Otpornost autohtonih sojeva Bradyrhizobium japonicum na stres izazvan nedostatkom vlage

Puljko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:321300

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Otpornost autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* na stres izazvan nedostatkom vlage

DIPLOMSKI RAD

Ana Puljko

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Agroekologija

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

Otpornost autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* na stres izazvan nedostatkom vlage

DIPLOMSKI RAD

Ana Puljko

Mentor: prof. dr. sc. Sanja Sikora

Neposredni voditelj: Sanja Kajić, mag. biol. mol

.

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Puljko**, JMBAG 0178087135, rođen/a dana 21.08.1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Otpornost autohtonih sojeva Bradyrhizobium japonicum na stres izazvan nedostatkom vlage

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Ana Puljko**, JMBAG 0178087135, naslova

Otpornost autohtonih sojeva Bradyrhizobium japonicum na stres izazvan nedostatkom vlage

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	prof. dr. sc. Sanja Sikora	mentor	_____
	Sanja Kajić, mag.mol.biol	neposredni voditelj	_____
2.	izv. prof. dr. sc. Mihaela Blažinkov	član	_____
3.	prof. dr. sc. Snježana Kereša	član	_____

Zahvala

Izrazito se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc Sanji Sikori na svim savjetima i preporukama prilikom izrade ovog diplomskog rada, kao i tijekom studiranja. Također se zahvaljujem neposrednoj voditeljici Sanji Kajić, mag. mol. biol. na velikoj pomoći i strpljenju. Posebna zahvala ide mojim roditeljima Nini i Marijanu i bratu Hrvoju na njihovoj neizmjernoj podršci.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Cilj istraživanja 3
2. Pregled literature 4
2.1. Simbiozna fiksacija dušika 4
2.2. Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) 6
2.3. Kvržične bakterije *Bradyrhizobium japonicum* 7
2.4. Utjecaj okolišnih čimbenika na populacije simbioznih fiksatora dušika 9
2.4.1. Utjecaj nedostatka vode 9
2.4.2. Utjecaj salinitetnog stresa 10
2.4.3. Utjecaj osmotskog stresa 11
2.5. Mehanizmi odgovora kvržičnih bakterije na okolišni stres 13
3. Materijali i metode 15
3.1. Sojevi *B. japonicum* 15
3.2. Fenotipska karakterizacija sojeva *B. japonicum* 16
3.2.1. Rast sojeva *B. japonicum* na različitim koncentracijama PEG6000 16
3.2.2. Rast sojeva *B. japonicum* na različitim koncentracijama NaCl 17
3.3. Genotipska karakterizacija sojeva *B. japonicum* 18
3.3.1. Izolacija DNA iz čistih kultura 18
3.3.2. Određivanje koncentracije izolirane DNA spektrofotometrijskom metodom 19
3.3.3. ERIC-PCR 19
3.3.4. Analiza ERIC-PCR profila 21
4. Rezultati 22
4.1. Fenotipska karakterizacija sojeva 22
4.2.1. Rast sojeva *B. japonicum* pri različitim koncentracijama PEG 6000 22
4.2.2. Rast sojeva *B. japonicum* na različitim koncentracijama NaCl 24
4.2. Genotipska karakterizacija sojeva 26
4.2.1 ERIC-PCR analiza 26
5. Rasprava 28
6. Zaključci 31
7. Literatura 32
8. Životopis 39

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ane Puljko**, naslova

OTPORNOST AUTOHTONIH SOJEVA *Bradyrhizobium japonicum* NA STRES IZAZVAN NEDOSTATKOM VLAGE

Biološka fiksacija dušika uvelike ovisi o uvjetima tla, a nedostatak vode uzrokuje porast koncentracije soli i povišenje osmotskog tlaka u tlu što negativno utječe na simbiozni odnos biljaka i bakterija te na samu fiksaciju dušika. U ovom diplomskom radu 15 autohtonih sojeva *Bradyhrizobium japonicum* izoliranih iz pet različitih područja Republike Hrvatske podvrgnuto je ispitivanjima u uvjetima *in vitro* suše i pri povišenom sadržaju soli. Izvršena je identifikacija sojeva ERIC-PCR metodom radi utvrđivanja genetske varijabilnosti autohtonih bakterija. Uvjeti *in vitro* nedostatka vode su se utvrđivali pomoću polietilen glikola (PEG) 6000 gdje je pri 15 % PEG 6000 autohtoni soj izoliran iz područja istočne Slavonije *B. japonicum* IS1 je tolerantan na nedostatak vode. Najmanje je otporan autohtoni soj *B. japonicum* ZS4, izoliran iz zapadne Slavonije. Pri koncentraciji PEG 6000 od 30 %, autohtoni soj istočne Slavonije, *B. japonicum* IS2 izrazito je otporan na osmotski stres, a najmanje tolerantan na nedostatak vode je soj *B. japonicum* IS4, izoliran s područja istočne Slavonije. Kod svih ispitivanih sojeva uočen je dobar rast pri koncentraciji od 1 % NaCl. Umjeren rast je utvrđen kod autohtonog soja iz područja Koprivnice i kod referentnog soja *B. japonicum* 344, dok dva soja zapadne Slavonije nisu tolerantna na 2 % NaCl. Dva autohtona soja Baranje, jedan soj Istre, tri soja istočne Slavonije i jedan soj iz Koprivnice su otporni na salinitet od 3 % NaCl. Autohtoni soj Baranje, Istre i dva iz istočne Slavonije su toleratni na izrazito visoke koncentracije od 4 % NaCl. Prema rezultatima ERIC-PCR metode utvrđeno je da genetska sličnost nije uvjetovana mjestu izolacije. Svi sojevi su podjeljeni u dvije glavne grupe s niskom relativnom sličnošću. Najveća genetska sličnost bila je utvrđena kod sojeva izoliranih iz područja Baranje, istočne Slavonije, Koprivnice i zapadne Slavonije.

Ključne riječi: *Glycine max* (L.) Merrill, kvržične bakterije, fiksacija dušika, *in vitro* suša, salinitet, ERIC-PCR

Summary

Of the master's thesis – student Ana Puljko, entitled

RESISTANCE OF INDIGENOUS *Bradyrhizobium japonicum* STRAINS TO WATER STRESS DEFICIENCY

Biological nitrogen fixation is largely dependant on soil conditions. Lack of water causes increased salt concentration and elevated osmotic pressure in the soil, which negatively affect the symbiotic relationship between plant and bacteria, and nitrogen fixation itself. In this master thesis, fifteen indigenous strains *Bradyrhizobium japonicum* isolated from five different regions of the Republic of Croatia were subjected to *in vitro* investigations in drought conditions and with increased concentrations of NaCl. Identification of strains was carried out with ERIC-PCR method in order to determine genetic variability of indigenous bacteria. Conditions of *in vitro* water deficiency were determined with polyethilene glycol (PEG) 6000. At 15 % of PEG 6000 indigenous strain isolated from east Slavonia region, *B. japonicum* IS1 is tolerant to the lack of water. Least resistant strain is *B. japonicum* ZS4, isolated from west Slavonia. At the concentraction of 30 % PEG 6000, indigenous strain from eastern Slavonia, *B. japonicum* IS2, is distincively resistant to osmotic pressure and least tolerant is strain *B. japonicum* IS4, from eastern Slavonia. In all tested strains, good growth is observed at the concentration of 1 % NaCl. Moderate growth is noticed in the indigenous strain from Koprivnica region and in the referent strain *B. japonicum* 344, whilst two strain from western Slavonia are intolerant at 2 % NaCl. Two indigenous strains of Baranja region, one from Istria, three from eastern Slavonia and one from Koprivnica region are resistant on the salinity of 3 % NaCl. Indigenous strans from Baranja region, Istria and two from eastern Slavonia are very tolerant on the high concentration of 4 % NaCl. According to results from ERIC-PCR method genetic similarity is not conditioned with location of the isolation. All strains are divided into two main groups with low relative similarity. The greatest genetic similarity were observed with strains that were isolated from Baranja region, easter Slavonia, Koprivnica and western Slavonia.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill, root colonizing bacteria, nitrogen fixation, *in vitro* drought, salinity, ERIC-PCR

1. Uvod

Suša je jedan od najvećih limitirajućih čimbenika u proizvodnji hrane. Procjenjuje se da će do 2050. godine, ona uzrokovati probleme s proizvodnjom poljoprivrednih kultura na 25 % uzgojnih površina (FAO, 2016). Prema Američkom meteorološkom društvu (2004) suša se može podijeliti na četiri definicije: meteorološka suša je nedostatak oborina u određenom vremenskom periodu; hidrološka suša je definirana kao nedostatak adekvatne vodene površine koja se može upotrebljavati u gospodarenjem voda; socio-ekonomska suša je definirana kao nedostatak vode i vodenih sustava koje udovoljavaju potražnjom za vodom; agronomska suša je period s padajućom vlažnosti tla koja rezultira uginućem biljaka (Ngumbi i Kloepper, 2016).

U poljoprivrednoj proizvodnji važan je simbiozni odnos kvržičnih bakterija i mahunarki jer se u praksi iskorištava kroz agrotehničku mjeru predsjetvene bakterizacije sjemena. Bakterije koje stupaju u simbiozni odnos s mahunarkama zajedničkim se imenom nazivaju rizobije. One posjeduju sposobnost inficiranja korijena biljaka mahunarki nakon čega dolazi do procesa nodulacije te se stvaraju kvržice u kojima se odvija fiksacija dušika. Prilikom uspostave kvalitetnog odnosa između članova simbioze, vrlo veliki značaj imaju okolišne prilike tla u kojima se nalazi korijen biljke i same rizosferne bakterije.

Suša smanjuje nodulaciju jer utječe na preživljavanje bakterija u tlu, kolonizaciju korijena i infekcije (Zahran., 1999; Mhadhbi i sur., 2011). Učinkovitost kolonizacije i brza adaptacija bakterija prilikom sušnih uvjeta mogu se upotrijebiti za smanjenje utjecaja suše na biljke. (Yang i sur, 2009). Suša i salinitet tla negativno utječu na rast i razvoj biljaka što rezultira slabom ili nepostojećom uspostavom simbioze. Stoga preživljavanje rizobija i njihova kolonizacija biljaka od velike je važnosti za formiranje zdravih kvržica što rezultira preživljavanjem biljaka u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Egamberdieva i sur., 2017).

Nekoliko okolišnih faktora djeluju kao limitirajući faktori rasta i utječu na aktivnost biljaka i rizobija. 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, neadekvatna fotosinteza,..) utječu na biljku domaćina (Brockwell i sur., 1995). Tipični okolišni faktori koji utječu na ostvarivanje simbioznih odnosa uključuju vodni stres, poremećaj u fotosintezi, salinitet, povišen sadržaj nitrata u tlu te nepovoljnu temperaturu (Zahran, 1999).

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 bakterija i njihovom primjenom u uzgoju mahunarki ostvaruju se veći prinosi, bolje kakvoće uz manja ulaganja (Sikora i Redžepović, 2000). 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 vrše simbioznu fiksaciju dušika. To potvrđuju Meghvansi i sur. (2010.) gdje introducirani soj *B. japonicum* UJ335-1 nije imao zadovoljavajuće rezultate uspoređujući ga s analiziranim autohtonim sojevima. Stoga se smatra da bi autohtoni sojevi *B. japonicum* izolirani iz različitih uzgojnih područja mogli povećati učinkovitost bakterizacije korijena soje u nepovojnim uvjetima tla.

