

# Filogenetska analiza autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju soju (*Glycine max* L.) i njihova simbiozna učinkovitost u uvjetima suše

---

Kajić, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:319417>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
AGRONOMSKI FAKULTET

Sanja Kajić

**FILOGENETSKA ANALIZA  
AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE  
NODULIRAJU SOJU (*GLYCINE MAX* L.) I  
NJIHOVA SIMBIOZNA UČINKOVITOST U  
UVJETIMA SUŠE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



University of Zagreb  
FACULTY OF AGRICULTURE

Sanja Kajić

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF  
INDIGENOUS RHIZOBIAL STRAINS  
NODULATING SOYBEAN (*GLYCINE  
MAX L.*) AND THEIR SYMBIOTIC  
EFFICIENCY UNDER DROUGHT  
CONDITIONS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
AGRONOMSKI FAKULTET

SANJA KAJIĆ

**FILOGENETSKA ANALIZA  
AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE  
NODULIRAJU SOJU (*GLYCINE MAX* L.) I  
NJIHOVA SIMBIOZNA UČINKOVITOST U  
UVJETIMA SUŠE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof.dr.sc. Sanja Sikora

Zagreb, 2020.



University of Zagreb  
FACULTY OF AGRICULTURE

Sanja Kajić

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF  
INDIGENOUS RHIZOBIAL STRAINS  
NODULATING SOYBEAN (*GYCINE MAX  
L.*) AND THEIR SYMBIOTIC EFFICIENCY  
UNDER DROUGHT CONDITIONS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Sanja Sikora, PhD

Zagreb, 2020.

## 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:** 210
- **Broj slika:** 55
- **Broj tablica:** 47
- **Broj priloga:** 5
- **Broj literaturnih referenci:** 227
- **Datum obrane doktorskog rada:** 18.12.2020.
- **Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:**
  1. Prof. dr. sc. Milan Poljak
  2. Prof. dr. sc. Ivan Pejić
  3. Prof. dr. sc. Mihaela Blažinkov

### 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 21.01.2020., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 10.03.2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA IZVORNOSTI**

Ja, **Sanja Kajić**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad po naslovom:

**FILOGENETSKA ANALIZA AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE NODULIRAJU  
SOJU (*GLYCINE MAX L.*) I NJIHOVA SIMBIOZNA UČINKOVITOST U UVJETIMA  
SUŠE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovog doktorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

Zagreb, \_\_\_\_\_ . godine

---

*Potpis doktorandice*

## Ocjena doktorskog rada

Doktorski rad je obranjen na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, 18.12.2020.  
pred povjerenstvom u sastavu:

Prof. dr. sc. Milan Poljak \_\_\_\_\_

*Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet*

Prof. dr. sc. Ivan Pejić \_\_\_\_\_

*Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet*

Prof. dr. sc. Mihaela Blažinkov \_\_\_\_\_

*Sveučilište u Slavonskom Brodu*



## 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. Doktorsku disertaciju obranila je iz područja simbiozne fiksacije dušika 1996. godine. Zapošljava se na Agronomskom fakultetu u Zagrebu na kojem radi da danas. U znanstveno nastavno zvanje redoviti profesor u trajnom zvanju izabrana je 2016. godine. Na modulima preddiplomskog, diplomskog i poslijediplomskog studija Agronomskog fakulteta u Zagrebu sudjeluje u izvođenju nastave iz područja opće mikrobiologije, mikrobiologije tla, biološke fiksacije dušika i biotehnologije tla kao i mikrobiologije i biotehnologije vina. Voditelj je diplomskog studija Agroekologija- Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Sudjelovala je u izvođenju nastave na Međusveučilišnom studiju „Meditranska poljoprivreda“ kao i na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru gdje je bila nositelj modula na preddiplomskom i diplomskom studiju. Nastavnu aktivnost potvrđuje i velikim brojem mentorstva obranjenih završnih, diplomskih, magistarskih i doktorskih disertacija. Znanstveni interes usmjeren je na područje mikrobiologije tla s posebnim naglaskom na simbioznu fiksaciju dušika. Sudjelovala je u realizaciji deset znanstvenih projekata te je bila voditelj tri nacionalna znanstvena projekta i četiri stručna. Također je kao suradnik sudjelovala u međunarodnom znanstvenom projektu "Physiology of Soybean Nitrogen Nutrition", te "Legumes in biodiversity-based farming systems in Mediterranean basin" koji je u provedbi.

Kao autor i koautor objavila je 54 znanstvena rada te je sudjelovala na 78 znanstvenih skupova. U svojoj bogatoj znanstvenoj karijeri boravila 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 tla (Embrapa Soybean Center; Londrina, PR, Brazil). Njezina bogata znanstvena aktivnost također se očituje kroz sudjelovanje u osnivanju Laboratorija za molekularnu identifikaciju mikroorganizama u Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu 1993. godine, kao i u formiranju Nacionalne kolekcije simbioznih fiksatora dušika. Od 2006.-2015. godine bila je predstojnik Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta.

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.

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.

Član je nekoliko znanstvenih društava kao što su: Hrvatskog mikrobiološkog društva, Hrvatskog tloznanstvenog društva, Hrvatskog agronomskog društva te Hrvatskog društva za biotehnologiju.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici, profesorici dr. sc. Sanji Sikora na povjerenju i prilici da radim u ovom području istraživanja. Svojim dugogodišnjim iskustvom i znanjem uvelike je doprinjela mom znanstvenom radu i pružila mi podršku na svakom koraku mog znanstvenog istraživanja. Veliko joj hvala za brojne savjete u izadi ovog rada i realizaciju svih mojih znanstvenih ideja i zamisli. Puna razumijevanja bodrila me na mom znanstvenom putu i uvijek mi davala punu podršku u svemu.*

*Od srca se zahvaljujem i profesorici dr.sc. Kristini Lindström što me primila u svoj tim znanstvenika s kojima sam provela lijepo trenutke svog znanstvenog usavršavanja kao i dr. sc. Aregi Amsalu Aserse na stručnim savjetima i velikom znanju koje mi je prenio te pomogao u interpretaciji rezultata.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Ivanu Pejiću kao članu povjerenstva na brojnim savjetima i sugestijama, kao i na nesebično doniranim uzorcima i prikupljenim podacima s projekta "AGRO-DROUGHT-ADAPT" što je uvelike dopriječelo cjelokupnoj težini ovog znanstvenog istraživanja. Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Mihaeli Blažinkov i prof. dr. sc. Milanu Poljaku na vremenu i trudu koje su uložili kao članovi povjerenstva za ocjenu ovog rada. Veliko im hvala na svim njihovim savjetima i potpori.*

*Najiskrenije zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Pecina na pomoći u statističkoj obradi podataka te uloženom trudu vezanom za dodatna pojašnjenja. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Borisu Lazarević na pruženoj pomoći, kao i dr. sc. Branki Mihaljević, voditeljici Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju s Instituta Ruđer Bošković, koja mi je u svom laboratoriju omogućila sterilizaciju materijala za potrebe provedenog znanstvenog istraživanja. Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Davoru Romiću na podacima mehaničkog sastava nekoliko uzoraka tla koje je mi je uveliko pomoglo u pisanju disertacije.*

*Veliko hvala mojim dragim kolegicama sa Zavoda za mikrobiologiju na pruženoj potpori i ohrabivanju, posebno Salihi Kruško, Sandri Matijević i Dragici Hradec koje su mi pomagale oko vegetacijskih pokusa i bile tu uvijek za mene.*

*Hvala mojoj braći, sestri i njenoj obitelji na velikoj podršci i potpori kroz sve godine. Hvala vam što ste bili uz mene.*

*Na kraju, najveća hvala mojim dragim roditeljima na neizmjerljivoj ljubavi i pomoći. Dok sam pisala ovaj rad moja majka se borila borila s teškom bolesti. Nažalost, bitku je izgubila i otišla u trenutku kad sam rad dovršila. Dala je zadnji atom snage da bude uz mene do kraja. Svojoj dragoj majci i posvećujem ovaj rad kao zahvalu za svu ljubav koju mi je pružila u životu i što je bila uz mene do kraja. Naučila me hrabrosti, ustrajnosti i velikoj borbi. Hvala ti ljubljena moja majčice. Znam da si danas gore ponosna na mene.*

*Hvala mom dragom tati koji se davno preselio na neko ljepše mjesto gore. Dragi tata znam da si također jako ponosan na mene. Tvoja mala Sanja je sad odrasla i ostvarila ono što je oduvijek sanjala. Hvala ti za svaki trenutak koji smo proveli skupa.*

***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. Filogenetska analiza sekvenci napravljena je u Ecosystems and Environment Research Programme, Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finska, pod vodstvom profesorice dr.sc. Kristine Linström.***

## SAŽETAK

Simbiozne zajednice između većine leguminoza i posebnih skupina bakterija tla (rizobija) omogućuju značajan unos biološki vezanog dušika u tlo. Selekcija visoko učinkovitih sojeva rizobija koje noduliraju soju jedan je od preduvjeta uspješne primjene bakterizacije sjemena soje. Pretpostavlja se da su u tlima različitih regija Hrvatske prisutni autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju soju, da postoji visoki stupanj varijabilnosti u prirodnoj populaciji te da se sojevi međusobno razlikuju po fenotipskim, genotipskim i simbioznim svojstvima. U cilju odabira najkvalitetnijih sojeva rizobija koji noduliraju soju sakupljeni su uzorci tla iz 29 regija kontinentalnog i mediteranskog dijela RH. Ukupno je izolirano 60 autohtonih sojeva rizobija koji su identificirani RAPD (engl. *random amplified polymorphic DNA*) metodom kojom je dobiven uvid u genetsku raznolikost izolata na osnovu koje je izvršeno grupiranje u 24 skupine, dok se identifikacija na razini vrste provela sekvenciranjem 16S rRNA gena. *In vitro* ispitivanjem tolerantnosti izolata na sušu utvrđena je najveća otpornost sojeva koji pripadaju rodu *Ensifer* i *Bradyrhizobium*. Na osnovu tri provedene metode odabrano je 12 reprezentativnih izolata za daljnu analizu koja je uključivala sekvenciranje *rpoB*, *gyrB*, *glnII* gena u cilju točnije identifikacije reprezentativnih izolata, kao i simbiozni *nodC* gen i gen za fiksaciju dušika *nifH*. Fenotipska karakterizacija uključila je utvrđivanje rasta na različitim temperaturama, pH vrijednostima, koncentracijama NaCl-a, sposobnosti iskorištavanja različitih izvora ugljika, biokemijsku karakterizaciju izolata, otpornost na antibiotike, utvrđivanje generacijskog vremena izolata kao i PGRP (engl. *plant growth promoting rhizobacteria*) karakterizaciju. U vegetacijskom pokusu ispitana je simbiozna učinkovitost i tolerantnost na sušu 12 odabranih sojeva koja je uspoređena sa referentnim sojem i nebakteriziranom kontrolom. Rezultati filogenetske analize 16S rRNA gena pokazali su da 75 % izolata pripada rodu *Bradyrhizobium*, dok je preostali dio izolata svrstan u rodove *Ensifer*, *Microbacterium*, *Rhizobium* i *Agrobacterium*. Filogenetskom analizom tri konstitucijska gena *rpoB*, *gyrB* i *glnII* po prvi puta u tlima RH identificirane su vrste *B. diazoefficiens* i *B. ottawaense* kao i vrsta *B. japonicum* koja je ranije identificirana. Analiza *nodC* gena pokazala je da svi izolati osim S27 pripadaju simbiovaru *glycinearum*, dok se filogenija većine *nifH* gena podudara se sa filogenijom *nodC* gena što ukazuje na koevoluciju ova dva simbiozna gena. Dokazana je različita otpornost sojeva na stresne uvjete posebno otpornost na niski pH što je od izuzetne važnosti budući da Hrvatska ima jako puno kiselih tala, dok je PGRP karakterizacijom utvrđeno da soj S32 (*B. ottawaense*) producira IAA, egzopolisaharide, litičke enzima i otapa fosfate čime direktno promovira rast i razvitak soje. Rezultati vegetacijskog pokusa pokazuju da je najveći broj kvržica po biljci utvrđen primjenom soja S1/5 (*B. japonicum*), najveća masa suhe tvari kvržica utvrđena primjenom sojeva S37 (*B. japonicum*), S32 (*B. ottawaense*) i S25/2 (*B. diazoefficiens*). Na biljkama bakteriziranim sojevima vrste *B. diazoefficiens* (S25/2) i *B. japonicum* (S1/5) utvrđena je najveća masa suhe tvari kao i najveća količina dušika u suhoj tvari biljke što upućuje na njihovu veću simbioznu učinkovitost. Najveći indeks količine klorofila u biljci utvrđen je primjenom sojeva S3/5 (*B. japonicum*) i S25/2 (*B. diazoefficiens*). Sojevi S1/5 (*B. japonicum*) i S25/2 (*B. diazoefficiens*) odlikuju se najvećom simbioznom učinkovitošću u uvjetima suše zbog čega bi ih bilo korisno uključiti u daljnji program selekcije.

**Ključne riječi:** simbiozna fiksacija dušika, RAPD, 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, *nodC*, *nifH*, simbiozna učinkovitost, suša

## ABSTRACT

Phylogenetic analysis of indigenous rhizobial strains nodulating soybean (*Glycine max* L.) and their symbiotic efficiency under drought conditions

Symbiotic associations between legumes and specific group of soil bacteria (rhizobia) enable considerable entries of biologically fixed nitrogen into the soil. Efforts are therefore made to intensify the natural process of symbiotic nitrogen fixation by legume inoculation. Effective symbiotic nitrogen fixation can significantly reduce the need for mineral nitrogen fertilizers. Rhizobia form a symbiotic association with leguminous plants, which results in the formation of an organ called a nodule on the root of the host plant. Inside the root nodule, rhizobia convert atmospheric nitrogen to ammonia, which may then be utilized for plant growth. Approximately 120 rhizobial species in 15 genera of  $\alpha$ -proteobacteria and  $\beta$ -proteobacteria have been documented for diverse legumes. Soybean is the most important legume in the world and its seeds contain 40% protein and 20% oil. The northeastern region of China, the Korean peninsula, and Japan are the origin of soybean. China, USA, Brazil, and Argentina are the largest producers in the world. In recent years, the demand for soybean has increased in Europe due to increasing consumer demand for soybean as a healthy alternative to meat as well as to reduce the import of genetically modified soybean products from USA and South America. However, soybean cultivation is still relatively new in central Europe even though areas of soybean cultivation increased two-fold between 2013 and 2018. There is also large potential to grow soybean under the cooler and less favorable environments in northern parts of Europe. The rhizobia inoculation of soybean is a sustainable practice to induce atmospheric nitrogen fixation and subsequently improve crop productivity and soil fertility. Different environmental factors affect legume and rhizobia symbiosis, such as temperature, pH, salinity, drought, the origin of cultivars and the amount of nitrogen in soil. The main advantage of indigenous rhizobial strains relates to their high competitiveness and adaptation ability to specific environmental conditions. It is assumed that native rhizobial populations are also present in Croatian soils and that they contain strains resistant to stress soil conditions and with hidden potential for efficient nitrogen fixation. Soil samples were collected from 29 different region of Croatia. Trapping host method was performed to obtain 60 isolates of indigenous soybean symbionts. The identification of isolates was first performed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method was employed to assess rhizobial genetic diversity. Since the sequencing of 16S rRNA gene is considered as universal tool for identification of bacteria, it is also widespread used for rhizobia as well. 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 until now. In rhizobia, the variation in 16S rRNA gene sequences was shown to be unreliable to resolve species below the genus level. In many of the rhizobial groups, this region has slight divergence between species. Particularly in the genus *Bradyrhizobium*, phylogenetic classification at species level using this gene known to be difficult because the 16S rRNA gene is highly conserved in the genus *Bradyrhizobium* and the sequence similarity is relatively high among closely related species.

Drought is one of the most important factors limiting nitrogen fixation, growth and yield of soybean. Recent advances in current understanding of the effects of drought on soybean growth have predominantly been based on evaluation of above-ground (shoot) traits, with flowering and seed stages particularly sensitive to drought stress. In contrast, drought effects on soybean roots, and specifically root nodules, has been less studied. In this study, 60 indigenous rhizobia isolated from different regions of Croatia were subjected to in vitro investigations of different water conditions (simulated by polyethylene glycol (PEG) 6000).

Based on the results obtained by the RAPD method, sequencing of the 16S rRNA gene and *in vitro* drought test representative strains were selected for further analysis of sequences *rpoB*, *glnII*, *gyrB*, *nodC* and *nifH* gene. Housekeeping protein coding genes are chromosomal in origin and are constitutively expressed in all cells under normal and patho-physiological conditions in order to maintain basic cellular functions of an organism. To overcome the limitations of rRNA genes, the sequence analysis of multiple protein coding genes known as multilocus sequence analysis (MLSA), has been recently considered as a preferred method to study closely related species and to discriminate strains of the same species. In general, they have higher level of sequence divergence compared to the 16S rRNA gene but are conserved enough to retain genetic information and therefore their sequences show better discrimination than 16S rRNA gene sequences. In rhizobia, the symbiotic genes that are required for nodule formation (*nod*) and for nitrogen-fixation (*fix* and *nif* genes) in symbiosis with the host legume are located either on plasmids or symbiosis islands in the chromosomes of the bacteria.

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 intrinsic antibiotic resistance, biochemical characterization, assimilation of different carbon sources, generational time and screening for plant growth promoting properties (PGPR). Greenhouse experiment was setup using two factors (2 x 14) on the basis of a completely randomized block design with three replications. The first factor in the experiment were 12 indigenous rhizobial strains selected from different RAPD groups 16S rRNA sequencing results and *in vitro* drought test, reference strain *B. japonicum* 344 used to inoculate plants, negative control (uninoculated plants). The second factor was moisture (two irrigation regimes- drought and optimal conditions). At the flowering stage plants were collected and afterwards nodule number, nodule dry mass, aboveground dry biomass, total N and chlorophyll content index in each plant were measured in order to estimate symbiotic efficiency and drought tolerance of indigenous strains. Analysis of variance was performed with the statistical package SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc.

The 16S rRNA gene sequences were firstly compared to those available in Genbank and the results showed that 75 % strains from this study belong to genus *Bradyrhizobium*, while the remaining strains belong to the genus *Ensifer*, *Microbacterium*, *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Phylogenetic analysis of the three housekeeping genes *rpoB*, *gyrB* and *glnII* showed that the strains were identified as *B. diazoefficiens* and *B. ottawaense* (similarity value higher than 99 %) species for the first time in Croatian soils and species *B. japonicum* identified earlier. Six isolates were identified as *B. japonicum*, four as *B. diazoefficiens* and two as *B. ottawaense*. The strain S27 formed an independent lineage and they certainly represents a new species. 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 *glycinearum* except S27 which formed an independent lineage. The phylogeny of most *nifH* genes coincides with the phylogeny of the *nodC* gene indicating the co-evolution of these two genes. PGPR characterization of isolates showed their significant variability. The best strain in this study was S32 which was syntetized of indole-3-acetic acid, produced exopolysaccharides, phosphate solubilizing activity and lytic enzymes production. This strain might have great potential to improve soybean productivity under different stress conditions.

Results of greenhouse experiment showed that the highest nodule number was obtained when soybean was inoculated with indigenous strain S1/5 (*B. japonicum*). Nodule dry weight is parameter indicating nodulation capacity of strain. The highest nodule dry weight was obtained when soybean was inoculated with indigenous strains S37 (*B. japonicum*), S32 (*B. ottawaense*) and S25/2 (*B. diazoefficiens*). The highest dry aerial biomass was

obtained when soybean was inoculated indigenous rhizobial strains S25/2 (*B. diazoefficiens*) and S1/5 (*B. japonicum*). The highest total N content was obtained in plants inoculated with strains indicating this strains were most efficient in nitrogen fixation S25/2 (*B. diazoefficiens*) and S1/5 (*B. japonicum*). The highest chlorophyll content index was obtained in plants inoculated with strains S3/5 (*B. japonicum*) and S25/2 (*B. diazoefficiens*).

Besides being highly efficient in symbiotic nitrogen fixation, strains S3/5 (*B. japonicum*) S25/2 (*B. diazoefficiens*) S32 (*B. ottawaense*) and S37 (*B. japonicum*) showed significant tolerance to unfavourable conditions such as high NaCl concentrations, high temperatures and PGPR characterization especially strain S32 (*B. japonicum*). Therefore, these strains should be included in further investigation in order to select high quality strain for application as biofertilizer for sustainable soybean production.

**Key words:** symbiotic nitrogen fixation, RAPD, 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, *nodC*, *nifH*, symbiotic efficiency, drought



# SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Hipoteze i ciljevi .....	5
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	6
2.1.	Biološka fiksacija dušika .....	6
2.1.1.	Biokemizam fiksacije dušika .....	8
2.1.2.	Simbiotna fiksacija dušika .....	9
2.1.2.1.	Genska kontrola simbiotne fiksacije dušika .....	11
2.1.2.2.	Proces infekcije i razvoj kvržica .....	13
2.1.2.3.	Važnost kvržica u simbiotnoj fiksaciji dušika.....	15
2.1.3.	Značaj biološke fiksacije dušika .....	16
2.1.4.	Predstetvena bakterizacija leguminoza.....	17
2.1.5.	Utjecaj okolišnih uvjeta na simbiotnu fiksaciju dušika .....	18
2.2.	Makrosimbionti-leguminoze .....	21
2.2.1.	Soja .....	23
2.2.1.1.	Botanička klasifikacija, značaj i porijeklo soje .....	23
2.2.1.2.	Morfološke osobine soje .....	24
2.2.1.3.	Razvojne faze soje .....	28
2.2.1.4.	Agroekološki uvjeti uzgoja soje .....	30
2.2.1.5.	Proizvodnja soje u svijetu.....	31
2.2.1.6.	Proizvodnja soje u Hrvatskoj .....	32
2.3.	Mikrosimbionti-kvržične bakterije .....	35
2.3.1.	Taksonomija rizobija.....	35
2.3.1.1.	Rizobije unutar razreda $\alpha$ -proteobakterija .....	37
2.3.1.2.	Rizobije unutar razreda $\beta$ -proteobakterija.....	39
2.3.1.3.	Nejasnoće oko taksonomskog statusa rodova <i>Agrobacterium-Allorhizobium-Rhizobium</i> .....	40
2.3.1.4.	Rizobije bez simbiotnih gena (“ne-simbiotne rizobije”) .....	40
2.3.1.5.	Taksonomski kriteriji za opis novih vrsta.....	40
2.3.2.	Proučavanje raznolikosti i filogenija rizobija .....	42
2.3.3.	Molekularne metode za identifikaciju i proučavanje raznolikosti rizobija .....	43
2.3.3.1.	Sekvenciranje 16S rRNA ( <i>rrs</i> ) gena.....	43

2.3.3.2.	DNA-DNA hibridizacija.....	45
2.3.3.3.	AFLP (engl. <i>amplified fragment length polymorphism</i> ) .....	45
2.3.3.4.	RAPD-PCR analiza .....	46
2.3.3.5.	Rep-PCR analiza .....	46
2.3.3.6.	Sekvenciranje konstitutivnih gena .....	47
2.3.3.7.	Pomoćni genetički elementi: simbiozni geni.....	48
2.3.4.	Rod <i>Bradyrhizobium</i> .....	49
2.3.4.1.	Genom roda <i>Bradyrhizobium</i> .....	50
2.3.5.	Proučavanje raznolikosti rizobija u Republici Hrvatskoj.....	52
2.4.	Odgovor rizobija i biljke domaćina na stres izazvan sušom .....	54
2.4.1.	Utjecaj suše na mikrobne zajednice tla.....	54
2.4.1.1.	Voda kao resurs.....	55
2.4.1.2.	Voda kao otapalo .....	56
2.4.1.3.	Voda kao transportni medij.....	56
2.4.2.	Važnost vode za mikroorganizme .....	57
2.4.3.	Adaptacijski mehanizmi rizobija na sušu.....	60
2.4.3.1.	Dormantnost .....	60
2.4.3.2.	Proizvodnja egzopolisaharida i formiranje biofilma.....	61
2.4.3.3.	Molekularna adaptacija.....	65
2.4.3.4.	Prilagodba stanične membrane .....	67
2.4.3.5.	Akumulacija osmolita .....	67
2.4.3.6.	Metaboličke adaptacije .....	68
2.4.4.	Utjecaj suše na rast i razvoj biljke soje.....	68
2.4.5.	Fotosintetska učinkovitost soje u uvjetima suše.....	70
2.4.6.	Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu .....	72
2.4.7.	Utjecaj suše na proces simbiozne fiksacije dušika .....	72
2.4.8.	Povećanje tolerantnosti biljaka na sušu posredstvom rizobija .....	73
3.	MATERIJAL I METODE.....	75
3.1.	Uzorkovanje tla i pedološke analize.....	75
3.2.	Izolacija autohtonih sojeva rizobija .....	78
3.3.	Test autentičnosti izolata .....	80
3.4.	Identifikacija autohtonih sojeva rizobija .....	81
3.4.1.	Izolacija genomske DNA .....	81
3.4.2.	Određivanje koncentracije genomske DNA .....	82

3.4.3.	RAPD analiza.....	82
3.4.4.	Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena .....	84
3.4.5.	Amplifikacija i sekvenciranje konstitutivnih <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> i <i>glnII</i> gena.....	85
3.4.6.	Amplifikacija i sekvenciranje <i>nodC</i> i <i>nifH</i> gena .....	87
3.4.7.	Filogenetska analiza sekvenciranih gena .....	89
3.5.	Fenotipska karakterizacija izolata .....	90
3.5.1.	<i>In vitro</i> ispitivanje tolerantnosti na sušu .....	90
3.5.2.	Ekološka karakterizacija izolata.....	91
3.5.2.1.	Rast na različitim temperaturama.....	91
3.5.2.2.	Rast na različitim pH vrijednostima.....	91
3.5.2.3.	Rast pri različitim koncentracijama NaCl.....	92
3.5.3.	Biokemijska karakterizacija izolata.....	92
3.5.3.1.	Katalaza test .....	92
3.5.3.2.	Ureaza test .....	93
3.5.3.3.	Oksidaza test .....	93
3.5.4.	Otpornost na antibiotike.....	94
3.5.5.	Iskorištavanje različitih izvora šećera .....	95
3.5.6.	Generacijsko vrijeme izolata .....	95
3.6.	PGPR karakterizacija izolata .....	98
3.6.1.	<i>In vitro</i> mehanizmi stimulacije biljnog rasta – direktni mehanizmi .....	98
3.6.1.1.	Produkcija indol-3-octene kiseline (IAA) .....	98
3.6.1.2.	Otapanje fosfata.....	100
3.6.2.	<i>In vitro</i> mehanizmi stimulacije biljnog rasta – indirektni mehanizmi .....	100
3.6.2.1.	Sposobnost sinteze litičkih enzima.....	100
3.6.2.2.	Sposobnost sinteze egzopolisaharida .....	102
3.7.	Simbiotska učinkovitost autohtonih sojeva rizobija.....	103
3.7.1.	Vegetacijski pokus .....	103
3.7.2.	Indeks sadržaja klorofola u listu .....	108
3.7.3.	Broj kvržica, masa suhe tvari kvržica i suhe tvari biljke.....	109
3.7.4.	Sadržaj dušika u nadzemnom dijelu biljke .....	109
3.7.5.	Statistička analiza .....	109
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	110
4.1.	Analize tla .....	110
4.2.	Izolacija autohtonih sojeva rizobija.....	115

4.3.	Test autentičnosti izolata .....	115
4.4.	Identifikacija autohtonih sojeva rizobija .....	117
4.4.1.	RAPD analiza.....	117
4.4.2.	Analiza sekvenci 16S rRNA gena.....	120
4.4.3.	Analiza sekvenci <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> i <i>glnII</i> gena .....	122
4.4.4.	Analiza sekvenci simbioznog <i>nodC</i> i <i>nifH</i> gena.....	125
4.5.	Fenotipska karakterizacija izolata .....	132
4.5.1.	<i>In vitro</i> ispitivaje tolerantnosti izolata na sušu .....	132
4.5.2.	Ekološka karakterizacija izolata.....	134
4.5.3.	Biokemijska karakterizacija izolata.....	137
4.5.4.	Otpornost na antibiotike .....	139
4.5.5.	Iskorištavanje različitih izvora ugljika .....	139
4.5.6.	Generacijsko vrijeme .....	140
4.6.	PGPR karakterizacija izolata .....	142
4.6.1.	Produkcija indol-3-octene kiseline (IAA) .....	142
4.6.2.	Sinteza egzopolisaharida (EPS), litičkih enzima, otapanje fosfata .....	143
4.7.	Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija.....	145
4.7.1.	Broj kvržica po biljci.....	147
4.7.2.	Masa suhe tvari kvržica po biljci.....	149
4.7.3.	Masa suhe tvari biljke.....	152
4.7.4.	Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke .....	154
4.7.5.	Indeks sadržaja klorofila u listu (CCI).....	156
5.	RASPRAVA .....	158
5.1.	Analize tla i izolacija autohtonih sojeva rizobija .....	158
5.2.	Identifikacija autohtonih sojeva rizobija .....	161
5.2.1.	Identifikacija na razini vrste .....	161
5.3.	Fenotipska karakterizacija izolata .....	166
5.3.1.	<i>In vitro</i> ispitivaje tolerantnosti izolata na sušu .....	166
5.3.2.	Ekološka karakterizacija izolata.....	166
5.3.3.	Biokemijska karakterizacija izolata.....	168
5.3.4.	Otpornost na antibiotike, iskorištavanje različitih izvora šećera i generacijsko vrijeme izolata .....	169
5.3.5.	PGPR karakterizacija izolata .....	171
5.4.	Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija.....	173

6. ZAKLJUČCI.....	176
7. POPIS LITERATURE.....	178
ŽIVOTOPIS .....	198

## Popis kratica

**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*)

**MLSA** analiza sekvenci više lokusa (engl. *Multilocus Sequence Analysis*)

**NaCl** natrijev klorid

**NaOH** natrijev hidroksid

**PCR** lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

**RAPD** nasumična amplifikacija polimorfne DNA (engl. *Random Amplification of Polymorphic DNA*)

**PEG 6000** polietilen glikol

**PGPR** bakterije promotori biljnog rasta i razvitka (engl. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*)

**PS II** fotosustav II

**ROS** reaktivni oblik kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)

**IAA** indol-3-octetna kiselina

## Popis priloga

**Prilog 1.** Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na broj kvržica po biljci.

**Prilog 2.** Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na masu suhe tvari kvržica.

**Prilog 3.** Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na masu suhe tvari biljke.

**Prilog 4.** Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na količinu ukupnog dušika u biljci.

**Prilog 5.** Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na indeks sadržaja klorofila u listu (CCI).

## Popis tablica

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

**Tablica 2.** Geni odgovorni za proces simbiozne fiksacije dušika

**Tablica 3.** Količine fiksiranog dušika u simbiozi rizobija i leguminoza.

**Tablica 4.** Opis faza razvoja soje.

**Tablica 5.** Žetvena površina, proizvodnja i prirod soje u Republici Hrvatskoj.

**Tablica 6.** Lokacije uzorkovanja tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.

**Tablica 7.** Sastav hranjive podloge YMA (Yeast Mannitol Agar).

**Tablica 8.** Sastav hranjive podloge YMB (Yeast Mannitol Broth).

**Tablica 9.** Karakteristike oligonukleotidnih početnica korištenih u RAPD analizi.

**Tablica 10.** Uvjeti amplifikacije za RAPD analizu.

**Tablica 11.** Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje 16S rRNA gena.

**Tablica 12.** Uvjeti amplifikacije 16S rRNA gena.

**Tablica 13.** Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena.

**Tablica 14.** Uvjeti amplifikacije *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena.

**Tablica 15.** Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje *nodC* i *nifH* gena.

**Tablica 16.** Uvjeti amplifikacije *nodC* i *nifH* gena.

**Tablica 17.** Sastav hranjive podloge za ureaza test.

**Tablica 18.** Sastav hranjive podloge bez ugljikohidrata.

**Tablica 19.** Sastav YMB (Yeast Mannitol Broth) hranjive podloge uz dodatak PEG 6000.

**Tablica 20.** Sastav Nutrient Broth hranjive podloge.

**Tablica 21.** Sastav Salkowski reagensa.

**Tablica 22.** Sastav Pikovskayas hranjive podloge.

**Tablica 23.** Sastav SMA (Skim Milk Agar) hranjive podloge.

**Tablica 24.** Sastav škrobne hranjive podloge.

**Tablica 25.** Sastav hranjive podloge za priremu inokuluma.

**Tablica 26.** Sastav hranjive podloge za ishranu biljaka soje tijekom vegetacije.

**Tablica 27.** Shema pokusa.

**Tablica 28.** Fizikalne karakteristike istraživanih tala.

**Tablica 29.** Kemijske karakteristike istraživanih tala: sadržaj humusa i reakcija tla.

**Tablica 30.** Kemijske karakteristike istraživanih tala: sadržaj fiziološki aktivnog kalija i fosfora, te sadržaj ukupnog dušika.

**Tablica 31.** Autohtoni sojevi rizobija izolirani iz kvržica formiranih na korijenu soje.

**Tablica 32.** Sojevi grupirani prema sličnosti RAPD profila.

**Tablica 33.** Matrica sličnosti sekvenci istraživanih i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena.

**Tablica 34.** Matrica sličnosti sekvenci istraživanih i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *nodC* gena.

**Tablica 35.** Matrica sličnosti sekvenci istraživanih i tipskih sojeva najsrodnijih vrsta na temelju analize *nifH* gena.

**Tablica 36.** Identifikacija autohtonih sojeva rizobija na temelju RAPD profila i sekvenciranja *rrs*, *rpoB*, *gyrB*, *glnII*, *nodC* i *nifH* gena.

**Tablica 37.** Rezultati ispitivanja rasta sojeva na različitim temperaturama i sadržaju NaCl.

**Tablica 38.** Rezultati biokemijske karakterizacije izolata.

**Tablica 39.** Rezultati ispitivanja prirodne otpornosti na antibiotike, te iskorištavanja različitih izvora ugljika.

**Tablica 40.** Generacijsko vrijeme ispitivanih izolata.

**Tablica 41.** Rezultati produkcije egzopolisaharida, litičkih enzima i P-solubilizacija.

**Tablica 42.** Rezultati analize varijance za ispitivana svojstva. Opravdanost djelovanja faktora i interakcije na ispitivana svojstva navedene P vrijednosti.

**Tablica 43.** Broj kvržica.

**Tablica 44.** Masa suhe tvari kvržica po biljci (mg/biljci).

**Tablica 45.** Masa suhe tvari biljke (mg).

**Tablica 46.** Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci).

**Tablica 47.** Indeks sadržaja klorofila u listu.



## Popis slika

- Slika 1.** Građa kompleksa nitrogenaze. Fe protein predstavlja dinitrogenazu reduktazu, a MoFe protein predstavlja dinitrogenazu.
- Slika 2.** Shematski prikaz procesa simbiotne fiksacije dušika.
- Slika 3.** Razmjena signala između rizobija i biljke domaćina u procesu stvaranja kvržica.
- Slika 4.** Shematski prikaz procesa stvaranja kvržice.
- Slika 5.** Nedeterminirani (lijevo) i determinirani (desno) noduli.
- Slika 6.** Podjela porodice *Fabaceae* na potporodice.
- Slika 7.** Anatomija zrna soje.
- Slika 8.** Korijen soje s kvržicama.
- Slika 9.** Tip rasta stabljike soje.
- Slika 10.** Vrste listova kod soje.
- Slika 11.** Boja cvijeta soje.
- Slika 12.** Boja mahuna biljke soje.
- Slika 13.** Razvojne faze soje.
- Slika 14.** Svjetska proizvodnja soje u 2018. godini.
- Slika 15.** Svjetska proizvodnja soje u razdoblju od 2014. do 2018. godine.
- Slika 16.** Shematski prikaz broja i distribucija rizobija koje noduliraju leguminoze.
- Slika 17.** Prikaz 16S rRNA gena sa konzerviranim i varijabilnim regijama.
- Slika 18.** Prikaz građe genoma roda *Bradyrhizobium*.
- Slika 19.** Raspon veličine genoma kod različitih rodova porodice *Bradyrhizobiaceae*.
- Slika 20.** Učinci vlažnosti tla na mikrobnu aktivnost od (a) suhog do (c) zasićenog.
- Slika 21.** Učinci suše na fiziologiju i biokemiju bakterijskih stanica.
- Slika 22.** Adaptacijski mehanizmi rizobija koji im omogućuju preživljavanje u uvjetima suše.
- Slika 23.** Dormancija mikroorganizama kao mehanizam adaptacije na okolišni stres
- Slika 24.** Sastav biofilma.
- Slika 25.** Shematski prikaz makro i mikroagregata za vrijeme suše (lijevo) i u normalno vlažnom tlu (desno).
- Slika 26.** Formiranje biofilma na korijenu biljaka.
- Slika 27.** Karta lokacija uzorkovanja tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.
- Slika 28.** Pokus u plasteniku s prikupljenim uzorcima tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.
- Slika 29.** Krivulja rasta bakterija.
- Slika 30.** Sjeme sorte Lucija.
- Slika 31.** Panoramski uređaj s  $^{60}\text{Co}$  izvorom gama zračenja.
- Slika 32.** Vegetacijski pokus u plasteniku.
- Slika 33.** Mjerenje sadržaja vode u supstratu.
- Slika 34.** Mjerenje indeksa količine klorofila u biljci pomoću klorofilmetra.
- Slika 35.** Pozitivan rezultat testa autentičnosti dva izolata koji se očituju pojavom kvržica na korijenu biljke soje.
- Slika 36.** RAPD profili dobiveni korištenjem početnica P1, P2 i P3 i označene skupine sojeva (sličnost <75 %).
- Slika 37.** Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu sekvenci 16S rRNA gena. Evolucijske udaljenosti su izračunate koristeći Tamura 3 parametarsku metodu.
- Slika 38.** Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su koristeći Tamura-Nei model.

- Slika 39.** Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *nodC* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su koristeći Tamura-Nei model.
- Slika 40.** Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *nifH* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su koristeći Tamura-Nei model.
- Slika 41.** Rezultati in vitro ispitivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na sušu.
- Slika 42.** Rezultati rasta izolata na različitim pH vrijednostima.
- Slika 43.** Rezultati provedena tri biokemijska testa.
- Slika 44.** Količina sintetizirane indol-3-octene kiseline od strane izolata.
- Slika 45.** Pozitivan rezultat ispitivanja produkcije egzopolisaharida.
- Slika 46.** Rezultati proteaza testa.
- Slika 47.** Prikaz utjecaja interakcije soja i količine vode na broj kvržica po biljci.
- Slika 48.** Nodulacija korijena soje sojem S37 kojim je dobivena najveća masa suhe tvari kvržica.
- Slika 49.** Nodulacija korijena soje sojem S16/5 koji je dao najmanju masu suhe tvari kvržica.
- Slika 50.** Prikaz utjecaja interakcije soja i količine vode na masu suhe tvari kvržica (mg/biljci).
- Slika 51.** Prikaz razlike u rastu između biljaka soje koje su primale optimalnu količinu vode (lijevo) i biljaka soje koje su podvrgnute tretmanu suše (desno).
- Slika 52.** Utjecaj interakcije soja i količine vode na količinu dušika u nadzemnom dijelu biljke.
- Slika 53.** Razlike u rastu nadzemnog dijela biljka i boji lišća između nebakterizirane kontrole (desno) i dva soja (S1/5 i S25/2) s kojima je postignuta najveća količina dušika u nadzemnom dijelu biljke.
- Slika 54.** Utjecaj interakcije soja i količine vode na indeks količine klorofila u listu.
- Slika 55.** Razlike u boji lišća i visini nadzemnog dijela biljaka primjenom soja S3/5 (lijevo) kod kojeg je utvrđen najveći CCI i nebakterizirane kontrole (desno).

# 1. UVOD

Danas se u područje poljoprivrednih znanosti ulažu veliki napori s ciljem ostvarivanja maksimalnih prinosa zbog kontinuiranog porasta stanovništva u svijetu. Kako bi se osigurali visoki prinosi brojnih poljoprivrednih kultura od izuzetne važnosti je osigurati biljkama dovoljnu količinu elemenata biljne ishrane.

Jedan od esencijalnih biljnih elemenata je dušik koji se često smatra i ograničavajućim čimbenikom biljne proizvodnje. Sastavni je dio proteina, nukleinskih kiselina, fotosintetskih elemenata i drugih spojeva, regulirajući rast i razvoj biljaka. Izvor dušika je atmosfera u kojoj se nalazi u inertnom obliku u postotku 78,1 %, ali ga u takvom obliku biljke ne mogu iskorištavati. Transformacija molekularnog dušika u mineralni oblik zahtijeva i veliku količinu energije, oko 946 kJ (Vukadinović i Vukadinović, 2011). Dušik se u tlu nalazi u organskom (humus) i anorganskom (mineralnom) obliku. Poznato je da brojni abiotiski čimbenici utječu na količinu dušika u tlu. Budući da je pristupačni oblik dušika rijetko prisutan u rezervama tla, javlja se potreba za njegovim unosom u tlo putem mineralnih dušičnih gnojiva.

U suvremenom procesu uzgoja pretjerana uporaba mineralnih gnojiva, osobito dušičnih i fosfornih, dovodi do značajnog onečišćenja tla, zraka i vode. Proizvodnja mineralnih gnojiva iscrpljuje neobnovljive izvore energije, naftu i prirodni plin te tako predstavlja veliku opasnost za ljude i okoliš (Gupta i sur., 2015). Budući da proizvodnja mineralnih gnojiva nema uporište u ekološkim, energetske i ekonomskim značajkama, nudi se alternativa njihovu korištenju u vidu procesa biološke fiksacije dušika. Danas je biološka fiksacija dušika jedan od najviše istraživanih mikrobioloških procesa te predstavlja važnu ulogu u procesu kruženja dušika u prirodi.

Biološka fiksacija dušika je mikrobiološki proces u kojem posebne skupine mikroorganizama vežu elementarni dušik iz atmosfere i prevode ga amonijačni oblik kojeg biljke mogu koristiti za svoj rast i razvitak. Pretvorba inertnog atmosferskog dušika u amonijačni oblik odvija se djelovanjem enzima nitrogenaze kojeg posjeduje nekoliko rodova bakterija i cijanobakterija.

Rizobije su bakterije tla koje imaju jedinstvenu sposobnost simbioze s leguminozama čime omogućuju značajan unos biološki vezanog dušika. Simbiozna fiksacija dušika je proces koji je vrlo značajan za poljoprivredu jer predstavlja alternativu korištenju dušičnih mineralnih gnojiva koji za proizvodnju iskorištavaju fosilna goriva. Bakterizacija leguminoza smatra se jednom od najstarijih ekoloških i biotehnoloških pristupa u

agronomiji. Taj postupak datira iz 1888. kad je Beijerinck potvrdio da su mikroorganizmi odgovorni za formiranje kvržica na korijenu leguminoza (Karmakar i sur., 2015). Dobra i efektivna simbioza između navedenih organizama može zamijeniti ili bar smanjiti korištenje dušičnih gnojiva. Simbiozom između leguminoza i rizobija fiksira se 80 % dušika u prirodi, dok u poljoprivrednoj proizvodnji simbioza omogućava 45 % dušika za rast biljaka (Zahran, 2017). Primjena predsjetvene bakterizacije sjemena leguminoza očituje se u povećanju prinosa zrna leguminoza i biljne mase, povećavaju plodnost tla te znatno smanjuje troškove nabave mineralnih gnojiva.

Među leguminoznim usjevima posebno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji pripada soji (*Glycine max* L.) zbog visokog sadržaja visokovrijednih proteina i ulja (FAOSTAT, 2017), prepoznata kao visoko kvalitetan izvor ljudske i stočne hrane te važna sirovina za prerađivačku industriju (Vratarić i Sudarić, 2008). Uzgoju soje najbolje odgovaraju duboka, plodna tla, neutralne pH reakcije, no uspijeva i na siromašnijim tlima. Količina vode je izrazito važna jer sudjeluje u prenošenju hranjivih tvari i izmjeni elemenata iz organa i tkiva u druge, ali i sudjeluje u izmjeni enzimatskih procesa. Za vrijeme klijanja, soja treba apsorbirati 50% više vode od svoje mase kako bi ostvarila rast i razvoj (Vratarić i Sudarić, 2008). Voda potiče održavanje turgora, što je važan činitelj koji određuje produkciju fotosinteze i rast listova. Nedostatak vode i visoke temperature u kritičnim fazama razvoja soje sve su češći problem pri uzgoju ove uljarice u Republici Hrvatskoj, ali i u svijetu. Istraživanja u poljskim, ali i u kontroliranim uvjetima pokazuju da stres suše, ovisno o lokaciji i vremenu, uzrokuje značajno smanjenje u prinosu sjemena soje (24 – 50 %) (Wang i sur., 2020).

Poljoprivredna proizvodnja vrlo je podložna promjenama u okolišu i na nju izravno utječu povoljne, ali i nepovoljne klimatske promjene. Globalne klimatske promjene i drugi biotički i abiotički stresori predstavljaju veliki izazov za poljoprivrednu proizvodnju. Ekstremni uvjeti kao što su poplave, suše i temperaturni ekstremi kojima sve više možemo svjedočiti, izravno utječu na biljni svijet i mikroorganizme. Neke od posljedica ovih promjena su: otežano klijanje sjemena, inhibicija fotosinteze, loša raspoloživost nutrijenata, smanjenje broja mikroorganizama u tlu te promjene u ekspresiji gena biljaka i mikroorganizama.

Globalne klimatske promjene predstavljaju poseban izazov u proizvodnji visoko kvalitetne hrane te povećavaju potražnju za novim tipovima usjeva koji moraju udovoljavati kriteriju visoke produktivnosti (Vermeulen i sur., 2012).

Suša se definira kao jedan od najštetnijih abiotskih stresova koji imaju utjecaj na modernu poljoprivrednu proizvodnju (Zhang i sur., 2016) jer uzrokuje vodni stres usjeva i na taj način postaje ograničavajući čimbenik rasta i produktivnosti biljke (Rampino i sur., 2007).

Nedostatak vode negativno utječe na rast i razvoj biljaka što rezultira slabom ili nepostojećom uspostavom simbioze između rizobija i leguminoza.

Preživljavanje rizobija i njihova kolonizacija biljaka od velike je važnosti za formiranje zdravih kvržica što rezultira prihranom biljaka dušičnim hranivom u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Egamberdieva i sur., 2017). U simbioznom odnosu, proces fiksacije dušika strogo je povezan s fiziološkim stanjem biljke domaćina, odnosno ni jedan soj visoke učinkovitosti ne može ostvariti svoj puni kapacitet prilikom fiksacije dušika ako limitirajući faktori tla (salinitet, nedovoljna vlaga, nepovoljan pH, bolesti biljaka i neadekvatna fotosinteza) utječu na biljku domaćina (Kabbadj i sur., 2017).

Među fiksatorima dušika koji noduliraju soju važno je spomenuti brzorastuće bakterije *Sinorhizobium* (*Ensifer*): *S. fredii* i *S. xinjiangense*, ali i već poznate spororastuće kvržične bakterije roda *Bradyrhizobium*, najčešćih vrsta *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* (Youseif i sur., 2014). Cjelokupni genom *B. japonicum* sekvencioniran je 2011. godine i sastoji se od 9,2 milijuna parova baza i sadrži jedinstveni kromosom (Kaneko i sur., 2011). Za razliku od ostalih rizobija kojima se geni za simbiozu s biljkom domaćinom nalaze na velikim plazmidima, kod *B. japonicum* ti geni su većinom grupirani na kromosomalnim genomskim otocima. Prema Cytryn i sur. (2008) samo 24 % vrsta roda *Bradyrhizobium* sadrži plazmide koje nose gene za simbiozu (Zahran, 2017).

Ribosomalna RNA predložena je kao prikladno sredstvo za procjenu promjena aktivnosti bakterijskih populacija budući da njezin sadržaj predstavlja aproksimaciju bakterijske aktivnosti (Wagner, 1994). Nekoliko molekularnih metoda omogućilo je identifikaciju i klasifikaciju bakterija na razini vrste ili soja. Prvenstveno se ističe primjena PCR metode (engl. *polymerase chain reaction*), lančana reakcija polimerazom koja se temelji na enzimatskoj sintezi specifičnih sekvenci DNA. Ovisno o genetskom markeru moguća je identifikacija bakterija na razini roda, vrste ili soja.

Standard u identifikaciji rizobija postala je metoda sekvenciranja ribosomalnih (*rrs*) gena, no kako ova metoda nema mogućnost razlikovanja bliskih vrsta, danas se za identifikaciju rizobija sve češće koristi sekvenciranje konstitutivnih (engl. *housekeeping*) gena koji su uključeni u osnovne funkcije bakterijskog rasta (Efrose i sur., 2018).

Bakterizacija raznih sorti soje sa učinkovitim autohtonim sojevima rizobija može dati sličan prinos zrna kao i primjena mineralnih dušičnih gnojiva. Rezultat je to brojnih istraživanja poput Redžepović i sur. (2006) za *B. japonicum* u Hrvatskoj, Hungria i sur. (2015) za *B. japonicum* i *B. diazoefficiens* u Brazilu, Koziel i sur. (2013) za *B. japonicum* u Poljskoj, Leggett i sur. (2017) za *B. japonicum* u Argentini, Thuita i sur. (2018) za *B. japonicum* i *B.*

*diazoefficiens* u Keniji. Značajne razlike u količini usvojenog dušika posljedica su genetskih karakteristika i simbiozne učinkovitosti različitih sojeva rizobija te njihove kompatibilnosti s biljkom (Blažinkov i sur., 2012). Selekcijom visoko učinkovitih sojeva rizobija i njihovom primjenom u uzgoju leguminoza ostvaruju se veći prinosi, bolje kakvoće uz manja ulaganja (Sikora i Redžepović, 2003). Potencijal selekcije autohtonih sojeva leži u tome što se oni mogu bolje adaptirati na nepovoljne uvjete tla i imaju veću kompeticijsku sposobnost prema ostalim bakterijama tla, a zbog toga bolje provode simbioznu fiksaciju dušika.

Ovo dokazuje da je proučavanje raznolikosti autohtonih rizobija važno u nastojanju da se pronađe soj koji je dobro prilagođen na sušu u tlu te istovremeno učinkovit u fiksaciji dušika kako bi se predstjetvenom bakterizacijom soje sa visoko kvalitetnim sojevima unaprijedio uzgoj ove vrlo vrijedne kulture u Hrvatskoj.

## 1.1. Hipoteze i ciljevi

Pretpostavlja se da su u tlima različitih regija Hrvatske prisutni autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju soju te da postoji visoki stupanj varijabilnosti u prirodnoj populaciji čiji se sastav i svojstva mijenjaju ovisno o kompleksnim i raznovrsnim uvjetima određenog lokaliteta. Pretpostavka je da se sojevi međusobno razlikuju po fenotipskim, genotipskim i simbioznim svojstvima te da postoje sojevi sa visokom simbioznom učinkovitosti koji su istovremeno dobro adaptirani na nepovoljne uvjete u okolišu.

Ciljevi ovih istraživanja su:

1. Identificirati autohtone rizobije izolirane iz različitih regija Hrvatske i utvrditi genotipsku i fenotipsku raznolikost prirodnih populacija.
2. *In vitro* utvrditi toleranciju sojeva na stresne uvjete okoline.
3. Vegetacijskim pokusom utvrditi njihovu simboznu učinkovitost i toleranciju na sušu.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Biološka fiksacija dušika

Dušik predstavlja jedan od glavnih limitirajućih faktora u biljnoj proizvodnji koji utječe na prinos i kvalitetu poljoprivrednih kultura. Nalazi se u sastavu mnogih bioloških važnih molekula, kao što su ATP i nukleinske kiseline (Ahmad i sur., 2018). Neophodan je i za proces fotosinteze i disanja te je sastavni dio fotosintetskog pigmenta klorofila. Iako je elementarni dušik jedan od najzastupljenijih elemenata u Zemljinoj atmosferi, biljke mogu usvajati samo nitratni i amonijski oblik koje mogu dobiti na nekoliko načina: razgradnjom organske tvari, mineralnim dušičnim gnojivima, konverzijom atmosferskog dušika u vezane oblike prirodnim procesima kao što su električna pražnjenja te procesom biološke fiksacije dušika (Anglade i sur., 2015).

Slijedom načela održive poljoprivredne proizvodnje smanjuje se utjecaj na okoliš uz potrebu da se zadovolji potreba za rastućom svjetskom populacijom (Koskey i sur., 2018). Održiva poljoprivreda zahtjeva da sva hranjiva iznesena iz tla prinosom ili izgubljena iz poljoprivrednog tla budu nadomještena (Ahmad i sur., 2018). Poznato je da biološki fiksirani dušik pridonosi plodnosti tla (Meena i Meena, 2019).

Biološku fiksaciju dušika (BNF), koju je otkrio Beijernick 1888. godine provodi skupina specijaliziranih mikroorganizama koji posjeduju enzim nitrogenazu pomoću kojeg prevode atmosferski dušik ( $N_2$ ) u amonijak ( $NH_3$ ), kojeg biljke mogu iskoristavati. Navedena skupina prokariota naziva se diazotrofima i uključuje vodene organizme (cijanobakterije), slobodnoživuće bakterije tla (*Azotobacter*), bakterije koje žive u asocijaciji s biljkama (*Azospirillum*) te bakterije koje ulaze u simbiozne odnose s leguminozama (tablica 1) (Lehnert i sur., 2018).

Redukcija atmosferskog dušika složen je i energetski dosta zahtijevan proces, budući da se molekula dušika sastoji od dva atoma dušika koji su spojeni trostrukom kovalentnom vezom što molekulu dušika čini visoko inertnom i nereaktivnom. Proces biološke fiksacije dušika sastavni je dio biogeokemijskog ciklusa dušika kojim dolazi do pretvorbe inertnog oblika dušika u amonijak kojeg može koristiti većina mikroorganizama.



Mikroorganizmi koji imaju sposobnost fiksiranja atmosferskog dušika mogu se koristiti za inokulaciju sjemena ili tla s ciljem povećanja količine biljci pristupačnog dušika, a time i boljeg rasta biljaka. Introdukcija specifičnih bakterija u tlo može poboljšati opskrbu biljaka hranjivima, stimulirati rast biljaka preko proizvodnje fitohormona, kontrolirati ili inhibirati aktivnost patogena te poboljšati strukturu tla (Olanrewaju i sur., 2017).

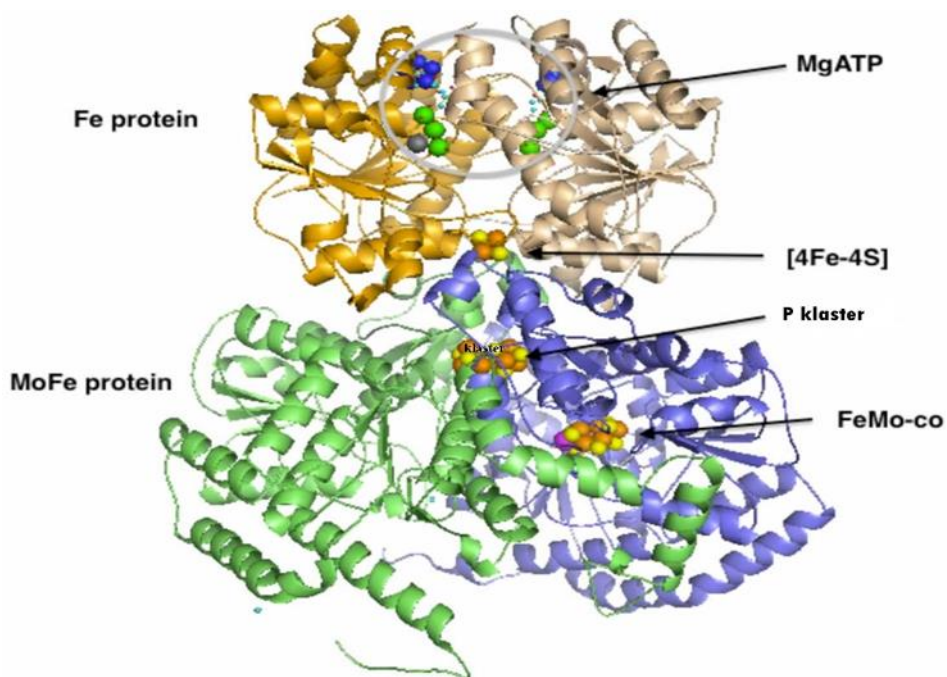
Tablica 1. Primjeri različitih rodova mikroorganizama koji fiksiraju atmosferski dušik u različitim odnosima sa biljkama domaćinima.

Mikroorganizam	Biljka domaćin	Referenca
<b>Simbiozni</b>		
<i>Bradyrhizobium</i>	brojne leguminoze	Shamseldin i sur., 2016.
<i>Rhizobium</i>		
<i>Ensifer</i>		
<i>Mesorhizobium</i>		
<i>Allorhizobium</i>		
<i>Azorhizobium</i>		
<i>Pararhizobium</i>		
<i>Methylobacterium</i>		
<i>Microvirga</i>		
<i>Ochrobacterium</i>		
<b>Asocijativni</b>		
<i>Azotobacter</i>	žive oko korijena raznih vrsta biljaka	Kakraliya i sur., 2018.
<i>Azospirillum</i>		
<i>Bacillus</i>		
<i>Paenibacillus</i>		
<b>Endofiti</b>		
<i>Arthrobacter</i>	pšenica	Santos i sur., 2018.
<i>Herbaspirillum</i>	riža	
<i>Burkholderia</i>		
<b>Asimbiozni</b>		
<i>Clostridium</i>	ne tvore odnos sa domaćinom	Kakraliya i sur., 2018.
<i>Beijerinckia</i>		

Inokulacijom se postižu značajne prednosti u područjima gdje se usjevi uzgajaju prvi puta (O'Callaghan, 2016) ili tlima gdje je broj kvržičnih bakterija prenizak za nodulaciju biljaka (Clua i sur., 2018).

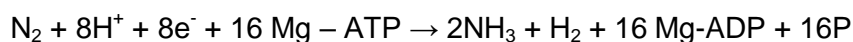
### 2.1.1. Biokemizam fiksacije dušika

Biokemijski mehanizmi potrebni za biološku fiksaciju dušika osigurani su kompleksom nitrogenaze (slika 1). Kompleks nitrogenaze se sastoji od dvije komponente metalnih proteina koji označavaju protein željeza (Fe-protein) što predstavlja dinitrogenazu reduktazu (komponenta II) i MoFe-proteina koji predstavlja dinitrogenazu (komponenta I). Oni kataliziraju ATP- ovisnu redukciju dušika do amonijaka (Jasniewski i sur., 2018).



Slika 1. Građa kompleksa nitrogenaze. Fe protein predstavlja dinitrogenazu reduktazu, a MoFe protein predstavlja dinitrogenazu. Prilagođeno iz Siegbahn (2019).

Redukcija atmosferskog dušika ( $N_2$ ) odvija se reakcijom:



MoFe protein je kompleksini  $\alpha_2\beta_2$  heterodimer molekularne mase ~250 kDa koji sadrži dva udaljena metalo-klastera:

- P klaster
- MoFe - kofaktor klaster

P klasteri su prisutni na svakom sučelju  $\alpha\beta$  podjedinice dinitrogenaze, dok su FeMo-kofaktori prisutni isključivo između  $\alpha$  podjedinica.

Dinitrogenaza reduktaza odnosno Fe protein je homodimer molekularne mase ~60 kDa koji služi kao obvezni donor elektrona MoFe proteinu. Sadrži dva MgATP vezajuća dijela i jedan (4Fe-4S) klaster (slika 1). Dinitrogenaza reduktaza posjeduje značajan stupanj strukturalne i funkcionalne homolognosti s drugim proteinima.

Dinitrogenaza reduktaza donira po jedan elektron dinitrogenazi što je praćeno hidrolizom dvije molekule MgATPA-a. Elektroni donirani dinitrogenazi usmjeravaju se na Fe-Mo kofaktor, aktivni dio za koji se smatra da tu počinje redukcija.

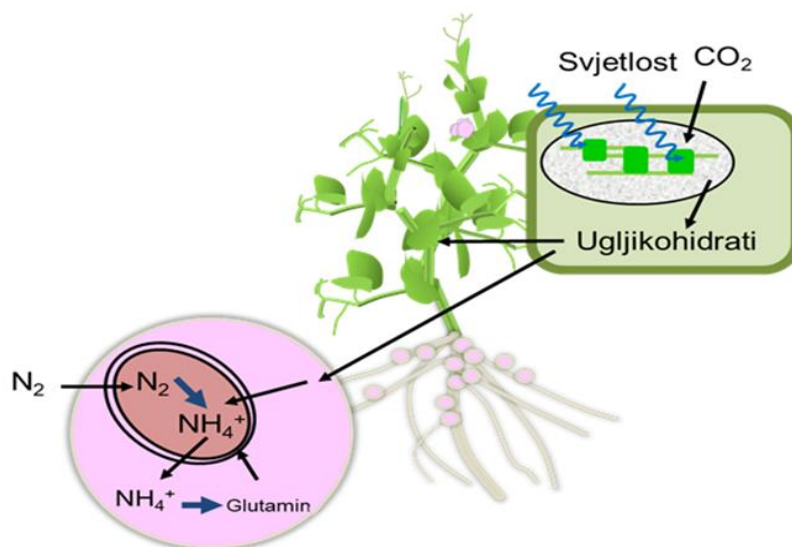
Za vrijeme katalize MgATP se hidrolizira kako bi nastao MgADP koji je inhibitor rada nitrogenaze i mora biti uklonjen. Ioni magnezija ključni su za funkciju nitrogenaze. Za vrijeme katalize proteinske komponente se spajaju i razdvajaju na način ovisan o MgATP-u. Za nitrogenazu se smatra da je vrlo spor enzim budući da svaki korak transfera elektrona između elektrona dinitrogenaze reduktaze i dinitrogenaze zahtijeva obvezno spajanje i razdvajanje dvaju proteina (Hoffman i sur., 2014).

Obe proteinske komponente nitrogenaze su vrlo labilne u prisustvu kisika, zbog čega je proces isključivo anaeroban, a sama nitrogenaza da bi obavljala svoju funkciju mora biti zaštićena od kisika. Zaštitnu ulogu nitrogenaze od kisika ima leghemoglobin, odnosno njegov globinski dio koji se sintetizira u kvržicama (Siegbahn, 2019).

### 2.1.2. Simbiozna fiksacija dušika

Poznato je da postoje različiti tipovi simbiozne fiksacije dušika koji se međusobno razlikuju prema pojedinim članovima simbioznih odnosa budući da se zna da različite vrste bakterija stvaraju simbiozu s različitim vrstama biljaka. Najznačajniji tip simbiozne fiksacije dušika za poljoprivredna tla je fiksacija dušika koja nastaje simbiozom bakterija iz različitih rodova reda *Rhizobiales* s biljkama iz porodice *Fabaceae*. U procesu simbiozne fiksacije dušike atmosferski se dušik prevodi u amonijačni kojeg biljka može usvojiti te ga iskoristiti za svoje raznovrsne potrebe. Izraz simbioza prvi put je upotrijebio de Bary (1879) za označavanje zajedničkog života različitih organizama. Od samog početka definicija "living together of unlike organisms" bila je na meti bojnih kritičara jer je bila dosta široka i nedostajala je točna definicija koristi i štete koju bi simbioza dva organizma mogla prouzročiti. Neslaganje i turbulencije oko termina "živjeti zajedno" trajala je dosta dugo

među biolozima, no na kraju je taj termin prihvaćen je kao prikladan koncept za definiranje termina simbioza (Martin i Schwab, 2013).



Slika 2. Shematski prikaz procesa simbiozne fiksacije dušika. Prilagođeno iz Schwember i sur. (2018).

Bakterije koje fiksiraju atmosferski dušik u simbiozi s leguminozama nazivaju se rizobije. Simbioznim odnosom rizobija i leguminoza nastaje posebna vrsta organa na korijenju leguminoza koje se nazivaju kvržice (slika 2). Unutar kvržica rizobije reduciraju atmosferski dušik u NH<sub>3</sub>.

Zanimljivo je da postoje i slučajevi u kojima se simbioza leguminoza i rizobija može smatrati i parazitizmom. Naime, poznato je da rizobije mogu imati dva načina života:

- kao endosimbiont unutar kvržica
- kao slobodnoživući saprofiti u tlu ili rizosferi

Kao endosimbiont rizobije potiču rast biljake domaćina tako što ju opskrbljuju izvorom fiksiranog dušika, a za uzvrat od biljke domaćina dobivaju ugljikohidrate i energiju. Taj odnos ukazuje na postojanje uzajamne koristi dva organizma.

No, rizobije nekad mogu stvarati i neučinkovitu simbiozu s leguminozama pri čemu rizobiji dobivaju od biljaka kontinuiranu opskrbu hranjivim tvarima, dok pri tome rizobije fiksiraju jako malo dušika ili ga uopće ne fiksiraju. Proces simbiozne fiksacije dušika zahtijeva veliku količinu energije koja se uglavnom dobiva procesom fotosinteze. Biljke tako pretvaraju šećere u dikarbonske kiseline (sukcinat, malat, fumarat) čime se stvara energija kao i niz drugih produkata bitnih za nastanak amonijaka (Pohajda, 2011). Amonijak koji potom nastane ulazi u druge metaboličke procese biljaka pri čemu se sintetiziraju aminokiseline i proteini.

#### 2.1.2.1. Genska kontrola simbiozne fiksacije dušika

Simbiozna fiksacija dušika kod rizobija kontrolirana je *nod*, *nif* i *fix* genima (tablica 2). Nod i Nif proteini kodirani su pomoćnim genima (engl. *accessory*) koji se nalaze na pokretnim genetičkim elementima poput plazmida, simbiotskih otoka ili kromida (Lindström i Mousavi, 2019) koji se prenose horizontalnim prijenosom gena (engl. *horizontal gene transfer*, HGT) između vrsta istog roda, rijeko između rodova (Remigi et al., 2016).

