
rel. int.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
m/z (10^3)

Prilog 2. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije Sorta x Soj na masu suhe tvari kvržica (P= 0,0218*).

2.a. Prosječne vrijednosti kombinacija

sorta	Soj	mstkvrz LSMEAN	LSMEAN Number
SlaZ	1BZ	86,113333	2
SlaZ	20Z	146,576667	3
SlaZ	22AT	188,790000	4
SlaZ	23T	124,666667	5
SlaZ	2Z	115,406667	6
SlaZ	26T	240,000000	7
SlaZ	9T	131,480000	8
SlaZ	3T	104,443333	9
SlaZ	7Z	127,513333	10
SlaZ	12Z	96,983333	11
SlaZ	1AT	149,920000	12
SlaZ	15Z	110,356667	13
SlaZ	16T	91,430000	14
SlaZ	17T	124,416667	15
SlaZ	18T	117,980000	16
SlaZ	3622	119,583333	18
Tres	1BZ	138,806667	20
Tres	20Z	161,170000	21
Tres	22AT	162,780000	22
Tres	23T	107,833333	23
Tres	2Z	112,156667	24
Tres	26T	200,416667	25
Tres	9T	146,476667	26
Tres	3T	130,750000	27
Tres	7Z	110,766667	28
Tres	12Z	110,676667	29
Tres	1AT	101,626667	30
Tres	15Z	118,666667	31
Tres	16T	122,443333	32
Tres	17T	115,793333	33
Tres	18T	111,380000	34
Tres	3622	180,000000	36

2.b. P vrijednosti za usporedbu prosjeka kombinacija iz prilagođenog testa višestrukih usporedbi po Tukeyu.