1.1. Cilj istraživanja

Klimatski uvjeti i promjene uvelike su važni za poljoprivrednu proizvodnju. Među najvećim problemima s kojima se poljoprivreda susreće su nedostatak vode i povišen salinitet tla. Zbog utjecaja suše i proširivanja aridnih područja, sve je veći trend smanjivanja prinosa poljoprivrednih kultura. Zato je potrebno istražiti utjecaj različitih okolišnih stresova na rizobije, također selekcionirati visoko učinkovite sojeve tolerantne na različite okolišne uvjete. Ti sojevi imaju potencijal većeg iskorištavanja simbiozne fiksacije dušika i povećanja prinosa u tlima pogodnim za poljoprivrednu proizvodnju.

Ciljevi istraživanja u ovom radu su:

1. utvrditi otpornost autohtonih sojeva *B. japonicum* na *in vitro* sušu,
2. utvrditi otpornost autohtonih sojeva *B. japonicum* na povišene koncentracije NaCl i
3. utvrditi genetsku raznolikost između autohtonih sojeva *B. japonicum* izoliranih iz različitih uzgojnih područja soje Republike Hrvatske

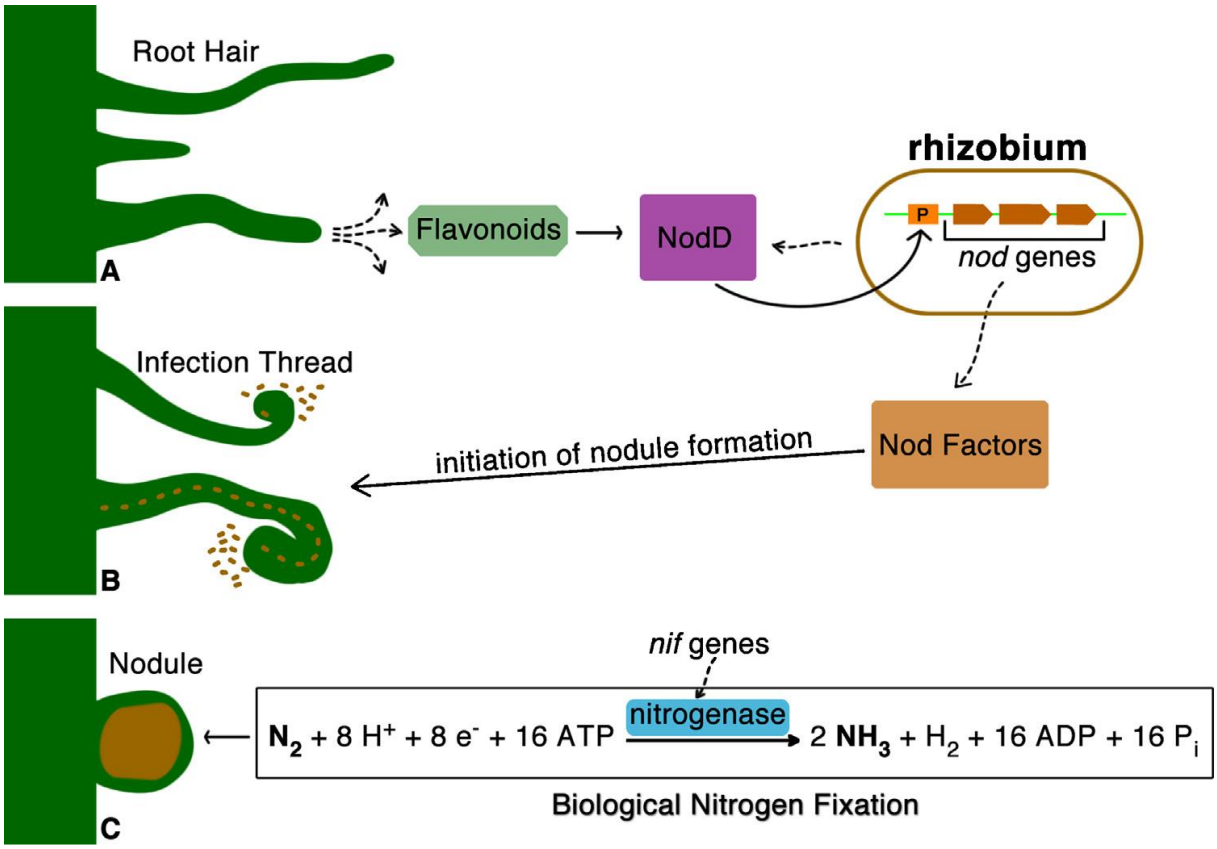
2. Pregled literature

2.1. Simbiozna fiksacija dušika

Simbiozna fiksacija dušika je proces koji je vrlo dobro istražen u poljoprivredi i alternativa je korištenju dušičnih mineralnih gnojiva koji za proizvodnju iskorištavaju fosilna goriva. Inokulacija mahunarki smatra se jednom od najstarijih ekoloških i biotehnoloških pristupa u agronomiji. Taj postupak datira iz 1888. kad je Beijirincki potvrdio da su mikroorganizmi odgovorni za formiranje kvržica na korijenu mahunarki (Crawford i sur. 2000). Simbiozom između rizobija koje žive u tlu i mahunarki reducira se atmosferski dušik u amonijak, a zatim u glutamin koje biljke iskorištavaju za svoj rast (Ferguson i sur., 2010.). Dobra i efektivna simbioza između navedenih organizama može zamijeniti ili bar smanjiti korištenje dušičnih gnojiva. Simbiozom između mahunarki i rizobija se fiksira se 80 % dušika u prirodi (Zahran, 2010), dok u poljoprivredi simbioza omogućava 45 % dušika za rast biljaka (Karmakar i sur. 2015; Zahran, 2017).

Vrlo velik utjecaj na saprofitski rast rizobija i uspostavu simbioznog odnosa s biljkama imaju različiti okolišni čimbenici u tlu. Za bolju nodulaciju prilikom uzgoja mahunarki upotrebljavaju se selekcionirani sojevi, na primjer *B. japonicum* i *Rhizobium galegae* jer umanjuju djelovanje čimbenika stresa te pospješuju rast biljke i nodulaciju na korijenu soje i kozje rute (*Galega officinalis*) (Zahran, 2017).

Mahunarke imaju sposobnost formiranja kvržica - nodula na korijenu u kojima se događa proces fiksacije dušika. Soja (*Glycine max*) je najrasprostranjenija kultivirana mahunarka. Najčešće formira simbiozu s vrstama rizobija kao što su *Bradyrhizobium japonicum* i *Sinorhizobium fredii* (Dolatabadian i sur. 2013). Soja pruža zaštitu i hranjive tvari rizobijima, a zauzvrat bakterije fiksiraju atmosferski dušik (N_2) i prevode ga u amonijak (NH_3) koje biljke mogu koristiti. Za povoljan nastanak ovakvog odnosa, tlo bi trebalo sadržavati relativno velik broj stanica rizobija koje se nalaze dovoljno blizu samog korijena biljke (Barthelemey-Delaux i sur., 2014).



Slika 1. Shematski prikaz simbioze između korijena biljke domaćina i rizobija (Laranjo i sur. 2014)

Simbiozna fiksacija dušika započinje kad biljka izlučivanjem određenih flavonoida i izoflavonoida inducira nodulacijske gene (Nod-geni) u rizobijima. Soja izlučuje izoflavonoide genistein i daidzein, koje kompatibilni sojevi *B. japonicum* prepoznaju (Muñoz i sur., 2014). Flavonoidi daju signale za ekspresiju Nod-gena koji kodiraju proteine što su odgovorni za sintezu i izlučivanje nodulacijskih faktora (Nod-faktori). Prilikom izlučivanja izoflavonoida soje, oni iniciraju ekspresiju općih Nod-gena (*nodYABC*) i ekspresiju specifičnih Nod-gena (npr. *nodZ* i *nodFE*) za bakterijsku infekciju određene vrste. Odgovor je bakterije na signale biljke sinteza lipohito-oligosaharida tzv. Nod-faktora. Pomoću Nod-faktora započinje deformacija korijenovih dlačica, izazivaju razne biokemijske reakcije i počinje dijeljenje stanica u korijenu, odnosno stvaranje infekcijske niti pomoću koje bakterije ulaze u korijen i stvaraju funkcionalne kvržice (Slika 1). Soja sadrži dimerne proteinske receptore i kompleks signalnih kaskada koje se aktiviraju ako specifična vrsta bakterije izlučuje određene Nod-faktore koje biljka domaćin prepoznaje (Dolatabadian i sur., 2013). Fiksacija atmosferskog dušika u nodulama događa se pomoću gena za fiksaciju (*nif* i *fix*), gdje je najbitniji gen za enzim nitrogenazu *nifHDK* (Laranjo i sur., 2014).

2.2. Soja (*Glycine max* (L.) Merr.)

Soja (*Glycine max* (L.) Merill) je jedna od najvažnijih poljoprivrednih kultura u svijetu. Najviše se uzgaja u Sjedinjenim Američkim Državama, Brazilu, Kini i Argentini. Prema Statističkom ljetopisu (2017.), u Hrvatskoj je 2016. godine proizvodnja soje iznosila 244 075 tona. Po količini proizvodnje kao industrijskog usjeva Hrvatske, nalazi se druga po redu nakon šećerne repe. Cijela biljka se može koristiti u prehrani ljudi, domaćih životinja i za industrijsku proizvodnju različitih derivata iz sojinih proteina i ulja. Sjeme soje sadrži između 38 - 44 % proteina, 18 - 23 % ulja i oko 30 % ugljikohidrata te različitih minerala i vitamina. Uzgaja se na većim proizvodnim površinama te je vrlo važna kultura u plodoredu, a može se proizvoditi u naknadnoj ili postrnoj sjetvi za zelenu masu i zrno (Gagro, 1997; Orf, 2010). Soja može simbioznim odnosom s rizobijima podmiriti i do 70 % potrebnog dušika. Prilikom proizvodnje soje ne preporuča se gnojidba dušičnim gnojivima, pogotovo ureom jer neće doći do infekcije korijena (Gagro M., 1997). Također, kao što je spomenuto, uspostava simbioze neće doći ni u nepovoljnim uvjetima u tlu, a pogotovo prilikom nedostatka vode u tlu. Stres izazvan sušom smanjuje fiksaciju dušika što rezultira smanjenjem produkata fotosinteze te utječe na razvitak same biljke, ali i nodula.

Za dobru i sigurnu uspostavu kvalitetnog simbioznog odnosa u prilikama gdje će biti izražen nedostatak vode što dovodi do suše i nakupljanja iona soli u tlu, osim selekcije sorata soje koje daju dovoljan prinos u navedenim uvjetima, vrlo važna je selekcija vrsta i sojeva rizobija. Izolirane vrste i sojevi prvenstveno moraju dati dobre rezultate u laboratorijskim, kao i poljskim pokusima gdje se simuliraju nepovoljni uvjeti tla radi odabira najboljih sojeva za proizvodnju preparata za predsjetvenu bakterizaciju. *B. japonicum* je do sad najpogodnija vrsta rizobija za predsjetvenu inokulaciju sjemena soje.