Nod faktori su signalne molekule rizobija koji su kodirani nod genima. Imaju važnu ulogu u procesu simbiozne fiksacije dušika regulirajući prve faze uspostave simbioze rizobija i biljke domaćina. Oni potiču deformaciju korijenovih dlačica i nastanak infekcijske niti čime je omogućen ulazak rizobija u korijen biljke domaćina.

Bonaldi i sur. (2010) navode ključnu ulogu tri *nod* gena u procesu simbiozne fiksacije dušika:

- *nodC* kodira N-acetil-glukozaminiltransferazu koji polimerizira UDP-N-acetil-D-glukozamin u oligosaharidne lance što predstavlja prvi korak u stvaranju Nod faktora
- *nodB* kodira deacetilazu koja uklanja N-acetilni dio iz nereducirajućih krajeva ovih oligosaharida
- *nodA* koji kodira aciltransferazu koja prenosi masne kiseline u Nod faktor

Tablica 2. Geni odgovorni za proces simbiozne fiksacije dušika. Prilagođeno iz Lindström i Mousavi (2019).

Nodulacijski geni	Funkcija
<i>nodA</i>	aciltransferaza
<i>nodB</i>	oligosaharid deacetilaza
<i>nodC</i>	N-acetilglukozaminiltransferaza
<i>nodD</i>	transkripcijski regulator nod gena
<i>nodJ</i>	prijenos Nod faktora
<i>NodPQ, nodX, nodEF</i>	sinteza podjedinica Nod faktora
<i>nol</i>	sinteza i izlučivanje podjedinica Nod faktora
<i>noe</i>	sinteza podjedinica Nod faktora
Geni za fiksaciju dušika	Funkcija
<i>nifH</i>	dinitrogenaza reduktaza (Fe protein)
<i>nifD</i>	podjedinice dinitrogenaze (MoFe protein)
<i>nifK</i>	b podjedinice dinitrogenaze (MoFe protein)
<i>nifA</i>	transkripcijski regulator ostalih nif gena
<i>fixABCX</i>	transportni lanac elektrona do nitrogenaze
<i>fixGH</i>	prijenos dušika kroz membrane
<i>fixLJ</i>	transmembranski senzor protein

U procesu simbiozne fiksacije dušika ključnu ulogu imaju i *nif* geni koji kodiraju kompleks nitrogenaze kao i niz regulatornih proteina uključenih u fiksaciju dušika. Oni su uključeni u strukturu i funkcioniranje nitrogenaznog sustava (Kelly i sur., 2017). Karakteristični su i za brojne druge bakterije s mogućnošću fiksacije elementarnog dušika. Većina gena odgovornih za sintezu nitrogenaze smješeno je na *nif* HDK operonu. Naime, *nifA* i *nifB* reguliraju tako sintezu Fe-Mo kofaktora nitrogenaze uz dodatnu pomoć *nifE* i *nifN* gena. (Laranjo i sur., 2014).

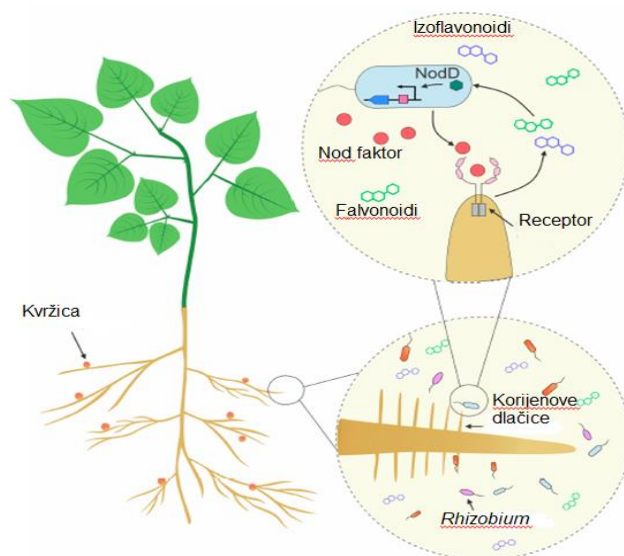
Pored *nod* i *nif* gena, simbiozna fiksacija dušika regulirana je još jednom skupinom gena koji se nazivaju *fix* geni, koji su odgovorni isključivo za proces simbiozne fiksacije dušika. Većina *fix* gena organizirana je u dva operona (*fixABCX* i *fixGH*). Operon *fixABCX* uglavom je odgovoran za prijenos elektrona nitrogenaze, dok *fixGH* operon omogućuje prijenos dušika kroz membrane.

### 2.1.2.2. Proces infekcije i razvoj kvržica

Uspostava simbioze između leguminoza i većine vrsta rizobija ovisi o složenim molekularnim interakcijama između eksudata korijena biljke i rizobijalnih lipohitooligosaharidnih signalnih molekula (Nod faktori).

Poznato je također da u nekim slučajevima nisu potrebni Nod faktori za uspostavu simbioze između rizobija i leguminoza i taj proces simbioze se naziva interakcija neovisna o Nod faktorima (Giraud i sur., 2007).

U slučaju interakcije ovisne o Nod faktorima, formiranje kvržica na korijenu leguminoza započinje izlučivanjem sekundarnih metabolita (flavonoida) koji se izlučuju iz korijena biljke domaćina što se može vidjeti na slici 3 (Clua i sur., 2018).



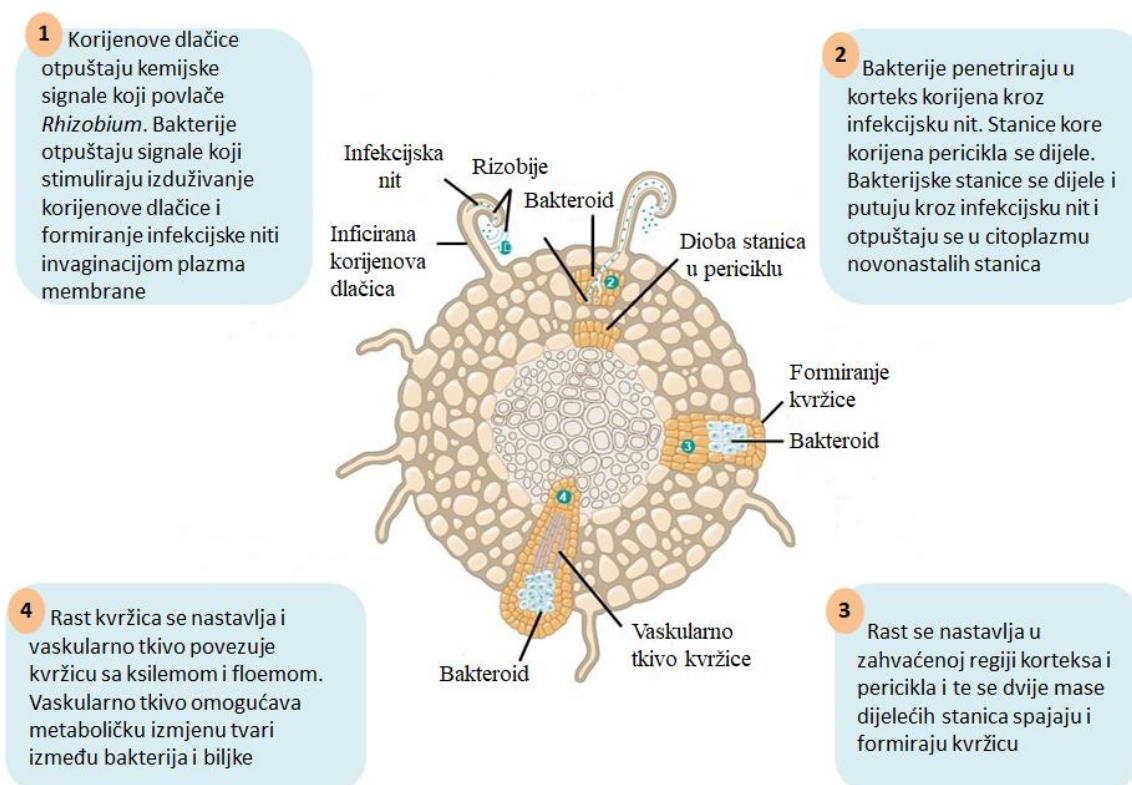
Slika 3. Razmjena signala između rizobija i biljke domaćina u procesu stvaranja kvržica.

Prilagođeno iz Clua i sur. (2018).

Bakterijski receptor *NodD* protein prepoznaje flavanoide i nastali kompleks djeluje kao aktivator ekspresije rizobijalnih nodulacijskih gena. Nodulacijski geni *nodA*, *nodB*, *nodC* koji kodiraju acil transferazu, hitin oligosaharid deacetilazu i N-acetilglukozaminil

transferazu su visoko konzervirani geni (Lindström i Mousavi, 2019). Ovi enzimi kataliziraju produkciju Nod faktora.

Kao reakcija na biljne flavanoide kod rizobija dolazi do stvaranja i aktivacije signalnih molekula odnosno Nod faktora. U tom trenutku dolazi do prve faze infekcije gdje se rizobije prihvaćaju za površinu korijenove dlačice. Stvaranje tubularnih struktura poznatih kao infekcijska nit u blizini stanica korijenovih dlačica i ulaz rizobija u biljku domaćina olakšana je brojnim pektinazama i celulazama koje mogu biti sintetizirane od strane rizobija ili leguminoza. Kao rezultat toga stanice rizobija lakše ulaze u kortikalne stanice biljke domaćina. Mitotička dioba stanica kortikalnih stanica oko zone infekcije dovodi do formiranja kvržičnog primordijuma. Kvržični primordijum potom formira meristem.



Slika 4. Shematski prikaz procesa stvaranja kvržice.

U meristemu prevladavaju dva tipa stanica. Paploidne koje su inficirane bakterijama i diploidne koje će diobama formirati radijalni sustav nezaražene kvržice te sudjelovati u povećanju difuzije plinova. Sljedeća faza razvoja kvržica je transformacija bakterijskih stanica u bakterioide. Dolazi do oslobađanja bakterija iz infekcijske niti te umnažanjem stanica meristema dolazi do formiranja kvržica. U učinkovitim kvržicama bakteroid počinje fiksirati dušik te dolazi do izmjene tvari između bakterije i biljke domaćina. To se uglavnom događa u zoni fiksacije dušika (Huić-Babić, 2011).

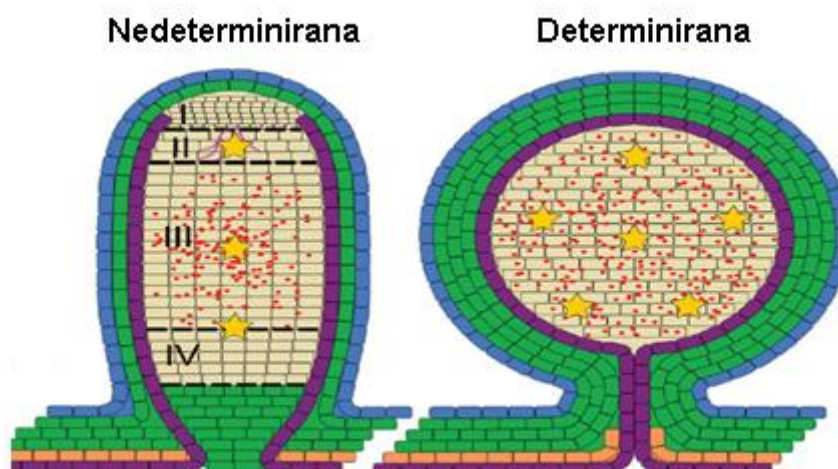


### 2.1.2.3. Važnost kvržica u simbioznoj fiksaciji dušika

Postoje dva osnovna tipa kvržica koje formiraju različite leguminoze. Kvržice su tako klasificirane na determinirane i nedeterminirane (slika 5). Glavna razlika između ove dvije vrste kvržica životni je vijek njihovog meristema.

Nedeterminirani tip kvržica karakterizira perzistentni meristem koji ostaje aktivan tijekom cijelog životnog vijeka kvržice. Takve kvržice su izduženog oblika. Simbiozna fiksacija kod ovog tipa kvržica odvija se u samoj sredini odnosno na mjestima gdje su se smjestili bakteroidi. Kod ovog tipa kvržica apikalni meristem kontinuirano stvara nove stanice koje postaju inficirane bakterijama.

Suptrotno tome determinirane kvržice imaju meristem koji je aktivan samo u ranim fazama razvoja. Takve kvržice su obično okruglog oblika te se fiksacija dušika kod takvog tipa kvržica odvija u cijeloj kvržici. Najpoznatije leguminoze koje stvaraju nedeterminirani tip kvržica su grašak i lucerna, dok soja i grah stvaraju determinirane kvržice (Mao i sur., 2013).



Slika 5. Nedeterminirana (lijevo) i determinirana (desno) kvržica. Determinirana kvržica ne sadrži apikalni meristem, pa ne dolazi do apikalnog gradijenta u razvoju kao kod determinirane kvržice u kojoj se jasno usiču zone rasta (I-V).

### 2.1.3. Značaj biološke fiksacije dušika

Biološka fiksacija dušika smatra se nakon fotosinteze, drugim najvažnijim biološkim procesom na Zemlji. Prema procjenama, biološka fiksacija dušika zaslužna je za fiksaciju 200 milijuna tona dušika godišnje, odnosno 50% dušika koji se koristi u poljoprivredi (Mahmud i sur., 2020). Za poljoprivrednu proizvodnju najvažnija je simbiozna fiksacija dušika koju provode kvržične bakterije (rizobije) u simbiozi s leguminozama (Kakraliya i sur., 2018).

Evaluacija ekonomske i ekološke cijene mineralnih dušičnih i bioloških gnojiva pokazala je da biološka fiksacija dušika predstavlja ekonomičan, održiv i za okoliš povoljan izvor dušika za potrebe agro-ekosustava (Singh i sur., 2016). Proizvodnja mineralnih dušičnih gnojiva Haber-Bosch-ovim postupkom je skupa i energetski zahtjevna. Osim toga, mineralna dušična gnojiva povezuju se s brojnim problemima u okolišu uzrokovanim ispiranjem nitrata, volatilizacijom i denitrifikacijom. Te probleme moguće je izbjeći ili bar smanjiti korištenjem biofertilizatora koji su ekološki prihvatljivi i koji bi mogli smanjiti globalno zatopljenje i reducirati upotrebu mineralnih gnojiva (Herridge i sur., 2008). Za biološku fiksaciju značajno je to da od nje ne profitiraju samo leguminoze već i sve kulture koje se uzgajaju nakon njih. U tablici 3. navedene su izmjerene količine dušika koji mogu fiksirati pojedini simbiozni fiksatori dušika u simbiozi s biljkom domaćinom.

Tablica 3. Količina fiksiranog dušika u simbiozi rizobija i leguminoza.

Mahunarka	Količina fiksiranog dušika (kg/ha/god)	Referenca
Soja ( <i>Glycine max</i> )	175-300	Hungria i sur., 2006.
Grah ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	55-85	Unkovich i Pate 2000.
Leća ( <i>Lens esculenta</i> )	60-110	Peoples, 2008.
Slanutak ( <i>Cicer arietinum</i> )	40-138	Fatima i sur., 2008.
Grašak ( <i>Pisum sativum</i> )	85-166	Peoples, 2008.

#### 2.1.4. Predsjetvena bakterizacija leguminoza

Predsjetvena bakterizacija sjemena ekonomski značajnih leguminoza postala je redovita mjera u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji. Primjenom predsjetvene bakterizacije sjemena leguminoza, gnojdba mineralnim dušikom može se svesti na minimum ili čak potpuno izostaviti. Na taj način usjevu je omogućeno da tijekom vegetacije posredstvom svojim mikrosimbionata koristi atmosferski dušik. Zbog visoke cijene dušičnih gnojiva u ekonomskom pogledu bakterizacija danas predstavlja važnu agrotehničku mjeru. Naime, primjena mineralnog dušika osim negativnog ekonomskog ima i negativan ekološki učinak. Niski koeficijent iskorištavanja mineralnih dušičnih gnojiva od strane biljke, kao i njihova mobilnost u tlu, predstavlja veliku opasnost za onečišćenje podzemnih voda. Budući da se biološka fiksacija odlikuje nizom pozitivnih učinaka, nastoji ju se sve više intenzivirati procesom predsjetvene bakterizacije leguminoza kvalitetnim sojevima njihovih mikrosimbionata s ciljem uspješnog uzgoja leguminoza.

Vrlo važnim se smatra izbor visoko učinkovitih sojeva za proizvodnju inokuluma, budući da se zna da se sojevi znatno razlikuju po svojoj učinkovitosti (Sikora i sur., 2002). U tlima su često prisutni visoko kompetitivni autohtoni sojevi sojevi *B. japonicum* koji limitiraju uspjeh inokulacije zbog svoje slabe učinkovitosti i nemogućnosti fiksacije dušika. Kao posljedica toga bakterizacija soje visoko učinkovitim sojevima *B. japonicum* može dovesti do toga da ne dođe do povećanja prinosa u područjima gdje je soja prije bila sijana (Redžepović i sur., 2006).

Brojna istraživanja su potvrdila da je jedan od vodećih agronomskih problema kod aplikacije sojeva *B. japonicum* kao inokuluma, prisutnost visoko adaptiranih autohtonih sojeva u tlu koji često imaju veću sposobnost kompeticije za mjesto nodulacije nego sojevi koji se nalaze u inokulumu (Ulzen i sur. 2016).

Predsjetvena bakterizacija leguminoza postala je redoviti agrotehnički postupak kako u svijetu, tako i u Republici Hrvatskoj, budući da omogućava značajno manju upotrebu mineralnih dušičnih gnojiva. Primjenom ove mjere sjeme leguminoza bakterizira se selekcioniranim i visokoučinkovitim sojevima koji noduliraju korijen biljke i započnu usvajanje atmosferskog dušika kojeg biljka koristi kao izvor dušičnog hranjiva.

Od presudnog značaja je selekcija visokoučinkovitih sojeva u proizvodnji preparata za predsjetvenu bakterizaciju leguminoza. No, glavni problem u uvođenju novih sojeva kvržičnih bakterija u okoliš je kompeticija sa visoko adaptiranim sojevima, kao i nepovoljni uvjeti okoliša. U većini slučajeva autohtoni sojevi ne fiksiraju učinkovito kao što je to slučaj s

komercijalnim sojevima (Sikora i Redžepović, 2002). Upravo je zbog toga od velikog značaja identifikacija i karakterizacija autohtonih sojeva simbioznih fikstora dušika koje uključuju fenotipsku i genotipsku karakterizaciju sojeva kao i provjeru njihove simbiozne učinkovitosti (Blažinkov, 2006).

Predsjetvena bakterizacija leguminoza spada tako u održivi način proizvodnje s ciljem zadovoljavanja potreba ljudi za hranom te poboljšanja kvalitete životne sredine budući da omogućava iskorištavanje prirodnih resursa, kao i odvijanje prirodnih bioloških ciklusa. Na taj način se smanjuju posljedice koje nastaju komercijalnim načinom proizvodnje (Singh i sur., 2016). Osim toga, brojna su istraživanja pokazala da bakterizacija sjemena leguminoza rizobijama direktno utječe i na povećanje prinosa. Zbog toga je od izuzetne važnosti istraživanje prirodnih populacija kvržičnih bakterija u cilju selekcije visokoučinkovitih sojeva koji bi se mogli koristiti za predsjetvenu bakterizaciju leguminoza (Ntambo i sur., 2017).

#### 2.1.5. Utjecaj okolišnih uvjeta na simbioznu fiksaciju dušika

Nepovoljni uvjeti okoline mogu biti ograničavajući čimbenici za rast i aktivnost rizobija u procesu fiksacije dušika. Proces fiksacije dušika snažno je povezan s fiziološkim stanjem biljke domaćina, zbog toga se ne očekuje da će rizobije izraziti svoj puni kapacitet za fiksaciju dušika ukoliko neki okolišni čimbenici utječu na snagu domaćina. Brojni biotički i abiotički čimbenici mogu negativno utjecati na proces simbiozne fiksacije dušika i dovesti do izostanka razvoja kvržica.

Kad govorimo o biotičkim čimbenicima prvenstveno se misli na prisustvo autohtonih sojeva rizobija u tlu koji su često neučinkoviti u procesu fiksacije dušika. Autohtoni sojevi odlikuju se velikom kompetitivnošću zbog jako dobre prilagođenosti različitim uvjetima u tlu. Da bi bakterizacija bila uspješna nužno je da bakterizirani soj učinkovito fiksira atmosferski dušik, kao i to da bude kompetitivan u odnosu na autohtone sojeve koji su prisutni u tlu.

Tipični abiotički čimbenici koji utječu na mikrosimbionte i proces fiksacije dušika jesu salinitet, visoke temperature, nepovoljni pH i suša. Zapravo se smatra da su najproblematičnija okruženja za rizobije, tla s niskim sadržajem vode, niskim pH vrijednostima te ekstremne temperature (Silva i sur., 2017).

Osmotski stres može značajno utjecati na efikasnost fiksacije dušika. Povišena koncentracija soli inhibira početne korake simbioze rizobija i biljke domaćina (Dong i sur., 2017). To su potvrdila i istraživanja (Zahran, 2012; Egamberdieva i sur., 2017) koji su bakterizirali soju s *B. japonicum* u prisutnosti povišenih koncentracija NaCl-a pri čemu je došlo do deformacije korijenovih dlačica, čime je infekcija korijenovh dlačica bila sporija što je u konačnici rezultiralo potpunim izostankom nodulacije. Udio korijenovh dlačica koje su imale infekcijske niti smanjio se za 30 do 52 %.

Povišen salinitet tla danas predstavlja ozbiljnu prijetnju poljoprivrednoj proizvodnji, osobito proizvodnji leguminoza zbog njihove slabe tolerancije na povišene količine soli u tlu (Shrivastava i Kumar, 2015). Smatra se da se oko 40 % površina tla u svijetu danas suočava s problemom povišene količine soli (Zahran, 2012), čime salinitet postaje glavni abiotički faktor koji onemogućava simbiozni odnos. Povišeni salinitet tla ne utječe na kolonizaciju korijena leguminoza rizobijama, ali utječe na proces simbiozne fiksacije dušika. Povišene količine soli, tako izravno djeluju na proces nodulacije pri čemu usporava nastanak novih kvržica i smanjuje njihovu učinkovitost (Bruning i sur., 2015). Povišen salinitet također negativno djeluje i na biljke domaćine uzrokujući niz fizioloških i morfoloških promjena koje se uglavnom ispoljavaju kroz smanjene rasta biljaka, što u konačnici dovodi do smanjenja prinosa.

Visoke temperature utječu na infekciju korijena te samu strukturu kvržica. Za većinu rizobija optimalni raspon temperature za rast je 25-28°C. U tropskim uvjetima temperatura tla može biti veća od 50° C na 1 cm dubine. To se odražava direktno na fiksaciju dušika kao i na nodulaciju i rast biljaka. U mediteranskim područjima, primarna odrednica prestanka rasta, a time i fiksacije dušika kod leguminoza su visoke temperature (preko 30° C) povezane sa nedostatkom vode tijekom proljeća i ranog ljeta. Brzina kojom temperatura i nedostatak vode uzrokuju starenje biljaka ovisi o dubini korijenja leguminoza, o pristupu podzemnoj vodi te o genetskom kapacitetu biljke da se odupire prolaznom stresu suše.

S druge strane, niske temperature tijekom jeseni i zime su velika prepreka rastu leguminoza i nodulaciji sa značajnim štetnim učincima na prinose. Niske temperature u zoni korijenja mogu ometati nodulaciju na način da smanjuju proizvodnju biokemijskih faktora koji su potrebni za pokretanje razvoja nodula od strane leguminoza. Nadalje, niske temperature tijekom sezone rasta mogu izazvati znatnu štetu tijekom cvatnje i kao posljedica toga smanjiti prinose.

Jedan od najviše proučavanih okolišnih faktora koji negativno utječe na simbiozu leguminoza i rizobija je reakcija tla (pH). Naime, većina leguminoza zahtijeva neutralnu ili blago kiselu reakciju tla, što onemogućava njihov uzgoj u brojnim tropskim i subtropskim regijama. Kiselost tla utječe na simbioznu fiksaciju dušika, tako što smanjuje postojanost i preživljavanje rizobija u tlu, a osim toga djeluje na proces nodulacije (Zahran, 2012). Što se tiče leguminoza, većina njih zahtijeva neutralnu ili blago kiselu reakciju tla, čime se ograničava njihovu proizvodnju u brojnim područjima koja se suočavaju s povišenom kiselošću tla.

Općenito se smatra da su rizobije više osjetljivije na pH tla nego leguminoze (Ferguson i sur., 2013). Problem povišene kiselosti tla danas se uspješno rješava procesom kalcifikacije čime se biljkama povećava dostupnost kalcija koji je važan za brojne fiziološke procese u biljnim stanicama.

Na rast rizobija kao i na proces simbiozne fiksacije dušika utječe i sadržaj vode u tlu. Tako u suhim tlima najčešće dolazi do slabe nodulacije ili njenog izostanka zbog smanjenja populacije rizobija. Smanjenje broja nodula uglavnom je povezano s negativnim djelovanjem suše na infekciju korijenovih dlačica i formiranje infekcijske niti. U tom slučaju broj nodula značajno opada, pri čemu dolazi do redukcije simbiozne fiksacije dušika.

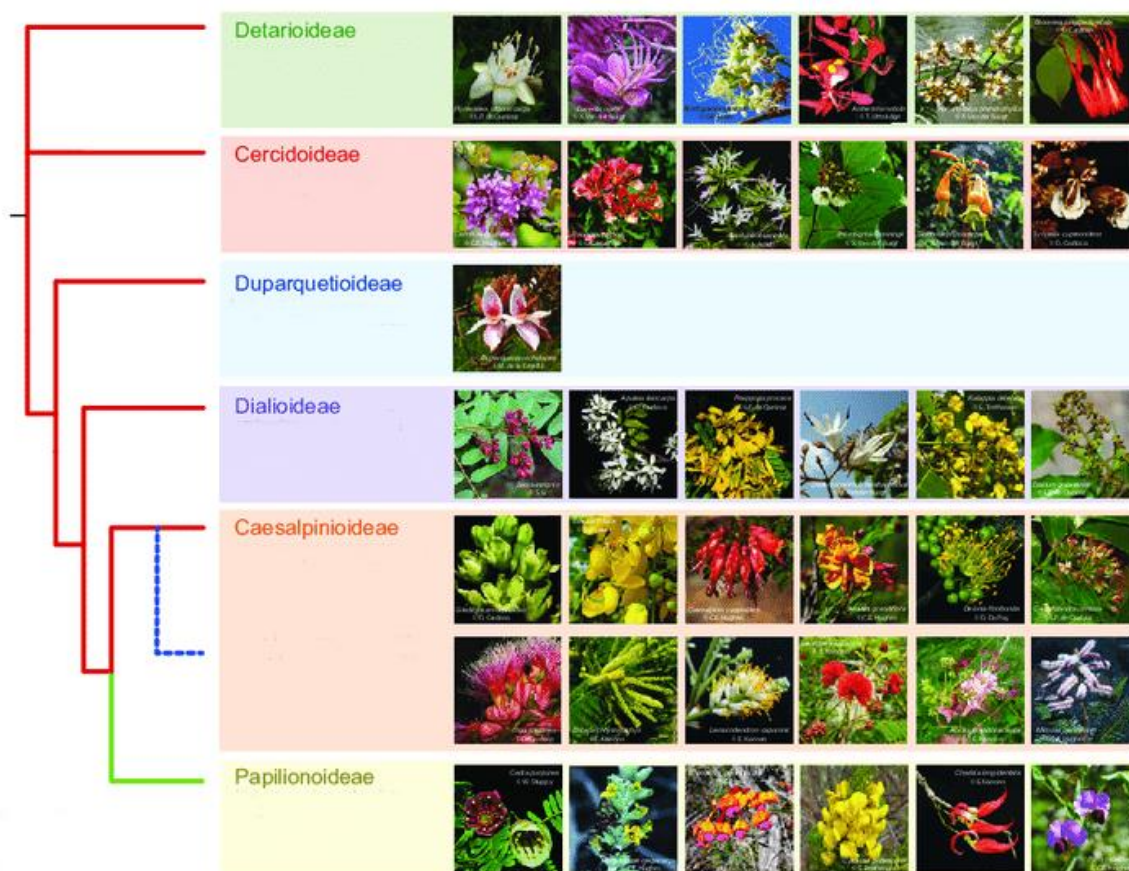
Rizobije se međusobno razlikuju po svojoj otpornosti na stres izazvan sušom. Općenito se smatra da su brzorastući pripadnici roda *Rhizobium* osjetljiviji na sušu od spororastućih pripadnika roda *Bradyrhizobium*. To potvrđuje i istraživanje koje su proveli Aserse i sur. (2019) u kojem su ispitali osjetljivost brzorastućih pripadnika roda *Rhizobium* (*R. phaseoli*, *R. etli* i *R. giardinii*) i spororastućih pripadnika roda *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* i *B. elkanii*) na sušu u Etiopiji. S navedenim sojevima rizobija bakterizirali su sjeme soje i graha, pri čemu je kod soje došlo do povećanja prinosa u odnosu na grah koji je pokazao manji prinos što potvrđuje tvrdnju da su spororastuće rizobije otpornije na sušu.

Navedena istraživanja zaključuju kako neki pripadnici roda *Rhizobium* pokazuju značajnu tolerantnost na sušu. To potvrđuju i istraživanja koja su proveli Hungria i sur. (2000) na vrsti *R. tropici* u Južnoj Americi kao i Rodrigues-Navaro i sur. (2000) u Španjolskoj na vrsti *R. etli* koji su pokazali veliku tolerantnost na sušu.

Iako smanjena količina vlage u tlu negativno djeluje na proces simbiozne fiksacije dušika i pretjerana vlaga u tlu ima negativne posljedice. Negativne posljedice očituju se kroz smanjen rast rizobija i biljke domaćina (Biswas i Gresshof, 2014).

## 2.2. Makrosimbionti-leguminoze

Porodica *Leguminosae* ili *Fabaceae* (leguminoze) obuhvaća preko 770 rodova s više od 19 500 vrsta rasprostranjenih širom svijeta. Leguminoze pripadaju razdjelu Magnoliophyta, razredu Magnoliopsidae i redu *Fabales* te porodici *Fabaceae* (*Leguminosae*). Daljnja podjela porodice *Fabaceae* je na potporodice *Detarioideae*, *Cercidoideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinoideae* i *Papilionoideae* (LPWG, 2017).



Slika 6. Podjela porodice *Fabaceae* na potporodice. Prilagođeno iz LPWG, 2017.

Najznačajnije leguminoze koje se uzgajaju za proizvodnju hrane su: grah (*Phaseolus vulgaris*), grašak (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max* L.), bob (*Vicia faba*), leća (*Lens esculenta*) i kikiriki (*Arachis hypogaea*). Za proizvodnju krme najčešće se uzgajaju vrste kao što su lucerna (*Medicago sativa* L.), crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.), bijela djetelina (*Trifolium repens* L.), perzijska djetelina (*Trifolium resupinatum* L.). Zbog široke rasprostranjenosti biljaka iz porodica leguminoza one imaju vrlo velik ekonomski, agronomski i ekološki značaj.

Iako se leguminoze koriste u poljoprivredi jer poboljšavaju produktivnost i potencijalnu održivost sustava poljoprivredne proizvodnje, one rijetko dominiraju na poljoprivrednim površinama. Razlog zašto rijetko dominiraju na poljoprivrednim površinama možemo pronaći u tome da leguminoze neće uvijek biti najprofitabilnija opcija za korištenje zemljišta. Često leguminozni prinosi postižu manju cijenu na tržištu od nekih neleguminoznih kao što su žitarice i uljarice. Žitarice, uljarice te ostale kultivirane biljke daju veće prinose sa većim udjelom proteina kada se uzgajaju poslije ili u kombinaciji sa simbioznim leguminozama na nedovoljno razvijenom tlu. Odgovor zašto je to tako pronalazimo u fiksaciji dušika od strane leguminoza te prijenosa vezanog dušika na neleguminoze (Remigi i sur., 2016).

Druga velika korist od korištenja leguminoza u poljoprivredi odnosno u sustavima poljoprivredne proizvodnje je kontrola bolesti i štetnika na žitaricama ili uljaricama. Mnoge bolesti i štetnici koji su dominantni na monokulturama su specifični za određenog domaćina. Uvođenjem leguminoza u plodorede smanjuje se nakupljanje i brojnost štetnika i bolesti na žitaricama i uljaricama. Samim time smanjuje se i ovisnost o skupim kemijskim fungicidima i pesticidima koji se koriste kako bi uklonile bolesti i štetnici i time povećali prinose (Bruning i Rozema, 2013).

Za prehranu svjetske rastuće populacije u budućnosti bi trebalo osigurati bolju poljoprivrednu produktivnost. Leguminoze i njihovi mikrosimbionti u tom povećanju produktivnosti odigrali bi važnu ulogu.

Herridge i Rose (2000) smatraju da će povećanje biološke fiksacije dušika za samo 10% dovesti do bio-ekonomske koristi od otprilike jednog bilijuna američkih dolara. Povećanje biološke fiksacije dušika može se postići na dva načina, uzgojem leguminoza sa poboljšanim osobinama za fiksaciju dušika ili proširiti upotrebu leguminoza u svjetskoj poljoprivredi.



## 2.2.1. Soja

### 2.2.1.1. Botanička klasifikacija, značaj i porijeklo soje

Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) je jednogodišnja leguminoza koja pripada porodici *Fabaceae* i rodu *Glycine*. Rod *Glycine* Wild. podijeljen je u dva podroda: *Glycine* i *Soja* (Moench) F. J. Herm. Divlja višegodišnja soja pripada podrodu *Glycine* i ima velik broj vrsta. Kultivirana soja *Glycine max* (L.) Merr i njezin divlji jednogodišnji predak *Glycine soja* Sieb Zucc. pripadaju podrodu *Soja*, imaju diploidni broj kromosoma  $2n=40$  i mogu se međusobno križati. Njihovim križanjem nastaje intermedijarna vrsta *Glycine gracilis* (Kozumplik i Pejić, 2012).

Soja je biljka visoke hranjive vrijednosti. Radi se o jednogodišnjoj samooplodnoj dvosupnici koja danas predstavlja vodeću uljnu i bjelančevinastu kulturu za ishranu stoke. Značaj i važnost soje proizlaze iz kakvoće njenog zrna. Zna se da zrno soje sadrži 35 – 50 % bjelančevina te 18 – 24 % ulja (Vratarić i Sudarić, 2008). Bjelančevine iz zrna soje bogate su esencijalnim aminokiselinama, osobito lizinom i metioninom te su najslabije bjelančevinama životinjskog porijekla zbog toga imaju visoku biološku vrijednost. Posljednjih deset godina diljem svijeta, uključujući i Europu podižu se sve više tvornica za preradu sojinog zrna u proizvode za izravnu ljudsku ishranu (sir tofu, pljeskavice, razne slastice). Također preradom sojinog zrna dobiva se ulje kao i drugi proizvodi (sačma) koji imaju 39-95 % bjelančevina koji se mogu koristiti za prehranu ljudi, domaćih životinja ili kao sirovina u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Broja medicinska istraživanja prepoznala su veliki značaj soje u prevenciji i liječenju različitih kroničnih bolesti. Tome najviše pridonose fitokemijske supstance (izoflavoni) koje se nalaze u sojinu zrnu.

Soja također ima primjenu u industriji u proizvodnji sapuna, krema, deterdženata, boja i lakova. Osim toga sojino ulje se danas koristi u proizvodnji pesticida kao nosač aktivne tvari, no u posljednje vrijeme soja se sve češće koristi za proizvodnju biodizelskog goriva koje ima niz prednosti u odnosu na obična goriva, a to su da nije kancerogeno, manje zagađuje okoliš, ne sadrži sumpor (Vratarić i Sudarić, 2008).

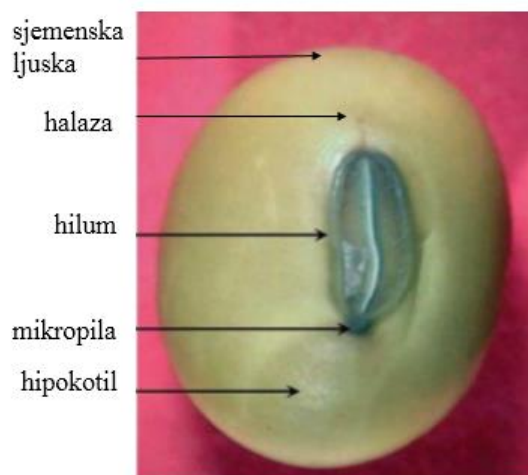
Posebno se ističe agrotehnički značaj soje kao leguminozne biljke u plodoredu, budući da se zna da u simbiozi s kvržičnim bakterijama (*B. japonicum*) sudjeluje u obogaćivanju tla dušikom (175-300 kg/ha) (Hungria i sur., 2006).

Centar porijekla soje je sjeveroistočna Kina gdje se uzgaja više od četiri tisuće godina, odakle se polako širila na ostatak svijeta gdje su se potom razvile lokalne populacije soje (Vratarić i Sudarić, 2008) .

### 2.2.1.2. Morfološke osobine soje

Soja je uspravna, granata jednogodišnja biljka s vrlo velikim variranjem u morfološkim svojstvima, ovisno o sorti i vanjskim uvjetima sredine.

Sjeme soje može biti različitog oblika, veličine i boje što uvelike ovisi o sorti i načinu uzgoja. Što se tiče oblika, sjeme soje može varirati od okruglog do spljoštenog oblika. Sastavljeno je od embria koji je obavijen sjemenskom opnom. Sam embrio sastoji se od dva kotiledona, plumule s dva primarna listića, epikotila, hipokotila i korijenčića. Kod soje kotiledoni čine najveći dio ukupne mase i volumena zrna, te su prekriveni epidermom. Sjemenska ljuska završava hilumom. Na jednom kraju hiluma se nalazi halaza, a na drugom mikropila (slika 7).



Slika 7. Anatomija zrna soje. Prilagođeno iz Purcell i sur. (2014).

Soja spada u biljke s jakim korijenovim sustavom koji ima visoku apsorpcijsku sposobnost. Korijenov sustav sastoji se od glavnog vretenastog korijena i velikog broja sekundarnog korijenja. Sam razvoj korijena ovisi o raspoloživoj količini vode i hranjivih tvari u tlu, te sastavu tla. Na korijenu soje razvijaju se kvržice te tako veličina korijena i

broj kržica na njemu utječu na konačan urod zrna soje. Korijen najbrže raste na početku dok u vrijeme nalijevanja zrna usporava te u fazi fiziološke zriobe njegov rast je u potpunosti dovršen. Smatra da se da dobro razvijeni korijen ne samo da povećava broj zrna po biljci i lisnu masu, već također povećava i otpornost prema suši.



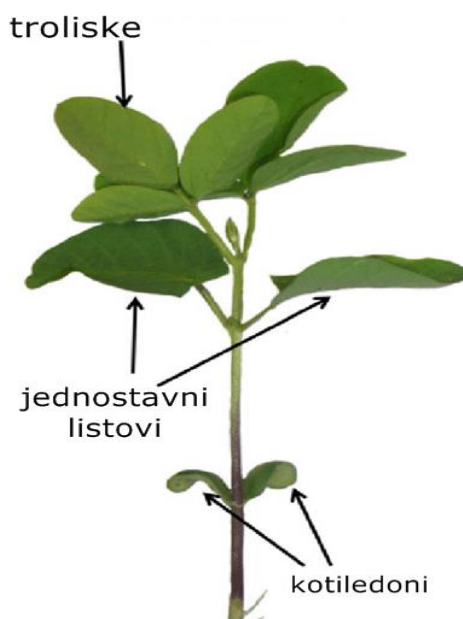
Slika 8. Korijen soje s kvržicama.

Stabljika. Kod soje postoje dva tipa rasta ovisno o tipu habitusa. To su nedeterminirani (nedovršeni) i determinirani (dovršeni) tip rasta (slika 9). Kod nedeterminiranog tipa rasta cvatnja počinje na petom-šestom nodiju, potom biljka dalje postepeno raste i cvjeta. Stabljika je dosta visoka, s velikim brojem nodija. Sorte koje posjeduju determinirani tip rasta najprije narastu više od 80% potrebne visine. Zatim procvjetaju na svim nodijima. Stabljike su obično nešto niže i imaju veću mogućnost grananja.



Slika 9. Tip rasta stabljike soje. Lijevo prikazuje nedeterminirani tip rasta, desni dio slike prikazuje determinirani tip rasta. Prilagođeno iz Yoshikawa i sur. (2013).

List. Soja posjeduje četiri tipa listova, a to su: kotiledoni, jednostavni primarni listovi, troliske (slika 10) i trokutasti listovi koji se još nazivaju zalisci. Jednostavni listovi se počinju razvijati još u sjemenci. Svi drugi listovi su troliske i poredani se na stabljici naizmjenično. Naime većina sorata soje imaju listove s tri liske. Većinom krmne sorte determiniranog tipa imaju veće listove dok divlje sorte vrlo male listove. Listovi oblikom mogu varirati od širokolisnih do uskih. U zriobi istovi postaju žuti i otpadnu, dok kod nekih kasnih sorata mogu zadržati zelenu boju i ne otpadnu.



Slika 10. Vrste listova kod soje. Prilagođeno iz Yoshikawa i sur. (2013).

Cvijet soje sličan je cvijetu ostalih leguminoznih biljaka. Veličina mu varira od tri do osam milimetara te se formira na svakom pazušcu lista na stabljici i granama. Boja cvjetova može biti bijela, ljubičasta ili kombinacija bijelo-ljubičaste boje (slika 11). Cvijet je sastavljen od časke, vjenčića, prašnika i tučka. Budući da je soja samooplodna biljka s malim postotkom stranooplodnje (0,5-1 %), cvijetovi se oprašuju prije otvaranja.



Slika 11. Boja cvijeta soje. Prilagođeno iz Yan i sur. (2014).

Mahuna soje može biti srpastog, okruglog ili spljostenog oblika. Jako varira po veličini kako na istoj biljci tako i između sorata. Uglavnom je oblik mahune vezan za broj i oblik sjemenki. Mahuna sadrži jednu do pet sjemenki. Duljina mahune je između dva i sedam centimetara. Boja varira od slamnatožute, sive pa sve do crne (slika 12).

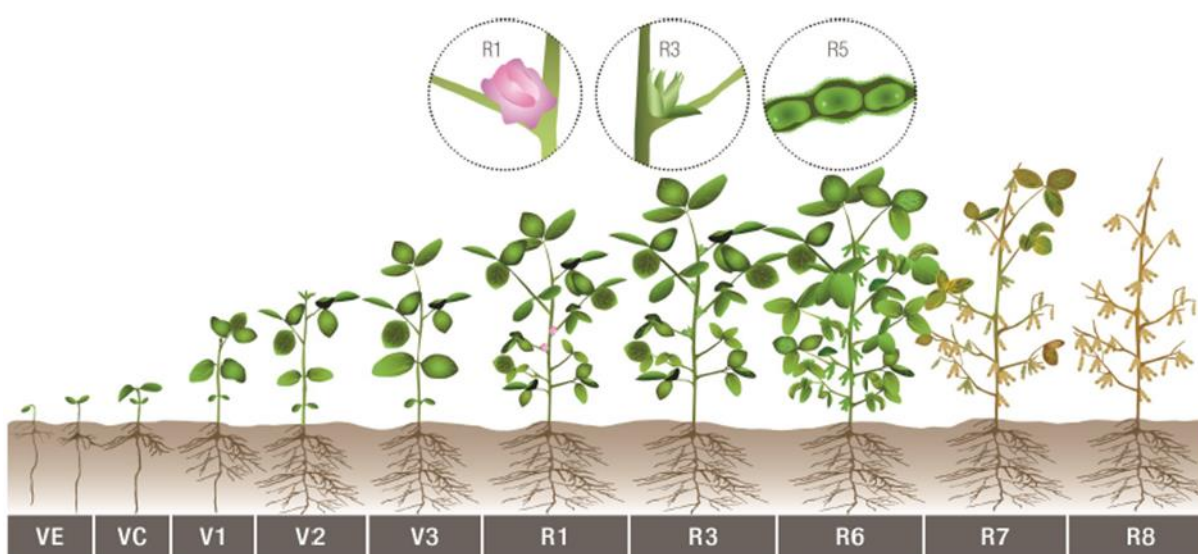


Slika 12. Boja mahuna biljke soje. Na slici se jasno vidi kako boja mahuna varira od slamnatožute do gotovo crne boje. Prilagođeno iz Yoshikawa i sur. (2013).

### 2.2.1.3. Razvojne faze soje

Mnoštvo čimbenika utječe na trajanje svake faze razvoja soje te se kao najvažnijima faktorima smatraju obilježja pojedinih sorti soje i klima (temperatura i fotoperiod). Ostali faktori koji mogu utjecati na razvoj soje uključuju uvjete u tlu, lokaciju, datum sjetve te opskrbljenost hranjivima.

Vratarić i sur., (2008) navode kako je danas u svijetu najprihvaćenija klasifikacija razvojnih faza soje prema Fehr i Cavinessu (1977) koji razvojne faze soje dijele na vegetativne (V) i reproduktivne (R) (slika 13).



Slika 13. Razvojne faze soje prema Fehr i Caviness (1977) (Izvor: University of Illinois, 2018).

Detaljan opis svake pojedine faze prikazan je u tablici 4. Naime, rast kao i životni vijek soje pod utjecajem je fotoperiodizma i noćnih temperatura. Onat i sur. (2017) navode važnost temperature za pojedine faze razvoja soje. Tako niske temperature usporavaju, a visoke ubrzavaju klijanje sjemena i razvoj listova. Iz tog razloga broj dana od sjetve do stadija nicanja (VE) ovisno o temperaturi može varirati od pet do 15 dana.

Sojine potebe za vodom kreću se od 450-850 mm po vegetacijskom periodu (Rodrigues i sur., 2017). Da bi sjeme proklijalo mora apsorbirati količinu vode višu od 50% svoje mase.

Tablica 4. Opis faza razvoja soje. Prema Vratarić i Sudarić (2008).

Oznaka stadija	Naziv stadija	Opis stadija
<b>VEGETATIVNI STADIJ</b>		
<b>VE</b>	Nicanje	Kotiledoni iznad površine tla.
<b>VC</b>	Kotiledoni	Jednostavni listovi odvojeni dovoljno, tako da se ivice listova ne dodiruju.
<b>V1</b>	Prvi nodij	Potpuno razvijeni listovi na nodijima jednostavnih listova.
<b>V2</b>	Drugi nodij	Potpuno razvijena troliska na prvom nodiju iznad nodija jednostavnih listova.
<b>V3</b>	Treći nodij	Tri nodija na glavnoj stabljici s potpuno razvijenim listovima, počevši s nodijima jednostavnih listova.
<b>V(n)</b>	n-ti nodij	n-nodija na glavnoj stabljici s potpuno razvijenim listovima.
<b>REPRODUKTIVNI STADIJ</b>		
<b>R1</b>	Početak cvatnje	Jedan otvoren cvijet na bilo kojem nodiju glavne stabljike.
<b>R2</b>	Puna cvatnja	Jedan otvoren cvijet na jednom od 2 najviša nodija na glavnoj stabljici s potpuno razvijenim listovima.
<b>R3</b>	Početak formiranja mahuna	Mahune dužine 5 mm na jednom od 4 najviša nodija na glavnoj stabljici s potpuno razvijenim listovima.
<b>R4</b>	Puni razvoj mahuna	Mahune dužine 2 cm na jednom od 4 najviša nodija na glavnoj stabljici s potpuno razvijenim listovima.
<b>R5</b>	Začetak formiranja sjemena	Sjeme dužine 3 mm u mahuni na jednom od 4 najviša nodija na glavnoj stabljici s potpuno razvijenim listovima
<b>R6</b>	Puni razvoj sjemena	Mahuna sadrži zeleno sjeme, koje ispunjava šupljinu mahune na jednom od 4 najviša nodija glavne stabljike s potpuno razvijenim listovima.
<b>R7</b>	Početak zriobe	Jedna normalna mahuna na glavnoj stabljici je dostigla boju zrelosti.
<b>R8</b>	Potpuna zrioba	95% mahuna koje su dostigle boju zrelosti. Potrebno je 5-10 dana suhog vremena za psotizanje zrelosti pogodne za kombajniranje (15% vode u zrnu).

#### 2.2.1.4. Agroekološki uvjeti uzgoja soje

Osim izbora prikladne sorte soje za određeno područje uzgoja, važan čimbenik predstavljaju i ekološki čimbenici koji svojim utjecajem mogu pozitivno ili negativno utjecati na genetski potencijal soje. Među najvažnijim ekološkim čimbenicima ističu se zrak (količina ugljikovog dioksida), svjetlost, vlaga i temperatura. Za uzgoj soje potrebna su duboka, humusom bogata tla s dobrim vodozračnim odnosima te neutralne reakcije s pH 7.

Najznačajnija područja za uzgoj soje u svijetu su ona gdje su duboka, plodna tla bogata humusom. Za proizvodnju soje prihvatljive su gotovo sve vrste tla osim jako kiselih i jako slanah te plitkih tala. Također je vrlo važno da su hranjiva u tlu u dovoljno pristupačnom obliku. Ovi uvjeti, osim za razvoj same biljke, potrebni su i za što bolji razvoj kvržičnih bakterija na korijenu.

Razvoj soje moguć je u raznim klimatskim uvjetima – od tropskih dijelova pa sve do umjerene kontinentalne klime, a raznolikosti staništa na kojima se uzgaja pridonosi i velik broj sojeva i hibrida soje.

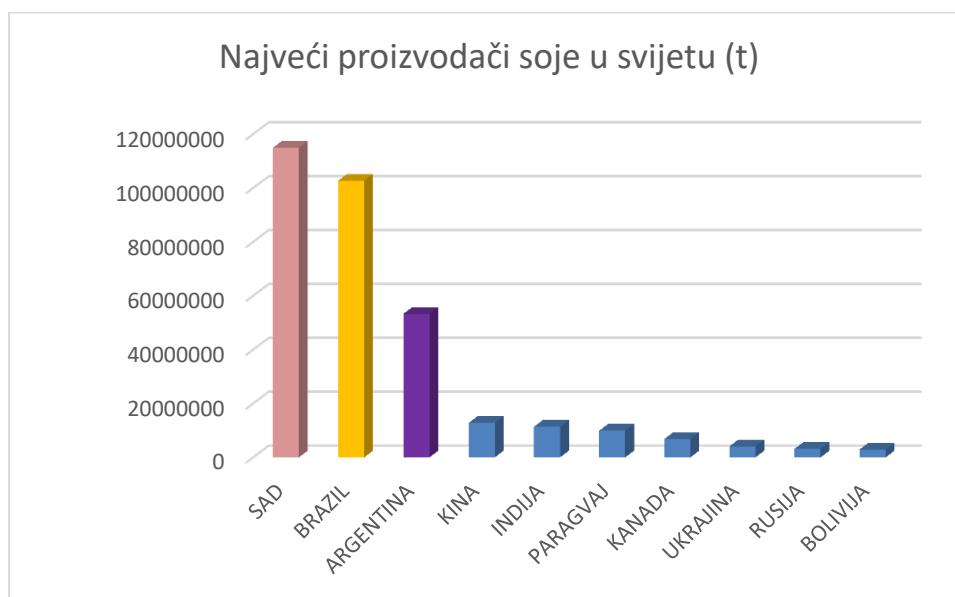
Soja klije pri minimalnoj temperaturi 6-7°C, niče pri 8-10°C, a cvate kada je temperatura 17-18°C. Najoptimalnije temperature za njezin rast i razvoj su 20-25°. Soja je biljka kratkog dana. Voda i vlaga u zraku i tlu predstavlja važan ekološki faktor koji potiče brojne fiziološke procese. Najbolji predusjevi su šećerna repa i kukuruz, a najnepovoljniji suncokret i ozima uljana repica. U periodu od sjetve do nicanja najčešće se ne primjenjuju mjere njege soje osim u izuzetnim slučajevima kada se uslijed jakih i čestih kiša stvori pokorica.

U pripremi sjemena soje za sjetvu obaveznu mjeru predstavlja bakterizacija sjemena odnosno tretiranje rizobijima. Bakterizacija sjemena se obavlja prije sjetve. U Hrvatskoj se soja najviše uzgaja u istočnoj Slavoniji i Baranji. Na tom području se nalaze različite vrste tla poput pseudogleja, ritske crnice i degradiranog černoze, međutim, uz primjenu agromelioracijskih i hidromelioracijskih mjera, tla su poboljšavaju za uzgoj soje.



### 2.2.1.5. Proizvodnja soje u svijetu

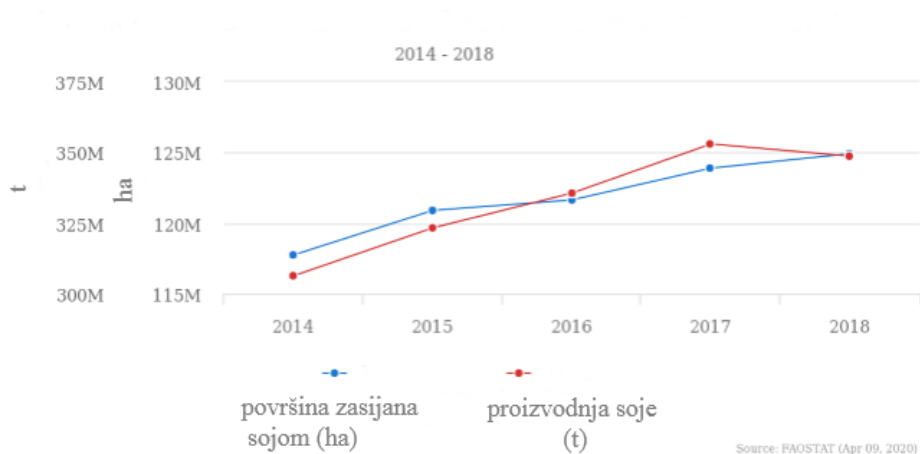
Soja potječe iz istočne Azije te se potom njena proizvodnja proširila po čitavom svijetu. Soja se u Europi počinje proizvoditi tek u 19. stoljeću. Danas najveće površine zasijane sojom ima SAD, potom Brazil, Argentina, Kina i Indija (slika 14). SAD su najveći proizvođači soje s 34 % tržišta odnosno 117 milijuna tona na godinu. Potom slijedi Brazil s 31 % tržišta ili 108 milijuna tona, dok Argentina ima 55 milijuna tona proizvedene soje na godinu što znači da ima 16 % tržišta (FAOSTAT, 2020). Ove tri zemlje drže zajedno više od 80 % svjetske proizvodnje ove vrlo vrijedne kulture. Četvrta po poretku je Kina koja ima 12,9 milijuna tona godišnje proizvodnje, dok se na petom mjestu nalazi Indija s 11,5 milijuna tona godišnje proizvodnje (FAOSTAT, 2020).



Slika 14. Svjetska proizvodnja soje u 2018. godini

Izvor: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Zbog svoje dobre prilagodbe različitim agroekološkim uvjetima soja se danas razvija i u brojnim drugim zemljama svijeta. Površine zasijane sojom u svijetu posljednjih pet godina uglavnom su se povećavale (FAOSTAT, 2020) što se može vidjeti na slici 15.



Slika 15. Svjetska proizvodnja soje u razdoblju od 2014. do 2018. godine

Izvor: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Isti slučaj je i s prinosima koji su iz godine u godinu rasli. Izuzetak je 2018. godina u kojoj je zabilježen blagi pad prinosa, no opečnito se može reći da prinos soje uglavnom ima tendenciju rasta iz godine u godinu.

Ako se uzme period od 20 godina (1998.-2018.), ukupna proizvodnja soje u svijetu se povećavala, pa je tako 1998. godine proizvedeno 160 milijuna tona, dok je 2018. godine proizvedeno ukupno preko 348 milijuna tona (FAOSTAT, 2020). Površine pod sojom su se u ovom periodu također povećavale. U ukupnoj proizvodnji u spomenutih 20 godina Amerika je imala najveći udio (86,1 %), slijedi Azija s 11,1 %, Europa sa svega 2,1 %, te Afrika s 0,7 % (FAOSTAT, 2020).

#### 2.2.1.6. Proizvodnja soje u Hrvatskoj

Na području Republike Hrvatske soja se prvi put pojavljuje između 1876. i 1878. godine. U to vrijeme austrijski biokemičar Friedrich Haberlandt je počeo s provedbom pokusa od sjevernog dijela Češke pa sve do Dubrovnika. Veće širenje soje na područje Hrvatske proveo je Stjepan Čmelik koji je počeo s nabavljanjem novih sorata soje izravno iz Kine te ju počeo uzgajati u području Virovitice. Širenje se nastavilo i izgradnjom Zagrebačke tvornice ulja (današnja Zvijezda) 1934. Nakon Drugog svjetskog rata u Hrvatskoj se soju pokušavalo proizvoditi na većim površinama gdje je bilo zasijano oko 4500 ha, s

prosječnim urodom od 730 kg/ha. Početkom 70-ih godina prošlog stoljeća, nizom poticajnih mjera s državne razine, ponovo je potaknut interes za sojom, što je pridonijelo i povećanju njezine proizvodnje kod nas. U to vrijeme su uvezene novije sorte, prvenstveno iz SAD-a i Kanade, koje su ispitivane na agronomska svojstva, a od najboljih je umnožavano sjeme te se priznavalo i upisivalo u listu sorata soje za komercijalnu proizvodnju (Kozumplik i Pejić, 2012). Međutim, prilagodljivost stranih sorata soje i stabilnost njihova uroda zrna u našim uvjetima uzgoja nije bila zadovoljavajuća. Promjenljivost uroda zrna bila je velika, od lokaliteta do lokaliteta za sortu, kao i variranje uroda zrna iz godine u godinu. Vrlo brzo se nametnula potreba za stvaranjem vlastitih (domaćih) sorata.

Usporedo su oplemenjivači radili na selekciji iz skupljenih introduciranih sorata koje su bile heterogene populacije. Izabrani su poželjni genotipovi, testiralo ih se na urod zrna i najbolji su upisani u liste sorata (uglavnom selekcije Agronomskog fakulteta).

Započelo se s fazom primjene umjetne hibridizacije za stvaranje novih izvora genetičke varijabilnosti. Dobivene sorte iz početnih hibridizacijskih programa korištene su kao roditelji za razvoj novih hibridnih populacija. Višegodišnjim, kontinuiranim i intezivnim radom na soji u Poljoprivrednom institutu u Osijeku i Agronomskom fakultetu u Zagrebu stvaran je domaći sortiment za agroekološke uvjete lokalnih proizvodnih područja. Međutim, ove domaće sorte nisu odigrale značajnu ulogu u afirmaciji soje kao industrijske kulture. Započelo se s fazom primjene umjetne hibridizacije za stvaranje novih izvora genetičke varijabilnosti. Roditelji u početnim križanjima bili su introducirane sorte ili selekcionirani genotipovi iz introdukcija, a koji su uzgajani u širokoj proizvodnji. Hibridne populacije uzgajane su tijekom nekoliko generacija samooplodnje, pri čemu se uglavnom koristilo pedigre metodu izbora za dobivanje homozigotnih linija. Potomstvo pojedinačnih biljaka je ocjenjivano, a superiorne homozigotne linije su bile priznate kao sorte. Dobivene sorte iz početnih hibridizacijskih programa korištene su kao roditelji za razvoj novih hibridnih populacija. Višegodišnjim, kontinuiranim i intezivnim radom na soji u Poljoprivrednom institutu u Osijeku i Agronomskom fakultetu u Zagrebu stvaran je domaći sortiment za agroekološke uvjete lokalnih proizvodnih područja. Prvi domaći kultivari soje (Sivka, Ljubica, Uskolisna, OS-289, Srećka, Maksimirska M-45) priznati su 1976. godine. Od tada do danas u Republici Hrvatskoj registrirana je 61 domaća sorta i oko 40 inozemnih kultivara soje, što znači da se u širokoj proizvodnji soje uz domaće sorte siju i strane sorte. Iako su su prvi eksperimenti i oplemenjivački programi soje započeli u prvoj polovini prošlog stoljeća u današnjem Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta (i traju kontinuirano do danas), oplemenjivački program soje, koji je organiziran i započeo u drugoj polovini 20. stoljeća u Poljoprivrednom institutu

Osijek, imao je fundamentalnu ulogu i značajni doprinos u uvođenju, proširenju i stabilizaciji proizvodnje soje u našoj zemlji. Do sada je iz tog programa Institutu priznata 41 sorta soje u Republici Hrvatskoj. Većina priznatih sorata soje bila je, nalazi se ili će biti uvedena u široku proizvodnju. Svrha kontinuiranog genetskog unapređivanja domaćih sorti soje je napredak i povećanje proizvodnje soje u Republici Hrvatskoj. Svako povećanje proizvodnje koje rezultira iz genetskog poboljšanja kultivara predstavlja i značajan nacionalni ekonomski dobitak. Oplemenjvanjem na adaptacijske vrijednosti stvorene su visokorodne sorte za sva uzgojna područja soje: u istočnom dijelu zemlje pogodne su za sjetvu sorte I. i II. grupe zriobe, a u zapadnom dijelu sorte 00., 0. i I. grupa zriobe.

Podaci Državnog zavoda za statistiku govore da se soja na području Hrvatske uzgaja na gotovo 90 tisuća hektara te da prinosi variraju ovisno o kvaliteti tla, proizvodnim mjerama te vremenskim uvjetima (tablica 5). Interes za sojom u Hrvatskoj u posljednjih nekoliko godina jako je porastao jer je Europa, pa tako i Hrvatska do 2012. godine uvozila 97 % svojih potreba za sojom.

Tablica 5. Žetvena površina, proizvodnja i prirod soje u Republici Hrvatskoj u posljednjih pet godina. Izvor: <https://www.dzs.hr/>

Godina	Površina (ha)	Proizvodnja (t)	Prirod (t/ha)
2014.	47.104	131.424	2.8
2015.	88.867	196.431	2.2
2016.	78.614	244.075	3.1
2017.	85.133	207.765	2.4
2018.	77.087	245.188	3.2

## 2.3. Mikrosimbionti-kvržične bakterije

Rizobije su bakterije tla koje se odlikuju sposobnošću inficiranja korijenovih dlačica brojnih leguminoza pri čemu dolazi do stvaranja posebnih organa koji se nazivaju kvržice, unutar kojeg se odvija proces simbiozne fiksacije dušika. Prema *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* radi se o aerobnim, Gram-negativnim, štapićastim bakterijama koje imaju sposobnost pokretanja.

### 2.3.1. Taksonomija rizobija

Sistematika je grana biologije koja se bavi klasifikacijom živih organizama opisujući tako njihovu raznolikost i njihove odnose međusobno. Sistematika se dijeli na taksonomiju, klasifikaciju i filogenetiku.

Taksonomski razvoj kao i sistematika rizobija prvotno je bila usmjerena na biljku domaćina. U početnoj klasifikaciji bakterija (Bergey i sur., 1923) rizobije su opisivali kao Gram negativne, aerobne, ne sporulirajuće bakterije, a najvažniji kriterij bila je njihova sposobnost nodulacije. Tako prema Bergey i sur. (1923) bakterije koje su imale sposobnost nodulacije bile su klasificirane kao rizobije, dok bakterije sa istim morfološkim svojstvima koje nisu imale sposobnost nodulacije su bile isključene.

Kasnije se u obzir uzimao i raspon biljke domaćina kao i karakteristike rasta bakterija na hranjivom mediju (Fred i sur., 1923). Na temelju rasta na hranjivom mediju Fred i sur. (1932) klasificirali su tako rizobije na brzorastuće i spororastuće. U prvom objavljenom popisu bakterijskih vrsta (Skerman i sur., 1980) uvrštene su tako bile četiri vrste rizobija, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifoli* i *R. meliloti*. Imena su im bila dodijeljena na osnovu biljke domaćina koju noduliraju.

Dugo se smatralo da bakterije koje imaju sposobnost nodulacije potječu od alfa-proteobakterija, no uskoro je potvrđeno da nekoliko bakterija koje pripadaju beta-proteobakterijama također imaju sposobnost nodulacije te su tako rizobije bile klasificirane na alfa i beta-rizobije (Moulin i sur., 2001).

Bakterije koje noduliraju različite leguminoze dijele se na dva različita razreda (Shamseldin i sur., 2017):

- $\alpha$ -proteobakterije
- $\beta$ -proteobakterije

Najveći razred među njima su  $\alpha$ -proteobakterije koje uključuju šest porodica: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae* i *Brucellaceae*.

