

Molekularna i fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju slanutak (*Cicer arietinum* L.)

Frančić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:204:484045>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**MOLEKULARNA I FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA
AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE NODULIRAJU
SLANUTAK (*CICER ARIETINUM* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Petra Frančić

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**MOLEKULARNA I FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA
AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE NODULIRAJU
SLANUTAK (*CICER ARIETINUM* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Petra Frančić

Mentor:

Prof. dr. sc. Sanja Sikora

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Petra Frančić**, JMBAG 0178115132, rođena 25.11.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**MOLEKULARNA I FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE
NODULIRAJU SLANUTAK (*CICER ARIETINUM L.*)**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Petre Frančić**, JMBAG 0178115132, naslova

**MOLEKULARNA I FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE
NODULIRAJU SLANUTAK (*CICER ARIETINUM L.*)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof.dr.sc. Sanja Sikora mentor

2. Prof.dr.sc. Mirna Mrkonjić Fuka član

3. Prof.dr.sc. Snježana Bolarić član

Zahvala

Ovim putem zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Sanji Sikora na prilici koju mi je pružila pisanjem ovog diplomskog rada te na strpljenju i stručnim savjetima. Zahvaljujem se što mi je svojim znanjem i dugogodišnjim iskustvom omogućila da proširim vlastito znanje i zanimanje u području mikrobiologije za vrijeme diplomskog studija.

Iskreno se zahvaljujem dr. sc. Sanji Kajić na neizmjerljivoj podršci i korisnim savjetima kojima mi je omogućila uspješnije pisanje ovog diplomskog rada. Ujedno se zahvaljujem tehničkoj suradnici Zavoda za Mikrobiologiju Dragici Hradec na izdvojenom vremenu i pomoći tijekom laboratorijskog istraživanja kao i Petri Borovec, mag. ing. agr. na savjetima i pomoći prilikom pisanja rada.

Posebno se zahvaljujem svojim kolegicama Ani Jakoplić i Aniti Duvančić te najboljim prijateljicama Mii Alerić i Josipi Krković što su me podupirale i bile uz mene tijekom cijelog mog studiranja. Veliko hvala mojoj obitelji, ponajviše roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi i potpori te ohrabrenju da ostvarim sve svoje želje i ciljeve u životu.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Ciljevi istraživanja.....	4
2. Pregled dosadašnjih istraživanja	5
2.1. Biološka fiksacija dušika	5
2.1.1. Simbiozna fiksacija dušika	5
2.1.2. Odnos leguminoze – rizobije	6
2.2. Makrosimbiont- slanutak	7
2.2.1. Botanička klasifikacija i podrijetlo slanutka.....	7
2.2.2. Morfološke karakteristike slanutka	8
2.2.3. Biološke karakteristike i agroekološki uvjeti uzgoja slanutka	10
2.2.4. Agrotehničke mjere za uzgoj slanutka.....	11
2.2.5. Prehrambeni i poljoprivredni značaj slanutka.....	12
2.2.6. Proizvodnja slanutka u Hrvatskoj i svijetu	13
2.3. Mikrosimbiont-kvržične bakterije.....	13
2.3.1. Taksonomija rizobija	13
2.4. Metode za karakterizaciju i identifikaciju rizobija	16
2.4.1. Fenotipske metode.....	16
2.4.2. Genotipske metode	17
3. Materijali i metode.....	19
3.2. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena	19
3.3. Amplifikacija i sekvenciranje <i>nifH</i> gena.....	19
3.3.1. Filogenetska analiza.....	21
3.2. Fenotipska karakterizacija.....	22
3.2.1. <i>In vitro</i> ispitivanje tolerantnosti na sušu	22
3.2.2. Ekološka karakterizacija.....	22
4. Rezultati istraživanja i rasprava	24
4.1. Analiza 16S rRNA gena	24
4.2. Analiza <i>nifH</i> gena.....	27
4.3. Fenotipska karakterizacija izolata	29
4.3.1. <i>In vitro</i> ispitivanje tolerantnosti na sušu	29
4.3.2. Ekološka karakterizacija izolata	30
5. Zaključci.....	33
6. Popis Literature	34
Životopis	41

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Petre Frančić**, naslova

MOLEKULARNA I FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA RIZOBIJA KOJE NODULIRAJU SLANUTAK (*CICER ARIETINUM* L.)

Simbiozni fiksatori dušika (rizobije) omogućuju unos značajnih količina biološki vezanog dušika u tlo stvarajući simbiozne odnose s brojnim leguminozama. Autohtoni sojevi rizobija često su vrlo kompetitivni radi dobre prilagodbe na različite uvjete u tlu. Selekcija visoko učinkovitih sojeva rizobija koje noduliraju slanutak jedan je od preduvjeta uspješne primjene inokulacije sjemena slanutka. S ciljem izolacije i odabira najkvalitetnijih autohtonih sojeva rizobija prikupljeni su uzorci tla s različitih područja uzgoja slanutka u Hrvatskoj i Hercegovini. Početna identifikacija provedena je sekvenciranjem 16S rRNA gena kojim je utvrđeno da većina izolata iz kvržica slanutka pripada rodovima *Rhizobium*, *Mesorhizobium* i *Sinorhizobium*. Uvid u biološku raznolikost i simbiozna svojstva izolata provedeno je sekvenciranjem *nifH* gena kojim je utvrđena velika varijabilnost između vrsta. Ispitivanjem fenotipskih karakteristika izolata utvrđena je značajna otpornost na različite nepovoljne čimbenike poput povišene temperature, povišene koncentracije NaCl-a, niske pH vrijednosti te *in vitro* tolerantnosti na sušu. Budući da se radi o početnim fazama istraživanja raznolikosti prirodnih populacija rizobija koje noduliraju slanutak, od izuzetne važnosti je dobivene izolate uključiti u daljnji program detaljne identifikacije i karakterizacije.

Ključne riječi: simbiozna fiksacija dušika, slanutak (*Cicer arietinum* L.), rizobije, 16S rRNA gen, *nifH* gen, fenotipske karakteristike

Summary

Of the master's thesis - student **Petra Frančić**, entitled

MOLECULAR AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS RHIZOBIAL STRAINS NODULATING CHICKPEA (*CICER ARIETINUM* L.)

Symbiotic nitrogen-fixing bacteria (rhizobia) enable the entry of significant amounts of biologically fixed nitrogen into the soil, creating symbiotic associations with numerous legumes. Indigenous rhizobial strains are often very competitive because of their good adaptation to different soil conditions. The selection of highly effective rhizobial strains nodulating chickpea is one of the preconditions for a successful application of chickpea inoculation. In order to isolate and select the highest quality of rhizobial strains, soil samples were collected from different areas of chickpea cultivation in Croatia and Herzegovina. Initial identification was conducted by sequencing the 16S rRNA gene and the results revealed that most of the chickpea isolates belong to the genera *Rhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium*. The insight into biodiversity and the symbiotic characteristics of the isolates was performed by sequencing the *nifH* gene which determined high variability between species. Phenotypic characterization of isolates revealed considerable resistance to unfavorable environmental conditions such as elevated temperature and NaCl concentration, low pH values and drought. In this paper, the initial results of studying biodiversity of indigenous chickpea rhizobia, are presented. Therefore, it is important to include the obtained strains in further programs of detailed identification and characterization.

Keywords: symbiotic nitrogen fixation, chickpea (*Cicer arietinum* L.), rhizobia, 16S rRNA gene, *nifH* gene, phenotypic characteristics

1. Uvod

Danas je poljoprivredna proizvodnja pod velikim pritiskom radi sve većeg porasta svjetske populacije. Postavlja se važno pitanje kako osigurati dovoljnu količinu hrane za rastuću populaciju i postići maksimalne prinose, a da pri tom ne dođe do onečišćenja okoliša radi intenzivne poljoprivredne proizvodnje odnosno prekomjerne uporabe agrokemikalija. To pitanje predstavlja veliki izazov za poljoprivrednike kao i za samu održivu proizvodnju hrane i očuvanje ekosustava. Kako bi se osigurala dostatna količina hrane dolazi do širenja poljoprivrednih površina, povećanog unosa agrokemikalija (sredstva za zaštitu bilja, mineralna gnojiva), prekomjerne obrade tla i dr. što dovodi do velikog pritiska na okoliš. Kako bi se smanjilo onečišćenje okoliša (tla, zraka i vode) uvodi se alternativa intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji u vidu održive poljoprive u kojoj je ograničena količina primjene agrokemikalija te se potiče i uporaba biološke fiksacije dušika kao jedne od mogućnosti iskorištavanja prirodnih procesa u zamjenu za primjenu mineralnih gnojiva (Hajduković i Radić Lakoš, 2010).

Biljkama je općenito za rast i razvoj neophodna sunčeva energija, voda i izvor hranjivih tvari. Za postizanje visokih prinosa kao jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika izdvaja se dušik. On je jedan od najvažnijih esencijalnih biljnih elemenata o kojemu ovisi rast i razvoj same biljke. Najveće količine dušika prisutne su u atmosferi (78,1 %) u molekularnom obliku (N_2) i takav oblik biljkama nije dostupan. Ukupan sadržaj dušika u tlu izražen je u vrlo malim količinama, a varira ovisno o fizikalnim i kemijskim značajkama tla, klimi, vegetaciji i dr. Tijekom godine biljkama je na raspolaganju samo 1 do 5 % dušika radi čega je gnojidba dušičnim gnojivima neizostavna agrotehnička mjera. Dušik se u tlu nalazi u organskom i anorganskom obliku. Biljkama je dušik pristupačan u samo dva oblika; amonijskom (NH_4^+) i nitratnom (NO_3^-). Količine pristupačnog oblika dušika koje se nalaze u rezervama u tlu nisu dostatne za opskrbu biljke tokom cijelog razvoja stoga je potrebno nadomjestiti potrebne količine primjenom mineralnih dušičnih gnojiva (Čoga i Slunjski, 2018).

Prekomjernim korištenjem mineralnih gnojiva tlo je podložno negativnim promjenama. Smanjuje se kvaliteta tla (povećani salinitet), teški metali akumuliraju se u tlu, dolazi do ispiranja nitrata u podzemne vode te naposljetku i smanjenja plodnosti tla (Krznarić, 2018). Kako bi se upotreba mineralnih gnojiva smanjila, nastoji se što više iskoristiti proces biološke fiksacije dušika. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem mikroorganizmi uz pomoć enzima nitrogenaze pretvaraju atmosferski dušik u dostupan amonijski oblik (Sikora i sur., 2008). Najznačajniji oblik biološke fiksacije dušika za poljoprivrednu proizvodnju je simbiotna fiksacija dušika. To je simbiozni odnos između biljke i mikroorganizama u tlu. Rizobije su jedna od skupina tih mikroorganizama koji imaju sposobnost stvaranja simbioznih odnosa sa mahunarkama (leguminozama). U simbioznom

odnosu, rizobije opskrbljuju biljku reduciranim oblikom dušika dok biljke osiguravaju bakterijama izvor ugljika (Topol i Kanižai Šarić, 2013).

Slanutak (*Cicer arietinum* L.) se u poljoprivrednoj proizvodnji izdvaja kao vrlo značajna kultura. Ona je jedna od najstarijih kultura mahunarki s dugom povijesti upotrebe i proizvodnje (Laranjo i sur., 2014). Smatra se vrlo kvalitetnom i gospodarski vrijednom kulturom. Visoko je kvalitetna namirnica za ljude i stoku radi bogatog izvora bjelančevina i drugih nutritivnih vrijednosti (ugljikohidrati, vitamini i dr.). Konzumacija sjemenki slanutka može služiti kao prevencija u smanjenju rizika od raznih bolesti. Zbog širokog nutritivnog sadržaja i zdravstvenih pogodnosti slanutak je prihvaćen kao jedna od namirnica u kategoriji funkcionalne hrane (Jukanti i sur, 2012). Uzgoj slanutka u svijetu vrlo je raširen te se uzgaja u oko 80 različitih zemalja od kojih se Indija i Pakistan izdvajaju kao najveći proizvođači. Međutim, proizvodnja slanutka u Hrvatskoj koncentrirana je na malim površinama pa je sve više prisutan uvoz iz drugih zemalja (Ozimec i sur. 2015). Za uzgoj slanutka pogodna su dobro drenirana (ilovasta ili glinasta) tla s neutralnim do blago alkalnim pH. Iako se smatra najotpornijom mahunarkom na sušu radi svog dobro razvijenog korijena, nedostatak vode u tlu može biti ograničavajući čimbenik visokih prinosa posebno u vrijeme formiranja pupova i cvatnje kada je slanutku potrebno najviše vode.

S obzirom na mali broj hektara raspoloživih poljoprivrednih površina za uzgoj slanutka u našem podneblju, važno je pratiti da pri tom ne dolazi do prekomjerne primjene mineralnih gnojiva koja su jedan od značajnih onečišćivača tla. Kao zamjena za mineralna gnojiva moguće je osigurati veće iskorištavanje procesa biološke fiksacije dušika. U tu svrhu, primjenjuje se predstjetvena inokulacija sjemena mahunarki sa odgovarajućim sojevima rizobija. U procesu biološke fiksacije iskorištava se dušik iz atmosfere kojeg mikroorganizmi prevode u oblik koji biljke mogu iskorištavati. Kako bi se fiksacija dušika odnosno simbiozna fiksacija dušika što uspješnije iskoristila jedan od uvjeta je odabir najpogodnijih sojeva simbioznih fiksatora dušika (rizobija) za inokulaciju. Jedan od mogućih pristupa u selekciji rizobija je proučavanje genetske raznolikosti prirodnih populacija i karakterizacija autohtonih sojeva. Neke od najčešće korištenih molekularnih metoda za identifikaciju i karakterizaciju simbioznih fiksatora dušika su: sekvenciranje 16S rRNA gena, RAPD-PCR (engl. *random amplified polymorphic DNA*), Rep-PCR (engl. *repetitive sequence-based*), AFLP (engl. *amplified fragment length polymorphism*) i DNA-DNA hibridizacija (DDH).