2.3. Kvržične bakterije *Bradyrhizobium japonicum*

Klasifikacija roda *Rhizobium* prvi put je promjenjena kad je Jordan (1982.) opisao novi rod *Bradyrhizobium* koji sadrži simbozne fiksatora dušika koji tvore simbiozu s korijenom soje (*Glycine max*) (Marcondes de Souza i sur. 2014). Napredovanjem molekularnih metoda za identifikaciju organizama pomoću 16S rRNA sekvencioniranja, rod *Bradyrhizobium* se uvrstio u novu porodicu, *Bradyrhizobiaceae*. Prema filogeneskom stablu, porodica *Bradyrhizobiaceae*, spada u razred *Alphaproteobacteria*, red *Rhizobiales* te sadrži 12 rodova, od kojih je za poljoprivredu vrlo značajan rod *Bradyrhizobium*.

Vrsta *B. japonicum* je spororastuća kvržična bakterija štapićastog oblika, veličine 0,5 - 0,9 x 1,2 – 3,0 µm. Pokreću se pomoću jedne polarne ili subpolarne flagele. Gram su negativni, nesporulirajući mikroorganizmi. *B.* japonicum su aerobne bakterije, gdje im je kisik krajnji primatelj elektrona u metabolizmu disanja (Kuykendall, 2015). Optimalna temperatura za njihov rast je između 25 – 30 °C, a maksimalna temperatura je 33 - 35 °C. Tolerantni su na kiselu sredinu. Optimalni pH je između 6 – 7, a većina sojeva raste pri pH od 4,5. Neki sojevi mogu rasti na niskom pH od 3,5. Ne rastu na pH iznad 9,0. Kemoorganotrofi su, upotrebljavaju širok raspon ugljikohidrata i soli iz organskih kiselina, što im služi kao izvor ugljika, bez proizvodnje plina. Najpoželjniji izvori ugljika su arabinoza i razne pentoze. U mediju koji sadrži mineralne soli, manitol te razne ugljikohidrate stvaraju alkalnu reakciju. Pri rastu na ugljikohidratima (glicerol, glukonat ili manitol) izlučuju vodotopive izvanstanične polisaharide u obliku sluzi. Nitriti i neke aminokiseline mogu poslužiti kao izvor dušika. Slabo iskorištavaju pepton, a ne hidroliziraju kazein i agar. Također, ne iskorištavaju celulozu i škrob. Ne iskorištavaju vitamine za rast, osim vrlo rijetko, biotin koji može biti inhibitoran za neke sojeve. Ne rastu u medijima koji sadrže 2 % NaCl, ne stvaraju H_2S, dok vrlo često stvaraju penicilazu (Kuykendall, 2015).

Kolonije *B. japonicum* okruglog su oblika, mutne, vrlo rijetko prozirne, bijele boje, konveksne i teksturno mogu biti granulirane. Promjer im nije veći od 1,0 mm, nakon inkubacije od 5 – 6 dana na A1EG hranjivoj podlozi, dok u tekućoj podlozi turbitet je vidljiv tek nakon 3 – 4 dana. Generacijsko vrijeme je 9 – 18 sati te spadaju u spororastuće rizobije.

Karakteristika je vrste *Bradyhrizobium* da ulaze u korijenove dlačice mahunarki tropskih i umjerenih krajeva te potiču stvaranje nodula gdje se one nalaze kao unutarstanični simbionti. Neki sojevi, a pogotovo vrsta *B. elkani* fiksira dušik kao slobodnoživuća bakterija u tlu u određenim uvjetima (Kuykendall, 2015).

Cjelokupni genom *B. japonicum* sekvencioniran je 2011. godine i sastoji se od 9, 2 milijun 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 *Bradyrhizobium* sadrži plazmide koje nose gene za simbiozu (Zahran, 2017). Genomski otoci su podijeljeni u tri regije (Locus A, Locus B, Locus C) i sadrže 860 tisuća parova baza. Geni (*nif* i *fix*) za fiksaciju dušika nalaze se u središnjem dijelu tog otoka. Prema Kaneko i sur. (2011.) pomoću genetskih analiza otkriveno je da vrlo veliki broj gena, koji su zaslužni za stupanje u simbiozni odnos sa sojom, dobiveno horizontalnim prijenosom gena među sojevima *B. japonicum*. U istraživanju od Okubo i sur. (2012.) otkriveno je da soj *Bradyhrizobium* sp. S23221 izoliran iz rižinih polja, ne sadrži simbiotski otok, kojeg sadrže ostali istraživani sojevi *B. japonicum* (USDA 6 i USDA 110), nego sadrži fotosintetski sustav. Navedena istraživanja ukazuju da se vrste roda *Bradyrhizobum* prilagođavaju različitim uvjetima sredine.

2.4. Utjecaj okolišnih čimbenika na populacije simbioznih fiksatora dušika

2.4.1. Utjecaj nedostatka vode

Nedostatak vode, odnosno suša utječe na preživljavanje bakterija tla direktno preko osmotskog stresa i kompeticije za resurse. Bakterije žive u optimalnim uvjetima gdje rastu, razmnožavaju se i obavljaju metaboličke procese, no za preživljavanje u promjenjivoj okolini, moraju se adaptirati. Uslijed nedostatka vode u tlu može doći do nakupljanja soli i drugih toksičnih spojeva što uzrokuje solni i osmotski stres. Krajnji je rezultat oštećenje nukleinskih kiselina (Ngumbi i Kloepper, 2016). Akumulacijom prevelikih količina toksičnih spojeva dolazi do smanjenja vijabilnosti stanica. (Vriezen, 2005). No, nisu samo uvjeti tla uzročnici smanjenja vijabilnosti mikroorganizama. Proces proizvodnje cjepiva za inokulaciju biljaka može ugroziti broj bakterija koje su potrebne za uspješnu bakterizaciju. Radi potrebe skladištenja, proizvedeni inokulanti se isušuju. Uvijek će doći do odumiranja određenog broja bakterija u fazi isušivanja. Ako dođe do naglog isušivanja, manja je stopa preživljavanja bakterija (Vrizen, 2005.). Prilikom proizvodnje inokulanata gdje se upotrebljava sporiji način isušivanja, bakterije će imati veće šanse za preživljavanje jer imaju dovoljno vremena za prilagodbu na sušne uvjete. Bushby i Marshall (1977.) uvidjeli su da je veći postotak preživljavanja vrste roda *Bradyrhizobium* nego *Sinorhizobium* pri brzom isušivanju. Van Rensburg i Strijdom (1980.) su ustanovili da prisilnim isušivanjem u pijesku, *Bradyrhizobium* ima veću stopu preživljavanja, a *Sinorhizobium* više preživljava prilikom sporog sušenja (Vriezen, 2005.).

Nedostatak vode u mikroorganizmima se može podijeliti na tri stadija: isušivanje, dormantnost i revitalizacija stanica. Ovo se odnosi na proizvodnju inokulanata, no može se primijeniti i na nedostatak vode u tlu. Tijekom nedostatka vode događa se nakupljanje soli tijekom faze isušivanja; hiperosmoza; prilikom smanjenja aktivnosti vode dolazi do smanjenja metaboličke aktivnosti; jednoslojni vodeni omotač oko makromolekula se odvaja i dolazi do oštećenja stanice – slično je kao oštećenje UV ili ionizirajućim zračenjem; nakupljaju se kisikove reaktivne vrste (ROS – „reactive oxygen species“) tijekom faze mirovanja jer mikroorganizmi nisu metabolički aktivni; nakon revitalizacije stanica, odnosno dolaskom vlage, postoji mogućnost hipoosmotskog stresa te pojave i nakupljanja ROS (Vriezen, 2005).

Suša dovodi do oštećenja DNA i RNA, akumuliraju se slobodni radikali, smanjuje se efikasnost restrikcijskih enzima i događaju se promjene u transportnom sustavu elektrona (Vrieze, 2005; Ngumbi i Kloepper, 2016). Potaknuta je promjena građe proteina koja utječe

na promjenu kemijskog sastava fosfolipida i masnih kiselina u staničnoj membrani. Akumulirani slobodni radikali pospješuju razgradnju proteina i peroksidaciju lipida gdje je krajnji rezultat liza stanice (Ngumbi i Kloepper, 2016.).

Bakterija može odgovoriti na stres u dva oblika: pomoću općenite reakcije na stres te specifičnom reakcijom na stres. Prvobitna je reakcija kontrolirana s jednim do nekoliko glavnih regulatora na stres. Omogućava unakrsnu zaštitu od mnogih negativnih okolišnih čimbenika bez obzira na inicijator stresa. Ovakav je način zaštite učinkovit za preživljavanje, ali ne i za rast bakterijske stanice u stresnim uvjetima. U otežanim i produženim uvjetima stresa, stanica počinje upotrebljavati mehanizme za specifične reakcije na stres. Ovakav način prilagodbe djeluje kao usklađene interakcije između genetskih i fizioloških mehanizama prilagodbe. Također, postoji kompleksna veza između specifičnih reakcija na stres i općih regulatora stresa te se time dodaje još jedna razina kontrole stanice za odgovor na stres i dugoročno preživljavanje (Fox, 2005).

2.4.2. Utjecaj salinitetnog stresa

Akumulacija soli u tlu prijeti poljoprivrednoj proizvodnji, naročito u polusušnim i sušnim klimatskim zonama. Skoro 40 % svjetskih obradivih površina smatra se problematičnima u smislu zaslanjenosti tla (Kajić i sur., 2016). Slanost se tla najčešće događa prilikom nedostatka vode te ima utjecaj pri uspostavljanju simbioznog odnosa između mahunarki i rizobija. U biljci djeluje na fotosintetsku aktivnost što direktno ima utjecaj na metabolizam i redukciju dušika u kvržicama (Georgiev i Atkias, 1993; Zahran, 1999). Iako postoje kultivari i sojevi koji su otporni na salinitet, moguće je da se simbioza i formiranje nodula neće dogoditi (Zahran, 1991). Također, smatra se da su spororastuće vrste rizobija, odnosno *Bradyrhizobium* osjetljiviji na salinitetni stres, nego brzorastuće bakterije.

Sama uspostava simbioze između rizobija i mahunarka te formiranje kvržica na korijenu su više osjetljivi na sušu izazvanu solnim ili osmotskim stresom, nego što su osjetljive same rizobije. Akumulacija soli inhibira prvobitnu uspostavu odnosa – samu infekciju korijena (L'taief i sur., 2007). Prema istraživanju Tu (1981.) koje je provedeno na korijenu soje inokuliranog *B. japonicum*, pri koncentraciji NaCl od 170 mM, uvijanje i deformacija korijenovih dlačica je bila minimalna, a nodulacija je bila izostavljena pri 210 mM NaCl (Zahran, 1999).

Salinitetni stres je limitirajući čimbenik za simbioznu fiksaciju dušika.U zaslanjenom tlu, redukcija atmosferskog dušika je smanjenja. Respiracija kvržica se umanjuje zbog

redukcije staničnih proteina, što utječe i na protein leghemoglobin (Ikeda i sur., 1992; Delgado i sur., 1994; Kajić i sur., 2016). Stvaraju se nefunkcionalne kvržice, nepravilne građe jer salinitet utječe na samu strukturu nodula. Osim toga, prilikom ulaska bakterije u membranu korijena, ne dolazi do formiranja peribakteroidne membrane. Poremećaj u strukturi kvržica ima veliki učinak na enzim nitrogenazu. Kvržice kontroliraju smanjenje i povećanje difuzije kisika unutar inficiranih stanica i tako reguliraju metabolizam (de Lima i sur., 1994.). Zbog smanjenja permeabilnosti samih nodula, kisik se akumulira i zadržava u inficiranim zonama korijena te dolazi do inhibicije aktivnost nitrogenaze što se u konačnici odražava na sam rast makrosimbionta (L'taief i sur., 2007).