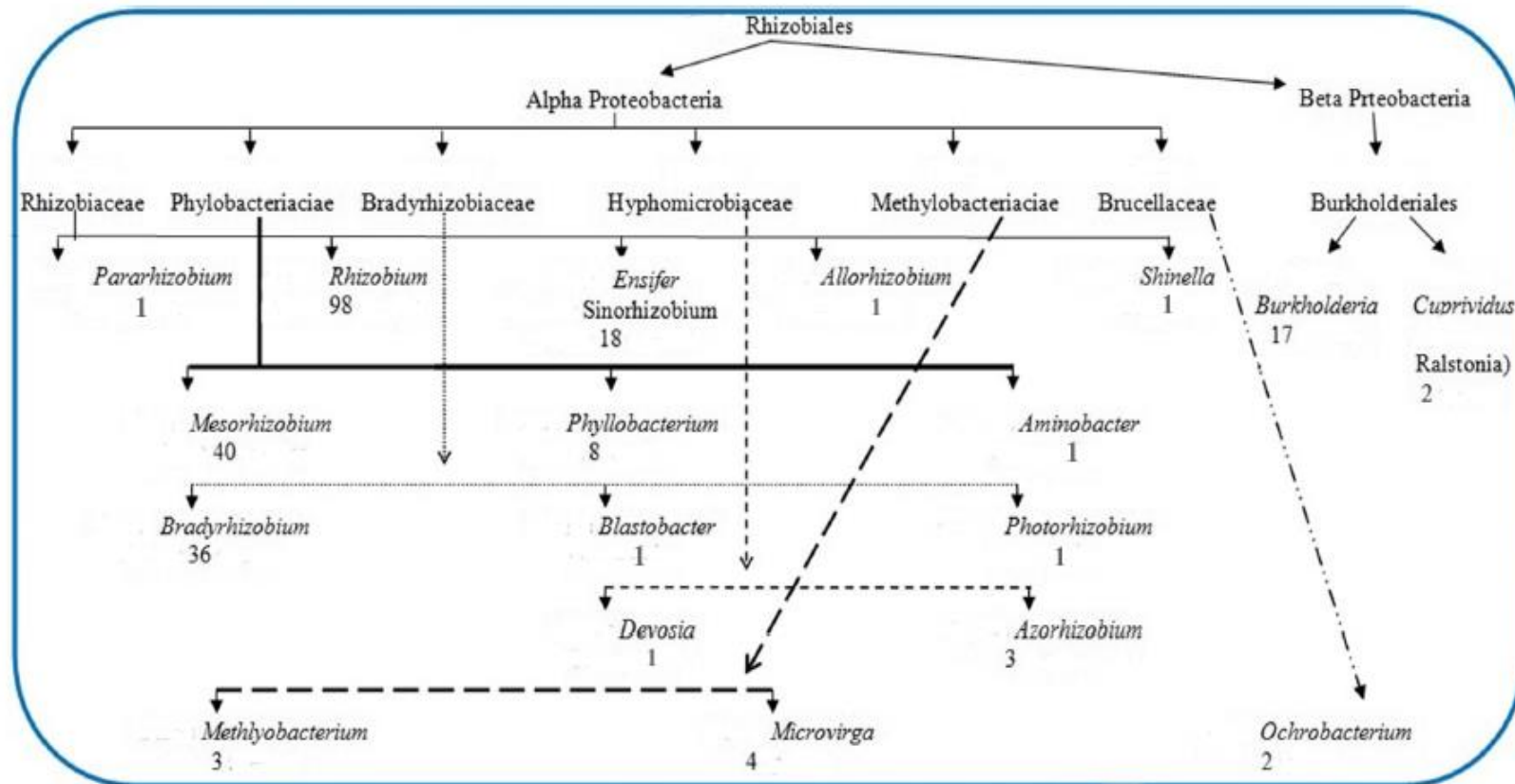
Klasifikacija rizobija dosta se često mijenjala kroz povijest. Zakhia i de Lajudie (2001) su tako cijelu klasifikaciju rizobija saželi u šest *Rhizobium* rodova i 28 rizobijalnih vrsta. No, Sawada i sur. (2003) to mijenjaju budući da su otkrili 44 bakterijske vrste rizobija koje ulaze u simbiozne odnose s brojnim leguminozama te su rizobije tako klasificirali na 12 rodova. Nakon toga, Willems (2006) izvještava da su otkrivene ukupno 53 bakterijske vrste rizobija koje su raspoređene u rodove *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azorhizobium* i *Allorhizobium*.

Daljnja klasifikacija rizobija se nastavila kad su Barrada i Fikri-Benbrahim (2014) izvijestili da rizobijama pripada 98 bakterijskih vrsta koje su raspoređene u 14 rodova. Konačna klasifikacija rizobija dogodila se nekoliko godina kasnije kada su Shamseldin i sur. (2017) izvijestili da je opisano ukupno 238 vrsta rizobija koje su raspoređene u 18 rodova. Takva klasifikacija nije se mijenjala do danas.

### 2.3.1.1. Rizobije unutar razreda $\alpha$ -proteobakterija

Porodica *Rhizobiaceae* predstavlja jednu od najviše kohezivnih i sačuvanih porodica (slika 16). Radi se o porodici koja je široko rasprostranjena i sastoji se od šest rodova: *Rhizobium*, *Ensifer* (ranije *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Shinella*, *Pararhizobium* i *Neorhizobium*. Rod *Rhizobium* ima 98 vrsta, pri čemu je njih 69 izolirano s različitim leguminoza, dok njih 29 predstavlja nesimbiotske vrste. Shamseldin i sur. (2017) identificirali su *Rhizobium aegypticaum* kao novu vrstu koja učinkovito nodulira egipatsku djetelinu (*Trifolium alexandrinum* L.).

Rod *Ensifer* (ranije *Sinorhizobium*) ima 18 vrsta. Gubry-Rangin i sur. (2013) otkrili su novu vrstu *Ensifer meliloti* sv. *rigiduloides*, koja nodulira *Medicago rigiduloides*, ali ne i *Medicago truncatula*. Ostala tri roda (*Allorhizobium*, *Shinella* i *Pararhizobium*) imaju po jednu vrstu.



Slika 16. Shematski prikaz broja i distribucija rizobija koje noduliraju leguminoze Prilagođeno iz Shamseldin i sur. (2017).



Druga obitelj *Phylobacteriaceae* sadrže tri roda: *Mesorhizobium*, *Phylobacterium* i *Aminobacter*. Rod *Mesorhizobium* tako sadrži 40 vrsta, rod *Phlobacterium* 8 vrsta, dok rod *Aminobacter* samo jednu vrstu.

Treća porodica *Bradyrhizobiaceae* sadrži rodove *Bradyrhizobium*, *Blastobacter* i *Photorhizobium*. Rod *Bradyrhizobium* uključuje 36 vrsta, dok ostala dva roda imaju samo po jednu vrstu. Guerrouj i sur. (2013) predložili su novi simbiovar nazvan *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., koji nodulira *Retama sphaerocarpa* i *Retama monosperma*.

Četvrta porodica *Hyphomicrobiaceae* uključuje rodove *Devosia* i *Azorhizobium*. Rod *Devosia* ima samo jednu vrstu, dok rod *Azorhizobium* ima tri vrste.

Peta porodica *Methylobacteriaceae* sastoji se od rodova *Microvirga* i *Metylobacterium*. Rod *Microvirga* uključuje četiri vrste, dok rod *Metylobacterium* samo tri vrste.

Na kraju šesta porodica *Brucellaceae* sadrži samo rod *Ochrobactrum* koji ima svega dvije vrste.

#### 2.3.1.2. Rizobije unutar razreda $\beta$ -proteobakterija

Iako je većina rizobija smještena unutar  $\alpha$ -proteobakterija, novije studije su pokazale da bakterije koje noduliraju leguminoze pripadaju i mnogo široj skupini (Sprent i sur., 2017). Otkriveno je da 18 vrsta rizobija spada u dva roda  $\beta$ -proteobakterija. Rod *Burkholderia* koji ima 17 rodova i rod *Cupriavidus* koji se sastoji od dvije vrste. Iako su  $\beta$ -rizobije tek nedavno opisane, brojne molekularne analize su potvrdile da one preko pedeset milijuna godina stvaraju simbioze s različitim leguminozama (Gyaneshwar i sur., 2011). Tako različite vrste  $\beta$ -rizobija sadrže uobičajne nodulacijske gene (*nodABC*, *nodD*, *nifH*) koji su vrlo slični simbiotskim genima  $\alpha$ -rizobija. Stoga se pretpostavlja da su  $\beta$ -rizobije simbiozne gene dobile s vremenom horizontalnim prijenosom gena (Lindström i sur., 2015).

### 2.3.1.3. Nejasnoće oko taksonomskog statusa rodova *Agrobacterium-Allorhizobium-Rhizobium*

*Agrobacterium* spp. prvo je klasificiran na vrste na temelju njihove interakcije s biljkama, kao *A. tumefaciens* koji stvara tumore na korijenu biljaka, *A. rhizogenes* koji je uzrok pojačane dlakavosti korijena biljaka i nepatogeni *A. radiobacter*. Sve opisane vrste rodova *Agrobacterium* imenovane su i uključene u ovaj rod na osnovu specifičnih karakteristika koje nose na plazmidu (tumorigeneze, patogenosti i rizogenosti). Rod *Agrobacterium* pokazuje vrlo veliku sličnost s rodom *Rhizobium*. Budući da plazmidi kao i geni na plazmidima nisu stabilni, često može doći do njihove zamjene između relativno bliskih bakterijskih vrsta, kao i onih relativno udaljenih. Young i sur. (2001) predložili su tako spajanje rodova *Agrobacterium* i *Allorhizobium* u rod *Rhizobium*.

### 2.3.1.4. Rizobije bez simbioznih gena ("ne-simbiozne rizobije")

Danas su ukupno otkrivene 33 vrste ne-simbiozni rizobija koje su raspoređene u različite rodove. Većina njih (29) pripada rodu *Rhizobium*. Kimes i sur. (2015) otkrili su novi rod, *Pseudorhizobium*, odnosno novu vrstu *Pseudorhizobium pelagicum* koja pokazuje 97% sličnosti sekvenci sa sekevencama pripadnika rodova *Neorhizobium* i *Rhizobium*, no ovoj novootkrivenoj vrsti nedostaju simbiotski geni (Shamseldin i sur., 2017).

### 2.3.1.5. Taksonomski kriteriji za opis novih vrsta

Prve kvržične bakterije izolirane su 1888. iz kvržica korijena graška od strane nizozemskog mikrobiologa i botaničara Beijerincka. Nazvane su *Bacillus radicola*. Međutim, Frank je ove bakterije 1889. godine preimenovao u *R. leguminosarum*, odnosno svrstao ih u rod *Rhizobium*. Od tada je otkriven značajan broj novih vrsta rizobija, a taksonomija se stalno mijenjala kako su se otkrivale nove vrste i rodovi. Početkom 1920. godina kao kriterij za klasifikaciju rizobija koristila su se fenotipska svojstva (Bergey i sur., 1923). U skladu s tim morfološke karakteristike rizobija smatrale su se kriterijima za njihovu taksonomiju. Kasnije su Fred i sur. (1932) koristili i koncept unakrsne inokulacije kojom se pratio raspon rizobija za biljku domaćina.

Taksonomija rizobija znatno je poboljšana razvojem molekularne metode sekvenciranja 16S rRNA koju je otkrio Woese i sur. (1984). Polifazni pristup koji je uključivao klasične fenotipske i morfološke karakteristike, analize proteina, analize masnih kiselina (FAME), DNA-DNA hibridizacija, RFLP metoda, sekvenciranje 16S rRNA gena kao i neke

simbiotske karakteristike, dugo su se smatrali standardnim smjernicama za opis novih vrsta rizobija (de Lajudie i sur., 2019).

U razdoblju od 1991. do 2018. godine strategije za opisivanje novih vrsta rizobija dosta su evoluirale budući da su sekvencirani setovi kromosomalnih gena za mnoge vrste (de Lajudie, 2019). U identifikaciji rizobija danas se najčešće koristi analiza sekvenci više lokusa MLSA (engl. *Multilocus Sequence Analysis*).

Tako je predloženo da se u MLSA analizu uključi barem pet konstitucijskih gena, no taj broj još nije točno definiran. Ovi geni daju višu filogenetsku razlučivost, a korištenje nekoliko gena minimalizira utjecaj mogućeg horizontalnog prijenosa gena (eng. *Horizontal gene transfer*). Većina znanstvenika smatra da je minimum tri gena potreban za MLSA analizu, budući da se pokazalo da su gotovo svi geni, čak i 16S rRNA u određenoj mjeri horizontalno prenešeni tijekom evolucije (Andrews, 2018). Korištenje MLSA analize u otkrivanju novih vrsta potvrđena (2002) od strane Međunarodnog odbora za sistematiku prokariota. Za opis novih vrsta rizobija najčešće korišteni geni su *recA*, *atpD*, *glnII*, *rpoB*, *gyrB* i *dnaK* (Yuan i sur., 2020).

### 2.3.2. Proučavanje raznolikosti i filogenija rizobija

Zadnjih nekoliko godina uloženo je dosta napora u proučavanju raznolikosti i populacijske strukture rizobija u različitim dijelovima svijeta (Li i sur., 2011). Za sva provedena istraživanja korištene su različite molekularne metode. To je uključivalo analizu profila plazmida (Aserse i sur., 2017), RFLP rRNA gena i profile intragenjskih regija (Poussier i sur., 2000), AFLP (*engl. Amplified Fragment Length Polymorphic DNA*), rep-PCR (*engl. repetitivne extragenic palindromic sequence*), ERIC (*engl. enterobacterial repetitive intergenic consensus*), RAPD (*engl. random amplified polymorphic DNA*) kao i multilokusnu analizu konstitutivnih gena.

Molekularni markeri općenito pružaju bolje informacije, osjetljiviji su i relativno precizniji za proučavanje odnosa usko povezanih bakterijskih sojeva kao i za otkrivanje veće raznolikosti rizobija za razliku od fenotipskih metoda. Fenotipske karakteristike kao što su morfologija kolonija, fiziološke i biokemijske karakteristike mogu dosta varirati ovisno o hranjivoj podlozi i uvjetima njihovog uzgoja. Osim toga, abiotski faktori u tlu kao i metodika uzorkovanja tla utječu na raznolikost rizobija (Oliviera i sur., 2017).

Otkrićem molekularnih metoda za identifikaciju bakterija, klasifikacija rizobija prošla je niz različitih faza. Prvenstveno se odnosi na morfološke, fiziološke, biokemijske faze, kao i na kraju fazu molekularnih markera. Tako su se molekularni markeri počeli koristiti kao neizostavan alat u identifikaciji novih vrsta rizobija. Za njih je značajno da mogu biti smješteni i u kodirajućim i u nekodirajućim regijama genoma. Molekularne markere karakterizira nekoliko bitnih značajki, a to su: da ih je većina konstitutivnih (*engl. housekeeping*) koji su prisutni u svim bakterijskim stanicama, da imaju visok stupanj polimorfizma, što omogućava razlikovanje među bakterijskim vrstama, visoko su konzervirani, što omogućava lako konstruiranje početnica za PCR amplifikaciju. Smatra se da se kombinacijom više različitih markera dobivaju najpouzdaniji rezultati.

### 2.3.3. Molekularne metode za identifikaciju i proučavanje raznolikosti rizobija

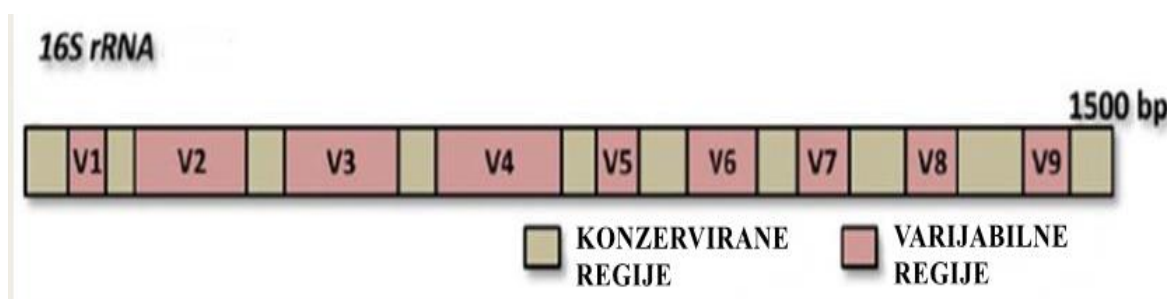
#### 2.3.3.1. Sekvenciranje 16S rRNA (*rrs*) gena

Iako je dokazano da 16S rRNA gen nije najbolji izbor za klasifikaciju svih bakterijskih vrsta, još uvijek se najviše koristi u identifikaciji rodova i vrsta različitih bakterija uključujući i rizobije. Naime bakterije sadrže gene koji kodiraju za 5S, 16S i 23S rRNA kao i za ITS regiju (eng. *internal transcribed spacer*) koja se nalazi između 16S i 23S rRNA. Ribosomalna RNA je vitalna komponenta ribosoma koji su uključeni u prenošenje glasničke RNA (mRNA) i sintezu proteina (Klein i sur., 2004).

Sekvenciranje 16S rRNA gena koristi se kao standardni molekularni marker u identifikaciji i taksonomskoj klasifikaciji prokariota, uključujući i rizobije (Haris i Hartley, 2003). Glavne značajke koje 16S rRNA čine pogodnom za filogenetske analize su:

1. 16S rRNA se univerzalno nalazi u svim živim organizmima što omogućava usporedbu filogenetskih odnosa svih organizama i omogućava izradu filogenetskog stabla.
2. Visoko je konzervirana, te se njena funkcija vremenom nije promijenila.
3. Sekvenca bakterijske rRNA dosta je duga (oko 1500bp). Uključuje konzervirane i varijabilne regije koje pri tome mogu pružiti dosta informacija bitnih za taksonomiju.

16S rRNA sadrži devet hipervarijabilnih regija (V1-V9) koje su značajne po tome da pokazuju vrlo veliku raznolikost između različitih vrsta bakterija, što je bitno za filogenetske analize rizobija (slika 17).



Slika 17. Prikaz 16S rRNA gena sa konzerviranim i varijabilnim regijama.

Budući da hipervarijabilne regije pokazuju različiti stupanj raznolikosti sekvenci, ne može se koristiti samo jedna regija za razlikovanje svih bakterijskih vrsta. Zbog toga su provedena i brojna istraživanja u kojima se uspoređivala prednost svake pojedine regije ili čak kombinacija više regija u identifikaciji određenih vrsta (Bukin i sur., 2019).

Zbog svega navedenog sekvenciranje 16S rRNA gena intenzivno se koristi kao glavni kriterij za filogenetsku klasifikaciju prokariota (Patwardhan i sur., 2014). Općenito, sličnost sekvenci 16S rRNA gena veća od 97% smatra se granicom za razlikovanje vrste (Beye i sur., 2017).

Danas se sekvenciranje 16S rRNA gena za proučavanje mikrobne raznolikosti i filogenetičke analize mora koristiti oprezno jer se zna da bakterijski genom može imati višestruke i heterogene ribosomalne RNA operone koji mogu utjecati na horizontalni prijenos gena i genetičku rekombinaciju (Espejo i Plaza, 2018). Otkriveno je da se broj operona između relativno bliskih vrsta konzerviran, dok su umjerene varijacije pronađene između sojeva iste vrste. Tako primjerice različiti sojevi *B. japonicum* mogu imati jedan ili dva rRNA operona gdje većina sekvenci 16S rRNA izvedena od različitih operona istoga genoma imaju veliku sličnost (samo oko 1% nukleotidne razlike), dok su varijacije između sekvenci 16S rRNA koje pripadaju različitim operonima istoga genoma može biti isto velika (Johnson i sur., 2019). Stoga heterogenost sekvenci unutar genoma može dovesti do povećanja bakterijske raznolikosti unutar populacije.

Kod rizobija se pokazalo da je varijacija u sekvenci gena 16S rRNA nepouzdana za razlikovanje bliskih vrsta (Ramirez-Bahena i sur., 2008). To se posebno odnosi na rod *Bradyrhizobium* gdje je filogenetska klasifikacija na razini vrste korištenjem ovog molekularnog markera dosta teška. Razlog tomu je visoka konzerviranost 16S rRNA gena kod roda *Bradyrhizobium*, dok je sličnost sekvenci relativno velika između usko povezanih vrsta (Wojcik, 2019). Zbog toga se češće koristi analiza ITS regije. Radi se o regiji koja se nalazi između 16S rRNA i 23S rRNA lokusa u rRNA. Struktura 16S-23S rRNA pokazuje vrlo veliku raznolikost između vrsta i time omogućava bolju identifikaciju. Analiza ITS regije ponekad zna biti dosta zahtjevna zbog velike varijacije u veličini sekvenci kod nekih sojeva roda *Bradyrhizobium* (Passaglia, 2017).

### 2.3.3.2. DNA-DNA hibridizacija

DNA-DNA hibridizacija (DDH) je molekularna metoda koja se koristi za proučavanje bakterijske heterogenosti, specifikacije i taksonomije (Leite i sur., 2018). Metoda DNA-DNA hibridizacija koristi se za utvrđivanje specifičnih razlika između usko povezanih bakterijskih vrsta. Nakon što ju je Krieg (1988) otkrio ova metoda se koristi za opis novih vrsta bakterija. Radi se o metodi kod koje se cjelokupna sličnost sekvenci različitih organizama izračunava usporedbom čitavog genoma (Kuzmanović i sur., 2018).

U praksi DDH metoda sastoji se od 3 koraka:

1. Analiza genomske DNA ispitivanog organizma i referentnog soja
2. Miješanje DNA oba soja i zagrijavanje kako bi se molekula DNA denaturirala
3. Hlađenje do temperature koja je potrebna da se fragmenti DNA ponovno ne spoje

Metoda zahtijeva i vrlo veliku količinu DNA koja je visoko kvalitetna, tehnički je dosta zahtjevna i dugotrajna. Specijalizirana je većinom na nekoliko laboratorija i uglavnom se primjenjuje ukoliko se zna da proučavane bakterije imaju usko povezane sekvence 16S rRNA gena (Okamura i sur., 2013; Auch i sur., 2010). Iako ima dosta ograničenja, DDH metoda se još uvijek smatra standardom za razgraničenje bakterija na razini vrste. No brzim napretkom metode sekvenciranja i smanjenje njenih troškova polako dovodi do toga da ova metoda bude zamijenjena puno preciznijom metodom sekvenciranja.

### 2.3.3.3. AFLP (engl. *amplified fragment length polymorphism*)

AFLP metoda je jedna od najčešće korištenih metoda za analizu bakterijskog genoma. Od kako je prvi put predstavljena znanstvenoj zajednici (Vos i sur., 1995) koristila se za proučavanje genetske raznolikosti i filogeniju ne samo bakterija već i biljaka i gljiva. Početna faza AFLP metode je restrikcija DNA, a potom dolazi do spajanja s početnicama. Nakon toga se restrikcijski fragmenti umnože te se razdvoje na poliakrilamidnom gelu ili nešto češće kapilarnom elektroforezom, koristeći automatski sekvencer. Za AFLP metodu je značajno i to da je obično jedna ili čak obje početnice moraju biti fluorescentno obilježene da bi se dobiveni fragmenti mogli detektirati i razdvojiti prema svojoj veličini. U usporedbi s RAPD metodom, AFLP metoda ima veću diskriminacijsku moć i pokazuje bolju gensku raznolikost (Wojcik i sur., 2019). Ova metoda se također koristi za proučavanje taksonomskog odnosa različitih skupina bakterijskih vrsta. Pokazala se

također uspješnom za određivanje različitih vrsta roda *Agrobacterium* koje su prethodno bile klasificirane DNA-DNA hibridizacijom (Portier i sur., 2006).

AFLP metoda također je korištena u taksonomskim analizama različitih *Bradyrhizobium* vrsta (Willems i sur., 2000). Aserse i sur. (2012) navedenu metodu koristili su u proučavanju raznolikosti rizobija koje noduliraju grah u Etiopiji, dok su Qureshi i sur. (2018) AFLP metodom proučavali devet različitih vrsta roda *Rhizobium* u Pakistanu.

#### 2.3.3.4. RAPD-PCR analiza

RAPD (engl. *random amplified polymorphic DNA*) je metoda nasumične amplifikacije polimorfne DNA. Radi se o metodi koja je utemeljena na lančanoj reakciji polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*). Metoda je značajna po tome da se primjenjuju nasumično odabrane početnice koje se višestruko vežu na djelomično ili potpuno komplementarne sekvence ispitivanog genoma. Početnice su najčešće veličine 10-20 bp čiji sadržaj G+C baza mora iznositi preko 70 %, a detektiraju polimorfizme genskih otisaka što u konačnici omogućava razlikovanje sojeva iste vrste. Za RAPD-PCR metodu je značajno i to da nije potrebno poznavati sekvencu genoma vrste koja se proučava. RAPD metoda pokazala se jako dobrom metodom u proučavanju raznolikosti različitih sojeva roda *Rhizobium* (Koskey i sur., 2018).

Muschetti i sur. (2005) navode da se RAPD metoda pokazala učinkovitom za grupiranje različitih sojeva *R. leguminosarum* bv. *viciae* kao i Blažinkov i sur. (2006), dok Sikora i Redžepović (2003) navode tako da je RAPD metoda u njihovim istraživanjima omogućila identifikaciju i grupiranje različitih autohtonih sojeva *B. japonicum* na temelju polimorfnih genskih otisaka.

#### 2.3.3.5. Rep-PCR analiza

Rep-PCR (engl. *repetitive sequence-based*) jedna je od najčešće korištenih metoda u proučavanju prirodnih populacija simbioznih fiksatora dušika. Njena glavna značajka je da omogućava razlikovanje sojeva unutar iste vrste (Hameed i sur., 2016; Chibeba i sur., 2017). Metoda se temelji na umnažanju kratkih repetitivnih sekvenci koje su raspršene po kromosomu. Značajna je po svojoj osjetljivosti i visokoj reproducibilnosti pa se zbog toga koristi za proučavanje genetske raznolikosti različitih sojeva bakterija, uključujući i rizobije (Cardoso i sur., 2017).



### 2.3.3.6. Sekvenciranje konstitutivnih gena

Konstitutivni geni (engl. *housekeeping*) su geni koji su smješteni na kromosomu. Oni su uključeni u brojne procese kao što su metabolizam, izmjena informacija i brojne druge. Za njih je značajno da se eksprimiraju u svim stanicama u normalnim i patofiziološkim uvjetima kako bi održali osnovne stanične funkcije organizma. U cilju prevladavanja ograničenja sekvenciranja *rrs* gena i metode DNA-DNA hibridizacija, analize sekvenci više lokusa (MLSA), smatra se glavnom metodom za proučavanje blisko povezanih vrsta. Zbog svega navedenog smatra su da su konstitutivni geni najprikladniji markeri za filogenetsku analizu rizobija. Za konstitutivne gene je značajno da imaju višu divergenciju sekvenci u odnosu na 16S rRNA gene (Andrews i sur., 2018). Naime, smatra se da geni koji kodiraju proteine su široko rasprostranjeni, jedinstveni unutar određenog genoma, dovoljno dugački i dosta filogenetički informativni (Andrews i sur., 2018).

Kombinacija dva ili više konstitutivnih gena najčešće se koristi u proučavanju taksonomije i filogenetskoj analizi rizobija.

Stepowski i sur. (2018) koristeći nekoliko konstitutivnih gena proučavali su tako filogeniju roda *Rhizobium* spp., Kalloniati i sur. (2009) *Mesorhizobium* spp., dok su Bouznif i sur. (2019) i Schmeijdsberg i sur. (2018) kombinacijom nekoliko konstitutivnih gena proučavali filogeniju roda *Bradyrhizobium* spp.

Martens i sur. (2008) proveli su analizu deset različitih konstitutivnih gena nekoliko vrsta rizobija koje pripadaju rodu *Ensifer*. Utvrdili su da su se kao najbolji molekularni markeri za identifikaciju vrsta roda *Ensifer* pokazali geni *recA*, *gyrB*, *gltA* i *thrC*. Rivas i sur. (2009) su u svom istraživanju otkrili da su se u identifikaciji *Bradyrhizobium* vrsta najbolje pokazali geni *atpD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *dnaK*. Ovo pokazuje da zapravo kombinacija različitih konstitutivnih gena daje najbolje rezultate u identifikaciji različitih vrsta roda *Bradyrhizobium* (Peix i sur., 2015).

Varijabilnost grupiranja bakterijskih sojeva iste vrste ovisi o vrsti korištenih gena. Ova varijacija se najčešće pripisuje razlikama u evolucijskoj povijesti između gena ili čak horizontalni prijenos gena ponekad može utjecati na strukturu sekvenci ovih gena (Liu i sur., 2019). Upravo se iz tog razloga preporuča koristiti više od jednog gena u svrhu identifikacije bakterija i jasne filogenetske zaključke.

### 2.3.3.7. Pomoćni genetički elementi: simbiozni geni

Pomoćni genom rizobija (engl. *accessory*) obuhvaća skupinu gena koji se uglavnom nalaze u sekundarnim bakterijskim replikonima poznatim po nazivu plazmidi kod roda *Rhizobium* ili na genskim otocima na kromosomu kod roda *Bradyrhizobium*.

Dok osnovni (engl. *core*) geni kodiraju osnovne stanične funkcije (metabolizam, izmjena informacija) pomoćni geni kodiraju za dodatne funkcije koje su potrebne bakterijama za prilagodbu na različite uvjete okoliša i ekološke niše (Aserse, 2012). Riječ je o pokretnim genetičkim elementima koji se mogu prenositi između bakterijskih stanica, ali se također mogu dugoročno povezati sa bakterijskim vrstama ili grupom vrsta (Ling i sur., 2016).

Smatralo se da je kontinuirani gubitak ili dobitak pokretnih genetičkih elemenata između različitih bakterijskih vrsta uobičajena pojava. Ovi procesi povezani su s nekoliko mehanizama horizontalnog prijenosa gena, kao što je konjugacija kojom se fragmenti DNA ili čitavi plazmidi prenose od bakterijskog donora u bakteriju recipijenta, ekscizija ili integracija transpozona u kromosomu, transdukcija faga ili transkripcija slobodne DNA iz jedne u drugu stanicu (Andrews i sur., 2018).

Pomoćni geni uključeni su u prenošenje osobina kao što su otpornost na antibiotike, razgradnju ksenobiotika, svojstva koja bakterijama omogućava da ulaze u simbiozne odnose sa drugim višim organizmima (Andrews i sur., 2018). Iz svega navedenog slobodno se može reći da pomoćni geni pojačavaju "adaptivnu" evoluciju bakterija (Yuan i sur., 2020).

Kod rizobija simbiozni *nod* geni potrebni za proces nodulacije i formiranje kvržica te geni potrebni za proces fiksacije dušika (*fix* i *nif*) mogu biti smješteni ili na plazmidima ili na simbioznim otocima. Tako su kod rodova *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Cupriavidus* i *Ensifer* smješteni na plazmidu (Roy i sur., 2020), a kod roda *Bradyrhizobium* na simbioznim otocima (Ormeño-Orrillo i Martinez-Romero, 2019).

Prvi simbiozni otok otkriven je kod vrste *M. loti*, a kasnije su pronađeni na kromosomu *B. japonicum* USDA 110 i *B. japonicum* USDA 6 (Uchiumi i sur., 2004).

Za razliku od osnovnih gena koji imaju sličnu organizaciju kod relativno srodnih vrsta, organizacija i sastav pomoćnih gena dosta se razlikuje među srodnim vrstama.

#### 2.3.4. Rod *Bradyrhizobium*

Osnovne karakteristike roda *Bradyrhizobium* opisane su u *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Kuykendall, 2005). Radi se o Gram negativnim nesporulirajućim štapićima koji imaju jednu subpolarnu ili polarnu flagelu pomoću koje se pokreću. Formiraju okrugle, neprozirne kolonije veličine oko 1 mm. Optimalna temperatura rasta kreće se između 25-30°C, ali u mogućnosti su rasti i na temperaturama do 35°C. Rastu pri pH 6 –7, ali mogu rasti i na nižim pH vrijednostima.

Spadaju u skupinu spororastućih rizobija s generacijskim vremenom od 9–18 sati. Radi se o kemoorganotrofnim mikroorganizmima koji mogu upotrebljavati širok raspon ugljikohidrata kao i soli iz različitih organskih kiselina. Najpoželjniji izvori ugljika roda *Bradyrhizobium* su arabinoza i razne pentoze.

*Bradyrhizobium* je jedan od nekoliko rodova rizobija koji ima sposobnost ulaska u simbiozu s različitim leguminozama pri čemu stvara posebnu vrstu organa na korijenju leguminoza u kojima se vrši proces fiksacije atmosferskog dušika. U početku su sojevi roda *Bradyrhizobium* bili označeni kao spororastući *Rhizobium* sojevi, dok ih kasnije Jordan (1982) nije svrstao u neovisan rod *Bradyrhizobium*. Broj vrsta roda *Bradyrhizobium* posljednjih godina znatno se povećao. Otkriveno je da se unutar roda *Bradyrhizobium* nalaze i neke fotosintetske bakterije koje trebaju Nod faktore za stvaranje kvržica, čime je otvoreno novo područje istraživanja nodulacije biljaka (Ormeño-Orrillo i Martinez-Romero, 2019).

Različite vrste roda *Bradyrhizobium* stvaraju simbiozne odnose s brojnim leguminozama poput soje (Delamuta i sur., 2013), lima graha (Duran i sur., 2014), kikirikija (Steenkamp i sur., 2008), kao i brojnim tropskim leguminozama (Delamuta i sur., 2015; Ramirez-Bahena, 2009).

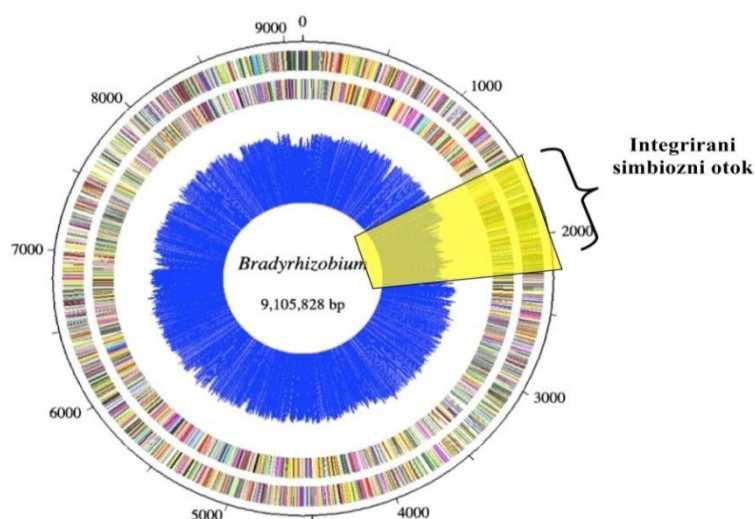
Koristeći nekoliko gena kao molekularnih markera otkrivena je velika raznolikost roda *Bradyrhizobium*. Poznato je da unutar ovog roda 16S rRNA geni ne daju odgovarajuću raznolikost sekvenci kako bi se jasno identificirale različite vrste (Leite i sur., 2017). Zbog toga se kao molekularni markeri najčešće koriste geni kao što su geni *recA*, *glnII*, *atpD*, *dnaK*, *gyrB* i *rpoB* u identifikaciju vrsta roda *Bradyrhizobium*.

Kalita i Malek (2019) koristili su tako u svom istraživanju novi molekularni marker *ftsA* koji se pokazao pouzdan u identifikaciji vrste *B. japonicum*. Smatraju da će ovaj novootkriveni marker doprinijeti cjelokupnoj filogeniji ovog roda, kao i preciznijoj identifikaciji vrste *B. japonicum*.

Podaci o raznolikosti roda *Bradyrhizobium* proširili su se zahvaljujući brojnim istraživanjima na leguminozama u Africi (Gronemeyer i sur., 2017), Brazilu (Martins da Costa i sur., 2017; Leite i sur., 2018), te Kini (Li i sur., 2019).

#### 2.3.4.1. Genom roda *Bradyrhizobium*

Rod *Bradyrhizobium* značajan je po tome što ima dosta veliki genom bez simbioznih plazmida (Ormeño-Orrillo i Martinez-Romero (2019)). Na kromosomu ovog roda smješteni su simbiozni otoci koji nose *nod* i *nif* gene (slika 18) odgovorne za proces nodulacije i fiksacije dušika.

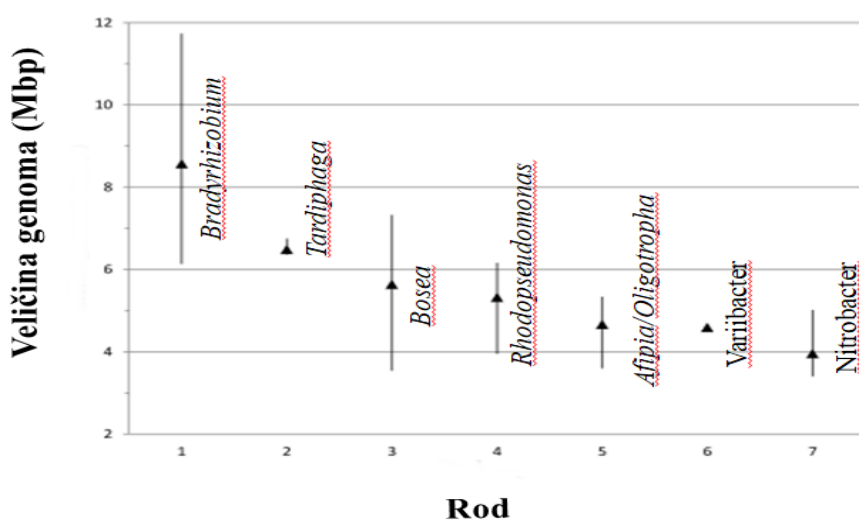


Slika 18. Prikaz građe genoma roda *Bradyrhizobium*. Žuto označeno predstavlja simbiozni otok na kromosomu na kojem su smješteni *nod* i *nif* geni. Prilagođeno iz Ormeño-Orrillo i Martinez-Romero (2019).

Rod *Bradyrhizobium* karakterizira i velika raznolikost nodulacijskih gena, osobito raznolikost *nodA* i *nodC* gena budući da su ovi geni podložni horizontalnom prijenosu gena između različitih vrsta ovog roda.

Smatra se da je rod *Bradyrhizobium* jedan je od rodova s najvećom veličinom genoma. Veličina genoma kod većine vrsta ovog roda kreće se između 7 i 10 Mbp, sa srednjom veličinom oko 8,6 Mbp (Ormeño-Orrillo i Martínez-Romero, 2019).

Ako se usporedi veličina genoma ovog roda s ostalim rodovima u porodici *Bradyrhizobiaceae*, jasno se vidi da rod *Bradyrhizobium* ima najveći genom, potom slijedi rod *Tardiphaga* i *Bosea*, dok najmanji genom ima rod *Nitrobacter* (slika 19).



Slika 19. Raspon veličine genoma kod različitih rodova porodice *Bradyrhizobiaceae*. 1. *Bradyrhizobium*; 2. *Tardiphaga*; 3. *Bosea*; 4. *Rhodopseudomonas*; 5. *Afipia/Oligotropha*; 6. *Variibacter*; 7. *Nitrobacter*. Trokut označava srednju veličinu genoma.

Tri roda s najvećim genomom ulaze u simbozne odnose s biljkama. S druge strane najmanji genom imaju bakterije roda *Nitrobacter*, *Oligotropha*, *Veriibacter* i patogeni rod *Afipia*. Iz toga se može zaključiti da je veličina genoma kod ove porodice vezana uz način života.

### 2.3.5. Proučavanje raznolikosti rizobija u Republici Hrvatskoj

U Hrvatskoj je prisutno dugogodišnje proučavanje simbiozne fiksacije dušika, ponajviše kroz simbiozni odnos vrste *B. japonicum* i soje (Redžepović i sur., 2006; Sikora i sur., 2002). Prvi literaturni zapis o proučavanju raznolikosti simbioznih fiksatora dušika u Republici Hrvatskoj je disertacija Strunjak (1965) koja je provela serološku identifikaciju rizobija s lucerne i djeteline. Velik interes za proučavanje simbioznih fiksatora dušika javlja se sredinom 80-tih godina prošlog stoljeća kada na Zavodu za mikrobiologiju započinje submerzni uzgoj biomase *B. japonicum*. Istraživanje se na početku temeljilo na proučavanju kompatibilnosti različitih sorata soje s inokuliranim sojevima *B. japonicum* kao i na koji način mineralni dušik djeluje na rast simbiozni fiksatora dušika *B. japonicum* (Redžepović i sur., 1986). Uvođenjem molekularnih metoda u područje simbiozne fiksacije dušika došlo je do napretka u identifikaciji i karakterizaciji simbioznih fiksatora dušika. Molekularne metode prvi put je upotrijebila Sikora u svojoj disertaciji (1996) koja se bavila proučavanjem simbiozne učinkovitosti autohtonih sojeva *B. japonicum* izoliranih sa područja zapadne Slavonije. Pored SDS-PAGE metode ukupnih staničnih proteina, analizirala je i njihove RAPD profile te utvrdila da je to od svih korištenih metoda u istraživanju najosjetljivija i najpouzdanija metoda za identifikaciju sojeva *B. japonicum*. Nakon toga uspješno su identificirane i karakterizirane prirodne populacije sojeva *B. japonicum* s područja istočne Slavonije, Baranje, Istre (Sikora i sur., 2002; 2003). Osim toga, proučavan je sastav i karakteristike prirodnih populacija *S. meliloti* u različitim regijama Republike Hrvatske (Donnarumma i sur., 2014). Kroz niz poljskih pokusa uspješno je provjerena i njihova simbiozna učinkovitost.

Proučavanjem nodulacijskih gena autohtonih sojeva *R. leguminosarum* koji noduliraju grašak i grahoricu bavili su se Žafran i sur. (1996). Također su započeta i istraživanja na simboznim fiksatorima dušika graška (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) od strane Blažinkov (2006) koja je primjenom 16S rDNA PCR-RFLP metode i *nodD* gena dokazala prisustvo navedene vrste u tlima sjeverozapadne Hrvatske dok je primjenom RAPD i rep-PCR metoda izvršila njihovu diferencijaciju na razini soja.

Istraživanja na autohtonim sojevima rizobija koje noduliraju lucernu prikazana su radovima Bradić i sur., (2003), kao i Huić Babić (2011) koja je primjenom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR) uspjela kvantificirati gene koji su uključeni u kruženje dušika u rizosfernom tlu. U svom istraživanju uspjela je dokazati da različita simbiozna učinkovitost istraživanih sojeva *S. meliloti* ne utječe samo na brojnost fiksatora dušika u rizosferi lucerne, već također i na brojnost ostalih skupina mikroorganizama.

Pored soje i lucerne započeto je i proučavanje autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju grah. Prvo takvo istraživanje započela je Pohajda (2011) koja je proučavala simbioznu učinkovitost autohtonih sojeva rizobija iz tala Zagrebačke županije. Od ukupno 25 uzetih uzoraka tala s područja Zagrebačke županije, samo u njih 5 dokazala je prisustvo autohtonih sojeva kvržičnih bakterija graha. Primjenom 16S rDNA PCR-RFLP metode izvršila je njihovu identifikaciju na razini vrste, a RAPD i ERIC-PCR metodom karakterizaciju na razini soja. Istraživanje autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju grah nastavila je Rajnović (2017). Ona je provela istraživanje autohtonih sojeva rizobija iz područja sjeverozapadne Hrvatske koje je značajno za uzgoj ove vrlo vrijedne kulture u Hrvatskoj. Sekvenciranjem tri gena (*rrs*, *atpD* i *recA*) utvrdila je da istraživani izolati pripadaju vrstama *R. leguminosarum*, *R. pisi* i *R. hidalgonense*, dok je sekvenciranje simbioznog *nodC* gena utvrdila da svi sojevi pripadaju simbiovaru phaseoli. U ovom istraživanju je prvi puta utvrđen simbiovar phaseoli kod vrste *R. pisi*. Također je primjenila i MALDI-TOF metodu koja je pokazala najveću podudarnost sa vrstama koje pripadaju filogenetskoj skupini *R. leguminosarum*.

## 2.4. Odgovor rizobija i biljke domaćina na stres izazvan sušom

U kontekstu poljoprivrede, suša se definira kao razdoblje ispodprosječnih oborina kada količine raspoložive vode u rizosferi padaju ispod granica potrebnih za učinkovit rast i proizvodnju biomase. Takav deficit vode u tlu može biti postojan u klimatskim zonama koje karakteriziraju slaba dostupnost vode ili povremena i nepredvidiva opskrba vodom tijekom vegetacijskog razdoblja. Zbog toga je suša glavni stres u okolišu koji utječe na rast i razvoj biljka kao i mikroorganizama tla (rizobija) narušavajući njihov status vode. Suša dramatično utječe na rizobije i njihove biljke domaćine narušavajući fiziološke procese, poput fotosinteze, disanja, unosa mineralnih hranjivih sastojaka kao i na cjelokupni metabolizam rizobija i proces simbiozne fiksacije dušika. Naime, suša narušava izmjenu plinova i dovodi do prekomjerne proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kod rizobija i biljke domaćina, dovodeći tako do razvoja oksidativnog stresa (Osmolovskaya i sur., 2018). Nedostatak vode također inhibira staničnu diobu kod rizobija i biljke domaćina, pri čemu dodatno dovodi do širenja površine lista, rasta stabljike i proliferacije korijenskih stanica biljke domaćina (Paul i sur., 2017).

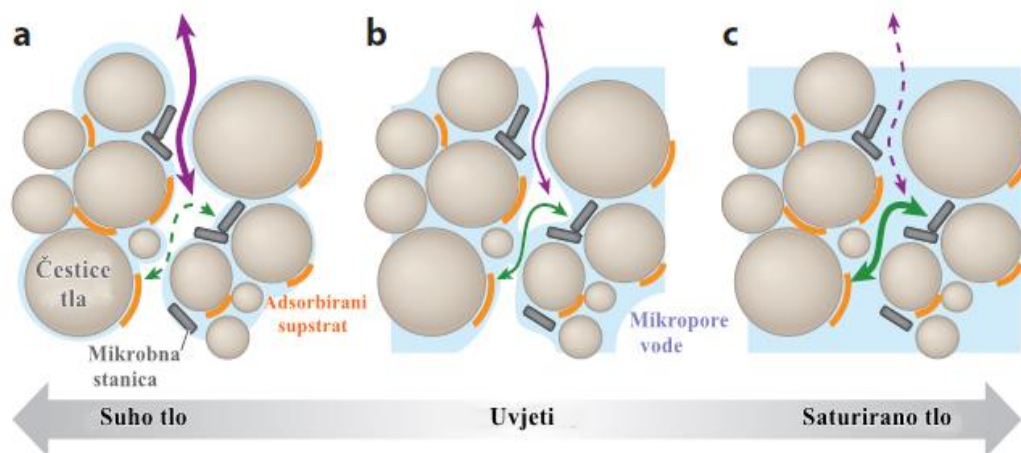
### 2.4.1. Utjecaj suše na mikrobne zajednice tla

Voda utječe na mikrobnu dinamiku tla na tri osnovna načina:

1. kao resurs
2. kao otapalo i
3. kao transportni medij

Svaki od njih je važan u regulaciji funkcije mikroorganizama, a djelujući dovode do kompleksnih mikrobnih i biogeokemijskih odgovora što se jasno može vidjeti na slici 20 (Paul i sur., 2017).





Slika 20. Učinci vlažnosti tla na mikrobnu aktivnost od (a) suhog do (c) zasićenog. Sivi pravokutnici predstavljaju mikrobne stanice, dok narančaste linije predstavljaju supstrat adsorbiran na čestice tla. Najveća mikrobna aktivnost vidljiva je kod saturiranog tla (zeleno) te opada sa smanjenjem količine vode u tlu. Prilagođeno iz Schimel (2018).

#### 2.4.1.1. Voda kao resurs

Dostupnost vode kao resursa ovisi o energetske stanju, odnosno o njenom vodnom potencijalu. Ukoliko je više energije na raspolaganju, voda kao resurs više je dostupna. Vodni potencijal označen simbolom  $\Psi$  i izražen je u jedinicama tlaka (paskalima) je temelj u razumijevanju odnosa vezanih uz vlažnost tla. Naime, vodni potencijal tla kontroliran je prvenstveno fizikalnim matriksom tla i otopljenim tvarima. Voda komunicira s čvrstim česticama putem kapilarosti i prijanjanjem na površinu čestica.

Za mikroorganizme tla, vodni potencijal je kontroliran njihovim preživljavanjem i funkcijom. Budući da su mikroorganizmi mali te su u uskom kontaktu sa svojom okolinom, između njih i tla ne postoji ništa osim njihove stanične membrane i stjenke. Zbog toga je nužno da je njihov vodni potencijal u ravnoteži s vodnim potencijalom tla koji se nalazi oko njih.

Kako se tlo isušuje vodni potencijal tla opada što dovodi do promjena stanica mikroorganizama. Da bi stanice mikroorganizama izbjegle gubitak vode u okoliš i dehidrirale, počinju akumulirati otopljene tvari kako bi smanjile svoj unutarnji vodni potencijal i dovele do toga da se on izjednači s vodnim potencijalom tla. Neki mikroorganizmi u takvim situacijama počinju formirati nepropusne stanične stjenke (kao što je slučaj kod *Bacillus* spp.). Kako se tada stanični vodni potencijal mikroorganizama smanjuje to može dovesti do smanjena turgora stanica, što je jednako uvenuću kod

biljaka. Gubitak turgora dovodi do promjene fizioloških funkcija mikroorganizama, što u konačnici smanjuje dinamiku metabolizma. Na kraju, smanjenje vodnog potencijala u stanici dovodi do propadanja staničnih funkcija i na taj način dovodi do uginuća mikroorganizama. Kada je tlo dovoljno vlažno, sadržaj vode se može značajno promijeniti bez smanjena vodnog potencijala. Međutim, kad su tla suha čak i mala promjena sadržaja vode u tlu može uzrokovati veliku promjenu u vodnom potencijalu.

#### 2.4.1.2. Voda kao otapalo

Drugi način na koji voda kontrolira aktivnost mikroorganizama u tlu je kao otapalo. Supstrati koje mikroorganizmi koriste kao izvore energije topljivi su u vodi, iznimka su samo plinovi poput metana i dušičnog oksida te nekoliko organskih tvari poput octene kiseline, terpena i izoprena (Schimel, 2018). Kako se tlo isušuje, volumen vode se smanjuje te tako dolazi do koncentriranja pojedinih otopljenih tvari.

#### 2.4.1.3. Voda kao transportni medij

Voda u tlu nije samo vitalni resurs i otapalo već je i osnovni transportni put hranjivih tvari kod mikroorganizama. Budući da mikroorganizmi usvajaju samo male molekule oslanjaju se na ekstracelularne enzime kako bi mogli razgraditi polimere i difuzijom omogućili pristup manjim molekulama (Wallenstein i Weintraub, 2008). Budući da je većina supstrata topiva u vodi, mikropore vode od vitalnog su značenja te tako omogućuju transport resursa do samih mikroorganizama (Bailey i sur., 2017). Kako se tlo suši, vodeni film na česticama tla postaje sve tanji te na taj način difuzija postaje duža i teža (slika 20a, nasuprot 20b i 20c).

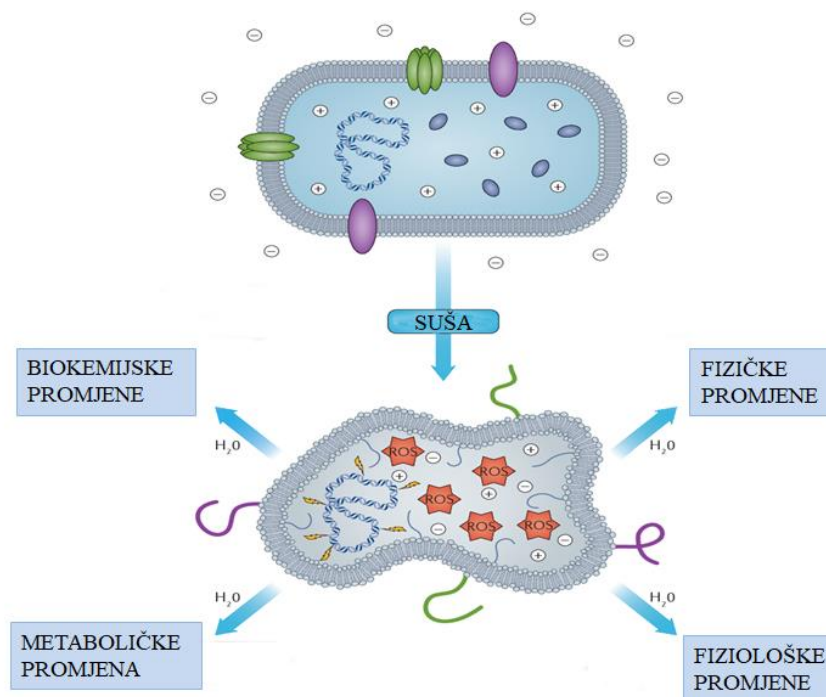
Kako se tlo suši, dolazi najprije do isušivanja makropora te na taj način difuzivnost tla znatno opada (Paul i sur., 2017). Kao posljedica svega toga smanjuje se dostupnost resursa i njeno smanjenje postaje razmjerno sadržaju vode u tlu.

#### 2.4.2. Važnost vode za mikroorganizme

Voda je bitna za sve žive organizme, uključujući i bakterije jer je neophodna za mnoge biomolekularne procese, uključujući stabilnost proteina, različite interakcije enzima i supstrata kao i za održavanje cjelokupne stanične strukture (Lebre i sur., 2017). Izlaganje mikroorganizma sušnim uvjetima može dovesti do poremećaja njihovih osnovnih funkcija i preživljavanje bakterijskih stanica. Brojni mikroorganizmi prilagodili su se uvjetima sa smanjenom količinom vode u tlu. Porastom globalne dezertifikacije zbog klimatskih promjena i utjecaja ljudi danas se sve veća važnost pridaje razumijevanju brojnih mehanizama tolerantnosti mikroorganizama na sušne uvjete (Lebre i sur., 2017).

Naime, u uvjetima smanjene količine vode u tlu dolazi do isušivanja bakterijske stanice (slika 21) čime se smanjuje njena površina što je povezano s brzim gubitkom citoplazmatskog volumena. Ovaj gubitak unutarstanične vode dovodi do smanjenja turgora što rezultira porastom unutarstaničnih metabolita i iona, nakupljanjem različitih makromolekula i smanjenjem fluidnosti.

Dolazi do narušavanja integriteta membrane zbog povećanja van der Waalsovih veza između fosolipida, koji su obično oslabljeni prisustvom molekula vode vezanih za fosfatne grupe. Javlja se i poremećaj u konfiguraciji proteina kao posljedica gubitka vode iz stanice. Poremećaj u funkciji proteina rezultira nakupljanjem slobodnih radikala. Kao posljedica toga dolazi do naglog unutarstaničnog nakupljanja reaktivnih vrsta kisika, ROS što u konačnici izaziva oksidativni stres bakterijskih stanica i njihovo uginuće. Proizvodnja ROS-a rezultat je dehidracije bakterijske stanice zbog gubitka integriteta membrane koji potom dovodi do poremećaja u procesu respiracije. Osim toga suša uzrokuje i oštećenje molekule DNA i poremećaja mehanizma popravka DNA.



Slika 21. Učinci suše na fiziologiju i biokemiju bakterijskih stanica. Prilagođeno iz Lebre i sur. (2017).

Danas sušna područja čine oko 10% zemljine kopnene površine te se predviđa da će se ovo područje znatno povećavati kao rezultat klimatskih promjena i procesa dezertifikacije.

Razumijevanje fizioloških, biokemijskih i molekularnih mehanizama adaptacije mikroorganizama na sušu važni su ne samo za okoliš, već i sve više za proizvodnju hrane. Napredak tehnologije sekvenciranja i metagenomike omogućio je usporedbu mikrobne raznolikosti povezane s ekstremnim uvjetima okoliša, čime se nastoji steći uvid na koji način mikroorganizmi opstaju u ekstremnim ekološkim nišama.

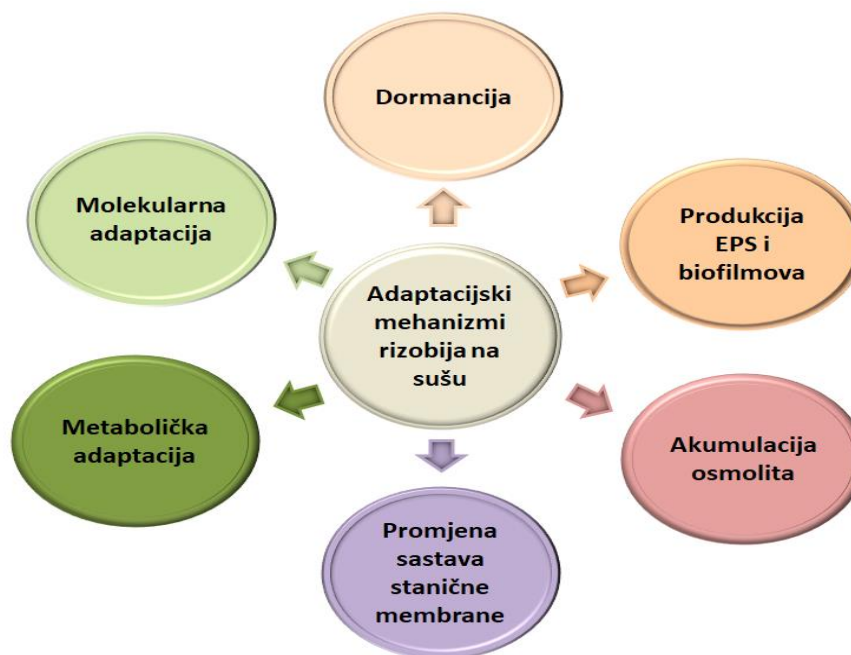
Danas se sa sigurnošću zna da se stanice mikroorganizama opiru isušivanju smanjujući potrošnju energije. Na taj način sprječavaju gubitak vode tako što akumuliraju osmolite i izravno sprječavaju oštećenja DNA i proteina. Počinju se koristiti alternativni izvori ugljika, poput masnih kiselina za proizvodnju ATP-a te se zaustavljaju svi procesi koji troše energiju poput flagelarne pokretljivosti (Harding i sur., 2016). Oštećenje molekule DNA sprječava se ekspresijom DNA-vezujući proteina koji djeluju kao fizički štit (Naylor i Coleman-Derr, 2018). Potom dolazi i do modifikacije fosfolipida što omogućava staničnoj membrani da zadrži unutarstaničnu vodu (Lebre i sur., 2017).

Predviđene klimatske promjena s manjom dostupnošću vode za rast biljaka uslijed sušnih razdoblja ozbiljno utječu na održivost prinosa brojnih usjeva kao što je soja. Zbog toga se sve veća pažnja posvećuje selekciji kultivara soje otpornih na sušu kako bi se izbjegla neposredna prijetnja proizvodnji hrane. Osim toga, danas se sve više istražuje utjecaj suše ne samo na nadzemne dijelove soje, već i na njen korijen i kvržice koje nastaju u simbiozi s rizobijama (Kunert i sur., 2016).

Simbiozni odnos biljke soje i rizobija jako je osjetljiv na nedostatak vode u tlu. Manjak vode dovodi do smanjenog broja kvržica na korijenju soje kao i smanjene stope fiksacije dušika u kvržicama što u konačnici smanjuje prinos soje (Kibido i sur., 2019). Manjak vode ne samo da smanjuje količinu rizobija u tlu, već djeluje i na njihov razvoj kao i sposobnost interakcije s leguminozama.

### 2.4.3. Adaptacijski mehanizmi rizobija na sušu

Rizobije su razvile nekoliko različitih mehanizama koji im omogućavaju lakše preživljavanje u uvjetima suše. Vrste adaptacijskih mehanizama prikazane su na slici 22, a svaki od mehanizma zasebno je objašnjen u nastavku teksta.

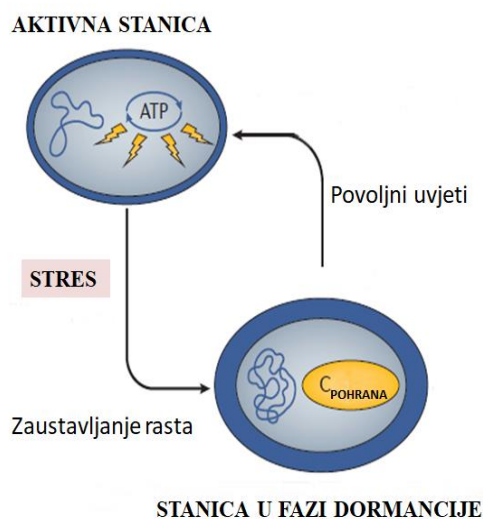


Slika 22. Adaptacijski mehanizmi rizobija koji im omogućuju preživljavanje u uvjetima suše. Prilagođeno iz Schimel (2017) i Lebre i sur. (2019).

#### 2.4.3.1. Dormantnost

Uslijed nepovoljnih abiotičkih faktora, bakterije ulaze u reverzibilni oblik dormantnosti (mirovanja) u kojem stanica prelazi u inertno stanje metaboličke aktivnosti. Dormancija je energetski dosta zahtjevan proces budući da vraćanje bakterijskih stanica u aktivni oblik zahtjeva mnogo resursa i energije (Rittershausi sur., 2013).

Kad stanica uđe u stadij dormancije dolazi do zaustavljanja njenog rasta, smanjuje se metabolička aktivnost i proizvodnja brojnih makromolekula. Stanica počinje akumulirati ugljik, najčešće u obliku trehaloze, glikogena i triglicerida. Molekula DNA postaje kompaktnija te dolazi do modifikacija same bakterijske stanice (Lebre i sur., 2017). Kada nastupe povoljni uvjeti bakterijska stanica se ponovno vraća u aktivni oblik (slika 23).



Slika 23. Dormancija mikroorganizama kao mehanizam adaptacije na okolišni stres.  
Prilagođeno iz Lebre i sur. (2017).

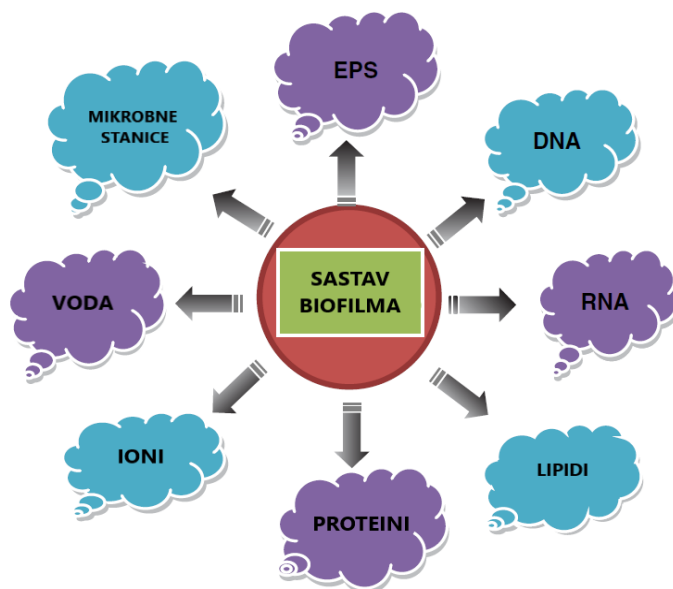
Dormancija se smatra važnom strategijom za preživljavanje mikroorganizama u različitim stresnim uvjetima okoliša, posebno u uvjetima suše. Ne samo da omogućava dugotrajno preživljavanje mikroorganizama, ona također omogućuje očuvanje biološke raznolikosti, jer "uspavane" bakterijske stanice postaju zaštićeni rezervoari genetske raznolikosti (Bär i sur., 2002).

#### 2.4.3.2. Proizvodnja egzopolisaharida i formiranje biofilma

Ime egzopolisaharidi (engl. *extracellular polymeric substance*, EPS) prvi put se spominje (1972) od strane Sutherlanda koji je predložio opći izraz za različite vrste bakterijskih egzopolisaharida (Naseem i sur., 2018). Egzopolisaharidi predstavljaju najvažniji dio ekstracelularnog matriksa na kojeg otpada 40-95% bakterijske težine. Bakterije proizvode dva tipa EPS-a: sluzavi EPS i EPS u obliku kapsule (Marazak i sur., 2017).

Budući da su egzopolisaharidi sastavni dio glikokaliksa, sudjeluju u formiranju biofilma. Biofilmovi se nalaze u različitim ekološkim okruženjima kao dominantne strukture zajednica u kojima koegzistiraju mikroorganizmi (Besemer, 2015). Formiranje biofilma nužno je povezano s opstankom mikroorganizama u tlima s niskim sadržajem vode (Wu i sur., 2019).

Sastav biofilma igra značajnu ulogu u regulaciji i poboljšavanju raznih metaboličkih i fizioloških funkcija unutar bakterijske zajednice. Glavni sastojak biofilma čini voda, čak 97%, a ostalih 3% čine bakterije (slika 24).



Slika 24. Sastav biofilma. Prilagođeno iz Singh i Chauhan (2017).

Voda osigurava protok hranjiva, mikroorganizama i kisika unutar biofilma. Ovakvo hidrirano okruženje omogućuje povezanosti vodikovim vezama čime se smanjuje mogućnost da dođe do isušivanja.

Mikrokolonije bakterijskih stanica unutar biofilma su razdvojene kanalićima kroz koje struji voda ili neka druga tekućina. U sastavu matriksa se nalaze razni minerali, otopljene tvari, polisaharidi, lipopolisaharidi (LPS), lipidi, DNA i proteini (slika 24). Stabilnost strukture biofilma ovisi o svojstvima polimernih tvari (EPS) koje izlučuju bakterije, a koje su u interakciji s makromolekulama kao što je DNA te neki proteini i ioni.