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1		0.5583	0.0036	0.9935	0.9999	<.0001	0.9508	10.000	0.9831	10.000	0.4449	10.000	10.000	0.9941	0.9997	0.9993	0.8083	0.1579	0.1321	10.000	10.000	0.0005	0.5618	0.9587	10.000	10.000	10.000	0.9996	0.9973	0.9999	10.000	0.0137
2	0.5583		0.9785	10.000	0.9998	0.0147	10.000	0.9790	10.000	0.8828	10.000	0.9974	0.7365	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9931	0.9989	0.7760	10.000	10.000	0.9979	0.9978	0.9554	10.000	10.000	0.9998	0.9984	0.9993
3	0.0036	0.9785		0.4345	0.1887	0.8465	0.6663	0.0517	0.5303	0.0186	0.9927	0.1078	0.0082	0.4264	0.2443	0.2842	0.8746	10.000	10.000	0.0795	0.1326	10.000	0.9778	0.6417	0.1131	0.1119	0.0356	0.2609	0.3647	0.1964	0.1214	10.000
4	0.9935	10.000	0.4345		10.000	0.0004	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9994	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9971	0.9945	10.000	10.000	0.1463	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7307
5	0.9999	0.9998	0.1887	10.000		<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9988	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9460	0.9233	10.000	10.000	0.0474	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.4193
6	<.0001	0.0147	0.8465	0.0004	<.0001		0.0014	<.0001	0.0007	<.0001	0.0237	<.0001	<.0001	0.0004	0.0001	0.0002	0.0045	0.1028	0.1240	<.0001	<.0001	0.9907	0.0145	0.0012	<.0001	<.0001	<.0001	0.0002	0.0003	<.0001	<.0001	0.5743
7	0.9508	10.000	0.6663	10.000	10.000	0.0014		10.000	10.000	0.9988	10.000	10.000	0.9890	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.9998	10.000	10.000	0.2913	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9038
8	10.000	0.9790	0.0517	10.000	10.000	<.0001	10.000		10.000	10.000	0.9495	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9989	0.6857	0.6316	10.000	10.000	0.0101	0.9796	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.1495
9	0.9831	10.000	0.5303	10.000	10.000	0.0007	10.000	10.000		0.9999	10.000	10.000	0.9976	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9992	0.9983	10.000	10.000	0.1983	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8139
10	10.000	0.8828	0.0186	10.000	10.000	<.0001	0.9988	10.000	0.9999		0.8017	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9808	0.4325	0.3815	10.000	10.000	0.0032	0.8849	0.9992	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.0614
11	0.4449	10.000	0.9927	10.000	0.9988	0.0237	10.000	0.9495	10.000	0.8017		0.9907	0.6263	10.000	0.9997	0.9999	10.000	10.000	10.000	0.9793	0.9952	0.8632	10.000	10.000	0.9920	0.9917	0.9079	0.9998	10.000	0.9990	0.9936	0.9999
12	10.000	0.9974	0.1078	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9907		10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8559	0.8156	10.000	10.000	0.0238	0.9975	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.2730
13	10.000	0.7365	0.0082	0.9994	10.000	<.0001	0.9890	10.000	0.9976	10.000	0.6263	10.000		0.9994	10.000	10.000	0.9233	0.2705	0.2318	10.000	10.000	0.0013	0.7396	0.9915	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	0.0293
14	0.9941	10.000	0.4264	10.000	10.000	0.0004	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9994		10.000	10.000	10.000	0.9968	0.9940	10.000	10.000	0.1423	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7228
15	0.9997	10.000	0.2443	10.000	10.000	0.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9997	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	0.9717	0.9570	10.000	10.000	0.0661	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.5048
16	0.9993	10.000	0.2842	10.000	10.000	0.0002	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	0.9821	0.9716	10.000	10.000	0.0808	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.5599
17	0.8083	10.000	0.8746	10.000	10.000	0.0045	10.000	0.9989	10.000	0.9808	10.000	10.000	0.9233	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	0.9998	10.000	0.5188	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9962	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9842
18	0.1579	10.000	10.000	0.9971	0.9460	0.1028	0.9999	0.6857	0.9992	0.4325	10.000	0.8559	0.2705	0.9968	0.9717	0.9821	10.000		10.000	0.7905	0.8945	0.9917	10.000	0.9999	0.8653	0.8633	0.5901	0.9766	0.9931	0.9506	0.8787	10.000
19	0.1321	10.000	10.000	0.9945	0.9233	0.1240	0.9998	0.6316	0.9983	0.3815	10.000	0.8156	0.2318	0.9940	0.9570	0.9716	10.000	10.000		0.7427	0.8603	0.9954	10.000	0.9997	0.8264	0.8240	0.5345	0.9638	0.9880	0.9293	0.8418	10.000
20	10.000	0.9931	0.0795	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9793	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9998	0.7905	0.7427		10.000	0.0166	0.9933	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.2137
21	10.000	0.9989	0.1326	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9952	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8945	0.8603	10.000		0.0306	0.9989	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.3211
22	0.0005	0.7760	10.000	0.1463	0.0474	0.9907	0.2913	0.0101	0.1983	0.0032	0.8632	0.0238	0.0013	0.1423	0.0661	0.0808	0.5188	0.9917	0.9954	0.0166	0.0306		0.7731	0.2724	0.0252	0.0249	0.0066	0.0721	0.1137	0.0499	0.0275	10.000
23	0.5618	10.000	0.9778	10.000	0.9998	0.0145	10.000	0.9796	10.000	0.8849	10.000	0.9975	0.7396	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9933	0.9989	0.7731		10.000	0.9979	0.9979	0.9565	10.000	10.000	0.9999	0.9984	0.9993
24	0.9587	10.000	0.6417	10.000	10.000	0.0012	10.000	10.000	10.000	0.9992	10.000	10.000	0.9915	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.9997	10.000	10.000	0.2724	10.000		10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8898
25	10.000	0.9979	0.1131	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9920	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8653	0.8264	10.000	10.000	0.0252	0.9979	10.000		10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.2835
26	10.000	0.9978	0.1119	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9917	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8633	0.8240	10.000	10.000	0.0249	0.9979	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.2812
27	10.000	0.9554	0.0356	10.000	10.000	<.0001	0.9999	10.000	10.000	10.000	0.9079	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9962	0.5901	0.5345	10.000	10.000	0.0066	0.9565	0.9999	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000	10.000	0.1085
28	0.9996	10.000	0.2609	10.000	10.000	0.0002	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9766	0.9638	10.000	10.000	0.0721	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000	0.5283
29	0.9973	10.000	0.3647	10.000	10.000	0.0003	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9931	0.9880	10.000	10.000	0.1137	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	0.6580
30	0.9999	0.9998	0.1964	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9990	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9506	0.9293	10.000	10.000	0.0499	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	0.4318
31	10.000	0.9984	0.1214	10.000	10.000	<.0001	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9936	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8787	0.8418	10.000	10.000	0.0275	0.9984	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		0.2998
32	0.0137	0.9993	10.000	0.7307	0.4193	0.5743	0.9038	0.1495	0.8139	0.0614	0.9999	0.2730	0.0293	0.7228	0.5048	0.5599	0.9842	10.000	10.000	0.2137	0.3211	10.000	0.9993	0.8898	0.2835	0.2812	0.1085	0.5283	0.6580	0.4318	0.2998	

Prilog 3. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije Sorta x Soj na masu suhe tvari biljke (P=0,0318*).