Prema istraživanju L'taief i sur. (2007.) rezultati su pokazali da pri povećanom salinitetu nije došlo do uspostave simbioze između osjetljivih sorata slanutka (Amdoun 1 i INRAT 87) i *Mesorhizobium ciceri* UMPCa$_7$, dok se pri koncentraciji od 25 mM NaCL nisu tvorile nodule ni na jednoj istraživanoj sorti slanutka.

Osim što sol inhibira aktivnost nitrogenaze i uspostavu simbioznog odnosa, ona utječe na rast bakterija zbog ionskog toksiciteta (Farissi i sur. 2014). Nakuplja se u otopini u vrlo visokim koncetracijama unutar stanice što rezultira povećanjem osmotskog tlaka u citoplazmi (Elsheikh, 1998). Prema Rowellu (1988.), u tlima s povećanom salinitetom osim NaCl, toksičnu reakciju na bakterije imaju ioni K^+, Ca^{2+}, SO_4^{2-}, BO_3^{3-}, HCO_3^-. Steinborn i Roughley (1974) toksičnost NaCl-a pripisuju Cl^- ionu (Elsheikh, 1998).

2.4.3. Utjecaj osmotskog stresa

Prema Hrvatskoj enciklopediji (2017.) osmoza je difuzija kojom se izjednačavaju koncentracije u otopini i otapalu, odnosno izjednačavanje dviju otopina različitih koncentracija međusobno odijeljenih polupropusnom membranom. Osmoza se javlja u biljnim i životinjskim organizmima, gdje stanične membrane imaju svojstvo polupropusnosti i postoji razlika unutarstanične i izvanstanične koncentracije otopine.

Prilikom promjene u koncentraciji izvanstanične tekućine, ona se počinje kretati uz osmotski gradijent. Ako dođe do smanjenja izvanstaničnog osmotskog tlaka, voda počinje ulaziti u stanicu što rezultira hipoosmozom. U stanici se stvara hipotonična otopina što u konačnici dovodi do pucanja stanice. Povećanje izvanstaničnog osmotskog tlaka uzrokuje hiperosmozu, gdje dolazi do gubitka tekućine iz stanice, javlja se dehidratacija i plazmoliza

(Wood, 2015) Sama stanica brže reagira na hipoosmozu jer se događa veća šteta prilikom pucanja stanice nego ako dođe do dehidracije (Wood, 1999).

Bakterije imaju više načina za detekciju promjene u osmotskom tlaku stanice, što uključuje: promjenu turgora unutar stanice, deformaciju stanične stjenke te promjenu u hidratiziranosti membranskih proteina, dok je glavni čimbenik promjena u koncentraciji unutarstaničnih otopljenih tvari (Poolman i sur., 2002). Prema Milleru i Wood (1996.) i Wood (1999.) zadnji se čimbenik stanica detektira pomoću iona kalija jer se vrlo brzo transportiraju i akumuliraju unutar citoplazme nakon osmotske promjene. Smatra se da nema nikakvu drugu funkciju osim kao sekundarni glasnik za aktivaciju drugih reakcija na plazmolizu (Fox, 2005). Različiti su autori dokazali da smanjen rast i razmnožavanje stanica rizobija nije samo zbog utjecaja povećanog osmotskog tlaka, nego ovisi i o akumulaciji određenog iona soli (Fox, 2005).

Za određivanje tolerantnosti bakterija na induciranu sušu u laboratorijskim i poljskim pokusima zbog povećanja osmotskog tlaka koristi se otopina PEG 6000. Polietilen glikol veže izvanstaničnu vodu te mikroorganizami nisu u stanju usvojiti vodu. Prema istraživanju Farissi i sur. (2014.) pomoću PEG 6000 (6 - 9 %) ispitivan je rast *S. meliloti*. Do 7 % nije bilo nikakvog utjecaja, ali kako se postotak PEG 6000 povećavao tako se rast svih ispitivanih sojeva smanjivao. U istraživanju Mangla (2013.) svi istraživani sojevi rizobija izoliranih sa zlatnog graha (*Vigna radiata*) mogli su rasti pri koncentraciji PEG od 10 %, no samo su četiri soja mogla rasti pri koncentraciji od 30 % PEG-a.

2.5. Mehanizmi odgovora kvržičnih bakterije na okolišni stres

Vrlo je teško razlikovati povećani osmotski stres i koncentraciju soli što uzrokuju sušu. Prema Zahranu i sur. (1994) soli mogu biti odgovorne za povećanje koncentracije otopljenih tvari u citoplazmi i utječu na povećanje osmotskog tlaka.

Bakterije imaju dva različita mehanizma kao odgovor tijekom osmotskog stresa. Osim olakšane difuzije kojom se balansira razina otopina prilikom stresa, jedan je od mehanizama odgovora na stres, pomoću specifičnih vodnih kanala u stanici, tzv. akvaporina. Oni omogućavaju brz protok vode kroz staničnu membranu. Ovakav mehanizam najviše iskorištavaju životinjske i biljne stanice, no nađeni su i u mikroorganizmima kao *Saccharomyces* spp. i *E. coli*. Akvaporini u *E. coli* akumuliraju velike količine vode koje brzo ulaze i izlaze iz stanice kao odgovor na smanjenje ili povećanje osmotskog tlaka. Vrlo su važni pri preživljavanju bakterija pod osmotskim stresom. Drugi mehanizam odgovora na stres, koje bakterije upotrebljavaju, a nalazi se u rizobijima je pomoću osmolita i/ili kompatibilnih otopljenih tvari. Bakterije koje se nastanjuju u staništima s promjenjivim razinama saliniteta i vode posjeduju takav mehanzam (Fox, 2005). Osmoliti su netoksične, vrlo topive, nenabijene molekule, male molekularne mase i ne sudjeluju u metaboličkim reakcijama u normalnim uvjetima, ali služe za stabilizaciju proteina i membrana i održavaju turgor stanice (Räsänen i sur., 2004; Pavlović, 2017). Također, štite enzime od inaktivacije toplinom (Räsänen i sur, 2004). Kompatibilne otopljene tvari su specifični organski osmoliti koji se akumuliraju u visokom postotku unutar stanice da uspostave ravnotežu s vanjskim okolišem kad su prisutne velike količine iona soli, ali ne ometaju stanične funkcije (Bougouffa i sur. 2014). Neke kompatibilne otopljene tvari stabiliziraju enzimatsku aktivnost unutar stanice tijekom stresnih uvjeta (Poolman i sur. 2002). Mnogi osmoliti u citoplazmi se ponašaju ili se prevode u kompatibilne otopljene tvari. Prema Bremeru i Krämeru (2000.) akumulacija kompatibilnih tvari može biti vrlo visoka i do nekoliko molova po litri (Fox, 2005). Osmoliti se mogu podijeliti na nekoliko glavnih skupina: šećeri (saharoza i trehaloza), polioli (sorbitol, manitol), aminokiseline (proline, glutamat, glutamin, betain,...) (Da Costa i sur., 1998). Od anorganskih tvari mogu iskorištavati K^+ ion (Wood, 2015). Osmoliti se u bakterijiskim stanicama akumuliraju direktnim usvajanjem iz okoline ako su dostupni ili se sintetiziraju *de novo*. Gram – pozitivne bakterije sintetiziraju svoje osmolite i kompatibilne tvarim, dok gram – negativne bakterije, uključujući rizobije povećavaju koncentraciju osmolita uzimanjem iz medija (Bougouffa i sur. 2014).

Bakterije mogu iskoristiti samo određene vrste osmolita i kompatibilnih tvari. Tako na primjer, *S. meliloti* i *E. coli* upotrebljavaju glicin betain, dok ga *Bacillus subtilis* teže iskorištava. Prolin je kompatibilna tvar kod *E. coli*, ali ga rizobiji ne iskorištavaju (Fox M. A, 2005). Prema rezultatima Boncompagni i sur. (1999.) u istraživanju gdje se ispitivao rast na medijima s povećanom koncentracijom NaCl (0,1 - 0,5 M) te obogaćenim osmolitima glicin betainom i kolinom, *B. japonicum* nije akumulirao navedene tvari i bakterija nije rasla pri povećanoj koncentraciji soli. Također, ustanovljeno je da sve ispitivane vrste rizobija u navedenom istraživanju mogu iskoristiti glicin betain i kolin, osim *B. japonicum*. Osmolit koji se smatra da *B. japonicum* iskorištava je trehaloza (Elsheikh, 1998). Također, prema Gouffi i sur., (1999.) nađeno je da bakterije ne uzimaju trehalozu iz medija, nego je sintetiziraju *de novo* (Vriezen, 2005). Što znači da za prilagodbu i preživljavanje na nepovoljne uvjete, bakterije iskorištavaju niz kemijskih i biokemijskih spojeva koje uzimaju iz okoliša ili ih same sintetiziraju.

3. Materijali i metode

3.1. Sojevi *B. japonicum*

U preliminarnom istraživanju ispitivano je 15 autohtonih izolata *B. japonicum* iz kolekcije sojeva Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Zavoda za mikrobiologiju (Tablica 1). Navedeni autohtoni sojevi izolirani su iz pet regija na području Republike Hrvatske. Kao referentni soj koristio se *B. japonicum* 344. Ispitivanja su vršena u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju, Sveučilišta u Zagrebu na Agronomskom fakultetu.

Tablica 1. Oznake sojeva izoliranih s različitih lokaliteta Republike Hrvatske

Lokalitet	**Oznaka soja**
Baranja 55	B1
Baranja 57	B2
Istra 134 A	I1
Istra 126 F	I2
Istočna Slavonija 33	IS1
Istočna Slavonija 23	IS2
Istočna Slavonija 30	IS3
Istočna Slavonija 26	IS4
Koprivnica 95	K1
Koprivnica 112	K2
Koprivnica 101	K3
Zapadna Slavonija 8	ZS1
Zapadna Slavonija 11	ZS2
Zapadna Slavonija 9	ZS3
Zapadna Slavonija 15	ZS4

3.2. Fenotipska karakterizacija sojeva *B. japonicum*

3.2.1. Rast sojeva *B. japonicum* na različitim koncentracijama PEG6000

Za određivanje rasta *B. japonicum* pri osmotskom stresu, korištena je hranjiva podloga YMB (Yeast Mannitol Broth) uz dodatak 15 % i 30 % polietilen glikol 6000 (PEG 6000). Za pripremu 1000 ml YMB korišteni su reagensi iz Tablice 2.

Tablica 2. Sastav manitne podloge s kvasnim ekstraktom (YMB) uz dodatak PEG 6000

K_2HPO_4	0,5 g
NaCl	0,1 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2 g
Manitol	10,0 g
Kvasni ekstrakt	0,4 g
Bromtimol (indikator)	5 ml
Destilirana voda	1000 ml
15 % PEG 6000	45 g
30 % PEG 6000	90 g

Tekuće podloge su podešene na pH vrijednost od 6, 8 s 1 M NaOH. Sterilizirane su u autoklavu na 121°C na 15 minuta.

Sojevi su precijepljeni u 5 ml sterilizirane YMB i inkubirane pri 28 °C na 24 sata. Uzimano je 100 µL prethodno vorteksiranih prekonoćnih kultura i precijepljeno u 20 ml steriliziranih YMB otopina koji su sadržavali 0 %, 15 % i 30 % PEG 6000. Otopine s kulturama, inkubirane su na električnoj miješalici (Orbital Shaker-Incubator ES-20) 7 dana pri 28 °C. Nakon sedam dana bakterijski rast je očitan na spektrofotometru (Spectrometer Lambda EZ 210) pri valnoj duljini od 600 nm.