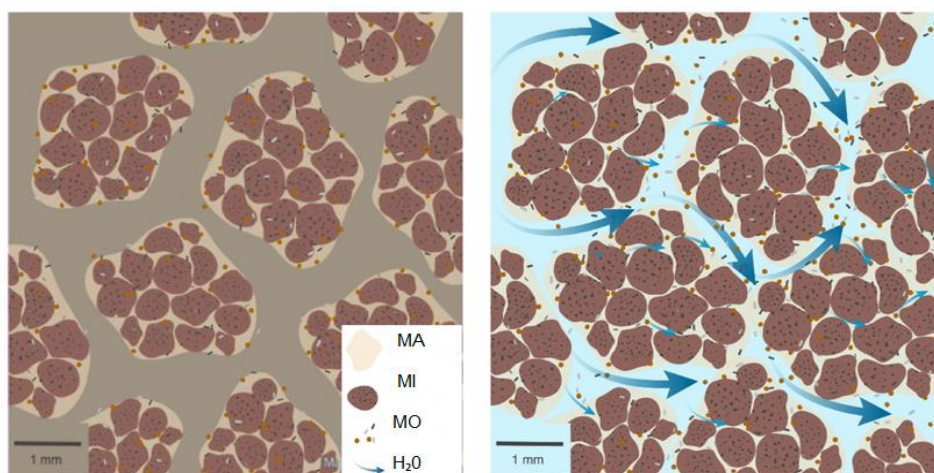
Izlučivanjem egzopolimernih tvari povećava se afinitet za vezanje vode. Time se sprječava dehidracija koja je česta kod planktonskog oblika, a uzrokuje nepovoljne uvjete za bakterije. Biomolekule, kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline, imaju fiziološku, ali i strukturalnu ulogu. Brojni proteini unutar matriksa funkcioniraju kao enzimi, uključujući lipaze, liaze, hidrolaze, glukanaže, koji su odgovorni za razgradnju biopolimera i iskorištavanje produkata razgradnje kao izvor nutrijenata. Biomasa formiranog biofilma



sastoji se većinom od egzopolisaharida (EPS), složenih polimera koji su poput omotača kovalentno vezani na površinu bakterijskih stanica (Janczarek i sur., 2015). Sastav biofima prikazan je na slici 24.

Uloga EPS-a u povećanju tolerantnosti mikroorganizama na sušu može se povezati njegovom higroskopnom prirodom, odnosno sposobnošću upijanja vlage iz okoline. Osim toga, njegova hidrofilna svojstva također doprinose brzom stopi apsorpcije vode (Castellane i sur., 2014). S obzirom na važnost biofilma u održavanju života mikrobne zajednice u različitim stresnim uvjetima, biofilmi se često smatraju i prvom linijom obrane od abiotički stresova, posebno suše.

Prema Naseem i sur. (2018) neke vrste mikroorganizama mogu dovesti do ublažavanja suše u tlu produkcijom egzopolisaharida. Egzopolisaharidi tako utječu na strukturu tla čime je poboljšavaju te na taj način povećavaju tolerantnost leguminoza na sušu. Istraživanje Wilpieszek i sur. (2019) je pokazalo da mikroorganizmi koji sintetiziraju egzopolisaharide dovode do stvaranja makroagregata u većem postotku. Tako tla s većim sadržajem agregata manje veličine sadrže više hranjiva za mikroorganizme i za biljke u pristupačnom obliku (slika 25), nego što bi to sadržavali krupniji agregati (Milošević i Marinković, 2015).



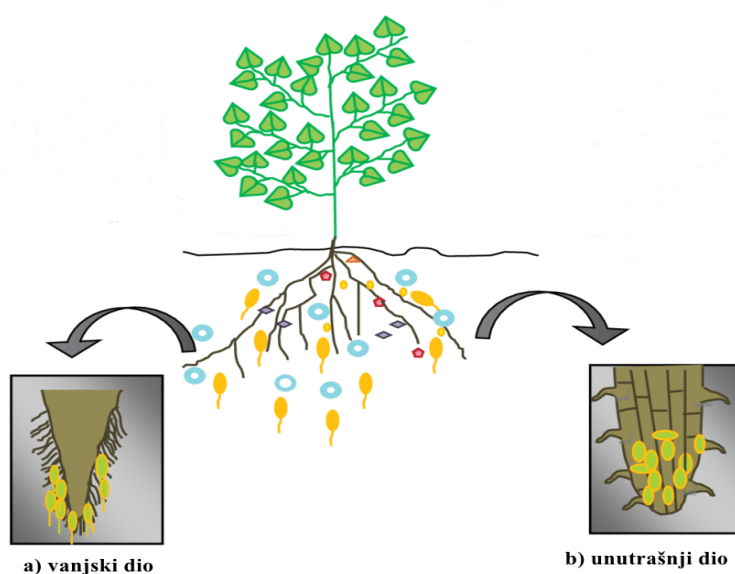
Slika 25. Shematski prikaz makro i mikroagregata za vrijeme suše (lijevo) i u normalno vlažnom tlu (desno). Vlažni uvjeti tla (desno) omogućuju lakše širenje hranjivih tvari u odnosu na suho tlo (lijevo). (MA-makroagregati; MI- mikroagregati; MO- mikroorganizmi). Prilagođeno iz Wilpieszek i sur. (2019).

Makroagregati se još nazivaju i čuvari plodnosti tla budući da održavaju ravnotežu aerobno-anaerobnih uvjeta kao postupno trošenje hranjivih tvari. Mikroorganizmi tako naseljavaju unutrašnjost agregata tla te na taj način zauzimaju dijelove koji su ispunjeni vodom ili pak prekriveni vodenim filmovima (Vos et al., 2013).

Tip tla, njegova pH vrijednost, kao i tekstura uvelike utječu na mikrobnu zajednicu. Smatra se da glinovita tla imaju viši postotak mikroorganizama nego pjeskovita tla u kojima ih je manje. Zbog svoje velike raznolikosti mikroorganizmi tla sudjeluju u svim procesima koji se događaju u tlu kao što je pedogeneza i agregacija čestica. Odgovorni su za biološke transformacije i formiranje stabilnih zaliha dušika, ugljika i drugih nutrijenata. Tako se smatra da je stanje mikrobne raznolikosti pokazatelj zdravlja i kvalitete tla.

Proizvodnja EPS-a je općenito važna u formiranju biofilma. Učinkovita kolonizacija korijena biljaka mikroorganizmima koji proizvode EPS pomaže da esencijalne hranjive tvari cirkuliraju u biljku radi pravilnog rasta i razvoja i zaštite od napada stranih patogena.

Prvi korak interakcije biljaka i mikroorganizama predstavlja vezivanje rizobija iz tla na stanice korijena biljke. To je ujedno i prvi korak u formiranju biofilma oko korijena biljke domaćina (slika 26).



Slika 26. Formiranje biofilma na korijenu biljaka. Prilagođeno iz Singh i Chauhan (2017).

Formiranje biofilma ovisi o bakterijskoj populaciji ili zajednici koja se nalazi u tlu. Tako suša ne utječe samo na populaciju i aktivnost mikroorganizama koji naseljavaju rizosferu, već i na fiziološke i biokemijske procese u biljci kao što su fotosinteza, respiracija, metabolizam ugljikohidrata i hranjivih tvari, dovodeći tako da smanjenog rasta i razvitka biljaka (Faroog i sur., 2008).

Reakcija rizobija na sušu raznolika je i ovisi o intenzitetu stresa i njegovom vremenskom trajanju (Urlich i sur., 2019).

Smatra se da rizobije u uvjetima suše proizvode veće količine EPS-a nego kad se nalaze u optimalnim uvjetima rasta, te da se količina EPS-a povećava, povećanjem intenziteta suše (Vurukonda i sur., 2016).

#### 2.4.3.3. Molekularna adaptacija

Pored simbioznih gena koji su ključni za interakciju rizobija i leguminoza, genom rizobija sadrži i druge gene koji su važni za životni ciklus rizobija, poput stresom induciranih gena (engl. *stress response genes*). Stresom inducirani geni kao što su *otsAB*, *groEL*, *clpB*, *rpoH* igraju važnu ulogu u toleranciji rizobija na različite uvjete okolišta (Silva i sur., 2017).

Opstanak rizobija u nepovoljnim uvjetima zahtijeva prije svega sposobnost prepoznavanja promjena u okruženju kao i sposobnost ekspresije gena u novim uvjetima sredine te na kraju i cjelokupnu prilagodbu bakterijske fiziologije na nepovoljne uvjete okolišta. Sposobnost prepoznavanja izvanstaničnih promjena, odnosno promjena uvjeta sredine, imaju periplazmatski senzorni proteini.

Reakcija na toplinski stres dobro je proučavan kod mnogih bakterija uključujući i rizobije (Silva, 2017). Proteini toplinskog stresa (engl. *heat shock proteins*, HSP) skupina je proteina koji se mogu naći u svakoj stanici živog organizma. Različite vrste stresa uključujući i sušu induciraju ekspresiju gena koje nazivamo genima proteina toplinskog stresa. Postoje dva glavna razreda HSP-a uključenih u zaštitu stanica od denaturacije proteina uzrokovanih promjenom temperature, a to su šaperoni i proteaze.

Proučavanje odgovora na stres na molekularnoj razini kod rizobija dosta je zanimljivo jer ne samo da su rizobije izložene različitim uvjetima tla, nego i endosimbiotskom načinu života unutar korijena biljke domaćina ili kvržica.

Danas se razvojem visokoučinkovitih sojeva rizobija koja se koriste za predstjetvenu bakterizaciju leguminoza ne smije zanemariti ni njihova tolerancija na različite vrste stresa (Silva, 2017). Ukoliko rizobije nisu sposobne prevladati različite abiotske promjene u okolišu, njihova primjena u bakterizaciji leguminoza neće imati velikog učinka (Igiehon i Babalola, 2018).

U mnogim poljoprivrednim tlima, postoje autohtone populacije rizobija koje mogu biti vrlo neučinkovite za rast biljke domaćina i proces fiksacije dušika, ali mogu biti vrlo dobro prilagođeni na nepovoljne uvjete tla. Stoga je ispitivanje molekularnih osnova tolerancije rizobija na stres temeljni korak u pravcu poboljšanja visokoučinkovitih rizobija za predstjetvenu bakterizaciju leguminoza.

Simbiotski proces između rizobija i leguminoza uglavnom se može podijeliti na dva glavna događaja: bakterijsku interakciju i organogenezu kvržica. Za uspješnu simbiozu rizobija i biljke domaćina, važno je da su ova dva događaja prostorno i vremenski koordinirana, kako bi se osiguralo stvaranje kvržica na mjestu bakterijske infekcije (Silva, 2017).

Molekularna signalizacija i ulazak rizobija u stanice biljke domaćina, posebno je osjetljiv na različite abiotičke stresove. Za rizobije je jako važno da budu u stanju fiziološki se prilagoditi okolišnim uvjetima kako bi se osigurala uspješna simbioza s biljkom domaćinom (Clua i sur., 2018).

Različiti abiotički stresovi mogu tako poremetiti simbiotski odnos rizobija i biljke domaćina i dovesti do odgode interakcije i formiranja kvržica, razvoj neučinkovitih kvržica ili do potpunog izostanka stvaranja kvržica (Kunert i sur., 2016). Osim toga, tijekom interakcije rizobije se također mogu nositi s nepovoljnim uvjetima unutar stanica biljke domaćina kao i sa urođenim imunitetom biljke domaćina koji inducira fiziološki odgovor na stres, što može poremetiti proces simbioze (Hungria i Vargas, 2000). Primjer tome je pH koji je u području rizosfere biljke domaćina dosta nizak zbog različitih organskih kiselina koje izlučuju biljke. Također je i koncentracija kisika u kvržicama dosta niska što dovodi do promjena u metabolizmu ugljika te tako dolazi do stvaranja različitih organskih kiselina koje inhibiraju regulaciju citoplazmatskog pH (Silva, 2017).

Zbog svega navedenog rizobije moraju biti u stanju prevladati sve stresne uvjete okoliša kako bi se simbiozom s biljkom domaćinom postigla učinkovita fiksacija dušika. To dovodi do zaključka da je uloga stresom induciranih gena temeljni dio simbiotskog odnosa kod rizobija koji igra važnu ulogu i njihovoj tolerantnosti na stresne uvjete okoliša (Schwember i sur., 2019).

#### 2.4.3.4. Prilagodba stanične membrane

Stanična membrana predstavlja glavnu barijeru između unutarstaničnog prostora i vanjskog okruženja. Pod snažnim je utjecajem promjena u vanjskoj dostupnosti vode. Bakterije koje su izložene ekstremnim fluktuacijama stanja vode obično imaju promjene u sastavu fosfolipida i masnih kiselina membrane. To uključuje povećan udio nezasićenih masnih kiselina. Smatra se da povećanjem udjela nezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani bakterija igra važnu ulogu u zaštiti bakterijske stanice od isušivanja (Lebre i sur., 2017).

#### 2.4.3.5. Akumulacija osmolita

U uvjetima isušivanja bakterijskih stanica dolazi do unutarstaničnog nakupljanja malih molekula poznatih pod nazivom osmoliti. Oni uspostavljaju osmotsku ravnotežu i omogućuju kontinuiranu funkciju proteina pri niskom vodnom potencijalu, koja omogućava opstanak bakterijske stanice u uvjetima nedostatka vode, odnosno suše (Kibido i sur., 2019).

Osmoliti, kao što su trehaloza i glicin betain dio su opće adaptivne strategije opstanka u uvjetima suše većine bakterija uključujući i rizobije. Radi se o spojevima male molekularne mase koji se mogu akumulirati iz okoliša ili sintetizirati unutar bakterijskih stanica. Osmoliti inhibiraju promjene membrane povezane s gubitkom vode iz stanica i smanjenje intracelularne fluidnosti (Vriezen i sur., 2007). Unutar bakterijske stanice induciraju se raznolike molekule s osmolitskom sposobnošću kao ugljikohidrati (saharoza i trehaloza), aminokiseline i njihove derivate (Kibido i sur., 2019).

#### 2.4.3.6. Metaboličke adaptacije

Gubitak vode iz bakterijskih stanica stvara veliko metaboličko opterećenje za samu stanicu jer dolazi do promjene kinetike metaboličkih putova, promjene u brzini stvaranja energije te promjene stope rasta bakterijskih stanica. U tom bakterije najčešće prelaze s anaboličkog na katabolički metabolizam.

Ravnoteža između anaboličkog i kataboličkog metabolizma dosta je složena. Primjer tome je oksidacija masnih kiselina koja daje više molekula ATP-a po atomu ugljika, nego glukoza. U uvjetima suše sva glukoza se preusmjerava na sintezu trehaloze, dok oksidacija masnih kiselina postaje vrlo učinkovit alternativni izvor energije za stanicu (Fin i sur., 2013).

Geni uključeni u metabolizam glikogena dosta su ekspimirani u stanicama rizobija koje su izložene suši, jer unutarstanični glikogen pomaže u vraćanju volumena stanica rizobija (Sanko-Sawczenko i sur., 2019).

Prilagodba metabolizma može uvelike doprinijeti sposobnosti bakterijskih stanica u prilagodbi na stres izazvan sušom (Vurukonda, 2016).

#### 2.4.4. Utjecaj suše na rast i razvoj biljke soje

Svaki biotički ili abiotički čimbenik koji prelazi optimalnu granicu vrijednosti za rast i razvoj biljaka predstavlja stres. Tijekom vegetacije biljke su izložene različitim stresnim uvjetima sredine u kojoj se nalaze koji nepovoljno djeluju na njihov rast i razvoj te kvalitetu i prinos zrna. Biljke ne mogu izbjeći nepovoljne uvjete, ali neke sorte pokazuju veću, a neke manju otpornost na stresne uvjete. Tolerancija prema stresu je sposobnost biljke da se prilagodi iznenadnim promjenama ukoliko se oni dogode i da pritom ne budu previše oštećena. Postoji nekoliko vrsta stresa: vodni stres, temperaturni stres, stres izazvan povećanom koncentracijom soli. Značajan problem u uzgoju biljaka je vodni stres, odnosno suša i od svih ekstremnih vremenskih nepogoda izazvanih klimatskim promjenama suša ima najveći ekonomski utjecaj na društvo (Rampino i sur., 2007).

Suša je glavni i najčešći uzrok nestabilnosti prinosa najvažnijih poljoprivrednih kultura kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj. Pod utjecajem klimatskih promjena, suša predstavlja veliki problem u svijetu jer uzrokuje inhibiciju rasta biljaka, a time i smanjenje ekonomske produktivnosti, posebno u aridnim i semiaridnim područjima. Tri su uobičajene definicije suše: meteorološka, hidrološka i poljoprivredna suša (Wilhite i Pulwarty, 2017).

Meteorološka suša definirana je kao produljen period vremena u kojem je količina oborina manja od prosjeka te se pojavljuje se kada je količina dostupne vode u tlu smanjena.

Hidrološka suša značajna je po tome da se pojavljuje kada se rezerve vode ispod i na površini zemlje smanje ispod prosjeka zbog nedostatka oborina (Wilhite i Pulwarty, 2017).

Poljoprivredna suša se pak pojavljuje kada rezerve vode (oborine i zalihe vode u tlu) nisu u mogućnosti podržati proizvodnju usjeva. Na osnovu vremena pojave suše i faze razvoja usjeva, poljoprivredna suša se dijeli na sušu početkom sezone, sredinom sezone, s prekidima i kasno u sezoni (terminalna suša). Terminalna i suša s prekidima je vrsta suše koja najčešće pogađa proizvodnju leguminoznih kultura (Liu i sur., 2017).

Najjače suše u Hrvatskoj pojavljuju se 1920-tih, 1940-tih, 1950-tih te početkom 2010-tih. Sušu 2011./2012. označava ekstremno dugo trajanje u kontinentalnom području Hrvatske i najveća je suša od početka 20. stoljeća. Prema globalnim i lokalnim scenarijima klimatskih promjena u bližoj budućnosti, očekuju se sve češće suše jačeg intenziteta, što će imati utjecaj na održivost proizvodnje najvažnijih poljoprivrednih kultura.

Osim što suša nepovoljno djeluje na kvržične bakterije, u razvoju nalijevanja zrna uzrokuje maksimalno smanjenje uroda. Soja je najosjetljivija prema nedostatku vode u tlu u vrijeme nalijevanja zrna te se u toj fazi može smanjiti urod zrna osjetljivijih sorata za 40-60%. Oborine u toj fazi vrlo povoljno djeluju na urod. Utjecaj suše vidi se na listu, tako što se list uvija prema gore. Sušom pogođena soja često ima manje listove zbog nedostatka vode, nedostupnosti hranjiva i usvajanja istih.

#### 2.4.5. Fotosintetska učinkovitost soje u uvjetima suše

Kod viših biljaka funkcija i organizacija fotosintetskog aparata se mijenja kao odgovor na abiotički stres. Kao najučestaliji osmotski stres navodi se visoka temperatura, suša, povišen salinitet, te niski pH tla. Oni dovode do promjene fizioloških, biokemijskih i molekularnih procesa u biljci (Poljak i sur., 1998). Kao posljedica djelovanja osmotskog stresa često dolazi do gubitka fotosintetskih pigmenata, pa se tako jedan od prvih odgovora biljke na nepovoljne uvjete okoline navodi smanjenje stope fotosinteze (Josipović, 2019).

Pokazatelj stanja fotosintetskog aparata je mjerenje fluorescencije klorofila. Djelovanje suše na fotosintetski aparat započinje zatvaranjem puči ako se radi o umjerenj suši, dok su metaboličke, strukturalne promjene uzrokovane dugotrajnom sušom. Općenito se smatra da je fotosustav II (PSII) više otporan na manjak vode te da negativne posljedice nastaju samo u uvjetima ekstremnih suša (Meng i sur., 2016).

Općenito blagi stres suše dovodi do smanjenja ukupne stope fotosinteze jer se zatvaraju puči, ali ne dolazi do ekstremnijih promjena metaboličkih reakcija (Wang i sur., 2020).

Metoda mjerenja fluorescencije Chl a, danas je postala dosta rašireno među oplemenjivačima bilja zbog selekcije tolerantnih genotipova (Fernández-Calleja i sur., 2020). Suša izaziva promjenu u koncentraciji fotosintetskih pigmenata. Shah i sur. (2017) tako navode u svojim istraživanjima da u uvjetima suše dolazi do značajnog pada koncentracije Chl a, Chl b, Chl a+b u odnosu na njihove koncentracije u optimalnim uvjetima. Tolerancija na sušu prisutna je kod svih biljaka, ali njena razina tolerancije varira među različitim vrstama, kao i među sortama iste vrste (Osmolovskaya i sur., 2018).

U uvjetima suše dolazi do zatvaranja puči i ograničene izmjene plinova. Intenzivna suša prisutna kroz duži vremenski period dovodi do značajnog poremećaja kako metabolizma, tako i različitih staničnih struktura. Budući da je ravnoteža vode u biljci određena transpiracijom i apsorpcijom vode iz tla, kada se dogodi da je stopa transpiracije veća od apsorpcije javlja se smanjenje staničnog turgora koji počinje opadati. Volumen stanice se počinje smanjivati, a to sve skupa dovodi do porasta koncentracije staničnih komponenti. Javlja se i porast osmotskog i smanjenje vodnog potencijala što izaziva zastoj u procesu fotosinteze (Fathi i Tari, 2016). Na smanjenje stope fotosinteze osim zatvaranja puči djeluju i promjene u metabolizmu, ponajviše se to odnosi na promjene u Kalvinovu ciklusu (Morales, 2020).



Najraniji odgovor na sušu u uvjetima blage do umjerene suše predstavlja zatvaranje puči, a pri jakoj suši dolazi do inhibicije metaboličkih procesa. Kod biljaka koje su izložene stresu suše dolazi do nakupljanja organskih tvari male molekularne mase koji se nazivaju osmolitima. Osmoliti se tako dijele na osmolite koji sadrže dušik (prolin, betain) te ugljikohidratni osmoliti kao što su šećerni alkoholi (manitol, sorbitol), monosaharidi (fruktoza, glukoza) te oligosaharidi (saharoza, trehaloza). Prolin i betain tako sudjeluju u osmoregulaciji biljaka kao odgovor na sušu te štite stanicu na više načina. Naime, prolin povećava kiselost citoplazme te stabilizira makromolekule, te ujedno predstavlja zalihu ugljika i dušika u uvjetima suše. Osim toga brojna istraživanja su pokazala da se prolin u uvjetima suše akumulira u puno većoj količini u odnosu na ostale aminokiseline. Povećano nakupljanje u uvjetima suše dokazano kod soje i lucerne, ali i nekih žitarica kao što su ječam i pšenica. Njihovom akumulacijom omogućeno je održavanje turgora u uvjetima suše, bez vremenskog djelovanja na samu stanicu. Naime, u uvjetima dehidracije osmoliti imaju i mogućnost održavanja hidratiziranog stanja staničnih proteina.

U slučaju dugotrajne suše osmoliti se vodikovim vezama vežu za stanične proteine te na taj način štite proteine od denaturacije, tako što zamjenjuju vodu (Kereša i sur., 2008). Nasuprot tome, ugljikohidratni osmoliti više stabiliziraju stanične membrane. Tako šećerni alkoholi u ekstremnim sušama se vodikovim vezama vežu za proteine te na taj način smjenjuju vodu, čime štite proteine od denaturacije i omogućava održavanje njihove pravilne strukture.

Kod biljaka u uvjetima suše također dolazi i do nakupljanja slobodnih radikala, pri čemu su najznačajnije reaktivne vrste kisika koje uzrokuju slobodni radikali koji dovode do oksidativnog stresa. Na djelovanje slobodnih vrsta kisika posebno su osjetljivi kloroplasti budući da sadrže visoke koncentracije kisika koji se pri tome reducira elektronima koji dolaze iz fotosustava i pretvaraju ga u superoksidni radikal. Nastali slobodni radikali dovode do oštećenja membrane, denaturacije proteina i brojnih promjena u molekuli DNA, izazivajući na taj način velika oštećenja biljnih stanica, što u konačnici može dovesti do redukcije prinosa.

#### 2.4.6. Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu

Kompleksno svojstvo tolerantnosti na sušu opisano je u radu Kereša i sur. (2008) gdje se tolerantnost genotipova na sušu s oplemenjivačke strane gleda kao sposobnost zadržavanja visokog prinosa bez obzira na nepovoljne uvjete okoline. Također navode da se tolerantnost može izbjeći ukoliko genotip posjeduje neki od mehanizama kao što su:

- mehanizam za izbjegavanje suše
- mehanizam za smanjivanje dehidracije
- mehanizam za tolerantnost na dehidraciju

Mehanizam za izbjegavanje suše postiže se ranim dozrijevanjem. Tako se genotipovi raznih vrsta bilja odlikuje ovim mehanizmom, gdje svoj životni ciklus završe prije nego što nastupi razdoblje intenzivne suše. Uglavnom to postižu ubrzavanjem metaboličkih procesa i svojim ubrzanim rastom (Shavrukov i sur., 2017).

Mehanizam za smanjenje dehidracije predstavlja tako fiziološku prilagodbu biljke. Za genotipove koji posjeduju ovaj mehanizam karakteristično je usporavanje metaboličkih procesa kao i sporiji rast te visok vodni potencijal i turgor u stanicama (Kereša i sur., 2008).

Na kraju, mehanizam tolerantnosti na dehidraciju predstavlja tolerantnost na promjene koje suša uzrokuje u stanicama. Većina biljaka to postiže osmotskom regulacijom odnosno smanjenjem osmotskog potencijala zbog nakupljanja osmolita.

#### 2.4.7. Utjecaj suše na proces simbiozne fiksacije dušika

Nedostatak vode reducira proces simbiozne fiksacije dušika na korijenu soje. Smanjenje fiksacije dušika tijekom deficita vode u uskoj je vezi s ograničenom opskrbom kvržica vodom i kisikom. Zapravo, voda ima veći utjecaj na smanjenje procesa fiksacije dušika. Prema Foyer i Zhang (2011) suša inhibira inicijaciju nodula, rast i razvoj nodula kao i njihovu samu funkciju. Leguminoze koje luče alantoin i alantoinisku kiselinu, u koje spadaju soja i crni grah, osjetljivije su od onih koje luče amide, kao što su lucerna, slanutak i grašak. Broj kvržica se smanjuje samo pri ekstremnim sušnim uvjetima, a tolerancija kvržica na sušu povezuje se s mogućnošću da se održi dostupnost produkata fotosinteze u kvržicama tijekom suše. Suša također štetno djeluje na enzim nitrogenazu

koji vrši proces biološke fiksacije dušika. Tijekom suše na djelovanje nitrogenaze utječe nekoliko čimbenika:

1. smanjen priljev ATP-a, što je posljedica smanjene opskrbe kisikom ili ugljikom iz asimilata što utječe na učinkovitost disanja
2. inhibicija  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$ , ADP-om
3. izmijenjen pH gradijent preko bakterijske membrane
4. dostupnosti supstrata, kao i genetska ekspresija utječu na aktivnost nitrogenaze

Danas se provode brojna istraživanja o poboljšanju simbioze soje i rizobija koja bi pridonijela boljoj toleranciji soje na sušu. Jedno od rješenja je izolacija rizobija tolerantnih na sušu koje bi se primjenjivale u agrotehničkoj mjeri predstvene bakterizacije soje.

#### 2.4.8. Povećanje tolerancije biljaka na sušu posredstvom rizobija

Značajnu ulogu u adaptaciji i povećanju otpornosti brojnih leguminoza na sušu, kao i na druge abiotičke stresove imaju mikroorganizmi. Brojna istraživanja su pokazala da pojedine vrste mikroorganizama povećavaju toleranciju brojnih leguminoza na različite abiotičke stresove kao što su povišen salinitet tla, suša, kiselost/alkalnost tla, kao i na prisustvo različitih teških metala u tlu. To se posebno odnosi na rizobije koje se odlikuju sposobnošću stvaranja biofilma i produkcijom egzopolisaharida kao i drugim brojnim mehanizmima čime povećavaju toleranciju leguminoza na različite abiotičke stresove. Proizvodnja egzopolisaharida je važna u formiranju biofilma.

Veliki utjecaj na povećanje tolerancije biljaka na sušu imaju rizobije koje posjeduju neke od svojstava koje je karakteristično za PGPR bakterije (engl. *plant growth promoting rhizobacteria*) odnosno bakterije koje potiču rast biljaka. Svojim direktnim i indirektnim mehanizmima proizvode fitohormone, provode opskrbu biljaka pristupačnim oblikom fosfora te smanjuju štetne utjecaje patogenih mikroorganizama sintezom različitih antibiotika (Backer i sur., 2018).

Fiziološki najaktivniji auksin u rastu i razvoju biljaka je indol-3-octena kiselina (engl. *indole-3-acetic acid*, IAA). Istraživanja su pokazala da je kod biljnih vrsta koje su inokulirane s rizobijima koje imaju mogućnost sinteze IAA, došlo do povećanja rasta korijena. Povećanje korijenove mase omogućava biljkama da se lakše nose sa deficitom vode.

Igiehan i Babalola (2019) u svom istraživanju navode da *Bradyrhizobium spp.* poboljšava rast i razvitak korijena brojnih leguminoza te također povećava toleranciju biljaka na sušu sintezom IAA. Također navode da soj *Rhizobium* MRPI povećava broj kvržica, koncentraciju leghemoglobina te sadržaju proteina u sjemenu kod graška, dok *Rhizobium spp.* kod leće povećava razvitak biljke, sadržaj dušika i proteina u sjemenu u uvjetima povišene koncentracije teških metala.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Uzorkovanje tla i pedološke analize

Uzorci tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljeni su sa površina koje se koriste za uzgoj ratarskih kultura kao i s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava koje se bave uzgojem soje. Svi uzorci tala uzeti su iz oraničnog horizonta dubine 0-30 cm. Ukupno je uzeto tlo s 29 različitih lokacija, od toga dvanaest uzoraka s područja Vukovarsko-srijemske županije, osam uzoraka s područja Koprivničko-križevačke, četiri uzorka s područja Bjelovarsko-bilogorske, dva uzorka s područja Istarske, te po jedan uzorak koji pripada Požeško-slavonskoj, Zadarskoj i Splitsko-dalmatinskoj županiji (tablica 6, slika 27).

U Zavodu za pedologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu određene su fizikalno-kemijske karakteristike tala kao i njihova sistematska pripadnost. Navedene analize obuhvatile su:

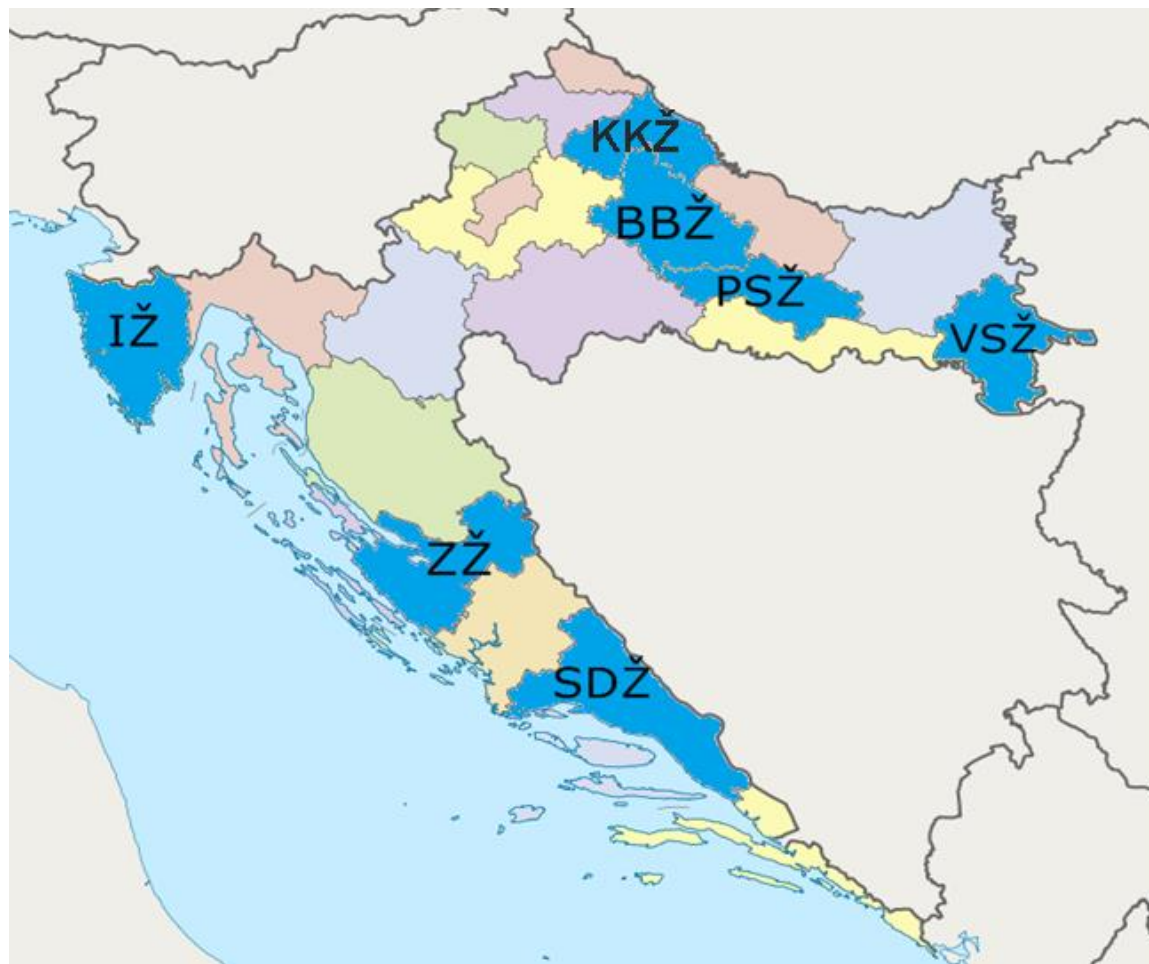
- pripremu uzoraka za fizikalno–kemijske analize prema HRN ISO 11464:2009.
- određivanje raspodjele veličine čestica (mehaničkog sastava) u mineralnom dijelu tla metodom prosijavanja i sedimentacije (modificirana metoda HRN ISO 10390:2005).
- određivanje pH-vrijednosti tla u H<sub>2</sub>O i KCl-u (HRN ISO 10390:2005).
- određivanje količine humusa (bikromatna metoda po Tjurinu, JDPZ, 1966).
- određivanje fiziološki aktivnog P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i K<sub>2</sub>O (Al-metoda, JDPZ, 1966).
- određivanje sadržaja ukupnog dušika suhim spaljivanjem, “elementarna analiza” (prilagođena HRN ISO 138781261:2004).

Tablica 6. Lokacije uzorkovanja tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.

Županija, lokacija	Koordinate		Oznaka uzorka
	N	E	
VSŽ, Sopot	45° 15' 41"	18° 46' 54"	S1
VSŽ, Andrijaševci	45° 15' 41"	18° 46' 54"	S2
VSŽ, Retkovci	45° 13' 36"	18° 40' 35"	S3
VSŽ, Privilaka	45° 11' 16"	18° 51' 51"	S4
VSŽ, Komletinci I	45° 7' 25"	18° 56' 45"	S5
VSŽ, Komletinci II	45° 10' 28"	18° 56' 15"	S6
VSŽ, Bobota I	45° 27' 13"	18° 51' 40"	S7
VSŽ, Bobota II	45° 27' 6"	18° 51' 50"	S8
VSŽ, Bobota III	45° 28' 41"	18° 51' 4"	S9
VSŽ, Bobota IV	45° 28' 48"	18° 52' 16"	S10
VSŽ, Orlovača I	45° 24' 7"	18° 56' 1"	S11
VSŽ, Orlovača II	45° 24' 0"	18° 55' 41"	S12
PSŽ, Kutjevo	45° 25' 26"	17° 52' 35"	S28-36
KKŽ, Križevci	46° 1' 47"	16° 32' 42"	S21
KKŽ, Ivanec Križevački	46° 4' 39"	16° 34' 40"	S22
KKŽ, Kloštar Vojakovački	46° 6' 52"	16° 32' 50"	S23
KKŽ, Sveta Helena	46° 6' 52"	16° 32' 50"	S24
KKŽ, Bočkovec	46° 4' 30"	16° 29' 43"	S25
KKŽ, Gregurovec I	46° 1' 27"	16° 27' 52"	S26
KKŽ, Gregurovec II	46° 1' 21"	16° 27' 19"	S27
KKŽ, Gola	46° 10' 9"	16° 48' 52"	S37-S46
BBŽ, Mlinski vinogradi I	45° 40' 21"	16° 55' 13"	S15
BBŽ, Mlinski vinogradi II	45° 40' 19"	16° 55' 8"	S16
BBŽ, Mlinski vinogradi III	45° 40' 18"	16° 55' 6"	S17
BBŽ, Hercegovac	45° 40' 1"	16° 59' 20"	S18
IŽ, Novigrad	45° 19' 59"	13° 34' 14"	S47
IŽ, Poreč	45° 13' 19"	13° 36' 13"	S48
ZŽ, Vrana	43° 56' 45"	15° 26' 53"	S49
SDŽ, Sinjsko polje	43° 42' 16"	16° 40' 0"	S50

VSŽ- Vukovarsko-srijemska županija, PŽ- Požeška županija, KKŽ-Koprivničko-križevačka županija, BBŽ-Bjelovarsko-bilogorska županija, IŽ-Istarska županija, ZŽ-Zadarska županija, SD-Splitsko-dalmatinska županija

Slika 27. Karta lokacija uzorkovanja tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.



### 3.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija

U cilju izolacije autohtonih sojeva rizobija iz prikupljenih uzoraka tla, postavljen je vegetacijski pokus u plasteniku Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu u proljeće 2017. godine. Sjeme sorte Lucija najprije je površinski sterilizirano trenutnim uranjanjem u otopinu 96 % etanola, potom namakanjem u 3 % natrijevom hipokloritu (NaClO) u trajanju od 15 minuta te na kraju višestrukim ispiranjem u šest serija sterilne vode.

Sjeme je potom posijano u lonce koji su prethodno dezinficirani i na čije su dno postavljene kuglice ekspanzirane gline kako bi održavale vlažnost u loncu.



Slika 28. Postavljen pokus u plasteniku s prikupljenim uzorcima tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija.

U fazi pune cvatnje soje koja je nastupila šest tjedana nakon sjetve, prikupljene su kvržice s korijena biljki soje te se pristupilo izolaciji čistih kultura rizobija standardnim protokolom (Vincent, 1970).



U tu svrhu s prikupljenih pet kvržica po svakoj biljci najprije su odstranjeni ostatci tla, tako što su isprane u vodi nekoliko puta. Nakon toga proveda se površinska sterilizacija kvržica na isti način kao i sterilizacija sjemena samo što je vrijeme namakanja u 3 % natrijevom hipokloritu skraćeno s petnaest na tri minute, budući da su kvržice dosta osjetljivije od sjemena.

Nakon sterilizacije, sterilne kvržice su mehanički secirane te je oslobođeni mliječni fluid pomoću sterilnog L štapića razmazan na pripremljenu hranjivu podlogu YMA (s dodatkom Congo red indikatora) čiji je sastav naveden u tablici 7.

Tablica 7. Sastav hranjive podloge YMA (Yeast Mannitol Agar).

Sastav	Količina	Proizvođač
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	VWR Chemicals
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	VWR Chemicals
NaCl	0.1 g	VWR Chemicals
Manitol	10.0 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	0.4 g	BioLife
Congo red	5 ml	Alfa Aesar
Agar	15.0 g	BioLife
Destilirana voda	1000 ml	

Nakon toga uslijedila je inkubacija u trajanju od sedam dana na temperaturi 28 °C. Potom je iz svakog uzorka odabrano je 5-6 kolonija na temelju morfoloških karakteristika (veličina, oblik, boja i tekstura) te je uslijedilo bojanje po Gramu i mikroskopiranje dobivenih kolonija.

Odabrale kolonije za daljnju analizu koje su se u tu svrhu pročistile metodom iscrpljenja pohranjenje su na dva načina. Za rutinsko korištenje dobiveni bakterijski izolati čuvani su pri temperaturi 4°C na YMA hranjivim podlogama uz dodatak bromtimol plavog indikatora. Isti izolati su pohranjeni na temperaturu od -20°C. U ovom slučaju korištena je 20 % sterilna otopina glicerola u koju je dodana suspenzija bakterijskih stanica. Ukupno je izolirano 60 izolata iz 29 prikupljenih uzoraka tla.

### 3.3. Test autentičnosti izolata

Nakon postupka izolacije autohtonih sojeva rizobija proveden je test autentičnosti dobivenih izolata s ciljem provjere njihove sposobnosti nodulacije. Za provedbu ovog testa koristile su se umnožene bakterijske kulture dobivenih izolata kao inokulum za sjeme soje. Test autentičnosti uključivao je 60 izolata dobivenih iz 29 prikupljenih uzoraka tla, referentni soj *B. japonicum* 344 kao pozitivnu kontrolu te negativnu (nebakteriziranu) kontrolu. Za sjetvu je korišteno sjeme sorte Lucija, koje je prethodno sterilizirano (Vincent, 1970) i posijano u sterilizirane lonce. Kao supstrat koristio se sterilni vermikulit.

Pokus je postavljen u komori rasta Zavoda za ishranu bilja, Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Uvjeti u komori rasta bili su strogo kontrolirani s fotoperiodom 16 h dana i 8 h noći. Dnevna temperatura je iznosila 26°C, vlaga 65%, dok je noćna temperaturu iznosila 22°C s jednakom vlažnošću. Tijekom pokusa uzorci su zalijevani hranjivom otopinom koja nije sadržavala dušik.

Pozitvan rezultat testa verifikacije očitovao se pojavom kvržica na korijenju soje u fazi pune cvatnje biljke.

### 3.4. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija

#### 3.4.1. Izolacija genomske DNA

Izolacija ukupne genomske DNA provedena je korištenjem DNeasy® Blood&Tissue kita (QIAGEN, 2006, USA) prema preporukama proizvođača. Dobiveni izolati najprije su uzgajani 24 sata na 28 °C u YMB tekućoj hranjivoj podlozi čiji je sastav naveden u tablici 8.

Tablica 8. Sastav hranjive podloge YMB (Yeast Mannitol Broth).

Sastav	Količina	Proizvođač
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	VWR Chemicals
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	VWR Chemicals
NaCl	0.1 g	VWR Chemicals
Manitol	10.0 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	0.4 g	BioLife
Bromtimol-plavo	5 ml	Alfa Aesar
Destilirana voda	1000 ml	

Tekuća kultura bakterijskih stanica volumena 1,5 ml najprije se centrifugirala 10 minuta na 7000 rpm (Eppendorf, Njemačka). Nakon toga se dobiveni supernatant odbacio, dok se talog resuspendirao dodatkom 180 µl ATL pufera i 20 µl proteinaze K. Ovim postupkom izvršila se liza bakterijskih stanica. Liza bakterijskih stanica se potom ubrzala inkubacijom bakterijskih stanica u vodenoj kupelji pri temperaturi od 56 °C u trajanju od sat i pol. Nakon inkubacije suspenziji se dodalo 200 µl pufera AL, te 200 µl 96 % etanola u svrhu precipitacije. Potom se čitav sadržaj suspenzije prebacio u DNeasy Mini Spin kolone s membranom na kojoj se zadržala bakterijska DNA. Sadržaj u kolonama se nakon toga centrifugirao jednu minutu na 8000 rpm. Nakon toga se sadržaj kolekcijske tubice odbacio, te se na kolonu stavila nova tubica. Na kraju je uslijedio proces ispiranja membrane Mini Spin kolone na koju je vezana bakterijska DNA. Proces se vršio u dvije faze. Najprije se kolona isprala s 500 µl pufera AW1, nakon čega se sadržaj kolone centrifugirao jednu minutu na 8000 rpm. U drugoj fazi kolona se isprala s 500 µl pufera AW2 te se kolonica opet centrifugirala tri minute na 14 000 rpm.

U zadnjem koraku izolacije genomske DNA, Mini Spin kolona se stavila u novu sterilnu tubicu. U kolonu se potom dodalo 200 µl elucijskog pufera AE koji se inkubirao jednu minutu na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirao tri minute na 8000 rpm. Tijekom centrifugiranja elucijski pufer AE povukao je genomsku DNA s membrane Mini Spin kolone, tako da se na kraju dobila čista genomska DNA. Dobivena DNA se najprije pohranila na 4°C preko noći, a potom na -20°C na duži period.

### 3.4.2. Određivanje koncentracije genomske DNA

Koncentracija izolirane genomske DNA kao i njena čistoća određena je spektrofotometrijski pri valnim duljinama 260 i 280 nm na spektrofotometru Lambda 12 (Perkin Elmer, SAD).

Koncentracija ukupne genomske DNA za svaki pojedini uzorak izračunata je prema formuli:

$$\text{cDNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{faktor apsorbancije (A}_{260}\text{)} \times \text{faktor razrijeđenja} \times 50$$

### 3.4.3. RAPD analiza

Kako bi se dobio uvid u bioraznolikosti svih 60 izoliranih sojeva provedena je RAPD analiza s tri oligonukleotidne početnice čije su karakteristike navedene u tablici 9.

Tablica 9. Karakteristike oligonukleotidnih početnica korištenih u RAPD analizi (Sikora i Redžepović, 2003).

Oznaka početnice	Sekvenca	Broj nukeleotida	GC sadržaj (%)
P1	5' - GATCGGACGG - 3'	10	70
P2	5' - GATCCTGCCG - 3'	10	70
P3	5' - GATCGGACCG - 3'	10	70

Reakcijska smjesa za amplifikaciju jednog uzorka sadržavala je 10x pufer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP, 0.2 mM oligonukleotidne početnice (P2, P5, P16), 1.25 U Taq polimerazu, DNA i H<sub>2</sub>O. Amplifikacija je provedena prema temperaturnim profilima navedenim u tablici 10.

Amplifikacija je provedena u PCR termobloku (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems).

Tablica 10: Uvjeti amplifikacije za RAPD analizu.

Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	5
35	Denaturacija DNA	95	1/2
	Sparivanje početnice s kalupom	45	1/2
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
1	Završno produljenje lanaca	72	7

Dobiveni PCR produkti razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom na 6% poly(NAT) gelu (Elchrom Scientific AG, Cham, Švicarska). Naneseno je 5 µl PCR produkta i 5 µl molekularnog markera od 1 kb (Thermo Fisher Scientific, SAD) za određivanje veličine amplificiranih fragmenata. Elektroforeza je provedena 7V/cm u trajanju od 2 sata i 30 minuta, nakon čega je gel bojan etidij-bromidom u vremenu od 30 min te isto toliko odbojavan sredstvom za odbojavanje (DST Solution, Elchrom Scientific, Švicarska). Na kraju je konstruirano filogenetsko stablo na temelju matrice koja je dobivena UPGMA metodom i Jaccard-ovim koeficijentom koristeći programa Bionumerics, verzije softvera 4.0 (Applied Maths, Austin, Teksas)

#### 3.4.4. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena

U cilju utvrđivanja vrste kvržičnih bakterija izoliranih iz kvržica soje provedena je amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena. Korištene su početnice fD1 i rD1 čije su konačne koncentracije iznosile  $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Karakteristike navedenih početnica navedene su u tablici 11.

Tablica 11. Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje 16S rRNA gena. Preuzeto iz Chen i sur. (2000).

Gen	Oznaka početnice	Sekvenca
16S rRNA gen	fD1	5' – CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'
	rD1	5' – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 3'

Amplifikacija je provedena u PCR termobloku (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems) prema temperaturnim profilima navedenim u tablici 12.

Tablica 12. Uvjeti amplifikacije 16S rRNA gena.

Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	3
35	Denaturacija DNA	94	1
	Sparivanje početnice s kalupom	57	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1,5
1	Završno produljenje lanaca	72	10

Elektroforeza amplificiranih PCR produkata provedena je na isti način kao što je prethodno opisano u RAPD analizi. Fragmenti DNA su potom pročišćavani tako što su najprije izrezani iz gela, a potom je uslijedilo njihovo pročišćavanje korištenjem GenElute PCR Clean-Up kita (Sigma Aldrich, SAD) prema uputama proizvođača.

Na kraju je uslijedilo sekvenciranje gena 16S rRNA korištenjem istih početnica čije su karakteristike prethodno navedene u tablici 11. U cilju sekvenciranja 16S rRNA gena, pročišćeni PCR produkti su potom poslani na sekvenciranje u Macrogen servis (Amsterdam, Nizozemska).

### 3.4.5. Amplifikacija i sekvenciranje konstitutivnih *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena

Karakteristike početnica za amplifikaciju i sekvenciranje konstitutivnih *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena opisane su u tablici 13. Konačna koncentracija sve tri početnice za amplifikaciju svakog pojedinog gena iznosila je 0,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , dok su temperaturni profili za amplifikaciju gena navedeni u tablici 14.

Tablica 13. Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena.

Gen	Oznaka početnice	Sekvenca	Referenca
<i>rpoB</i>	rpoB83F	5'- CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC - 3'	Dalamuta i sur., 2012.
	rpoB1061R	5'- AGCGTGTTGCGGATATAGGCG - 3'	
<i>gyrB</i>	gyrB343F	5'- TTCGACCAGAAYTCCTAYAAGG - 3'	Dalamuta i sur., 2012
	gyrB1043R	5'- AGCTTGTCCTTSGTCTGCG - 3'	
<i>glnII</i>	TSglnII <sub>f</sub>	5'- AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG -3'	Stepkowski i sur., 2005.
	TSglnII <sub>r</sub>	5'- SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTGCG - 3'	

Tablica 14. Uvjeti amplifikacije *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena.

<b><i>rpoB</i></b>			
Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	5
3	Denaturacija DNA	94	2
	Sparivanje početnica s kalupom	58	2
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
30	Denaturacija DNA	94	1/2
	Sparivanje početnice s kalupom	58	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
1	Završno produljenje lanaca	72	5
<b><i>gyrB</i></b>			
Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	5
5	Denaturacija DNA	94	2
	Sparivanje početnica s kalupom	58	2
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
28	Denaturacija DNA	94	1/2
	Sparivanje početnica s kalupom	58	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
1	Završno produljenje lanaca	72	5
<b><i>glnII</i></b>			
Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	2
35	Denaturacija DNA	95	45 s
	Sparivanje početnice s kalupom	58	1/2
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1,5
1	Završno produljenje lanaca	72	7



Pročišćavanje dobivenih fragmenata DNA te uvjeti elektroforeze odvijali su se na isti način kao i kod prethodno opisane analize 16S rRNA gena.

Za sekvenciranje *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena koristile su iste početnice kao i za njihovu njihovu amplifikaciju čije su karakteristike prethodno opisane u tablici 13. Kao i za prethodno opisani 16S rRNA gen pročišćeni PCR produkti poslani na sekvenciranje u Macrogen servis (Amsterdam, Nizozemska).

### 3.4.6. Amplifikacija i sekvenciranje *nodC* i *nifH* gena

Karakteristike početnica za amplifikaciju i sekvenciranje *nodC* i *nifH* gena opisane su u tablici 15. Konačne koncentracije obje početnice za amplifikaciju iznosile su 0,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , dok su temperaturni profili za amplifikaciju gena navedeni u tablici 16.

Tablica 15. Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje *nodC* i *nifH* gena.

Gen	Oznaka početnice	Sekvenca	Referenca
<i>nodC</i>	nodC-for540	5' - TGATYGAYATGGARTAYTGGYT- 3'	Yao i sur., 2014.
	nodC-rev1160	5' - CGYGACAGCCANTCKCTATTG - 3'	
<i>nifH</i>	nif-F	5' - TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA - 3'	
	nif-R	5' - AGCATGTCTCSAGYTCNTCCA - 3'	

Tablica 16. Uvjeti amplifikacije za analizu *nodC* i *nifH* gena.

<b><i>nodC</i></b>			
Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	5
30	Denaturacija DNA	94	1
	Sparivanje početnice s kalupom	55	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
1	Završno produljenje lanaca	72	10
<b><i>nifH</i></b>			
Broj ciklusa	Faza	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	Početna denaturacija	95	5
30	Denaturacija DNA	94	1
	Sparivanje početnice s kalupom	57	1
	Sinteza komplementarnih lanaca	72	1
1	Završno produljenje lanaca	72	10

### 3.4.7. Filogenetska analiza sekvenciranih gena

Sve sekvence dobivene sekvenciranjem svih prethodno spomenutih gena ručno su pročišćene i poravnate koristeći Staden softver (Staden i sur., 2003). Potom su sekvence uspoređene s genima koji se nalaze u GenBank korištenjem programa BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*).

Koristeći Kimura's two-parameter izračunata je udaljenost prema modelu (Kimura, 1993) kako bi se moglo konstruirati filogenetsko stablo metodom pridruživanja susjednih parova (engl. *neighbour joining method*). Na kraju pomoću MEGA X softvera izrađeno je filogenetsko stablo najveće sličnosti (Maximum Likelihood Tree) (Kamar i sur., 2018). Grananje u filogenetskim stablima dobiveno je „*bootstrap*“ analizom uz permutaciju 1000 podataka.

### 3.5. Fenotipska karakterizacija izolata

#### 3.5.1. *In vitro* ispitivanje tolerantnosti na sušu

U cilju utvrđivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na sušu provedeno je njihovo *in vitro* testiranje u kojem je suša inducirana koristeći polietilen glikol (PEG 6000). U hranjivu podlogu YMB (tablica 18) dodavane su dvije različite koncentracije PEG-a kako bi se stimulirale dvije razine suše. Koncentracije PEG-a koje su dodavane u podloge iznosile su:

- 15 %
- 30 %

Tablica 18. Sastav YMB hranjive podloge uz dodatak PEG 6000.

Sastav	Količina	Proizvođač
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	VWR Chemicals
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	VWR Chemicals
NaCl	0.1 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	0.05 g	BioLife
15 % PEG 6000	45.0 g	Chem Cruz
30 % PEG 6000	90.0 g	
Destilirana voda	1000 ml	

Nakon što su hranjive podloge sterilizirane u autoklavu 15 min na 121°C sojevi su najprije naciepljeni u 5 ml YMB hranjive podloge bez dodatka PEG-a te su inkubirani 24 sata na 28°C. Nakon toga uzimano je po 100 µl prekonocne kulture svakog soja i preneseno u 20 ml YMB hranjive podloge koja je sadržavala 15 % i 30 % PEG. Kao kontrola služila je YMB hranjiva podloga u koji su bili naciepljeni bakterijski izolati bez PEG-a.

Bakterijski izolati su potom inkubirani u termostatu s miješalicom (Orbital Shaker Biosan ES-20, Latvija) 7 dana na 28°C. Nakon inkubacije spektrofometrijski (Spectrometer Lambda EZ 210) je očitani rast odnosno apsorbancija na valnoj duljini 600 nm. Na kraju provedenog istraživanja izvršila se selekcija sojeva s najvećom *in vitro* tolerantnošću na sušu. Oni sojevi koji su pokazali najveću *in vitro* tolerantnost na sušu bili su uključeni u vegetacijski pokus.

## 3.5.2. Ekološka karakterizacija izolata

### 3.5.2.1. Rast na različitim temperaturama

Kako bi se ispitao rast istraživanih sojeva na različitim temperaturama, pripremljene su YMA hranjive podloge koje su prethodno sterilizirane 15 minuta na 121 °C pri 1ATM, dok je pH vrijednost podloga bila podešena na 6.8.

Sojevi su potom nacijepljeni na pripremljene hranjive podloge te inkubirani na temperaturama od 4 °C, 37 °C i 45 °C. Ispitivanje sposobnosti rasta rizobija na različitim temperaturama vršilo se u tri ponavljanja. Kao pozitivna kontrola u ovom ispitivanju koristio se rast sojeva na 28 °C jer je to optimalna temperatura rasta kvržičnih bakterija. Nakon 7 dana rasta očitani su rezultati, pri čemu se rast označavo (+), odsustvo rasta (-), a slabi rast (+/-).

### 3.5.2.2. Rast na različitim pH vrijednostima

U ovom istraživanju ispitivana je sposobnost rasta sojeva na šest različitih pH vrijednosti:

- 4.5
- 5
- 6
- 9
- 10
- 11

Naime, optimalna pH vrijednost za rast rizobija je 6.8 te ja ova pH vrijednost ujedno služila kao pozitivna kontrola. Istraživanje je provedeno tako što je standardnoj YMB podlozi dodavan natrijev hidroksid (1M NaOH) kako bi se postigla alkalna reakcija te klorovodična kiselina (1M HCl) za postizanje kisele reakcije. Na tako pripremljene sterilne podloge nacijepljeni su sojevi koji su potom inkubirani 7 dana na temperaturi od 28°C. Ispitivanje se vršilo u tri ponavljanja za svaki soj. Nakon 7 dana rasta, rezultati su očitani spektrofotometrijski na valnoj duljini 600 nm te uspoređeni s pozitivnom kontrolom.

### 3.5.2.3. Rast pri različitim koncentracijama NaCl

Optimalna koncentracija NaCl-a u standardnoj YMA podlozi iznosi 0.01 %, pri čemu povišena koncentracija soli inhibira rast rizobija. Kako bi se ispitala sposobnost rasta istraživanih sojeva u uvjetima povišene koncentracije soli, standardnoj YMA podlozi dodavane su sljedeće koncentracije NaCl:

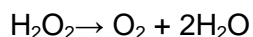
- 1 %
- 2 %
- 3 %
- 3 %
- 5 %

Svi sojevi su potom inkubirani 7 dana na temperaturi od 28°C. Na kraju su očitani rezultati gdje je rast označen (+), odsustvo rasta (-), a slabi rast (+/-).

### 3.5.3. Biokemijska karakterizacija izolata

#### 3.5.3.1. Katalaza test

Katalaza testom utvrdilo se prisustvo enzima katalaze kod sojeva koji su uključeni u ovo istraživanje. Enzim katalaza zadužen je za razlaganje toksičnog vodikovog peroksida na molekulu vode i kisika.



Ispitivanje se provelo tako što je na predmetno stakalce nanescena kap vodikovog peroksida u koju je dodan bakterijski izolat. Test se smatrao pozitivnim ukoliko je došlo do stvaranja mjehurića, što je značilo da ispitivani izolat posjeduje enzim katalazu, a nastali mjehurići predstavljali su kisik koji je nastao razlaganjem vodikovog peroksida. Odsustvo mjehurića sugeriralo je na odsustvo enzima katalaze i test se smatrao negativnim (Dekak i sur., 2018).

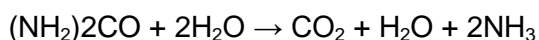
### 3.5.3.2. Ureaza test

Za ispitivanje pojedovanja enzima ureaze, svaki izolat nacijepljen je na hranjivu podlogu čiji je sastav naveden u tablici 19.

Tablica 19. Sastav hranjive podloge za ureaza test

Sastav	Količina	Proizvođač
Urea	20.0 g	VWR Chemicals
NaCl	5.0 g	VWR Chemicals
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g	VWR Chemicals
Pepton	1.0 g	VWR Chemicals
Dekstroza	1.0 g	BioLife
Fenol red	0.012 g	Sigma Aldrich
Destilirana voda	1000 ml	

Ukoliko ispitivani izolat posjeduje ezim ureazu dolazi do hidrolize uree koja se nalazi u sastavu hranjive podloge.



Kao rezultat hidrolize uree dolazi do nastanka amonijaka. Nastali amonijak alkalizira hranjivu podlogu te dolazi do promjene boje iz žute (pH 6.8) u ružičastu (pH 8.1) što se potom smatra pozitivnim rezultatom. Odsustvo enzima ureaze ne dovodi do hidrolize uree i nastanka amonijaka te u tom slučaju ne dolazi do promjene pH hranjive podloge što se smatra negativnim testom (Dekak i sur., 2018).

### 3.5.3.3. Oksidaza test

Oksidaza test provodi se u cilju identifikacije izolata koji imaju sposobnost produkcije enzima citokrom c oksidaze koji je dio transportnog lanca elektrona. Test se provodi tako što se bakterijska kultura nanosi na filter papir, a potom se dodaje jedna kapljica reagensa (BBL™ Oxidase Reagent Droppers). Ukoliko ispitivani izolat posjeduje enzim citokrom c dolazi do oksidacije redoks boje, što rezultira promjenom boje filter papira iz žute u plavu (Dekak i sur., 2018).

### 3.5.4. Otpornost na antibiotike

U cilju ispitivanja otpornosti svakog pojedinog izolata na određene doze antibiotika korišteni su test diskovi BD Sensi-Disc™ (Becton Dickinson GmbH). U provedenom istraživanju korišteni su sljedeći antibiotici u navedenim koncentracijama:

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

Istraživanje je provedeno tako što su svi izolati prvo uzgajani u 5 ml tekuće YMB hranjive podloge 7 dana na temperaturi 28°C. Sastav YMB hranjive podloge prethodno je naveden u tablici 8.

Potom je 100 µl bakterijske kulture svakog izolata preneseno na YMA hranjivu podlogu (sastav prethodno naveden u tablici 7) te razmazano pomoću L-stapića. Na podloge s nanesenom bakterijskom kulturom svakog izolata dodani su diskovi s antibioticima čije su koncentracije prethodno navedene.

Hranjive podloge s nanesenim izolatima su potom inkubirane 7 dana nakon čega su očitani rezultati. Ukoliko je došlo do rasta oko diska pojedinog antibiotika to je označavalo otpornost izolata na ispitivanu koncentraciju određenog antibiotika. Suprotno tome, ukoliko je došlo do pojave prstena oko diska antibiotika, odnosno zone inhibicije u kojima nema bakterijskog rasta smatralo se da je izolat osjetljiv na ispitivani antibiotik. Kako se raspon djelovanja korištenih antibiotika odnosi na kliničke izolate bilo je potrebno prilagoditi za kvržične bakterije. Na kraju su rezultati očitani na temelju polumjera zone oko diska. Izolati koji su tvorili zone manje od 4 mm za eritromicin, ampicilin i streptomycin smatrani su rezistentnim (R), 5-8 mm slabo otporni (I), dok su zone veće od 8 mm ukazivale na osjetljivost (S) ispitivanog izolata na antibiotik. Što se tiče kanamicima zone inhibicije do 6 mm ukazivale su na rezistentnost(R), 7-10 mm slabo osjetljivim, a zone veće od 10 mm su ukazivale na osjetljivost (S) ispitivanog izolata (Rajnović, 2017).



### 3.5.5. Iskorištavanje različitih izvora šećera

U ovom istraživanju sojevi su testirani na sposobnost iskorištavanja ugljika iz različitih izvora šećera. Za rast sojeva korištena je hranjiva podloga bez ugljikohidrata (Somasegaran i Hoben, 1994). U podlozi je također reducirani kvasni ekstrakt s 0.4 g/l na 0.05 g/l (tablica 20).

U istraživanje su bili uključeni i termostabilni i termolabilni ugljikohidrati te se njihova sterilizacija vršila na dva različita načina. Sterilizacija termostabilnih ugljikohidrata (fruktoza, glukoza, laktoza, saharoza i manitol) vršila se u autoklavu pri 121 °C, 15 min i 1 ATM, a termolabilnih ugljikohidrata (galaktoza, maltoza, arabinoza i rafinoza) filter-sterilizacijom uz pomoć Chromafil Xtra PET-20/25 (Macherey-Nagel) filtera kojeg karakterizira poliesterska membrana, veličine pora 0,2 µm. Nakon sterilizacije svi šećeri su dodavani u hranjivu podlogu čiji je sastav naveden u tablici 20. Potom su na podloge nanosili sojevi te su nakon inkubacije od 7 dana na 28°C očitani rezultati (+, -)

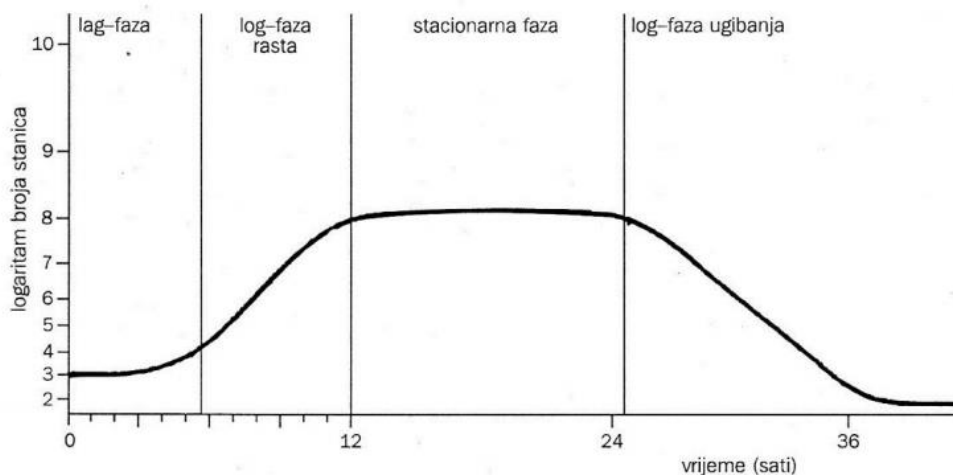
Tablica 20. Sastav hranjive podloge bez ugljikohidrata.

Sastav	Količina	Proizvođač
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	VWR Chemicals
MgSO <sub>4</sub>	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	

### 3.5.6. Generacijsko vrijeme izolata

Poznato je da rizobije koje noduliraju soju uglavnom pripadaju spororastućim bakterijama s generacijskim vremenom od 9-18 sati što znači da je njihovo generacijsko vrijeme duže u odnosu na brzorastuće rizobije koje imaju znatno kraće generacijsko vrijeme. No, brojna istraživanja su pokazala da soju mogu nodulirati i brzorastuće rizobije (Pastorino i sur., 2003).

Nakon naciepljivanja bakterijskih izolata na hranjivu podlogu započinje njihov rast i razmnožavanje koje se odvija eksponencijalno kao što je prikazano na slici 29.



Slika 29. Krivulja rasta bakterija.

Bakterijski rast se dijeli na četiri faze:

- lag faza (faza suzdržanog rasta)
- log faza rasta (logaritamska ili eksponencijalna faza)
- stacionarna faza
- faza odumiranja

Za potrebe ovog istraživanja svi sojevi su prvo uzgajani na YMB hranjivoj podlozi (tablica 8) 24 sata na 28°C. To je predstavljalo lag fazu koja se još naziva i faza prilagodbe. U ovoj fazi bakterijski izolati pokazuju spori rast budući da se moraju prilagoditi na nove uvjete sredine. Kad su se bakterijske stanice prilagodile novim uvjetima sredine odnosno u lag fazi rasta 100  $\mu$ l prekonoćne kulture svakog izolata preneseno je u Erlenmayerove tikvice koje su sadržavale 100 ml YMB podloge. Nakon naciepljivanja bakterijskih izolata na hranjivu podlogu započeo je njihov rast i razmnožavanje se odvijao eksponencijalno kao što je prikazano na slici 29.