3.a. Prosječne vrijednosti kombinacija

sorta	Soj	mstbilj LSMEAN	LSMEAN Number
SlaZ	**0**	54,583333	1
SlaZ	**1BZ**	106,943333	2
SlaZ	**20Z**	97,083333	3
SlaZ	**22AT**	125,216667	4
SlaZ	**23T**	145,333333	5
SlaZ	**2Z**	129,406667	6
SlaZ	**26T**	106,620000	7
SlaZ	**9T**	115,333333	8
SlaZ	**3T**	92,776667	9
SlaZ	**7Z**	102,380000	10
SlaZ	**12Z**	116,616667	11
SlaZ	**1AT**	141,190000	12
SlaZ	**15Z**	106,070000	13
SlaZ	**16T**	118,493333	14
SlaZ	**17T**	124,250000	15
SlaZ	**18T**	131,723333	16
SlaZ	**N**	148,730000	17
SlaZ	**3622**	86,946667	18
Tres	**0**	95,396667	19
Tres	**1BZ**	123,390000	20
Tres	**20Z**	133,883333	21
Tres	**22AT**	120,000000	22
Tres	**23T**	150,750000	23
Tres	**2Z**	140,240000	24
Tres	**26T**	115,666667	25
Tres	**9T**	130,953333	26
Tres	**3T**	163,666667	27
Tres	**7Z**	129,230000	28
Tres	**12Z**	144,603333	29
Tres	**1AT**	125,753333	30
Tres	**15Z**	123,963333	31
Tres	**16T**	163,276667	32
Tres	**17T**	142,170000	33
Tres	**18T**	124,833333	34
Tres	**N**	137,360000	35
Tres	**3622**	138,000000	36

3.b. P vrijednosti za usporedbu prosjeka kombinacija iz prilagođenog testa višestrukih usporedbi po Tukeyu.