3.2.2. Rast sojeva *B. japonicum* na različitim koncentracijama NaCl

U standardnoj YMA (Yeast Mannitol Agar) podlozi, koncentracija NaCl iznosi 0,01 % i smatra se optimalnom za rast rizobija. Za ispitivanje rasta sojeva *B. japonicum* pri povišenom solnom stresu upotrebljene su YMA podloge uz dodatak povišenih koncentracija NaCl koje iznose: 1 % NaCl, 2 % NaCl, 3% NaCl , 4 % NaCl.

Za pripremu 1000 ml YMA podloge uz dodatak navedenih koncentracija NaCl upotrebljeni su reagensi navedeni u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav manitne podloge s kvasnim ekstraktom (YMA) uz dodatak 1 % - 4 % koncentracije NaCl

K_2HPO_4	0,5 g
NaCl	0,1 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2 g
Manitol	10,0 g
Agar	15,0 g
Kvasni ekstrakt	0,4 g
Bromtimol (indikator)	5 ml
Destilirana voda	1000 ml
1 % NaCl	2,5 g
2 % NaCl	5,0 g
3 % NaCl	7,5 g
4 % NaCl	10 g

Vrijednost pH YMA podloga je podešena na 6,8 pomoću 1 M NaOH. Podloge su sterilizirane u autoklavu na 15 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije, podloga je razdijeljena u Petrijeve posude i ohlađena.

Sojevi su precijepljeni na ohlađene YMA podloge i inkubirani su pri 28 °C, sedam dana u termostatu. Nakon sedam dana, rezultati su vizualno očitani. Rezultati su prikazani određivanjem pozitivnog rasta (vidljive kolonije) ili negativnog rasta (bez kolonija) na YMA podlogama s različitim postocima NaCl.

3.3. Genotipska karakterizacija sojeva *B. japonicum*

3.3.1. Izolacija DNA iz čistih kultura

Za izolaciju DNA iz čistih kultura koristio se komercijalni set DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Njemačka). Nakon što je uzgojena čista kultura svih sojeva, izolacija je provedena prema sljedećem protokolu:

1. prekonoćna kultura uzgojena u YMB hranjivim otopinama se vorteksira (maksimalno 2 x 109 stanica) i doda pipetom u tubice za mikrocentrifugu, tubice se centrifugiraju 10 minuta pri 5000 x g (7500 o/min). Supernatan te uklanja.
2. dobiveni pelet se resuspendira sa 180 µl ATL pufera.
3. dodaje se 20 µl proteinaze K, vorteksira i inkubira u vodenoj kupelji (Memmert, Njemačka) na 56 °C, najmanje 1-3 sata do potpune lize stanica. Tijekom inkubacije tubice se povremeno vorteksiraju.
4. nakon inkubacije, uzorci u tubicama se vorteksiraju 15 sekundi i dodaje se 200 µl AL pufera te se temeljito vorteksira. Zatim se dodaje 200 µl etanola (96%-100%) i ponovno se vorteksira.
5. otopina, uključujući talog se pipetira u Dneasy Mini spin kolonu koja se stavi na sakupljajuću tubicu od 2 ml. Otopina se centrifugira jednu minutu pri ≥6000 x g (8000 o/min). Sakupljajuća tubica s filtratom se baca.
6. u novu tubicu od 2 ml stavi se DNeasy Mini spin kolona, doda se 500 AW1 µl pufera i centrifugira pri ≥6000 x g (8000 o/min), jednu minutu. Sakupljajuća tubica i njen sadržaj se baca.
7. DNeasy Mini spin kolona se stavlja u novu sakupljajuću epruvetu od 2 ml te se dodaje 500 µl AW2 pufera. Centrifugira se tri minute pri 20000 x g (14000 o/min) radi sušenja. Filtrat se ponovno baca sa sakupljajućom epruvetom
8. DNeasy Mini spin kolona stavlja se u novu epruvetu od 2 ml i pipetira se 200 µl AE pufera, direktno na membranu DNeasy kolone. Inkubira se 2 minute na sobnoj temperaturi i zatim se centrifugira jednu minutu pri ≥6000 x g (8000 o/min).

3.3.2. Određivanje koncentracije izolirane DNA spektrofotometrijskom metodom

Za određivanje koncentracije izolirane DNA spektrofotometrijski, u kvarcnu kivetu je dodano 10 µl uzorka DNA i 490 µl destilirane vode. Spektrofotometrijska analiza je vršena pri valnoj duljini od 260 nm koja odgovara maksimumu apsorbancije molekule DNA. Apsorbancije uzoraka su izmjerene, a koncentracija DNA je izračunata prema formuli:

c(DNA [g/ml]) = A(260 nm) x 50 µg/ml x faktor razrjeđenja,

A(260 nm) - dobivena apsorpcija

50 µg/ml – c(dsDNA)

Faktor razrjeđenja – 50.

3.3.3. ERIC-PCR

Za identifikaciju sojeva *B. japonicum* korištena je ERIC – PCR metoda. ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) PCR služi za identifikaciju bakterija na razini soja. ERIC sekvence su u rizobijskom genomu vrlo konzervirane, a opisuju se kao intergenetičke ponavljajuće jedinice jer se razlikuju od ostalih ponavljajućih jedinica u genomu bakterija po svojoj rasprostranjenosti u velikom broju vrsta. Služe za klasifikaciju različitih sojeva rizobija u cjelokupnoj populaciji (Ogutcu H. i sur., 2009.).

Za pripremu PCR-a, volumen reakcijske smjese iznosio je 20 µl, a sadržavala je 2,5 µl pufera 10x uz dodatak $MgCl_2$, 2 µl dNTP (2 mM), 0,25 µl specifične oligonukleotidne početnice ERIC 1, 0,25 µl specifične oligonukleotidne početnice ERIC 2, 0,3 µl Taq polimeraze (Invitrogen, SAD), 14,7 µl H_20 te je dodano 5 µl originalne izolirane DNA. Korištene sekvence početnica prikazane su u Tablici 4. Umnožavanje fragmenata DNA sojeva *B. japonicum* izvršeno je u termobloku PCR System ProFlex (Applied Biosystems by Life Technologies, USA) na temperaturnim profilima prikazanim u Tablici 5.

Tablica 4. Nukleotidne sekvence početnica ERIC 1 i ERIC 2 (prema de Brujin, 1992)

Početnica	Nukleotidna sekvenca (smjer 5' → 3')
ERIC 1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

Tablica 5. Temperaturni profili ERIC-PCR reakcije

Faza	Temperatura °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija DNA	95	5 min	1
Denaturacija DNA	94	30 sek	35
Sparivanje početnica s kalupom	50 52	30 sek 1 min	
Sinteza komplementarnih lanaca	72	1 min	
Završno produljenje lanaca	72	7 min	1

3.3.4. Analiza ERIC-PCR profila

Elektroforeza je metoda gdje umnoženi fragmenti DNA molekule pod utjecajem istosmjernog električnog polja putuju različitom brzinom u agaroznom gelu, ovisno o svojoj veličini. DNA molekula je negativno nabijena zbog sadržaja fosfatnih skupina te u električnom polju putuje prema pozitivnoj elektrodi i pritom se razdvajaju po veličini. Ovom se metodom omogućuje identifikacija, razdvajanje, određivanje količine i pročišćavanje molekula DNA.

Produkti ERIC-PCR amplifikacije razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom na 6 % poly (NAT) gelovima (Elchrom Scientific, AG, Switzerland). Elektroforeza je trajala 2 sata i 10 minuta pri 8 V/cm pri 20 °C. Korišteni molekularni marker bio je 1 kb DNA ladder (Fermentas, Kanada) pomoću kojeg se određivala veličina amplificiranih produkata. Završetkom elektroforeze gelovi su obojani etidij bromidom (Sigma Chemical Co. Ltd), koncentracije 0,5 µl/ml za vizualizaciju na UV-transiluminatoru (ElChrom Scientific AG, Švicarska). Dobivena slika je obrađena u računalnom programu BioNumerics Seven, Applied Maths (Gent, Belgija).

4. Rezultati

4.1. Fenotipska karakterizacija sojeva

Autohtoni sojevi *Bradyrhizobium japonicum* podvrgnuti su rastu na medijima koji su u sebi sadržavali povišene koncentracije natrijevog klorida i polietilen glikola (PEG 6000) radi karakterizacije njihovog rasta u nepovoljnoj okolini *in vitro*.

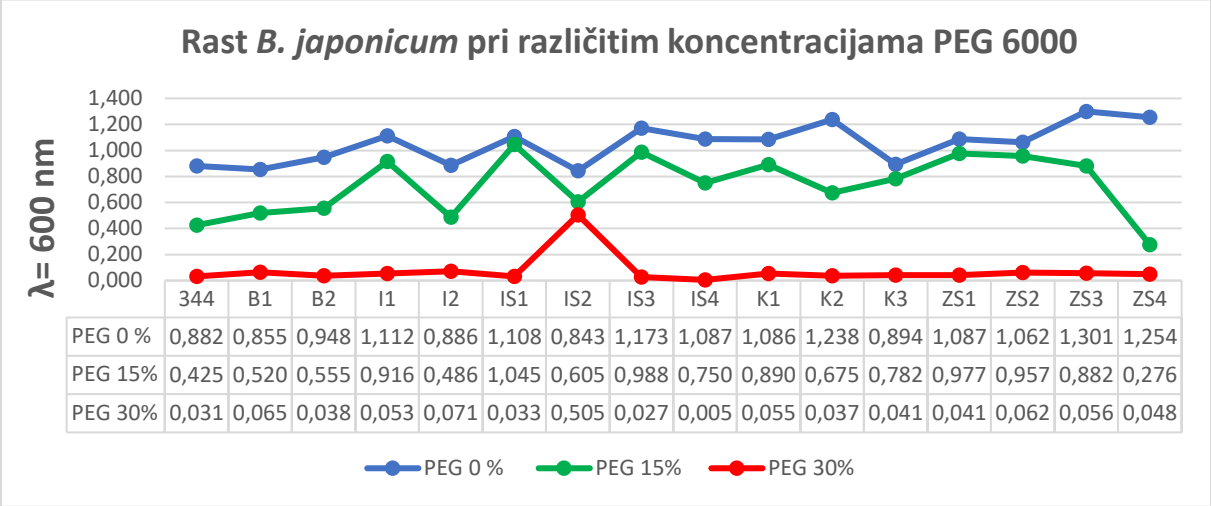
4.2.1. Rast sojeva *B. japonicum* pri različitim koncentracijama PEG 6000

Za induciranje osmotskog stresa korištena je otopina poletilen glikola 6000 (PEG 6000) dodanog u hranjivu otopinu YMB od 15 % i 30 %. Što je veći postotak PEG 6000, smatra se da će biti veći osmotski stres, odnosno induciranija suša u YMB hranjivoj otopini. PEG 6000 veže vodu za sebe, a dovoljno je velika molekula da neće ući u stanicu bakterija. Rast se određivao mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm (Grafikon 1). U Tablici 6. prikazana je srednja vrijednost između tri uzastopna ponavljanja za navedene valne duljine.