Tikvice su potom inkubirane u termostatu s miješalicom (Biosan, Orbital Shaker ES-20, Latvija) na 28°C te se svaka 2 sata mjerila apsorbancija na spektrofotometru (Lambda EZ 210, Perkin Elmer, SAD ) na valnoj duljini od 600 nm.

Apsorbancija se mjerila svaka 2 sata sve dok bakterijske stanice nisu ušle u logaritamsku fazu odumiranja u kojoj se broj bakterijskih stanica počeo smanjivati geometrijskom progresijom. Time je broj odumrlih bakterijskih stanica postao veći nego broj nastalih stanica.

Krivulja rasta koja se dobila na temelju prikupljenih podataka prikazuje kinetiku diobe bakterijske kulture, a predstavlja grafički prikaz parametra koji su ovisni o rastu i diobi bakterijske kulture. U ovom slučaju to se odnosi na optičku gustoću bakterijskih stanica koja je izmjerena na valnoj duljini od 600 nm ( $OD_{600}$ ) u ovisnosti o vremenu. Iz krivulje rasta se potom odredilo generacijsko vrijeme svakog ispitivanog soja.

### 3.6. PGPR karakterizacija izolata

PGPR karakterizacija izolata obuhvatila je utvrđivanje sposobnosti produkcije indol-3-octene kiseline (IAA), litičkih enzima, egzopolisaharida, te optapanje fosfata.

#### 3.6.1. *In vitro* mehanizmi stimulacije biljnog rasta – direktni mehanizmi

##### 3.6.1.1. Produkcija indol-3-octene kiseline (IAA)

Sposobnost produkcije indol-3-octene kiseline utvrđena je modificiranom kvantifikacijskom metodom (Chandra i sur., 2018). Za svaki izolat radila se serija od 3 ponavljanja. Izolati su prvo nacijepljeni na NB hranjivu podlogu čiji je sastav naveden u tablici 20, a potom su inkubirani 24 sata na 28°C.

Tablica 20. Sastav Nutrient Broth hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
Pepton	15 g	VWR Chemicals
Glukoza	1 g	VWR Chemicals
NaCl	6 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	3 g	BioLife
Destilirana voda	1000 ml	

Nakon inkubacije, 10 µl bakterijske kulture je prenešeno u 1 ml NB medija uz dodatak 100µg/ml L- triptofana. Izolati su potom inkubirani u termostatu s mješalicom (Biosan, Orbital Shaker ES-20, Latvija) 7 dana na temperaturi 28 °C i 150 rpm-a.

Nakon inkubacije izolati su prvo centrifugirani 10 minuta na 8000 rpm-a (Eppendorf Centrifuge 5415 R), a potom je 200 µl supernatanta prebačeno je u nove tubice u koje je dodano 400 µl Salkowski reagensa čiji je sastav naveden u tablici 21.

Tablica 21. Sastav Salkowski reagensa.

Sastav	Količina	Proizvođač
35 % HClO <sub>4</sub>	49 ml	VWR Chemicals
0.5 M FeCl <sub>3</sub>	1 ml	VWR Chemicals

Suspencija je potom inkubirana 35 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je na UV-VIS spektrofotometru (Lambda EZ 210, Perkin Elmer, SAD) izmjerena apsorbancija na valnoj duljini 530 nm. Neinkubirana NB hranjiva podloga s L-triptofanom i Salkowski reagensom je korištena je za izradu standardne krivulje. Standardna krivulja dobivena je razrjeđivanjem sintetičke IAA (Sigma Aldrich, SAD) u NB mediju u koncentracijama:

- 5 µg ml<sup>-1</sup>
- 10 µg ml<sup>-1</sup>
- 20 µg ml<sup>-1</sup>
- 50 µg ml<sup>-1</sup>
- 100 µg ml<sup>-1</sup>

U 1 ml svake pojedinačno razrjeđene IAA dodano je 2 ml Salkowski reagensa. Potom se izvršila inkubacija od 25 minuta na sobnoj temperaturi te je izmjerena apsorbacija na 530 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije uspoređene su na kraju s vrijednostima standardne krivulje IAA, a sintetizirana IAA izražena je u µg ml<sup>-1</sup>.

### 3.6.1.2. Otapanje fosfata

Sposobnost izolata da otapaju fosfate utvrđena je nanošenjem 15 µl prekončne bakterijske kulture na Pikovskayas hranjivu podlogu (tablica 22).

Tablica 22. Sastav Pikovskayas hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
Dekstroza	10.0 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	0.5 g	BioLife
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5.0 g	VWR Chemicals
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g	VWR Chemicals
KCl	0.2 g	VWR Chemicals
MgSO <sub>4</sub>	0.1 g	VWR Chemicals
MnSO <sub>4</sub>	0.0001 g	VWR Chemicals
FeSO <sub>4</sub>	0.0001 g	VWR Chemicals
Agar	15.0 g	BioLife
Destilirana voda	1000 ml	

Izolati su potom inkubirani 5 dana na 28°C nakon čega su očitani rezultati. Formirana čista zone oko bakterijske kolonije ukazivala je na sposobnost solubilizacije fosfata (+). Suprotno tome, sojevi bez formirane čiste zone oko svoje kolonije bili su negativni (-) na provedeni test.

### 3.6.2. *In vitro* mehanizmi stimulacije biljnog rasta – indirektni mehanizmi

#### 3.6.2.1. Sposobnost sinteze litičkih enzima

Brojne rizobakterije uključujući i rizobije imaju sposobnost sinteze litičkih enzima čija je glavna zadaća zaštita od patogenih mikroorganizama. Litički enzimi dovode do degradacije stanične stijenke patogenih mikroorganizama i na taj način sudjeluju u zaštiti biljaka. U ovom istraživanju provedeno je ispitivanje sposobnosti sinteze proteaze i amilaze.

Sposobnost sinteze proteaze ispitana je na SMA mediju (Skim Milk Agar) čiji je sastav naveden u tablici 25 (Chaiharn i sur., 2008).

Tablica 25. Sastav SMA (Skim Milk Agar) hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
Kazein	5.0 g	<i>VWR Chemicals</i>
Kvasni ekstrakt	2.5 g	<i>BioLife</i>
Dekstroza	1.0 g	<i>VWR Chemicals</i>
Mlijeko u prahu	28.0 g	<i>VWR Chemicals</i>
Agar	15.0 g	<i>BioLife</i>
Destilirana voda	1000 ml	

Naime, 15 µl prekonocne tekuće bakterijske kulture svakog pojedinog izolata preneseno je na SMA hranjivu podlogu i inkubirano 48 h na 28° C. Izolati koji su imali sposobnost sinteze proteaze formirali su čiste zone oko svojih kolonija što je označeno (+), dok izolati koji nisu imali sposobnost označeni su (-).

Sposobnost sinteze amilaze ispitana je na škrobnom agaru čiji je sastav naveden u tablici 26.

Tablica 26. Sastav škrobne hranjive podloge.

Sastav	Količina	Proizvođač
Mesni ekstrakt	3.0 g	<i>VWR Chemicals</i>
Pepton	5.0 g	<i>VWR Chemicals</i>
Škrob	2.0 g	
Agar	15.0 g	<i>BioLife</i>
Destilirana voda	1000 ml	

Po 15 µl tekuće bakterijske kulture svakog izolata preneseno je na škrobni agar te inkubirano 48 h na 28° C. Nakon inkubacije, podloge s izraslim kolonijama su prelivene otopinom lugola. Time je došlo do reakcije joda iz lugolne otopine te škroba iz škrobne hranjive podloge, što je dovelo do formiranja čistih zona oko kolonija koje imaju sposobnost sinteze amilaze (+). Kolonije koje nisu formirale čiste zone označene su (-).

### 3.6.2.2. Sposobnost sinteze egzopolisaharida

Sposobnost sinteze egzopolisaharida utvrđena je modificiranom metodom po Quarshi i Sabri (2011). Po 200  $\mu$ l prekonoćne tekuće bakterijske kulture svakog soja inokulirano je u 50 ml Nutrient Broth hranjive podloge (tablica 20) te inkubirano 5 dana na 28°C uz miješanje od 150 rpm-a (Orbital Shaker-Incubator, ES-20, BioSan). Nakon inkubacije u supernatant koji je dobiven centrifugiranjem na 9000 rpm-a (Nuve, NF 800R) u trajanju od 10 minuta dodan je prethodno ohlađeni aceton u omjeru 3:1 (Shekhar i sur., 2016). Ukoliko je došlo do formiranja prstena na vrhu epruvete test se smatrao pozitivnim (+), dok je izostanak prstena ukazivao na negativan test (-).



## 3.7. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija

### 3.7.1. Vegetacijski pokus

U cilju utvrđivanja tolerantnosti na sušu i procjenu simbiozne učinkovitosti autohtonih sojeva u proljeće 2018. godine u plasteniku Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu postavljen je dvofaktorijski pokus (2 x 13) prema slučajnom bloknom rasporedu u tri ponavljanja.

Budući da se radilo o dvofaktorijskom pokusu jedan od faktora bila je vlaga, dok je drugi faktor uključivao autohtone sojeve rizobija.

Faktor vlaga uključivao je dva režima navodnjavanja (optimalni uvjeti i suša). Mlade biljke su optimalno navodnjavane do pojave trećeg nodija (V3 stadij). Količina vode u supstratu mjerila se koristeći senzor vlažnosti tla (Delta-T, SM150T, Engleska). Primjenjivana su dva različita tretmana navodnjavanja:

1. optimalna količina vode (36 % vlažnost supstrata) i
2. tretman suše – 50 % od optimalnog (18% vlažnosti supstrata)

Drugi faktor bili su sojevi: 12 autohtonih sojeva odabranih iz grupa dobivenih temeljem RAPD analize i *in vitro* ispitivanja tolerantnosti na sušu te referentni soj 344 (*B. japonicum*). U pokus je uključena i negativna (nebakterizirana) kontrola (0).

U pokusu je korišteno sjeme sorte Lucija. Riječ je o vrlo ranoj sorti soje (00-0) koja ima visoki udio mahuna s 4 zrna. Karakteristična je po tome što dobro podnosi stres izazvan visokim temperaturama u fazi oplodnje i nalijevanja zrna. Cvijetovi su ljubičaste boje, dok je biljka srednje visine. Pokazuje visoku tolerantnost na polijeganje te zadovoljavajuću tolerantnost na bolesti. Potencijal rodosti joj je iznad 4 t/ha. Zrno sadrži 42 % proteina te 21-23 % ulja.



Slika 30. Sjeme sorte Lucija.

Izvor: <https://www.poljinis.hr/proizvodi-usluge/soja-suncokret/soja/lucija-i8/>

Za pripremu inokuluma za vegetacijski pokus, čiste bakterijske kulture svakog soja umnožene su u 120 ml tekuće hranjive podloge (tablica 25). Sojevi su potom rasli 7 dana na 28 °C kako bi se postigao broj stanica  $10^9$  CFU/ml.

Tablica 25. 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	VWR Chemicals
$MnSO_4$	0,01 g	VWR Chemicals
$Na_2B_4O_7$	u tragu	VWR Chemicals
$Na_2MoO_4$	u tragu	VWR Chemicals
D – manitol	10, 0 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	50 ml	BioLife
Bromthymol plavo	1,0 ml	Alfa Aesar
Destilirana voda	950 ml	

Sjeme sorte Lucija površinski je dezinficirano prema Somasegaran i Hoben (1994) prema kojem je sjeme uranjanjo 1 minutu u 96 % etanol, potom 15 minuta u 3 % otopinu natrijeva hipoklorita. Na kraju je isprano u nekoliko serija sterilne vode.

Vegetacijske posude i vermikulit (Agra-vermiculite, Pull Rhenen, Nizozemska) koji je služio kao supstrat u vegetacijskom pokusu, sterilizirani su u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju na Institutu Ruđer Bošković. Sterilizacija je izvršena panoramskim uređajem s  $^{60}\text{Co}$  izvorom gama zračenja (Slika 31).



Slika 31. Panoramski uređaj s  $^{60}\text{Co}$  izvorom gama zračenja.

Izvor: <https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-kemiju-materijala/Laboratorij-za-radijacijsku-kemiju-i-dozimetriju/Usluge/Co-60-usluge-ozracivanja-na-panoramskom-izvoru-gama-zracenja>

Vegetacijske posude su potom napunjene sterilnim vermikulitom u koje je posijano sjeme soje bakterizirano s po 1 ml bakterijske kulture po sjemenki, a potom je svaka posuda još dodatno prekrivena slojem vermikulita (slika 32).



Slika 32. Vegetacijski pokus u plateniku.

Tijekom vegetacije biljke su zalijevane bezdušičnom hranjivom otopinom čiji je sastav naveden u tablici 26 (Macary, 1989).

Tablica 26. Sastav hranjive otopine za ishranu biljaka tijekom vegetacije.

Reagens	Stock otopina g/L	Količina za 1L hranjive otopine	Konačna koncentracija pojedinog elementa ( $\mu\text{g/ml}$ )
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,1	1ml	P: 62
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	174,2	1ml	K. 156,5
$\text{K}_2\text{SO}_4$	87,1	1ml	Ca: 40
$\text{CaCl}_2$	73,5	2ml	Mg: 12,3
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	123,2	1ml	S: 32, 2

Zalijevanje kontrolnih biljaka nastavljeno je do maksimalnog kapaciteta u kojem je sadržaj vode u supstratu iznosio 36 %, a tretman suše izazvan je prekidanjem navodnjavanja (V3 stadij) dok se sadržaj vode u supstratu nije spustio na 50 % od optimalnog vodnog kapaciteta (18 %). Količina vode u supstratu mjerena je senzorom vlažnosti tla (SM150T, Delta-T Devices, UK) kroz cijeli period trajanja vegetacijskog pokusa (slika 33).



Slika 33. Mjerenje sadržaja vode u supstratu.

Tablica 27. Shema pokusa.

Kombinacija Vlaga x Soj	Faktor Vlaga	Faktor Soj
1	S <sub>o</sub>	0
2	S <sub>o</sub>	<i>B. japonicum</i> 344
3	S <sub>o</sub>	S1/5
4	S <sub>o</sub>	S3/5
5	S <sub>o</sub>	S16/5
6	S <sub>o</sub>	S18/4
7	S <sub>o</sub>	S21/5
8	S <sub>o</sub>	25/2
9	S <sub>o</sub>	S26/7
10	S <sub>o</sub>	S27
11	S <sub>o</sub>	S31
12	S <sub>o</sub>	S32
13	S <sub>o</sub>	S37
14	S <sub>o</sub>	S44
15	S	0
16	S	<i>B. japonicum</i> 344
17	S	S1/5
18	S	S3/5
19	S	S16/5
20	S	S18/4
21	S	S21/5
22	S	S25/2
23	S	S26/7
24	S	S27
25	S	S31
26	S	S32
27	S	S37
28	S	S44

\*S<sub>o</sub>- optimalni uvjeti; \*\*S- suša

### 3.7.2. Indeks sadržaja klorofila u listu

Sadržaj klorofila u listu jedan od značajnijih parametara povezanih sa sušom. Mjerenje količine klorofila u listu od izuzetne je važnosti za razumijevanje procesa fotosinteze u uvjetima s ograničenom količinom vode.

U fazi pune cvatnje koja je nastupila šest tjedana nakon sjetve, koristeći klorofilmetar CCM-200 (Opti-Sciences, SAD) izmjeren je indeks (CCI) sadržaja klorofila u listovima biljaka soje (slika 34).



Slika 34. Mjerenje indeksa sadržaja klorofila u biljci pomoću klorofilmetra.

Mjerenje je provedeno tako što se list stavi u komoru za detektiranje lista u kojoj mjerač emitira svjetlost dviju dioda, pri čemu jedna emitira crvenu svjetlost (660 nm), a druga infracrvenu (930 nm). Rezultati se iskazuju u CCM-200 jedinicama. Na svakom uzorkovanom listu obavljena su tri očitavanja CCI-a, čiji je prosjek predstavljao indeks sadržaja klorofila uzorkovanog lista.

### 3.7.3. Broj kvržica, masa suhe tvari kvržica i suhe tvari biljke

Kao i kod prethodno spomenute metode, u fazi pune cvatnje sakupljene su biljke soje. U cilju utvrđivanja simbiozne učinkovitosti svakog pojedinog soja, sa korijenja biljaka sakupljene su kvržice. Kvržice su prvo prebrojane, nakon čega se odredila njihova masa sušenjem do konstantne težine. Također je određena i masa nadzemnog dijela biljke sušenjem u sušioniku na 70 °C do postizanja konstantne težine. Iz dobivenih rezultata određen je prinos mase suhe tvari biljaka (g) i suhe tvari kvržica (mg/ biljci).

### 3.7.4. Sadržaj dušika u nadzemnom dijelu biljke

Sadržaj dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci) određena u analitičkom laboratoriju Zavoda za ishranu bilja Agronomskog fakulteta u Zagrebu metodom po Kjeldahlu (AOAC, 1995).

### 3.7.5. Statistička analiza

Na podacima dobivenim istraživanjem (indeks sadržaja klorofila u biljci (CCI), broj kvržica po biljci, masa suhe tvari biljaka (g), masa suhe tvari kvržica (mg/biljci) i količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci)) provedena je statistička analiza. U tu svrhu koristila se dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) slučajnog bloknog rasporeda (RCBD) dvofaktorijelnog pokusa (vlaga x soj). Svi dobiveni podaci obrađeni su korištenjem statističkog programskog paketa SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc. 2013. SAS® 9.4. Cary, NC, USA).

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Analize tla

Sa 29 lokacija na području Republike Hrvatske prikupljeni su uzorci tla iz oraničnog sloja (0-30 cm) u svrhu izolacije autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju soju. Fizikalne i kemijske analize napravljene su za prosječan uzorak svakog lokaliteta.

Fizikalne analize odnosile su se na određivanje mehaničkog sastava čestica tla (krupnog pijeska, sitnog pijeska, krupnog praha, sitnog praha i gline). Fizikalne analize pokazuju da 52% uzoraka ima teksturnu oznaku praškasto ilovaste teksture. Sedam uzoraka (S2, S3, S5, S7, S8, S12 i S37-S46) ima praškasto glinasto ilovastu teksturu, četiri uzorka (S22, S24, S25 i S27) teksturu praha, dok samo jedan uzorak (S11) ima kombinaciju praškasto ilovaste i praškasto glinasto ilovaste teksture. U tablici 28 navedene su fizikalne analize istraživanih tala. Za dva uzorka (S28-S36 i S48) nema podataka o mehaničkom sastavu čestica tla.

Kemijske analize pokazuju da uglavnom dominiraju kisela tla. Kod 59 % uzoraka izmjeren je pH u KCl-u < 6,02. Od toga je pet uzoraka jako kiselo (S15, S17, S18, S24 i S25). Jako kisela tla zastupljena su u Bjelovarsko-bilogorskoj i Koprivničko-križevačkoj županiji. Osam tala je kiselo (S3, S6, S16, S21, S22, S26, S27 i S31) te su ta tla zastupljena u Vukovarsko-srijemskoj, Požeško-slavonskoj i Koprivničko-križevačkoj županiji. Četiri tla su slabo kisela (S1, S2, S5 i S12) i ona su zastupljena na području Vukovarsko-srijemske županije. Neutralnih tala je bilo četiri (S7, S11, S33-S46 i S48) te su ona bila s područja Vukovarsko-srijemske, Koprivničko-križevačke i Istarske županije. Alkaličnih tala je osam (S5, S8, S9, S10, S23, S47, S49 i S50) i ona su zastupljena u četiri županije.

U pogledu sadržaja humusa 19 uzoraka tala je slabo humozno, 10 uzoraka dobro humozno. Rezultati sadržaja ukupnog dušika pokazuju da su dva uzorka S49 (Vrana, Zadarska županija) i S50 (Sinjsko polje, Splitsko-dalmatinska županija) bili vrlo bogato opskrbljeni dušikom. Jedan uzorak S23 (Kloštar Vojakovački, Koprivničko-križevačka županija) bio je bogato opskrbljen dušikom, dok je uzorak S18 (Hercegovac, Bjelovarsko-bilogorska županija) imao umjerenu količinu dušika. Ostali uzorci tala bili su dobro opskrbljeni dušikom.

Kemijske analize istraživanih tala pokazuju različitu opskrbljenost fosforom. Jedan uzorak (S23) s područja Koprivničko-križevačke županije vrlo slabo je opskrbljen, osam uzoraka je slabo opskrbljeno, devet uzoraka dobro, pet uzoraka bogato i četiri uzorka vrlo



bogato opskrbljena. Što se tiče kalija najveći dio istraživanih tala (njih 12) bogato je opskrbljeno kalijem, njih tri (S10, S12 i S47) vrlo bogato, 11 uzoraka dobro, dok je samo tri uzorka slabo opskrbljena kalijem. Sva tri uzorka pripadaju području Koprivničko-križevačke županije. Kemijske analize uzorkovanih tala prikazane su u tablicama 29 i 30.

Tablica 28. Fizikalne karakteristike 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	
S1	VSŽ, Sopot	1,0	3,8	35,8	32,9	26,5	PrI
S2	VSŽ, Andrijaševci	0,6	2,6	32,7	34,2	29,9	PrGI
S3	VSŽ, Retkovci	0,3	0,9	34,4	34,8	29,6	PrGI
S4	VSŽ, Privlaka	0,5	0,9	38,4	36,7	24,5	PrI
S5	VSŽ, Komletinci I	0,7	0,9	28,8	35,0	34,6	PrGI
S6	VSŽ, Komletinci II	0,2	1,0	38,7	34,2	25,9	PrI
S7	VSŽ, Bobota I	0,1	1,5	37,9	31,5	29,0	PrGI
S8	VSŽ, Bobota II	0,3	1,1	35,1	31,2	32,3	PrGI
S9	VSŽ, Bobota III	0,5	3,2	37,9	31,6	26,8	PrI
S10	VSŽ, Bobota IV	0,5	3,0	37,7	32,4	26,4	PrI
S11	VSŽ, Orlovača I	0,2	1,5	39,5	31,8	27,0	PrI-PrGI
S12	VSŽ, Orlovača II	0,5	1,1	36,8	32,2	29,4	PrGI
S28-S36	PSŽ, Kutjevo	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S21	KKŽ, Križevci	1,4	3,3	46,2	32,9	16,2	PrI
S22	KKŽ, Ivanec Križevački	0,7	4,3	52,3	32,5	10,2	Pr
S23	KKŽ, Osijek Vojakovački	1,2	3,4	28,7	48,7	18,0	PrI
S24	KKŽ, Sveta Helena	0,4	3,4	54,9	31,1	10,2	Pr
S25	KKŽ, Bočkovec	0,3	2,5	46,5	38,7	12,0	Pr
S26	KKŽ, Gregurovec I	0,4	3,7	52,1	29,5	14,3	PrI
S27	KKŽ, Gregurovec II	0,8	2,5	53,1	32,4	11,2	Pr
S37-S46	KKŽ, Gola	0,5	1,8	9,1	60,4	28,2	PrGI
S15	BBŽ, Mlinski Vinogradi I	0,4	2,8	48,0	29,9	18,0	PrI
S16	BBŽ, Mlinski vinogradi II	0,5	3,7	50,4	29,3	16,1	PrI
S17	BBŽ, Mlinski vinogradi III	0,3	3,9	50,0	26,9	18,9	PrI
S18	BBŽ, Hercegovac	1,1	3,8	50,8	27,5	16,8	PrI
S47	IŽ, Novigrad	0	1	1	46	52	PrG
S48	IŽ, Poreč	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S49	ZŽ, Vrana	3,1	17,0	21,2	43,4	15,3	PrI
S50	SDŽ, Sinjsko polje	1,3	2,1	25,1	27,9	43,6	PrG

\* PrI: praškasta ilovača, PrGI: praškasto glinasta ilovača, Pr: prah, PrG: praškasta glina, NA: not analyzed

Tablica 29: Kemijske karakteristike istraživanih tala: sadržaj humusa i reakcija tla.

Oznaka uzorka	Lokacija	Sadržaj humusa		pH (reakcija tla)		
		%	Interpretacija	H <sub>2</sub> O	KCl	Interpretacija
S1	VSŽ, Sopot	2,17	slabo humozno	6,93	5,62	slabo kiselo
S2	VSŽ, Andrijaševci	2,38	slabo humozno	7,11	6,02	slabo kiselo
S3	VSŽ, Retkovci	2,33	slabo humozno	6,41	4,80	kiselo
S4	VSŽ, Privlaka	1,99	slabo humozno	6,77	5,55	slabo kiselo
S5	VSŽ, Komletinci I	2,72	slabo humozno	8,16	7,28	alkalično
S6	VSŽ, Komletinci II	2,07	slabo humozno	6,33	4,80	kiselo
S7	VSŽ, Bobota I	3,03	dosta humozno	7,94	7,14	neutralno
S8	VSŽ, Bobota II	3,39	dosta humozno	8,07	7,34	alkalično
S9	VSŽ, Bobota III	3,26	dosta humozno	8,22	7,59	alkalično
S10	VSŽ, Bobota IV	3,36	dosta humozno	8,07	7,48	alkalično
S11	VSŽ, Orlovača I	2,82	slabo humozno	7,61	7,09	neutralno
S12	VSŽ, Orlovača II	3,34	dosta humozno	6,83	5,80	slabo kiselo
S27-36	PSŽ, Kutjevo	2,14	slabo humozno	5,15	4,37	kiselo
S20	KKŽ, Križevci	2,38	slabo humozno	6,33	5,09	kiselo
S21	KKŽ, Ivanec Križevački	2,46	slabo humozno	6,06	4,88	kiselo
S22	KKŽ, Kloštar Vojakovački	3,67	dosta humozno	7,91	7,24	alkalično
S23	KKŽ, Sveta Helena	2,25	slabo humozno	5,59	4,46	jako kiselo
S24	KKŽ, Bočkovec	3,13	dosta humozno	5,81	4,41	jako kiselo
S25	KKŽ, Gregurovec	2,15	slabo humozno	5,93	4,75	kiselo
S26	KKŽ, Gregurovec II	2,09	slabo humozno	5,96	4,79	kiselo
S37-46	KKŽ, Gola	2,76	slabo humozno	7,87	7,36	neutralno
S15	BBŽ, Mlinski vingradi I	2,17	slabo humozno	5,10	3,98	jako kiselo
S16	BBŽ, Mlinski vinogradi II	2,51	slabo humozno	6,00	4,64	kiselo
S17	BBŽ, Mlinski vinogradi III	1,81	slabo humozno	5,55	4,26	jako kiselo
S18	BBŽ, Hercegovac	1,68	slabo humozno	5,77	4,38	jako kiselo
S47	IŽ, Novigrad	3,93	dosta humozno	8,08	7,53	alkalično
S48	IŽ, Poreč	2,28	slabo humozno	7,91	7,32	neutralno
S49	ZŽ, Vrana	7,28	dosta humozno	8,05	7,69	alkalično
S50	SDŽ, Sinjsko polje	4,76	dosta humozno	8,10	7,42	alkalično

Tablica 30. Kemijske karakteristike istraživanih tala: sadržaj fiziološki aktivnog kalija i fosfora te sadržaj ukupnog dušika.

Uzorak	Lokacija	Sadržaj ukupnog dušika		Sadržaj P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		Sadržaj K <sub>2</sub> O	
		%	Interpretacija opskrbljenosti	mg/100 g tla	Interpretacija opskrbljenosti	mg/100 g tla	Interpretacija opskrbljenosti
S1	VSŽ	0,12	dobro	23,89	dobro	21,0	dobro
S2	VSŽ	0,13	dobro	26,0	bogato	26,6	bogato
S3	VSŽ	0,14	dobro	24,92	dobro	24,0	dobro
S4	VSŽ	0,11	dobro	22,91	dobro	22,0	dobro
S5	VSŽ	0,15	dobro	10,32	slabo	16,7	dobro
S7	VSŽ	0,12	dobro	17,19	dobro	29,5	bogato
S7	VSŽ	0,17	dobro	18,65	dobro	28,0	bogato
S8	VSŽ	0,19	dobro	21,98	dobro	34,0	bogato
S9	VSŽ	0,19	dobro	51,18	vrlo bogato	26,5	bogato
S10	VSŽ	0,18	dobro	63,80	vrlo bogato	>40,0	vrlo bogato
S11	VSŽ	0,15	dobro	15,83	dobro	26,0	bogato
S12	VSŽ	0,17	dobro	56,45	vrlo bogato	>40,0	vrlo bogato
S27-S36	PŽ	0,12	dobro	11,65	slabo	23,19	dobro
S15	BBŽ	0,14	dobro	17,39	dobro	23,5	dobro
S16	BBŽ	0,14	dobro	19,41	dobro	30,0	bogato
S17	BBŽ	0,11	dobro	27,61	bogato	26,0	bogato
S18	BBŽ	0,10	umjereno	27,61	bogato	21,0	dobro
S20	KKŽ	0,15	dobro	56,90	vrlo bogato	18,4	dobro
S21	KKŽ	0,14	dobro	37,30	bogato	19,5	dobro
S22	KKŽ	0,22	bogato	4,50	vrlo slabo	13,5	slabo
S23	KKŽ	0,14	dobro	8,21	slabo	17,5	dobro
S24	KKŽ	0,20	dobro	3,69	slabo	12,2	slabo
S25	KKŽ	0,12	dobro	50,57	vrlo bogato	27,5	bogato
S26	KKŽ	0,12	dobro	27,61	bogato	27,0	bogato
S37-S46	KKŽ	0,14	dobro	11,46	slabo	11,90	slabo
S47	IŽ	0,18	dobro	1,85	slabo	>40,0	vrlo bogato
S48	IŽ	0,12	dobro	35,48	bogato	32,42	bogato
S49	ZŽ	0,51	vrlo bogato	9,52	slabo	39,58	bogato
S50	SDŽ	0,23	vrlo bogato	7,34	slabo	15,64	dobro

## 4.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija

U fazi pune cvatnje koja je nastupila šest tjedana nakon sjetve, kvržice za izolaciju autohtonih sojeva rizobija prikupljene su sa korijena soje sorte Lucija koja je posijana u lonce sa 29 prikupljenih uzoraka tla. Kod osam uzoraka nije došlo do razvoja kvržica na korijenu soje. To se odnosilo na uzorke S5 (VSŽ, Komletinci I), S8 (VSŽ, Bobota II ), S20 (KKŽ, Križevci) S22 (KKŽ, Ivanec Križevački ), S47 (Novigrad), S48 (Poreč), S49 (Vrana, Biograd) te uzorak S50 (Sinjsko polje).

Na osnovu morfoloških svojstava kolonija i bakterijskih stanica tipičnih za rizobije odabrano je ukupno 60 izolata. Izolati dobiveni iz prikupljenih uzoraka tla kao i njihovo podrijetlo navadeni su u tablici 31.

## 4.3. Test autentičnosti izolata

Nakon provedenog testa autentičnosti dobivenih izolata, u fazi pune cvatnje utvrđeno je prisustvo kvržica kod 56 biljaka. Kod četiri uzorka nije došlo do razvoja kvržica na korijenu soje. To se odnosi na uzorke S7/4 i 7/5 za koje je daljnjom molekularnom karakterizacijom utvrđeno da pripadaju rodu *Microbacterium*, kao i uzorcima S9/2 i S9/4 koji pripadaju vrsti *Agrobacterium tumefaciens* koji nemaju sposobnost nodulacije.



Slika 35. Pozitivan rezultat testa autentičnosti dva izolata koji se očituje pojavom kvržica na korijenu soje.

Tablica 31. Autohtoni sojevi rizobija izolirani iz kvržica formiranih na korijenu soje.

Podrijetlo autohtonih sojeva		Oznaka izolata	Test autentičnosti
Lokacija	Oznaka lokacije		
VSŽ, Sopot	S1	S1/1, S1/5	+
VSŽ, Andrijaševci	S2	S2/1, S2/5	+
VSŽ, Retkovci	S3	S3/1, S3/5	+
VSŽ, Privlaka	S4	S4/6, S4/7	+
VSŽ, Komletinci II	S6	S6/2, S6/4	+
VSŽ, Bobota I	S7	S7/4, S7/5	-
VSŽ, Bobota III	S9	S9/2, S9/4	-
VSŽ, Bobota IV	S10	S10/3, S10/8	+
VSŽ, Orlovača I	S11	S11/1, S11/5	+
VSŽ, Orlovača II	S12	S12/4, S12/7	+
BBŽ, Mlinski vinogradi I	S15	S15/2, S15/3, S15/4	+
BBŽ, Mlinski vinogradi II	S16	S16/2, S16/5	+
BBŽ, Mlinski vinogradi III	S17	S17/1, S17/3	+
BBŽ, Hercegovac	S18	S18/1, S18/4	+
KKŽ, Križevci	S21	S21/4, S21/5	+
KKŽ, Kloštar Vojakovački	S23	S23/3, S23/6	+
KKŽ, Sveta Helena	S24	S24/2, S24/6	+
KKŽ, Bočkovec	S25	S25/2, S25/3	+
KKŽ, Gregurovec	S26	S26/1, S26/7	+
PSŽ, Kutjevo	S27- S36	S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S34, S35, S36	+
KKŽ, Gola	S37-S46	S37, S38, S39, S40, S41, S42, S43, S44, S45, S46	+

## 4.4. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija

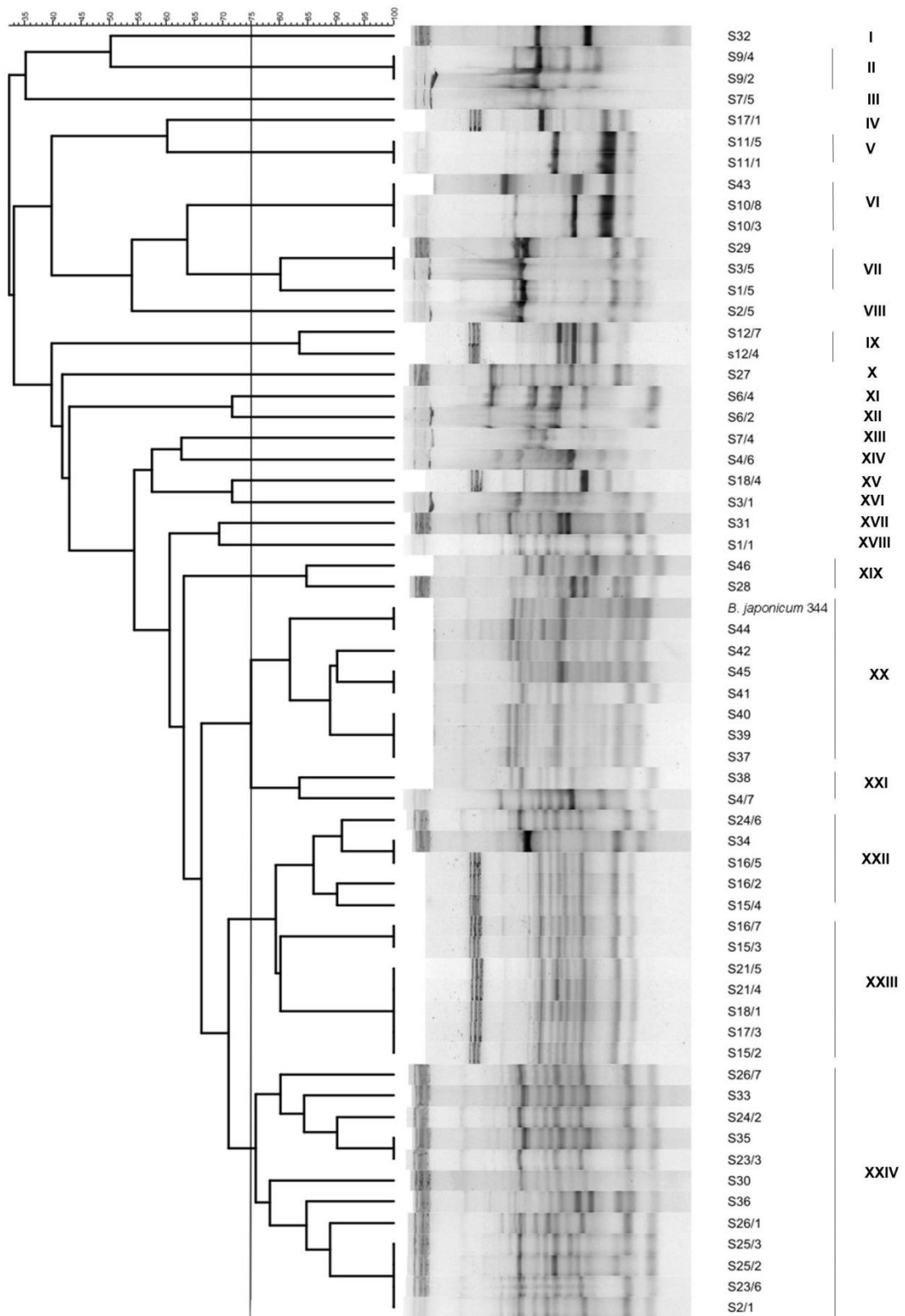
### 4.4.1. RAPD analiza

U cilju početnog grupiranja dobivenih sojeva provedena je RAPD analiza korištenjem tri oligonukleotidne početnice (P1, P2, P3). Tako su za 60 istraživanih sojeva dobivena 42 RAPD profila na temelju kojih su sojevi grupirani u skupine sa sličnošću manjom od 75 %.

Dobiveni RAPD profili međusobno su se razlikovali u broju i veličini polimorfnih fragmenata što ukazuje na visoku raznolikost između istraživanih sojeva. Raznolikost istraživanih sojeva kao i veličina polimorfnih fragmenata prikazana je na dendrogramu (slika 36).

Najveća skupina izolata je pod brojem XXIV i uključuje 12 sojeva koji su izoliranih iz različitih uzoraka tala, skupina XX uključuje osam sojeva, skupina XXIII sedam sojeva, skupina XXII pet, dok ostale skupine uključuju nešto manje izolata. Neki RAPD profili predstavljeni su samo s jednim sojem i oni se nazivaju linije.

Iz svake skupine je odabrano po nekoliko reprezentativanih sojeva za daljnju identifikaciju temeljem analize gena što je prikazano u tablici 32.



Slika 36. RAPD profili dobiveni korištenjem početnica P1, P2 i P3 i označene skupine sojeva (sličnost < 75 %).



Tablica 32. Sojevi grupirani prema sličnosti RAPD profila i sojevi odabrani za analizu gena.

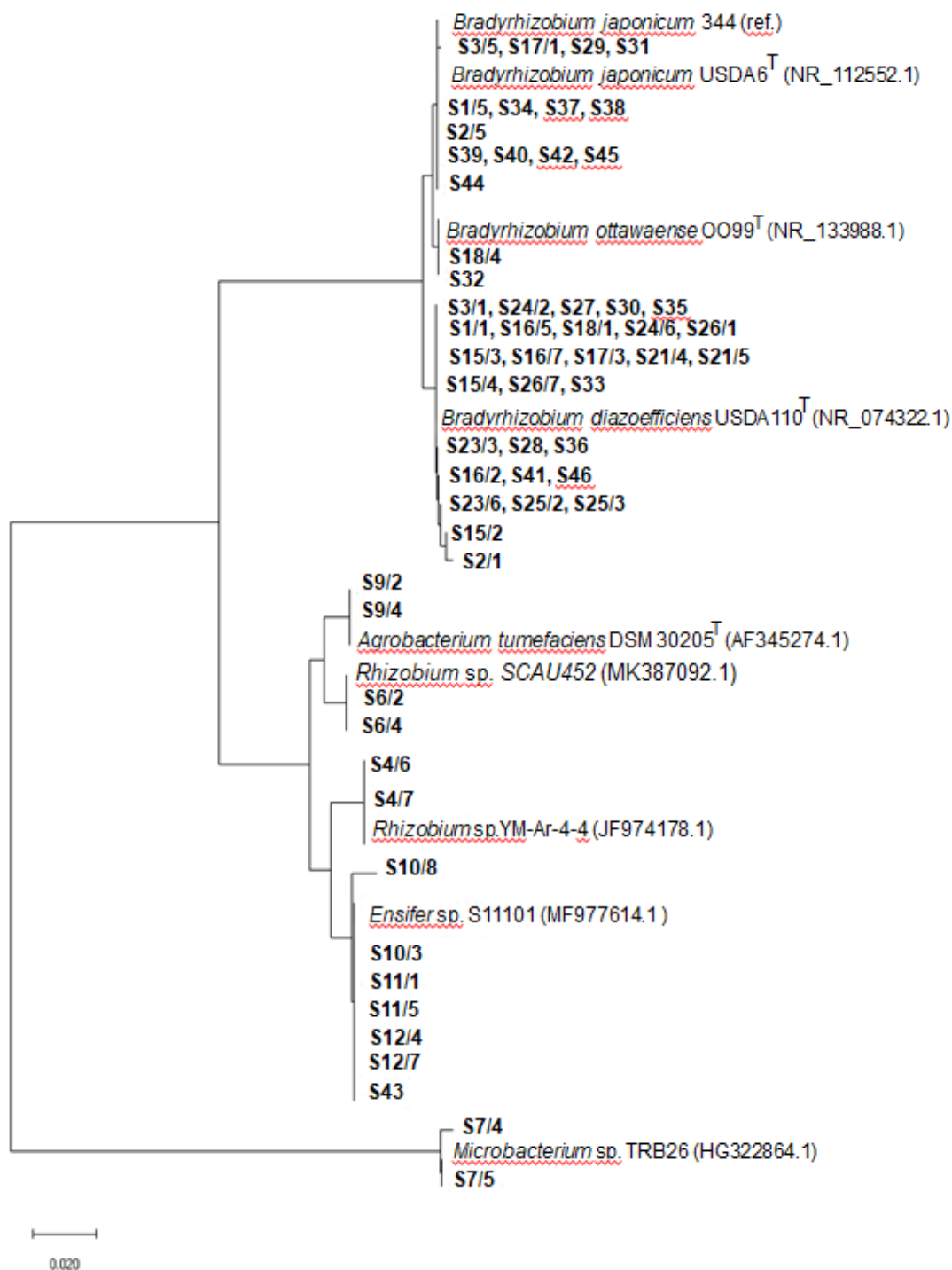
RAPD skupina	Sojevi koji pripadaju pojedinoj skupini na osnovu RAPD profila	Reprezentativni sojevi koji su odabrani za daljnu analizu
I	S32	S32
II	S9/2, S9/4	
II	S7/5	
IV	S17/1	
V	S11/1, S11/5	
VI	S10/8, S10/3, S43	
VII	S1/5, S3/5, S29	S1/5, S3/5
VIII	S2/5	
IX	S12/4, S12/7	
X	S27	S27
XI	S6/4	
XII	S6/2	
XIII	S7/4	
XIV	S4/6	
XV	S18/4	S18/4
XVI	S3/1	
XVII	S31	S31
XVIII	S1/1	
XIX	S46, S28	
XX	S37, S39, S40, S41, S42, S44, S45, <i>B. japonicum</i> 344	S37, S44, <i>B. japonicum</i> 344
XXI	S4/7, S38	
XXII	S15/4, S16/2, S16/5, S24/6, S34	S16/5
XXIII	S15/, S15/3, S16/7, S17/3, S18/1, S21/4, S21/5	S21/5
XXIV	S2/1, S23/3, S23/6, S24/2, S25/2, S25/3, S26/1, S26/7, S30, S33, S35, S36	S25/2, S26/7

#### 4.4.2. Analiza sekvenci 16S rRNA gena

Kod svih 60 izoliranih sojeva amplificiran je i sekvenciran 16S rRNA gen s ciljem utvrđivanja vrste svakog pojedinog izolata. U analizu je bio uključen i referentni soj *B. japonicum* 344.

Nakon što su dobivene sekvence pročišćene i poravnate koristeći Staden software, uspoređene su s genima u GenBank pomoću programa BLAST. Nakon usporedbe dobivenih sekvenci 16S rRNA gena svih 60 izolata sa sekvencama iz GenBank-a dobiveni su rezultati koji pokazuju da 75 % izolata pripada sporosastućem rodu *Bradyrhizobium*, dok preostalih 25 % otpada na brzorastuće rodove *Ensifer*, *Microbacterium* i *Rhizobium*.

Najveći broj sojeva (njih 20) pripada vrsti *B. ottawaense*, 14 sojeva pripadalo je vrsti *B. japonicum*, dok je preostalih 11 sojeva pripadalo vrsti *B. diazoefficiens*. Dva soja (S9/2 i S9/4) pripadao je vrsti *Agrobacterium tumefaciens*, dok se za ostale sojeve nije mogla utvrditi točna pripadnost vrsti već samo pojedinim rodovima. Filogenetsko stablo dobiveno na osnovu sekvenci 16S rRNA prikazano je na slici 37.



Slika 37. Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu sekvenci 16S rRNA gena. Evolucijske udaljenosti su izračunate koristeći Tamura 3 parametarsku metodu.

#### 4.4.3. Analiza sekvenci *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena

U cilju prevladavanja ograničenja 16S rRNA gena, analiza sekvenci više lokusa (MLSA), smatra se točnijom metodom za proučavanje blisko povezanih vrsta. Konstitutivni geni prikladniji su markeri za filogenetsku analizu rizobija, budući da imaju višu divergenciju sekvenci u odnosu na 16S rRNA gene.

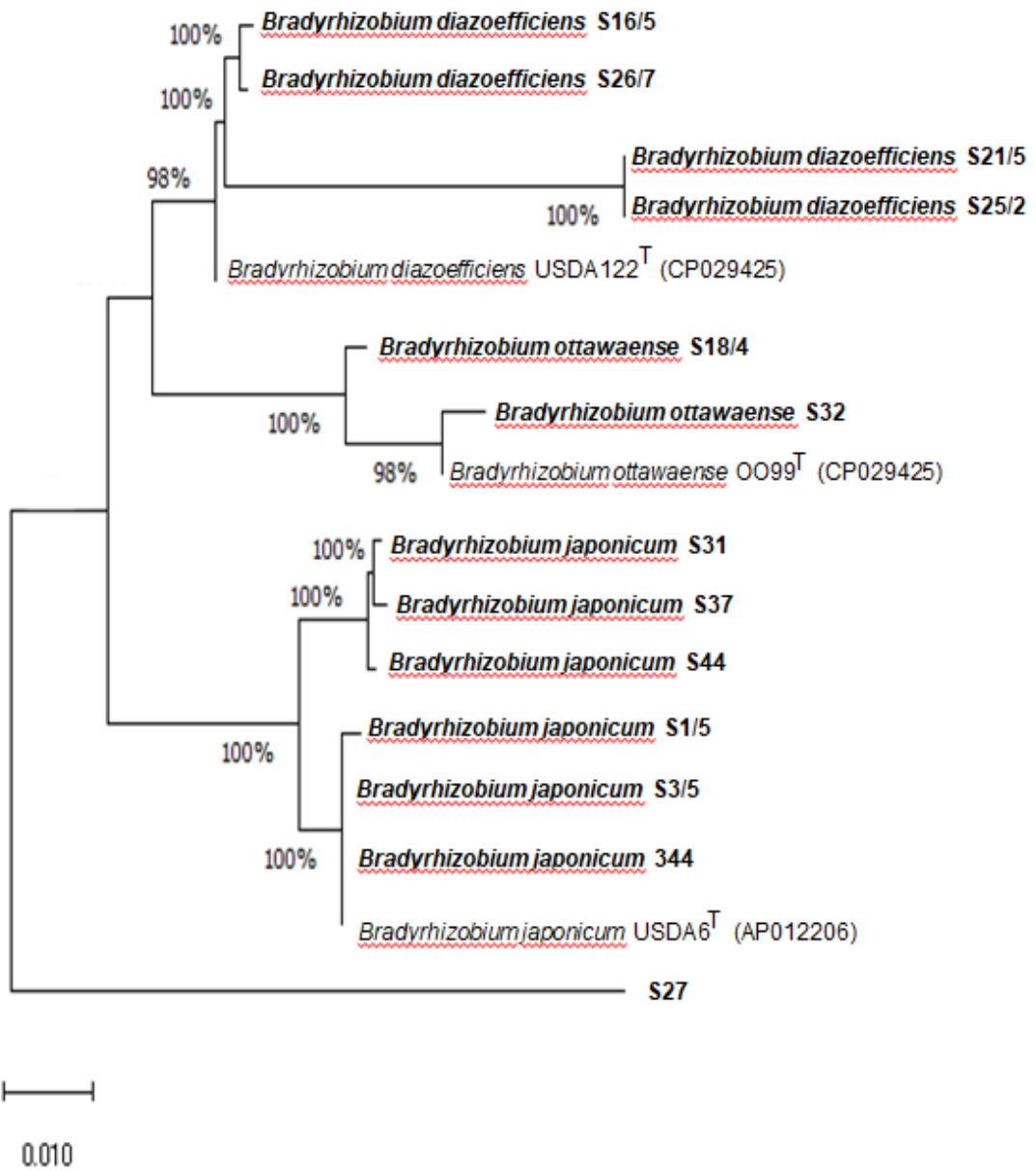
Rezultati provedene MLSA analize pokazuju da su sojevi grupirani slično kao i nakon analize 16S rRNA gena, izuzetak je par sojeva koji su pokazali pripadnost drugim vrstama.

Pet sojeva (S1/5, S3/5, S31, S37 i S44) pripadaju vrsti *B. japonicum* sa više od 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (AP012206) i referentnim sojem *B. japonicum* 344. Sojevi (S16/5, S21/5, S25/2 i S26/7) pripadaju vrsti *B. diazoefficiens* te su također pokazali preko 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. diazoefficiens* USDA 122<sup>T</sup> (CP029425). Nakon provedene MLSA analize sojevi S18/4 i S32 pokazali su pripadnost vrsti *B. ottawaense* sa više od 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. ottawaense* OO99<sup>T</sup> (CPO29425).

Tri soja (S16/5, S21/5, S26/7) koji su analizom 16S rRNA gena pokazali pripadnost vrsti *B. ottawaense*, provedenom MLSA analizom pokazuju pripadnost vrsti *B. diazoefficiens* s više od 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. diazoefficiens* USDA 122<sup>T</sup> (CP029425). Izuzetak je soj S27 koji je analizom 16S rRNA gena pokazao pripadnost *B. ottawaense*, dok se MLSA analizom ne može utvrditi kojoj točno vrsti pripada te kao takav tvori zasebnu skupinu. Moguće je da je soj S27 nova vrsta koja je jako bliska s tri vrste koje su identificirane u ovom istraživanju.

Tablica 33. Matrica sličnosti sekvenci istraživanih i tipskih sojeva najsirodnijih vrsta na temelju analize *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena. Sličnost je izračunata koristeći Tamura 3 parametarski model.

	<b>S1/5</b>	<b>S3/5</b>	<b>S16/5</b>	<b>S18/4</b>	<b>S21/5</b>	<b>S26/7</b>	<b>S27</b>	<b>S31</b>	<b>S32</b>	<b>S37</b>	<b>S44</b>	<i>B. japonicum</i> 344	<i>B. japonicum</i>	<i>B. diazoefficiens</i>	<i>B. ottawaense</i>	<b>S25/2</b>	
<b>S1/5</b>	100.00																
<b>S3/5</b>	99.96	99.96															
<b>S16/5</b>	99.95	99.95	99.97														
<b>S18/4</b>	99.92	99.92	99.96	99.93													
<b>S21/5</b>	99.96	99.96	100.00	99.97	99.96												
<b>S26/7</b>	99.90	99.90	99.91	99.90	99.87	99.91											
<b>S27</b>	99.98	99.99	99.96	99.95	99.92	99.96	99.89										
<b>S31</b>	99.94	99.94	99.96	99.98	99.92	99.96	99.89	99.94									
<b>S32</b>	99.98	99.98	99.95	99.95	99.92	99.95	99.90	100.00	99.96								
<b>S37</b>	99.98	99.99	99.95	99.95	99.92	99.96	99.89	100.00	99.94	100.00							
<b>S44</b>																	
<i>B. japonicum</i> 344	100.00	100.00	99.96	99.95	99.92	99.96	99.90	99.99	99.94	99.98	99.99						
<i>B. japonicum</i>	100.00	100.00	99.96	99.95	99.92	99.96	99.90	99.99	99.94	99.98	99.99	100.00					
<i>B. diazoefficiens</i>	99.96	99.96	100.00	99.97	99.96	100.00	99.91	99.96	99.96	99.96	99.96	99.96	99.96				
<i>B. ottawaense</i>	99.94	99.95	99.96	99.99	99.92	99.96	99.89	99.94	100.00	99.94	99.94	99.95	99.95	99.96			
<b>S25/2</b>	99.92	99.92	99.96	99.92	100.00	99.96	99.87	99.92	99.92	99.92	99.92	99.92	99.92	99.92	99.96	99.92	



Slika 38. Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su koristeći Tamura-Nei model.

#### 4.4.4. Analiza sekvenci simbioznog *nodC* i *nifH* gena

Nodulacijski gen *nodC* jedan je od najčešće korištenih filogenetskih markera za razlikovanje simbiovara te predstavlja ključnu ulogu u odabiru biljke domaćina.

Do danas je unutar roda *Bradyrhizobium* opisano osam simbiovara, a to su: *centrosemae*, *genistearum*, *glycinearum*, *phaseolarum*, *retamae*, *sierranevadense*, *tropici*, *vignae*.

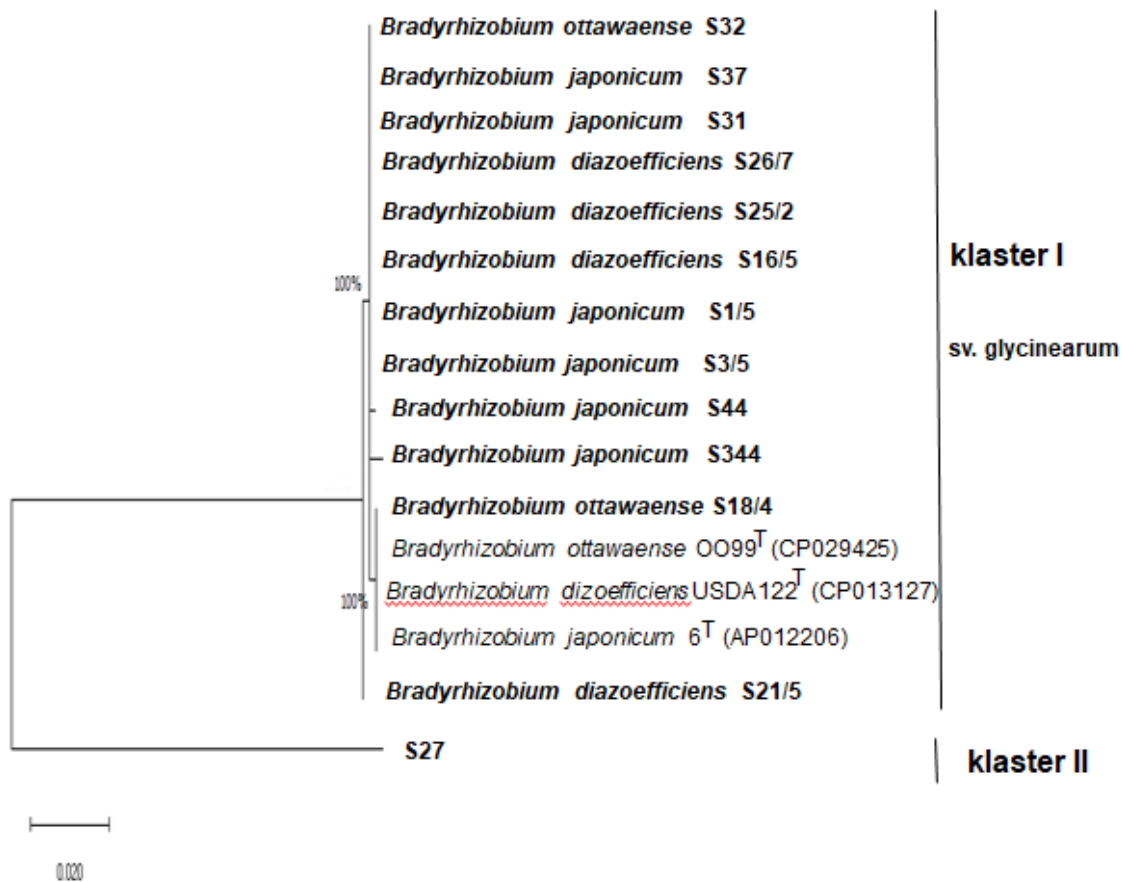
Filogenetsko stablo dobiveno analizom *nodC* gena pokazuje da su svi izolati grupirani u dva klastera. Svi sojevi osim S27 grupirani u klaster 1, skupa s tipskim sojevima te pripadaju simbiovaru *glycinearum*. Soj S27 zasebno je grupiran u klaster 2, što možda predstavlja novi simbiovar koji do sada nije opisan u literaturnim podacima (slika 39).

Sličnost svih izolata sa tipskim sojevima *B. japonicum*, *B. ottawaense* i *B. diazoefficiens* iznosi 100 %, izuzetak je soj S27 koji ima nešto manju sličnost što je i bilo za očekivati budući da ne pripada klasteru i simbiovaru *glycinearum*, već tvori zaseban klaster (tablica 34).

Tablica 34. Matrica sličnosti sekvenci istraživanih i tipskih sojeva najrodnijih vrsta na temelju analize *nodC* gena. Sličnost je izračunata koristeći Tamura 3 parametarski model.

	1/5	S3/5	S16/5	S18/4	S21/5	S25/2	S26/7	S27	S31	S32	S37	S44	<i>B. japonicum</i> 344	<i>B. japonicum</i>	<i>B. diazoefficiens</i>	<i>B. ottawaense</i>
<b>S1/5</b>	100.00															
<b>S3/5</b>	100.00	100.00														
<b>S16/5</b>	100.00	100.00	100.00													
<b>S18/4</b>	100.00	100.00	100.00	100.00												
<b>S21/5</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00											
<b>S25/2</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00										
<b>S26/7</b>	99.81	99.81	99.81	99.81	99.89	99.81	99.89									
<b>S27</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89								
<b>S31</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00							
<b>S32</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00						
<b>S37</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00	100.00					
<b>S44</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00	100.00	100.00				
<i>B. japonicum</i> 344	100.00	100.00	100.00	99.89	99.89	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00	100.00	99.99				
<i>B. japonicum</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99			
<i>B. diazoefficiens</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	100.00		
<i>B. ottawaense</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	100.00	100.00	





Slika 39. Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *nodC* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su koristeći Tamura-Nei model.

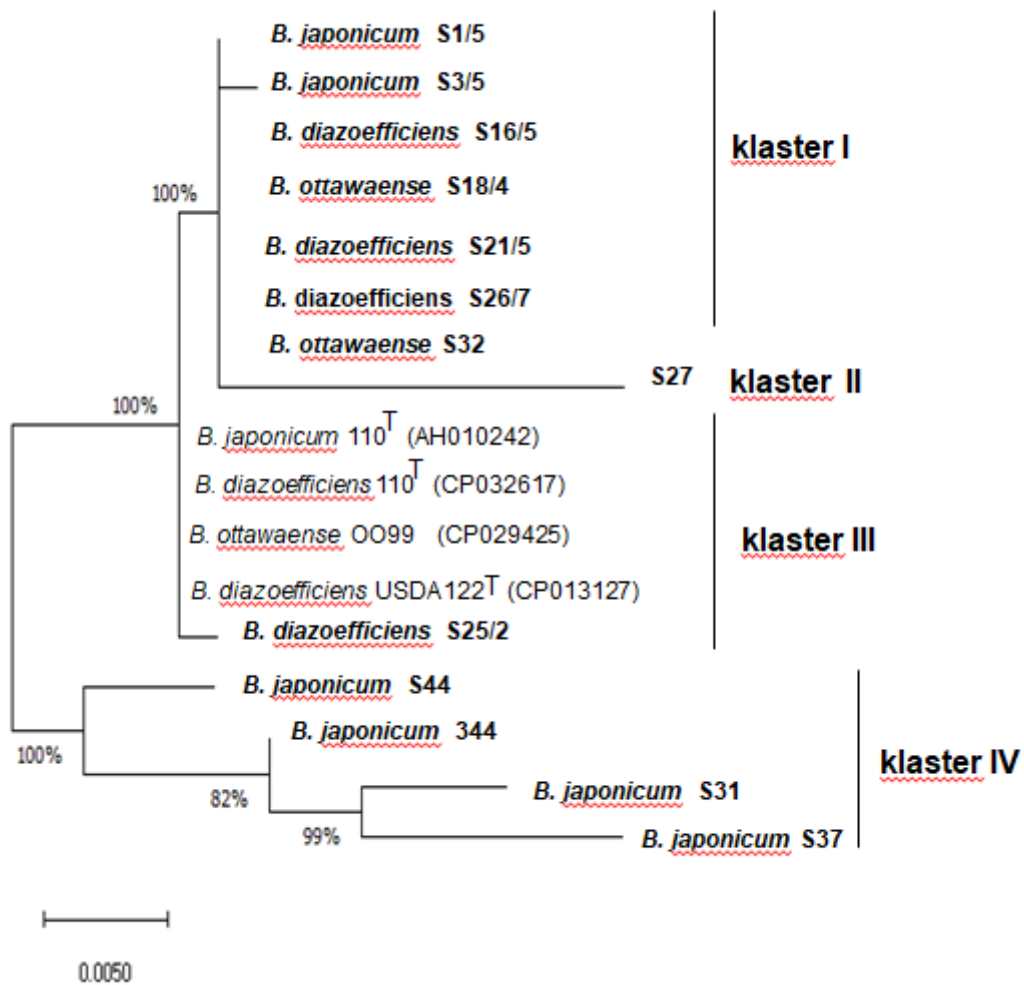
Rezultati analize *nifH* gena pokazuju da su izolati grupirani u četiri klastera. Klasteru I pripada sedam sojeva (S1/5, S3/5, S16/5, S18/4, S21/6, S26/7 i S32) dok je unutar klastera II grupiran samo soj S27, koji je tvorio zaseban klaster i kod analize *nodC* gena. Unutar klastera III grupiran je soj S25/2 skupa s tipskim sojevima *B. japonicum*, *B. ottawaense* i *B. diazoefficiens*. Tri soja (S31, S37 i S44) te referentni soj *B. japonicum* 344 nalaze se unutar klastera IV. Klaster IV je zanimljiv jer su unutar njega grupirani svi sojevi iste vrste *B. japonicum* (slika 40).

Filogenija pojedinih *nifH* gena podudara se sa filogenijom *nodC* gena što ukazuje na koevoluciju ovih simbioznih gena.

Sličnost svih izolata sa tipskim sojevima *B. japonicum*, *B. ottawaense* i *B. diazoefficiens* veća je od 99.99 % (tablica 35).

Tablica 35. Matrica sličnosti sekvenci istraživanih i tipskih sojeva najrodnijih vrsta na temelju analize *nifH* gena. Sličnost je izračunata koristeći Tamura 3 parametarski model.

	S1/5	S3/5	S16/5	S18/4	S21/5	S25/2	S26/7	S27	S31	S32	S37	S44	<i>B. japonicum</i> 344	<i>B. japonicum</i>	<i>B. diazoefficiens</i>	<i>B. ottawaense</i>	
S1/5	100.00																
S3/5	100.00	100.00															
S16/5	100.00	100.00	100.00														
S18/4	100.00	100.00	100.00	100.00													
S21/5	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00												
S25/2	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00											
S26/7	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00										
S27	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99									
S31	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99								
S32	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	99.99	99.99							
S37	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.98	99.99	99.99	99.99						
S44	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	100.00	100.00				
<i>B. japonicum</i> 344	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	99.99	100.00	99.99	99.99	99.99	100.00			
<i>B. japonicum</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	99.99	100.00	99.99	99.99	99.99	100.00	100.00		
<i>B. diazoefficiens</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	99.99	100.00	99.99	99.99	99.99	100.00	100.00	100.00	
<i>B. ottawaense</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.99	99.99	100.00	99.99	99.99	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00



Slika 40. Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *nifH* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su koristeći Tamura-Nei model.

