

FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS *SINORHIZOBIUM MELILOTI* STRAINS

**Mihaela Blažinkov, Darija Vrbanac, Katarina Huić Babić,
Sanja Sikora**

SAŽETAK

Simbiozni odnos između kvržičnih bakterija *Sinorhizobium meliloti* i lucerne (*Medicago sativa* L.) omogućuje značajan unos biološki vezanog dušika u tlo. U poljoprivrednoj proizvodnji prirodni proces biološke fiksacije dušika nastoji se sve više intenzivirati predstjetvenom bakterizacijom sjemena lucerne s učinkovitim sojevima *S. meliloti*. Bitan preduvjet za uspjeh ovog procesa je selekcija najkvalitetnijih sojeva *S. meliloti* koji su visoko učinkoviti i prilagođeni na određene ekološke uvjete. Cilj istraživanja je utvrditi biokemijska i ekološka svojstva autohtonih sojeva *S. meliloti*, odnosno utvrditi njihovu raznolikost u pogledu rasta na različitim pH vrijednostima, temperaturama, izvorima ugljikohidrata, koncentracijama soli kao i utvrditi njihovu otpornost na antibiotike. Rezultati istraživanja potvrđuju kako ispitivani sojevi *S. meliloti* pokazuju značajnu raznolikost u pogledu ispitivanih fenotipskih karakteristika. Pored šećera manitola svi sojevi rastu na celobiozi, manozu, melobiozi i galaktozi, a slabiji izvor ugljika za sve ispitivane sojeve su ugljikohidrati ksiloza, arabinoza, rafinoza. U jako kiselom mediju od pH 3 sojevi nisu rasli, no u blago kiseloj sredini pH 5 rasli su autohtoni sojevi Z21 i V11 te referentni soj 2011. Niti jedan ispitivani soj nije rastao na uvećanoj koncentraciji NaCl od 2 %, no sojevi V11, Os6, Os5 i Z21 su rasli na podlogama s koncentracijama NaCl od 0.5% i 1%. Ovim istraživanjem potvrđena je raznolikost ispitivanih sojeva prema sposobnosti rasta na temperaturama koje su više od optimalnih. Sojevi V11, C16 i Os4 uspješno rastu na povišenim temperaturama od 40°C, dok sojevi Os6 i Z21 nisu rasli na temperaturama od 37°C i 40°C.

Ključne riječi: simbiozna fiksacija dušika, sojevi *Sinorhizobium meliloti*, lucerna, fenotipska karakterizacija sojeva

ABSTRACT

Symbiotic relationship between nitrogen fixing bacteria *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa* L.) provides a significant input of biologically fixed nitrogen in soil. Alfalfa inoculation by highly efficient *S. meliloti* strains to enhance naturally occurring biological nitrogen fixation has been a common agricultural practice. The most important key for success of pre sowing alfalfa inoculation is selection the most efficient strain that is also compatible to different ecological conditions. The main aim of his study is to determine the biochemical and ecological characteristics of indigenous *S. meliloti* strains in order to reveal strains diversity according growth characteristics under different temperature conditions, pH values, salt concentration, carbon source assimilation and antibiotic resistance. The results of this study reveal considerable phenotypic diversity of all tested *S. meliloti* strains. Beside mannitol, all strains could grow on cellobiose, mannose, galactose, melobiose, but they were not able to utilize xylose, arabinose and raffinose as carbon source. Under strong acidic conditions (pH 3) none of the strain could grow, but at pH 5 media indigenous strains Z21 and V11 and reference strain 2011 grew well. None of tested isolates could grow on concentration of 2% NaCl, but strains V11, Os6, Os5 and Z21 could grow in medium containing 0,5% and 1% of NaCl. This study revealed that strains varied in their ability to grow at higher temperatures. The strains V11, C16 and Os4 were able to grow at a temperature 40°C, but strains Os6 and Z21 failed to grow at 37°C and 40°C.