Sekvenciranje 16S rRNA gena osnovna je metoda u proučavanju mikrobne filogenije i koristi se kao standard i u identifikaciji rizobija. Međutim, kako ova metoda nema mogućnost razlikovanja bliskih vrsta, identifikacija rizobija na razini vrste temelji se na analizama konstitutivnih gena koji imaju ključnu ulogu u svim funkcijama bakterijskog rasta. Metode poput MLSA (Multilocus sequence analysis) i MLST (*Multilocus sequence*

typing) temelje se na analizi nekoliko konstitutivnih gena i vrlo su korisne u filogenetskim analizama i identifikaciji konkretnih skupina rizobija (Rivas i sur., 2009). Nadalje, RAPD-PCR metoda smatra se pouzdanom metodom za filogenetske odnose između i unutar blisko srodnih vrsta radi svoje brzine i praktičnosti (Naz i sur., 2009). Ova metoda pokazala je veliki značaj u određivanju raznolikosti različitih sojeva roda *Rhizobium* (Koskey i sur., 2018). Za procjenu genetske varijabilnosti mikroorganizama značajna je Rep-PCR metoda (Hameed i sur., 2016) te AFLP metoda (Portier i sur., 2006). U svrhu identifikacije na razini vrsta koristi se metoda DNA-DNA hibridizacije (DDH) koja se temelji na analizi genomske sličnosti dvaju organizama. Prema Rossello-Mora i sur. (2011) smatrana je najvažnijim kriterijem za klasifikaciju bakterijskih vrsta. Ormeno-Orrillo i sur. (2015) uspostavili su metodu temeljenu na usporedbi sekvenci cijelog genoma (genotaksonomija) dok su Rashid i sur. (2015) koristili metodu temeljenu na prosječnom nukleotidnom identitetu (ANI) sekvenci genoma. Zaključno se može reći da prema najnovijim literaturnim podacima (Rajkumari i sur., 2022), taksonomija temeljena na kompletnom slijedu genoma (genotaksonomija) te prosječnom identitetu nukleotida, sada se smatra primarnim pristupom, što rezultira stalnim promjenama taksonomiji rizobija.

1.1. Ciljevi istraživanja

Cilj rada je detaljno karakterizirati izolate rizobija koji su u prethodnim istraživanjima identificirani do razine roda odnosno vrste.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Karakterizacija autohtonih sojeva rizobija sekvenciranjem simbioznog *nifH* gena koja će dati podatke o biološkoj raznolikosti i simbioznim svojstvima prirodnih populacija rizobija koje noduliraju slanutak.
2. Fenotipska karakterizacija sojeva koja će dati uvid u njihovu sposobnost rasta u različitim ekološkim uvjetima te u stresnim uvjetima suše.

2. Pregled dosadašnjih istraživanja

2.1. Biološka fiksacija dušika

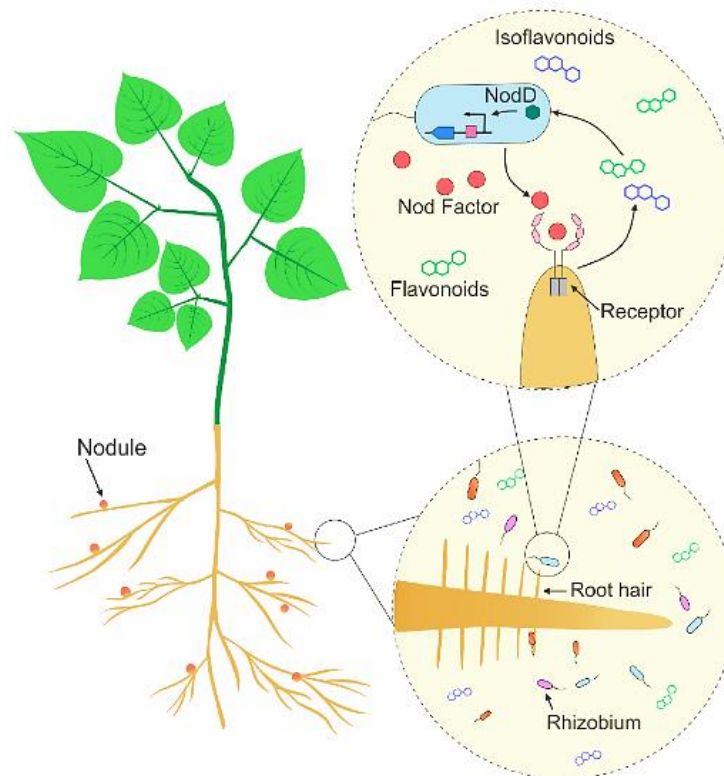
Dušik je često ograničavajući čimbenik o kojemu ovisi rast i razvoj biljaka. Dva su oblika dušika koje biljka može usvajati, a to su nitratni (NO_3^-) i amonijski (NH_4^+). Atmosferski dušik je molekula sastavljena od dva atoma dušika povezana trostrukom vezom koja ga čini vrlo stabilnim i inertnim (Topol i Kanižai Šarić, 2013). U procesu biološke fiksacije dušika (BNF) neki prokariotski mikroorganizmi pomoću enzima nitrogenaze reduciraju atmosferski dušik (N_2) prevodeći ga u biljkama dostupan oblik. Prokariotski mikroorganizmi koji provode ovaj proces nazivaju se diazotrofima (Zehara, 2021). Neki od njih mogu fiksirati dušik bez direktne povezanosti sa biljkama (*Azotobacter*), tvoreći asocijativne odnose sa biljkama (*Azospirillum*) ili pak u simbioznom odnosu s leguminozama (Lehnert i sur., 2018). Općenito, biološka fiksacija dušika dijeli se na asimbioznu, asocijativnu i simbioznu fiksaciju dušika (Topol i Kanižai Šarić, 2013).

2.1.1. Simbiozna fiksacija dušika

S obzirom da je dušik glavno limitirajuće hranjivo za većinu usjeva, simbiozna fiksacija dušika smatra se važnim biološkim procesom održive poljoprivredne proizvodnje (Sikora i sur., 2008). Nedostatak mineralnog dušika u tlu česta je pojava koja ograničava rast i razvoj biljaka. Zbog toga se taj koristan proces nastoji iskoristiti u biljnoj proizvodnji primjenom inokulanata. Inokulacijom sjemena povećava se količina dušika koji je biljci dostupan. Za inokulaciju sjemena mogu se koristiti mikroorganizmi koji su sposobni provoditi fiksaciju atmosferskog dušika. U ovom slučaju to su kvržične bakterije-rizobije (mikrosimbionti) koje stvaraju simbiozne odnose s biljkama iz porodice *Fabaceae* (makrosimbionti). Simbioza se temelji na obostranoj koristi simbionta. Biljka domaćin-leguminoza putem procesa fotosinteze osigurava bakterijama energiju potrebnu za provođenje fiksacije dušika. S druge strane, bakterije opskrbljuju biljku dušikom u amonijskom obliku. U simbioznoj fiksaciji dušika najznačajnije rizobije za uspostavu simbioznog odnosa su bakterije rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium*. Mjesto odvijanja procesa simbiozne fiksacije dušika su kvržice (nodule) koje stvaraju rizobije na korijenu biljke domaćina (Topol i Kanižai Šarić, 2013).

2.1.2. Odnos leguminoze – rizobije

Uspostava simbioznog odnosa (slika 1) temelji se na stvaranju kvržica na korijenu biljaka (Sikora i sur., 2008). Bakterije posjeduju tri skupine simbioznih gena; *nod*, *nif* i *fix* koje kontroliraju simbioznu fiksaciju dušika (Remigi i sur., 2016). *Nif* geni odgovorni su za kodiranje kompleksa nitrogenaze kao i za ostale regulatorne proteine koji su uključeni u proces fiksacije (Kelly i sur., 2017) dok *fix* geni imaju ključnu ulogu u samom procesu simbiozne fiksacije dušika (Kajić, 2020). Interakcija između biljke i rizobija započinje davanjem signala i prepoznavanjem simbioznog partnera.



Slika 1. Shematski prikaz simbioznog odnosa između biljke domaćina i rizobija (Izvor: Clua i sur., 2018)

U prvoj fazi uspostave simbioznog odnosa biljka domaćin-leguminoza stvara fitokemijske signale u obliku flavonoida koje ispušta u rizosferu putem korijena dok bakterija proizvodi Nod faktore čija je produkcija kontrolirana *nod* genima. Pri tom flavonoidne tvari privlače kompatibilne rizobije i odbijaju ne odgovarajuće vrste prisutne u tlu. Interakcija rizobija s korijenom biljke uspostavlja se pomoću receptora *nodD* proteina koji ima sposobnost vezanja na specifične flavonoide. *NodD* zatim aktivira produkciju ostalih *nod* gena. Kao reakcija na infekciju rizobija, dolazi do produljivanja korijena i biljka stvara infekcijske niti u blizini korijenovih dlačica (Topol i Kanižai Šarić, 2013). U drugoj fazi dolazi do ulaska rizobija u kortikalne stanice biljke domaćina kroz infekcijsku nit. Istodobno rizobije ulaze u korijen, a kortikalne stanice se dijele mitotičkom diobom i dolazi do stvaranja primordijalne

kvržice koja zatim formira meristem (Kajić, 2020). Rastom infekcijske niti rizobije putuju kroz korijen i neprekidno stvaraju nod faktore koji potiču diobu stanica unutar korijena. Time dolazi do stvaranja novih kvržica. Rizobije se zatim otpuštaju u novonastale biljne stanice citoplazme gdje biljna stanica stvara peribakteroidnu membranu koja okružuje bakterije. U trećoj fazi primordijalna kvržica pretvara se u zrelu dok se rizobije dalje dijele i diferenciraju u bakteroid. Tako nastali oblik rizobije sintetizira nitrogenazu i leghemoglobin (Godinić, 2020). Rizobije se potom oslobađaju iz infekcijske niti, a umnažanjem stanica meristema formira se kvržica (Kajić, 2020). Proces nodulacije završava i dolazi do fiksacije dušika u nastalim kvržicama. Naime, fiksacija se odvija samo u učinkovitim kvržicama koje se raspoznaju po crvenoj boji na presjeku koja potječe od pigmenta leghemoglobina. Uglavnom se nalaze na primarnom i lateralnom korijenju. Neučinkovite kvržice su manje, blijede do blijedo zelene boje na presjeku i raspoređene su po čitavom korijenu (Krznarić, 2018).

2.2. Makrosimbiont- slanutak

2.2.1. Botanička klasifikacija i podrijetlo slanutka

Slanutak (*Cicer arietinum* L.) je jednogodišnja leguminoza koja pripada porodici *Fabaceae* i rodu *Cicer*. Latinsko ime roda *Cicer* potječe od grčke riječi „*kikus*“ što znači sila ili snaga. Ime vrste *Arietinum* dolazi od grčke riječi „*krios*“ što je drugi naziv za ovna koji je asocijacija na sjeme slanutka čiji oblik podsjeća na glavu ovna (Ereso, 2017). Rod *Cicer* obuhvaća 9 jednogodišnjih i 35 višegodišnjih vrsta čije je središte raznolikosti u jugozapadnoj Aziji (Van der Maesen i sur., 2007). Sve jednogodišnje vrste su diploidi sa 16 kromosoma ($2n = 16$). Vrsta *C. recitulum* najbliže je povezana s kultiviranim slanutkom i smatra se njenim pretkom (Flowers i sur., 2010).

Pripitomljavanje vrste se dogodilo prije oko 10 000 godina u jugoistočnoj Turskoj u djelu zvanom „Plodni polumjesec“. Do toga je došlo zbog ograničene zemljopisne rasprostranjenosti populacije divljih vrsta i vrlo niske genetske varijacije kultivara. Postoje različite teorije podrijetla slanutka, no vjeruje se da je nastao na područjima današnje jugoistočne Turske i u susjednim područjima Sirije (Knights i Hobson, 2016).

Slanutak je jedna od najstarijih kultura mahunarki koja ima dugu povijest upotrebe i proizvodnje (Laranjo i sur., 2014). Uzgoj je raširen po cijelom svijetu, a najviše se uzgaja na području Mediterana, Bliskog Istoka, u Etiopiji, Meksiku i zapadnoj Aziji (Ereso, 2017). Poznata su dva priznata tipa slanutka koje se uzgajaju u svijetu, a to su Desi (sitnozrnati) i Kabuli (krupnozrnati) (Flowers i sur., 2010).

2.2.2. Morfološke karakteristike slanutka

Slanutak je jednogodišnja zeljasta biljka koja, ovisno o sorti i vanjskim uvjetima sredine, uvelike varira u morfološkim karakteristikama (Ahmad i sur., 2005).

Korijenski sustav slanutka je vretenast, razgranat i dug do 1 m dubine. U dobro strukturiranim tlima korijen se može razviti i do više od 1 m. Rast korijena je najbrži u vrijeme cvatnje, a pod povoljnim uvjetima raste sve do zrelosti biljke (GRDC, 2017Aa). Ponekad na površini korijena nastaju kvržice (slika 2) koje se pojavljuju u velikom broju te mogu biti velike kao i sjeme slanutka. Korijen slanutka sastoji se od glavnog korijena s nekoliko bočnih. Vrlo dobra razvijenost korijena osigurava dobru moć upijanja te omogućuje opskrbu korijena vodom i hranivima iz dubljih slojeva tla. Također, duljina korijena doprinosi većoj otpornosti biljke na sušu (Sudar, 2016).



Slika 2. Korijen slanutka s kvržicama
(Izvor: GRDC, 2017b)

Stabljika. U početku vegetacije je zeljasta i takav oblik zadržava sve do kraja vegetacije kada odrveni. Visina se razlikuje ovisno o kultivaru i uvjetima uzgoja. Poznato je da Kabuli sorte imaju višu stabljiku od Desi sorte. Općenito, visina stabljike slanutka varira između 20 i 100 cm (Sudar, 2016). Stabljika je uspravna s malim dlačicama na površini te se grana na tri do pet glavnih grana koje mogu stajati pod većim ili manjim kutom. Grane koje se razvijaju iz prva tri nodija osiguravaju najveći dio prinosa. Stoga je vrlo važno pratiti razvoj biljke posebno u fazi razvoja prvih grana.