Turbitet rasta bakterija u kontrolnim uvjetima (0 % PEG 6000) se kretao između najviše izmjerene apsorpcijske vrijednosti od 1,301 i najniže izmjerene vrijednosti od 0,843. Prosjek rasta bakterija pri 0 % PEG iznosila je 1,051. Najveći rast u kontrolnim uvjetima imao je autohtoni soj ZS3, dok je najmanju izmjerenu vrijednost imao autohtoni soj IS2. Povećanjem koncentracije PEG 6000 na 15 %, smanjen je rast bakterija. Od šesnaest sojeva, čak ih je sedam imalo vrlo dobar rast pri povećanom osmotskom stresu. Najbolji rast je pokazivao autohtoni soj IS1 s apsorpcijskom vrijednošću od 1,045, a zatim ga slijede autohotni sojevi IS3 (0,988), ZS1 (0,977), ZS2 (0,957), I1 (0,916), K1 (0,890), ZS3 (0,882). Pri navedenoj koncentraciji PEG 6000 najmanja apsorpcijska vrijednost od 0,276 je očitana kod autohtonog soja ZS4, a zatim slijedi referentni soj 344 s vrijednošću od 0,425. Drastično smanjenje rasta bakterija je uočeno pri očitanju apsorpcijske vrijednosti kod koncentracija PEG 6000 od 30 %. Samo je jedan soj IS2 imao dobar rast pri ovoj koncentraciji gdje je apsorpcija iznosila 0,505. Svi ostali sojevi su imali apsorpcijske vrijednosti očitane na vrijednostima manjima od 0,100 i kretale su se između 0,071 i 0,027. Najmanja očitana vrijednost je iznosila 0,005 kod autohtonog soja IS4.

Tablica 6. Rast autohtonih sojeva *B. japonicum* pri 0%, 15% i 30% PEG 6000 (λ=600 nm)

SOJ	PEG 0% (kontrola)	PEG 15%	PEG 30%
344	0,882	0,425	0,031
B1	0,855	0,520	0,065
B2	0,948	0,555	0,038
I1	1,112	0,916	0,053
I2	0,886	0,486	0,071
IS1	1,108	1,045	0,033
IS2	0,843	0,605	0,505
IS3	1,173	0,988	0,027
IS4	1,087	0,750	0,005
K1	1,086	0,890	0,055
K2	1,238	0,675	0,037
K3	0,894	0,782	0,041
ZS1	1,087	0,977	0,041
ZS2	1,062	0,957	0,062
ZS3	1,301	0,882	0,056
ZS4	1,254	0,276	0,048



Grafikon 1. Usporedni prikaz rasta *B. japonicum* na različitim koncentracijama PEG 6000

4.2.2. Rast sojeva *B. japonicum* na različitim koncentracijama NaCl

Optimalna koncentracija NaCl u YMA hranjivoj podlozi za uzgoj rizobija iznosi 0,01 %. U ovom radu korištene su koncentracije koje su bile sto, dvjesto, tristo i četiristo puta više od koncentracije za optimalan rast rizobija.

Prema rezultatima istraživanja (Tablica 7.) vidljivo je da svi analizirani autohtoni sojevi *B. japonicum* te referentni soj 344 imaju sposobnost rasta na koncentracijama NaCl od 1 %, iako su neki sojevi bolje rasli. Šest sojeva (344, I1, I2, IS2, IS4 i K2) su imali vrlo dobar rast, dok je umjeren rast bio vidljiv kod tri soja (B2, IS3, K1), a ostali su sojevi pokazivali slabiji rast pri navedenoj koncentraciji. Već povećanjem koncentracije NaCl na 2 % dva soja ZS1 i ZS2 nisu rasli pri ovim uvjetima, dok su umjeren rast pokazivali samo referentni soj 344 i autohtoni soj K2. Ostali analizirani sojevi su pokazivali slab rast kolonija. Pri koncentraciji NaCl od 3 %, osam ispitivanih sojeva je imalo slab rast kolonija (B1, B2, I1, I2, IS1, IS2, IS3 i K1), dok ostalih osam sojeva nije raslo pri ovoj koncentraciji NaCl. Na najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 4 % NaCl, samo su četiri autohtona soja (B1, I1, IS1, IS3) imala vidljive kolonije na YMA hranjivoj podlozi, a njihov rast je bio očitan kao slab. Ostali sojevi nisu imali vidljiv rast kolonija na hranjivoj podlozi.

Tablica 7. Rasta autohtonih sojeva na povišenim postocima NaCl u hranjivoj podlozi

Soj	1 % NaCl	2 % NaCl	3 % NaCl	4 % NaCl
344	++	+	-	-
B1	±	±	±	±
B2	+	±	±	-
I1	++	±	±	±
I2	++	±	±	-
IS1	±	±	±	±
IS2	++	±	±	-
IS3	+	±	±	±
IS4	++	±	-	-
K1	+	±	±	-
K2	++	+	-	-
K3	±	±	-	-
ZS1	±	-	-	-
ZS2	±	-	-	-
ZS3	±	±	-	-
ZS4	±	±	-	-

Vizualno određivanje rasta kolonija je podijeljeno u četiri kategorije:

++ (vrlo dobar rast),

+ (umjeren rast),

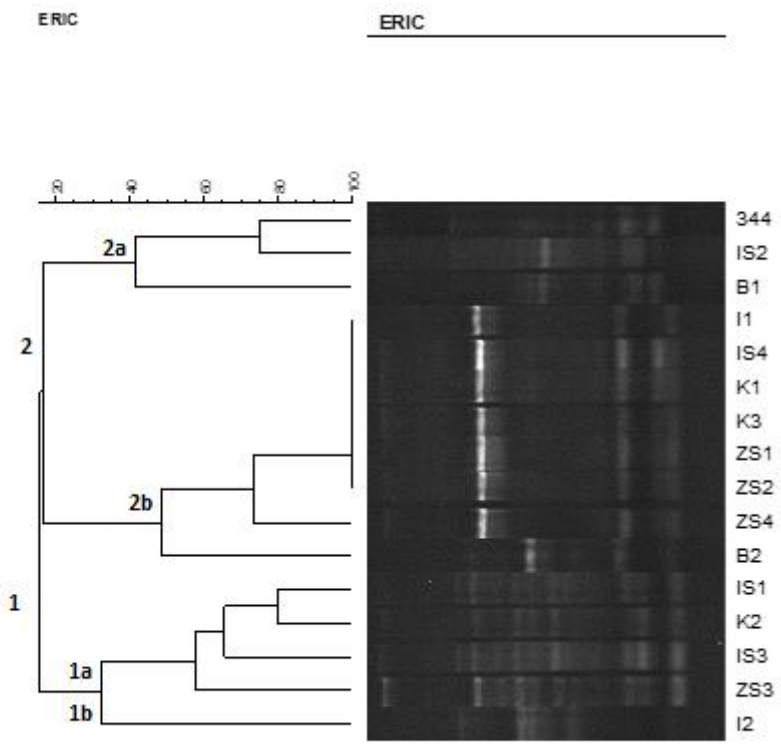
± (slabiji rast),

- (nema rasta).

4.2. Genotipska karakterizacija sojeva

4.2.1 ERIC-PCR analiza

ERIC-PCR je molekularna metoda koja je korištena za identifikaciju i procjenu genetičke raznolikosti autohtonih sojeva *B. japonicum* i referentnog soja 344. Ukupna izolirana genomska DNA sojeva amplificirana je pomoću početnica ERIC 1 i ERIC 2. Dobiveni su umnoženi fragmenti koji su se razlikovali po broju i veličini. Upotrebom navedenih početnica došlo je do selektivne amplifikacije različitih genomskih regija koje su smještene između ERIC sekvenci koje omogućavaju diferencijaciju rizobija na razini soja.



Slika 2. Dendrogram reprezentativnih uzoraka sojeva *B. japonicum* i 344 referentnog soja *B. japonicum* dobiven na osnovi ERIC- profila

Prema dendrogramu na Slici 2. vidljivo je da su sojevi podijeljeni u dvije glavne grupe (1 i 2). Između njih je relativna sličnost iznosila 20 %. Druga glavna grupa (grupa 2) koja sadrži većinu sojeva podijeljena je u dvije podgrupe (2a i 2b). U podgrupi 2a nalazi se referentni soj 344 s kojim autohtoni soj IS2 pokazuje najveću sličnost od 75 %. Treći soj u ovoj podgrupi je soj B1 sa relativnom sličnosti od 41 % u odnosu na ostale sojeve podgrupe 2a. Podgrupa 2b sadrži najveći broj izoliranih sojeva. Između autohtonih sojeva I1, IS4, K1, K3, ZS1 i ZS2 utvrđena je najveća relativna sličnost (99 %) od svih

analiziranih sojeva. Najmanju relativnu sličnost s ostatkom podgrupe ima soj B2 od 50 %. U grupi 1 nalaze se dvije podgrupe 1a i 1b. U 1a podgrupi sadržani su sojevi IS1 i K2 koji imaju međusobno relativnu sličnost od 80 %. Autohtoni soj IS3 u odnosu na IS1 i K2 ima relativnu sličnost od 65 %, dok soj ZS3 u odnosu na navedenu podgrupu 1a ima relativnu sličnost od 57 %. Jedini soj koji se nalazi u podgrupi 1b je soj I2 s relativnom sličnosti od 30 %.

5. Rasprava

Poljoprivreda je najviše pogođena klimatskim promjenama što direktno utječe na proizvodnju hrane. Istraživanja otpornosti simbioznih fiksatora dušika na abiotske čimbenike okoliša uvelike savladavaju prepreke pri uzgoju soje. Vrlo je bitna selekcija i identifikacija, ne samo simbioznih fiksatora dušika nego i PGPR bakterija radi smanjenja upotrebe pesticida i mineralnih gnojiva te radi umanjivanja utjecaja negativnih okolišnih čimbenika koji neposredno utječu na prinos uzgajane biljke.

Zbog sve većih ekstremnih klimatskih uvjeta s kojima se poljoprivrednici susreću zadnjih godina, bitna je selekcija sojeva koji mogu podnijeti različite nepovoljne uvjeta okoliša radi poboljšanja prinosa usjeva. Znanje o prilagodbi različitih sojeva B. japonicum izoliranih u Republici Hrvatskoj bitno je za dobivanje visokoselekcioniranih sojeva rizobija te proizvodnju kvalitetnijih inokulanata koji bi mogli smanjiti utjecaj negativnih abiotskih čimbenika kao nedostatak vode ili zaslanjenost tla pri uzgoju određenih kultivara mahunarki

U ovom radu su sojevi bili podvrgnuti osmotskom stresu i povećanom sadržaju NaCl-a *in vitro* radi određivanja njihove otpornosti na te bitne okolišne čimbenike koji otežavaju poljoprivredu proizvodnju. Optimalna količina soli za rast rizobija je 0,01 % NaCl koji se dodaje u hranjivu podlogu. Uvjet za prilagodbu na povećan salinitet od optimalnog, zahtijeva da bakterija ima sposobnost tolerancije, odgovora i prilagodbe na dane uvjete okoliša (Mangla, 2013).

Prema rezultatima ovog rada svi su sojevi imali vidljive kolonije na hranjivim podlogama pri 1 % NaCl. Rast im je okarakteriziran u rasponu od vrlo dobrog do slabog rasta. Pri postotku natrijevog klorida od 2 %, dva autohtona soja izoliranih iz zapadne Slavonije (ZS1 i ZS2) nisu rasla. Kod većine sojeva je zabilježen slab rast, osim kod referentnog soja 344 i autohtonog soja Koprivnice (K2) koji su imali umjeren rast. Povećanjem sadržaja soli na 3 %, u hranjivoj podlozi, kolonijama koje su bile vidljive na hranjivoj podlozi, rast je zabilježen kao slab. Pri 4 % NaCl samo su kolonije autohtonih sojeva B1, I1, IS1, IS3 bile vidljive na hranjivoj podlozi, a rast im je okarakteriziran kao slab.