Key words: Symbiotic nitrogen fixation, *Sinorhizobium meliloti* strains, Alfalfa, Phenotypic characterization

UVOD

Iskorištavanje postojećih prirodnih resursa, korištenje obnovljivih izvora energije uz smanjenu upotrebu kemijskih sredstava u okolišu temeljne su postavke koje određuje održiva poljoprivredna proizvodnja. Poljoprivrednom proizvođaču često je ovaj model teško primjenjiv jer većina kultura za ostvarivanje optimalnih prinosa zahtjeva dodatne izvore pristupačnih dušičnih hranjiva kojima su većina tla limitirana. Gnojidba s mineralnim dušičnim gnojivima pruža usjevu neophodno dušično hranjivo, ali značajno poskupljuje njegovu proizvodnju na oranici. Održivom poljoprivrednom proizvodnjom se

stoga potencira uzgoj poljoprivrednih kultura kojima se namiruje dušično hranjivo iz prirodnih izvora prvenstveno putem procesa biološke fiksacije dušika. Značaj navedenog procesa je u smanjenom korištenju kemijskih sredstava u okolišu, iskorištavanju obnovljivih izvora energije, a za poljoprivredne proizvođače najveća korisnost i primjenjivost procesa je u pogledu ušteda na upotrebi mineralnih dušičnih gnojiva. Za poljoprivrednu praksu najznačajniji je proces simbiozne fiksacije dušika pa se taj proces nastoji intenzivirati kroz uzgoj mahunarki i njihovom predstjetvenom bakterizacijom. Primjena visoko kvalitetnih sojeva kvržičnih bakterija je preduvjet za uspješnu bakterizaciju mahunarki. Isto tako selekcija i odabir najprikladnijih sojeva za proizvodnju inokuluma predmet su dugogodišnjih istraživanja i znanstvenog rada (Sikora i Redžepović 2000., Sikora i sur. 2002., Bradić i sur. 2003.) Osim toga, bitan preduvjet za uspjeh predstjetvene bakterizacije na nekom uzgojnom području je postojanje prirodne populacije sojeva kvržičnih bakterija. Proučavanje prirodne populacije sojeva kvržičnih bakterija prvenstveno se odnosi na utvrđivanje njihove genetske varijabilnosti i simbiozne učinkovitosti (Frioni i sur., 2001., Mahdhi i sur., 2008.). Genetička identifikacija provodi se raznim suvremenim molekularnim metodama kojima se procjenjuje varijabilnost ili srodnost sojeva (Hungria i sur., 2000., Sikora i Redžepović, 2000., 2003.). Stupanj raznolikosti autohtone populacije ovisan je o ekološkim uvjetima sredine u kojoj žive, a također se autohtoni sojevi razlikuju i po svojoj učinkovitosti (Dowling i Broughton, 1986.). Procjena simbiozne učinkovitosti provodi se u kontroliranim uvjetima staklenika, a potom kroz poljske pokuse na različitim tlima, lokacijama i kultivarima biljke domaćina. Prirodne populacije simbioznih fiksatora dušika značajno se razlikuju i u svojim fenotipskim karakteristikama te je ispitivanje navedenih svojstava također značajno za selekciju sojeva (Odee i sur., 1997., Camacho i sur., 2002., Villages i sur., 2006., Yang i sur., 2005., 2008.) U tu svrhu utvrđuju se ekološka, fiziološka, biokemijska i serološka svojstva simbioznih fiksatora dušika. Fiziološke i biokemijske karakteristike odnose se na utvrđivanje aktivnosti bakterijskih enzima, pri čemu se provode različiti biokemijski testovi (sposobnost iskorištavanja ugljika iz ugljikohidrata; redukcija nitrata, tvorba indola, amonijaka ili sumporovodika; iskorištavanje N iz različitih spojeva). Osim toga utvrđuje se osjetljivost sojeva na metaboličke inhibitore i antibiotike, optimalne pH vrijednosti, osmotsku toleranciju, sadržaj stanične stjenke, itd. Ekološka karakterizacija daje nam podatke o prilagođenosti sojeva različitim ekološkim

uvjetima (temperatura, pH, voda, svjetlost, kisik). Rezultati tih ispitivanja daju podatke o prikladnost sojeva za određeni tip tla i uvjete koji vladaju na pojedinom području. U ovim istraživanjima određivane su fenotipske karakteristike prirodne populacije sojeva *Sinorhizobium meliloti* koji su izolirani sa različitih područja i tipova tla u našoj zemlji. Sojevi navedene vrste kvržičnih bakterija značajni su u poljoprivrednoj praksi jer se koriste za predsjetvenu bakterizaciju najznačajnije krmne mahunarke – lucerne (Maćešić i sur., 2007., Blažnikov i sur., 2008.). Cilj istraživanja je utvrditi biokemijska i ekološka svojstva autohtonih sojeva *S. meliloti*, odnosno njihovu raznolikost u pogledu rasta na različitim pH vrijednostima, temperaturama, izvorima ugljikohidrata, koncentracijama soli kao i njihovu otpornost na antibiotike.