Listovi. Na stabljici se nalaze naizmjenično duž grane. Neparno su perasti, obrnuto ovalnog oblika (Pole, 2021). Prvi pravi list sastoji se od dva do tri para liski sa jednim terminalnim. Nakon faze razvijanja šeste grane (nodija), dolazi do potpunog formiranja listova sa pet do osam pari nazubljenih liski (10 do 16). Listovi kao i cijela površina izdanka biljke osim cvijeta, prekriveni su gustim žljezdanim dlačicama (trihomima) koje izlučuju jaku kiselinu

(uglavnom jabučnu). Te izlučevine služe biljci kao zaštita od raznih štetočina. Što se tiče boje listova i stabljike, Desi sorte karakteriziraju tamniji tonovi dok su kod Kabuli sorte izraženi svjetlo zeleni listovi i stabljika (GRDC, 2017Aa).

Cvijet. Sitni cvjetovi, leptirastog oblika nalaze se pojedinačno u pazuhu listova na kratkim stapkama. Cvijet je pentameran (Sudar, 2016) te može sadržavati pigment antocijanin prema čemu se boje latica razlikuju od bijele, ružičaste do svjetlo plave. Cvjetovi sorte Desi su ljubičasti dok su kod sorte Kabuli bijele do krem boje radi nedostatka pigmenta. Pojava pojačane pigmentacije na cvjetovima pokazatelj je okolišnih stresova kao što su niske temperature, višak vode, stres soli, suša i virusne infekcije. Slanutak je biljka dugog dana. Vrlo je osjetljiva na fotoperiod koji je jedan od glavnih okolišnih čimbenika, uz genotip i temperaturu, što određuje vrijeme cvatnje i pojavu prvog cvijeta. Cvatnja slanutka je neodređena kao i sami rast biljke te može trajati do 60 dana (Croser i sur., 2003). U fazi prelaska lisnih pupova u cvjetne, dolazi do stvaranja niza pseudocvjetova ili lažnih cvjetnih pupova na stabljici. Ova karakteristika slanutka može uzrokovati razdoblje neučinkovite cvatnje; kada se mahune ne zametnu. Nadalje, prvi cvjetovi pojavljuju se na glavnoj stabljici i donjim granama unutar tri do četiri dana. Oprašivanje slanutka odvija se prije otvaranja cvjetnog pupa. Slanutak je uglavnom samooplodna kultura, no u nekim istraživanjima spomenuto je unakrsno oprašivanje (GRDC, 2017Aa).

Plod slanutka je sitna mahuna, ovalnog, jajolikog ili valjkastog oblika duga 1-4 cm. Sadrži jedno do četiri sjemena zametka koja se rijetko sva oplode. Na jednoj biljci razvije se do 100 mahuna (Pole, 2021). Pod povoljnim uvjetima temperature i vlage u tlu, vrijeme potrebno od oplodnje do prve pojave mahune je oko šest dana. Tada se sjeme puni sljedeća tri do četiri tjedna. Veličina mahune razlikuje se među sortama i uglavnom nije osjetljiva na promjene okoline. Međutim, punjenje sjemena i kasnija veličina uvelike ovisi o sorti i vremenskim uvjetima. S time, kod Kabuli sorte proces punjenja sjemena traje duže nego u Desi sorta.

Sjeme. Oblik sjemena slanutka je nepravilno okruglast s ispupčenim hilumom (Lešić i sur., 2004) što mu daje karakterističan „kljunasti“ oblik. Sjeme je ponekad omeđeno glatkom ili izbrazdanom ovojnicom. Boja sjemena varira ovisno o sorti, a određena je bojom i debljinom ovojnice sjemena te unutrašnjom bojom kotiledona. U Desi sorta pojavljuje se sitno sjeme oblika glave ovna s neravnom površinom crno obojane ljuske (Pole, 2021). Oblik sjemena sorte Kabuli je krupnog i nepravilnog oblika te podsjeća na sovину glavu dok je površina naborana s neobojanom ljuskom. Važna karakteristika slanutka prema kojoj se izdvaja od drugih mahunarki je upravo boja sjemena. Brojnim istraživanjima otkrivena je 21 različita boja te nijansa sjemena (Godinić, 2020).

2.2.3. Biološke karakteristike i agroekološki uvjeti uzgoja slanutka

Slanutak je tijekom svog rasta i razvoja izložen različitim ekološkim čimbenicima koji reguliraju njegov rast i produktivnost. Među važnijim ekološkim čimbenicima mogu se istaknuti temperatura, vlaga (količina dostupne vode) i tlo (tip tla, pH i dr.) (GRDC, 2017Aa).

Spomenuti ekološki čimbenici uvelike utječu na vegetacijsko razdoblje slanutka koje u prosjeku traje od dva do četiri mjeseca. Tijekom tog razdoblja potrebna je kontinuirana opskrba fosforom (P) kako ne bi došlo do njegovog nedostatka. Slanutak je u odnosu na druge mahunarke i žitarice manje osjetljiv na nedostatak P. Razlog tome je što korijenski eksudati s organskim kiselinama otapaju P čime se izbjegava njegov nedostatak. Neki netopljivi minerali (Cu, Zn Mn i Fe) koji nisu dostupni slanutku kao i većini biljaka također se otapaju uz P putem korijenskih eksudata te na taj način postaju dostupni.

Temperatura. Klijanje sjemena slanutka odvija se pri minimalnoj temperaturi 2-3°C, a nicanje pri 5-6°C u trajanju od tri tjedna. U početnim fazama rasta slanutak podnosi niske temperature od -6 do -8°C, a može podnijeti i niže do -16°C (Godinić, 2020). Optimalna temperatura rasta u vegetativnoj fazi je između 20 i 24°C, a za vrijeme cvatnje oko 25°C. Niske temperature niže od optimalnih loše utječu na razvoj reproduktivnog sustava biljke. Naime, niske temperature uzrokuju odgodu cvatnje, ali dolazi do većeg grananja. Kod većine današnjih sorti, kritična srednja ili prosječna dnevna temperatura za pobačaj cvjetova je <15°C. Ispod te temperature pelud postaje sterilan i ne razvijaju se reproduktivni organi biljke. Temperature ispod ništice tijekom zime i u proljeće mogu uzrokovati razna oštećenja na lišću. Međutim, slanutak ima sposobnost regeneracije oštećenih organa pa tako nastala oštećenja nisu dugotrajna (GRDC, 2017Aa). Osim niskih temperatura, na razvoj reproduktivnih organa utječu i visoke temperature koje uzrokuju velike gubitke prinosa. Temperature iznad 35°C uzrokuju pobačaj cvjetova i smanjuju vrijeme potrebno za punjenje sjemena što na posljetku rezultira smanjenjem prinosa. Iako su posljedice visokih temperatura velike, u usporedbi s drugim mahunarkama, slanutak se smatra visoko tolerantnim (Kaushal i sur., 2013).

Vlaga. Slanutak se smatra najotpornijom mahunarkom na sušu radi svog dobro razvijenog korijenovog sustava. Biljci je potrebno najviše vode u vrijeme formiranja pupova i cvatnje kako ne bi došlo do odgode ili prestanka cvatnje. Nakon bolesti, suša je drugo glavno ograničenje produktivnosti slanutka. Stres od suše ima značajne učinke na unos hranjivih tvari, otežava stvaranje kvržica te negativno utječe na prinos i komponente prinosa (Maqbool i sur., 2017). Također ima značajan učinak na morfološke i fiziološke procese te može dovesti do smanjenja prinosa i do 60 % (Godinić, 2020). Radi toga je potrebno redovito i ravnomjerno navodnjavati tlo tokom cijele godine. Optimalan prinos sjemena može se postići redovitim održavanjem vlažnosti tla u fazama grananja, cvatnje i formiranja mahuna.

Tlo. Različiti kemijski i fizikalni čimbenici tla ograničavaju rast i razvoj biljaka. Jedan od njih je slanost tla. Višak soli u tlu upućuje na povećanu količinu natrija (Na) što se uočava kod

povećane gustoće mase, niske infiltracije vode i loše aeracije. Slanutak ima nisku toleranciju na ionske neravnoteže koje inhibiraju njegov rast i produktivnost uslijed usporenog rasta korijena i loše nodulacije. Drugi važni čimbenik je kiselost tla koja je povezana sa lošom nodulacijom. Slanutku odgovara neutralni do blago alkalni pH (7-8). Nedostatak željeza (Fe) i cinka (Zn) te nedostatak ili toksičnost bora (B) također su jedni od ograničavajućih čimbenika za rast slanutka. Dobro drenirana tla (ilovasta ili glinasta) najpogodnija su za uzgoj slanutka radi dobre sposobnosti zadržavanja vode (Knights i Hobson, 2016).

2.2.4. Agrotehničke mjere za uzgoj slanutka

Za uspješnu proizvodnju s visokim prinosima prvenstveno je važno odabrati prikladnu sortu za određeno područje uzgoja. U izboru sorti bitno je voditi računa o morfološkim i fiziološkim karakteristikama sjemena kako bi odabir bio što precizniji. Nakon izbora sorte važno je utvrditi kvalitetu sjemena (Vargas i sur., 2021). Prije same sjetve potrebno je obratiti pažnju na plodored. U pravilu bi trebalo izbjegavati sadnju na tlima na kojima su prethodno bile posijane višegodišnje žitarice, mahunarke i suncokret. Također se ne preporuča sadnja slanutka u blizini polja luka, češnjaka, vlasca i poriluka. Naime, slanutak ima ulogu „poboljšivača tla“ pa je time dobra pretkultura u plodoredu za pšenicu (Pole, 2021). Mahunarke općenito imaju veći potencijal apsorpcije ugljika u odnosu na monokulture. Poljoprivrednici imaju velike koristi od uvođenja mahunarki u plodored jer se time povećava produktivnost koja se onda prenosi na iduću žetvu. Osim toga, njihova prisutnost u tlu povećava mikrobnu aktivnost koja obogaćuje poljoprivrednu bioraznolikost tla. Na taj način tlo se lakše odupire iscrpljivanju i povećava se njegova plodnost (Vargas i sur., 2021).

Obrada tla također je jedan od važnih agrotehničkih zahvata koji definiraju uspješnu proizvodnju. Prilikom rane sjetve, tlo se za obradu priprema na jesen kako bi ostalo dovoljno vremena za agrotehničke zahvate u proljeće. Glavna obrada obavlja se na dubini od 30 do 35 cm. Vrlo je važno provesti duboko oranje kako bi tlo postalo prozirno i nakupilo se dovoljno vlage za pravilno razvijanje korijena. Na lakšim tlima dovoljno je provesti samo plitku obradu tla.

U našem podneblju (Mediteran) slanutak se sije u razdoblju od kasne jeseni do ranog proljeća. Način sjetve prilagođen je različitim područjima uzgoja te ovisi o mogućnosti upotrebe mehanizacije. Da bi se posijalo 50-150 kg/ha sjemena, ovisno o krupnoći, potreban je razmak redova 30-70 cm te razmak u redu 10-30 cm (Pole, 2021). Kod šireg razmaka preporuča se međuredna kultivacija. Dubina sjetve ovisi o strukturi tla. Općenito se sije na dubini od 5-7 cm. Kod lakih i suhih tala sije se dublje dok se kod teških i vlažnijih tala sjetva obavlja pliće (Agroklub, 2022).

Slanutak nema velike zahtjeve za gnojidbom. Potrebe za dušikom zadovoljava simbioznom fiksacijom u simbiozi s bakterijama iz skupine rizobija. Ipak, u vrijeme sjetve primjenjuju se male doze N (10-20 kg/ha) kao „starter“ prije simbioze. Količina pristupačnog fosfora bitna je radi duljine vegetacijskog razdoblja. Za postizanje visokih prinosa, u tlo je potrebno unijeti 40-70 kg/ha P₂O₅, dok se kalij dodaje samo ako je uočen nedostatak. Nedostatak Fe, Zn i Mo može se nadograditi folijarnim prskanjem (Vargas i sur., 2021).

2.2.5. Prehrambeni i poljoprivredni značaj slanutka

Danas se slanutak smatra vrlo značajnom kulturom te je treća po zastupljenosti među mahunarkama u svijetu koje se koriste u ljudskoj prehrani, nakon graha (*Phaseolus vulgaris*) i graška (*Pisum sativum*) (Flowers i sur., 2010). Ova kultura pronalazi veliki značaj u prehrambenoj industriji, medicini te tekstilnoj industriji.

Slanutak se uglavnom konzumira kao sjemenska hrana u različitim oblicima (Jukanti i sur, 2012) poput kavovine (nadmjestak za kavu), prženo ili kuhano sjeme te kao brašno za kruh. Slanutak je jedan od glavnih mahunarki u svijetu koja se koristi kao primarni izvor hrane za ljude. Razlog tome su sjemenke koje su jedini jestivi dio biljke za ljude te ujedno i bogat izvor bjelančevina (17 – 31 %) (Maqbool i sur., 2017). U sjemenu slanutka su također zastupljene značajne količine ugljikohidrata od 50 – 60 %, manje količine ulja (> 3%), celuloze (oko 3 %) i mineralnih tvari (oko 4 %) te neki antinutrijenti (Jukanti i sur., 2012). Sjemenke slanutka su također bogate vitaminima kao što su riboflavin, tiamin, vitamin A, niacin i β-karoten, a od važnijih minerala nalaze se P, Mg, Ca i K (Grasso i sur. 2022).

Istraživanja su pokazala da konzumacija slanutka ima potencijalne zdravstvene pogodnosti te da u kombinaciji s drugim mahunarkama i žitaricama može utjecati na smanjenje rizika od raznih bolesti poput CVD-a (kardiovaskularne bolesti), dijabetesa, raka i bolesti probavnog sustava (Ibrikci i sur., 2003). Zbog svoje nutritivne i zdravstvene pogodnosti slanutak je prihvaćen kao jedna od namirnica u kategoriji funkcionalne hrane (Jukanti i sur, 2012).