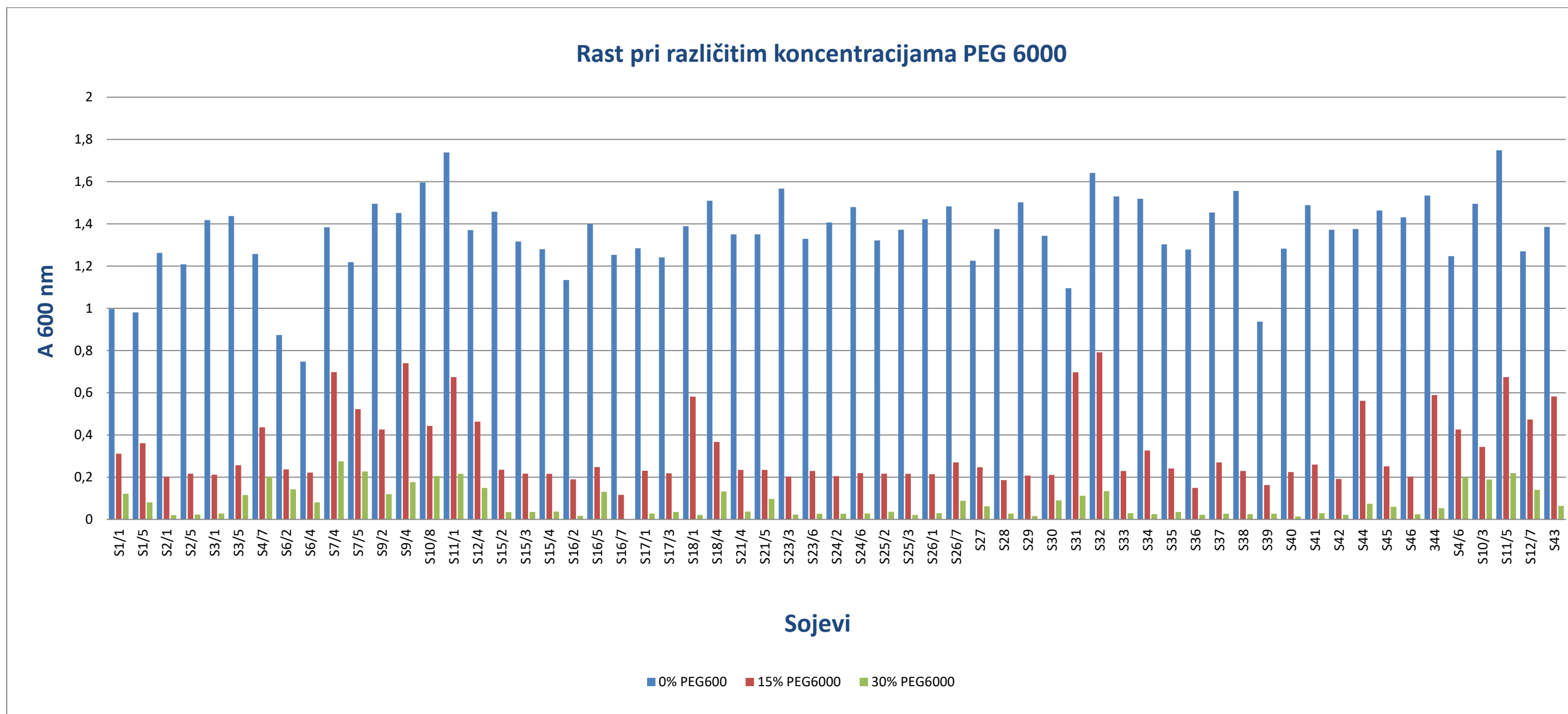
Tablica 36. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija na temelju sekvenciranja *rrs*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, *nodC* i *nifH* gena. Ista boja označava podudarnost metoda u identifikaciji vrsta.

Soj	RAPD grupa	Identifikacija na temelju: 16S rRNA gena	Identifikacija na temelju: <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>glnII</i> gena	Identifikacija na temelju: <i>nodC</i> i <i>nifH</i> gena (simbiovar)
S1/5	VII	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	sv. <i>glycinearum</i>
S3/5	VII	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	
S16/5	XXII	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	
S18/4	XV	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	
S21/5	XXIII	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	
S25/2	XXIV	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	
S26/7	XXIV	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	
S27	X	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	Zaseban klaster	
S31	XVII	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	sv. <i>glycinearum</i>
S32	I	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	
S37	XX	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	
S44	XX	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	

## 4.5. Fenotipska karakterizacija izolata

### 4.5.1. *In vitro* ispitivanje tolerantnosti izolata na sušu

U cilju utvrđivanja tolerantnosti izolata na *in vitro* sušu provedeno je testiranje s polietilen glikolom (PEG 6000) koji je dodavan u YMB hranjivu podlogu u različitim koncentracijama (15 % i 30 %), dok je podloga bez polietilen glikola služila kao kontrola. Rezultati provedenog testiranja pokazuju da je najveći rast sojeva uočen u YMB hranjivoj podlozi bez polietilen glikola što je i bilo za očekivati. Najveću apsorbanciju imao je soj S11/1 *Ensifer sp.* i ona je iznosila 1,738. Šest izolata među kojima je i referentni soj *B. japonicum* 344 imali su apsorbanciju veću od 1,500 (S10/8, S18/4, S23, S29, S32 i S38). Najmanju izmjerenu prosječnu apsorbanciju imao je izolat S6/4 *Rhizobium sp.* i ona je iznosila 0,747. Prosječne izmjerene apsorbancije ostalih izolata kretale su se od 0,873 do 1,488. Dodatkom polietilen glikola u koncentraciji 15 % u YMB hranjivu podlogu došlo je do povećanja vodnog deficita budući da je polietilen glikol na sebe vezao vodu. Vodni deficit se odrazio na rast sojeva što se moglo vidjeti po smanjenju apsorbancije u odnosu na apsorbancije kontrolnih uzoraka. Najveću zabilježanu prosječnu apsorbanciju imao je izolat S32 (*B. ottawaense*) i ona je iznosila 0,791. Osam izolata, uključujući i referentni soj *B. japonicum* 344 imao je apsorbanciju iznad 0,500. Apsorbancije ostalih izolata kretale su se od 0,163 do 0,463. Najmanju zabilježenu apsorbanciju imao je izolat S16/7 *B. ottawaense* i ona je iznosila 0,163. U YMB hranjivoj podlozi u kojoj je dodan 30 % polietilen glikol uočena je najveća redukcija bakterijskog rasta. Veća koncentracija polietilen glikola značajno reducirala količinu vode u hranjivoj podlozi što se odrazilo na rast izolata i značajno smanjenje apsorbancije. Najveću zabilježenu apsorbanciju imao je izolat S7/4 *Microbacterium sp.* i ona je iznosila 0,275. Četiri izolata (S4/7, S7/5, S10/8 i S11/1) imali su apsorbanciju koja se kretala od 0,202 do 0,227. Najmanju prosječnu zabilježenu apsorbanciju imao je izolat S16/7 *B.ottawaense* i ona je iznosila 0,01 iz čega se može vidjeti da rasta skoro pa i nema. Apsorbancija ostalih izolata kretala se od 0,06 do 0,176. Što je prosječna izmjerena apsorbancija pri 15 % i 30 % koncentraciji polietilen glikola bila veća time je testirani izolat bio tolerantniji na *in vitro* sušu (slika 41).



Slika 41. Rezultati *in vitro* ispitivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na sušu.

#### 4.5.2. Ekološka karakterizacija izolata

Ispitivanjem sposobnosti rasta bakterijskih izolata na različitim temperaturama nije utvrđena znatna raznolikost. Devet od ukupno 13 izolata imalo je iste profile rasta. Niti jedan izolat nije pokazao sposobnost rasta na temperaturi od 4°C. Sojevi S16/5 i S32 jedini su pokazali dobru sposobnost rasta na temperaturi 37°C i 45°C. Sojevi pripadaju vrstama *B. japonicum* i *B. diazoefficiens* te su izolirani iz tala s različitim lokacija. Soj S16/5 s područja Bjelovarsko-bilogorske županije (Mlinski vinogradi I), dok je soj S32 izoliran s područja Požeško-slavonske županije (Kutjevo). Ostali sojevi pokazali su dobar ili djelomičan rast na temperaturi od 37°C i 45°C. Rezultati ispitivanja sposobnosti rasta izolata na različitim temperaturama prikazani su u tablici 37.

Tablica 37. Rezultati ispitivanja rasta sojeva na različitim temperaturama i sadržaju NaCl.

Soj	NaCl (%)					Temperatura°C		
	1	2	3	4	5	4	37	45
S1/5	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+/-
S3/5	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+/-
S16/5	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	+
S18/4	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+/-
S21/5	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+/-
S25/2	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+	+/-
S26/7	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-
S27	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+/-
S31	+	+/-	+/-	-	-	-	+	+/-
S32	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+	+
S37	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	-
S44	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	-
344	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+/-

Standardna YMA podloga za uzgoj rizobija sadrži 0,01 % NaCl-a. Kako bi se utvrdila sposobnost bakterijskih izolata da rastu na povišenim koncentracijama soli, ispitivan je njihov rast na YMA podlogama s 1 %, 2 %, 3 %, 4% i 5 % NaCl-om. Svi izolati pokazali su dobar ili djelomičan rast na koncentracijama 1 %, 2 % i 3 %, osim sojeva S37 i S44 koji nisu rasli na 3 % koncentraciji NaCl-a. Djelomičan rast na 4 % koncentraciji NaCl-a pokazalo je sedam od ukupno 13 izolata, dok je na 5 % koncentraciji NaCl-a djelomičan rast pokazao samo izolat S16/5 koji je izoliran s područja Bjelovarsko-bilogorske županije i pripada vrsti *B. diazoefficiens* (tablica 37).

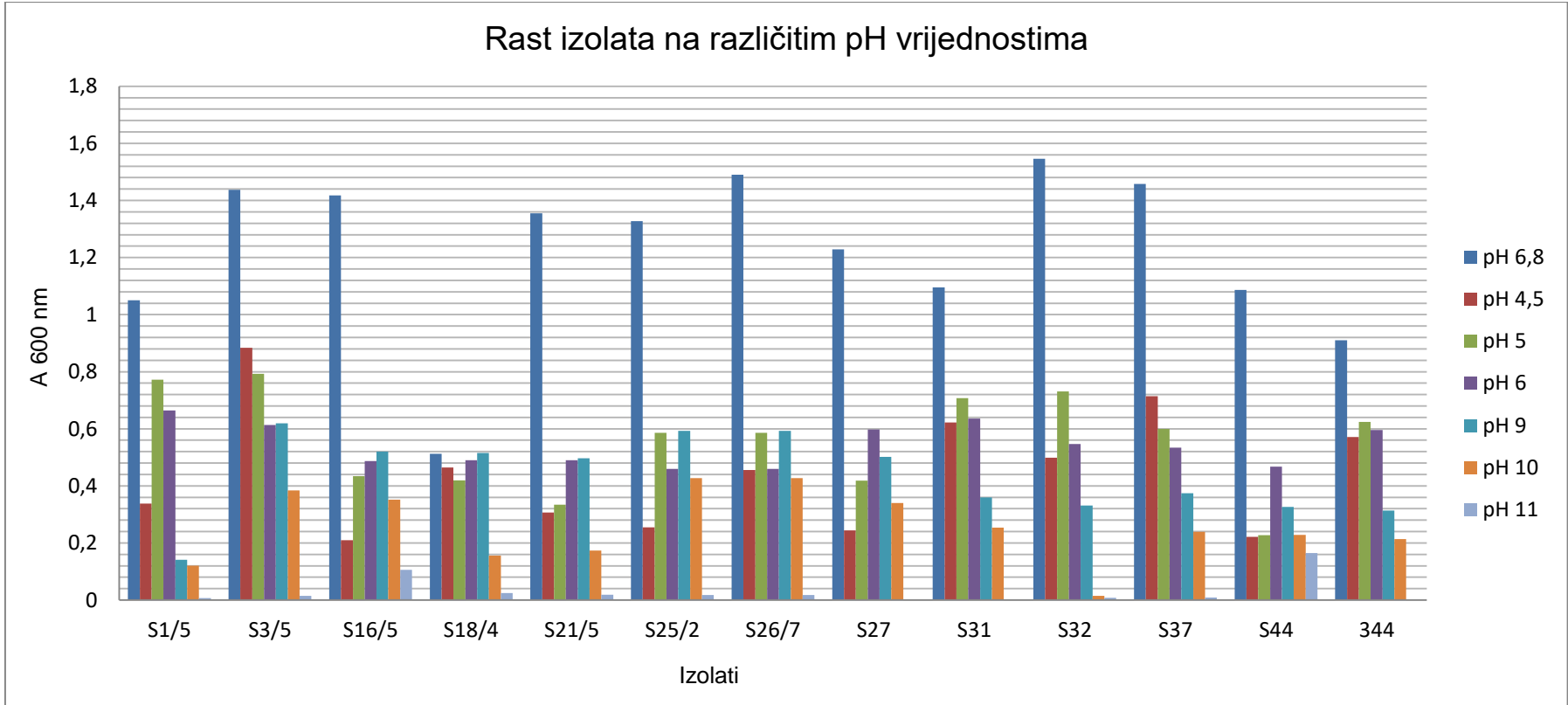


Što se tiče optimalnog pH za rast rizobija on iznosi 6-7, no u ovom istraživanju ispitivana je i njihova sposobnost rasta na različitim pH (4.5, 5, 6, 6.8, 9, 10 i 11), pri čemu je utvrđena znatna raznolikost.

Na pH 4.5 svi su izolati pokazali rast, pri čemu se najviše ističu izolati S3/5, S31, S37 i referentni soj *B. japonicum* 344. Svi su oni izolirani iz kiselih tala s različitim lokacija i pripadaju *B. japonicum*. Pri pH 5, 6 i 6.8 svi izolati su dobro rasli, pri čemu je najbolji rast uočen na pH 6.8 budući da je to optimalni pH rasta rizobija.

Izolati su također pokazali dobar rast i na pH 9 i 10, pri čemu su najbolji rast pokazali izolati S3/5, S18/4, S25/2 i S26/7 koji su izolirani iz kiselih tala s različitim lokacija.

Pri pH 11 tri izolata (S27 *B. ottawaense*, S31 *B. japonicum* i referentni soj *B. japonicum* 344) nisu pokazali rast, dok su ostali izolati slabo rasli, ali među njima su se najviše isticala dva izolata (S16/5 *B. ottawaense* i S44 *B. japonicum*) koji su pokazali nešto bolji rast u odnosu na ostale sojeve. Izolat S16/5 *B. ottawaense* izoliran je iz kiselog tla s područja Bjelovarsko-bilogorske županije, dok je izolat S44 *B. japonicum* izoliran iz kiselog tla s područja Koprivničko-križevačke županije (Gola).



Slika 42. Rezultati rasta izolata na različitim pH vrijednostima.

#### 4.5.3. Biokemijska karakterizacija izolata

U cilju dobivanja podataka o biokemijskom statusu svakog pojedinog izolata provedena su tri biokemijska testa (katalaza, ureaza i oksidaza).

Rezultati provedenog katalaza testa pokazuju da je od ukupno 13 izolata samo njih tri pozitivno na provedeni test. Pozitivan katalaza test pokazali su izolati S3/5, S44 koji pripadaju vrsti *B. japonicum* te su izoliranih iz tala s različitim lokacija i referentni soj *B. japonicum* 344. Nakon provedenog testa sva tri izolata su stvarala mjehuriće zraka što ukazuje na prisustvo enzima katalaze koji razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik.

Provedenim ureaza testom od ukupno 13 izolata njih 11 pokazalo je pozitivnu reakciju. Pozitivan rezultat ureaza testa kod ispitivanih izolata potvrđuje prisustvo enzima ureaze koji hidrolizira ureu i dovodi do nastanka amonijaka koji alkalizira pH hranjive podloge i tako dovodi do promjene njene boje iz žute u ružičastu (slika 43). Izolati S1/5 i S21/5 pokazali su negativnu reakciju što znači da ne posjeduju enzim ureazu.

Oksidaza testom utvrđen je samo jedan pozitivan rezultat, koji je pokazao izolat S27. Pozitivan rezultat ukazuje da izolat S27 posjeduje enzim citokrom c oksidazu, dok svi ostali izolati nemaju navedeni enzim.

Tablica 38. Rezultati biokemijske karakterizacije izolata.

Soj	Ureaza	Katalaza	Oksidaza
S1/5	-	-	-
S3/5	+	+	-
S16/5	+	-	-
S18/4	+	-	-
S21/5	-	-	-
S25/2	+	-	-
S26/7	+	-	-
S27	+	-	+
S31	+	-	-
S37	+	-	-
S44	+	+	+
344	+	+	-



Slika 43. Rezultati provedena tri biokemijska testa: ureaza (a) ružičasta boja ukazuje na pozitivan rezultat, katalaza (b) nastanak mjehurića zraka pokazatelj pozitivnog testa, oksidaza (c) plava boja ukazuje na pozitivan rezultat.

#### 4.5.4. Otpornost na antibiotike

Rezultati provedene analize prirodne otpornosti izolata na različite antibiotike pokazuju da je najveći broj ispitivanih sojeva osjetljiv na antibiotik streptomycin. U prisustvu koncentracije 10 µg/disku samo je rastao soj S32 *B. ottawaense*, dok je ova koncentracija streptomicina inhibirala rast ostalih 12 sojeva. Također je veliki broj sojeva pokazao osjetljivost i na 30 µg/disku kanamicina koji je inhibirao rast 11 izolata. Na ovoj koncentraciji rasla su samo dva soja, S18/4 i S32 koji su pokazali rezistentnost na ovaj antibiotik. Oba izolata pripadaju vrsti *B. ottawaense*. Nešto veća otpornost uočena je kod eritromicina koncentracije 15 µg/disku, kod kojeg su četiri izolata pokazala rezistentnost (S21/5, S27, S31 i S32). Međutim, najveća rezistentnost uočena je kod ampicilina koncentracije 10 µg/disku. Na ovu koncentraciju ampicilina rezistenciju je pokazalo 11 izolata. Najmanju osjetljivost pokazao je izolat S32 koji pripada vrsti *B. ottawaense* koji je bio rezistentan na sva četiri ispitana antibiotika. Rezultati provedene analize prikazani su u tablici 39.

#### 4.5.5. Iskorištavanje različitih izvora ugljika

Rezultati provedenog ispitivanja korištenja različitih šećera kao izvor ugljika pokazuju da su svi izolati iskorištavali glukozu, saharozu, manozu, rafinozu i galaktozu što je bilo vidljivo njihovim rastom na hranjivim podlogama u prisustvu navedenih šećera. U prisustvu maltoze, laktoze i arabinoze nije rastao soj S18/4 *B. ottawaense*, dok je još dodatno kod dva izolata (S16/5 *B. ottawaense* i S26/7 *B. ottawaense*) u prisustvu arabinoze došlo do inhibicije rasta. Sojevi S1/5, S16/5, S18/4, S21/4 i 344 nisu rasli u prisustvu ksiloze i laktoze (S1/5, S3/5, S16/5, S18/4, S21/5 kao i referentni soj *B. japonicum* 344 što se može vidjeti iz rezultata prikazanih u tablici 39.

Tablica 39. Rezultati ispitivanja prirodne otpornosti na antibiotike te iskorištavanja različitih izvora ugljika.

	Antibiotici				Šećeri									
	streptomycin	eritromicin	ampicilin	kanamicin	manoza	saharozna	ksiloza	glukoza	maltoza	rafinoza	arabinoza	galaktoza	fruktoza	laktoza
S1/5	S	I	I	S	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
S3/5	S	I	R	S	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S16/5	S	I	R	S	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
S18/4	S	I	I	R	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
S21/5	S	R	R	S	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
S25/2	S	I	R	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S26/7	S	I	R	S	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
S27	S	R	R	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S
S31	S	R	R	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S32	R	R	R	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S37	S	S	R	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S44	S	S	R	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
344	S	S	R	S	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

\*S- osjetljiv; I- umjereno osjetljiv; R-rezistentan

#### 4.5.6. Generacijsko vrijeme

Rezultati određivanja generacijskog vremena svakog pojedinog izolata pokazuju da svi istraživani sojevi pripadaju spororastućoj skupini rizobija. Prosječno generacijsko vrijeme izolata iznosi 15,4 sata. Najduže generacijsko vrijeme imao je soj S31 i ono je iznosilo 18,7 sati, dok je najkraće generacijsko vrijeme utvrđeno kod soja S18/4 i ono je iznosilo 12,4 sata. Izolati S32 i S37 imali su isto generacijsko vrijeme koje je iznosilo 18,2 sata. Generacijsko vrijeme svih ispitivanih izolata prikazano je u tablici 40.

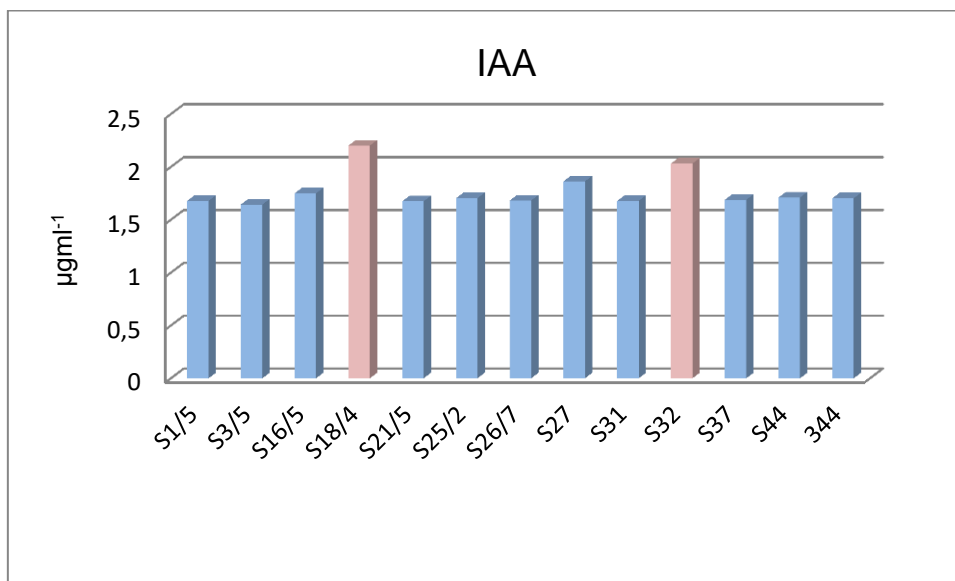
Tablica 40. Generacijsko vrijeme ispitivanih izolata.

Soj		Generacijsko vrijeme (h)
S1/5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	13
S3/5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	14
S16/5	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	14,9
S18/4	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	12,4
S21/5	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	16,3
S25/2	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	17,6
S26/7	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	14,7
S27	<i>Bradyrhizobium</i>	15,6
S31	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	18,7
S32	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	18,2
S37	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	18,2
S44	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	13,6
344	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	12,8

## 4.6. PGPR karakterizacija izolata

### 4.6.1. Produkcija indol-3-octene kiseline (IAA)

Rezultati ispitivanja produkcije indol-3-octene kiseline pokazuju da su svi izolati imali sposobnost sinteze IAA. Najveće koncentracije sintetizirane IAA imali su sojevi S18/4 i S32 i ona je iznosila preko  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  (slika 44). Oba izolata pripadaju vrsti *B. ottawaense*. Kod ostalih sojeva koncentracije sintetizirane IAA kretale su se od  $1,6-1,8 \mu\text{g ml}^{-1}$  što se može vidjeti na slici 44. Iz dobivenih rezultata se može uočiti da su se sojevi grupirali u svije skupine. U jednu skupinu grupirani su sojevi koji pripadaju vrsti *B. diazoefficiens* i *B. japonicum* čije su se koncentracije kretale u rasponu od  $1,6-1,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ , dok se u drugoj skupini nalaze sojevi koji imaju nešto višu koncentraciju sintetizirane IAA, te oni pripadaju vrsti *B. ottawaense*.



Slika 44. Količina sintetizirane indol-3-octene kiseline od strane izolata.



#### 4.6.2. Sinteza egzopolisaharida (EPS), litičkih enzima, otapanje fosfata

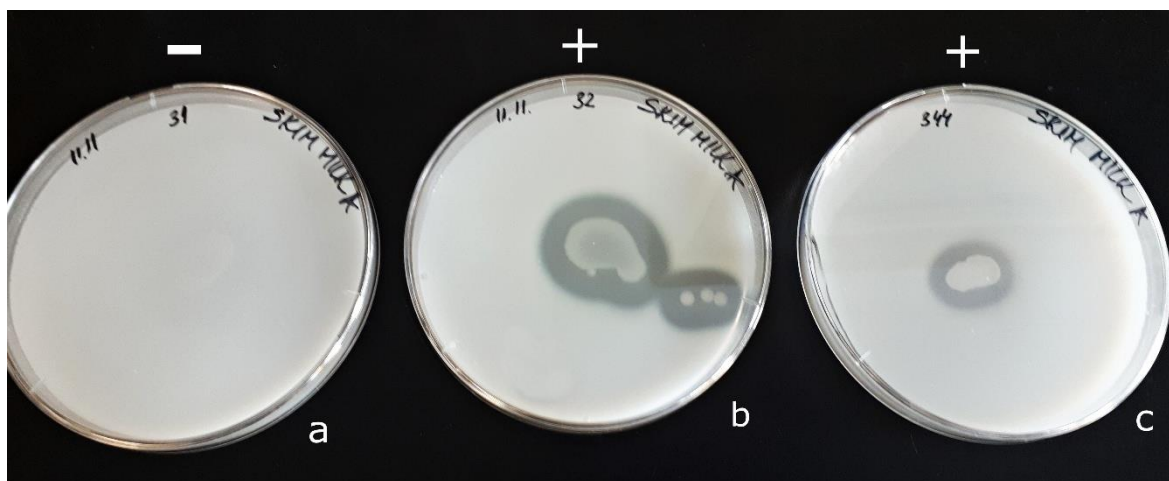
Rezultati ispitivanja sposobnosti sinteze egzopolisaharida pokazuju da su svi izolati imali sposobnost sinteze EPS-a. Nakon provedenog testa kod svih izolata došlo je do formiranja bijelog paučinastog prstena na vrhu epruvete što je bio znak pozitivnog testa (slika 45).



Slika 45. Pozitivan rezultat ispitivanja produkcije egzopolisaharida. Na vrhu epruvete vidljiv je bijeli paučinasti prsten što ukazuje na pozitivan test.

Rezultati ispitivanja sposobnosti izolata da otapaju fosfate pokazuju da samo izolat S32 *B. ottawaense* ima tu sposobnost. Naime, samo je kod izolata S32 došlo do formiranja čiste zone oko kolonije, što ukazuje da je navedeni izolat otapa fosfat iz hranjive podloge. Ostali izolati su bili negativni na provedeni test (tablica 41).

Što se tiče produkcije litičkih enzima, svi izolati su bili negativni na produkciju amilaze dok su dva izolata bila pozitivna na produkciju proteaze. Kod izolata S32 koji pripada vrsti *B. ottawaense* i referentnog soja *B. japonicum* 344 nakon provedene inkubacije došlo je do formiranja čiste zone oko bakterijske kolonije što ukazuje na pozitivan rezultat provedenog testa (slika 46).



Slika 46. Rezultati proteaza testa. a) negativan rezultat provedenog testa, b) i c) pozitivan rezultat izolata *B. ottawaense* S32 i *B. japonicum* 344 što je vidljivo formiranom čistom zonom oko bakterijskih kolonija.

Tablica 41. Rezultati produkcije egzopolisaharida, litičkih enzima i otapanja fosfata.

Soj	EPS	Otapanje fosfata	Litički enzimi	
			Proteaza	Amilaza
S1/5	+	-	-	-
S3/5	+	-	-	-
S16/5	+	-	-	-
S18/4	+	-	-	-
S21/5	+	-	-	-
S25/2	+	-	-	-
S26/7	+	-	-	-
S27	+	-	-	-
S31	+	-	-	-
S32	+	+	+	-
S37	+	-	-	-
S44	+	-	-	-
344	+	-	+	-

#### 4.7. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija

Na osnovu rezultata dobivenih ispitivanjem tolerantnosti izoliranih sojeva na *in vitro* sušu, RAPD PCR metode i sekvenciranja 16S rRNA gena, vegetacijskim pokusom utvrđena je kompatibilnost sa sortom soje Lucija, simbiozna učinkovitost kao i tolerantnost na sušu 12 reprezentativnih autohtonih sojeva rizobija, jednog referentnog soja, te negativne kontrole (bez bakterizacije). Uzorci biljnog materijala sakupljeni su u fazi pune cvatnje soje.

Simbiozna učinkovitost je procijenjena na osnovu sljedećih parametara: broj kvržica po biljci, masa suhe tvari kvržica, masa suhe tvari biljaka, količina ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke, te indeks količine klorofila u listu. Rezultati analize varijance pokazuju da su utvrđene signifikantne razlike za sva ispitivana svojstva ovisno o primijenjenom soju, količini vode i njihovoj interakciji osim za djelovanje interakcije soja i količine vode na indeks količine klorofila u listu što se može vidjeti u tablici 42.

Tablica 42. Rezultati analize varijance za ispitivana svojstva. Opravdanost djelovanja faktora i interakcije na ispitivana svojstva uz navedene P vrijednosti.

Izvor varijabilnosti	Broj kvržica po biljci	Masa suhe tvari kvržica	Masa suhe tvari biljke	Količina ukupnog dušika	CCI
Soj	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)
Vlaga	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)
Soj x Vlaga	<0.0043 (*)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.0001 (**)	<0.5496 (ns)

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

#### 4.7.1. Broj kvržica po biljci

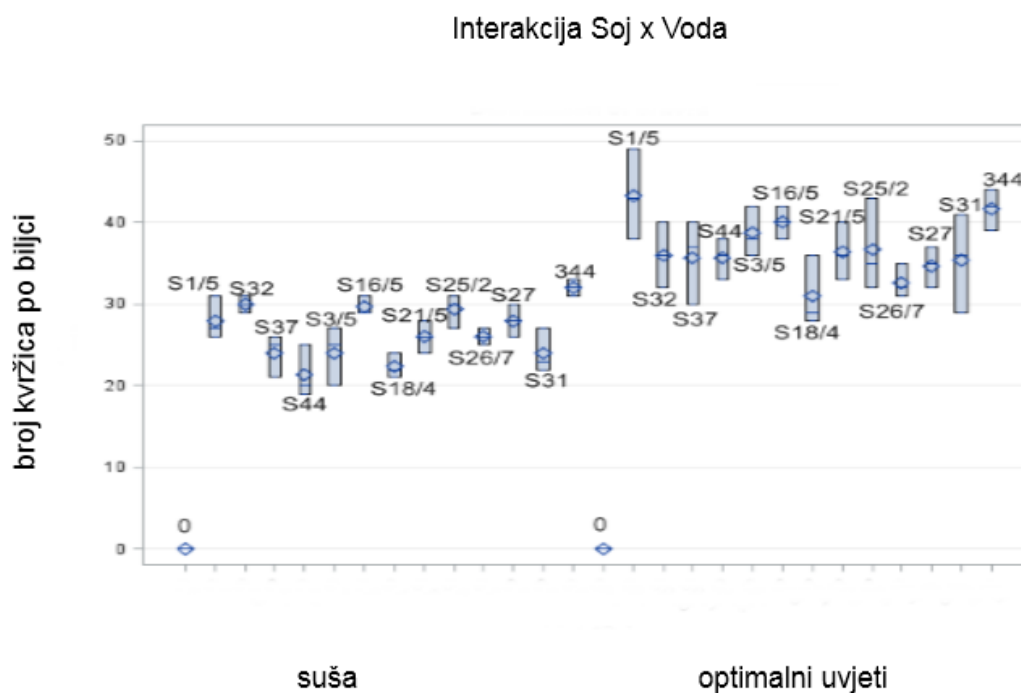
Statističkom obradom podataka o broju kvržica po biljci utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva, količine vode te interakcije soja i količine vode. Djelovanje količine vode statistički je opravdano te je kod biljaka koje su primale optimalnu količinu vode utvrđen signifikantno veći broj kvržica po biljci u odnosu na biljke uzgajane u sušnim uvjetima. Najveći broj kvržica po biljci utvrđen je uz primjenu referentnog soja 344 *B. japonicum*, nakon čega se još izdvajaju autohtoni sojevi S1/5 *B. japonicum* te S16/5 *B. diazoefficiens*. Premda je primjena ova tri soja rezultirala najboljom nodulacijom i između njih nema statistički opravdanih razlika, nisu utvrđene signifikantne razlike u broju kvržica niti uz inokulaciju sa još pet autohtonih sojeva (S3/5, S21/5, S25/2, S27, S32). Najslabija nodulacija utvrđena je uz primjenu soja S18/4 *B. ottawaense*, međutim ova vrijednost za broj kvržica je signifikantno niža samo u odnosu na broj kvržica utvrđenih uz primjenu pet najboljih autohtonih sojeva. Na osnovu rezultata statističke analize podataka, može se zaključiti da utvrđene razlike u broju kvržica nisu u većini slučajeva statistički opravdane te sposobnost nodulacije ne ovisi o pripadnosti određenoj vrsti rizobija nego o specifičnom soju koji je korišten za bakterizaciju sjemena soje.

Tablica 43. Broj kvržica po biljci.

Soj		Vlaga		Prosjek sojeva	Grupa (soj)*
		Optimalna	Suša		
344	<i>B. japonicum</i>	41.66	32.00	36.83	A
S1/5	<i>B. japonicum</i>	43.33	28.00	35.66	AB
S16/5	<i>B. diazoefficiens</i>	40.00	29.66	34.83	ABC
S25/2	<i>B. diazoefficiens</i>	36.66	29.33	33.00	ABCD
S32	<i>B. ottawaense</i>	36.00	30.00	33.00	ABCD
S3/5	<i>B. japonicum</i>	38.66	24.00	31.33	ABCDE
S27	<i>Bradyrhizobim sp.</i>	34.66	28.00	31.33	ABCDE
S21/5	<i>B. diazoefficiens</i>	36.33	26.00	31.16	ABCDE
S37	<i>B. japonicum</i>	35.66	24.00	29.83	BCDE
S31	<i>B. japonicum</i>	35.33	24.00	29.66	BCDE
S26/7	<i>B. diazoefficiens</i>	32.66	26.00	29.33	CDE
S44	<i>B. japonicum</i>	35.66	21.33	28.50	DE
S18/4	<i>B. ottawaense</i>	31.00	22.33	26.66	E
K	kontrola	0.00	0.00	0.00	F
<b>Prosjek:</b>		<b>34.11</b>	<b>24.61</b>		

\*Prosječne vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju kod  $p > 0,05$  (Tukeyev test).

Od svih istraživanih kombinacija, najveći broj kvržica po biljci utvrđen je uz optimalnu količinu vode i bakterizaciju sojevima S1/5 *B. japonicum*, S16/5 *B. diazoefficiens* i referentni soj 344 *B. japonicum*. U tablici 43. prikazane su prosječne vrijednosti broja kvržica po biljci dok je na slici 47. prikazan utjecaj interakcije soja i vode na broj kvržica po biljci.



Slika 47. Prikaz utjecaja interakcije soja i količine vode na broj kvržica po biljci.

#### 4.7.2. Masa suhe tvari kvržica po biljci

Za potrebe utvrđivanja mase suhe tvari kvržica po biljci uzeto je pet biljaka sa korijenom u fazi pune cvatnje. Statističkom obradom podataka utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva, vlage i interakcije sojeva i vlage. Prosječne vrijednosti mase suhe tvari kvržica po biljci prikazane su u tablici 44.

Tablica 44. Masa suhe tvari kvržica po biljci (mg/biljci).

Soj		Vlaga		Prosjek sojeva	Grupa (soj)*
		Optimalna	Suša		
S37	<i>B. japonicum</i>	186.01	85.36	135.69	A
S32	<i>B. ottawaense</i>	145.50	106.20	125.85	A
S25/2	<i>B. diazoefficiens</i>	133.97	116.53	125.25	A
S18/4	<i>B. ottawaense</i>	125.93	84.36	105.15	B
S3/5	<i>B. japonicum</i>	120.13	77.73	98.93	BC
S27	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	102.84	90.81	96.82	BCD
S21/5	<i>B. diazoefficiens</i>	104.12	81.20	92.66	BCDE
S26/7	<i>B. diazoefficiens</i>	97.66	81.66	89.66	CDEF
S31	<i>B. japonicum</i>	106.30	67.83	87.06	CDEFG
S1/5	<i>B. japonicum</i>	91.63	73.96	82.80	DEFG
344	<i>B. japonicum</i>	95.30	63.43	79.37	EFG
S44	<i>B. japonicum</i>	91.86	64.56	78.21	FG
S16/5	<i>B. diazoefficiens</i>	90.31	58.51	74.41	G
K	kontrola	0.00	0.00	0.00	H
<b>Prosjek:</b>		<b>106.54</b>	<b>75.15</b>		

\*Prosječne vrijednosti označene istim slovom nisu statistički različita kod  $p > 0,05$  (Tukeyev test).

Najveća masa suhe tvari kvržica po biljci utvrđena je primjenom soja S37 koji pripada vrsti *B. japonicum*. Korijen soje bakteriziran sojem S37 prikazan je na slici 48. Soj S37 signifikantno se razlikovao od svih ostalih sojeva i kontrole (K) osim kod dva autohtona soja: S21/5 koji pripada vrsti *B. diazoefficiens* i S32 koji pripada vrsti *B. ottawaense*. Budući da je masa suhe tvari kvržica parametar kojim se procjenjuje sposobnost nodulacije, odnosno njegova infektivnost, može se zaključiti da autohtoni soj S37 ima najveću sposobnost nodulacije biljke domaćina.



Slika 48. Nodulacija korijena soje sojem S37 kojim je dobivena najveća masa suhe tvari kvržica. Lijevo prikazuje korijen soje koja je dobivala optimalnu količinu vode, dok je desno prikazan korijen soje koja je bila podvrgnuta tretmanu suše.

Dobru sposobnost nodulacije pokazao je i soj S18/4 (105.15 mg) koji pripada vrsti *B. ottawaense*. Soj se signifikantno razlikovao od svih ostalih sojeva i kontrole (K) osim od S3/5, S21/5 koji pripadaju vrsti *B. japonicum* i S27 *Bradyrhizobium* sp. Ostali ispitivani sojevi tvorili su manju masu suhe tvari kvržica po biljci bez statističke opravdanosti.

Najniža vrijednost za masu suhe tvaru kvržica po biljci utvrđena je uz primjenu autohtonog soja S16/5 (74.41 mg) koji pripada vrsti *B. diazoefficiens*. Soj S16/5 se signifikantno razlikovao od većine istraživanih izolata osim od sojeva S1/5, S31, S44 i referetnog soja 344 koji pripadaju vrsti *B. japonicum*.

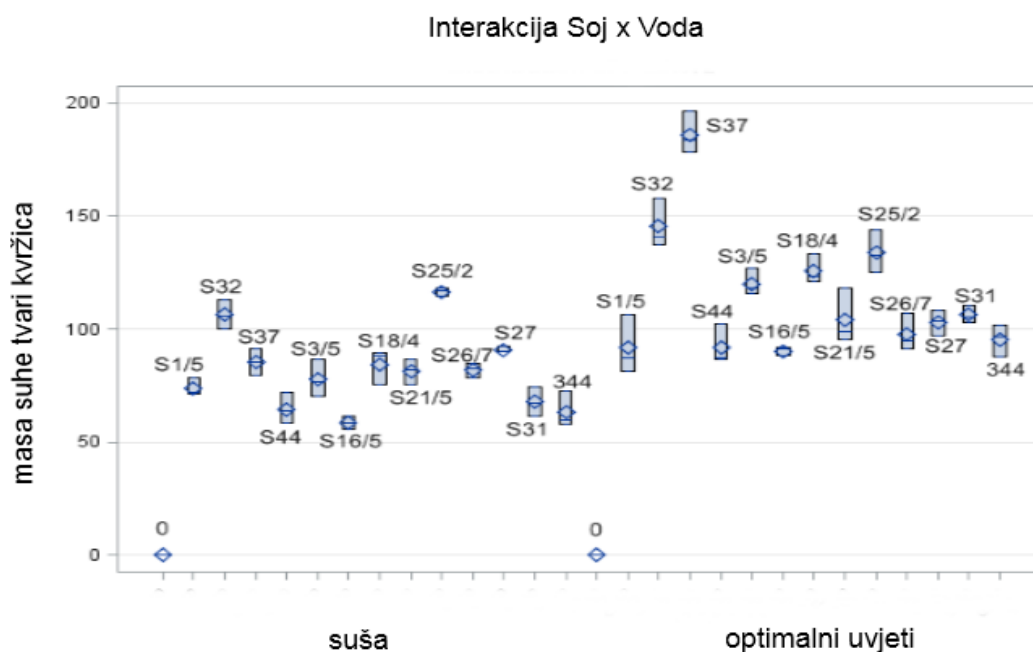


Slika 49. Nodulacija korijena soje sojem S16/5 koji je dao najmanju masu suhe tvari kvržica. Lijevo (optimalna količina vode), desno (tretman suše).



Interakcija sojeva i vlage imala je signifikantan utjecaj na masu suhe tvari kvržica te je kod svih biljaka soje koje su dobivale optimalnu količinu vode utvrđena veća masa suhe tvari kvržica. Najveće mase utvrđene su primjenom sojeva S37 *B. japonicum*, S32 *B. ottawaense* i S25/2 *B. diazoefficiens* kod biljaka soje koje su dobivale optimalnu količinu vode. Primjenom istih sojeva na biljke soje koje su bile podvrgnute tretmanu suše utvrđana je niža masa suhe tvari kvržica, pa tako za soj S37 *B. japonicum* ona uznosi 85.36 mg. Uglavnom, masa suhe tvari kvržica smanjila za više od 15%, gdje je najmanje smanjenje mase suhe tvari kvržica biljke utvrđeno primjenom soja S25/2 *B. diazoefficiens* na biljke soje koje su bile podvrgnute suši (slika 50).

Najmanja masa kvržica utvrđena je primjenom soja S16/5 *B. diazoefficiens* na biljke soje koje su bile podvrgnute suši (58.51 mg) gdje je došlo do smanjenja mase za 35% u odnosu na biljke koje su dobivale optimalnu količinu vode. U prilogu 1 prikazani su različiti stupnjevi signifikantnosti sojeva.



Slika 50. Prikaz utjecaja interakcije soja i količine vode na masu suhe tvari kvržica (mg/biljci).

#### 4.7.3. Masa suhe tvari biljke

Statističkom obradom podataka mase suhe tvari biljke utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva, vlage i interakcije sojeva i vlage. Najveća masa suhe tvari biljke dobivena je primjenom soja S25/2 koji pripada vrsti *B. diazoefficiens* (tablica 45). Soj S25/2 signifikantno se razlikovao od većine sojeva osim S1/5, S3/5, S21/5 i S37 za koje je utvrđeno da pripadaju vrsti *B. japonicum*.

Tablica 45. Masa suhe tvari biljke (mg).

Soj		Vlaga		Prosjek sojeva	Grupa (soj)*
		Optimalna	Suša		
S25/2	<i>B. diazoefficiens</i>	1958.25	1214.41	1586.33	A
S1/5	<i>B. japonicum</i>	1929.03	1228.36	1578.70	A
S37	<i>B. japonicum</i>	1653.60	1280.73	1467.17	AB
S21/5	<i>B. diazoefficiens</i>	1717.76	1164.75	1441.26	ABC
S3/5	<i>B. japonicum</i>	1872.30	993.86	1433.09	ABC
S44	<i>B. japonicum</i>	1590.20	1180.56	1385.38	BCD
S27	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1639.03	1099.40	1369.22	BCD
344	<i>B. japonicum</i>	1726.66	990.10	1358.38	BCD
S16/5	<i>B. diazoefficiens</i>	1718.86	986.38	1352.62	BCD
S32	<i>B. ottawaense</i>	1637.50	1022.00	1329.75	BCD
S26/7	<i>B. diazoefficiens</i>	1758.59	820.82	1289.71	CDE
S31	<i>B. japonicum</i>	1332.53	1106.96	1219.75	DE
S18/4	<i>B. ottawaense</i>	1524.07	738.65	1131.36	EF
K	kontrola	1058.73	916.43	987.58	F
<b>Prosjek:</b>		<b>1651.23</b>	<b>1053.10</b>		

\*Prosječne vrijednosti označene istim slovom nisu statistički različita kod  $p > 0,05$  (Tukeyev test).

Statistički opravdana razlika utvrđena je između neinokulirane kontrole i ostalih autohtonih sojeva (osim S18/4 *B. ottawaense*) uključujući i referentni soj *B. japonicum* 344.

Signifikantno veća masa suhe tvari biljaka utvrđena je primjenom svih autohtonih sojeva na biljke koje su dobivale optimalnu količinu vode u odnosu na biljke koje su bile tretirane istim sojevima u uvjetima suše.

Najmanja masa suhe tvari biljke utvrđena je za nebakteriziranu kontrolu (987.58 mg) i soj S18/4 *B. ottawaense* koji se signifikantno razlikovao od većine sojeva osim od S26/7 *B. diazoefficiens*, S31 *B. japonicum* i nebakterizirane kontrole.

Statističkom obradom podataka mase suhe tvari biljke utvrđena je statistički opravdano djelovanje interakcije sojeva i vlage. Interakcija soja i vlage za soj S18/4 *B. ottawaense*

signifikantna je za većinu sojeva pri čemu je primjenom ovog soja na biljake soje koje su bile izložene tretmanu suše utvrđena najmanja masa suhe tvari biljke (738.65 mg). Uočeno je da su biljke koje su tretirane autohtonim sojevima i primale optimalnu količinu vode imale veću masu nadzemnog dijela biljke u odnosu na biljke koje su podvrgnute tretmanu suše (slika 51).



Slika 51. Prikaz razlike u rastu između biljaka soje koje su primale optimalnu količinu vode (lijevo) i biljaka soje koje su podvrgnute tretmanu suše (desno).

Primjenom soja S25/2 *B. diazoefficiens* utvrđena je najveća masa suhe tvari biljke, no tretiranje biljaka soje koje su bile podvrgnute tretmanu suše istim sojem došlo je do smanjenja mase suhe tvari biljke za više od 30%. Primjenom soja S37 *B. japonicum* na biljke soje koje su bile podvrgnute tretmanu suše uočeno je najmanje smanjenje mase suhe tvari biljke i ono iznosi nešto više od 20 %.

#### 4.7.4. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke

Najveća količina dušika u nadzemnom dijelu biljke utvrđena je primjenom soja S1/5 koji pripada vrsti *B. japonicum*. Soj S1/5 signifikantno se razlikovao od ostalih sojeva uključujući referentni soj *B. japonicum* 344 i nebakteriziranu kontrolu (tablica 46).

Tablica 46. Količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci).

Soj		Vlaga		Prosjek sojeva	Grupa (Soj)*
		Optimalna	Suša		
S1/5	<i>B. japonicum</i>	8.77	5.25	7.01	A
S25/2	<i>B. diazoefficiens</i>	7.56	4.10	5.83	B
S27	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	7.24	4.13	5.68	BC
S32	<i>B. ottawaense</i>	6.79	3.86	5.33	BC
S26/7	<i>B. diazoefficiens</i>	7.89	2.56	5.22	BC
344	<i>B. japonicum</i>	7.326	2.81	5.07	BCD
S21/5	<i>B. diazoefficiens</i>	6.38	3.32	4.85	BCD
S16/5	<i>B. diazoefficiens</i>	5.43	4.14	4.78	BCDE
S31	<i>B. japonicum</i>	5.59	3.91	4.75	BCDE
S37	<i>B. japonicum</i>	6.50	2.95	4.73	BCDE
S3/5	<i>B. japonicum</i>	6.39	2.94	4.66	CDE
S18/4	<i>B. ottawaense</i>	5.82	2.24	4.03	DE
S44	<i>B. japonicum</i>	4.26	3.10	3.68	EF
K	kontrola	3.52	2.28	2.90	F
<b>Prosjek:</b>		<b>6.39</b>	<b>3.40</b>		

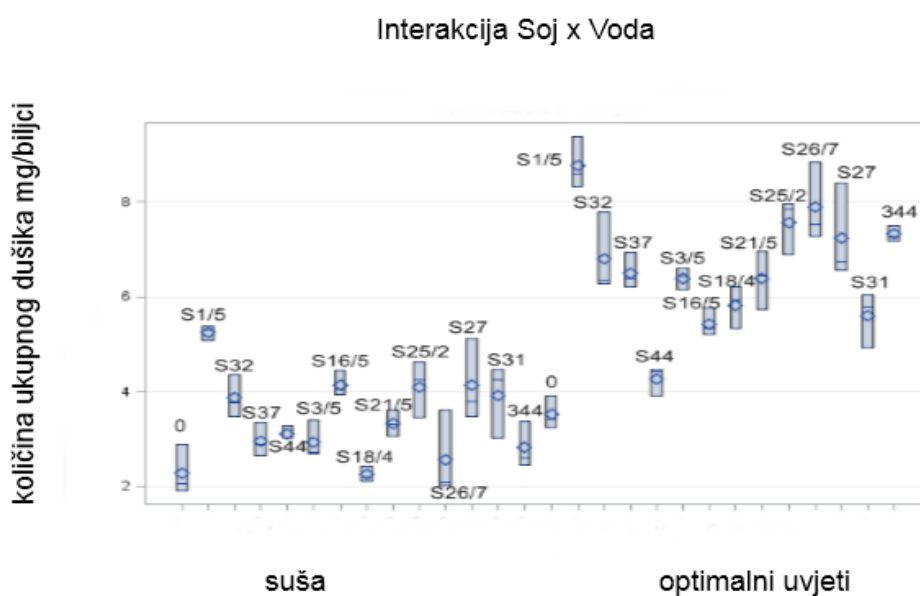
\*Prosječne vrijednosti označene istim slovom nisu statistički različita kod  $p > 0,05$  (Tukeyev test).

Nešto niža količina dušika u nadzemnom dijelu biljke u odnosu na soj S1/5 utvrđena je i primjenom sojeva S16/5, S21/5, S25/2, S26/7, S27, S31, S37, 344 pri čemu je utvrđeno da se soj S1/5 signifikantno razlikuje od njih.

Najmanja količina dušika u nadzemnom dijelu biljke utvrđena je kod nebakterizirane kontrole (2.90 mg) i primjenom soja S44 *B. japonicum*. Za soj S44 utvrđeno je da se signifikantno razlikuje od većine sojeva.

Utvrđena je statistički opravdana razlika interakcije soja i vlage. Najveća količina dušika u nadzemnom dijelu biljke dobivena je primjenom soja S1/5 na biljke soje koje su dobivale optimalnu količinu vode, dok je primjenom istog soja na biljke koje su bile izložene tretmanu suše došlo do smanjenja količine dušika u nadzemnom dijelu biljke za oko 40 %.

Nešto niža količina dušika utvrđena je primjenom soja S25/2 (7.56 mg) na biljke koje su primale optimalnu količinu vode, dok je primjenom istog soja na biljke koje su bile izložene suši došlo do redukcije količine dušika u nadzemnom dijelu biljke za više od 50 %. Najniža količina dušika utvrđena je kod nebakterizirane kontrole (3.52 mg) gdje su biljke primale optimalnu količinu vode. Nebakterizirana kontrola značajno se razlikovala od svih ostalih sojeva osim soja S44. Kod nebakteriziranih biljaka (nebakterizirana kontrola) u uvjetima suše količina dušika se reducirala za oko 35 %.



Slika 52. Utjecaj interakcije soja i količine vode na količinu dušika u nadzemnom dijelu biljke.



Slika 53. Razlike u rastu nadzemnog dijela biljaka i boji lišća između nebakterizirane kontrole (desno) i dva soja (S1/5 i S25/2) s kojima je postignuta najveća količina dušika u nadzemnom dijelu biljke.

#### 4.7.5. Indeks sadržaja klorofila u listu (CCI)

Statističkom obradom podataka indeksa sadržaja klorofila u listu utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva i vlage. Najveći indeks klorofila u listu utvrđen je primjenom soja S3/5 (27.66) koji pripada vrsti *B. japonicum* (tablica 47). Soj S3/5 signifikantno se razlikovao od ostalih sojeva osim od četiri soja (S25/2, S26/7, S31 i S44). Nešto manji indeks klorofila u listu utvrđen je primjenom autohtonih sojeva S1/5, S16/5, S21/5, S27 i S32 koji pripadaju istoj grupi.

Tablica 47. Indeks sadržaja klorofila u listu (CCI).

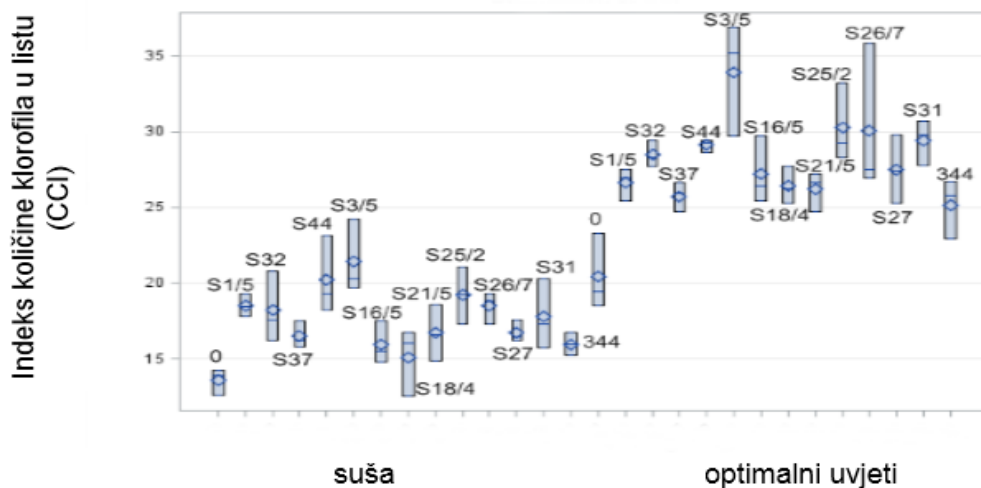
Soj		Vlaga		Prosjek sojeva	Grupa (Soj)*
		Optimalna	Suša		
S3/5	<i>B. japonicum</i>	33.93	21.40	27.66	A
S25/2	<i>B. diazoefficiens</i>	30.26	19.20	24.73	AB
S44	<i>B. japonicum</i>	29.10	20.20	24.65	ABC
S26/7	<i>B. diazoefficiens</i>	30.06	18.46	24.26	ABC
S31	<i>B. japonicum</i>	29.43	17.76	23.60	ABC
S32	<i>B. ottawaense</i>	28.46	18.20	23.33	BC
S1/5	<i>B. japonicum</i>	26.60	18.50	22.55	BC
S27	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	27.50	16.73	22.11	BC
S16/5	<i>B. diazoefficiens</i>	27.16	15.93	21.55	BC
S21/5	<i>B. diazoefficiens</i>	26.16	16.70	21.43	BC
S37	<i>B. japonicum</i>	25.73	16.50	21.11	BCD
S18/4	<i>B. ottawaense</i>	26.40	15.06	20.73	BCD
344	<i>B. japonicum</i>	25.13	15.93	20.53	CD
K	kontrola	20.40	13.56	16.98	D
<b>Prosjek:</b>		<b>27.59</b>	<b>17.44</b>		

\*Prosječne vrijednosti označene istim slovom nisu statistički različita kod  $p > 0,05$  (Tukeyev test).

Najmanja zabilježena vrijednost indeksa klorofila u biljci zabilježena je kod nebakterizirane kontrole (16.98) i primjenom soja S18/4 *B. ottawaense* koji se signifikantno razlikuje od sojeva kod kojih je utvrđena najveća vrijednost sadržaja klorofila u biljci.

Nije utvrđano statistički opravdano djelovanje interakcije soja i vlage iako je primjenom svih sojeva kod biljaka koje su primale optimalnu količinu vode veća vrijednost indeksa klorofila u listu (slika 53).

### Interakcija Soj x Voda



Slika 54. Utjecaj interakcije soja i količine vode na indeks količine klorofila u listu.

Razlike između negativne kontrole i bakteriziranih varijanti kod kojih je utvrđen veći indeks sadržaja klorofila u listu jasno su se uočavale po različitoj boji lišća i visini nadzemnog dijela biljke što se može vidjeti na slici 55.



Slika 55. Razlike u boji lišća i visini nadzemnog dijela biljaka primjenom soja S3/5 (lijevo) kod kojeg je utvrđen najveći CCI i nebakterizirane kontrole (desno). Na slici se jasno može vidjeti da soj S3/5 ima tamniju boju lišća u odnosu na nebakteriziranu kontrolu.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Analize tla i izolacija autohtonih sojeva rizobija

Republika Hrvatska ima jako povoljne agroekološke uvjete za uzgoj soje. Soja uspijeva na dubokim, plodnim i strukturnim tlima, neutralne reakcije, s dobro uređenim vodnozračnim režimom. Međutim, može uspijevati i na manje plodnim tlima lošije strukture, ali tada ovisi o provedenoj agrotehnici. Za normalan rast i razvoj traži područja s minimalnim godišnjim oborinama između 600 i 700 mm. Najkritičnije je razdoblje u fazama formiranja mahuna i nalijevanja zrna (srpanj i kolovoz), kad bi trebalo pasti najmanje 50 mm oborina. U početnom rastu može podnijeti mrazeve do  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok se optimalna temperatura za razvoj i rast kreće između  $21 - 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Za potrebe ovog istraživanja uzeti su uzorci tala sa 29 (tablica 6, slika 27) na području različitih županija (Vukovarsko-srijemske, Požeško-slavonske, Koprivničko-križevačke, Bjelovarsko-bilogorske, Istarske, Zadarske i Splitsko-dalmatinske županije). Uzorci tla uzeti su sa ratarskih poljoprivrednih površina u cilju dokazivanja prisutnosti i izolacije prirodnih populacije kvržičnih bakterija koje noduliraju soju. Zbog velikog značaja proučavanja prirodnih populacija kvržičnih bakterija u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji, ova istraživanja usmjerena su na izolaciju autohtonih sojeva rizobija, *in vitro* utvrđivanju njihove tolerantnosti na stresne uvjete okoline, identifikaciji te provjeri simbiozne učinkovitosti.

Rezultati fizikalne analize tla (tablica 28) pokazuju da je 52% tala praškasto ilovaste teksture, dok su preostali uzorci praškasto glinasto ilovaste teksture i teksture praha.

Kemijskim analizama tla (tablica 29) u najvećem broju uzorka utvrđena je kisela pH reakcija. Jako kisela tla bila su zastupljena u Bjelovarsko-bilogorskoj i Koprivničko-križevačkoj županiji. Manji dio uzoraka imao je neutralnu pH reakciju tla i ona su bila zastupljena Vukovarsko-srijemske, Koprivničko-križevačke i Istarske županije, dok su alkalna tla bila zastupljena u četiri županije. Za pH se zna da je jedan od ograničavajućih čimbenika rasta rizobija. Iako je većina tala imala kiselu pH reakciju u većini tala utvrđeno je prisustvo autohtonih sojeva rizobija. Razlog tome je što su simbiozni fiksatori dušika koji noduliraju soju manje osjetljiviji na niski pH tla (Zahran i sur., 2012; Rajnović, 2017). Ovim se potvrdilo da autohtoni sojevi rizobija mogu opstati u vrlo različitim i često nepovoljnim ekološkim uvjetima, na koje su se sposobni uspješno adaptirati.



Količina dušika u tlima varirala je od dobre do vrlo bogate opskrbljenosti, dok je većina tala imala slabu opskrbljenost humusom. Najveću količinu dušika imali su uzorci S49 (Vrana) i S50 (Sinjsko polje). Sva tla bila su bogato opskrbljena kalijem dok je količina fosfora varirala od vrlo slabe do vrlo bogate opskrbljenosti. Iako su neki uzorci tla imali niski sadržaj pojedinih elemenata u većini njih dokazano je prisustvo autohtonih sojeva rizobija. Istraživanja koja su provedena na drugim kulturama u Republici Hrvatskoj pokazuju da nije utvrđena korelacija između fizikalno-kemijskih karakteristika tla i prisutnosti rizobija koje noduliraju stočni grašak (Blažinkov, 2006) i grah (Pohajda, 2011; Rajnović, 2017).

Kiselost tla je često ograničavajući čimbenik koji utječe na mikrobiološke procese u njemu kako u pogledu zastupljenosti, infektivnosti nodulacijske i sposobnosti simbioznih fiksatora dušika. Kisela tla su najčešće slabo opskrbljena fosforom, kalcijem i manganom. Što se tiče leguminoza, većina njih zahtijeva neutralnu ili slabo kiselu reakciju tla, zbog toga je mogućnost njihova uzgoja ograničena u suptropskim i tropskim područjima koji se suočavaju sa jako kiselim tlima. U uvjetima niskog pH tla kod simbioznih fiksatora dušika dolazi do smanjenog otpuštanja flavonoida koji direktno djeluju na aktivaciju Nod faktora, čime se inhibira infekcija korijenovih dlačica i nastanak nodula u kojima se odvija proces simbiozne fiksacije dušika (Karmakar i sur., 2015). Nizak pH utječe na dostupnost hraniva, čime se inhibira rast leguminoza.

Budući da je većina istraživanih tala imala nizak pH, pri čemu su iz takvih tala izolirani autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju soju, može se zaključiti da izolirani sojevi imaju razvijenu adaptaciju na nepovoljne uvjete okoline (u ovom slučaju pH) što ih čini dobrim kandidatima za pripremu inokuluma za predstjvenu bakterizaciju soje naročito za područja s tlima niske pH reakcije.

Autohtoni sojevi rizobija izolirani su pomoću dvije metode. Jedna je metoda gdje se biljka domaćin koristi kao zamka za autohtone sojeve ("trap host"). Spomenutom metodom se u prikupljene uzorke tla posijalo sterilizirano sjeme soje te se u fazi pune cvatnje biljke iz kvržica biljaka izvršila izolacija autohtonih sojeva rizobija. Druga metoda uključivala je direktno prikupljanje noduliranih biljaka soje s polja. Općenito se smatra da je "trap host" metoda puno bolja od direktnog prikupljanja noduliranih biljaka s polja što se potvrdilo i u ovom istraživanju jer od ukupno šest lokacija s kojih su direktno uzete nodulirane biljke soje na samo dvije su pronađeni autohtoni sojevi rizobija, dok na preostale četiri lokacije nisu. Za daljnja istraživanja je odabrano ukupno 60 izolata rizobija. Iz uzoraka S47 (Istarska županija, Novigrad), S48 (Istarska županija, Poreč), S49 (Zadarska županija,

Vrana), te uzorka S50 (Splitsko-dalmatinska županija, Sinjsko polje) nisu izolirani sojevi rizobija jer nije došlo do nodulacije biljaka.

Ovo se može povezati sa fizikalnim karakteristikama tala jer uzorci S47 i S50 imaju teksturnu oznaku praškasta glina koja spada u teža tla. Teža tla imaju najveći kapacitet zadržavanja vode i ostalih hranjivih elemenata koji su neophodni za rast i razvitak biljaka (Al-Saedi i sur., 2016). Što se tiče kemijskih karakteristika, uzorci S47, S49 i S50 slabo su opskrbljeni fosforom, dok su uzorci S49 i S50 vrlo bogato opskrbljeni dušikom. Takva kombinacija hranjiva predstavlja vrlo nepovoljno stanište za rast i razvoj rizobija što bi moglo biti uzrok izostanka nodulacije biljaka soje na ovim lokacijama.

Područje Istre i Dalmacije spada u regije u kojima prevladava mediteranska i submediteranska klima, što može biti također jedan od mogućih uzroka izostanka nodulacije biljaka. Moguće je da su nešto više temperature u ovim regijama te manja količina oborina utjecale na prirodnu populaciju rizobija u tlu i dovele do njene redukcije što se onda odrazilo na izostanak nodulacije. Količina vode u tlu može imati utjecaj na rast rizobija kao i na proces simbiozne fiksacije dušika. U tlima sa smanjenom količinom vode najčešće dolazi do smanjenja prirodne populacije rizobija. Nedostatak vode utječe na infekciju korijenovih dlačica kao i formiranje infekcijske niti što dovodi do reduciranja broja nodula (Egamberdieva i sur., 2017). Osim toga, područje Istre i Dalmacije nisu regije uzgoja soje u Hrvatskoj što može biti dodatni razlog izostanka nodulacije biljaka.

Još jedan od mogućih uzroka izostanka nodulacije može biti i povišen salinitet tala na ovim lokacijama. Naime, povišeni salinitet može dovesti do smanjenja rasta biljaka kao i na prinos. Povišeni salinitet tla ne utječe na kolonizaciju korijena leguminoza rizobijama, ali utječe na proces simbiozne fiksacije dušika. Povišene količine soli izravno djeluje na proces nodulacije pri čemu usporava nastanak novih kvržica i smanjuje njihova učinkovitost (Bruning i sur., 2015). Zapravo povišeni salinitet inhibira inicijalnu fazu uspostavljanja simbioznog odnosa tj. kovrčanje korijenovih dlačica te time izravno blokira nastanak novih nodula u kojima bi se odvijala simbiozna fiksacija dušika. Budući da su ovo područja u kojima prevladava mediteranska klima moguće je da takva tla imaju i nešto višu količinu soli što je dovelo do izostanka nodulacije. Visoke koncentracije soli tako izravno štetno djeluju na simbiozne fiksatore dušika kao rezultat toksičnosti, ali također i neizravno kao rezultat osmotskog stresa. Kod simbioznog sustava vrsta iz roda *Rhizobium* spp. i leguminoza utvrđena je puno veća osjetljivost na salinitet ili pojavu osmotskog stresa, nego kod pojedinačnog člana *Rhizobium* spp., odnosno kvržičnih bakterija (Zahran i sur., 2012), a razlog tomu je što sol inhibira inicijalnu fazu razvoja

simbioznog sustava. Kod simbioznog sustava vrste *B. japonicum* i soje, utvrđena je manja sposobnost nodulacije u prisutnosti 170 mM NaCl-a, s tim da je nodulacija potpuno bila onemogućena pri 210 mM NaCl-a (Yadav i sur., 2011).

U uvjetima visoke koncentracije soli u tlu različiti sojevi simbiozni fiksatora dušika mijenjaju svoju morfologiju. Bakterijske stanice tako postaju spiralne ili filamentozne, dolazi do povećanja njihove veličine, deformacije stanične stijenke, kao i do brojnih poremećaja u citoplazmi.

Povišen salinitet također negativno djeluje i na biljke uzrokujući niz fizioloških i morfoloških promjena koje se ispoljavaju kroz smanjene rasta biljaka, a u konačnici i smanjenje prinosa. Smatra se da je tolerancija soli kod biljaka složen proces koji uključuje niz biokemijskih procesa koji mogu dovesti do morfoloških i fizioloških promjena. Leguminoze su više osjetljivije na povišene koncentracije soli od rizobija, no i među njima se ističe nekoliko vrsta koje su iznimno otporne. To su soja (*Glycine max*), grah (*Phaseolus vulgaris*), te grahorica (*Vicia faba*).