METODE ISTRAŽIVANJA

U istraživanje je uključeno osam sojeva *S. meliloti* od kojih je sedam autohtonih iz kolekcije sojeva Zavoda za mikrobiologiju i jedan referentni soj 2011 koji je dobiven iz Institute of Grassland & Environmental Research-Dyfed (Velika Britanija). Autohtoni sojevi (Os4, Os5, Os6, S26, V11, Z21, C16) su izolirani iz različitih tala na području Hrvatske (Tablica 1). Svi sojevi su genetski karakterizirani molekularnim metodama i na osnovu kojih je utvrđena njihova genetska varijabilnost (Bradić i sur., 2003.). Simbiotska učinkovitost korištenih sojeva utvrđena je u vegetacijskim pokusima na dvije sorte (Bradić i sur., 2003.). Simbiotsko najučinkovitiji sojevi u uvjetima staklenika uključeni su u poljske pokuse na različitim lokacijama u RH i s različitim sortama lucerne (podaci nisu prikazani). Navedeni sojevi uzgajani su na YMA podlozi (Vincent, 1970.) 4-5 dana pri temperaturi 27°C.

I) Ispitivanje otpornosti sojeva na antibiotike:

U svrhu procjene otpornosti sojeva *S. meliloti* na različite antibiotike korištena je metoda difuzije u agaru s filter-diskovima koja se koristi u bakteriologiji u svrhu određivanja osjetljivosti bakterija prema antibioticima i kemoterapeuticima (Hajsig i sur. 1992., Martensson, 1992). U petrijeve zdjelice s bakterijskom kulturom na YMA podlozi stavljaju se različiti komercijalni antibiotski diskovi. U ovom istraživanju su korišteni antibiotski diskovi slijedećih koncentracija: penicilin (10 µg/ml), tetraciklin (5 µg/ml), ampicilin (2 µg/ml) i eritromicin (15 µg/ml) (BD Diagnostic, Le Pont de Claix, Francuska).

Tablica 1: Porijeklo i oznake izolata te kemijske karakteristike tla
Table 1: Origin and designation of isolates and soil chemical properties

Oznake sojeva	Porijeklo sojeva	Dubina cm	H ₂ O	pH MKCl	ocjena reakcije	Sadržaj humusa %	Ocjena humoznosti	Ukupni N	Ocjena opskrbljenosti dušikom	P ₂ O ₅ mg/10 0 g tla	Fiziološki ocjena opskrbljenosti	aktivni K ₂ O mg/100 g tla	ocjena opskrbljenosti
V11	Grabovac	0 – 30	7,0	6,2	slabo kisela	2,8	slabo humuzno	0,16	dobra	49,56	dobra	42,5	dobra
O84	Valpovo	0 – 30	5,2	4,4	jako kisela	2,2	slabo humuzno	0,15	dobra	15,64	osrednja	44,0	dobra
O85	Karanac	0 – 30	7,6	6,6	praktički neutralna	3,4	dosta humuzno	0,19	dobra	13,74	osrednja	45,0	dobra
O86	Brestovac	0 – 30	7,5	7,1	praktički neutralna	3,2	dosta humuzno	0,20	bogata	67,70	dobra	59,8	dobra
S26	Slavonski Brod	0 – 30	5,6	5,0	kisela	4,1	dosta humuzno	0,22	bogata	34,01	dobra	17,0	osrednja
C16	Čazma	0 – 30	6,2	5,1	kisela	2,5	slabo humuzno	0,15	dobra	17,32	osrednja	10,2	osrednja
Z21	Zagreb	0 – 30	6,2	5,1	kisela	2,3	slabo humuzno	0,15	dobra	8,98	slaba	13,5	osrednja

Sojevi koji se uzgajaju na hranjivoj podlozi rastu do mjesta na kojem se nalazi ona količina antibiotika koja sprječava njihov rast. Na taj način se oko diska stvara zona u kojoj sojevi ne mogu rasti jer ih antibiotik inhibira pa se te zone nazivaju zone inhibicije. Inkubacija je vršena na temperaturi 27-28°C, a očitavanje rezultata obavljeno je nakon šest dana na način da se utvrđuje postojanost ili odsutnost zone inhibicije oko diskova kako je nevedeno u literaturi (Ködöböcz i sur. 2009). Sva ispitivanja izvršena su u tri ponavljanja.