Osim za ljude, koristi se i kao hrana za stoku. Takav način upotrebe slanutka doprinosi velikom značaju u poljoprivrednim sustavima. Uvođenjem ove mahunarke u plodored postiže se održivost proizvodnje, a potreba za gnojidbom dušikom je smanjena radi sposobnosti kvržičnih bakterija na korijenu slanutka da fiksiraju atmosferski dušik (Maqbool i sur., 2017). Biološka fiksacija dušika kod slanutka pridaje veliku važnost u održavanju plodnosti tla posebno u kišnim te suhim područjima jer vrlo dobro podnosi sušu (Wubie i sur., 2021).

2.2.6. Proizvodnja slanutka u Hrvatskoj i svijetu

Početak uzgoja slanutka poznat je još od 8. stoljeća prije Krista kada se uzgajao na područjima Sirije (Redden i Berger, 2007). Azija je u razdoblju od 2009. do 2013. godine proizvodila slanutak u vrijednostima koje su činile 85,1 % svjetske proizvodnje. Manje značajne proizvodnje odvijale su se i u Australiji (5,3 %), Africi (5 %) i Americi (3,8 %) dok je Europa zauzimala samo 0,9 % svjetske proizvodnje. Od 2011. do 2013. ukupna proizvodnja slanutka u svijetu odvijala se na 13 milijuna ha što je zabilježeno najvećom proizvodnjom do tada. Danas se slanutak uzgaja u oko 80 zemalja. Indija se može izdvojiti kao primarni proizvođač jer proizvodi dvije trećine svjetskih usjeva, a kao sekundarni proizvođač ističe se Pakistan (Godinić, 2020).

Proizvodnja slanutka u Hrvatskoj najviše je razvijena u primorskim krajevima, na području Istre i Dalmacije radi velike otpornosti na sušu. Slanutak se može uzgajati kao ratarska kultura i tada se koristi sitnozrni tip (Desi) ili kao povrtna kultura kada se koristi krupnozrni (Kabuli). Međutim, slanutak se u Hrvatskoj vrlo slabo uzgaja te je sve više prisutan uvoz iz drugih zemalja. Također, radi problema nedostatka i veličine poljoprivrednih površina slanutak nema veliku vrijednost niti za ishranu stoke (Ozimec i sur. 2015.).

2.3. Mikrosimbiont-kvržične bakterije

Rizobije su skupina bakterija koje imaju sposobnost provođenja simbiozne fiksacije dušika. Sposobne su uspostaviti odnos s brojnim leguminozama stvarajući kvržice na njihovom korijenu. Prema *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* rizobije su štapičaste, aerobne, Gram-negativne, pokretljive bakterije (Sessitsch i sur., 2002).

2.3.1. Taksonomija rizobija

Prvu bakteriju iz kvržice na korijenu biljke izolirao je Beijerinck (1888) i nazvao ju *Bacillus radicola*. Međutim, krajem 19. stoljeća Frank (1889) je izoliranu bakteriju nazvao *Rhizobium leguminosarum*. U idućem stoljeću, prije nego je prepoznata taksonomska raznolikost kvržičnih bakterija, identificirao je i druge vrste koje pripadaju istoj grupi. Izraz „*Rhizobia*“ izvorno je korišten da bi se imenovala ostale vrste unutar roda *Rhizobium*. Naime, ovom rodu pripada veliki broj vrsta, a s vremenom su otkriveni novi rodovi kao što je *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium* (Laranjo i sur., 2014).

Tradicionalno taksonomija rizobija temeljila se na specifičnostima biljke domaćina (Zehara, 2021). U istraživanjima do 20. stoljeća, uz *R. leguminosarum* zapisano je 5 novih vrsta imenovanih prema biljci domaćinu. Iz toga slijede: *Rhizobium meliloti* (lucerna), *Rhizobium trifolii* (djetelina), *Rhizobium phaseoli* (grah), *Rhizobium lupini* (lupina) i *Rhizobium japonicum* (soja) (Shamseldin i sur., 2017). Međutim, podjela vrsta prema tom kriteriju nije bila od koristi radi mogućnosti prirodnog prijenosa simbioznih plazmida među sojevima

rizobija u tlu te radi sposobnosti nekih sojeva da noduliraju široki spektar mahunarki (Zehara, 2021). U početku, bakterije su se dijelile prema sposobnosti nodulacije. Tako su one bakterije koje su imale sposobnost nodulacije nazivane rizobije dok ostale koje su imale ista morfološka svojstva bez sposobnosti noduliranja bila isključene (Bergey i sur., 1923). Nadalje, podjela rizobija temeljila se na brzini rasta bakterija na hranjivom mediju odnosno prema položaju simbioznih gena u bakteriji. Bakterije kojima su se simbiozni geni nalazili na kromosomu i kojima je generacijsko vrijeme veće od 6 sati obilježene su kao spororastuće bakterije koje su pripadale rodu *Bradyrhizobium*. Kao brzorastuće bakterije obilježene su one kojima su se simbiozni geni nalazili na plazmidima, kojima je generacijsko vrijeme manje od 6 sati, a to su bile bakterije roda *Rhizobium* (Zehara, 2021).

Prije se smatralo kako bakterije koje noduliraju leguminoze pripadaju samo skupini alfa proteobakterija. Međutim, proučavanjem nekih divljih sorata leguminoza identificirana je nova skupina rizobija koje pripadaju razredu beta proteobakterija (Laranjo i sur., 2014). Danas su bakterije koje noduliraju leguminoze podijeljene u dva razreda: α -proteobakterije i β -proteobakterije. Među njima, najveći broj predstavnika uključen je u razred α -proteobakterija u koji je uključeno 6 porodica: *Rhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Brucellaceae*, *Phyllobacteriaceae* i *Methylobacteriaceae* (Shamseldin i sur., 2017).

Taksonomiju rizobija prate velike promjene kroz povijest. Zakhia i de Lajudie (2001) prvi su saželi klasifikaciju rizobija u šest rodova *Rhizobium* i 28 priznatih vrsta. Dvije godine kasnije, Sawada i sur. (2003) mijenjaju tu teoriju otkrivanjem ukupno 44 vrsta bakterija koje noduliraju leguminoze i raspoređuju ih u 12 rodova. Willems (2006) kasnije navodi kako je otkriveno ukupno 53 vrsta rizobija raspoređenih u sljedeće rodove: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*. Nadalje, Berrada i Fikri-Benbrahim (2014) su nekoliko godina kasnije objavili popis od 98 bakterijskih vrsta rizobija podijeljenih u 14 rodova. Shamseldin i sur. (2017) objavili su popis gdje je ukupno opisano 238 bakterijskih vrsta raspoređenih u 18 rodova.

Rizobije unutar razreda α -proteobakterija

Tablica 1. Klasifikacija rizobija unutar razreda α -proteobakterija (Izvor: Shamseldin i sur., 2017)

Klasifikacija rizobija unutar razreda α -proteobakterija		
Porodice	Rodovi	Broj vrsta
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i> , <i>Ensifer</i> (ranije <i>Sinorhizobium</i>), <i>Allorhizobium</i> , <i>Pararhizobium</i> , <i>Shinella</i> i <i>Neorhizobium</i>	119 (98 + 18 + 1 + 1 + 1)
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Blastobacter</i> , <i>Photorhizobium</i>	38 (36 + 1 + 1)
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i> i <i>Devosia</i>	4 (3 + 1)
<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	2
<i>Phylobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Phylobacterium</i> i <i>Aminobacter</i>	49 (40 + 8 + 1)
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Microvirga</i> i <i>Methylobacterium</i>	7 (4 + 3)

Porodica *Rhizobiaceae* široko je rasprostranjena porodica unutar reda *Rhizobiales*. Sastoji se od šest rodova: *Rhizobium*, *Ensifer* (ranije *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Shinella* i *Neorhizobium*.

U rod *Rhizobium* uključeno je 98 vrsta od kojih je 69 izolirano s korijena različitih leguminoza dok preostalih 29 čine nesimbiozne vrste. Rod *Ensifer* ima 18 vrsta dok rodovi *Allorhizobium*, *Pararhizobium* i *Shinella* imaju po jednu.

Druga porodica *Bradyrhizobiaceae* obuhvaća tri roda: *Bradyrhizobium*, *Blastobacter* i *Photorhizobium*. Rod *Bradyrhizobium* ima 36 vrsta dok ostala dva roda imaju po jednu (Shamseldin i sur., 2017).

Treća porodica *Hyphomicrobiaceae* sastoji se od dva roda. Rod *Azorhizobium* ima tri vrste dok rod *Devosia* ima samo jednu.

U četvrtu porodicu *Brucellaceae* pripada samo jedan rod *Ochrobactrum* koji uključuje dvije vrste.

U petu porodicu *Phylobacteriaceae* uključena su tri roda: *Mesorhizobium*, *Phylobacterium* i *Aminobacter*. Rod *Mesorhizobium* ima 40 vrsta, rod *Phylobacterium* osam vrsta, a rod *Aminobacter* sadrži samo jednu.

Šesta i posljednja porodica *Methylobacteriaceae* sadrži dva roda. Rod *Microvirga* s četiri vrste i rod *Metylobacterium* s tri vrste (Shamseldin i sur., 2017) (tablica 1).

Rizobije unutar razreda β -proteobakterija

Unutar razreda β -proteobakterija nalazi se 18 bakterijskih vrsta raspoređenih u dva roda. Rod *Burkholderia* ima 17 vrsta dok rod *Cupriavidus* sadrži samo jednu (Shamseldin i sur., 2017). Međutim, imenovan je novi rod *Paraburkholderia* u koji su svrstane bakterije sposobne fiksirati dušik kako bi se mogle razlikovati od patogenih vrsta roda *Burkholderia* (Vio i sur., 2020). Brojnim molekularnim ispitivanjima utvrđeno je da su rizobije unutar razreda β -proteobakterija stvarale simbiozne odnose s leguminozama još u davnoj prošlosti. Iako rodovi unutar razreda posjeduju iste simbiozne gene, tokom godina su se razvijali odvojeno (Gyaneshwar i sur., 2011). Isto tako, istraživanja su pokazala da β -proteobakterije sadrže simbiozne gene (*nodABC*, *nodD*, *nifH*) slične onima koje posjeduju α -proteobakterije (Kajić, 2020). Međutim, Shiraishi i sur. (2010) primjetili su da postoji *Pseudomonas* sp. koja je sposobna provoditi nodulaciju na leguminozama. Ta nova vrsta rizobija pridodana je skupini odnosno razredu γ -proteobakterije (Shamseldin i sur., 2017).

2.4. Metode za karakterizaciju i identifikaciju rizobija

Poznate su razne fenotipske i genotipske metode koje su korisne u karakterizaciji i identifikaciji rizobija te bakterija općenito (Mehmood i sur., 2008).

2.4.1. Fenotipske metode

Na početku istraživanja i proučavanja rizobija, karakterizacija fenotipskim metodama bila je osnova za klasificiranje vrsta. Fenotipska identifikacija bakterija smatra se vrlo značajnom metodom koja se sastoji od niza identifikacijskih postupaka (Skendrović, 2018). Zasnovana je na određivanju fenotipskih svojstava odnosno proučavanju morfoloških, biokemijskih i fizioloških karakteristika. Provođenjem morfoloških testova dobiva se uvid o boji, veličini i obliku kolonija te veličini i obliku stanice. Određuje se pokretljivost (prisutnost flagela) i mogućnost tvorbe endospora. Postupkom bojanja po gramu određuje se da li je bakterija gram pozitivna/negativna. Biokemijskim i fiziološkim testovima određuje se rast bakterija u različitim ekološkim uvjetima (temperatura, pH vrijednost, koncentracija soli) (Rajnović, 2017). Danas su fenotipske metode neizostavan postupak u karakterizaciji i identifikaciji bakterija. Ne mogu se koristiti za identifikaciju vrste već samo u početnim koracima identifikacije kako bi se eliminirali izolati koji nemaju određena svojstva, a kasnije se koriste i kod karakterizacije izolata. Stoga se uvijek provode u kombinaciji sa genotipskim metodama koje su pouzdanije za identifikaciju i proučavanje raznolikosti izolata bakterija (Mehmood i sur., 2008).

2.4.2. Genotipske metode

S obzirom na slabu pouzdanost fenotipskih metoda, genotipske metode ključne su u identifikaciji i karakterizaciji izolata bakterija. Baziraju se na analizi nukleinskih kiselina, a njihova primjena sve je šira zahvaljujući neprestanom razvoju molekularne biologije (Rajnović, 2017).

Danas je sekvenciranje 16S rRNA gena osnovna metoda u proučavanju mikrobne filogenije. Analiza tog gena omogućila je filogentsku klasifikaciju bakterija neovisno o njihovim fenotipskim ili simbioznim karakteristikama. Tijekom godina istraživanja, simbiozne karakteristike postale su dominantne u taksonomiji rizobija, a 16S rRNA gen nije bio uključen u opis vrste do 1991. godine. S obzirom na ograničenja u razlikovanju među bliskim vrstama rizobija predloženo je nekoliko konstitutivnih gena („housekeeping“) za identifikaciju vrsta (Rivas i sur., 2009). Konstitutivni geni smješteni su na kromosomu te imaju ključnu ulogu u metabolizmu, izmjeni informacija i drugim brojnim procesima (Kajić, 2020). Znanstvenici su 1994. godine postavili granicu za razlikovanje vrsta. Smatrali su da dva soja pripadaju različitim vrstama ako dijele vrijednosti sličnosti sekvence gena 16S rRNA <97 % i različitom rodu ako je ta vrijednost <95 % (Beye i sur., 2017). Nadalje, primijenjene su nove metode poput MLSA (Multilocus sequence analysis) i MLST (*Multilocus sequence typing*) koje su se temeljile na analizi nekoliko konstitutivnih gena. Te metode bile su korisne u filogenetskim analizama i identifikaciji konkretnih skupina rizobija. Analizirana su i sekvencirana dva gena (*recA* i *atpD*) koja su uspješno korištena za razlikovanje vrsta rizobija za koje su 16S rRNA geni bili gotovo identični (Rivas i sur., 2009). Sekvenciranjem 16S rRNA gena Berrada i sur. (2012) otkrili su postojanje genetske varijabilnosti ukazujući time na prisutnost velike bioraznolikosti među različitim izolatima rizobija.