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
1		0.3921	0.8103	0.0263	0.0004	0.0119	0.4054	0.1359	0.9286	0.5914	0.1122	0.0010	0.4284	0.0837	0.0313	0.0075	0.0002	0.9909	0.8647	0.0365	0.0048	0.0654	0.0001	0.0013	0.1294	0.0087	<.0001	0.0123	0.0005	0.0238	0.0330	<.0001	0.0008	0.0282	0.0023	0.0020
2	0.3921		10.000	10.000	0.9247	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9802	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.8345	10.000	10.000	10.000	0.9996	10.000	0.7619	0.9865	10.000	10.000	0.2365	10.000	0.9385	10.000	10.000	0.2484	0.9716	10.000	0.9965	0.9951
3	0.8103	10.000		0.9991	0.5710	0.9911	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7501	10.000	10.000	0.9995	0.9771	0.4216	10.000	10.000	0.9997	0.9523	10.000	0.3408	0.7866	10.000	0.9829	0.0538	0.9918	0.6038	0.9987	0.9996	0.0575	0.7100	0.9993	0.8799	0.8617
4	0.0263	10.000	0.9991		10.000	10.000	10.000	10.000	0.9906	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9271	0.9974	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	0.9234	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9311	10.000	10.000	10.000	10.000
5	0.0004	0.9247	0.5710	10.000		10.000	0.9179	0.9972	0.3842	0.7941	0.9986	10.000	0.9056	0.9996	10.000	10.000	10.000	0.1899	0.4955	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.9977	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
6	0.0119	10.000	0.9911	10.000	10.000		10.000	10.000	0.9548	0.9995	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8117	0.9820	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9801	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9829	10.000	10.000	10.000	10.000
7	0.4054	10.000	10.000	10.000	0.9179	10.000		10.000	10.000	10.000	10.000	0.9777	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.8238	10.000	10.000	10.000	0.9995	10.000	0.7491	0.9845	10.000	0.9999	0.2268	10.000	0.9326	10.000	10.000	0.2385	0.9683	10.000	0.9958	0.9943
8	0.1359	10.000	10.000	10.000	0.9972	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9859	0.9989	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9697	0.9999	10.000	10.000	0.5672	10.000	0.9981	10.000	10.000	0.5848	0.9996	10.000	10.000	10.000
9	0.9286	10.000	10.000	0.9906	0.3842	0.9548	10.000	10.000		10.000	10.000	0.5636	10.000	0.9998	0.9940	0.9128	0.2605	10.000	10.000	0.9961	0.8560	0.9995	0.2008	0.6063	10.000	0.9289	0.0251	0.9572	0.4141	0.9882	0.9948	0.0269	0.5196	0.9921	0.7309	0.7043
10	0.5914	10.000	10.000	10.000	0.7941	0.9995	10.000	10.000	10.000		10.000	0.9158	10.000	10.000	10.000	0.9980	0.6557	10.000	10.000	10.000	0.9939	10.000	0.5656	0.9349	10.000	0.9988	0.1256	0.9996	0.8199	10.000	10.000	0.1330	0.8927	10.000	0.9740	0.9675
11	0.1122	10.000	10.000	10.000	0.9986	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9919	0.9977	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9811	10.000	10.000	10.000	0.6248	10.000	0.9991	10.000	10.000	0.6421	0.9998	10.000	10.000	10.000
12	0.0010	0.9802	0.7501	10.000	10.000	10.000	0.9777	0.9998	0.5636	0.9158	0.9999		0.9727	10.000	10.000	10.000	10.000	0.3193	0.6800	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
13	0.4284	10.000	10.000	10.000	0.9056	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9727		10.000	10.000	0.9998	0.8047	10.000	10.000	10.000	0.9992	10.000	0.7269	0.9808	10.000	0.9999	0.2111	10.000	0.9217	10.000	10.000	0.2222	0.9618	10.000	0.9945	0.9926
14	0.0837	10.000	10.000	10.000	0.9996	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	0.9968	0.9938	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9914	10.000	10.000	10.000	0.7064	10.000	0.9998	10.000	10.000	0.7226	10.000	10.000	10.000	10.000
15	0.0313	10.000	0.9995	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9940	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	0.9999	0.9445	0.9985	10.000	10.000	10.000	0.9997	10.000	10.000	10.000	0.9019	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9110	10.000	10.000	10.000	10.000
16	0.0075	0.9999	0.9771	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	0.9128	0.9980	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000		10.000	0.7229	0.9589	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9925	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9938	10.000	10.000	10.000	10.000
17	0.0002	0.8345	0.4216	10.000	10.000	10.000	0.8238	0.9859	0.2605	0.6557	0.9919	10.000	0.8047	0.9968	0.9999	10.000		0.1165	0.3535	0.9999	10.000	0.9986	10.000	10.000	0.9877	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
18	0.9909	10.000	10.000	0.9271	0.1899	0.8117	10.000	0.9989	10.000	10.000	0.9977	0.3193	10.000	0.9938	0.9445	0.7229	0.1165		10.000	0.9574	0.6298	0.9878	0.0851	0.3551	0.9986	0.7540	0.0082	0.8178	0.2095	0.9159	0.9491	0.0088	0.2847	0.9344	0.4745	0.4468