## 5.2. Identifikacija autohtonih sojeva rizobija

### 5.2.1. Identifikacija na razini vrste

Metode identifikacije na razini vrste i soja temelje se na metodama molekularne biologije koje se svakodnevno unapređuju čime se povećava njihova preciznost i jednostavnost te se skraćuje vrijeme njihovog izvođenja. Metodama temeljenim na DNA tehnologiji vrši se procjena genetičke raznolikosti prirodnih populacija rizobija s ciljem njihove identifikacije na razini vrste i roda. Pri tome se koriste različite metode koje se temelje na amplifikaciji DNA primjenom lančane reakcije polimerazom kao i njene modifikacije te sekvenciranje različitih molekularnih markera, za što točniju identifikaciju.

Kako bi se utvrdila genetska raznolikost rizobija izoliranih iz kvržica soje te odabrali reprezentativni sojevi za sekvenciranje gena u ovom istraživanju je korištena RAPD metoda (Pohajda i sur., 2016).

RAPD metoda jedna je od najčešće korištenih metoda za proučavanje raznolikosti kvržičnih bakterija. Značaj ove metode očituje se i u njejoj jednostavnosti jer daje informacije o bakterijskom genomu bez potrebe o ikakvim prethodnim znanjima o njemu (Koskey i sur., 2018).

Korištenjem nasumično izabranih početnica dobivaju se amplificirani DNA fragmenti koji nakon razdvajanja na gelu i daljnje analize omogućuju diferencijaciju vrlo srodnih sojeva unutar iste vrste bakterija (kao rezultat razdvajanja dobivaju se karakteristični profili koji se razlikuju između sojeva istih vrsta).

U ovom istraživanju grupiranje je provedeno korištenjem tri oligonukleotidne početnice P1, P2, P3 (Sikora i Redžepović, 2003). Za 60 istraživanih sojeva dobivena su 42 RAPD profila na temelju kojih su sojevi grupirani u skupine sa sličnošću manjom od 75 % (slika 36).

RAPD profili međusobno su se razlikovali u broju i veličini polimorfnih fragmenata što ukazuje na visoku raznolikost između istraživanih sojeva. Najvećoj skupini pripadalo je 12 izolata iz različitih uzoraka tala dok su ostale sačinjavali po osam, sedam i pet sojeva. Ostale skupine sadržavale su manje od pet izolata dok su neki RAPD profili bili predstavljeni samo s jednim sojem.

Od kada su Woese i suradnici (1984) predložili da se 16S rRNA koristi kao univerzalan marker za klasifikaciju i identifikaciju bakterija, ovaj gen je prihvaćen i kao osnova za klasifikaciju rizobija iz reda *Rhizobiales* (Rajnović, 2017).

Nakon sekvenciranja dobivene sekvence svih 60 izolata najprije su pročišćene i poravnate koristeći Staden software, a potom su uspoređene su s genima u GenBank. Nakon usporedbe dobivenih sekvenci 16S rRNA gena svih izolata sa sekvencama iz GenBank, rezultati filogenetske analize 16S rRNA gena su pokazali da 75 % izolata pripada rodu *Bradyrhizobium*, dok je preostali dio izolata svrstan u rodove *Ensifer*, *Microbacterium*, *Rhizobium* i *Agrobacterium* (slika 37).

Rod *Bradyrhizobium* se u ovom istraživanju pokazao kao najdominantniji rod što je bilo za očekivati, budući da je to rod koji najčešće nodulira soju. Najdominantnija vrsta bila je *B. ottawaense* kojoj je pripadalo 20 izolata, njih 14 vrsti *B. japonicum*, dok je preostalih 11 izolata pripadalo vrsti *B. diazoefficiens*. Za ostale isolate se nije mogla utvrditi točna pripadnost vrsti, već samo rodu, dok je za dva izolata (S9/2 i S9/4) utvrđeno da pripadaju vrsti *A. tumefaciens*.

Istraživanja koja su proveli drugi znanstvenici pokazala su da rizobije koje pripadaju rodu *Bradyrhizobium* najčešće noduliraju soju, no moguća je i nodulacija od strane drugih rodova. Yuan i sur. (2020) napravili su filogenetsku analizu 16S rRNA gena kod rizobija koje su izolirali s dvije sorte soje (Merlin i Enrei) u Njemačkoj i utvrdili da je soju noduliralo 71,4 % rizobija koje pripadaju rodu *Bradyrhizobium*, a 28,6 % njih koje pripadaju rodu *Rhizobium*.

Habibi i sur. (2017) proučavali su rizobije koje noduliraju soju u različitim ekološkim regijama sjeveroistočnog Afganistana te nakon provedene filogenetske analize 16S rRNA gena utvrdili da je također dominantna populacija koja pripada rodu *Bradyrhizobium* (55 %) dok je preostalih 45 % izolata pripadalo rodu *Ensifer*.

Nešto drugačije rezultate dobili su Ramirez i sur. (2019) koji su analizom 16S rRNA gena na rizobijama izoliranih iz kvržica soje različitih regija Venezuele utvrdili da su u područjima južne hemisfere dominantni rodovi *Burkholderia* i *Paraburkholderia*.

Brojna istraživanja koja su u posljednje vrijeme provedena sekvenciranjem 16S rRNA za identifikaciju rizobija su pokazala da ona nije dovoljna za razlikovanje vrsta. Genom rizobija može imati višestruke i heterogene ribosomalne RNA operone koji mogu utjecati na horizontalni prijenos gena i genetičku rekombinaciju (Espejo i Plaza, 2018). Broj operona između relativno bliskih vrsta često je konzerviran, dok su umjerene varijacije pronađene između sojeva iste vrste. Osim toga, kod rizobija se pokazalo da je varijacija u sekvenci gena 16S rRNA često nepouzdana da bi se razlikovale bliske vrste (Ramirez-Bahena i sur., 2008). To najviše dolazi do izražaja kod roda *Bradyrhizobium* gdje je filogenetska klasifikacija na razini vrste korištenjem ovog molekularnog markera dosta teška zbog visoke konzerviranosti 16S rRNA gena što dovodi do velike sličnosti sekvenci između usko povezanih vrsta (Wojcik, 2019). Dugo vremena raznolikost vrsta unutar roda *Bradyrhizobium* ostala je neistražena upravo zbog velike konzerviranosti sekvenci 16S rRNA gena koja se rutinski koristila kao marker za identifikaciju vrsta (Aserse i sur., 2017).

Zbog gore navedenih razloga danas se sve češće koristi MLSA (Multilocus Sequence Analysis) metoda (Chibeba i sur., 2017; Tampakaki i sur., 2017). Za MLSA analizu nužno je da se uključi više konstitucijskih gena koji daju veću filogenetsku razlučivost i smanjuju utjecaj mogućeg horizontalnog prijenosa gena.

Filogenetskom analizom tri konstitucijska gena *rpoB*, *gyrB* i *glnII* utvrđeno je da su sojevi grupirani slično kao i nakon analize 16S rRNA gena, izuzetak je bilo nekoliko izolata koji su pokazali pripadnost drugim vrstama unutar roda *Bradyrhizobium*. Jedan od mogućih razloga takvo dobivenih rezultata je viša divergencija sekvenci konstitucijskih gena u odnosu na 16S rRNA gen. Kao dominantna vrsta se pokazala *B. japonicum* kojoj je pripadao najveći broj izolata s više od 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (AP012206) te referentnim sojem *B. japonicum* 344. Naime, brojna istraživanja su pokazala da je *B. japonicum* uglavnom izoliran iz kiselih i neutralnih tala što se podudara s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Svi izolati za koje je utvrđeno da pripadaju vrsti *B. japonicum* izolirani su iz kiselih ili neutralnih tala.

Jedan dio izolata pripadao je vrsti *B. diazoefficiens*, također s preko 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. diazoefficiens* USDA 122<sup>T</sup> (CP029425). Iako su Naamala i sur. (2016) utvrdili da je *B. diazoefficiens* uglavnom dominantna populacija u južnofričkim tlima, dobiveni rezultati pokazuju da ova vrsta dominira i u tlima Hrvatske.

Za dva izolata je utvrđeno da pripadaju vrsti *B. ottawaense* koji su pokazali 99 % sličnosti s tipskim sojem *B. ottawaense* OO99<sup>T</sup> (CPO29425). Radi se o relativno novoj vrsti otkrivenoj 2014. godine u kvržicama soje u Kanadi (Yu i sur., 2014). Bez obzira na veliku geografsku udaljenost Kanade i Hrvatske, ova populacija mikrosimbionata soje prisutna je i u tlima Republike Hrvatske.

Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da su u tlima Republike Hrvatske dominantni mikrosimbionti soje *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* i *B. ottawaense*.

Izuzetak je bio izolat S27 koji je tvorio nezavisnu liniju. Međutim sličnost je bila veća od 99 % sa sve tri utvrđene vrste što ukazuje da soj SS27 vjerojatno pripadaju novoj vrsti unutar roda *Bradyrhizobium*. Kod tri izolata nije utvrđena podudarnost filogenetske analize *rrs* i konstitucijskih gena. To se odnosi na izolate S16/5, S21/5 i S26/7 koji su provedenom MLSA analizom svrstani u vrstu *B. diazoefficiens*, dok je filogenetska analiza *rrs* gena pokazala da pripadaju vrsti *B. ottawaense*.

Geografska distribucija rizobija može se također objasniti prilagodbom na različite klimatske uvjete. Korištenjem MLSA analize za procjenu biogeografije roda *Bradyrhizobium* utvrđeno je da su *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* i *B. elkanii* vrlo rašireni širom sjeverne hemisfere i stoga su otkriveni u područjima umjerene klime (Grönemeyer i Reinhold-Hurek, 2018).

Porast broja novih vrsta mikrosimbionata soje omogućila su brojna istraživanja za otkrivanje njihove geografske distribucije. Velikoj raznolikosti rizobija koje noduliraju soju u Hrvatskoj pogoduju najmanje dva čimbenika. Prvo, Hrvatska ima dosta heterogena tla i klimu pružajući na taj način raznolika staništa. Drugo, raznolikost rizobija može biti veća u mediteranskoj regiji Hrvatske kao što su Dalmacija i Istra u odnosu na kontinentalni dio zbog mogućih adaptacija na nešto suša područja.

Primjer toga je vrsta *B. japonicum* koja inače karakteristična za područja umjerene klime, ali je također pronađena u Subsaharskoj Africi koja je klimatski znatno drugačije područje. Vrsta *B. japonicum* uspješno je razvila mehanizme preživljavanja u znatno sušim područjima (Grönemeyer i Reinhold-Hurek, 2018).

Nekoliko istraživanja baziranih na zemljopisnoj rasprostranjenosti i biogeografiji rizobija su pokazala da je broj novih vrsta rizobija povezan s nekoliko bitnih značajki kao što su klima (Adhikari i sur., 2012), pH tla (Li i sur., 2011), vodni režim (Wade i sur., 2014), salinitet i sadržaj kalija u tlu (Chen i sur., 2018) kao i mjesto izolacije (Stepkowski i sur., 2012). Biogeografija je očito povezana s adaptacijama na više razina od klime do mikroniša (Wade i sur., 2014).

Geni zaduženi za nodulaciju i fiksaciju dušika (*nodC* i *nifH*) smješteni su kod roda *Bradyrhizobium* na simbiotskim otocima i imaju najvažniju ulogu u odabiru makrosimbionta (Gyogluu i sur., 2018).

Rezultati analize sekvenci *nodC* gena pokazuju da su izolati grupirani u dva klastera. Klasteru I pripadaju svi izolati osim soja S27. Svi oni pripadaju simbiovaru *glycinearum*, dok izolat S27 čini zaseban klaster što možda predstavlja neku novu vrstu. Ovi rezultati su u skladu s onima iz prethodnih istraživanja provedenih u Njemačkoj i Kini (Grönemeyer i Reinhold-Hurek 2018).

Rezultati analize *nifH* gena pokazuju da su izolati grupirani u četiri klastera. Zaseban klaster je kao i *nodC* gena formirao soj S27 (slika 40). Filogenija većine *nifH* gena podudara se sa filogenijom *nodC* gena što ukazuje na koevoluciju ova dva simbiozna gena.

## 5.3. Fenotipska karakterizacija izolata

### 5.3.1. *In vitro* ispitivanje tolerancije izolata na sušu

Rezultati provedenog *in vitro* testiranja pokazuju da je najveći rast sojeva uočen u YMB hranjivoj podlozi bez polietilen glikola što je i bilo za očekivati. Najveću apsorbanciju imao je soj S11/1 *Ensifer sp.* i ona je iznosila 1,738. Šest izolata među kojima je i referentni soj *B. japonicum* 344 imali su apsorbanciju veću od 1. Najmanju izmjerenu prosječnu apsorbanciju imao je izolat S6/4 *Rhizobium sp.* i ona je iznosila 0,747. Prosječne izmjerene apsorbancije ostalih izolata kretale su se od 0,873 do 1,488. Dodatkom polietilen glikola u koncentraciji 15 % u YMB hranjivu podlogu došlo je do povećanja vodnog deficita budući da je polietilen glikol na sebe vezao vodu. Vodni deficit se odrazio na rast sojeva što se moglo vidjeti po smanjenju apsorbancije u odnosu na apsorbancije kontrolnih uzoraka. Najveću zabilježanu prosječnu apsorbanciju imao je izolat S32 (*B. ottawaense*).

### 5.3.2. Ekološka karakterizacija izolata

Poznato je da se različiti sojevi rizobija razlikuju u svojim fenotipskim karakteristikama. To se prvenstveno odnosi na sposobnost adaptacije na nepovoljne uvjete vanjske sredine kao što su povišeni salinitet, niski pH te povišene temperature.

Budući da se rizobije mezofilni organizmi optimalna temperatura za rast i razmnožavanje kreće se od 28-30°C, no u tlu postoje sojevi koji mogu imati razvijenu toleranciju na znatno više ili niže temperature. Kako bi se to potvrdilo u ovom istraživanju ispitivana je sposobnost rasta izoliranih sojeva na znatno više temperature od optimalne (37°C i 45°C). Provedenim istraživanjem utvrđeno je da su svi izolati rasli na temperaturi od 37°C pri čemu su tri izolata pokazala djelomičan rast. Na temperature od 45°C 46% izolata pokazao je djelomičan rast, dva izolata rasla su dobro, dok ostali izolati nisu pokazali rast. Zanimljivo je da su svi sojevi koji su rasli na ovako visokim temperaturama izolirani iz tala istočne i sjeverne Hrvatske koje karakterizira umjereno topla klima čije se prosječne temperature za vrijeme toplih ljetnih mjeseci kreću od 20 do 22°C. No, prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda na području s kojeg su izolirani autohtoni sojevi rizobija zabilježene su maksimalne temperature zraka od 35 do 39.1°C. Budući da je temperatura jedan važan abiotički čimbenik koji utječe na rast rizobija i proces simbiozne fiksacije dušika može se zaključiti da izolirani sojevi imaju dobru predispoziciju za



učinkovit proces simbiozne fiksacije dušika, posebno izolati S16/5 i S32 koji su pokazali dobar rast i na 37 i 45°C.

Istraživanje koje su proveli Youseif i sur. (2014) pokazalo je da rizobije koje noduliraju soju imaju sposobnost rasta na visokim temperaturama (42°C), no radi se o sojevima koje su izolirane s područja Egipta. Provedeno istraživanje je pokazalo da niti jedan izolat nije imao sposobnost rasta na temperaturi od 4°C (tablica 34). Suprotno tome, Yuan i sur. (2020) proveli su istraživanje sposobnosti rasta rizobija na različitim temperaturama. Izolati su bili izolirani s područja Njemačke s dva različita kultivara soje (Merlin i Enrei). Rezultati provedenog istraživanja su pokazali da sojevi koji su izolirani sa sorte Merlin su imali sposobnost rasta i na niskim temperaturama (4°C) kao i na visokim (45°C), međutim niti jedan soj koji je izoliran sa sorte Enrei nije imao sposobnost rasta ni na niskim ni na visokim temperaturama. Iz provedenih istraživanja se može zaključiti da klimatska regija izolacije rizobija nije povezana s njihovom predispozicijom tolerantnosti na visoke ili niske temperature.

Salinitet je kao i visoka temperatura jedan od čimbenika koji može negativno djelovati na proces simbiozne fiksacije dušika. Tolerancija različitih kvržičnih bakterija na povišeni salinitet tla kreće se u rasponu od 0,1 do 0,65 M (Pohajda, 2011). Za rizobije se zna da za razliku od svojih domaćina mahunarki više toleriraju povišeni salinitet tla. No, za razliku od graha i graška, soja se smatra kulturom koja je izrazito otporna na povišeni salinitet tla (Chen i sur., 2018). Stres soli utječe na sve važne procese u biljci: fotosintezu, sintezu proteina i metabolizam lipida, a kako biljka reagira na više koncentracije soli razlikuje se ovisno o fazi rasta i razvoja biljke kao i o duljini izloženosti povećanom stupnju zaslanjenosti (Filipović, 2016). Različite vrste rizobija imaju različitu tolerantnost na povišeni salinitet. Neke od njih razvile su adaptivne mehanizme kojima uspješno toleriraju visoke koncentracije soli. Jedan od mehanizama je sinteza osmolita koje pohranjuju u citoplazmi i sprječavaju negativno djelovanje osmotskog stresa koji izaziva povišeni salinitet. Sintetizirani osmoliti tako sprječavaju dehidraciju stanice rizobija (Dong i sur., 2017; Arora i sur., 2018).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da većina izolata jako dobro tolerira povišeni salinitet jer je većina njih osim dva soja (S37 i S44) pokazala dobar ili djelomičan rast na 1, 2 i 3 % koncentraciji NaCl-a. Na nešto višim koncentracijama NaCl-a (4 %) sedam od 13 izolata raslo je djelomično, dok je na onoj najvišoj koncentraciji djelomičan rast pokazao izolat S16/5 koji pripada vrsti *B. japonicum* te je izoliran s područja Bjelovarsko-bilogorske županije. Nakon provedenog istraživanja mogu se izdvojiti tri soja, S16/5, S37 i S44 koji su pokazali visoku tolerantnost na povišene koncentracije soli.

Optimalan pH za rast rizobija je 6.8. Kako bi utvrdili sposobnost rasta na znatno nižim i višim pH vrijednostima u ovom istraživanju izolirani sojevi rizobija podvrgnuti su rastu na različitim pH vrijednostima u rasponu od 4.5-11.

Naime, pH je kao i temperatura i povišeni salinitet čimbenik koji negativno utječe na proces simbiozne fiksacije dušika. Niski pH tla dovodi do slabijeg otpuštanja flavonoida od strane biljke domaćina koji onda direktno djeluje na aktivaciju Nod faktora koji imaju ključnu ulogu u procesu formiranja kvržica na korijenu leguminoza (Muleta i sur., 2017). Iz ovog istraživanja se može zaključiti da su testirani izolati jako dobro tolerirali niski pH jer su pri 4.5 svi pokazali dobar ili djelomičan rast. Najviše se ističu izolati S3/5, S31, S37 i referentni soj *B. japonicum* 344 koji su imali najveće vrijednosti absorbacije. Svi su izolirani iz kiselih ili jako kiselih tala s različitim lokacija. Izolati su pokazali dobar rast i pri višim pH vrijednostima (5, 6, i 6.8), gdje je najbolji rast uočen na pH vrijednosti 6.8 što je bilo za očekivati jer se radilo o pH vrijednosti koja predstavlja optimum njihovog rasta.

Pri pH vrijednosti 9 i 10 svi izolati su pokazali sposobnost rasta te su se među njima najviše isticali izolati S3/5, S18/4, S25/2 i S26/7 koji su izolirani iz kiselih tala s različitim lokacija. Na najvišoj ispitivanoj pH vrijednosti 11, tri izolata nisu imala sposobnost rasta (S27, S31 i referentni soj *B. japonicum* 344), dok je većina ostali izolata rasla djelomično. Među njima su se najviše isticala dva izolata (S16/5 i S44) koji su pokazali nešto bolji rast u odnosu na ostale ispitivane sojeve. Bez obzira na to što su oba soja izolirana iz kiselih tala, pokazala su sposobnost rasta i na znatno višim pH vrijednostima. Soj S16/5 je izoliran iz tala s područja Bjelovarsko-bilogorske županije, dok je soj S44 iz tala s područja Koprivničko-križevačke županije (Gola). Iz ovoga se može zaključiti da nije postojala korelacija između reakcije tla iz kojeg su sojevi izolirani i pH raspona unutar kojeg su rasli, te da su se sojevi bez obzira na pH reakciju tla iz kojeg su izolirani jako dobro prilagodili na različite uvjete okoline.

### 5.3.3. Biokemijska karakterizacija izolata

Kako bi se utvrdio biokemijski status izolata provedena su tri biokemijska testa. Provedenim katalaza testom utvrđeno je da su samo tri izolata bila katalaza pozitivna. Radilo se o izolatima S3/5, S44 i referentnom soju *B. japonicum* 344. Oba izolata pripadaju vrsti *B. japonicum*. Provedenim ureaza testom utvrđeno je nešto više izolata koji su imali pozitivnu reakciju, točnije njih 85%. Većina pozitivnih izolata pripadala je vrsti *B.*

*japonicum*. Okisdaza testom je utvrđen samo jedan pozitivan rezultat kojeg je imao soj S27.

Deshmukh i sur. (2013) proveli su biokemijsku karakterizaciju sojeva rizobija koji noduliraju soju u Indiji te utvrdili da je većina izolata koja je pripadala vrsti *B. japonicum* imala pozitivnu reakciju na katalaza, oksidaza i uraza test. Rezultati dobiveni u Indiji mogu se povezati s ovim istraživanjem jer su svi izolati koji su bili pozitivni na tri provedena biokemijska testa pripadali vrsti *B. japonicum*.

#### 5.3.4. Otpornost na antibiotike, iskorištavanje različitih izvora šećera i generacijsko vrijeme izolata

Uspjeh primjene predstetvene bakterizacije sjemena leguminoza ovisi o bakterijskom i biljnom genomu, kao i o vanjskim faktorima, dok se učinkovitost selekcioniranih bakterija očituje u prinosima i količinama fiksiranog dušika.

Tlo sadrži velik broj različitih mikroorganizama koji imaju sposobnost sinteze antibiotika koji mogu biti letalni za osjetljivu populaciju rizobija u tlu. No, populacije rizobija u tlu većinom su stvorile intrizičnu rezistenciju na postojeće antibiotike u tlu, što im je omogućilo bolji rast, razmnožavanje i održivost. Pojava rezistencije bakterija uvjetovana je prekidom ili poremećajem djelovanja antibiotika. Rezistencijski mehanizmi se mogu javiti kao posljedica različitih procesa, ali konačni rezultat je uvijek potpuni ili djelomični gubitak učinkovitosti antibiotika. Okolišni faktori mogu uvelike utjecati na antibiotsku rezistenciju. Većinom su to pH, anaerobna atmosfera, koncentracija kationa i sadržaj timidina (Naamala i sur., 2016). Antibiotička rezistencija nije jednaka kod svih vrsta rizobija. Različite vrste rizobija, kao i sojevi iste vrste posjeduju različitu rezistenciju na antibiotike te različito reagiraju na njih.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je najveći broj ispitivanih izolata pokazao osjetljivost na antibiotik streptomycin. U njegovu prisustvu sposobnost rasta imao je samo soj S32, dok je streptomycin na ostale sojeve imao letalan učinak. Dobiveni rezultati se podudaraju s rezultatima koje su proveli Leite i sur. (2018) u Brazilu na sojevima koji pripadaju rodu *Bradyrhizobium* gdje je provedenim testiranjem većina sojeva pokazala je osjetljivost na streptomycin.

Većina izolata ovog istraživanja bila je osjetljiva i na kanamicin koji je bio letalan za 85% ispitivanih sojeva što je suprotno rezultatima koje je dobio Leite i sur. (2018) gdje je većina

ispitivanih sojeva bila rezistentna na kanamicin. Veća rezistentnost uočena primjenom eritromicina na kojeg je 30 % sojeva pokazalo rezistenciju. Međutim najveća rezistentnost uočena je primjenom antibiotika ampicilina na čije je djelovanje 70 % sojeva pokazalo rezistentnost.

Istraživanje koje su proveli Dekak i sur. (2018) u Alžiru navode da su rizobije koje su oni analizirali pokazale najveću rezistentnost na antibiotike streptomycin i eritromicin što je suprotno ovom istraživanju posebno kad je riječ o streptomycinu na kojeg je 85 % sojeva bilo osjetljivo. Ipak se može izdvojiti soj S32 koji je bio rezistentan na sva četiri ispitivana antibiotika.

Rizobije su kemoorganotrofni mikroorganizmi koji su sposobni iskorištavati veliki broj ugljikovih spojeva za rast i razvoj. U ovom istraživanju ispitivano je iskorištavanje različitih izvora ugljika: fruktoza, glukoza, laktoza, saharoza, manitol, galaktoza, maltoza, arabinoza i rafinoza. Naime, spektar ugljikovih spojeva koje rizobije koriste za svoj rast ovise o soju rizobija te predstavlja vrlo važnu komponentu fenotipske karakterizacije budući da može dati uvid u prilagodbu na rizosferu biljke domaćina (Rajnović, 2017).

Provedenim istraživanjem je utvrđeno da su svi izolati iskorištavali glukozu, saharozu, manozu, rafinozu i galaktozu. Također je utvrđeno da u prisustvu maltoze, laktoze i arabinoze nije rastao soj S18/4. Sojevi S1/5, S16/5, S18/4, S21/4 te referentni soj *B. japonicum* 344 nisu rasli u prisustvu ksiloze. Najveći broj izolata nije rastao u prisustvu laktoze (S1/5, S3/5, S16/5, S18/4, S21/5 i referentni soj *B. japonicum* 344 (tablica 36). Dobiveni rezultati podudaraju se provedenim istraživanjima na brojnim spororastućim rizobijama (Dekak i sur., 2018; Leite i sur., 2018).

Poznato je da soju mogu nodulirati sporo i brzo rastuće rizobije, no u većem postotku su to spororastuće s generacijskim vremenom između 9-18 sati. U ovom istraživanju željela se utvrditi geografska distribucija sporo i brzorastućih rizobija koje noduliraju soju na području Republike Hrvatske. Provedenim istraživanjem je utvrđeno da dominira populacija sporastućih rizobija. Prosječno generacijsko vrijeme izolata iznosilo je 15,4 sata. Najduže generacijsko vrijeme imao je soj S31 i ono je iznosilo 18,7 sati,. Molekularnim metodama je utvrđeno da soj S31 pripada vrsti *B. japonicum*, dok je najkraće generacijsko vrijeme imao soj S18/4 koji pripada vrsti *B. ottawaense* i ono je iznosilo 12,4 sata. Iako izolati S32 i S37 pripadaju različitim vrstama roda *Bradyrhizobium* utvrđeno je da imaju isto generacijsko vrijeme koje je iznosilo 18,2 sata.

Istraživanje koja su proveli Pastorino i sur. (2003) na kvržičnim bakterijama koje noduliraju soju utvrđeno je da pored spororastućih rizobija soju mogu nodulirati i brzorastuće.

Otkriveno je prisustvo *E. fredii* koji spada u skupinu brzorastućih rizobija. Slično istraživanje proveo je i Habibi i sur. (2017) u Afganistanu u kojem je potvrdio da soju može nodulirati i brzorastuća vrsta *E. fredii*.

### 5.3.5. PGPR karakterizacija izolata

Interakcije između bakterija koje naseljavaju tlo i biljaka mogu biti korisne, neutralne ili štetne za biljku. Posebna skupina bakterija tla koje poboljšavaju ishranu biljaka, reguliraju njihov hormonalni status, poboljšavaju otpornost na abiotičke stresove i pomažu u obrani od biljnih patogena i bolesti nazivaju se bakterije promotori biljnog rasta (engl. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).

Bakterije promotori biljnog rasta ispoljavaju svoj pozitivan učinak na rast i razvitak biljaka, te prinos preko niza različitih mehanizama koji mogu biti direktni ili indirektni, a uključuju povećanje sadržaja hraniva u rizosferi, biološku fiksaciju dušika, proizvodnju fitohormona, opskrbu biljaka pristupačnim fosforom te smanjenje štetnih utjecaja patogenih mikroorganizama sintezom različitih antibiotika (Yegorenkova i sur., 2016). PGPR bakterije također sintetiziraju egzopolisaharide koji značajno utječu na agregaciju tla i veličinu makropora povećavajući na taj količinu dostupne vode i hraniva u tlu.

Auksini su grupa biljnih hormona koji stimuliraju rast biljnih organa. Najčešće prisutan prirodni auksin je indol-3-octena kiselina (IAA). Pored biljaka koje imaju sposobnost sinteze IAA otkriveno je da različite vrste bakterija također posjeduju sposobnost sinteze ovog hormona. Danas se zna da postoji više različitih puteva biosinteze IAA kod bakterija, te da je sinteza ovog hormona slična sintezi kod biljaka (Yousef, 2018). Glavni prekursor sinteze je aminokiselina triptofan.

Provedenim istraživanjem je utvrđeno da su svi ispitivani sojevi imali sposobnost sinteze IAA. Koncentracija sintetizirane IAA nisu bile velike u usporedbi s drugim istraživanjima koja su provedena na rodu *Bradyrhizobium* i ostalim rodovima različitih rizobakterija. Najveće koncentracije IAA sintetizirala su dva soja (S18/4 i S32). Oba pripadaju vrsti *B. ottawaense*. Koncentracija sintetizirane IAA kod ova dva soja bila je viša od 2  $\mu\text{gml}^{-1}$ . Koncentracije sintetizirane IAA ostalih sojeva kretale su se od 1,6-1,8  $\mu\text{gml}^{-1}$ .

Masciarell i sur. (2014) proveli su sposobnost sinteze IAA kod vrste *Bacillus amyloliquefaciens* LL2012 i *B. japonicum* E109, pri čemu se pokazalo da vrsta *B. amyloliquefaciens* sintetizirala znatno veću količinu IAA (18,8  $\mu\text{gml}^{-1}$ ) u odnosu na vrstu

*B. japonicum* E109 (6,6 µgml<sup>-1</sup>). Zanimljivo istraživanje proveo je Dong i sur. (2017) koji su istraživali sposobnost sinteze IAA kod nekoliko sojeva roda *Bradyrhizobium*. U istraživanje su bili uključeni sojevi koji su bili tolerantni na povišene koncentracije soli, kao i oni koji su osjetljivi. Gotovo svi sojevi koji su bili tolerantni na povišene koncentracije soli producirali su veće koncentracije IAA, dok su osjetljiviji sojevi sintetizirali nešto manje količine indol-3-octene kiseline. Većina sojeva iz ovog istraživanja imala je sposobnost rasta na podlozi s vrlo visokim koncentracijama soli. Tako su sojevi S18/4 i S32 koji su u ovom istraživanju sintetizirali najveće količine IAA imali sposobnost rasta na podlozi s više od 3 % NaCl-a.

Sposobnost produkcije egzopolisaharida utvrđena je kod svih izolata. Većina izolata producirala je EPS u vrlo velikim količinama. Naime, određene bakterije sintetiziraju širok spektar multifunkcionalnih polisaharida. Proizvodnja egzopolisaharida (EPS) je općenito važna u formiranju biofilma. Učinkovita kolonizacija korijena biljaka mikroorganizmima koji proizvode EPS pomaže da esencijalne hranjive tvari cirkuliraju u biljku radi pravilnog rasta i razvoja, te zaštite od biljnih patogena. Svojstvo produkcije EPS-a od izuzetne je važnosti jer sintetizirani EPS djeluje poput signalnih molekula te pored Nod faktora i flavonoida igra vrlo važnu ulogu u uspostavljanju učinkovite simbioze s leguminozama pri čemu dolazi do formiranja kvržica na korijenju leguminoza u kojima se odvija proces simbiotske fiksacije dušika (Janczarek i sur., 2015). Sintetizirani EPS igra vrlo važnu ulogu u zaštiti od isušivanja, zaštiti od različitih abiotičkih stresova. Osim toga bakterije koje sintetiziraju EPS imaju mogućnost vezanja različitih kationa, uključujući Na<sup>+</sup>, te time direktno ublažavaju stres povezan s velikim razinama soli smanjujući razinu Na<sup>+</sup> dostupnog biljci za usvajanje (Gupta i sur., 2015).

Povećanje rasta putem enzimatske aktivnosti još je jedan od mehanizama koji koriste PGPR bakterije. Naime, određeni sojevi imaju sposobnost sinteze određenih enzima kroz čije djelovanje PGPR bakterije igraju vrlo značajnu ulogu u promicanju rasta biljaka, posebice u smislu zaštite biljaka od raznih biotičkih i abiotičkih stresova te suzbijanje patogenih mikroorganizama. U ovom istraživanju ispitala se sposobnost sinteze dva hidrolitička enzima (amilaza i proteaza). U istraživanju koje su proveli Masciarelli i sur. (2014) dva soja koja pripadaju rodu *Bradyrhizobium* također su pokazala sposobnost sinteze proteaze.

Dobiveni rezultati pokazuju da sposobnost sinteze amilaze nije imao ni jedan izolat, dok je proteazu producirao soj S32 koji pripada vrsti *B. ottawaense* i referentni soj *B. japonicum* 344. Tretiranjem sjemena soje ovim sojevima osigurala bi se značajna zaštita biljaka soje od patogenih mikroorganizama uključujući brojne gljive kao što su *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* i *Fusarium* spp., (Mufi i Bano, 2019).

Sposobnost fosfomobilizacije pokazao je samo izolat S32 koji pripada vrsti *B. ottawaense*, dok ostali izolati nisu imali sposobnost pretvorbe netopivih fosfata u topive. Fosfor nakon dušika igra najvažniju ulogu u ishrani biljaka. Igra vrlo važnu ulogu u gotovo svim glavnim metaboličkim procesima u biljci, uključujući fotosintezu, prijenos energije, projenos signala, biosintezu makromolekula i stanično disanje (Gupta i sur., 2015). U tlu je zastupljen u velikim količinama, no uglavnom u netopivom obliku te je kao takav nedostupan biljkama. Pojedine bakterije posjeduju sposobnost da nerazgradivi fosfor prevode u razgradivu formu pri čemu postaje dostupan biljkama. Glavni mehanizam kojim bakterije prevode netopive fosfate u topive temelji se na sintezi organskih kiselina male molekularne mase kao što su glukonska i limunska kiselina. Sintetizirane organske kiseline vežu fosfat s njegovim hidroksilnim i karboksilnim skupinama i time keliraju katione, te potiču zakiseljavanje tla, što rezultira otpuštanjem topivog fosfata (Kalayu, 2019).

#### 5.4. Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija

U cilju procjene simbiozne učinkovitosti i tolerantnosti na sušu postavljen je vegetacijski pokus u plasteniku u kojemu je korištena sorta soje Lucija. Radi se o vrloj ranoj sorti koju karakterizira visoki udio mahuna s četiri zrna. Dobro podnosi stres izazvan visokim temperaturama u vrijeme oplodnje i nalijevana zrna. Brzog je i ujednačenog početnog rasta u hladnijim proljećima kao i na težim tlima. Sjeme sorte Lucija inokulirano je s 12 odabranih sojeva i referentnim sojem *B. japonicum* 344 (tablica 27). U pokus su također bile uključene i nebakterizirane kontrole. Biljke su navodnjavane bezdušičnom hranjivom otopinom.

Budući da se pokusom htjela provjeriti i tolerantnost izolata na sušu kontrolne biljke su na navodnjavane do maksimalnog kapaciteta u kojem je sadržaj vode u supstratu iznosio 36 %, a tretman suše izazvan je prekidanjem navodnjavanja (V3 stadij) dok se sadržaj vode u supstratu nije spustio na ½ od maksimalnog vodnog kapaciteta (18 %).

Rezultati pokusa pokazali su da je sorta Lucija bila kompatibilne sa odabranim izolatima, te je zabilježena značajna raznolikost u simbioznoj učinkovitosti i tolerantnosti na sušu. Svi izolati su stvarali kvržice na korijenju biljaka soje koje su u presjeku bile crvene boje što ukazuje na učinkovitu fiksaciju dušika.

Statističkom obradom podataka o broju kvržica po biljci utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva, vlage te interakcije soja i količine vlage. Djelovanje vlage statistički je opravdano te je kod biljaka koje su primale optimalnu količinu vode utvrđen veći broj kvržica po biljci. Najveći broj kvržica po biljci utvrđen je primjenom autohtonih sojeva S1/5

(*B. japonicum*) izoliran s područja Vukovarsko-srijemske županije (Sopot), S16/5 *B. diazoefficiens* koji je izoliran s područja Bjelovarsko-bilogorske županije (Mlinski vinogradi II) te referentnog soja *B. japonicum* 344, dok su opravdane razlike utvrđene u odnosu na nebakteriziranu kontrolu (K).

Rezultati statističke obrade podataka o masi kvržica utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva, vlage i interakcije sojeva i vlage. Najveću masu suhe tvari kvržica po biljci tvorio je soj S37 koji pripada vrsti *B. japonicum*. Najmanji broj kvržica po biljci dao je soj S16/5 (*B. diazoefficiens*). Najveće mase utvrđene su primjenom sojeva S37 (*B. japonicum*), S32 (*B. ottawaense*) i S25/2 (*B. diazoefficiens*) kod biljaka soje koje su dobivale optimalnu količinu vode. Primjenom istih sojeva na biljke soje koje su bile podvrgnute tretmanu suše utvrđena je niža masa suhe tvari kvržica, pa tako za soj S37 masa suhe tvari kvržica smanjila za više od 15 %. Najmanja masa kvržica utvrđena je primjenom soja S16/5 (*B. diazoefficiens*) na biljke soje koje su bile podvrgnute suši gdje je došlo do smanjena mase suhe tvari kvržica za 35 % u odnosu na biljke koje su dobivale optimalnu količinu vode.

Statističkom obradom podataka mase suhe tvari biljke utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva, vlage i interakcije sojeva i vlage. Signifikantno veća masa suhe tvari biljaka utvrđena je primjenom svih autohtonih sojeva na biljke koje su dobivale optimalnu količinu vode u odnosu na biljke koje su bile tretirane istim sojevima u uvjetima suše.

Najveća masa suhe tvari biljke dobivena je primjenom soja S25/2 (*B. diazoefficiens*). Primjenom istog soja na biljke soje koje su bile podvrgnute tretmanu suše došlo je do smanjenja mase suhe tvari biljke za više od 30 %. Soj S25/2 bio je među sojevima koji su imali najveću masu suhe tvari kvržica, no nije imao najveći broj kvržica. Stvarao je velike kvržice koje su očito bile jako efikasne te se u njima aktivno odvijala fiksacija dušika koja je u konačnici dovela do povećanja ukupne mase biljke. Suprotno tome, najmanja masa suhe tvari biljke utvrđena primjenom soja S18/4 (*B. ottawaense*). Ovaj izolat stvarao je vrlo mali broj kvržica, ali se pokazao kao jedan od sojeva s vrlo velikom masom kvržica, što znači da su te kvržice bile velike što je dovelo do vrlo velike mase, no unatoč tome bile su neefikasne što se odrazilo i na masu suhe tvari biljke.

Najveća količina dušika u nadzemnom dijelu biljke utvrđena je primjenom soja S1/5 (*B. japonicum*). Ovo svojstvo se može povezati i s brojem kvržica budući da je soj S1/5 pored referentnog soja *B. japonicum* 344 bio jedan od sojeva s najvećim brojem kvržica. Iako je masa kvržica ovog soja bila mala, on je stvarao jako puno malih kvržica u kojima se aktivno odvijala fiksacija dušika, što se u konačnici odrazilo na veliku količinu dušika u nadzemnom dijelu biljke.

Najmanja količina dušika u nadzemnom dijelu biljke utvrđena je i primjenom soja S44 (*B. japonicum*). On je također bio među sojevima koji su stvarali najmanji broj kvržica i masu



suhe tvari kvržica. No, zanimljivo je da je imao dosta veliku masu suhe tvari biljke. To se može povezati s njegovim PGPR svojstvima, budući da je pokazao da ima sposobnost sinteze indol-3-octene kisline. Radi se o biljnom hormonu koji stimulira rast biljnih organa, što je u ovom slučaju soja S44 (*B. japonicum*) dovelo do povećanja ukupne mase biljke bez obzira što nije bio učinkovit u fiksaciji dušika.

Za ovo svojstvo je utvrđena statistički opravdana razlika interakcijom soja i vlage. Najveća količina dušika u nadzemnom dijelu biljke dobivena je primjenom soja S1/5 (*B. japonicum*) na biljke soje koje su dobivale optimalnu količinu vode, dok je primjenom istog soja na biljke koje su bile izložene tretmanu suše došlo do smanjenja količine dušika u nadzemnom dijelu biljke za oko 40 % iz čega se može zaključiti da nije jako tolerantan na sušu iako je *in vitro* pokazao vrlo veliku tolerantnost. Iz toga se može zaključiti da sojevi koji u kontroliranim uvjetima pokazuju veliku tolerantnost na sušu *in vivo* mogu imati nešto manju upravo zbog brojnih okolišnih faktora. Da li će neki soj razviti tolerantnost na sušu ne ovisi samo o njegovom genotipu, već također i o utjecaju okoline i njenih brojnih faktora.

Statističkom obradom podataka indeksa sadržaja klorofila u listu utvrđeno je statistički opravdano djelovanje sojeva i vlage. Najveći indeks klorofila u listu utvrđen je primjenom soja S3/5 (*B. japonicum*) koji je izoliran s područja Vukovarsko-srijemske županije (Retkovci). Zanimljivo je da je soj S3/5 bio među sojevima koji su stvarali najmanji broj kvržica i masu suhe tvari kvržica, ali je imao dosta veliku masu suhe tvari biljke. Također je bio među sojevima koji su imali malu količinu dušika u nadzemnom dijelu biljke. To se može objasniti time što je klorofil mjeran na trećem listu od vrha, a u ukupni dušik u čitavoj biljci. Budući da je dušik jako mobilan i biljka ga uglavnom usmjerava u mlade listove u kojima je i mjeran klorofil, moguće je da je to razlog tako velike količine klorofila. Koncentracija dušika u cijeloj biljci i koncentracija klorofila u jednom, relativno mladom listu, ne mora biti jako pozitivno korelirana. Ukupna koncentracija dušika u stanicama biljaka soje bila je manja jer su te biljke imale više stanica, ali istovremeno su u mladom lišću imale više klorofila zbog stimulacijskog učinka IAA koju je sintetizirao soj S3/5 i mobilizacije dušika iz starih dijelova biljke.

Najmanja zabilježena vrijednost indeksa klorofila u biljci zabilježena je primjenom soja S18/4 (*B. ottawaense*). Navedeni izolat imao je vrlo mali broj kvržica, ali je masa kvržica bila velika jer su kvržice bile dosta velike. Bez obzira na velike kvržice, one su bile neefikasne. Fiksacija dušika u njima je bila slaba, što se odrazilo i na malu količinu dušika u nadzemnom dijelu biljke, kao i na masu nadzemnog dijela biljke.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U svim svim istraživanim tlima kontinentalne Hrvatske utvrđeno je postojanje autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju soju, dok u tlima prikupljenim u mediteranskim regijama Hrvatske (Istra i Dalmacija) nisu pronađeni auhtoni sojevi rizobija.
2. Primjenom RAPD analize utvrđena je velika genotipska raznolikost unutar prirodnih populacija rizobija u tlima Hrvatske pri čemu su istraživani sojevi grupirani u 24 skupine.
3. Analizom sekvenci 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB* i *glnII* gena utvrđeno je postojanje do sada neidentificiranih vrsta rizobija u tlima kontinentalne Hrvatske. Po prvi put utvrđene su vrste *B. diazoefficiens* i *B. ottawaense*, kao i vrsta *B. japonicum* koja je ranije identificirana. Neki sojevi tvorili zasebne linije na filogenetskim stablima dovoljno udaljene od najbližih tipskih sojeva pa se može pretpostaviti da se radi o novim vrstama roda *Bradyrhizobium*.
4. Rezultati analize *nodC* gena pokazuju da svi sojevi izolirani iz tala kontinentalne Hrvatske u kojima se uzgaja soja pripadaju simbiovaru *glycinearum*.
5. Fenotipske karakteristike izoliranih sojeva ukazuju na njihovu varijabilnost, ali i na značajnu otpornost prema nepovoljnim čimbenicima kao što su povišene temperature, povećani sadržaj NaCl-a, niske pH vrijednosti kao i *in vitro* tolerantnost na sušu.
6. Biokemijska karakterizacija izolata pokazala je da su skoro svi izolati imali sposobnost sinteze ureaze, dok je na oksidaza i katalaza test bilo pozitivno jako malo izolata.
7. PGPR karakterizacija izolata pokazala je njihovu značajnu varijabilnost. Većina izolata imala je pozitivan test na neko od ispitivanih svojstava. Najviše se ističe soj S32 (*B. ottawaense*) koji je bio pozitivan na produkciju indol-3-octene kiseline, producirao je egzopolisaharide, otapao fosfate te sintetizirao litičke enzime (amilazu i proteazu). Tretiranjem sjemena soje ovim sojem značajno bi se stimulirao njen rast i razvitak, a sposobnost sinteze litičkih enzima doprinjeo bi njenoj zaštiti od patogena što bi smanjilo upotrebu kemijskih zaštitnih sredstava.

8. Sojevi S1/5 (*B. japonicum*) i S25/2 (*B. diazoefficiens*) odlikuju se najvećom simbioznom učinkovitošću u uvjetima suše.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Adhikari, D., Kaneto, M., Itoh, K., Suyama, K., Pokharel, B. B., and Gaihre, Y. K. (2012). Genetic diversity of soybean-nodulating rhizobia in Nepal in relation to climate and soil properties. *Plant Soil* 357: 131–145.
2. Ahmad M., Pataczek L., Hilger T., Zahir A., Hussain A., Rasche, F., Schafleitner, R., Solberg, S. (2018). Perspectives of Microbial Inoculation for Sustainable Development and Environmental Management. *Frontiers in Microbiology* 9: 2992-3018.
3. Al-Saedi S.A., Razaq I.B., Ali N.A. (2016). Effect of Soil Textural Classes on the Biological Nitrogen Fixation by *Bradyrhizobium* Measured by <sup>15</sup>N Dilution Analysis. *Baghdad Science Journal* 13(4): 734-744.
4. Andrews M., De Meyer S., James E. K., Stępkowski T., Hodge S., Simon M.F., Young J. (2018). Horizontal Transfer of Symbiosis Genes within and Between Rhizobial Genera: Occurrence and Importance. *Genes* 9(7): 321.
5. Anglade J., Bille G., Garnier J. (2015). Relationships for estimating N<sub>2</sub> fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere* 6: 1–24.
6. Arora N. K., Khare E., Singh S., Tewari S. (2018). Phenetic, genetic diversity and symbiotic compatibility of rhizobial strains nodulating pigeon pea in Northern India. *3 Biotech* 8(1): 52.
7. Aserse A. A., Woyke T., Kyrpides N.C., Whitman W.B., Lindström K. (2017). Draft genome sequences of *Bradyrhizobium shewense* sp. nov. ERR11T and *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071T. *Standards in Genomic Sciences* 12: 74.
8. Aserse A.A., Markos D., Getachew G., Yli-Halla M., Lindström K. (2019). Rhizobial inoculation improves drought tolerance, biomass and grain yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.) at Halaba and Boricha in Southern Ethiopia, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(4): 488-501.
9. 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.
10. Auch A.F., Jan M., Klenk H.P., Göker M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences* 2: 117-134.

11. Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 23(9): 1473.
12. Bailey V.L., Smith A.P., Tfaily M., Fansler S.J., Bond-Lamberty B. (2017). Differences in soluble organic carbon chemistry in pore waters sampled from different pore size domains. *Soil Biology and Biochemistry* 107: 133–43.
13. Bär M., von Hardenberg J., Meron E. Provenzale A. (2002). Modelling the survival of bacteria in drylands: the advantage of being dormant. *Proceedings Biological Sciences* 269: 937-942.
14. Bergey D.H., Harrison F.C., Breed R.S., Hammer B.W., Huntoon F.M. (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Prvo izdanje. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1-442.
15. Berrada H., Fikri-Benbrahim K. (2014) Taxonomy of the Rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal* 4: 616–639.
16. Besemer K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology* 166(10): 774–781.
17. Beye M., Fahsi N., Raoult D., Fournier P.E. (2017). Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New Microbe and New Infect* 22: 24-29.
18. Biswas B., Gresshoff P. (2014). The Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Sustainable Production of Biofuels. *International Journal of Molecular Sciences* 15(5): 7380–7397.
19. Blažinkov M. (2006). Genetička raznolikost prirodnih populacija *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* u tlima ekološkog područja sjeverozapadne Hrvatske. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
20. Blažinkov M., Uher D., Redžepović S., Maćešić D., Čolo J., Štafa Z., Sikora S. (2012). Učinkovitost primjene bakterizacije u uzgoju lucerne na području Bjelovarsko bilogorske županije. *Mljekarstvo* 62(3): 200-206.
21. Bonaldi K., Gourion B., Fardoux J., Hannibal L., Cartieaux F., Boursot M. (2010) Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with *Aeschynomene indica*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 760–770.
22. Bouznif B., Guefrachi I., Rodríguez de la Vega R.C., Hungria M., Mars M., Alunni B., Shykoff J.A. (2019). Phylogeography of the *Bradyrhizobium* spp. Associated with *Peanut*, *Arachis hypogaea*: Fellow Travelers or New Associations? *Frontiers in Microbiology* 10: 2041- 2054.

23. 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.
24. Bruning B., Logtestijn R., Broekman, R., Vos A., Gonzalez A.P., Rozema J. (2015). Growth and nitrogen fixation of legumes at increased salinity under field conditions: implications for the use of green manures in saline environments. *AoB Plants* 7: plv010.
25. Bruning B., Rozema J. (2013). Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany* 92: 134-143.
26. Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., Bukin S.V., Zakharenko A.S., Zemskaya T.I. (2018). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data* 6: 190007.
27. Cardoso A.A., Andraus M.P., Borbab T.C.O., Martin-Didonet C.C.G., Ferreira E.P. (2017). Characterization of rhizobia isolates obtained from nodules of wild genotypes of common bean. *Brazilian Journal of Microbiology* 48: 43-50.
28. Castellane T.C.L., Persona M.R., Campanharo J.C., Lemos E.G. (2015). Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 74: 515-522.
29. Chaiharn M., Chunnhaleuchanon S., Kozo A., Lumyong S. (2008). Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *Current Applied Science and Technology* 8(1): 18-23.
30. Chandra S., Askari K., Kumari M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16(2): 581-586.
31. Chen H., Liu X., Zhang H., Yuan X., Gu H., Cui X., Xin Chen X. (2018). Advances in salinity tolerance of soybean: Genetic diversity, heredity, and gene identification contribute to improving salinity tolerance. *Journal of Integrative Agriculture* 17(10): 2215-2221.
32. Chen L.S., Figueredo A., Pedrosa F.O., Hungria M. (2000). Genetic Characterization of Soybean Rhizobia in Paraguay. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11): 5099–5103.
33. Chibeba A.M., Kyei-Boahen S., Guimaraesa M.F., Nogueira M.A., Hungria M. (2017). Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium*

- strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 246: 291-305.
34. Chidebe I.N., Jaiswal S.K., Dakorab F.D. (2017). Distribution and Phylogeny of Microsymbionts Associated with Cowpea (*Vigna unguiculata*) Nodulation in Three Agroecological Regions of Mozambique. *Applied and Environmental Microbiology* 84(2): e01712-17.
  35. Clua, J., Roda, C., Zanetti, M.E., Blanco, F.A. (2018). Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Genes* 9: 125.
  36. De Lajudie P.M., Andrews M., Ardley J., Eardly B., Jumas-Bilak E., Kuzmanović N., Lassalle F., Lindström K., Mhamdi R., Martínez-Romero E., Moulin L., Mousavi S.A., Nesme X., Peix A., Puławska J., Steenkamp E., Stepkowski T., Tian C.F., Vinuesa P., Wei G., Willems A., Zilli J., Young P. (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 7: 37-49.
  37. Dekak A., Chabi R., Menasria T., Benhizia Y. (2018). Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *Journal of advanced research* 14: 35–42.
  38. Delamuta J.R.M., Ribeiro R.A., Menna P., Bangel E.V., Hungria M. (2012). Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(2): 698-710.
  39. Deshmukh V.V., Mane S.S., Gade R.M., Ingle R.W., Josh M.S. (2013). Biochemical studies of *Bradyrhizobium japonicum* isolates. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences* 4(1): 53-57.
  40. Dong R., Zhang J., Huan H., Bai C., Chen Z., Liu G. (2017). High Salt Tolerance of a *Bradyrhizobium* Strain and Its Promotion of the Growth of *Stylosanthes guianensis*. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1625-1642.
  41. 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.
  42. Duran D., Rey L., Sánchez-Cañizares C., 1 B. Jorrín B., Imperial J., Ruiz-Argüeso T. (2014). Biodiversity of Slow-Growing Rhizobia: The Genus *Bradyrhizobium*. *Beneficial Plant-microbial Interactions*. 20-43. An Imprint of Edenbridge Ltd, British Channel Islands, Enfield, New Hampshire.

43. Efrose R.C., Rosu, C.M., Stedel C. (2018). Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania. *Antonie van Leeuwenhoek* 111, 135–153.
44. Egamberdieva D., Wirth S., Jabborova D., Räsänen L.A., Liao H. (2017). Coordination between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture, *Journal of Plant Interactions* 12(1): 100-107.
45. Espejo R.T., Plaza N. (2018). Multiple Ribosomal RNA Operons in Bacteria; Their Concerted Evolution and Potential Consequences on the Rate of Evolution of Their 16S rRNA. *Frontiers in Microbiology* 9: 1232-1238.
46. FAO (2017) FAOSTAT database collections. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
47. FAO (2020) FAOSTAT database collections. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
48. Farooq M., Basra S.M.A., Wahid A., Cheema Z.A., Cheema M.A., Khaliq A. (2008). Physiological Role of Exogenously Applied Glycinebetaine to Improve Drought Tolerance in Fine Grain Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(5): 325-333.
49. Fathi A., Tari D.B. (2016). Effect of Drought Stress and its Mechanism in Plants. *International Journal of Life Sciences* 10(1): 1-6.
50. Fatima Z., Bano A., Sial R., Aslam M. (2008). Response of chickpea to plant growth regulators on nitrogen fixation and yield. *Pakistan Journal of Botany* 40(5): 2005-2013.
51. Ferguson B.J., Lin M.H., Peter M. Gresshof P.M. (2013). Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signaling and Behavior* 8(3): e23426.
52. Fernández-Calleja M., Monteagudo A., Casas A.M., Boutin C., Pin, P.A., Morales F., Igartua E. (2020). Rapid On-Site Phenotyping via Field Fluorimeter Detects Differences in Photosynthetic Performance in a Hybrid—Parent Barley Germplasm Set. *Sensors* 20: 1486-1501.
53. Filipović L. (2016). Modifikacija biopristupačnosti bakra i kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari i saliniteta tla. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
54. Finn S., Condell O., McClure P., Amézquita A., Fanning S. (2013). Mechanisms of survival, response and source of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology* 4: 331.
55. Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (1932). Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin, Madison, WI, p 343.



56. Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M., Simon D., Cartieaux F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Mangenot S., Segurens B., Dossat C., Franck W.L., Chang W.S., Saunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich D., Verméglio A., Médigue C., Sadowsky M. (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*. 1;316(5829):1307-12.
57. Grönemeyer J.L., Bünger W., Reinhold-Hurek B. (2017). *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of *Lablab purpureus*, hyacinth bean, in Namibia. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 67(12): 4884-4891.
58. Gubry-Rangin C., Béna G., Cleyet-Mare J.C., Brune B. (2013). Definition and evolution of a new symbiovar, sv. *rigiduloides*, among *Ensifer meliloti* efficiently nodulating *Medicago* species. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 490–496.
59. Guerrouj K., Ruiz-Diez B., Chahboune R., Ramirez-Bahena M.H., Abdelmoumen H., Quinones M.A., El Idrissi M.M., Velazquez E., Fernandez-Pascual M., Bedmar E.J., Peixd A. (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic Applied Microbiology* 36: 218–223.
60. Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K., Singh V. (2015). Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial and Biochemical Technology* 7: 96-102.
61. Gyaneshwar P., Hirsch A.M., Moulin L., Chen W.M., Elliott G.N., Bontemps C., los Santos P.E., Gross E., dos Reis F.B., Sprent J.I., Young J.P.W., James E.K. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host Range, and future prospects. *Molecular Plant Microbe Interaction* 24: 1276–1288.
62. Gyogluu C., Jaiswal S.K., Kyei-Boahen S., Dakora F.D. (2018). Identification and distribution of microsymbionts associated withsoybean nodulation in Mozambican soils. *Systematic and Applied Microbiology* 41: 506–515.
63. Habibi S., Ayubi A. G., Ohkama-Ohtsu N., Sekimoto H., Yokoyama, T. (2017). Genetic Characterization of Soybean Rhizobia Isolated from Different Ecological Zones in North-Eastern Afghanistan. *Microbes and environments* 32(1): 71–79.
64. Hameed R.A., Hussain N.N., Aljibouri A.M. (2016). Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Alfalfa in Iraq as a Source of More Efficient Drought Tolerance Strains. *Journal of Molecular Biology Research* 6(1).

65. Harding T., Brown M.W., Simpson A.G., Roger A.J. (2016). Osmoadaptive strategy and its molecular signature in obligately halophilic heterotrophic protists. *Genome Biology and Evolution* 8: 2241-2248.
66. Harris K.A., Hartley J.C. (2003). Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Medical Microbiology* 52: 685–691.
67. Herridge D., Rose A.(2000). Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crops Research* 65(2–3): 229-248.
68. Herridge D.F., Peoples M., Boddey R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311: 1–18.
69. Hoffman B.M., Lukoyanov D., Yang Z.Y., Dean D.R., Seefeld L.C. (2014). Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *Chemical Reviews* 114: 4041–4062.
70. HRN ISO 10390:2005
71. HRN ISO 10390:2005
72. HRN ISO 11464:2009
73. HRN ISO 138781261:2004
74. Huić Babić K. (2011). Utjecaj simbiozne učinkovitosti autohtonih sojeva *Sinorhizobium meliloti* na transformacije dušika u tlu i biljci. Doktorski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
75. Hungria M., Franchini J.C., Campo R.J., Crispino C.C., Moraes J. Z., Sibaldelli R.N.R., Mendes I.C., Arihara J. (2006). Nutrition azotée du soya au Brésil: contributions de la fixation biologique de l'azote et des fertilisants azotés au rendement en grains. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 927–939.
76. Hungria M., Nogueira M.A., Araujo R.A. (2015). Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability, *American Journal of Plant Sciences* 6: 811-817.
77. Hungria M., Vargas M.A.T. (2000). Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65: 151-164.
78. Igiehon N.O., Babalola O.O. (2018). Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15: 574-599.
79. Janczarek M., Rachwał K., Ciesla J., Ginalska G., Bieganowski A. (2015). Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant Soil* 388: 211–227.

80. Jasniewski A.J., Sickerman N.S., Hu Y., Ribbe M.W. (2018). The Fe Protein: An Unsung Hero of Nitrogenase. *Inorganics* 6(1): 25-39.
81. Johnson J.S., Spakowicz D.J., Hong B. i sur. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 10: 5029- 5040.
82. Josipović A. (2019). Regulatorni mehanizmi fotosintetske učinkovitosti genotipova soje tijekom različitih faza razvoja pod utjecajem stresa izazvanog sušom. Disertacija. Poljoprivredni institut Osijek.
83. Kabaddj A., Makoudi B., Mouradi M., Pauly N., Frendo P., Ghoulam C. (2017). Physiological and biochemical responses involved in water deficit tolerance of nitrogen-fixing *Vicia faba*. *PLoS ONE* 12(12): e0190284.
84. Kakraliya S.K., Singh, U., Bohra A., Choudhary K.K., Kumar S., Meena R.S., Jat M.L. (2018). Nitrogen and Legumes: A Meta-analysis. *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*, Springer Nature, Singapore Pte Ltd.
85. Kalayu G. (2019). Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy* 7: 4917256.
86. Kalita M., Małek W. (2019). The *ftsA* gene as a molecular marker for phylogenetic studies in *Bradyrhizobium* and identification of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of applied genetics*, 60(1): 123–126.
87. Kalloniati C., Tsikou D., Lampiri V., Fotelli M.N., Rennenberg H., Chatzipavlidis I., Fasseas C., Katinakis P., Flemetakis E. (2009). Characterization of a *Mesorhizobium loti* alpha-type carbonic anhydrase and its role in symbiotic nitrogen fixation. *Journal of bacteriology* 191(8): 2593–2600.
88. Kaneko T., Maita H., Hirakawa H., Uchiike N., Minamisawa K., Watanabe A., Sato S. (2011). Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. *Genes* 2: 763-787.
89. Karmakar K., Rana A., Rajwar A., Sahgal M., Johri B.N. (2015). Legume-Rhizobia Symbiosis Under Stress. *Plant Microbes Symbiosis Applied Facets* 241-258.
90. Kelly S., Radutoiu S., Stougaard J. (2017). Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 39: 152–158.
91. Kereša S., Barić M., Horvat M., Habuš Jerčić I. (2008). Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu i njihova genska osnova kod pšenice. *Sjemenarstvo* 25(1): 35-45.
92. Kibido T., Kunert T., Makgopa M., Greve M. (2019). Improvement of rhizobium-soybean symbiosis and nitrogen fixation under drought. *Food and Energy Security* 9: 177- 191.
93. Kimes N.E., López-Pérez M., Flores-Félix J.D., Ramírez-Bahena M.H., Igual J.M., Peix A., Rodriguez-Valera F., Velázquez E. (2015). *Pseudorhizobium pelagicum*

- gen. nov., sp. nov. isolated from a pelagic Mediterranean zone. *Systemic and Applied Microbiology* 38: 293–299.
94. Klein D.J., Moore P.B., Steitz T.A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *Journal of Molecular Biology* 340(1): 141-77.
  95. Koskey G., Mburu S.W., Kimiti J.M., Ombori O., Maingi J.M., Njeru E.M. (2018). Genetic Characterization and Diversity of *Rhizobium* isolated from root nodules of Mid-Altitude Climbing Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Frontiers in Microbiology* 9: 968-980.
  96. Koziel M., Gebala B., Martyniuk S. (2013). Response of Soybean to Seed Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and with mixed Inoculants of *B. japonicum* and *Azotobacter chroococcum*. *Polish Journal of Microbiology* 62(4): 457–460.
  97. Kozumplik V., Pejić I. (2012). Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
  98. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
  99. Kunert K.J., Vorster B.J., Fenta B.A., Kibido T., Dionisio G., Foyer C.H. (2016). Drought Stress Responses in Soybean Roots. *Frontiers in Plant Sciences* 7: 1015-1022.
  100. 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.
  101. Kuzmanović N., Smalla K., Gronow S., Pulawska J. (2018). *Rhizobium tumorigenes* sp. nov., a novel plant tumorigenic bacterium isolated from cane gall tumors on thornless blackberry. *Scientific Reports* 8: 9051-9059.
  102. Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. *Microbiological Research* 169: 2–17.
  103. Lebre P.H., Maayer P.D., Cowan D.A. (2017). Xerotolerant prokaryotes: surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology* 15(5): 285-296.
  104. Leggett M., Diaz-Zorita M., Koivunen M., Bowman R., Pesek R., Stevenson C., Todd Leister T. (2017). Soybean Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina. *Agronomy Journal* 109(3): 1031-1038.

105. Lehnert N., Dong H.T., Harland J.B., Hunt A.P., White C.J. (2018). Nature Reviews Chemistry 2: 278–289.
106. Leite J., Passos S.R., Simoes-Araujo J.L., Rumjanek N.G., Xavier G.R., Zilli J.E. (2018). Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 49: 703-713.
107. Li Q.Q., Wang E.T., Zhang Y.Z., Zhang Y.M., Tian C.F., Sui X.H. (2011). Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of Glycine max grown in Hebei Province, China. Microbial Ecology 61: 917–931.
108. Li Y.H., Wang R., Sui X.H., Wang E.T., Zhang X.X., Tian C.F., Chen W.F., Chen W.X. (2019). *Bradyrhizobium nanningense* sp. nov., *Bradyrhizobium guangzhouense* sp. nov. and *Bradyrhizobium zhanjiangense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut in Southeast China. Systemic and Applied Microbiology 42(5): 126002.
109. Lindström K., Aserse A.A., Mousavi S.A. (2015) Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. In Biological Nitrogen Fixation. De Bruijn, F.J. Hoboken, NJ: Wiley 21–38.
110. Lindstrom K., Mousavi S.A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. Microbial Biotechnology 0(0): 1–22.
111. Ling J., Wang H., Wu P., Li T., Tang Y., Naseer N., Zheng H., Masson-Boivin C., Zhong Z., Zhu J. (2016). Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113(48): 13875–13880.
112. Liu Y., Bowman B.C., Hu Y.G., Liang X., Zhao W., Wheeler J., Klassen N., Bockelman H., Bonman J.M., Chen J. (2017). Evaluation of Agronomic Traits and Drought Tolerance of Winter Wheat Accessions from the USDA-ARS National Small Grains Collection. Agronomy 7: 51.
113. Liu Z., Chen W., Jiao S., Wang X., Fan M., Wang E., Wei G. (2019). New Insight into the Evolution of Symbiotic Genes in Black Locust-Associated Rhizobia. Genome Biology and Evolution 11(7): 1736–1750.
114. 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.
115. Mahmud K., Makaju S., Ibrahim R., Missaoui A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. Plants 9: 97.