Osim konstitutivnih gena, u identifikaciju rizobija uključeni su i tzv. „pomoćni“ ili „dodatni“ geni. To je skupina gena koji se uglavnom nalaze na plazmidima ili genskim otocima na kromosomu (Zehara, 2021). Najproučavaniji simbiozni geni rizobija (*nodC*, *nodA* i *nifH*) općenito su kodirani na plazmidima. Simbiozni geni imaju sposobnost premještanja u prirodi s plazmida na genske otoke (Nakatsukasa i sur., 2008), s bakterija na druge bakterije (Rogel i sur., 2001). Iz tog razloga upotreba simbioznih gena u identifikaciji rizobija nije pouzdana, ali su korisni za identifikaciju ne-*Rhizobium* vrsta koje su sposobne provoditi nodulaciju mahunarki (Rivas i sur., 2009).

RAPD-PCR (engl. *random amplified polymorphic DNA*) je metoda nasumične amplifikacije poliformne DNA uz upotrebu nasumično odabranih početnica (Maqbool i sur., 2017). Ova metoda smatrana je prikladnom metodom za razlikovanje sojeva unutar vrste ili za početna grupiranja radi svoje brzine i praktičnosti (Naz i sur., 2009). Prema istraživanjima Koskey i sur. (2018) ova metoda pokazala se vrlo značajnom u određivanju raznolikosti

različitih sojeva unutar vrste roda *Rhizobium*. RAPD metodu prvi put su koristili Harrison i sur. (1992) za karakterizaciju sojeva *R. leguminosarum*. Niemann i sur. (1997) također su koristili ovu metodu za razlikovanje među izolatima *S. meliloti*.

Rep-PCR (engl. *repetitive sequence-based*) je metoda koja se sve više koristi za procjenu genetske varijacije mikroorganizama (Hameed i sur., 2016). Temelji se na umnažanju ponavljajućih početnica raspršenih u genomu smještenih na različitim intergenskim pozicijama (Menna i sur., 2009). U ispitivanjima se najčešće koriste sljedeće ponavljajuće početnice: REP (engl. *repetitive extragenic palindromic sequence*), ERIC (engl. *enterobacterial repetitive intergenic consensus*) i BOX element (PawelTrzcinski i sur., 2011).

AFLP (engl. *amplified fragment length polymorphism*) metoda najčešće se koristi za procjenu genetske raznolikosti unutar vrsta ili među blisko srodnim vrstama (Portier i sur., 2006). U AFLP metodi se koriste restrikcijski enzimi za digestiju genomske DNA, nakon čega slijedi ligacija adaptora na krajeve restrikcijskih fragmenata. Zatim se odabiru restrikcijski fragmenti koji će se amplificirati (Sharma i sur., 1996). Osim na bakterijama, ova metoda se primjenjuje u istraživanjima na biljkama u svrhu stvaranja tzv. genetskih karata genoma ili njegovih fragmenata te za analizu ekspresije gena (Marczewski, 1997). PCR-RFLP 16S rRNA gena metoda najčešće se koristi za razlikovanje rizobija na razini vrste ili viših taksonomskih jedinica. Također ima vrlo značajnu ulogu u proučavanju filogenetskih odnosa, no nije pouzdana u razlikovanju srodnih sojeva (Rajnović, 2017).

DNA-DNA hibridizacija (DDH) je metoda koja se koristi za analizu genomske sličnosti dvaju organizama u svrhu identifikacije (Rossello-Mora i sur., 2011). DDH metoda započinje analizom genomske DNA ispitivanog uzorka i referentnog soja. Potom slijedi miješanje oba soja i njihovo zagrijavanje s ciljem denaturacije DNA. Na posljetku slijedi hlađenje do one temperature na kojoj će doći do ponovnog spajanja fragmenata DNA (Kajić, 2020). U taksonomiji bakterija koriste se vrijednosti DDH od 1960-ih u svrhu utvrđivanja povezanosti sojeva, a ujedno je i smatrana najvažnijim kriterijem za identifikaciju bakterijskih vrsta (Rossello-Mora i sur., 2011).

3. Materijali i metode

3.1. Bakterijski izolati

U ovom radu korišteni su bakterijski sojevi izolirani u sklopu istraživanja na PRIMA projektu „Legumes in biodiversity-based farming systems in Mediterranean basin (LEGU-MED)“. Uzorci tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljeni su sa površina obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava na području Dalmacije i južne Hercegovine koja se bave uzgojem slanutka. U cilju izolacije rizobija sa prikupljenim uzorcima tla postavljen je vegetacijski pokus u plasteniku Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u kojem je sjeme slanutka posijano u prikupljeno tlo. U fazi pune cvatnje, prikupljene su kvržice sa korijena slanutka iz kojih su izolirani bakterijski sojevi. U cilju karakterizacije, u ovom radu korišteno je ukupno 33 bakterijska izolata.

3.2. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena

U cilju početne identifikacije bakterijskih sojeva izoliranih iz kvržica slanutka, u prethodnim istraživanjima provedena je amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA gena (Kajić, 2020). Navedena metoda provedena je u sklopu rada na PRIMA projektu „Legumes in biodiversity-based farming systems in Mediterranean basin (LEGU-MED)“ u Zavodu za mikrobiologiju.

3.3. Amplifikacija i sekvenciranje *nifH* gena

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 2.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge YMB (Yeast Mannitol Broth).

Sastav	Količina	Proizvođač
K ₂ HPO ₄	0.5 g	VWR Chemicals
MgSO ₄	0.2 g	VWR Chemicals
NaCl	0.1 g	VWR Chemicals
Manitol	10.0 g	VWR Chemicals
Kvasni ekstrakt	0.4 g	BioLife
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.

U svrhu amplifikacije i sekvenciranja *nifH* gena korištene su nif-F i nif-R početnice čije su karakteristike opisane u tablici 3. Koncentracije početnica iznosile su 0.125 µmol l⁻¹.

Tablica 3. Karakteristike početnica korištenih za amplifikaciju i sekvenciranje *nifH* gena

Gen	Oznaka početnice	Sekvenca	Referenca
<i>nifH</i>	nif-F	5' - TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA - 3'	Yao i sur., 2014
	nif-R	5' - AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA - 3'	

Amplifikacija *nifH* gena provedena je u PCR termobloku (ProFlex™ 3x32-Well PCR System, Applied Biosystems). U tablici 4. prikazani su uvjeti amplifikacije.

Tablica 4. Uvjeti amplifikacije za analizu *nifH* gena

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

Nakon amplifikacije dobiveni produkti su razdvojeni horizontalnom gel elektorforezom na 1 % agaroznom gelu (Axygen, 300V General Purpose Power Supply-115V, Corning, SAD). Na gel je nanoseno 5 µl PCR produkta i 5 µl markera od 1 kb (Thermo Fisher Scientific, SAD) za određivanje veličine amplificiranih fragmenata. Elektroforeza je provedena na 100 V, 400 mA u vremenu od 45 minuta. Nakon toga gel se bojavao 30 minuta s etidij-bromidom. Obojani produkti zatim su vizualizirani na UV transiluminatoru (Uvidoc HD6, Uvitec Cambridge, Engleska). Dobiveni fragmenti poslani su dalje na sekvenciranje u Macrogen servis (Amsterdam).

3.1.1. Filogenetska analiza

Sekvence dobivene sekvenciranjem ručno su poravnate i pročišćene koristeći Staden software (Staden i sur., 2003). Zatim su uspoređene s genima koji se nalaze u GenBank upotrebom programa BLASTA (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*).

Udaljenost prema modelu (Nei i Kumar, 2000) izračunata je pomoću p-distance metode u svrhu izrade filogenetskog stabla metodom pridruživanja susjednih parova (engl. *neighbour joining method*) (Saitou i Nei, 1987). Uporabom MEGA X softwera konstruirano je filogenetsko stablo najveće sličnosti (Maximum Likelihood Tree) (Kumar i sur., 2018) dok je grananje filogenetskog stabla dobiveno „*bootstrap*“ analizom uz permutaciju 1000 podataka (Felsenstein, 1985).

3.2. Fenotipska karakterizacija

Od početnih 33 izolata, za fenotipsku karakterizaciju odabrano je 10 reprezentativnih izolata koji su na osnovu analize 16S rRNA gena svrstani u skupinu rizobija.

3.2.1. *In vitro* ispitivanje tolerantnosti na sušu

U svrhu utvrđivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na sušu bilo je potrebno provesti *in vitro* testiranje. Upotrebom polietilen glikola (PEG 6000) stimulirane su dvije razine suše. U YMB hranjivu podlogu (tablica 5) dodane su različite koncentracije PEG-a; 15 % i 30 %.

Tablica 5. Sastav YMB hranjive podloge s dodatkom PEG 6000

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

Hranjive podloge najprije su sterilizirane u autoklavu na 121°C, 15 min. Potom su sojevi naciepljeni u 5 ml sterline hranjive podloge bez dodatka PEG-a te inkubirani na 24 sata pri 28°C. Tako pripremljena podloga služila je kao kontrola. Zatim je uzimano po 100 µl prekonocne kulture svakog soja i preneseno u 20 ml YMB hranjive podloge s 15 % i 30 % PEG-a.

Naciepljeni izolati zatim su inkubirani u termostatu s mješalicom (Orbital Shaker Biosan ES-20, Latvija) na 7 dana pri 28°C. Nakon inkubacije očitani su rast odnosno apsorbancija pomoću spektrofotometra (Spectrometer Lambda EZ 210) na valnoj duljini 600 nm. Na kraju je izvršena selekcija sojeva izdvajanjem onih koji su pokazali najveću *in vitro* tolerantnost na sušu. Ti sojevi bili su uključeni u daljnja istraživanja u okviru PRIMA projekta LEGU-MED.

3.2.2. Ekološka karakterizacija

Ispitan je rast odabranih izolata na različitim temperaturama, pH vrijednostima i koncentracijama NaCl.

Rast na različitim temperaturama. Za ispitivanje rasta istraživanih sojeva na različitim temperaturama korištena je YMA hranjiva podloga. Prije nanošenja uzoraka, podloga je prethodno sterilizirana 15 minuta na 121°C pri 1ATM, a konačni pH podloge iznosio je 6.8.

Potom su odabrani sojevi nacijepljeni na tako pripremljenu podlogu i inkubirani na različitim temperaturama (4°C, 37°C i 45°C). Nakon 7 dana očitani su rezultati te su zabilježeni na sljedeći način: prisustvo bakterija (+), odsustvo bakterija (-), slabi rast bakterija (+/-).

Rast na različitim pH vrijednostima. Ispitivana je sposobnost rasta sojeva na tri različite pH vrijednosti; 5, 6 i 9. Ispitivanje je provedeno na standardnoj YMA podlozi na kojoj je prethodno dodan natrijev hidroksid (1M NaOH) za postizanje alkalne reakcije te klorovodična kiselina (1M HCl) za postizanje kisele reakcije. Sojevi su potom nacijepljeni na pripremljene sterilne podloge te inkubirani 7 dana na 28°C.

Rast na različitim koncentracijama NaCl. U standardnoj YMA podlozi optimalna koncentracija NaCl iznosi 0.01 %. Kako bi se ispitao rast kvržičnih bakterija u uvjetima veće koncentracije soli, u standardnu YMA podlogu dodavane su sljedeće koncentracije NaCl:

- 1 %
- 2 %
- 3 %

Tako pripremljene podloge su zatim inkubirane na sedam dana pri temperaturi od 28°C. Na poslijetku su očitani rezultati te prikazani u vidu prisustva (+), odsustva (-) te rasta bakterija (+/-).