19	0.8647	10.000	10.000	0.9974	0.4955	0.9820	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.6800	10.000	10.000	0.9985	0.9589	0.3535	10.000		0.9991	0.9227	0.9999	0.2803	0.7202	10.000	0.9682	0.0402	0.9832	0.5280	0.9966	0.9988	0.0430	0.6371	0.9979	0.8287	0.8067
20	0.0365	10.000	0.9997	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9961	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.9574	0.9991		10.000	10.000	0.9994	10.000	10.000	10.000	0.8799	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8902	10.000	10.000	10.000	10.000
21	0.0048	0.9996	0.9523	10.000	10.000	10.000	0.9995	10.000	0.8560	0.9939	10.000	10.000	0.9992	10.000	10.000	10.000	10.000	0.6298	0.9227	10.000		10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9975	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9980	10.000	10.000	10.000	10.000
22	0.0654	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	0.9995	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9986	0.9878	0.9999	10.000	10.000		0.9958	10.000	10.000	10.000	0.7673	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.7821	10.000	10.000	10.000	10.000
23	0.0001	0.7619	0.3408	0.9998	10.000	10.000	0.7491	0.9697	0.2008	0.5656	0.9811	10.000	0.7269	0.9914	0.9997	10.000	10.000	0.0851	0.2803	0.9994	10.000	0.9958		10.000	0.9731	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.9996	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000
24	0.0013	0.9865	0.7866	10.000	10.000	10.000	0.9845	0.9999	0.6063	0.9349	10.000	10.000	0.9808	10.000	10.000	10.000	10.000	0.3551	0.7202	10.000	10.000	10.000	10.000		0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
25	0.1294	10.000	10.000	10.000	0.9977	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9877	0.9986	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9731	0.9999		10.000	0.5822	10.000	0.9985	10.000	10.000	0.5997	0.9997	10.000	10.000	10.000
26	0.0087	10.000	0.9829	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	0.9289	0.9988	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7540	0.9682	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		0.9894	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9911	10.000	10.000	10.000	10.000
27	<.0001	0.2365	0.0538	0.9234	10.000	0.9801	0.2268	0.5672	0.0251	0.1256	0.6248	10.000	0.2111	0.7064	0.9019	0.9925	10.000	0.0082	0.0402	0.8799	0.9975	0.7673	10.000	10.000	0.5822	0.9894		0.9787	10.000	0.9339	0.8949	10.000	10.000	0.9153	0.9997	0.9998
28	0.0123	10.000	0.9918	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9572	0.9996	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8178	0.9832	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9787		10.000	10.000	10.000	0.9817	10.000	10.000	10.000	10.000
29	0.0005	0.9385	0.6038	10.000	10.000	10.000	0.9326	0.9981	0.4141	0.8199	0.9991	10.000	0.9217	0.9998	10.000	10.000	10.000	0.2095	0.5280	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.9985	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
30	0.0238	10.000	0.9987	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9882	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9159	0.9966	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	0.9339	10.000	10.000		10.000	0.9408	10.000	10.000	10.000	10.000
31	0.0330	10.000	0.9996	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9948	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	0.9491	0.9988	10.000	10.000	10.000	0.9996	10.000	10.000	10.000	0.8949	10.000	10.000	10.000		0.9044	10.000	10.000	10.000	10.000
32	<.0001	0.2484	0.0575	0.9311	10.000	0.9829	0.2385	0.5848	0.0269	0.1330	0.6421	10.000	0.2222	0.7226	0.9110	0.9938	10.000	0.0088	0.0430	0.8902	0.9980	0.7821	10.000	10.000	0.5997	0.9911	10.000	0.9817	10.000	0.9408	0.9044		10.000	0.9236	0.9998	0.9999
33	0.0008	0.9716	0.7100	10.000	10.000	10.000	0.9683	0.9996	0.5196	0.8927	0.9998	10.000	0.9618	10.000	10.000	10.000	10.000	0.2847	0.6371	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9997	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000
34	0.0282	10.000	0.9993	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9921	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9344	0.9979	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	0.9153	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9236	10.000		10.000	10.000
35	0.0023	0.9965	0.8799	10.000	10.000	10.000	0.9958	10.000	0.7309	0.9740	10.000	10.000	0.9945	10.000	10.000	10.000	10.000	0.4745	0.8287	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9997	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000		10.000
36	0.0020	0.9951	0.8617	10.000	10.000	10.000	0.9943	10.000	0.7043	0.9675	10.000	10.000	0.9926	10.000	10.000	10.000	10.000	0.4468	0.8067	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	