Prema rezultatima Mandala (2014.) od 27 ispitivanih sojeva Rhizobium trifolli utvrđen je rast svih sojeva pri koncentraciji od 0,25 % NaCl. Povišenjem sadržaja soli u hranjivoj podlozi na 0,5 % NaCl pet sojeva je bilo osjetljivo, odnosno nije utvrđen njihov rast. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji NaCl od 3 %, bile su vidljive kolonije pet sojeva te se oni smatraju tolerantnima na povišen sadržaj saliniteta. U istraživanju Dong i sur (2017.) četiri

izolirana soja B. japnicuim s korijena biljke Stylosanthes spp. nacjepljeni su na hranjive podloge uz dodatak 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M i 0,5 M NaCl. Samo je kod jednog soja bio zabilježen rast na podlozi s 0,5 M NaCl (oko 3 % NaCl). Ostali sojevi nisu rasli na koncentraciji višoj od 0,2 M NaCl. Sadowsky i Graham (2013.) utvrdili su da vrste Bradyrhizobium ne rastu na koncentracijama većim od 2 %. Također, smatra se da spororastuće vrste rizobija slabije toleriraju povećanu koncentraciju soli u tlu od brzorastućih (Zahran, 1999; Elsheikh, 1998). U skladu s navedenim istraživanjima vidljivo je da vrlo mali broj rizobija može rasti na visokim postocima soli koje mogu biti tristo do četiristo puta viši od optimalnih uvjeta. Dobiveni rezultati u ovom radu ukazuju da četiri autohtona soja izolirani s područja Baranje, Istre, i istočne Slavonije mogu rasti na veoma povećanom sadržaju soli, odnosno otporni su na izrazito nepovoljne koncentracije NaCl-a za vrste Bradyrhizobium.

Za određivanje otpornosti analiziranih sojeva na nedostatak vlage, korištena je otopina PEG 6000 od 15 % i 30 % u hranjivoj podlozi, što je rezultiralo smanjenem rasta bakterija. Kod svih šesnaest ispitivana soja utvrđen je pad rasta pri 15 %, dok pri 30 % PEG 6000 uočen je izrazito smanjen rast bakterija. Pri 15 % PEG 6000 sedam sojeva izoliranih iz područja Istre (I1), Koprivnice (K1), istočne Slavonije (IS1 i IS3) i zapadne Slavonije (ZS1, ZS2, ZS3) je pokazivalo jako dobar rast, gdje je najbolji rast utvrđen kod autohtonog soja IS1 (1,045). Najmanji rast pri 15 % PEG 6000 vidljiv je bio kod soja izoliranog iz zapadne Slavonije ZS4 (0,276). Na vrlo visokom postotku PEG 6000 od 30 %, samo je jedan autohtoni soj istočne Slavonije (IS2) pokazivao dobar rast (0,505) u odnosu na ostale ispitivane sojeve. Najlošiji rast je uočen kod soja IS4 (0,005).

Prema autorima Marinković i sur. (2013.) sojevi B. japonicum u hranjivom mediju uz dodatak 9 % PEG 6000 pokazuju smanjen rast u odnosu na rast u mediju bez dodatka PEG 6000. Soj B. japonicum 511 ima najmanju toleranciju na osmotski stres, gdje je rast između kontrole i 9 % PEG 6000 smanjen na 43,3 %. Soj B. japonicum D216 je tolerantan na osmotski stres, zato što je rast između kontrole i 9 % PEG 6000 bio smanjen za samo 3,3 %. U drugom istraživanju Mangla (2013.) od 91 soja rizobija, samo su četiri soja imali uočen rast pri izrazito visokom sadržaju PEG 6000 od 30 %. Dobivene apsorpcijske vrijednosti su se kretale između 0,606 i 0,485. Uspoređujući dobivene rezultate u ovom radu autohtoni soj IS2 je pokazivao približne očitane vrijednosti.

Dobivenim rezultatima utvrđeno je da tri soja zapadne Slavonije i dva soja istočne Slavonije imaju vrlo dobru prilagodbu na *in vitro* nedostatak vlage. Također, pri najvećem

postotku PEG 6000 kod autohtonog soja izoliranog iz istočne Slavonije (IS2) uočena je najbolja otpornost na osmotski stres.

Sojevi *B. japonicum* značajno se genetski razlikuju. Prilikom sekvencioniranja dva soja *B. japonicum* USDA6^{T} i *B. japonicum* USDA110 Kaneko i sur. (2011.) utvrdili su da iako sadrži slične regije genoma, također postoje i velike razlike u njihovim genomima. Kako imaju genetski različitu strukturu iako mogu doći s istog lokaliteta, tako imaju različitu otpornost na okolišne stresove. To potvrđuju Jida i Assefa (2012.) te Jebara i sur. (2001.) da se tolerancija bakterija na nepovoljne vanjske uvjete mogu razlikovati među sojevima. (Farissi i sur., 2014). Na osnovi dendrograma može se jasno vidjeti da nevezano za uzgojno područje Republike Hrvaske, većina izoliranih autohtonih sojeva su vrlo genetski različiti. Prema rezultatima istraživanja, referentni soj 344 je najsličniji soju IS2 koji tolerantan na visoke koncentracije NaCl-a (3%) i otporan na *in vitro* nedostatak vlage. Autohtoni sojevi (I1, IS4, K1, K3, ZS1, ZS2) izolirani iz različitih područja Republike Hrvatske pokazivali su vrlo visoku relativnu sličnost. Svi navedeni sojevi su imali različite prilagodbe na povišene koncentracije soli i na nedostatak vlage. Na primjer, dva autohtona soja zapadne Slavonije (ZS1, ZS2) su bili tolerantni na 15 % PEG 6000, no nisu bili otporni na koncentracije soli više od 2 % NaCl. Soj izoliran iz istočne Slavonije (IS4) pokazivao najmanju otpornost na povišen nedostatak vlage. Stoga se može reći da među analiziranim sojevima je utvrđena genetska raznolikost s obzirom na područje iz kojeg su izolirani. Također, njihova otpornost na nedostatak vode i povišeni salinitet je vrlo različita iako su relativno genetski slični. Najbolja otpornost na povišeni salinitet je ustanovljena kod autohtonih sojevi izoliranih iz Baranje, Istre i istočne Slavonije, dok je tolerantnost na nedostatak vode utvrđeno kod autohtonih sojeva istočne i zapadne Slavonije.

6. Zaključci

Na temelju rezultata istraživanja 15 autohtonih sojeva *B. japonicum* izoliranih iz različitih regija Republike Hrvatske može se zaključiti sljedeće:

1. Utvrđeno je da svih 15 izolata i referentni soj 344 mogu rasti pri povišenom sadržaju soli. Povećanjem saliniteta smanjivao se rast bakterija na hranjivim podlogama. Prema rezultatima jedan autohtoni soj izoliran iz Baranje te iz Istre i dva iz istočne Slavonije otporni su na vrlo visok sadržaj soli.
2. Pri nedostatke vlage *in vitro*, utvrđeno je da izolirani sojevi različitih područja imaju različitu prilagodbu na povišen osmotski stres. Bar jedan soj iz svih regija je pokazivao otpornost na povišen nedostatak vode, jedino sojevi izolirani iz Baranje su imali nižu toleranciju na sušu.
3. Primjenom ERIC-PCR metode utvrđena je genetska raznolikost među samim sojevima *B. japonicum* izoliranih s istih područja RH. Također, sama otpornost na nepovoljne uvjete nije povezana s genetskom sličnosti.
4. Ovim preliminarnim istraživanjem obuhvaćen je mali broj izolata no dobiveni rezultati mogu sugerirati kako postoji razlika među sojevima koji su sposobni rasti u nepovoljnim okolišnim uvjetima *in vitro*. U daljnjim istraživanjima bilo bi korisno uključiti veći broj izolata iz navedenih područja Republike Hrvatske s ciljem karakterizacije njihovih fenotipskih i genotipskih obilježja kako bi se mogli selekcionirati potencijalni autohtoni sojevi za primjenu prilikom nepovoljnih uvjeta u tlu.

7. Literatura

1. American Meteorological Society (2004). Statement on meteorological drought. Bull. Am. Meteorol. Soc 85: 771-773.
2. Barthelemey-Delaux C., Marburger D., Delaux P., Conley S. Ane J. (2014). Effect of drought on *Bradyrhizobium japonicum* populations in Midwest soils. Plant and Soil 382 (1-2): 165-173.
3. Blažinkov M., Redžepović S, Stipetić A, Thot N., Sikora S. (2012). Characterization of indigenous rhizobial strains isolated from faba bean (*Vicia faba* L.) nodules. Inovations for sustainable us of nitrogen resources: 291-293
4. Boncompagni E., Osteras M., Poggi M., Le Rudulier D. (1999). Occurrence of Choline and Glycine Betaine Uptake and Metabolism in the Family Rhizobiaceae and Their Roles in Osmoprotection. Environmental Microbiology, 2072-2077.
5. Bougouffa S., Radovanovic A., Essacj M., Bajic V. B. (2014). DEOP: a database on osmoprotectants and associated pathways. The Journal of Biological Databases and Curation (2014): 1-13 [online] <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bau100/263528> Pristupljeno: 23. svibnja 2018.
6. Bremer E. i Krämer R. (2000). Coping with Osmotic Challenges: Osmoregulation through Accumulation and Release of Compatible Solutes in Bacteria. U: Bacterial Stress Response (Storz G. i Hengge-Aronis R., Ur.), Asm Press: 79-97.
7. Brockwell J., Bottomley P. J., Thies J. E. (1995). Manipulation od rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant Soil 174: 143-180.
8. Bushby H. V. A. i Marshall K. C. (1977). Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. Soil Biology and Biochemistry 9(3): 143-147.
9. Crawford N. M., Kahn M., Leustek T., Long S. R. (2000). Nitrogen and sulfur. U: Biochemistry and molecular biology of plants (Buchanan B.B, Gruissern W., Jones R., Ur.). American Society of Plant Physiologist, Rockville, 786-849.
10. Cytryn E. J., Jitacksorn S., Giraud E., Sadowsky M. J. (2008). Insights learned from pBTAil, a 229-kb accessory plasmid from *Bradyrhizobium* sp. strain BTAil and prevalence of acessory plasmids in other *Bradyhrizobium* sp. Strains. Int. Soc. Microb. Ecol. J. 2: 158-170.