4. Rezultati istraživanja i rasprava

4.1. Analiza 16S rRNA gena

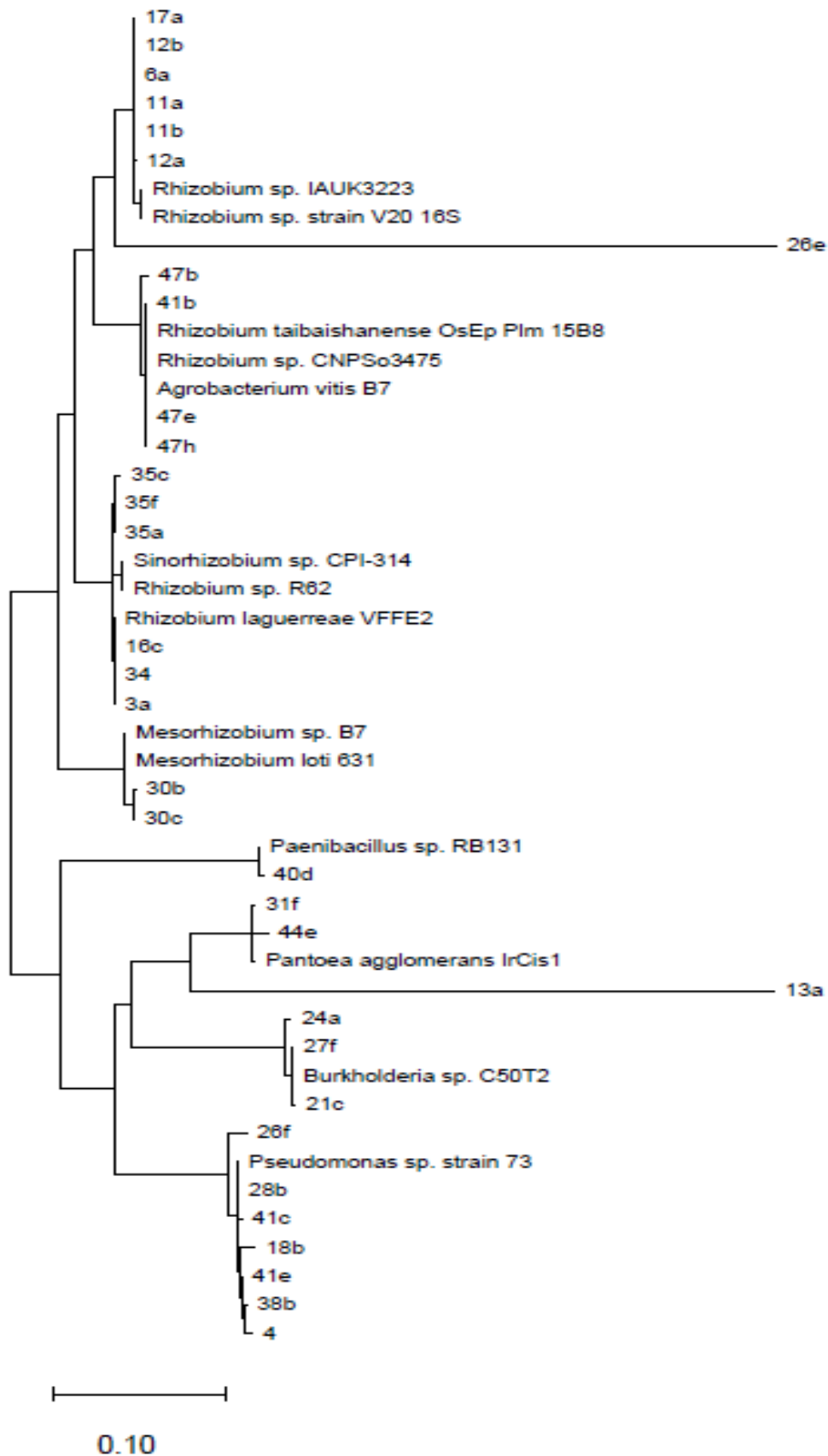
Od kada su Woese i sur. (1984) predložili da se 16S rRNA koristi kao univerzalan marker za identifikaciju bakterija, ovaj gen je prihvaćen i kao osnova za rizobije iz reda *Rhizobiales*. Kod 33 izolirana soja amplificiran je i sekvenciran 16S rRNA gen s ciljem utvrđivanja vrste svakog pojedinog izolata. 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 33 izolata sa sekvencama iz GenBank-a dobiveni su rezultati koji pokazuju da 46 % izolata pripada brzorastućem rodu *Rhizobium*, 21 % rodu *Pseudomonas*, dok preostalih 33 % otpada na rodove *Mesorhizobium*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* i rod *Agrobacterium* (slika 3). Kod većine izolata nije se mogla utvrditi točna vrsta već samo rod, što je i bilo za očekivati budući da je varijacija u sekvenci gena 16S rRNA nepouzdana za razlikovanje bliskih vrsta. Brojna istraživanja koja su u posljednje vrijeme provedena sekvenciranjem 16S rRNA gena 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 gena često nepouzdana da bi se razlikovale bliske vrste (Ramirez-Bahena i sur., 2008).

Istraživanje koje je provedeno u Iranu (Rouhrazi i Khodakaramian, 2015) pokazuje da je sekvenciranjem 16S rRNA gena utvrđeno da je slanutak uglavnom bio noduliran sa vrstama *Mesorhizobium ciceri* i *Mesorhizobium mediterraneum*. Tena i sur. (2017) proveli su istraživanje u Etiopiji gdje je analizom 16S rRNA gena utvrđeno da su svi analizirani sojevi pokazali pripadnost rodu *Mesorhizobium*. Istraživanjem u Kini Zhang i sur. (2018) su analizom 16S rRNA gena također utvrdili da slanutak najčešće nodulira rod *Mesorhizobium*. Benjelloun i sur. (2019) u Maroku su analizom 16S rRNA gena utvrdili da je u njihovim tlima dominantan rod *Mesorhizobium*. Također su identificirani i rodovi *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Pantoea* koji su identificirani i u ovom istraživanju. Važno je istaknuti da se u kvržicama slanutka, kao i u kvržicama ostalih mahunarki, nalaze uz različite rizobije i predstavnici drugih bakterijskih rodova i vrsta. Proučavanje mikrobioma kvržica je promijenilo dosadašnje spoznaje o raznolikosti bakterijskih populacija u kvržicama (Martinez-Hidalgo i Hirsch, 2017). Osim toga, postavlja se pitanje uloge pojedinih bakterijskih vrsta koje su prisutne u kvržicama. Pretpostavlja se da većina prisutnih članova mikrobioma kvržica ima PGP svojstva. Rezultati nekih istraživanja (Mir i

sur., 2021) ukazuju da bakterije koje se nalaze u kvržicama mogu pozitivno utjecati na nodulaciju, razvoj i prinos slanutka.

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je u istraživanim tlima prisutna velika raznolikost sojeva s obzirom na broj različito identificiranih rodova u kvržicama slanutka. Identifikaciju izolata svakako treba nastaviti i nadopuniti sa drugim metodama kako bi se dobili što pouzdaniji rezultati. Osim toga, potrebno je provesti nodulacijske testove te istražiti svojstva ne-rizobija koji su također izolirani iz kvržica slanutka.

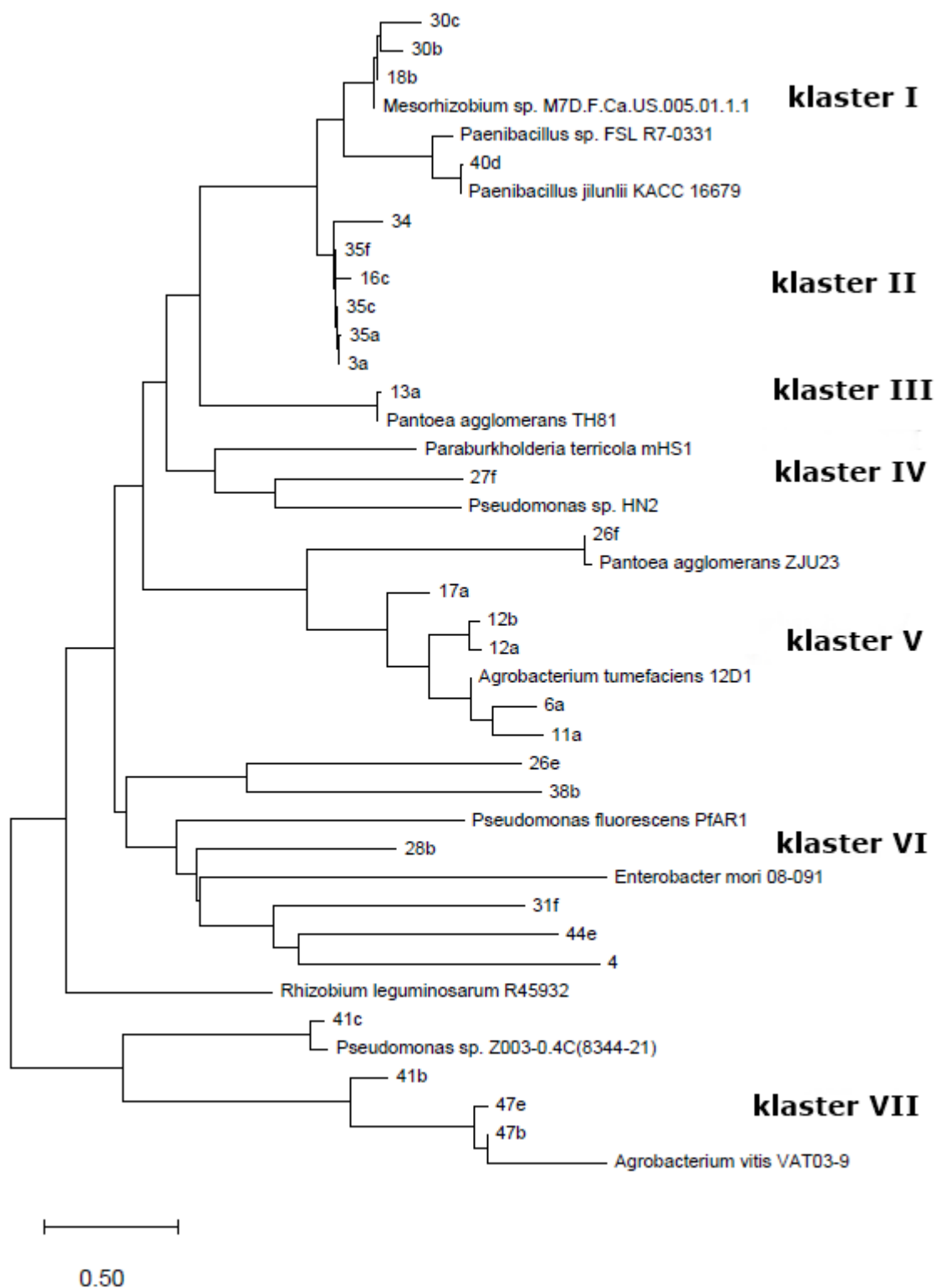


Slika 3. Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu sekvenci 16S rRNA gena. Evolucijske udaljenosti su izračunate koristeći Kimura 2- parametarsku metodu.

4.2. Analiza *nifH* gena

NifH gen smatra se najvažnijim biomarkerom koji se koristi za proučavanje ekologije i evolucije simboznih fiksatora dušika (Gaby i Buckley, 2014). Rezultati analize *nifH* gena pokazuju da su izolati grupirani u sedam klastera. Najveći broj izolata pripada klasteru II i VI unutar kojeg su grupirani sojevi koji su analizom 16S rRNA gena većinom pokazali pripadnost rodu *Rhizobium*, a i analizom *nifH* gena grupirani su zasebno. Unutar klastera V grupirano je pet izolata (17a, 12a, 12b, 6a i 11a) koji su analizom 16S rRNA gena uglavnom pokazali pripadnost rodu *Pseudomonas* i *Pantoea*, dok ih je analiza *nifH* gena grupirala u skupinu roda *Pseudomonas*. Klasteru I pripada 4 izolata (30b, 30c, 18b, 40d) koji su grupirani unutar roda *Mesorhizobium* kao i roda *Paenibacillus*. Metodom utvrđivanja vrste tj. analizom 16S rRNA gena navedeni izolati pokazali su pripadnost navednim rodovima. Klasteru VII pripada četiri izolata (41b, 41c, 47b, 47e) koji su grupirani unutar roda *Pseudomonas* i *Agrobacterium*, dok je najmanji broj izolata grupiran unutar klastera III i IV. U njima se nalazi po jedan izolat. Unutar klastera III grupiran je izolat 13a unutar roda *Pantoea* točnije vrste *Pantoea agglomerans*, dok se unutar klastera IV nalazi izolat 27f koji je grupiran unutar roda *Pseudomonas*. Za pet izolata (47h, 41e, 21c, 24a, 11b) nije pronađena *nifH* sekvenca u GenBank zbog čega su isključeni iz *nifH* filogenije (slika 4).

Benjelloun i sur. (2019) su analizom *nifH* gena utvrdili da je u tlima na području Maroka dominantan rod *Mesorhizobium* te je utvrđeno da je 99 % ispitivanih izolata imalo sličnosti s vrstom *M. ciceri*. Istraživanje u Etiopiji koje su proveli Gunnabo i sur. (2020) analizom simbioznog *nifH* gena nije utvrđena velika raznolikost ispitivanih izolata koji noduliraju slanetak. Svi izolati grupirani su unutar roda *Mesorhizobium*. Time se potvrđuje ranija tvrdnja da je slanetak vrlo restriktivan domaćin i da ga mogu nodulirati samo vrste unutar roda *Mesorhizobium*. To se uglavnom temeljilo na studijama unakrsne inokulacije, no napretkom molekularnih analiza došlo se do zaključka da slanetak mogu nodulirati i drugi rodovi, što ukazuje na vrlo veliku raznolikost mikrobioma kvržica. To potvrđuje i ovo istraživanje gdje je analizom *nifH* gena utvrđena velika raznolikost izoliranih sojeva. Ovo se najviše može pripisati činjenici da su simbiozni geni skloni horizontalnom prijenosu gena (Gunnabo i sur., 2021).



Slika 4. Filogenetsko stablo najveće sličnosti na osnovu analize sekvenci *nifH* gena. Evolucijske udaljenosti izračunate su prema modelu Tamura-Neiu modelu.

4.3. Fenotipska karakterizacija izolata

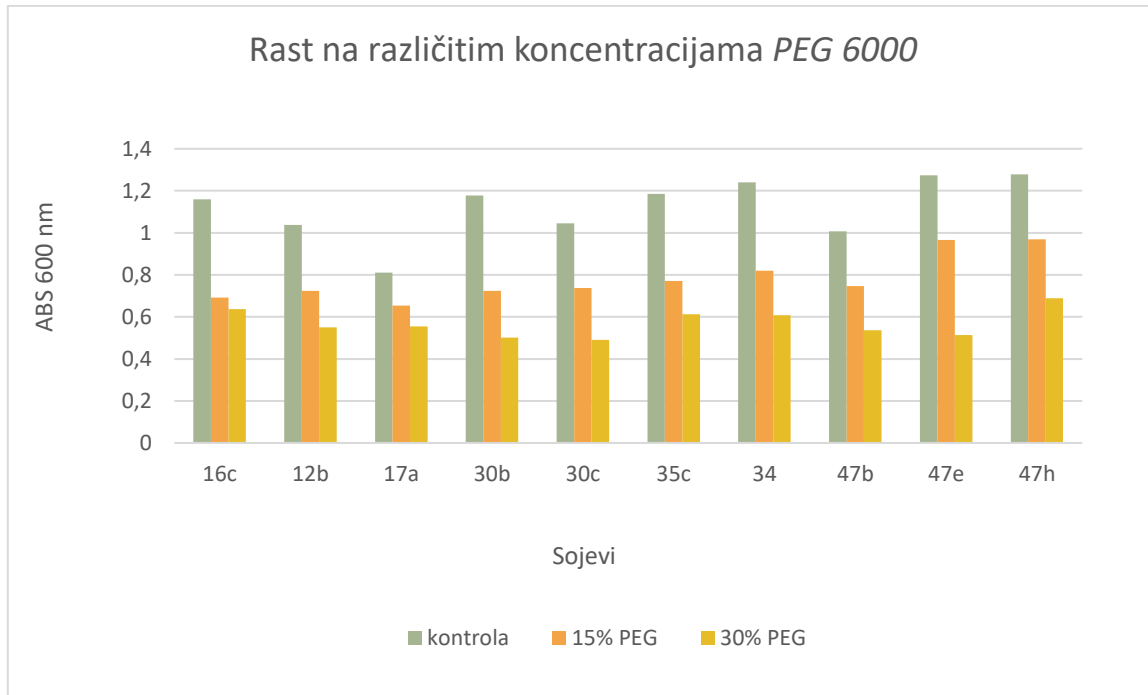
4.3.1. *In vitro* ispitivanje tolerantnosti na sušu