II) Ispitivanje rasta sojeva na različitim izvorima ugljikohidrata:

Standardna hranjiva podloga za uzgoj simbioznih fiksatora dušika je YMA (yeast mannitol agar) koja kao izvor ugljikohidrata sadrži manitol. U istraživanju su pored manitola koji je korišten kao pozitivna kontrola, korišteni slijedeći ugljikohidrati: glukoza, saharoza, melobioza, ksiloza, celobioza, manoza, arabinoza, dekstroza, rafinoza, melobioza, maltoza, galaktoza, sorbitol, laktoza i fruktoza. Metoda korištena za ispitivanje rasta sojeva je filter-disk metoda. Ispitivani sojevi inokulirani su u petrijevim posudicama na YMA podlozi bez dodatka manitola te su na njih stavljeni papirnati filter diskovi (Bio-Rad, Kalifornija, SAD) impregnirani s 10%-tnom otopinom ugljikohidrata. Na ploče s inokulumom stavljano je 4 filter diska s različitim ugljikohidratima. Ispitivanje je vršeno u tri ponavljanja, a rezultati su očitavani nakon šest dana kako je navedeno u literaturi (Odee i sur. 1997., Grossman i sur. 2005., Villegas i sur. 2006.)

III) Ispitivanje rasta sojeva na različitim pH vrijednostima, koncentracijama soli i temperaturama rasta:

Tolerantnost sojeva *S. meliloti* na pH vrijednosti koje su izvan optimalnih odnosno pH neutralnih vrijednosti ispitivana je na tri YMA podloge kojima je pH vrijednost iznosila pH 3, pH 5 i pH 8. Sojevi su inokulirani na temperaturi 27-28°C, a rast sojeva je očitavan šestog dana nakon inokulacije. Optimalna koncentracija soli za rast sojeva kvržičnih bakterija koju sadrži YMA podloga je 0,01 %. Rast ispitivanih sojeva praćen je na uvećanim koncentracijama soli i to s koncentracijom NaCl-a 0,5%, 1%, 2%. Ispitivanje je provedeno u tri ponavljanja, a rast sojeva je očitavan nakon šest dana od inokulacije. Osim rasta na optimalnim temperaturnim vrijednostima, rast ispitivanih sojeva praćen je i na temperaturama od 37° i 40° C. Praćenje rasta sojeva i očitavanje rezultata izvršeni su nakon šest dana inkubacije.

REZULTATI I RASPRAVA

Sojevi simbioznih fiksatora dušika razlikuju se u pogledu simbiozne učinkovitosti, genetskih karakteristika pa tako i po njihovoj osjetljivosti na ekološke faktore kao što su reakcija sredine, tolerantnost na povišene temperature i sadržaj soli, biokemijska svojstva i otpornost na antibiotike. Razlike u navedenim svojstvima postoje i u pogledu vrsta simbioznih fiksatora dušika tako su brzorastuće vrste znatno otpornije na antibiotike i uvećane koncentracije soli od spororastućih vrsta (Odee i sur. 1997.). Rezultati istraživanja prikazani su u tablici 2. Sojevi kvržičnih bakterija znatno se razlikuju prema svojoj osjetljivosti na antibiotike pa se ta karakteristika koristila pri identifikaciji sojeva prije pojave molekularnih metoda (Sikora i Redžepović, 2000.). Ovim istraživanjem je utvrđeno da su ispitivani sojevi *S. meliloti* Z21, S26, Os4 i Os5 otporni na korištene koncentracije svih antibiotika, odnosno da je utvrđen samo slabiji rast pojedinih sojeva. Blaga osjetljivost na penicilin utvrđena je kod sojeva V11, Os6 i 2011, dok su sojevi C16 i 2011 slabije rasli u prisutnosti tetraciklina. Isto tako blagu osjetljivost na ampicilin imaju sojevi V11 i Os6. Svi ispitivani sojevi pokazuju prirodnu otpornost na antibiotik eritromicin korištene koncentracije (Tablica 2).