Prilog 4. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije Sorta x Soj na količinu ukupnog dušika u biljci (P= 0,0059*).

4.a. Prosječne vrijednosti kombinacija

sorta	Soj	ukupN LSMEAN	LSMEAN Number
SlaZ	**0**	103,300000	1
SlaZ	**1BZ**	283,333333	2
SlaZ	**20Z**	187,033333	3
SlaZ	**22AT**	251,133333	4
SlaZ	**23T**	294,766667	5
SlaZ	**2Z**	313,733333	6
SlaZ	**26T**	206,200000	7
SlaZ	**9T**	246,833333	8
SlaZ	**3T**	220,466667	9
SlaZ	**7Z**	228,400000	10
SlaZ	**12Z**	247,533333	11
SlaZ	**1AT**	327,700000	12
SlaZ	**15Z**	266,966667	13
SlaZ	**16T**	289,666667	14
SlaZ	**17T**	281,400000	15
SlaZ	**18T**	310,500000	16
SlaZ	**N**	331,600000	17
SlaZ	**3622**	184,466667	18
Tres	**0**	141,066667	19
Tres	**1BZ**	340,500000	20
Tres	**20Z**	290,400000	21
Tres	**22AT**	256,733333	22
Tres	**23T**	392,233333	23
Tres	**2Z**	373,366667	24
Tres	**26T**	294,100000	25
Tres	**9T**	300,000000	26
Tres	**3T**	423,800000	27
Tres	**7Z**	339,666667	28
Tres	**12Z**	369,466667	29
Tres	**1AT**	319,000000	30
Tres	**15Z**	315,600000	31
Tres	**16T**	435,766667	32
Tres	**17T**	349,500000	33
Tres	**18T**	301,533333	34
Tres	**N**	293,800000	35
Tres	**3622**	346,733333	36

4.b. P vrijednosti za usporedbu prosjeka kombinacija iz prilagođenog testa višestrukih usporedbi po Tukeyu.