U svrhu utvrđivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na *in vitro* sušu izvršeno je testiranje s polietilen glikolom (PEG 6000) koji je dodan u YMB hranjivu podlogu u dvije različite koncentracije; 15 % i 30 %. Podloga koja nije sadržavala polietilen glikol upotrijebljena je kao kontrola. Prema dobivenim rezultatima može se uočiti da je najveći rast sojeva na YMB hranjivoj podlozi bez polietilen glikola, što je bilo i očekivano. Najveću zabilježenu apsorbanciju imao je soj 47h koja je iznosila 1.278, a najmanju soj 17a koja je iznosila 0.811. Izmjerene apsorbancije ostalih izolata kretale su se u rasponu od 1.007 do 1.273. Sojevi koji su rasli na YMB hranjivoj podlozi s dodatkom polietilen glikola u koncentraciji od 15 % ukazali su na smanjenje apsorbancije u odnosu na kontrolne uzorke. Razlog tome je što je dodatkom PEG-a došlo do povećanja vodnog deficita jer je polietilen glikol na sebe vezao vodu. Najveću apsorbanciju imao je soj 47h i iznosila je 0.969 dok je soj 17a prikazan s najmanjom apsorbancijom od 0.654. Apsorbancije ostalih izolata izmjerene su u rasponu od 0.692 do 0.966. U YMB hranjivim podlogama u koje je dodan PEG u koncentraciji od 30 % zabilježena je najveća redukcija rasta bakterija. Radi veće koncentracije, količina vode u hranjivoj podlozi je značajno reducirala vezanjem na polietilen glikol što je na poslijetku rezultiralo smanjenjem apsorbancije. Najveća apsorbancija iznosila je 0.689 kod soja 47h, dok je najmanja apsorbancija od 0.49 zabilježena kod soja 30c. Prosječne izmjerene apsorbancije ostalih izolata kretale su se od 0.502 do 0.637. Iz dobiveni rezultata može se uočiti da što je prosječna izmjerena apsorbancija pri 15 % i 30 % koncentraciji polietilen glikola bila veća time je ispitivani bakterijski izolat bio tolerantniji na *in vitro* sušu (slika 5).

Među ispitivanim izolatima slanutka utvrđena je različita tolerantost na sušu. Rezultati su pokazali da je soj 47h s vrijednosti apsorbancije 0.689 najotporniji u uvjetima jake suše (PEG 30%) kao i u uvjetima umjerene suše (PEG 15 %) s vrijednosti apsorbancije 0.969. Soj 47e također je pokazao znatnu otpornost u uvjetima umjerene suše (15 %) s malom razlikom u vrijednosti apsorbancije (0.966) od soja 47h.

Suša ima veliki utjecaj na rast rizobija i simbioznu fiksaciju dušika. Smanjenje fiksacije dušika tijekom nedostatka vode usko je povezana s ograničenom opskrbom kvržica vodom i kisikom. U uvjetima suše dolazi do smanjene infekcije korijenovih dlačica i formiranja infekcije niti što dovodi do redukcije broja kvržica. Jačina stresa suše uvelike ovisi o fazi rasta i razvoja biljke. Uslijed blage jačine stresa dolazi samo do redukcije broja kvržica, dok se kod pojačanog stresa smanjuje i veličina samih kvržica. Općenito, suša najveće štete donosi u razdoblju vegetacije biljke. Slanutak je u tom razdoblju najosjetljiviji za nedostatak vode u tlu (Foyer i Zhang, 2011). Tijekom nedostatka vode u tlu dolazi do nakupljanja soli kao i nekih toksičnih spojeva koji onda uzrokuju solni i osmotski stres što

na poslijetku dovodi do oštećenja nukleinskih kiselina (DNA i RNA) (Ngumbi i Kloepper, 2016).



Slika 5. Rezultati *in vitro* ispitivanja tolerantnosti bakterijskih izolata na sušu

4.3.2. Ekološka karakterizacija izolata

Kako bi se dobio što jasniji pregled ekoloških karakteristika bakterijskih izolata provedeno je ispitivanje njihova rasta na različitim temperaturama, pH vrijednostima i koncentraciji NaCl.

Odabrani bakterijski izolati nisu pokazali znatne razlike u rastu na različitim temperaturama (4°C, 37°C i 45°C). Rast pri 4°C mogao se uočiti kod devet od ukupno deset izolata. Za soj 34 zabilježen je slabi rast pri istoj temperaturi. Pri temperaturi od 37°C svi sojevi su narasli. Više od pola ispitanih izolata nije pokazalo sposobnost rasta pri 45°C. Izolati kod kojih je uočen rast na toj temperaturi bili su sojevi 35c, 17a, 30c i 47b. Pregled rezultata ispitivanja rasta na različitim temperaturama prikazan je u tablici 6.

S obzirom da su rizobije mezofilni organizmi optimalna temperatura za rast i razmnožavanje kreće se u rasponu od 28-30°C. Međutim, u tlu se nalaze neki sojevi koji toleriraju znatno više ili niže temperature od optimalne, a dobiveni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na njihovu varijabilnost. Istraživanje koje su proveli Jida i Assefa (2012) na području Etiopije pokazalo je da rizobije koje noduliraju slanutak imaju maksimalan rast u temperaturnom rasponu između 20 i 30°C. Nijedan od ispitivanih izolata nije bio tolerantan i nije mogao rasti na 4°C dok je na 40°C uspjelo narasti čak 17 % ispitivanih

izolata. Općenito, temperaturni uvjeti imaju velik utjecaj na rast rizobija i njihovu simbioznu učinkovitost. Klimatske promjene poput zatopljenja uvelike utječu na gotovo sve faze simbiozog odnosa mahunarki i rizobija. Osim na preživljavanje rizobija u tlu, visoke temperature utječu na razmjenu signalnih molekula između dva simbiozna partnera. Uz to dolazi do inhibicije prijanjanja bakterija na korijenove dlačice te stvaranja infekcijske niti. U istraživanju koje su proveli Benjelloun i sur. (2019) primijećena je termotolerantnost rizobija koje noduliraju slanutak. Od svih ispitivanih izolata, 68 % je pokazalo rast na 36°C, 21 % na 40°C dok niti jedan izolat nije narastao na 44°C. Na najnižoj ispitivanoj temperaturi od 4°C naraslo je 20 % od ispitivanih izolata. Termotolerantnost rizobija koje noduliraju slanutak također je potvrđena istraživanjem Demissie i sur., (2018) gdje je 40 % od ispitivanih izolata pokazalo rast na 40°C.

Tablica 6. Rezultati ispitivanja rasta sojeva na različitim temperaturama, pH i koncentraciji NaCl

Soj	Temperatura			pH			NaCl		
	4°C	37°C	45°C	5	6	9	1 %	2 %	3 %
12b	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
30b	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+
35c	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
47e	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-
17a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30c	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
47h	+	+	-	+	+	+	+	+	+/-
47b	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16c	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
34	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-

Optimalan pH rasta rizobija iznosi 6.8. Kako bi se utvrdilo rastu li pri različitim pH vrijednostima, ispitivan je njihov rast na tri različite pH vrijednosti (5, 6 i 9). Dobiveni rezultati ovog ispitivanja prikazani su u tablici 6. Podaci u tablici pokazuju da su skoro svi ispitani izolati rasli na pH 5, 6 i 9. Samo je kod dva izolata uočen slabi rast bakterija pri pH 9, a to su bili sojevi 30b i 30c.

Reakcija sredine (pH) je jedan od ograničavajućih čimbenika rasta brojnih mikroorganizama koji žive u tlu te ujedno i procesa simbiozne fiksacije dušika. Prema tome rizobije koje imaju širok raspon pH tolerantnosti u prednosti su kod preživljavanja u odnosu na one koji imaju uski raspon. Kisela tla karakterizira slaba opskrbljenost mikro i makro elemenata (P, Ca, Mo) te toksično djelovanje Al i Mn što ima loš učinak kako na biljku tako i na bakterije-rizobije odnosno na uspostavu simbioznog odnosa. U simbioznom odnosu općenito su rizobije pH osjetljivije (Hungria i Vargas, 2000). U uvjetima niskog pH tla reducirano je otpuštanje flavonoida koji imaju direktan utjecaj na aktivaciju Nod faktora čime dolazi do inhibicije inficiranja korijenovih dlačica i stvaranja kvržica u kojima se odvija

fiksacija dušika (Karmakar i sur., 2015). U alkalnim tlima nalaze se velike količine NaCl-a te bikarbonati i borati koji nepovoljno utječu na simbioznu fiksaciju dušika. Međutim, utjecaj visokog pH na simbioznu fiksaciju dušika manje je proučavan od utjecaja niskog pH (Hungria i Vargas, 2000). Demissie i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojemu su dokazali da rizobije koje noduliraju slanutak imaju vrlo dobru sposobnost rasta u umjereno kiselom (5,5) do neutralnog pH te blago alkalnom (8). Brojna druga istraživanja (Nour, 1994; Maatalah i sur., 2002; Kucuk i Kivanc, 2008; Jida i Assefa, 2012) provedena na rizobijama koje noduliraju slanutak također su ukazala na jednaku sposobnost rasta rizobija.

Što se tiče sposobnosti rasta rizobija na različitim koncentracijama NaCl, ispitivan je rast na tri različite koncentracije (1 %, 2 % i 3 %). Rast izolata na koncentracijama 1 % i 2 % pokazao je jednake rezultate. Kod obje koncentracije, tri soja nisu pokazala sposobnost rasta odnosno uočen je slabi rast bakterija. Pri koncentraciji od 3 %, pola od ispitivanih izolata pokazalo je sposobnost rasta, dok je kod ostalih uočen slabi rast (tablica 6).

Stres od soli u toplijim područjima može imati štetan utjecaj na nastale kvržice u vidu smanjenja fiksacije dušika i aktivnosti nitrogenaze. Iako postoje sojevi koji imaju veću tolerantnost na povećani salinitet, postoji mogućnost da neće doći do uspostave simbioznog odnosa. Općenito je smatrano da su spororastuće vrste rizobija otpornije na salinitet od brzorastućih bakterija. Stres soli smatra se limitirajućim faktorom za simbioznu fiksaciju dušika. U tlu povećanog saliniteta smanjena je redukcija atmosferskog dušika, a usporedno se smanjuje i respiracija nastalih kvržica uslijed redukcije staničnih proteina (leghemoglobin). Pri tom dolazi do stvaranja nefunkcionalnih kvržica, nepravilne građe. Poremećaj u strukturi kvržica dovodi do inhibicije enzima nitrogenaze. Do toga dolazi radi smanjenja permeabilnosti samih kvržica, jer se kisik akumulira i zadržava u inficiranim zonama korijena (L'taief i sur., 2007). U istraživanju Jida i Assefa (2012) većina (75 %) ispitivanih rizobija koje noduliraju slanutak naraslo je na 1 % koncentracije NaCl dok se na većim koncentracijama postotak naraslih izolata smanjivao. Na 5 % koncentracije NaCl naraslo je samo 11,5 % ispitivanih izolata. Slične rezultate imali su Demissie i sur. (2018) u svojem istraživanju gdje svi ispitivani izolati mogli su rasti na podlozi koja je sadržavala 0,5 % NaCl. Povećanjem koncentracije soli na podlozi smanjivao se i broj naraslih izolata. Oko 76 % od ispitivanih izolata naraslo je pri koncentraciji od 1 %, dok je svega par izolata naraslo na 4 % te je samo jedan narastao na koncentraciji soli od 5 %.

5. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Analizom sekvenci 16S rRNA gena utvrđeno je da 46 % izolata pripada brzorastućem rodu *Rhizobium*, 21 % rodu *Pseudomonas*, dok preostalih 33 % otpada na rodove *Mesorhizobium*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* i rod *Agrobacterium*. Kod većine izolata nije se mogla utvrditi točna vrsta već samo rod budući da je varijacija u sekvenci gena 16S rRNA nepouzdana za razlikovanje bliskih vrsta.
- Rezultati analize *nifH* gena pokazuju da su ispitivani izolati grupirani u sedam klastera što ukazuje na raznolikost između vrsta. Većina izolata grupirana je zasebno i nije utvrđena vrsta ili rod kojoj pripadaju. Preostali izolati grupirani su u sljedeće rodove: *Pseudomonas*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* i *Paenibacillus* dok je za jedan izolat utvrđena pripadnost vrsti *Pantoea agglomerans*. Za pet izolata nije pronađena *nifH* sekvenca te su isključeni iz filogenije.
- Fenotipskom karakterizacijom nije utvrđena znatna varijabilnost između bakterijskih izolata osim u slučaju tolerantosti na uvjete jake i umjerene suše. Međutim, uočena je značajna otpornost na različite nepovoljne čimbenike poput povišene temperature i koncentracije NaCl-a, niske pH vrijednosti te *in vitro* tolerantnosti na sušu. Posebno se ističe otpornost na niski pH što je od izuzetne važnosti budući da Hrvatska ima jako puno kiselih tala.
- Sekvenciranje 16S rRNA gena predstavlja osnovu identifikacije na razini vrste, ali ne daje konačan rezultat dok se metodom sekvenciranja *nifH* gena definira razlika između pojedinih izolata. Metode provedene u ovom radu samo su dio početnog istraživanja bioraznolikosti prirodnih populacija rizobija na slanutku stoga je izuzetno važno dobivene izolate uključiti u daljnji program karakterizacije i selekcije.