Sojevi vrste *S. meliloti* za svoj rast kao izvor ugljika iskorištavaju manitol te se navedeni ugljikohidrat koristi kod pripreme YMA podloge koja služi za uzgoj kvržičnih bakterija. Poznato je kako sojevi simbioznih fiksatora dušika mogu koristiti i neke druge izvore ugljikohidrata, ali isto tako da brzorastuće vrste preferiraju monosaharide dok spororastuće vrste simbioznih fiksatora dušika koriste disaharide (Grossman i sur., 2005.). U ovom istraživanju potvrđeno je da se ispitivani sojevi razlikuju u iskorištavanju ugljikohidrata, odnosno da pored manitola mogu koristiti i neke druge izvore šećera za rast i razvoj (Tablica 2.). Pored očekivanog rasta ispitivanih sojeva na manitolu, svi sojevi su rasli na celobiozi, manozi, melobiozi i galaktozi. S druge strane, loš izvor ugljika za sve ispitivane sojeve su ugljikohidrati ksiloza, arabinoza, rafinoza, jer nije utvrđen rast niti jednog ispitivanog soja na navedenim šećerima. Većina ispitivanih sojeva nije iskorištavala šećer fruktozu i dekstrozu osim soja Os4. Autohtoni soj Os4 je pokazao rast na najvećem broju korištenih

Tablica 2: Fenotipska karakterizacija sojeva *Sinorhizobium meliloti*

Table 2: Phenotypic characterization of *Sinorhizobium meliloti* strains

Karakteristike	Oznake sojeva							
	V11	C16	Os6	Os5	Os4	S26	Z21	2011
<i>Otpornost na antibiotike ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>								
Penicilin (10 $\mu\text{g/ml}$)	+-	++	+-	++	++	++	++	+-
Tetraciklin (5 $\mu\text{g/ml}$)	++	+-	++	++	++	++	++	+-
Ampicilin (2 $\mu\text{g/ml}$)	+-	++	+-	++	++	++	++	++
Eritromicin (15 $\mu\text{g/ml}$)	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Korištenje različitih izvora C</i>								
Manitol	++	++	++	++	++	++	++	++
Glukoza	+-	++	++	--	++	++	++	++
Saharoza	++	++	++	--	++	+-	++	+-
Melobioza	++	++	++	--	++	++	+-	++
Ksilioza	--	--	--	--	--	--	--	--
Celobioza	++	++	++	++	++	++	++	++
Manoza	++	++	++	++	++	++	++	++
Arabinoza	--	--	--	--	--	--	--	--
Dekstroza	--	--	--	--	+-	--	--	--
Rafinoza	--	--	--	--	--	--	--	--
Maltoza	--	--	--	--	--	--	--	--
Galaktoza	++	++	++	++	++	++	++	++
Sorbitol	++	++	++	--	+-	--	++	++
Laktoza	++	++	++	--	++	--	++	++
Fruktoza	--	--	--	--	+-	--	--	--
<i>pH podloge</i>								
pH=3	--	--	--	--	--	--	--	--
pH=5	+-	--	--	--	+-	--	++	+-
pH=8	++	++	++	--	++	++	++	++
<i>Osjetljivost na NaCl</i>								
0,5%	+-	--	+-	+-	--	--	++	--
1%	+-	--	+-	+-	--	--	++	--
2%	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Rast na različitim temperaturama</i>								
37°C	++	++	--	++	++	++	--	+-
40°C	++	++	--	--	++	--	--	--

** ++ dobar rast; +- slab i spor rast; -- nema rasta

šećera pa se može zaključiti kako se radi o soju koji nije osjetljiv na izvor ugljika za rast i razvoj. Utvrđeno je kako autohtoni soj Os5 pokazuje rast na malom broju korištenih šećera (celobiozi, manozi, meloiozi, manitolu i galaktozi) što ga čini vrlo osjetljivim sojem na izvor ugljika.