116. Mao G., Turner M., Yu O., Subramanian S. (2013). miR393 and miR164 influence indeterminate but not determinate nodule development. *Plant Signaling and Behavior* 8: e26753.
117. Marczak M., Mazur A., Koper P., Zebracki K., Skorupska A. (2017). Synthesis of Rhizobial Exopolysaccharides and Their Importance for Symbiosis with Legume Plants. *Genes* 8(12): 360- 384.
118. Martin B., Schwab E. (2013). Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *International Journal of Biology* 5(1):32-45.
119. Masciarelli O., Lianes A., Luna V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research* 169: 609–615.
120. Meena A.K., Meena M.R. (2019). Nitrogen Fixing Trees: Nature's Solution to Curing Nitrogen Deficiency. *Indian Farmer* 6(3): 181-186.
121. Meng L.L., Song J.F., Wen J., Zhang J., Wei J.H. (2016). Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. *Photosynthetica* 54 (3): 414-421.
122. Milošević N., Marinković J. (2015). Uloga mikroorganizama u adaptaciji poljoprivrednih biljnih vrsta na abiotičke stresove. *Zbornik referata sa 45. Savetovanja agronoma Srbije* 155- 162.
123. Morales F., Ancin M., Fakhret D., Gonzalez-Torralba J., Gamez A.L., Seminario A., Soba D., Mariem S.B., Garriga M., Aranjuelo I. (2020). Photosynthetic Metabolism under Stressful Growth Conditions as a Bases for Crop Breeding and Yield Improvement. *Plants* 9(1): 88-111.
124. 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.
125. Mufti R., Bano A. (2019). PGPR-induced defense responses in the soybean plant against charcoal rot disease. *European Journal of Plant Pathology* 155: 983–1000.
126. Muleta D., Ryder M.H., Denton M.D. (2017). The potential for rhizobial inoculation to increase soybean grain yields on acid soils in Ethiopia. *Soil Science and Plant Nutrition* 63(5): 441-451.
127. Naamala J., Jaiswal S. K., Dakora F. D. (2016). Antibiotics Resistance in *Rhizobium*: Type, Process, Mechanism and Benefit for Agriculture. *Current Microbiology*. 72: 804-816.
128. Naamala, J., Jaiswal, S.K., Dakora, F.D. (2016) Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils. *Systematic and Applied Microbiology* 39(5): 336–344.

129. Naseem H., Ahsan M., Shahid M.A., Khan N. (2018). Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology* 58: 1009- 1022.
130. Ntambo M.S., Chilinda I.S., Taruvunga A., Hafeez S., Anwar T., Sharif R., Chambi C., Kies L. (2017). The effect of rhizobium inoculation with nitrogen fertilizer on growth and yield of soybeans (*Glycine max* L.). *International Journal of Biosciences* 10(3): 163-172.
131. O'Callaghan M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 5729–5746.
132. Okamura K., Hisada, T., Takata K., Hiraishi A. (2013). Relationships between 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer DNA and genomic DNA similarities in the taxonomy of phototrophic bacteria. *Journal of Physics* 433.
133. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 197- 213.
134. Oliveira D.P., Alves de Figueiredo M., Soares L.B., Teixeira O.H., Dias Martins F.A., Rufini M., Chain C.P., Pereira Reis P., Ramalho de Moraes A., Moreira F.M., Andrade M.J.B. (2017). Acid tolerant *Rhizobium* strains contribute to increasing the yield and profitability of common bean in tropical soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 17 (4): 922-934.
135. Onat, N., Bakal, H., Gulluoglu, L., Arioglu, H. (2017). The effects of high temperature at the growing period on yield and yield components of Soybean [*Glycine max* (L.) *merr*] varieties. *Field Crops* 22(2): 178-186.
136. Ormeno-Orrillo E., Rartinez-Romero E. (2019). A Genomotaxonomy View of the *Bradyrhizobium* Genus. *Frontiers in Microbiology* 10: 1334- 1347.
137. Osmolovskaya N., Shumilina J., Kim A., Didio A., Grishina T., Bilova T., Keltsieva O.A., Zhukov V., Tikhonovich I., Tarakhovskaya E., Frolov A., Wessjohann L.A. (2018). Methodology of Drought Stress Research: Experimental Setup and Physiological Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 4080- 4414.
138. Passaglia L.M.P. (2017). *Bradyrhizobium elkanii* nod regulon: insights through genomic analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3): 703-716.
139. Pastorino G.N., Martinez Alcántara V., Balatti P.A. (2003). Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* [L.] *Merr*) by a multiplex PCR reaction. *FEMS Microbiology Letters* 229(2): 153–158.

140. Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* 2(2): 1000131.
141. Paul S., Wildhagen H., Janz D., Polle A. (2017). Drought effects on the tissue- and cell-specific cytokinin activity in poplar. *AoB Plants* 10(1): plx067.
142. 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.
143. Peoples, M.B. (2008). Biological nitrogen fixation by food legumes. In M. C. Kharkwal, editor. *Food legumes for nutritional security and sustainable agriculture. Proceedings 4th International Food Legumes Research Conference (IFLRC-IV)*, New Delhi, India. Indian Society of Genetics and Plant Breeding, New Delhi, India.
144. Pohajda I. (2011). Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva *Rhizobium* spp. izoliranih iz tala Zagrebačke županije. Disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
145. Pohajda I., Huić Babić K., Rajnović I., Kajić S., Sikora S. (2016). Genetic diversity and symbiotic efficiency of indigenous common bean rhizobia in Croatia. *Food technology and biotechnology* 54 (4), 468-474.
146. Poljak M., Dubravec K.D., Redžepović S., Sikora S., Britvec M. (1998). The effect of the symbiotic bacteria on the photosynthetic pigments level of the soybean (*Glycine max* L.) cultivars. 2nd Conference on Progress in Plant Sciences from Plant Breeding to Growth Regulation Book of Abstracts. 104-104 .
147. Portier P., Saux M.F., Mougél C., Lerondelle C., Chapulliot D., Thioulouse J., Nesme X. (2006). Identification of Genomic Species in *Agrobacterium* Biovar 1 by AFLP Genomic Markers. *Applied and Environmental Microbiology* 7123–7131.
148. Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A. (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146: 1679–1692.
149. Purcell L.C., Salmeron M., Ashlock L. (2014). Soybean Growth and Development. *Arkansas Soybean Production Handbook*. University of Arkansas System, SAD.
150. Rajnović I. (2017). Bioraznolikost i simbiozna učinkovitost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju grah (*Phaseolus vulgaris* L.). Disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
151. Ramírez M.D.A., España M., Aguirre C., Kojima K., Ohkama-Ohtsu N., Sekimoto H., Tadashi Yokoyama T. (2019). *Burkholderia* and *Paraburkholderia* are Predominant Soybean Rhizobial Genera in Venezuelan Soils in Different Climatic and Topographical Regions. *Microbes and Environments* 34(1): 43-58.
152. 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.
153. Rampino P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G. (2007). Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell and Environment* 29(12): 2143-52.
  154. Redžepović S., Čolo J., Blažinkov M., Poljak M., Pecina M., Sikora S., Šeput M. (2006). Effect of inoculation and growth regulator on soybean yield and photosynthetic pigment content. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71(3): 75-80.
  155. Redžepović S., Strunjak R., Varga B., Heneberg R., Slamić F., Bašić F., Šeput 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.
  156. Remigi P., Zhu J., Young J.P.W., Masson-Boivin C. (2016). Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends Microbiology* 24: 63–75.
  157. Rittershaus E.S., Baek S.H., Sasseti C.M. (2013). The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe* 13: 643-651.
  158. Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Soto J., Velázquez E., Frank Dazzo F., Martínez-Molina E., Mateos P.F. (2012). Development of Functional Symbiotic White Clover Root Hairs and Nodules Requires Tightly Regulated Production of Rhizobial Cellulase CelC2. *MPMI* 24(7): 798–807.
  159. Rodrigues J.P.P., de Paula R.M., Rennó L.N., Fontes M.M.S., Machado A.F., Valadares F., Huhtanen P., Marcondes M.I. (2017). Short-term effects of soybean oil supplementation on performance, digestion, and metabolism in dairy cows fed sugarcane-based diets. *Journal of Dairy Science* 100 (6): 4435-4447.
  160. 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.
  161. Roy S., Liu W., Nandety R.S., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I., Frugoli J., Dickstein R., Udvardia M.K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* 32: 15–41.
  162. Sanko-Sawczenko I., Lotocka B., Mielecki J., Rekosz-Burlaga H., Czarnocka W. (2019). Transcriptomic Changes in *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* Root

- Nodules during Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1204- 1224.
163. Santos M.L., Berlitz D.L., Wiest S.L.F., Schünemann R., Knaak N., Fiuza L.M. (2018). Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. *Agriculture, Agribusiness and Biotechnology* 61: e18160431.
  164. Sawada H., Kuykendal L.D., Young .JM. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology* 49: 155–179.
  165. Schimel J.P. (2018). Life in Dry Soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Annual Reviews* 49: 409–432.
  166. Schneijderberg M., Schmitz L., Cheng X., Polman S., Franken C., Geurts R., Ton Bisseling T. (2018). A genetically and functionally diverse group of non-diazotrophic *Bradyrhizobium* spp. colonizes the root endophytic compartment of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*18: 61-90.
  167. Schwember A.R., Schulze J., Pozo A., Cabeza R.A. (2019). Regulation of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules. *Plants* 8: 333-351.
  168. Shah S. H., Houborg R., McCabe M.F. (2017). Response of Chlorophyll, Carotenoid and SPAD-502 Measurement to Salinity and Nutrient Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.) *Agronomy* 7: 61- 82.
  169. Shamseldin A., Abdelkhalek A., Sadowsky M.J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis* 71: 91-109.
  170. Shavrukov Y., Kurishbayev A., Jatayev S., Shvidchenko V., Zotova L., Koekemoer F., de Groot S., Soole K., Langridge P. (2017). Early Flowering as a Drought Escape Mechanism in Plants: How Can It Aid Wheat Production. *Frontiers in Plant Science* 17(8): 1950-1958.
  171. Shrivastava P., Kumar R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22: 123-131.
  172. Siegbahn E.M. (2019). The mechanism for nitrogenase including all steps. *Physical Chemistry Chemical Physics* 21: 15747—15759.
  173. Sikora S. (1996). Simbiozna učinkovitost prirodne populacije *Bradyrhizobium japonicum* izolirane iz nekih tala zapadne Slavonije, Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
  174. 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.

175. Sikora S., Redžepović S., Bradić M. (2002). Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR Microbiological Research 157(3): 213–219.
176. Silva J.R., Alexandre A., Brígido C., Oliveira S. (2017). Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia? AIMS Microbiology, 3(3): 365-382.
177. Singh A., Chauhan P.S. (2017). Biofilms in Plant and Soil Health, Prvo izdanje. Edited by Iqbal Ahmad and Fohad Mabood Husain. John Wiley & Sons Ltd. Published 2017 by John Wiley & Sons Ltd.
178. Singh J.S., Koushal S., Kumar A., Vimal S. R., Gupta V. K. (2016). Book review: microbial inoculants in sustainable agricultural productivity-Vol. II: functional application. Frontiers in Microbiology 7:2105.
179. Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath (1980). Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 30: 225-420.
180. Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York.
181. Sprent J.I., Ardley J., James E.K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. New Phytologist 215: 40–56.
182. Staden R., Judge D.P., Bonfield J.K. (2003) Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: Krawetz S.A., Womble D.D. (eds) Introduction to Bioinformatics. Humana Press, Totowa, NJ
183. Stepkowski T., Banasiewicz J., Granada C.E., Andrews M., Passaglia L.M.P. (2018). Phylogeny and Phylogeography of Rhizobial Symbionts Nodulating Legumes of the Tribe *Genisteeae*. Genes 9: 163- 188.
184. Stepkowski T., Watkin E., McInnes A., Gurda D., Gracz J., Steenkamp E.T. (2012). Distinct *Bradyrhizobium* [corrected] communities nodulate legumes native to temperate and tropical monsoon Australia. Molecular Phylogenetics and Evolution 63: 265–277.
185. Strunjak R. (1965). Prilog poznavanja antigene strukture domaćih sojeva *Rhizobium*-a djeteline i lucerne, Doktorska disertacija, Zagreb.
186. Tampakaki A.P., Fotiadis C.T., Georgia Ntatsi G., Savvas D. (2017). Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenousslow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. Systematic and Applied Microbiology 40: 179–189.
187. Thuita M., Vanlauwe B., Mutegi B., Masso C. (2018). Reducing spatial variability of soybean response to rhizobia inoculants in farms of variable soil fertility in Siaya County of western Kenya. Agriculture, Ecosystem and Environment 261: 153–160.

188. Uchiumi T., Ohwada T., Itakura M., Mitsui H., Nukui N., Dawadi P., Kaneko T., Tabata S., Yokoyama T., Tejima K., Saeki K., Omori H., Hayashi M., Maekawa T., Sriprang R., Murooka Y., Tajima S., Simomura K., Nomura M., Suzuki A., Shimoda Y., Sioya K., Abe M., Minamisawa K. (2004). Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *Journal of Bacteriology* 186(8): 2439-48.
189. Ulrich D.E.M., Sevanto S., Ryan M., Albright M.B.N., Johansen R.B., Dunbar J.M. (2019). Plant-microbe interactions before drought influence plant physiological responses to subsequent severe drought. *Scientific Reports* 9: 249- 259.
190. Ulzen J., Abaidoo R. C., Mensah N. E., Masso C., Abdel Gadir A. H. (2016). *Bradyrhizobium* inoculants enhance grain yields of soybean and cowpea in Northern Ghana. *Frontiers in Plant Science* 7:1770.
191. Unkovich M.J., Pate J.S. (2000). An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field Crops Research*. 65: 211–228.
192. Vermeulen S.J., Campbell B.M., Ingram J.S.I. (2012). Climate change and food system. *Annual Review of Environment and Resources* 37: 195-222.
193. Vincent J.M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook No 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
194. Vos M., Wolf A.B, Jennings S.J., Kowalchuk G.A. (2013). Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol Reviews* 37: 936 –954.
195. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J. Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407-4414.
196. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008): *Soja*. Poljoprivredni institut Osijek.
197. Vriezen, J.A.C., de Bruijn, F.J., Nusslein, K. (2007). Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 3451–3459.
198. Vukadinović V., Vukadinović V. (2011): *Ishrana bilja*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. 442.
199. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Manjari Shrivastava M., Ali Skz A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growthpromoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 184: 13–24.
200. Wade T.K., Le Quere A., Laguerre G., N'Zoue A., Ndione J. A., Dorego F. (2014). Eco-geographical diversity of cowpea bradyrhizobia in Senegal is marked by dominance of two genetic types. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 129–139.

201. Wagner E.G., Simons, R.W. (1994). Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annual Review of Microbiology* 48: 713-42.
202. Wallenstein M.D., Weintraub M.N. (2008). Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2098–2106.
203. Wang C., Linderholm H.W., Song Y., Wang F., Liu Y., Tian J., Xu J., Song Y., Ren G. (2020). Impacts of Drought on Maize and Soybean Production in Northeast China During the Past Five Decades. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17: 2459.
204. Wilhite D., Pulwarty R.S. (2017). *Drought and Water Crises. Integrating Science, Management, and Policy*, 2. Izdanje. CRC Press
205. Willems A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287: 3–14.
206. Willems A., Diognon-Bourcier F., Coopman R., Hoste B., de Lajudie P., Gillis M. (2000). AFLP Fingerprint Analysis of *Bradyrhizobium* Strains Isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* Species. *Systemic and Applied Microbiology* 23(1): 137-147.
207. Wilpieszski R.L., Aufrecht J.A., Retterer S.T., Sullivan M.B., Graham D.E., Pierce E.M., Zablocki O.D., Palumbo A.V., Eliasa D.A. (2019). Soil Aggregate Microbial Communities: Towards Understanding Microbiome Interactions at Biologically Relevant Scales. *Applied and Environmental Microbiology* Volume 85(14): e00324-19.
208. 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.
209. Wojcik M., Kalita M., Matek W. (2019). Numerical analysis of phenotypic properties, genomic fingerprinting, and multilocus sequence analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lembotropis nigricans* of the tribe *Genisteeae*. *Annals of Microbiology* 69: 1123–1134.
210. Wu Y., Cai P., Jing X., Niu X., Ji D., Ashry N.M., Gao C., Huang Q. (2019). Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. *Environment International* 132: 105116.
211. Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011) Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology* 32(5): 667–685.

212. Yan F., Di S., Rojas Rodas F., Rodriguez Torrico T., Murai Y., Iwashina T., Anai T., Ryoji Takahashi R. (2014). Allelic variation of soybean flower color gene W4 encoding dihydroflavonol 4-reductase 2. *BMC Plant Biology* 14(1): 58.
213. Yao Y., Wnag R., Lu J.K., Sui X.H., Wanf E.T., Chen W.X. (2014). Genetic Diversity and Evolution of Bradyrhizobium Populations Nodulating Erythrophleum fordii, an Evergreen Tree Indigenous to the Southern Subtropical Region of China. *Applied and Environmental Microbiology* 80(19): 6184 – 6194.
214. Yegorenkova I.V., Tregubova K.V., Burygin G.L., Matora L.Y., Ignatov V.V. (2016) Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. *Canadian Journal of Microbiology* 62: 279-285.
215. Yoshikawa T., Ozawa S., Sentoku N. (2013). Change of shoot architecture during juvenile-to-adult phase transition in soybean. *Planta* 238: 229–237.
216. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A. (2001). Revision of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(1): 89-103.
217. Young J.P.W., Haukka K.E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist* 133: 87–94.
218. Yousef N.M.H. (2018). Capability of Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria* (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of Biological Research*. 4: 174-182.
219. Youseif S., Abd El-Megeed F., Mohamed A., Shamseldin A., Saleh A. (2014). Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. *European Journal of Soil Biology* 60: 34-43.
220. Yu X., Cloutier S., Tambong J.T., Bromfield E.S.P. (2014). *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 3202–3207.
221. Yuan K., Reckling M., Ramirez M., Djedidi S., Fukuhara I., Ohyama T., Yokoyama T., Bellingrath-Kimura S.D., Halwani M., Egamberdieva D., Ohkama-Ohtsu N. (2020). Characterization of Rhizobia for the Improvement of Soybean Cultivation at Cold Conditions in Central Europe. *Microbes and environments* 35(1): 1–13.
222. Zahran H.H. (2017). Plasmids impact on rhizobia-legumes symbiosis in diverse environments. *Symbiosis* 73: 75–91.

223. 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.
224. Zakhia F., de Lajudie P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomy* 21: 569–576
225. Zhang L., Xiao J., Zhou Y., Zheng Y., Li J., Xiao H. (2016). Drought events and their effects on vegetation productivity in China. *Ecosphere* 7(12): e01591.
226. 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.
227. Žafran Novak J. (2000). Karakterizacija autohtonih sojeva *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* efikasnih u nodulaciji biljaka domaćina. Doktorska disertacija, Zagreb.

## ŽIVOTOPIS

Sanja Kajić rođena je 11.02.1986. godine u Sarajevu. Diplomirala je 18.03.2011. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, studij: Biologije, smjer: Molekularna biologija. Diplomski rad pod naslovom „Detekcija DNA vrste *Chlamydia trachomatis* metodom hibridizacije nukleinskih kiselina u različitim biološkim uzorcima“ izradila je pod mentorstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec Lepej na Odjelu imunološke i molekularne dijagnostike Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević“. Zapošljava se 2015. godine kao asistent na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje 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 ekologija, Bakteriologija i mikologija u biotehnologiji, Molekularne metode u mikrobnoj agroekologiji, Mikrobna raznolikost prirodnih i antropogenih ekoloških sustava, Fermentirana mlijeka, Mikrobiologija namirnica te Beneficial associations of plants and microorganisms. Kao neposredni voditelj sudjelovala u izradi sedam završnih radova i 10 diplomskih radova. Bila je voditelj rada pod naslovom “Karakterizacija bakterija promotora biljnog rasta i njihov utjecaj na rast soje“ koji je 2019. dobio Dekanovu nagradu.

Članica Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog tloznanstvenog društva.

Dobitnica je stipendije Federacije europskih mikrobioloških društava (FEMS) u sklopu koje je boravila na znanstvenom usavršavanju u *Ecosystems and Environment Research Programme* na Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finska.

Kao autor i koautor napisala je pet znanstvenih radova A1 kategorije, četiri znanstvena rada A2 kategorije te više znanstvenih radova prezentiranih na domaćim i međunarodnim kongresima. Održala je 2 predavanja na Međunarodnom simpoziju agronoma (2019 i 2020).

Popis objavljenih radova:

Radovi A1 kategorije:

**Kajić, S.**, Puljko, A., Rajnović, I., Sikora, S. (2020). Resistance of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* strains on moisture deficiency stress. *Journal of Central European Agriculture*, 21 (2), 285-291.

**Kajić, S.**, Krznarić, D., Rajnović, I., Sikora, S. (2020). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Central European Agriculture* 21(1): 151-158.

**Kajić, S.**, Blažinkov, M., Rajnović, I., Burek Svetec, N., Lekčević, M., Sikora, S. (2019). Phenotypic and genotypic diversity of *Sinorhizobium meliloti* strains isolated from soils in Zadar County. *Journal of Central European Agriculture* 20(4): 1116-1125.

Rajnović, I., Ramírez-Bahena, M.H., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M. **Kajic, S.**, Peix, A., Velázquez, E., Sikora, S. (2019). Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in Croatia and definition of the symbiovar phaseoli within the species *Rhizobium pisi*. *Systematic and applied microbiology* 42(6).



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:

Rajnović, I., Fejer, D., **Kajić, S.**, Duvnjak, M., Sikora, S. (2020). Utjecaj različitih fungicidnih pripravaka na rast kvasaca skupine *Saccharomyces sensu stricto*. Glasnik Zaštite Bilja, 43 (3), 14-20 2020

**Kajić, S.**, Komes, A., Rajnović, I., Sikora, S. (2019). Selection of Stress Tolerant Indigenous Rhizobia Nodulating Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Agriculturae conspectus scientificus 84(4): 365-370.

Krznarić, D., Lenkert, B., Puljko, A., Jurić, S., Vinceković, M., **Kajić, S.** (2019). The Storage Efficiency of immobilized *Bradyrhizobium japonicum* strain using encapsulation method. *Contemporary Agriculture* 68(1-2): 43-50.

**Kajić, S.**, Hulak, N., Sikora, S. (2016). Environmental stress response and adaptation mechanisms in rhizobia. Agriculturae conspectus scientificus 8(1): 15-19.

Sažeci u zbornicima skupova:

**Kajić, S.**, Gradinščak, A., Königshofer, D., Fadljević, I., Rajnović, I., Sikora, S. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their benefits on soybean growth. 55th Croatian & 15th International Symposium on Agriculture, Vodice, Hrvatska 2020. 63-63 (predavanje, domaća recenzija, sažetak).

Rajnović, I., **Kajić, S.**, Puljko, A., Sikora, S. Resistance of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* strains to moisture deficiency stress. 55th Croatian & 15th International Symposium on Agriculture, Vodice, Hrvatska 2020. 67-67 (poster, domaća recenzija, sažetak).

Sikora, S., Abrić, J., Rajnović, I., **Kajić, S.** Impact of nitrogen fertilization on nodulation and symbiotic efficiency of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* strains. 16th International Conference on Environmental Science and Technology, Rodos, Grčka 2019. 224-226 (predavanje, međunarodna recenzija, kratko priopćenje).

Rajnović, Ivana., Ramírez-Bahena, M.H., Sánchez Juanes, F., **Kajić, S.**, Peix, A., Velázquez, E., Sikora, S. Bioraznolikost i simbiozna učinkovitost kvržičnih bakterija koje noduliraju grah. 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture, Vodice, Hrvatska 2019. 43-44 (predavanje, domaća recenzija, sažetak).

**Kajić, S.**, Krznarić, D., Sikora, S. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max* L.). 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture, Vodice 2019. 33-33 (predavanje, sažetak).

Krznarić, D., Lenkert, B., Puljko, A., **Kajić S.** Efficiency immobilized *Bradyrhizobium japonicum* strain using encapsulation method. Novi Sad, Srbija 2018. 191-198 (predavanje, sažetak).

Rajnović, Ivana., Ramírez-Bahena, M.H., Sánchez Juanes, F., **Kajić, S.**, Peix, A., Velázquez, E., Sikora, S. Biodiversity of indigenous rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in Croatia. 20th Nitrogen workshop- Coupling C-N-P-S cycles, Rennes, Francuska 2018. 307-308 (poster, međunarodna recenzija, prošireni sažetak).

Rajnović, Ivana., Ramírez-Bahena, M.H., Sánchez Juanes, F., **Kajić, S.**, Peix, A., Velázquez, E., Sikora, S. Identification and symbiotic characterization of indigenous rhizobia nodulating common bean in Croatia. 20th International Congress on Nitrogen Fixation. Granada, Španjolska 2017. 93-93 (poster, međunarodna recenzija, sažetak)

**Kajić, S.** Hajdari, E. Komes, A. Rajnović, I., Sikora, S. Selection of stress-tolerant indigenous rhizobia nodulating alfalfa (*Medicago sativa* L.) Power of Microbes in Industry and Environment, Krk, Hrvatska 2016. 77-77 (poster, domaća recenzija, sažetak).

Sikora, S., **Kajić, S.**, Dežić, S., Blažinkov, M. Biodiversity of indigenous alfalfa rhizobia isolated from soils in central Croatia. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology-BioMicroWorld, 2015. Barcelona, Španjolska (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

Sikora, S., Pohajda, I., Huić Babić, K., Rajnović I., Blažinkov, M., **Kajić, S.** Genetic diversity and symbiotic efficiency of indigenous common bean rhizobia isolated from agricultural soils in the central Croatia. 11th European Nitrogen Fixation Conference, 2014. Tenerife, Španjolska (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

Sikora, S., Blažinkov, M., **Kajić, S.**, Burek Svetec, N., Lekčević, M. Phenotypic and genotypic characterization of indigenous rhizobia nodulating Alfalfa in Mediterranean region of Croatia. 18th Nitrogen Workshop, Lisabon, Portugal 2014. 202-204 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

Sikora, S., **Kajić, S.**, Blažinkov, M. Biodiversity of indigenous rhizobia isolated from soils in Zadar County. Power of microbes in industry and environment. Primošten, Hrvatska 2013, 79-79 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

## PRILOZI

Prilog 1. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na broj kvržica po biljci.

<b>Voda</b>	<b>Soj</b>	<b>Brkvrz LSMEAN</b>	<b>LSMEAN Number</b>
Suša	K	0.0000000	1
Suša	S1/5	28.0000000	2
Suša	S32	30.0000000	3
Suša	S37	24.0000000	4
Suša	S44	21.3333333	5
Suša	S3/5	24.0000000	6
Suša	S16/5	29.6666667	7
Suša	S18/5	22.3333333	8
Suša	S21/5	26.0000000	9
Suša	S25/2	29.3333333	10
Suša	S26/7	26.0000000	11
Suša	S27	28.0000000	12
Suša	S31	24.0000000	13
Suša	R	32.0000000	14
Opt	K	0.0000000	15
Opt	S1/5	43.3333333	16
Opt	S32	36.0000000	17
Opt	S37	35.6666667	18
Opt	S44	35.6666667	19
Opt	S3/5	38.6666667	20
Opt	S16/5	40.0000000	21
Opt	S18/4	31.0000000	22
Opt	S21/5	36.3333333	23
Opt	S25/2	36.6666667	24
Opt	S26/7	32.6666667	25
Opt	S27	34.6666667	26
Opt	S31	35.3333333	27
Opt	R	41.6666667	28

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
1		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		1.0000	0.9966	0.5869	0.9966	1.0000	0.8485	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9966	0.9966	<.0001	<.0001	0.2414	0.3136	0.3136	0.0148	0.0027	1.0000	0.1815	0.1336	0.9761	0.5869	0.3972	0.0003
3	<.0001	1.0000		0.7723	0.1336	0.7723	1.0000	0.3136	0.9966	1.0000	0.9966	1.0000	0.7723	1.0000	<.0001	0.0004	0.7723	0.8485	0.8485	0.1336	0.0326	1.0000	0.6832	0.5869	1.0000	0.9761	0.9080	0.0041
4	<.0001	0.9966	0.7723		1.0000	1.0000	0.8485	1.0000	1.0000	0.9080	1.0000	0.9966	1.0000	0.2414	<.0001	<.0001	0.0027	0.0041	0.0041	<.0001	<.0001	0.4897	0.0017	0.0011	0.1336	0.0148	0.0064	<.0001
5	<.0001	0.5869	0.1336	1.0000		1.0000	0.1815	1.0000	0.9761	0.2414	0.9761	0.5869	1.0000	0.0148	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	0.0001	<.0001	<.0001	0.0476	<.0001	<.0001	0.0064	0.0004	0.0002	<.0001
6	<.0001	0.9966	0.7723	1.0000	1.0000		0.8485	1.0000	1.0000	0.9080	1.0000	0.9966	1.0000	0.2414	<.0001	<.0001	0.0027	0.0041	0.0041	<.0001	<.0001	0.4897	0.0017	0.0011	0.1336	0.0148	0.0064	<.0001
7	<.0001	1.0000	1.0000	0.8485	0.1815	0.8485		0.3972	0.9991	1.0000	0.9991	1.0000	0.8485	1.0000	<.0001	0.0003	0.6832	0.7723	0.7723	0.0964	0.0221	1.0000	0.5869	0.4897	1.0000	0.9500	0.8485	0.0027
8	<.0001	0.8485	0.3136	1.0000	1.0000	1.0000	0.3972		0.9991	0.4897	0.9991	0.8485	1.0000	0.0476	<.0001	<.0001	0.0003	0.0004	0.0004	<.0001	<.0001	0.1336	0.0002	0.0001	0.0221	0.0017	0.0007	<.0001
9	<.0001	1.0000	0.9966	1.0000	0.9761	1.0000	0.9991	0.9991		0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	0.7723	<.0001	<.0001	0.0326	0.0476	0.0476	0.0011	0.0002	0.9500	0.0221	0.0148	0.5869	0.1336	0.0683	<.0001
10	<.0001	1.0000	1.0000	0.9080	0.2414	0.9080	1.0000	0.4897	0.9998		0.9998	1.0000	0.9080	1.0000	<.0001	0.0002	0.5869	0.6832	0.6832	0.0683	0.0148	1.0000	0.4897	0.3972	0.9998	0.9080	0.7723	0.0017
11	<.0001	1.0000	0.9966	1.0000	0.9761	1.0000	0.9991	0.9991	1.0000	0.9998		1.0000	1.0000	0.7723	<.0001	<.0001	0.0326	0.0476	0.0476	0.0011	0.0002	0.9500	0.0221	0.0148	0.5869	0.1336	0.0683	<.0001
12	<.0001	1.0000	1.0000	0.9966	0.5869	0.9966	1.0000	0.8485	1.0000	1.0000	1.0000		0.9966	0.9966	<.0001	<.0001	0.2414	0.3136	0.3136	0.0148	0.0027	1.0000	0.1815	0.1336	0.9761	0.5869	0.3972	0.0003
13	<.0001	0.9966	0.7723	1.0000	1.0000	1.0000	0.8485	1.0000	1.0000	0.9080	1.0000	0.9966		0.2414	<.0001	<.0001	0.0027	0.0041	0.0041	<.0001	<.0001	0.4897	0.0017	0.0011	0.1336	0.0148	0.0064	<.0001
14	<.0001	0.9966	1.0000	0.2414	0.0148	0.2414	1.0000	0.0476	0.7723	1.0000	0.7723	0.9966	0.2414		<.0001	0.0064	0.9966	0.9991	0.9991	0.5869	0.2414	1.0000	0.9902	0.9761	1.0000	1.0000	0.9998	0.0476
15	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
16	<.0001	<.0001	0.0004	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	0.0064	<.0001		0.3972	0.3136	0.3136	0.9761	0.9998	0.0017	0.4897	0.5869	0.0148	0.1336	0.2414	1.0000
17	<.0001	0.2414	0.7723	0.0027	<.0001	0.0027	0.6832	0.0003	0.0326	0.5869	0.0326	0.2414	0.0027	0.9966	<.0001	0.3972		1.0000	1.0000	1.0000	0.9966	0.9500	1.0000	1.0000	0.9998	1.0000	1.0000	0.8485
18	<.0001	0.3136	0.8485	0.0041	0.0001	0.0041	0.7723	0.0004	0.0476	0.6832	0.0476	0.3136	0.0041	0.9991	<.0001	0.3136	1.0000		1.0000	1.0000	0.9902	0.9761	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.7723
19	<.0001	0.3136	0.8485	0.0041	0.0001	0.0041	0.7723	0.0004	0.0476	0.6832	0.0476	0.3136	0.0041	0.9991	<.0001	0.3136	1.0000	1.0000		1.0000	0.9902	0.9761	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.7723
20	<.0001	0.0148	0.1336	<.0001	<.0001	<.0001	0.0964	<.0001	0.0011	0.0683	0.0011	0.0148	<.0001	0.5869	<.0001	0.9761	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	0.3136	1.0000	1.0000	0.7723	0.9966	0.9998	1.0000
21	<.0001	0.0027	0.0326	<.0001	<.0001	<.0001	0.0221	<.0001	0.0002	0.0148	0.0002	0.0027	<.0001	0.2414	<.0001	0.9998	0.9966	0.9902	0.9902	1.0000		0.0964	0.9991	0.9998	0.3972	0.9080	0.9761	1.0000
22	<.0001	1.0000	1.0000	0.4897	0.0476	0.4897	1.0000	0.1336	0.9500	1.0000	0.9500	1.0000	0.4897	1.0000	<.0001	0.0017	0.9500	0.9761	0.9761	0.3136	0.0964		0.9080	0.8485	1.0000	0.9991	0.9902	0.0148
23	<.0001	0.1815	0.6832	0.0017	<.0001	0.0017	0.5869	0.0002	0.0221	0.4897	0.0221	0.1815	0.0017	0.9902	<.0001	0.4897	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9991	0.9080		1.0000	0.9991	1.0000	1.0000	0.9080
24	<.0001	0.1336	0.5869	0.0011	<.0001	0.0011	0.4897	0.0001	0.0148	0.3972	0.0148	0.1336	0.0011	0.9761	<.0001	0.5869	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9998	0.8485	1.0000		0.9966	1.0000	1.0000	0.9500
25	<.0001	0.9761	1.0000	0.1336	0.0064	0.1336	1.0000	0.0221	0.5869	0.9998	0.5869	0.9761	0.1336	1.0000	<.0001	0.0148	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	0.7723	0.3972	1.0000	0.9991	0.9966		1.0000	0.0964
26	<.0001	0.5869	0.9761	0.0148	0.0004	0.0148	0.9500	0.0017	0.1336	0.9080	0.1336	0.5869	0.0148	1.0000	<.0001	0.1336	1.0000	1.0000	1.0000	0.9966	0.9080	0.9991	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	0.4897
27	<.0001	0.3972	0.9080	0.0064	0.0002	0.0064	0.8485	0.0007	0.0683	0.7723	0.0683	0.3972	0.0064	0.9998	<.0001	0.2414	1.0000	1.0000	1.0000	0.9998	0.9761	0.9902	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		0.6832
28	<.0001	0.0003	0.0041	<.0001	<.0001	<.0001	0.0027	<.0001	<.0001	0.0017	<.0001	0.0003	<.0001	0.0476	<.0001	1.0000	0.8485	0.7723	0.7723	1.0000	1.0000	0.0148	0.9080	0.9500	0.0964	0.4897	0.6832	

Prilog 2. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na masu suhe tvari kvržica.

<b>Voda</b>	<b>Soj</b>	<b>mstkvrz LSMEAN</b>	<b>LSMEAN Number</b>
Suša	K	0.000000	1
Suša	S1/5	73.966667	2
Suša	S32	106.200000	3
Suša	S38	85.366667	4
Suša	S44	64.566667	5
Suša	S3/5	77.730000	6
Suša	S16/5	58.516667	7
Suša	S18/4	84.366667	8
Suša	S21/5	81.206667	9
Suša	S25/2	116.533333	10
Suša	S26/7	81.660000	11
Suša	S27	90.810000	12
Suša	S31	67.833333	13
Suša	R	63.433333	14
Opt	K	0.000000	15
Opt	S1/5	91.633333	16
Opt	S32	145.500000	17
Opt	S37	186.016667	18
Opt	S44	91.866667	19
Opt	S3/5	120.133333	20
Opt	S16/5	90.316667	21
Opt	S18/4	125.933333	22
Opt	S21/5	104.126667	23
Opt	S25/2	133.973333	24
Opt	S26/7	97.660000	25
Opt	S27	102.843333	26
Opt	S31	106.300000	27
Opt	R	95.300000	28

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
1		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		0.0002	0.9617	0.9964	1.0000	0.6058	0.9865	0.9999	<.0001	0.9998	0.4339	1.0000	0.9843	<.0001	0.3417	<.0001	<.0001	0.3177	<.0001	0.4935	<.0001	0.0008	<.0001	0.0282	0.0017	0.0002	0.0856
3	<.0001	0.0002		0.1062	<.0001	0.0021	<.0001	0.0685	0.0145	0.9876	0.0184	0.6133	<.0001	<.0001	<.0001	0.7133	<.0001	<.0001	0.7401	0.7836	0.5515	0.1660	1.0000	0.0032	0.9991	1.0000	1.0000	0.9766
4	<.0001	0.9617	0.1062		0.1077	0.9999	0.0053	1.0000	1.0000	0.0004	1.0000	1.0000	0.3559	0.0654	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001	1.0000	<.0001	0.2381	<.0001	0.9197	0.3621	0.1018	0.9925
5	<.0001	0.9964	<.0001	0.1077		0.8569	1.0000	0.1618	0.4582	<.0001	0.4049	0.0074	1.0000	1.0000	<.0001	0.0047	<.0001	<.0001	0.0041	<.0001	0.0097	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001	<.0001	0.0006
6	<.0001	1.0000	0.0021	0.9999	0.8569		0.2022	1.0000	1.0000	<.0001	1.0000	0.8638	0.9928	0.7442	<.0001	0.7868	<.0001	<.0001	0.7619	<.0001	0.9010	<.0001	0.0068	<.0001	0.1537	0.0136	0.0020	0.3520
7	<.0001	0.6058	<.0001	0.0053	1.0000	0.2022		0.0092	0.0460	<.0001	0.0370	0.0002	0.9969	1.0000	<.0001	0.0001	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
8	<.0001	0.9865	0.0685	1.0000	0.1618	1.0000	0.0092		1.0000	0.0002	1.0000	1.0000	0.4711	0.1018	<.0001	0.9999	<.0001	<.0001	0.9999	<.0001	1.0000	<.0001	0.1643	<.0001	0.8456	0.2627	0.0654	0.9757
9	<.0001	0.9999	0.0145	1.0000	0.4582	1.0000	0.0460	1.0000		<.0001	1.0000	0.9952	0.8384	0.3306	<.0001	0.9861	<.0001	<.0001	0.9819	<.0001	0.9977	<.0001	0.0412	<.0001	0.4808	0.0748	0.0138	0.7666
10	<.0001	<.0001	0.9876	0.0004	<.0001	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001		<.0001	0.0098	<.0001	<.0001	<.0001	0.0152	0.0016	<.0001	0.0172	1.0000	0.0075	0.9964	0.9128	0.3660	0.2287	0.8084	0.9890	0.0894
11	<.0001	0.9998	0.0184	1.0000	0.4049	1.0000	0.0370	1.0000	1.0000	<.0001		0.9976	0.7947	0.2857	<.0001	0.9921	<.0001	<.0001	0.9893	<.0001	0.9989	<.0001	0.0511	<.0001	0.5369	0.0914	0.0174	0.8133
12	<.0001	0.4339	0.6133	1.0000	0.0074	0.8638	0.0002	1.0000	0.9952	0.0098	0.9976		0.0401	0.0040	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	1.0000	0.0013	1.0000	<.0001	0.8435	<.0001	1.0000	0.9342	0.6008	1.0000
13	<.0001	1.0000	<.0001	0.3559	1.0000	0.9928	0.9969	0.4711	0.8384	<.0001	0.7947	0.0401		1.0000	<.0001	0.0268	<.0001	<.0001	0.0238	<.0001	0.0507	<.0001	<.0001	<.0001	0.0010	<.0001	<.0001	0.0038
14	<.0001	0.9843	<.0001	0.0654	1.0000	0.7442	1.0000	0.1018	0.3306	<.0001	0.2857	0.0040	1.0000		<.0001	0.0025	<.0001	<.0001	0.0022	<.0001	0.0052	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003
15	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
16	<.0001	0.3417	0.7133	1.0000	0.0047	0.7868	0.0001	0.9999	0.9861	0.0152	0.9921	1.0000	0.0268	0.0025	<.0001		<.0001	<.0001	1.0000	0.0021	1.0000	<.0001	0.9072	<.0001	1.0000	0.9680	0.7015	1.0000
17	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0016	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	0.0119	<.0001	0.1770	<.0001	0.9570	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
18	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
19	<.0001	0.3177	0.7401	1.0000	0.0041	0.7619	0.0001	0.9999	0.9819	0.0172	0.9893	1.0000	0.0238	0.0022	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001		0.0024	1.0000	<.0001	0.9216	<.0001	1.0000	0.9746	0.7287	1.0000
20	<.0001	<.0001	0.7836	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001	0.0013	<.0001	<.0001	<.0001	0.0021	0.0119	<.0001	0.0024		0.0010	1.0000	0.5360	0.7933	0.0510	0.3826	0.7940	0.0158
21	<.0001	0.4935	0.5515	1.0000	0.0097	0.9010	0.0003	1.0000	0.9977	0.0075	0.9989	1.0000	0.0507	0.0052	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	1.0000	0.0010		<.0001	0.7964	<.0001	0.9999	0.9050	0.5390	1.0000
22	<.0001	<.0001	0.1660	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9964	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1770	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001		0.0693	0.9997	0.0024	0.0380	0.1726	0.0006
23	<.0001	0.0008	1.0000	0.2381	<.0001	0.0068	<.0001	0.1643	0.0412	0.9128	0.0511	0.8435	<.0001	<.0001	<.0001	0.9072	<.0001	<.0001	0.9216	0.5360	0.7964	0.0693		0.0009	1.0000	1.0000	1.0000	0.9986
24	<.0001	<.0001	0.0032	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.3660	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9570	<.0001	<.0001	0.7933	<.0001	0.9997	0.0009		<.0001	0.0004	0.0033	<.0001
25	<.0001	0.0282	0.9991	0.9197	0.0001	0.1537	<.0001	0.8456	0.4808	0.2287	0.5369	1.0000	0.0010	<.0001	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	1.0000	0.0510	0.9999	0.0024	1.0000	<.0001		1.0000	0.9990	1.0000
26	<.0001	0.0017	1.0000	0.3621	<.0001	0.0136	<.0001	0.2627	0.0748	0.8084	0.0914	0.9342	<.0001	<.0001	<.0001	0.9680	<.0001	<.0001	0.9746	0.3826	0.9050	0.0380	1.0000	0.0004	1.0000		1.0000	0.9999
27	<.0001	0.0002	1.0000	0.1018	<.0001	0.0020	<.0001	0.0654	0.0138	0.9890	0.0174	0.6008	<.0001	<.0001	<.0001	0.7015	<.0001	<.0001	0.7287	0.7940	0.5390	0.1726	1.0000	0.0033	0.9990	1.0000		0.9740
28	<.0001	0.0856	0.9766	0.9925	0.0006	0.3520	<.0001	0.9757	0.7666	0.0894	0.8133	1.0000	0.0038	0.0003	<.0001	1.0000	<.0001	<.0001	1.0000	0.0158	1.0000	0.0006	0.9986	<.0001	1.0000	0.9999	0.9740	

Prilog 3. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na masu suhe tvari biljke.

Voda	Soj	Mstbilj LSMEAN	LSMEAN Number
Suša	K	916.43333	1
Suša	S1/5	1228.36667	2
Suša	S32	1022.00000	3
Suša	S37	1280.73333	4
Suša	S44	1180.56667	5
Suša	S3/5	993.86667	6
Suša	S16/5	986.38000	7
Suša	S18/4	738.65333	8
Suša	S21/5	1164.75000	9
Suša	S25/2	1214.41667	10
Suša	S26/7	820.82667	11
Suša	S27	1099.40000	12
Suša	S31	1106.96667	13
Suša	R	990.10000	14
Opt	K	1058.73333	15
Opt	S1/5	1929.03333	16
Opt	S32	1637.50000	17
Opt	S37	1653.60000	18
Opt	S44	1590.20000	19
Opt	S3/5	1872.30333	20
Opt	S16/5	1718.86333	21
Opt	S18/4	1524.07333	22
Opt	S21/5	1717.76667	23
Opt	S25/2	1958.25000	24
Opt	7S26/7	1758.59667	25
Opt	S27	1639.03333	26
Opt	S31	1332.53333	27
Opt	R	1726.66667	28

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		
1		0.0056	0.9979	0.0004	0.0467	1.0000	1.0000	0.6305	0.0867	0.0107	0.9996	0.5749	0.4940	1.0000	0.9247	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
2	0.0056		0.3378	1.0000	1.0000	0.1427	0.1095	<.0001	1.0000	1.0000	<.0001	0.9723	0.9863	0.1251	0.7149	<.0001	<.0001	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001	0.0119	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9983	<.0001	
3	0.9979	0.3378		0.0580	0.8169	1.0000	1.0000	0.0207	0.9224	0.4742	0.3861	1.0000	0.9999	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0060	<.0001	
4	0.0004	1.0000	0.0580		0.9991	0.0177	0.0127	<.0001	0.9923	1.0000	<.0001	0.5924	0.6727	0.0150	0.2150	<.0001	0.0006	0.0003	0.0063	<.0001	<.0001	0.1043	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	1.0000	<.0001	
5	0.0467	1.0000	0.8169	0.9991		0.5348	0.4559	<.0001	1.0000	1.0000	0.0005	1.0000	1.0000	0.4947	0.9857	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0012	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.8673	<.0001	
6	1.0000	0.1427	1.0000	0.0177	0.5348		1.0000	0.0666	0.7023	0.2249	0.6803	0.9979	0.9945	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0015	<.0001	
7	1.0000	0.1095	1.0000	0.0127	0.4559	1.0000		0.0887	0.6242	0.1773	0.7547	0.9945	0.9874	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0010	<.0001	
8	0.6305	<.0001	0.0207	<.0001	<.0001	0.0666	0.0887		<.0001	<.0001	1.0000	0.0005	0.0003	0.0770	0.0038	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
9	0.0867	1.0000	0.9224	0.9923	1.0000	0.7023	0.6242	<.0001		1.0000	0.0012	1.0000	1.0000	0.6635	0.9978	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.7332	<.0001
10	0.0107	1.0000	0.4742	1.0000	1.0000	0.2249	0.1773	<.0001	1.0000		<.0001	0.9931	0.9973	0.1999	0.8400	<.0001	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	0.0062	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9903	<.0001
11	0.9996	<.0001	0.3861	<.0001	0.0005	0.6803	0.7547	1.0000	0.0012	<.0001		0.0255	0.0183	0.7185	0.1267	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
12	0.5749	0.9723	1.0000	0.5924	1.0000	0.9979	0.9945	0.0005	1.0000	0.9931	0.0255		1.0000	0.9966	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1495	<.0001
13	0.4940	0.9863	0.9999	0.6727	1.0000	0.9945	0.9874	0.0003	1.0000	0.9973	0.0183	1.0000		0.9915	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1921	<.0001
14	1.0000	0.1251	1.0000	0.0150	0.4947	1.0000	1.0000	0.0770	0.6635	0.1999	0.7185	0.9966	0.9915		1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0013	<.0001
15	0.9247	0.7149	1.0000	0.2150	0.9857	1.0000	1.0000	0.0038	0.9978	0.8400	0.1267	1.0000	1.0000	1.0000		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0312	<.0001
16	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		0.0144	0.0291	0.0015	1.0000	0.3047	<.0001	0.2955	1.0000	0.7068	0.0154	<.0001	0.3747		
17	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0144		1.0000	1.0000	0.1412	1.0000	0.9943	1.0000	0.0037	0.9867	1.0000	0.0078	0.9999		
18	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0291	1.0000		1.0000	0.2379	1.0000	0.9709	1.0000	0.0079	0.9981	1.0000	0.0036	1.0000		
19	<.0001	0.0005	<.0001	0.0063	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0015	1.0000	1.0000		0.0219	0.9730	1.0000	0.9755	0.0003	0.7272	1.0000	0.0605	0.9497		
20	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	1.0000	0.1412	0.2379	0.0219		0.8568	0.0009	0.8487	0.9999	0.9941	0.1488	<.0001	0.9072		
21	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.3047	1.0000	1.0000	0.9730	0.8568		0.4497	1.0000	0.1203	1.0000	1.0000	0.0001	1.0000		
22	<.0001	0.0119	<.0001	0.1043	0.0012	<.0001	<.0001	<.0001	0.0005	0.0062	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9943	0.9709	1.0000	0.0009	0.4497		0.4610	<.0001	0.1426	0.9932	0.4834	0.3726		
23	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2955	1.0000	1.0000	0.9755	0.8487	1.0000	0.4610		0.1156	1.0000	1.0000	0.0001	1.0000		
24	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	1.0000	0.0037	0.0079	0.0003	0.9999	0.1203	<.0001	0.1156		0.4009	0.0039	<.0001	0.1576		
25	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.7068	0.9867	0.9981	0.7272	0.9941	1.0000	0.1426	1.0000	0.4009		0.9887	<.0001	1.0000		
26	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0154	1.0000	1.0000	1.0000	0.1488	1.0000	0.9932	1.0000	0.0039	0.9887		0.0072	0.9999		
27	<.0001	0.9983	0.0060	1.0000	0.8673	0.0015	0.0010	<.0001	0.7332	0.9903	<.0001	0.1495	0.1921	0.0013	0.0312	<.0001	0.0078	0.0036	0.0605	<.0001	0.0001	0.4834	0.0001	<.0001	<.0001	0.0072		<.0001		
28	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.3747	0.9999	1.0000	0.9497	0.9072	1.0000	0.3726	1.0000	0.1576	1.0000	0.9999	<.0001			



Prilog 4. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na količinu ukupnog dušika u biljci.

<b>Voda</b>	<b>Soj</b>	<b>ukupN LSMEAN</b>	<b>LSMEAN Number</b>
Suša	K	2.28000000	1
Suša	S1/5	5.25333333	2
Suša	S32	3.86666667	3
Suša	S37	2.95333333	4
Suša	S44	3.10666667	5
Suša	S3/5	2.94000000	6
Suša	S16/5	4.14000000	7
Suša	S18/4	2.24666667	8
Suša	S21/5	3.32333333	9
Suša	S25/2	4.10000000	10
Suša	S26/7	2.56666667	11
Siša	S27	4.13333333	12
Suša	S31	3.91333333	13
Suša	R	2.81333333	14
Opt	K	3.52000000	15
Opt	S1/5	8.77333333	16
Opt	S32	6.79666667	17
Opt	S37	6.50666667	18
Opt	S44	4.26666667	19
Opt	S3/5	6.39666667	20
Opt	S16/5	5.43333333	21
Opt	S18/4	5.82666667	22
Opt	S21/5	6.38666667	23
Opt	S25/2	7.56666667	24
Opt	S26/7	7.89000000	25
Opt	S27	7.24000000	26
Opt	S31	5.59333333	27
Opt	R	7.32666667	28

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	
1		<.0001	0.1358	0.9991	0.9841	0.9993	0.0277	1.0000	0.8442	0.0357	1.0000	0.0289	0.1061	1.0000	0.5596	<.0001	<.0001	<.0001	0.0121	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
2	<.0001		0.3393	0.0013	0.0039	0.0012	0.7547	<.0001	0.0176	0.6961	<.0001	0.7452	0.4048	0.0004	0.0603	<.0001	0.1690	0.5383	0.9010	0.7111	1.0000	0.9999	0.7259	0.0012	<.0001	0.0121	1.0000	0.0066	
3	0.1358	0.3393		0.9520	0.9946	0.9446	1.0000	0.1139	1.0000	1.0000	0.4649	1.0000	1.0000	0.8326	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	1.0000	0.0002	0.1504	0.0144	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	0.0627	<.0001	
4	0.9991	0.0013	0.9520		1.0000	1.0000	0.6445	0.9981	1.0000	0.7061	1.0000	0.6550	0.9224	1.0000	0.9999	<.0001	<.0001	<.0001	0.4445	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
5	0.9841	0.0039	0.9946	1.0000		1.0000	0.8553	0.9748	1.0000	0.8951	1.0000	0.8624	0.9882	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	0.6859	<.0001	0.0010	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001
6	0.9993	0.0012	0.9446	1.0000	1.0000		0.6235	0.9985	1.0000	0.6859	1.0000	0.6340	0.9121	1.0000	0.9999	<.0001	<.0001	<.0001	0.4245	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
7	0.0277	0.7547	1.0000	0.6445	0.8553	0.6235		0.0224	0.9863	1.0000	0.1454	1.0000	1.0000	0.4245	0.9998	<.0001	<.0001	0.0008	1.0000	0.0018	0.4752	0.0789	0.0019	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2570	<.0001
8	1.0000	<.0001	0.1139	0.9981	0.9748	0.9985	0.0224		0.8039	0.0289	1.0000	0.0234	0.0883	0.9999	0.5066	<.0001	<.0001	<.0001	0.0096	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
9	0.8442	0.0176	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9863	0.8039		0.9927	0.9949	0.9876	0.9999	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	<.0001	0.9341	<.0001	0.0051	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0016	<.0001
10	0.0357	0.6961	1.0000	0.7061	0.8951	0.6859	1.0000	0.0289	0.9927		0.1774	1.0000	1.0000	0.4856	0.9999	<.0001	<.0001	0.0006	1.0000	0.0013	0.4146	0.0627	0.0014	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2146	<.0001
11	1.0000	<.0001	0.4649	1.0000	1.0000	1.0000	0.1454	1.0000	0.9949	0.1774		0.1504	0.3951	1.0000	0.9273	<.0001	<.0001	<.0001	0.0732	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
12	0.0289	0.7452	1.0000	0.6550	0.8624	0.6340	1.0000	0.0234	0.9876	1.0000	0.1504		1.0000	0.4344	0.9998	<.0001	<.0001	0.0007	1.0000	0.0017	0.4649	0.0760	0.0018	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2496	<.0001
13	0.1061	0.4048	1.0000	0.9224	0.9882	0.9121	1.0000	0.0883	0.9999	1.0000	0.3951	1.0000		0.7731	1.0000	<.0001	<.0001	0.0001	1.0000	0.0003	0.1893	0.0197	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0820	<.0001
14	1.0000	0.0004	0.8326	1.0000	1.0000	1.0000	0.4245	0.9999	1.0000	0.4856	1.0000	0.4344	0.7731		0.9981	<.0001	<.0001	<.0001	0.2570	<.0001	0.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
15	0.5596	0.0603	1.0000	0.9999	1.0000	0.9999	0.9998	0.5066	1.0000	0.9999	0.9273	0.9998	1.0000	0.9981		<.0001	<.0001	<.0001	0.9957	<.0001	0.0197	0.0012	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0066	<.0001
16	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		0.0129	0.0016	<.0001	0.0007	<.0001	<.0001	0.0007	0.6129	0.9662	0.1774	<.0001	0.2646	
17	<.0001	0.1690	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0129		1.0000	0.0002	1.0000	0.3713	0.9148	1.0000	0.9935	0.7821	1.0000	0.6182	1.0000	
18	<.0001	0.5383	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0008	<.0001	<.0001	0.0006	<.0001	0.0007	0.0001	<.0001	<.0001	0.0016	1.0000		0.0020	1.0000	0.8082	0.9989	1.0000	0.8246	0.3438	0.9967	0.9520	0.9856	
19	0.0121	0.9010	1.0000	0.4445	0.6859	0.4245	1.0000	0.0096	0.9341	1.0000	0.0732	1.0000	1.0000	0.2570	0.9957	<.0001	0.0002	0.0020		0.0044	0.6757	0.1555	0.0048	<.0001	<.0001	<.0001	0.4245	<.0001	
20	<.0001	0.7111	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	0.0018	<.0001	<.0001	0.0013	<.0001	0.0017	0.0003	<.0001	<.0001	0.0007	1.0000	1.0000	0.0044		0.9199	0.9999	1.0000	0.6705	0.2146	0.9798	0.9888	0.9426	
21	<.0001	1.0000	0.1504	0.0003	0.0010	0.0003	0.4752	<.0001	0.0051	0.4146	<.0001	0.4649	0.1893	0.0001	0.0197	<.0001	0.3713	0.8082	0.6757	0.9199		1.0000	0.9273	0.0043	0.0004	0.0388	1.0000	0.0224	
22	<.0001	0.9999	0.0144	<.0001	<.0001	<.0001	0.0789	<.0001	0.0003	0.0627	<.0001	0.0760	0.0197	<.0001	0.0012	<.0001	0.9148	0.9989	0.1555	0.9999	1.0000		1.0000	0.0580	0.0071	0.3047	1.0000	0.2081	
23	<.0001	0.7259	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	0.0019	<.0001	<.0001	0.0014	<.0001	0.0018	0.0003	<.0001	<.0001	0.0007	1.0000	1.0000	0.0048	1.0000	0.9273	1.0000		0.6550	0.2048	0.9769	0.9904	0.9363	
24	<.0001	0.0012	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.6129	0.9935	0.8246	<.0001	0.6705	0.0043	0.0580	0.6550		1.0000	1.0000	0.0132	1.0000	
25	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9662	0.7821	0.3438	<.0001	0.2146	0.0004	0.0071	0.2048	1.0000		0.9995	0.0013	1.0000	
26	<.0001	0.0121	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1774	1.0000	0.9967	<.0001	0.9798	0.0388	0.3047	0.9769	1.0000	0.9995		0.0986	1.0000	
27	<.0001	1.0000	0.0627	<.0001	0.0003	<.0001	0.2570	<.0001	0.0016	0.2146	<.0001	0.2496	0.0820	<.0001	0.0066	<.0001	0.6182	0.9520	0.4245	0.9888	1.0000	1.0000	0.9904	0.0132	0.0013	0.0986		0.0603	
28	<.0001	0.0066	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2646	1.0000	0.9856	<.0001	0.9426	0.0224	0.2081	0.9363	1.0000	1.0000	1.0000	0.0603		

Prilog 5. Rezultati statističke analize podataka: učinak interakcije voda x soj na indeks sadržaja klorofila u listu (CCI).

Voda	Soj	CCI LSMEAN	LSMEAN Number
Suša	K	13.5666667	1
Suša	S1/5	18.5000000	2
Suša	S32	18.2000000	3
Suša	S37	16.5000000	4
Suša	S44	20.2000000	5
Suša	S3/5	21.4000000	6
Suša	S16/5	15.9333333	7
Suša	S18/4	15.0666667	8
Suša	S21/5	16.7000000	9
Suša	S25/2	19.2000000	10
Suša	S26/7	18.4666667	11
Suša	S27	16.7333333	12
Suša	S31	17.7666667	13
Suša	R	15.9333333	14
Opt	K	20.4000000	15
Opt	S1/5	26.6000000	16
Opt	S32	28.4666667	17
Opt	S37	25.7333333	18
Opt	S44	29.1000000	19
Opt	S3/5	33.9333333	20
Opt	S16/5	27.1666667	21
Opt	S18/4	26.4000000	22
Opt	S21/5	26.1666667	23
Opt	S25/2	30.2666667	24
Opt	S26/7	30.0666667	25
Opt	S27	27.5000000	26
Opt	S31	29.4333333	27
Opt	R	25.1333333	28

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	
1		0.4157	0.5412	0.9906	0.0425	0.0049	0.9996	1.0000	0.9790	0.1878	0.4291	0.9763	0.7242	0.9996	0.0304	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
2	0.4157		1.0000	1.0000	1.0000	0.9919	0.9985	0.9441	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9985	1.0000	0.0029	<.0001	0.0150	<.0001	<.0001	0.0009	0.0043	0.0067	<.0001	<.0001	0.0005	<.0001	0.0425	
3	0.5412	1.0000		1.0000	1.0000	0.9733	0.9998	0.9790	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9998	0.9999	0.0016	<.0001	0.0087	<.0001	<.0001	0.0005	0.0024	0.0038	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	0.0256	
4	0.9906	1.0000	1.0000		0.8895	0.4291	1.0000	1.0000	1.0000	0.9969	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.8325	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0010	
5	0.0425	1.0000	1.0000	0.8895		1.0000	0.6974	0.3395	0.9328	1.0000	1.0000	0.9386	0.9994	0.6974	1.0000	0.0620	0.0021	0.2133	0.0006	<.0001	0.0241	0.0845	0.1191	<.0001	<.0001	0.0133	0.0003	0.4157	
6	0.0049	0.9919	0.9733	0.4291	1.0000		0.2317	0.0688	0.5126	0.9999	0.9906	0.5269	0.9055	0.2317	1.0000	0.3158	0.0203	0.6698	0.0063	<.0001	0.1574	0.3895	0.4843	0.0006	0.0009	0.0981	0.0033	0.8810	
7	0.9996	0.9985	0.9998	1.0000	0.6974	0.2317		1.0000	1.0000	0.9665	0.9988	1.0000	1.0000	1.0000	0.6131	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	
8	1.0000	0.9441	0.9790	1.0000	0.3395	0.0688	1.0000		1.0000	0.7502	0.9493	1.0000	0.9969	1.0000	0.2717	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
9	0.9790	1.0000	1.0000	1.0000	0.9328	0.5126	1.0000	1.0000		0.9990	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.8895	<.0001	<.0001	0.0004	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0015	
10	0.1878	1.0000	1.0000	0.9969	1.0000	0.9999	0.9665	0.7502	0.9990		1.0000	0.9992	1.0000	0.9665	1.0000	0.0111	0.0003	0.0500	<.0001	<.0001	0.0038	0.0160	0.0241	<.0001	<.0001	0.0020	<.0001	0.1249	
11	0.4291	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9906	0.9988	0.9493	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	0.9988	1.0000	0.0027	<.0001	0.0142	<.0001	<.0001	0.0009	0.0040	0.0063	<.0001	<.0001	0.0004	<.0001	0.0402	
12	0.9763	1.0000	1.0000	1.0000	0.9386	0.5269	1.0000	1.0000	1.0000	0.9992	1.0000		1.0000	1.0000	0.8977	<.0001	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0016	
13	0.7242	1.0000	1.0000	1.0000	0.9994	0.9055	1.0000	0.9969	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	0.9979	0.0007	<.0001	0.0038	<.0001	<.0001	0.0002	0.0010	0.0016	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001	0.0118	
14	0.9996	0.9985	0.9998	1.0000	0.6974	0.2317	1.0000	1.0000	1.0000	0.9665	0.9988	1.0000	1.0000		0.6131	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	
15	0.0304	1.0000	0.9999	0.8325	1.0000	1.0000	0.6131	0.2717	0.8895	1.0000	1.0000	0.8977	0.9979	0.6131		0.0845	0.0031	0.2717	0.0009	<.0001	0.0340	0.1135	0.1574	<.0001	0.0001	0.0191	0.0004	0.4984	
16	<.0001	0.0029	0.0016	<.0001	0.0620	0.3158	<.0001	<.0001	<.0001	0.0111	0.0027	<.0001	0.0007	<.0001	0.0845		1.0000	1.0000	0.9990	0.0125	1.0000	1.0000	1.0000	0.8977	0.9386	1.0000	0.9940	1.0000	
17	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0021	0.0203	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0031	1.0000		0.9963	1.0000	0.2317	1.0000	1.0000	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9586	
18	<.0001	0.0150	0.0087	0.0003	0.2133	0.6698	<.0001	<.0001	0.0004	0.0500	0.0142	0.0005	0.0038	<.0001	0.2717	1.0000	0.9963		0.9541	0.0024	1.0000	1.0000	1.0000	0.5844	0.6698	1.0000	0.8895	1.0000	
19	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	0.0063	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0009	0.9990	1.0000	0.9541		0.4564	1.0000	0.9969	0.9906	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.8105	
20	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0125	0.2317	0.0024	0.4564		0.0340	0.0087	0.0056	0.8977	0.8429	0.0588	0.5988	0.0007	
21	<.0001	0.0009	0.0005	<.0001	0.0241	0.1574	<.0001	<.0001	<.0001	0.0038	0.0009	<.0001	0.0002	<.0001	0.0340	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0340		1.0000	1.0000	0.9815	0.9919	1.0000	0.9998	1.0000	
22	<.0001	0.0043	0.0024	<.0001	0.0845	0.3895	<.0001	<.0001	0.0001	0.0160	0.0040	0.0001	0.0010	<.0001	0.1135	1.0000	1.0000	1.0000	0.9969	0.0087	1.0000		1.0000	0.8429	0.8977	1.0000	0.9857	1.0000	
23	<.0001	0.0067	0.0038	0.0001	0.1191	0.4843	<.0001	<.0001	0.0002	0.0241	0.0063	0.0002	0.0016	<.0001	0.1574	1.0000	0.9997	1.0000	0.9906	0.0056	1.0000	1.0000		0.7629	0.8325	1.0000	0.9665	1.0000	
24	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.8977	1.0000	0.5844	1.0000	0.8977	0.9815	0.8429	0.7629		1.0000	0.9957	1.0000	0.3395	
25	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0009	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	0.9386	1.0000	0.6698	1.0000	0.8429	0.9919	0.8977	0.8325	1.0000		0.9985	1.0000	0.4157
26	<.0001	0.0005	0.0003	<.0001	0.0133	0.0981	<.0001	<.0001	<.0001	0.0020	0.0004	<.0001	0.0001	<.0001	0.0191	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0588	1.0000	1.0000	1.0000		0.9957	0.9985		1.0000	0.9996
27	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	0.0033	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0004	0.9940	1.0000	0.8895	1.0000	0.5988	0.9998	0.9857	0.9665	1.0000	1.0000	1.0000		0.6836
28	<.0001	0.0425	0.0256	0.0010	0.4157	0.8810	0.0003	<.0001	0.0015	0.1249	0.0402	0.0016	0.0118	0.0003	0.4984	1.0000	0.9586	1.0000	0.8105	0.0007	1.0000	1.0000	1.0000		0.3395	0.4157	0.9996	0.6836	