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
1		0.0167	0.9822	0.1518	0.0067	0.0013	0.8355	0.1936	0.6026	0.4592	0.1863	0.0004	0.0553	0.0101	0.0194	0.0018	0.0003	0.9884	10.000	0.0001	0.0096	0.1083	<.0001	<.0001	0.0071	0.0043	<.0001	0.0001	<.0001	0.0008	0.0011	<.0001	<.0001	0.0038	0.0073	<.0001
2	0.0167		0.9099	10.000	10.000	10.000	0.9945	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8841	0.2074	10.000	10.000	10.000	0.7467	0.9561	10.000	10.000	0.2282	10.000	0.9743	10.000	10.000	0.1152	0.9996	10.000	10.000	0.9998
3	0.9822	0.9099		0.9998	0.7653	0.4314	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.9999	0.2258	0.9906	0.8390	0.9266	0.4882	0.1828	10.000	10.000	0.1081	0.8293	0.9990	0.0021	0.0102	0.7757	0.6779	0.0001	0.1138	0.0138	0.3451	0.3998	<.0001	0.0601	0.6507	0.7803	0.0724
4	0.1518	10.000	0.9998		10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9951	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9897	0.9995	0.7275	0.9597	10.000	10.000	0.2207	0.5103	10.000	10.000	0.0291	0.9640	0.5813	0.9994	0.9998	0.0116	0.8894	10.000	10.000	0.9162
5	0.0067	10.000	0.7653	10.000		10.000	0.9638	10.000	0.9969	0.9996	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7236	0.1065	10.000	10.000	10.000	0.8987	0.9927	10.000	10.000	0.3921	10.000	0.9967	10.000	10.000	0.2219	10.000	10.000	10.000	10.000
6	0.0013	10.000	0.4314	0.9999	10.000		0.7684	0.9995	0.9351	0.9772	0.9996	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.3882	0.0291	10.000	10.000	10.000	0.9928	0.9999	10.000	10.000	0.7275	10.000	10.000	10.000	10.000	0.5139	10.000	10.000	10.000	10.000
7	0.8355	0.9945	10.000	10.000	0.9638	0.7684		10.000	10.000	10.000	10.000	0.5236	0.9999	0.9829	0.9963	0.8164	0.4539	10.000	0.9997	0.3100	0.9808	10.000	0.0104	0.0433	0.9669	0.9311	0.0007	0.3223	0.0569	0.6808	0.7385	0.0002	0.1961	0.9185	0.9683	0.2274
8	0.1936	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.9995	10.000		10.000	10.000	10.000	0.9890	10.000	10.000	10.000	0.9998	0.9790	0.9999	0.7953	0.9321	10.000	10.000	0.1745	0.4343	10.000	10.000	0.0211	0.9383	0.5031	0.9981	0.9992	0.0082	0.8386	10.000	10.000	0.8726
9	0.6026	0.9999	10.000	10.000	0.9969	0.9351	10.000	10.000		10.000	10.000	0.7731	10.000	0.9991	0.9999	0.9561	0.7096	10.000	0.9915	0.5503	0.9989	10.000	0.0311	0.1120	0.9974	0.9913	0.0025	0.5655	0.1418	0.8877	0.9202	0.0009	0.3921	0.9886	0.9975	0.4389
10	0.4592	10.000	10.000	10.000	0.9996	0.9772	10.000	10.000	10.000		10.000	0.8793	10.000	0.9999	10.000	0.9863	0.8315	10.000	0.9695	0.6930	0.9999	10.000	0.0547	0.1788	0.9996	0.9983	0.0048	0.7073	0.2211	0.9528	0.9700	0.0017	0.5309	0.9976	0.9997	0.5813
11	0.1863	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.9996	10.000	10.000	10.000	10.000		0.9902	10.000	10.000	10.000	0.9998	0.9812	0.9998	0.7848	0.9373	10.000	10.000	0.1815	0.4464	10.000	10.000	0.0223	0.9431	0.5158	0.9984	0.9993	0.0087	0.8476	10.000	10.000	0.8805
12	0.0004	10.000	0.2258	0.9951	10.000	10.000	0.5236	0.9890	0.7731	0.8793	0.9902		0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.1968	0.0099	10.000	10.000	0.9986	0.9998	10.000	10.000	10.000	0.9117	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7600	10.000	10.000	10.000	10.000
13	0.0553	10.000	0.9906	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999		10.000	10.000	10.000	0.9997	0.9854	0.4452	0.9974	10.000	10.000	0.4563	0.7858	10.000	10.000	0.0873	0.9979	0.8407	10.000	10.000	0.0386	0.9853	10.000	10.000	0.9909
14	0.0101	10.000	0.8390	10.000	10.000	10.000	0.9829	10.000	0.9991	0.9999	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	10.000	0.8036	0.1451	10.000	10.000	10.000	0.8399	0.9823	10.000	10.000	0.3125	10.000	0.9909	10.000	10.000	0.1677	0.9999	10.000	10.000	10.000
15	0.0194	10.000	0.9266	10.000	10.000	10.000	0.9963	10.000	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	10.000	0.9039	0.2298	10.000	10.000	10.000	0.7146	0.9443	10.000	10.000	0.2059	10.000	0.9662	10.000	10.000	0.1022	0.9993	10.000	10.000	0.9997
16	0.0018	10.000	0.4882	10.000	10.000	10.000	0.8164	0.9998	0.9561	0.9863	0.9998	10.000	10.000	10.000	10.000		10.000	0.4429	0.0369	10.000	10.000	10.000	0.9872	0.9999	10.000	10.000	0.6720	10.000	10.000	10.000	10.000	0.4563	10.000	10.000	10.000	10.000
17	0.0003	10.000	0.1828	0.9897	10.000	10.000	0.4539	0.9790	0.7096	0.8315	0.9812	10.000	0.9997	10.000	10.000	10.000		0.1581	0.0072	10.000	10.000	0.9965	0.9999	10.000	10.000	10.000	0.9427	10.000	10.000	10.000	10.000	0.8183	10.000	10.000	10.000	10.000
18	0.9884	0.8841	10.000	0.9995	0.7236	0.3882	10.000	0.9999	10.000	10.000	0.9998	0.1968	0.9854	0.8036	0.9039	0.4429	0.1581		10.000	0.0919	0.7928	0.9981	0.0017	0.0083	0.7347	0.6322	<.0001	0.0969	0.0113	0.3067	0.3581	<.0001	0.0503	0.6044	0.7396	0.0609