Sojevi *S. meliloti* znatno veću tolerantnost pokazuju na sadržaj soli u tlima, nego što je to slučaj s reakcijom sredine. U tlima je ponekad prisutan problem viših koncentracija soli što može ograničiti uspjeh predstetvene bakterizacije ako je učinkoviti soj osjetljiv na povišene koncentracije soli. Prilikom priprema YMA podloge koncentracija NaCl iznosi 0,01% i smatramo je optimalnom za uzgoj sojeva kvržičnih bakterija. Ova istraživanja usmjerena su na provjeru sposobnosti rasta ispitivanih sojeva *S. meliloti* u uvjetima povišenih koncentracija NaCl. Pregledom kultura utvrđen je dobar rast soja Z21 i slab rast sojeva V11, Os6, Os5 na koncentracijama soli od 0,5% i 1%. Preostali ispitivani sojevi (C16, 2011, Os4 i S26) nisu rasli na uvećanim koncentracijama soli od 0,5%, i 1%. Istraživanjem je utvrđeno da niti jedan ispitivani soj nije rastao na uvećanoj koncentraciji NaCl od 2 %, dakle koncentraciji soli koja je višestruko veća od optimalne. Sojevi različitih vrsta simbioznih fiksatora različito reagiraju na sadržaj soli. Autori Shamseldin i sur. (2009.) i Moschetti i sur. (2005.) navode kako su sojevi *Rh. leguminosarum* bv. *viciae* vrlo osjetljivi na povišene koncentracije soli i da ih je većina rasla samo na koncentraciji od 0,1% NaCl. S druge strane *S. meliloti* sojevi nisu toliko osjetljivi na veći sadržaj soli odnosno tolerantne su na koncentracije soli od 1%. Yan i sur. (2000.) navodi kako su pojedini sojevi vrste *S. meliloti* rasli na koncentraciji soli od 3% te se takve može smatrati tolerantnima na salinitet tla.

U pogledu reakcije sredine poznato je da je vrsta *S. meliloti* je izuzetno osjetljiva na niske pH vrijednost u tlu (De Lajudie i sur., 1994.), jer niski pH negativno utječe na količinu i vrstu značajnih egzopolisaharida kod *S. meliloti*. Ispitivani sojevi nisu rasli na jako kiselom mediju od pH 3. Na pH 5 jedino je soj Z21 imao dobar rast dok su sojevi V11, Os4 i 2011 imali djelomičan rast. Rezultati autora Villages i sur. (2006.) navode kako je referentni soj 2011 rastao pri pH 4, dakle radi se o soju koji je tolerantan na kiseliju sredinu što se i u našim poljskim uvjetima potvrdilo (Blažinkov i sur., 2008.). Alkalna sredina od pH 8 je znatno povoljnija za rast sojeva *S. meliloti*, jer su svi ispitivani sojevi (osim Os5) imali dobar rast pri tom pH. Autohtoni soj Z21 pokazuje najveću toleranciju na promjenu reakcije sredine, no unatoč tome nije prikladan za

pripremu inokuluma kod predstjetvene bakterizacije jer je slabije simbiozne učinkovitosti (Bradić i sur. 2003.). Optimalna temperatura rasta sojeva kvržičnih bakterija je 25-29°C odnosno na navedenoj temperaturi brzorastući sojevi *S. meliloti* imaju generacijsko vrijeme 2-4 sata. Ovim istraživanjem potvrđena je raznolikost ispitivanih sojeva s obzirom na sposobnost rasta na temperaturama koje su više od optimalnih. Sojevi V11,C16 i Os4 imali su odličan rast na temperaturama 37°C i 40°C. Sojevi Os5, S26 i 2011 su rasli na 37°C, no na temperaturi od 40°C nisu rasli. Sojevi Os6 i Z21 nisu rasli na višim temperaturama tijekom provedenih istraživanja što ukazuje da je njihov rast vezan uz optimalne temperature rasta. Slične rezultate objavio je Shamseldin i sur. (2009.) koji također navodi da autohtoni sojevi *S. meliloti* rastu na temperaturi od 37°C.

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja utvrđeno je da se prirodna populacija sojeva *S. meliloti* razlikuje u pogledu ispitivanih fenotipskih svojstava. Većina sojeva se može smatrati otpornim na antibiotike, alkalnu reakciju sredine i visoke temperature, ali su znatno osjetljivi na povišene koncentracije soli i kiselu reakciju u tlu. Rezultati fenotipskih analiza sojeva *S. meliloti* zajedno s procjenama njihove simbiozne učinkovitosti bitan su preduvjet za izbor najprikladnijih sojeva koji će se koristiti u predstjetvenoj bakterizaciji lucerne na različitim uzgojnim područjima u našoj zemlji.