11. Da Costa M. S., Santos H., Galinski E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol 61: 117-153.
12. De Bruijn F. J. (1992). Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenetic Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 58 (7): 2180-2187.
13. De Lima, Oresnik I. J., Milanthi Fernardo S., Layzell D. B.,(1994). The relationship between nodule adenylates and the regulation of nitrogenase activity by oxygen in soybean. Physiol. Plant 91: 687-695.
14. Delgado M. J., Ligero F., Lluch C. (1994). Effect of salt stress on growth and nitrogen fixatopn by pea, faba bean, common bean and soybean plant. Soil Biol. Biochem. 26: 371-376.
15. Dolatabadian A., Modarres Sanavy S. A., Ghanati F., Gresshoff P.M. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* transformed soybean roots differ in their nodulation and nitrogen fixation response to genistein and salt stress. World J. Microbiol. Biotechnol. 29: 1327-1339.
16. 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 Science 18: 1-17.
17. Dupont L., Alloing G., Pierre O., El Msehli S., Hopkins J., Hérouart D., Frendo P. (2012). The legume root nodule: From symbiotic nitrogen fixation to senescence. U: Scenescence (Tetsuji N., Ur.) InTech: 137-168 [online] <https://www.researchgate.net/publication/221926268_The_Legume_Root_Nodule_From_Symbiotic_Nitrogen_Fixation_to_Senescence> Pristupljeno: 24. svibnja 2018.
18. Elsheikh E. A. E. (1998). Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. Ann. Appl. Biol. 132: 507-524.
19. Egamberdieva D., Reckling M., Wirth S. (2017). Biochar-based *Bradyrhizobium* inoculum improves growth of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) under drought stress. European Journal of Soil Biology 78: 38-42 [online] <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi> Pristupljeno 04. siječnja 2018.

20. Farissi M., Bouizgaren A., Faissal A., Ghoulam C. (2014). Isolation and screening of rhizobial strains nodulating alfaalfa for their tolerance to some environmental stresses. Pacesetter Journal of Agricultural Science Research 2(2): 9-19.
21. Ferguson B. J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M. H., Lin Y. H., Reid D. E., Gresshoff P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. J. Integr. Plant. Biol. 52: 61-76.
22. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). The State of Food and Agriculture. [online] Rim, Italija < http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf > Prisupljeno 18. travnja 2018.
23. Fox M. A. (2005). Adaptation of *Rhizobium* to Environmental Stress. Doktorski rad, University of Reading, School of Animal and Microbial Sicences, Ujedinjeno Kraljevstvo
24. Gagro M. (1997). Zrnate mahunarke: Soja. U: Ratarstvo obiteljskog gospodarstva: žitarice i zrnate mahunarke. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb 207–222.
25. Georgiev G. I. i Atkias C. A. (1993). Effects of salinity on N2 fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. Symbiosis 15: 239-255.
26. Gouffi K., Pica N., Pichereau V., Blanco C. (1999). Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for Sinorhizobium meliloti. Applied Environmental Microbiology 65(4): 1491-1500.
27. Hrvatska enciklopedija (2017). Difuzija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža [online] http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=15048 Pristupljeno 18. prosinca 2017.
28. Ikeda J. I., Kobajashi M., Takahashi E. (1992). Salt stress increases the respiratory cost of nitrogen fixation. Soil Sci. Plant. Nutr. 38: 51-56.
29. Jebara M., Drevon J. J., Aouani M. E. (2001). Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native rhizobia from Tunisian soils. Agronomy 21: 601-605.
30. Jida M. i Assefa F. (2012). Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of *Mesorhizobium* species isolated from chickpea (*Cicer arientinum* L.) growing areas of Ethiopia. Afr. J. Biotechnol. 11: 7483-7493.
31. Kajić S., Hulak N., Sikora S. (2016). Environmental Stress Response and Adaptation Mechanisms in Rhizobia. Agriculturae Conspectus Scientificus 81(1): 15-1.

32. 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 [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927601> Pristupljeno 30. svibnja 2018.
33. Karmakar K., Rana A:, Rajawar A., Sahgal M., Johri B. N. (2015). Legume-rhizobia symbiosis under stress. U: Plant microbes symbiosis: Applied Facets (Arora N.K., Ur.). Springer, India 241-258.
34. Kuykendall L.D. (2015). Bradyrhizobium. U: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria First Edition (Whitman W. B. i sur., Ur.). John Wiley & Sons, Inc.
35. Laranjo M., Alexandre A, Oliveira S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on theMesorhizobium genus. Microbiological Research 169: 2-17.
36. L'taief B., Sifi B., Zaman-Allah M., Drevon J. J., Lachaâl M. (2007). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arientinum-Mesorhisobium ciceri* symbiosis. Journal of plant physiology 164: 1028-1036.
37. Mandal H. K. (2014). Isolation of Salt Tolerant Strains of *Rhizobium trifolii*. International Journal of Agriculture and Food Science Tehnology 5(4): 325-332
38. Mangla (2013). Isolation, characterization and symbiotic preformance of abiotic stress tolerant mungbean (*Vigna radiata)* rhizobia. Doktorski rad. CCS Haryana Agricultural University, Hisar, Haryana, Indija.
39. Marinković J., Đorđević V., Balešević-Tubić S., Bjelić D., Vucelić-Radović B., Jošić D. (2013). Osmotic stress tolerance, PGP traits and RAPD analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains. Genetika 45(1): 75-86.
40. Marcondes De Souza J. A., Carareto Alves L. M., de Mello Varani A., de Macedo Lemos E. G. (2014). The Family *Bradyrhizobiaceae*. U: The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (Rosenberg E. I sur., Ur.). Springer Verlag, Berlin 135-154.
41. Meghvansi M. K., Kamal Prasad, Mahna S. K. (2010). Symbiotic potential, competitiveness and compatibility of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* isolates to three soybean genotypes of two distinct agro-climatic regions of Rajasthan, India. Saudi Journal of Biological Sciences 17, 303-310. [online]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X10000720>
Pristupljeno 31. svibnja 2018.

42. Mhadhbi H., Chihaoui S., Mhamdi R., Jebara M., Mhamdi R. (2011). A highly osmotolerant rhizobial strain confers a better tolerance of nitrogen fixation and enhances protective activities to nodules of *Phaseolus vulgaris* under drought stress. African Journal of Biotechnology 10(20): 4555 – 4563.
43. Miller K. J. i Wood J. M. (1996). Osmoadaptation by Rhizosphere Bacterica. Annual Reviews of Microbiology 50: 101-136.
44. Muñoz N., Soria-Diaz M. E., Manyani H., Sanchez-Matamoros R. C., Serrano A. G., Megias M., Lascano R. (2014). Structure and biological activities of lipochitooligosaccharide nodulation signals produced by Bradyrhizobium japonicum USDA 138 under saline and osmotic stress. Biol. Fertil. Soils 50: 207-215.
45. Ngumbi E. i Kloepper J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. Applied Soil Ecology 105: 109-125.
46. Ogutcu H., Adiguzel A., Gulluce M., Karadayi M., Sahin F. (2009). Molecular Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from Wild Chickpeas Collection from High Altitudes in Erzurum-Turkey. Romanian Biotechnological Letter, 14(2): 4294-4300.
47. Okubo T., Tsukui T., Maita H., Okamoto S., Oshima K., Fujisawa T.(2012). Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. S23321: insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. Microb. Environ. 27: 306-315.
48. Orf J. (2010). Introduction. U: Genetics, Genomics and Breeding of Soybean (Bilyeu K., Ratnaparkhe M. B., Kole C., Ur.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire 1-18.
49. Pavlović I. (2017). Uloga auksina i hormona stresa u odgovoru kupusnjača (*Brassicaceae*) na povišeni salinitet. Doktorska disertacija, Osijek
50. Poolman B., Blount, P., Folgering, J. H. A., Friesen. R. H. E., Moe, P. C. & van der Heide, T. (2002). How do Membrane Proteins Sense Water Stress? Molecular Microbiology 44: 899-902
51. Räsänen L. A., Saijets S., Jokinen K., Lindström K. (2004). Evaluation of the roles of two compatible solutes, glycine betaine and trehalose, for the *Acacia senegal-Sinorhizobium* symbiosis exposed to drought stress. Plant and Soil 260: 237-251.

52. Rowell D. L. (1988). The management of irrigated saline and sodic soils. U: Russell's Soil Conditions and Plant Growth, 11th Edition (Wild A., Ur.). Longman Scientific, Technical Publications and John Wiley & Sons, 844-890
53. Sadowsky M. J., Graham P. H (2013). Root and Stem Nodule Bacteria of Legumes. U: Prokaryotes - Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations (Rosenberg E. i sur., Ur). Springer Verlag, Berlin 401-425.
54. Sikora S., Redžepović S. (2000). Identifikacija autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* izoliranih iz različitih tipova tala zapadne Slavonije. Poljoprivredna znanstvena smotra. 65: 229-236.
55. Statistički ljetopis Republike Hrvatske (2017). Poljoprivreda, šumarstvo i ribarstvo. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb 250–275. https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2017/sljh2017.pdf Pristupljeno: 05. lipnja 2018.
56. Steinborn S. i Roughley R. J. (1974). Sodium chloride as **a** cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants. Journal of Applied Bacteriology 39: 133-138.
57. Tu J. C. (1981). Effect of salinity on *Rhizobium*-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. Can. J. Plant Sci. 61: 231-239.
58. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. [online] <https://www.un.org/development/desa/en/key-issues/population.html> Pristupljeno 05. travnja 2018.
59. Van Rensburg H. J. i Strijdom B. W. (1980). Survival of fast-growing and slow-growing *Rhizobium* spp. under conditions of relatively mild desiccation. Soil Biology and Biochemistri 12(4): 353-356.
60. Vriezen J. A .C. (2005). Responses of *Sinorhizobium meliloti* 1021 to water stress. Doktorskirad, University of Massachussetts <https://www.researchgate.net/publication/34965813> Pristupljeno: 25. svibnja 2018.
61. Wood J. M. (1999). Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 230-262.
62. Wood J . M. (2015). Bacterial responses to osmotic challenges. Journal of General Physiology 145(5): 381-388 [online] <http://jgp.rupress.org/content/145/5/381/tab-article-info> Pristupljeno: 17.02.2018.
63. Yang J, Kloepper J. W., Ryu C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci., 14: 1 – 14.

64. Zahran H. H. (1991). Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline enviroments. Biology and Fertility of Soils 12(1): 78-80. [online] <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00369391> Pristupljeno: 12. prosinca 2017.
65. Zahran H. H., Räsänen L. A., Karsisto M., Lindström K. (1994). Alternation of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10: 100-105.
66. Zahran H. H. (1999). *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63(4): 968-989.
67. Zahran H. H. (2010). Legumes-microes interactions under stressed environments. U: Microbes for legume improvement (Khan M.S., Zaidi A., Musarrat J., Ur.). Springer-Verlag, Berlin 353-387.
68. Zahran H. H. (2017). Plasmids impact on rhizobia-legumes symbiosis in diverse environments. Symbiosis 73: 75-91.

8. Životopis

Ana Puljko rođena je 21.08.1992. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole pohađala je Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga gdje je 2011. godine stekla srednju stručnu spremu Ekološkog tehničara. Iste godine upisuje prvu godinu smjera Agroekologije na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Tijekom prediplomskog studija osim fakultetskih obveza sudjelovala je u radu studenske udruge IAAS. Završava preddiplomski studij obranom završnog rada na temu „Značaj spojeva dušika važnih u ishrani lisnatog povrća i prehrani ljudi“ kod metorice prof. dr.sc. Marije Bujan. Nakon završenog preddiplomskog studija, 2015. godine upisuje diplomski studij Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studija postaje predsjednica IAAS udruge između 2016. i 2017. godine. Također, 2016. godine sudjeluje na kongresu: „6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation“ u organizaciji Hrvatskog mikrobiološkog društva. U 2018. godini odlazi na na Erasmus stručnu praksu na Universität für Bodenkultur u Beču. Također sudjelovala je 2017. godine na Erasmus + projektu u Zakopanama, Poljska i 2018. godine na Erasmus + projektu u Bakurianiu, Gruzija.