19	10.000	0.2074	10.000	0.7275	0.1065	0.0291	0.9997	0.7953	0.9915	0.9695	0.7848	0.0099	0.4452	0.1451	0.2298	0.0369	0.0072	10.000		0.0034	0.1390	0.6298	<.0001	0.0002	0.1110	0.0761	<.0001	0.0037	0.0003	0.0196	0.0254	<.0001	0.0016	0.0688	0.1131	0.0020
20	0.0001	10.000	0.1081	0.9597	10.000	10.000	0.3100	0.9321	0.5503	0.6930	0.9373	10.000	0.9974	10.000	10.000	10.000	10.000	0.0919	0.0034		10.000	0.9821	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9834	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9191	10.000	10.000	10.000	10.000
21	0.0096	10.000	0.8293	10.000	10.000	10.000	0.9808	10.000	0.9989	0.9999	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7928	0.1390	10.000		10.000	0.8493	0.9842	10.000	10.000	0.3233	10.000	0.9920	10.000	10.000	0.1748	10.000	10.000	10.000	10.000
22	0.1083	10.000	0.9990	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9986	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9965	0.9981	0.6298	0.9821	10.000		0.2929	0.6123	10.000	10.000	0.0437	0.9843	0.6820	0.9999	10.000	0.0180	0.9387	10.000	10.000	0.9563
23	<.0001	0.7467	0.0021	0.2207	0.8987	0.9928	0.0104	0.1745	0.0311	0.0547	0.1815	0.9998	0.4563	0.8399	0.7146	0.9872	0.9999	0.0017	<.0001	10.000	0.8493	0.2929		10.000	0.8919	0.9425	10.000	10.000	10.000	0.9976	0.9950	10.000	10.000	0.9523	0.8887	10.000
24	<.0001	0.9561	0.0102	0.5103	0.9927	0.9999	0.0433	0.4343	0.1120	0.1788	0.4464	10.000	0.7858	0.9823	0.9443	0.9999	10.000	0.0083	0.0002	10.000	0.9842	0.6123	10.000		0.9917	0.9975	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9999	10.000	0.9983	0.9912	10.000
25	0.0071	10.000	0.7757	10.000	10.000	10.000	0.9669	10.000	0.9974	0.9996	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7347	0.1110	10.000	10.000	10.000	0.8919	0.9917		10.000	0.3811	10.000	0.9962	10.000	10.000	0.2142	10.000	10.000	10.000	10.000
26	0.0043	10.000	0.6779	10.000	10.000	10.000	0.9311	10.000	0.9913	0.9983	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.6322	0.0761	10.000	10.000	10.000	0.9425	0.9975	10.000		0.4822	10.000	0.9990	10.000	10.000	0.2891	10.000	10.000	10.000	10.000
27	<.0001	0.2282	0.0001	0.0291	0.3921	0.7275	0.0007	0.0211	0.0025	0.0048	0.0223	0.9117	0.0873	0.3125	0.2059	0.6720	0.9427	<.0001	<.0001	0.9834	0.3233	0.0437	10.000	10.000	0.3811	0.4822		0.9810	10.000	0.8093	0.7579	10.000	0.9969	0.5097	0.3763	0.9946
28	0.0001	10.000	0.1138	0.9640	10.000	10.000	0.3223	0.9383	0.5655	0.7073	0.9431	10.000	0.9979	10.000	10.000	10.000	10.000	0.0969	0.0037	10.000	10.000	0.9843	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9810		10.000	10.000	10.000	0.9117	10.000	10.000	10.000	10.000
29	<.0001	0.9743	0.0138	0.5813	0.9967	10.000	0.0569	0.5031	0.1418	0.2211	0.5158	10.000	0.8407	0.9909	0.9662	10.000	10.000	0.0113	0.0003	10.000	0.9920	0.6820	10.000	10.000	0.9962	0.9990	10.000	10.000		10.000	10.000	0.9996	10.000	0.9993	0.9959	10.000
30	0.0008	10.000	0.3451	0.9994	10.000	10.000	0.6808	0.9981	0.8877	0.9528	0.9984	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.3067	0.0196	10.000	10.000	0.9999	0.9976	10.000	10.000	10.000	0.8093	10.000	10.000		10.000	0.6099	10.000	10.000	10.000	10.000
31	0.0011	10.000	0.3998	0.9998	10.000	10.000	0.7385	0.9992	0.9202	0.9700	0.9993	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.3581	0.0254	10.000	10.000	10.000	0.9950	10.000	10.000	10.000	0.7579	10.000	10.000	10.000		0.5479	10.000	10.000	10.000	10.000
32	<.0001	0.1152	<.0001	0.0116	0.2219	0.5139	0.0002	0.0082	0.0009	0.0017	0.0087	0.7600	0.0386	0.1677	0.1022	0.4563	0.8183	<.0001	<.0001	0.9191	0.1748	0.0180	10.000	0.9999	0.2142	0.2891	10.000	0.9117	0.9996	0.6099	0.5479		0.9738	0.3110	0.2107	0.9615
33	<.0001	0.9996	0.0601	0.8894	10.000	10.000	0.1961	0.8386	0.3921	0.5309	0.8476	10.000	0.9853	0.9999	0.9993	10.000	10.000	0.0503	0.0016	10.000	10.000	0.9387	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9969	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9738		10.000	10.000	10.000
34	0.0038	10.000	0.6507	10.000	10.000	10.000	0.9185	10.000	0.9886	0.9976	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.6044	0.0688	10.000	10.000	10.000	0.9523	0.9983	10.000	10.000	0.5097	10.000	0.9993	10.000	10.000	0.3110	10.000		10.000	10.000
35	0.0073	10.000	0.7803	10.000	10.000	10.000	0.9683	10.000	0.9975	0.9997	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	0.7396	0.1131	10.000	10.000	10.000	0.8887	0.9912	10.000	10.000	0.3763	10.000	0.9959	10.000	10.000	0.2107	10.000	10.000		10.000
36	<.0001	0.9998	0.0724	0.9162	10.000	10.000	0.2274	0.8726	0.4389	0.5813	0.8805	10.000	0.9909	10.000	0.9997	10.000	10.000	0.0609	0.0020	10.000	10.000	0.9563	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9946	10.000	10.000	10.000	10.000	0.9615	10.000	10.000	10.000	