LITERATURA

1. Blažnikov, M., Sikora, S., Maćešić, D., Uher, D., Duraković, L. (2008.): The effect of rhizobial inoculation and liming on alfalfa production in Croatia. *Cereal Research Communications* 36: 343-346.
2. Bradić, M., Sikora, S., Redžepović, S., Štafa, Z. (2003.): Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous *Sinorhizobium meliloti* field population. *Food Technology and Biotechnology* 41(1): 69-75.
3. Camacho, M., Santamaria, C., Temprano, F., Rodriguez-Navarro, D.N., Daza, A., Espuny, R., Bellogin, R., Ollero, F.J., de Lyra, M.C.C.P., Buendia-Claveria, A., Zhou, J., Li, F.D., Velazquez, E., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz,

- J.E. (2002.): Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 592-602.
4. De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B. (1994.): Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44: 715 – 733.
 5. Dowling, D.N.; Broughton, W.J. (1986.): Competition for nodulation of legumes. *ANN. Review of Microbiology* 40:131-157.
 6. Frioni, L., Rodriguez, A., Meerhoff, M. (2001.): Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 16: 275-282.
 7. Grossman, J.M., Sheaffer, C., Wyse, D., Graham, P.H. (2005.): Characterization of slow-growing root nodule bacteria from *Inga oerstediana* in organic coffee agroecosystems in Chiapas, Mexico. *Applied Soil Ecology* 29: 236-251.
 8. Hajsig, D., Naglič, T., Madić, J., Gamulin, S. (1992): Opća mikrobiologija i imunologija s osnovama epizootologije. Školska knjiga, Zagreb.
 9. Hungria, M. Andrade, D. de S., Chueire, L. M. de O., Probanza, A., Gutierrez-Manero, F.J., Megias, M. (2000.): Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1515-1528.
 10. Kődöböcz, L. Halbritter, A., Mogyoróssy, T., Kecskés, M.L. (2009.): Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia in cropping area under intensive and organic agriculture in Hungary. *European Journal of Soil Biology* 45: 394-399.
 11. Maćešić, D., Uher, D., Sikora, S., Blažinkov, M., Štafa, Z. (2007.): Yield and height of alfalfa (*Medicago sativa* L.) effected by rhizobial inoculation. *Cereal Research Communications* 35: 737-740.
 12. Mahdhi, M., Nzoue, A., de Lajudi, P., Mars, M.(2008.): Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Progress in Natural Science* 18: 43-49.
 13. Martensson, A.M. (1992): Effects of agrochemical and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small seed legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 435-445.
 14. Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe., Defez, R. (2005.): Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification,

- RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 619-631.
15. Odee, D.W., Sutherland, J.M., Makatiani, E.T., McInroy, S.G., Sprent, J.I. (1997.): Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil* 188: 65-75.
 16. Shamseldin, A., El-Saadani, M., Sadowsky, M.J., Sun An, C. (2009.): Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of *nodC*, ARDRA and rDNA sequence analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 45-53
 17. Sikora, S., Redžepović, S. (2000.): Identifikacija autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* izoliranih iz različitih tipova tala zapadne Slavonije, *Poljoprivredna znanstvena smotra* 65 (4): 229-236.
 18. Sikora, S., Redžepović, S., Bradić, M.(2002.): Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. *Microbiological Research* 157(3): 157-160.
 19. Sikora, S., Redžepović, S. (2003.): Genotypic Characterisation of Indigenous Soybean Rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD Analysis. *Food Technology and Biotechnology* 41: 61-67.
 20. Villegas, M.D.C., Rome, S., Maure, L., Domergue, O., Gardan, L., Bailly, X., Cleyet-Marel, J., Brunel, B. (2006.): Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 526-538.
 21. Vincent, J.M.(1970.): A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *International Biological Programme Handbook No. 15*, London.
 22. Yan, A.M., Wang, E.T. Kan, F.L. Tan, Z.Y. (2000.): *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Mellilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1887-1891.
 23. Yang, J.K., Xie, F.L., Zou, J., Zhou, Q., Zhou, J.C. (2005.): Polyphasic characterization of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 141-153.
 24. Yang, J.K., Yuan, T.Y., Zhang, W.T., Zhou, J.C., Li, Y.G. (2008.): Polyphasic characterization of mung bean (*Vigna radiata* L.) rhizobia from different geographical regions of China. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1681-1688

Adresa autora-Author's address:

Doc. dr. sc. Mihaela Blažinkov
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb
E-mail: mihaela@agr.hr

Primljeno – Received:

15.07.2010.

Darija Vrbanac
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

Katarina Huić Babić, dipl. ing.
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

Prof.dr.sc. Sanja Sikora
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