6. Popis Literature

1. Agroklub (2022). <https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/slanutak-197/> – pristup 9.7.2022.
2. Ahmad F., Gaur P. M., Croser J. (2005). Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement-grain legumes. 1: 187-217.
3. Beijerinck MW. (1888). Die Bacterien der Papilionaceenknölchen. Botanische Zeitung. 46: 797-804.
4. Benjelloun I., Thami Alami I., Douira A., Udupa S. M. (2019). Phenotypic and genotypic diversity among symbiotic and non-symbiotic bacteria present in chickpea nodules in Morocco. Frontiers in Microbiology. 10: 1885.
5. 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.
6. Berrada H, Fikri-Benbrahim K (2014). Taxonomy of the Rhizobia: current perspectives. Brit Microbiol Res J. 4: 616–639.
7. Berrada H., Nouioui I., Iraqui Houssaini M., El Ghachtouli N., Gtari M., Fikri Benbrahim K. (2012). Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. African Journal of Microbiology Research. 6(25): 5314-5324.
8. 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.
9. 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.
10. 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(3): 125.
11. Croser J. S., Clarke H. J., Siddique K. H. M., Khan T. N. (2003). Low-temperature stress: implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. Critical Reviews in Plant Sciences. 22(2): 185-219.
12. Čoga L., Slunjski S. (2018). Dijagnostika tla u ishrani bilja: priručnik za uzorkovanje i analitiku tla. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb. [online] <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:925835> – pristup 15.8.2022.
13. Demissie N., Degefu T., Ergena A., Ojiewo C. (2018). Phenotypic characteristics of rhizobial and non-rhizobial isolates recovered from root nodules of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in Ethiopia. Afri. J. Microbiol. Res. 12: 73–85
14. Ereso T. A. D. E. L. E. (2017). Symbiotic effectiveness of rhizobia from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and phenotypic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating

- faba bean (*Vicia faba* L.) from Southern Ethiopia. Research Journal of Microbiology. 7: 280-296.
15. 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.
 16. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
 17. Flowers T. J., Gaur P. M., Gowda C. L. L., Krishnamurthy L., Samineni S., Siddique K. H. M., Turner N. C., Vadez V., Varshney R. K., Colmer T. D. (2010). "Salt sensitivity in chickpea," *Plant, Cell and Environment*. 33 (4): 490-509.
 18. Foyer C., Zhang H. (2011). Annual plant reviews, nitrogen metabolism in plants in the post-genomic era. John Wiley and Sons.
 19. Frank B. (1889). Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 7: 332-346.
 20. Gaby J.C., Buckley D.H. (2014). A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. Database.
 21. Godinić D. (2020). Bioraznolikost i značaj kvržičnih bakterija koje noduliraju slanutak, leću i lupinu (Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet). [online] <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:972406> – pristup 1.7.2022.
 22. Grasso N., Lynch N. L., Arendt E. K., O'Mahony J. A. (2022). Chickpea protein ingredients: A review of composition, functionality, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 21(1): 435-452.
 23. GRDC – Grains research and development corporation (2017a). Plant growth and physiology. U: Chickpeas Western region. 145-164.
 24. GRDC – Grains research and development corporation (2017b). Planting. U: Chickpeas Western region. 102-144.
 25. Gunnabo A.H., van Heerwaarden J., Geurts R. (2020). Symbiotic interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes and *Mesorhizobium* strains. *Symbiosis*. 82: 235–248. [online] <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00724-6> – pristup 12.9.2022.
 26. Gunnabo A.H., van Heerwaarden J., Geurts R., Wolde-Meskel E., Degefu T., Giller K.E. (2021). Phylogeography and Symbiotic Effectiveness of Rhizobia Nodulating Chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Ethiopia. *Microb Ecol. Apr.* 81(3): 703-716. [online] <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01620-8> – pristup 12.9.2022.
 27. 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.
 28. Hajduković I., Radić Lakoš T. (2010). Održiva poljoprivredna proizvodnja kao odgovor na degradaciju tala. *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*. 4 (1-2): 113-123.

29. Hameed R. A., Hussain N. N., Aljibouri A. 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): 20-25.
30. Harrison S.P., Mytton L.R., Skot L., Dye M., Cresswell A. (1992). Characterisation of Rhizobium isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Can. J. Microbiol.* 38: 1009–1015.
31. Hungria M., Vargas M.A.T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65: 151-164.
32. Ibriki H., Knewton S. J., Grusak M. A. (2003). Chickpea leaves as a vegetable green for humans: evaluation of mineral composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(9): 945-950.
33. Jida M., Assefa, F. (2012). Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of Mesorhizobium species isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing areas of Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*. 11(29).
34. Jukanti A. K., Gaur P. M., Gowda C. L. L., Chibbar R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*. 108(S1): S11-S26.
35. Kajić S. (2020). Filogenetska analiza autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju soju (*Glycine max* L.) i njihova simbiozna učinkovitost u uvjetima suše (Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet).
36. Karmakar K., Rana A., Rajwar A., Sahgal M., Johri B.N. (2015). Legume-Rhizobia Symbiosis Under Stress. *Plant Microbes Symbiosis Applied Facets*. 241-258.
37. Kaushal N., Awasthi R., Gupta K., Gaur P., Siddique K. H., Nayyar H. (2013). Heat-stress-induced reproductive failures in chickpea (*Cicer arietinum*) are associated with impaired sucrose metabolism in leaves and anthers. *Functional Plant Biology*. 40(12): 1334-1349.
38. Kelly S., Radutoiu S., Stougaard J. (2017). Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 39: 152–158.
39. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
40. Knights E. J., Hobson K. B. (2016.). Chickpea Overview. Reference Module in Food Science. [online] doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.00035-4 – pristup 1.7.2022.
41. 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.
42. Krznarić, D. (2018). Izolacija i karakterizacija endofitskih bakterija iz soje (*Glycine max* L.) (Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet).
43. Kucuk C, Kivanc M (2008). Preliminary characterization of Rhizobium strains isolated from chickpea nodules. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 772-775

44. 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.
45. Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological research*. 169(1): 2-17.
46. Lehnert N., Dong H. T., Harland J. B., Hunt A. P., White C. J. (2018). Reversing nitrogen fixation. *Nature Reviews Chemistry*. 2(10): 278-289.
47. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2004). *Povrćarstvo, Zrinski*. 559-562.
48. 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 arietinum*–*Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *Journal of plant physiology*. 164(8): 1028-1036.
49. Maatallah J., Berraho E.B., Sanjuan J., Lluch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. 22:321-329.
50. Maqbool M. A., Aslam M., Ali H. (2017.): Breeding for improved drought tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Breeding*. 300-318.
51. Marczewski W. (1997). AFLP—nowa metoda badawcza w genetyce roślin. *Biotechnologia*. 2(37): 97.
52. Martinez-Hidalgo P., Hirsch A. M. (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes Journal*. 1(2): 70-82.
53. Mehmood S., Bashir A., Ahmad A., Akram Z., Jabeen N., Gulfraz M. (2008). Molecular characterization of regional Sorghum bicolor varieties from Pakistan. *Pak. J. Bot.* 40(5): 2015-2021.
54. Menna P., Pereira A. A., Bangel E. V., Hungria M. (2009). Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*. 48(1): 120-130.
55. Mir M. I., Kumar B. K., Gopalakrishnan S., Vadlamudi S., Hameeda B. (2021). Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Heliyon*. 7(11): e08321.
56. Nakatsukasa H., Uchiumi T., Kucho K. I., Suzuki A., Higashi S., Abe M. (2008). Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to become a symbiosis island in *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 54(2): 107-118.
57. Naz I., Bano A., Hassan T-U. (2009). Morphological, biochemical and molecular characterization of rhizobia from halophytes of Khewra Salt Range and Attock. *Pak. J. Bot.* 41(6): 3159-3168.
58. Nei M., Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
59. Ngumbi E. i Kloepper J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*. 105: 109-125.

60. Niemann S., Pühler A., Tichy H.V., Simon R., Selbitschka W. (1997). Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J. Appl. Microbiol.* 82: 477–484.
61. Nour S. M., Cleyet-Marel J. C., Beck D., Effosse A., Fernandez M. P. (1994). Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.* 40: 345–354.
62. Ormeno-Orrillo E., Servin-Garciduenas L. E., Rogel M. A., Gonzalez V., Peralta H., Mora J., Martinez-Romero J., Martinez-Romero E. (2015). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Systematic and applied microbiology.* 38(4): 287-291.
63. Ozimec R., Karoglan Kontić J., Maletić E., Matotan Z., Strikić F. (2015.). Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije. Tiskara Zelina d.d., Sv. Ivan Zelina.
64. Pawel Trzcinski A. B., Kulisiewicz A., Malusá E. (2011). Use of the rep-PCR technique for differentiating isolates of rhizobacteria. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 19(1): 5-12.
65. Pole P. (2021). Suvremena proizvodnja slanutka (*Cicer arietinum* L) (Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti). [online] <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:555878> – pristup 8.7.2022.
66. Portier P., Fischer-Le Saux M., 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.* 72(11): 7123-7131.
67. Rajkumari J., Katiyar P., Dheeman S., Pandey P., Maheshwari D. K. (2022). The changing paradigm of rhizobial taxonomy and its systematic growth upto postgenomic technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 38(11): 1-23.
68. Rajnović I. (2017). Bioraznolikost i simbiozna učinkovitost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju grah (*Phaseolus vulgaris* L.) (Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.)
69. 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.
70. Rashid M., Young J. P. W., Everall I., Clercx P., Willems A., Braun M. S., Wink M. (2015). Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 65(9): 3037-3045.
71. Redden R. J., Berger J. D. (2007). History and origin of chickpea. *Chickpea breeding and management.* 1: 1-13.

72. Remigi P., Zhu J., Young J. P. W., Masson-Boivin C. (2016). Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends in microbiology*. 24(1): 63-75.
73. Rivas R., Garcia-Fraile P., Velazquez E. (2009). Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*. 2: MBI-S3137.
74. Rogel M. A., Hernandez-Lucas I., Kuykendall L. D., Balkwill, D. L., Martinez-Romero E. (2001). Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7). 3264-3268.
75. Rossello-Mora R., Urdiain M., Lopez-Lopez A. (2011). DNA–DNA Hybridization. In *Methods in Microbiology*. Academic Press. 38: 325-347.
76. Rouhrazi K., Khodakaramian G. (2015). Phenotypic and genotypic diversity of root-nodulating bacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Iran. *Ann Microbiol*. 65: 2219–2227. [online] <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1062-9> – pristup 12.9.2022.
77. Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
78. Sawada H, Kuykendal LD, Young JM (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol*. 49: 155–179.
79. Sessitsch A., Howieson J. G., Perret X., Antoun H., Martinez-Romero E. (2002). Advances in Rhizobium research. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21(4): 323-378.
80. Shamseldin A., Abdelkhalek A., Sadowsky M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*. 71(2): 91-109.
81. Sharma S. K., Knox M. R., Ellis T. N. (1996). AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 93(5): 751-758.
82. Shiraishi A., Matsushita N., Hougetsu T. (2010). Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*. 33(5). 269-274.
83. Sikora S., Blažinkov M., Babić K., Sudarić A., Redžepović S. (2008): Symbiotic nitrogen fixation and sustainable soybean production. *Cereal research communications*. 36: 1483-1486.
84. Skendrović N. (2018). Fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju soju (Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet).
85. 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.
86. Sudar I. (2016). Morfološka svojstva i hranidbena vrijednost slanutka. (Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet).
87. Tena W., Wolde-Meskel E., Degefu T., Walley F. (2017). Genetic and phenotypic diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) in soils from southern and central Ethiopia. *Canadian Journal of Microbiology*. 63(8). 690-707.

88. Topol J., Kanižai Šarić G. (2013). Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*. 75(2-3): 117-134.
89. Van der Maesen L. J. G., Maxted N., Javadi F., Coles S., Davies A. M. R. (2007). Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. *Chickpea breeding and management*. CAB International, Wallingford. 14-46.
90. Vargas-Blandino D., Cardenas-Travieso R. M., San José de las Lajas M. (2021). Chickpea cultivation, a possible solution to climate change. *Cultivos Tropicales*. 42(1): NA-NA.
91. Vio S. A., García S. S., Casajus V., Arango J. S., Galar M. L., Bernabeu P. R., Luna M. F. (2020). *Paraburkholderia*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press. 271-311.
92. Willems A (2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*. 287: 3–14.
93. 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.
94. Wubie G., Adal M. (2021). Isolation and Characterization of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Nodulating Rhizobia Collected from South Wollo Zone, Ethiopia. *International Journal of Agronomy*.
95. 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.
96. Zakhia F., de Lajudie P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomy*. 21: 569-576.
97. Zehara M. D. (2021). Genomic diversity, eco-physiological competence and symbioagronomic characteristics of *Mesorhizobium* species nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) from Ethiopia (Doctoral dissertation, Addis Ababa University, School of graduated studies). [online] <http://etd.aau.edu.et/handle/123456789/24999> – pristup 9.7.2022.
98. Zhang J., Guo C., Chen W., De Lajudie P., Zhang Z., Shang Y., Wang E. T. (2018). *Mesorhizobium wenxiniae* sp. nov., isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68(6): 1930-1936.

Životopis

Petra Frančić rođena je 25. studenog 1998. godine u Zagrebu. Pohađala je osnovnu školu Nikole Tesle gdje je osvojila drugo mjesto na školskom natjecanju iz Prve pomoći. Svoje srednjoškolsko obrazovanje stekla je u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga za kemijskog tehničara. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja, sudjelovala je u raznim školskim događanjima i bila pojavljivana u medijima. Sudjelovala je u dramskim predstavama te u uređenju školskog časopisa. Nakon završene srednje škole upisuje preddiplomski studij na Agronomskom fakultetu, smjer Biljne znanosti. U rujnu 2020. završava preddiplomski studij sa završnim radom pod nazivom „Smole i balzami“. Potom nastavlja svoje obrazovanje na istome fakultetu i upisuje smjer Agroekologija; Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Tijekom studiranja odrađivala je stručnu praksu u laboratoriju na Zavodu za Mirkobiologiju na Agronomskom fakultetu. Uporna je, marljiva i radišna osoba, a nove izazove rado prihvaća jer ih shvaća kao dio osobnog razvoja i boljitka.