

Biodiversity and symbiotic efficiency of indigenous rhizobia nodulating field pea

Prirodna raznolikost i simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju stočni grašak

Mihaela BLAŽINKOV¹ (✉), Darko UHER², Nataša ROMANJEK FAJDETIĆ¹, Božica JAPUNDŽIĆ –PALENKIĆ¹, Sanja SIKORA²

¹ College of Slavonski Brod, Dr. M. Budaka 1, 35000 Slavonski Brod, Croatia

² University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

✉ Corresponding author: mblazinkov@vusb.hr

Received: 9 May 2019; accepted: 20 March 2020

ABSTRACT

The main aim of this study was to assess genetic diversity within the natural populations of field pea rhizobia on different field sites in Northwestern Croatia and to evaluate their symbiotic efficiency. Identification of related bacterial strains was carried out using RAPD and rep-PCR methods and on the basis of differences in the nodulation nodD gene region by PCR-RFLP method. Indigenous strains have been shown to differ significantly from each other as well as from the reference strains *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* used in these study. Based on the nodulation genes, it was found that most isolates have the same or very similar nodulation nodD region except the isolates K22 and K23. A greenhouse studie was performed for evaluation of symbiotic efficiency of strains. The highest nodule dry weight was determined by inoculation with strains K23, K22, K17 and K20, indicating their high infectivity and nodulation ability. Significantly higher green mass and dry matter yield in aboveground plant parts were determined by inoculation with two indigenous strains K26 and K16 that showed potentially high symbiotic efficiency compared to other tested strains.

Keywords: biological nitrogen fixation, rhizobia, field pea, genetic diversity

SAŽETAK

Glavni cilj istraživanja je utvrditi genetsku raznolikost unutar prirodne populacije rizobija koji noduliraju stočni grašak na području sjeverozapadne Hrvatske te procijeniti njihovu simbioznu učinkovitost. Identifikacija srodnih bakterijskih sojeva provedena je primjenom RAPD i rep-PCR metode te na osnovi razlika u nodulacijskoj nodD genskoj regiji putem PCR-RFLP metode. Dokazano je da se autohtoni sojevi međusobno značajno razlikuju kao i od referentnih sojeva *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* korištenih u ovim istraživanjima. Na osnovu nodulacijskih gena primjenom PCR-RFLP metode utvrđeno je da većina izolata ima istu ili vrlo sličnu nodulacijsku nodD regiju osim izolata K22 i K23. Vegetacijski pokus u stakleniku postavljen je u svrhu procjene simbiozne učinkovitosti sojeva. Najveća masa suhe tvari kvržica utvrđena je primjenom izolata K23, K22, K17 i K20 što ukazuje na njihovu visoku infektivnost i nodulacijsku sposobnost. Signifikantno veći prinos zelene mase i suhe tvari nadzemnog dijela biljke, ostvaren je uz bakterizaciju s dva autohtona soja K26 i K16 koji su pokazali potencijalno visoku simbioznu učinkovitost u usporedbi s ostalim istraživanim sojevima.

Ključne riječi: biološka fiksacija dušika, rizobije, stočni grašak, genetska raznolikost

DETAILED ABSTRACT

Sustainable agriculture is a production system that combines ecological and economic production elements. One of the bases underlying this production is utilization of nitrogen from the environment and rational nitrogen fertilization. Process of biological nitrogen fixation and legume cultivation has a great potential in sustainable agriculture production because of input of atmospheric nitrogen in soil. An important legume crop is the forage pea, which is one of the main animal protein feeds. It is used for seed, hay, pasture, silage and green manure and it is one of the best feed for animals. Field pea may produce substantial yield with reduced requirement for nitrogenous fertilizers due to symbiotic relations with nitrogen-fixing bacteria. In order to increase the utilization of biological nitrogen fixation, the inoculation of forage pea seeds is recommended. However, the presence of indigenous soil strains of nitrogen fixing bacteria can reduce the inoculation benefits. To improve the inoculation response it is important to determine the composition and characteristics of indigenous field pea rhizobia. The main aim of this study was to isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* indigenous strains from different field sites in Croatia, to assess genetic diversity and genetic relationships amongst strains of natural populations and to provide information about nodulation and symbiotic efficiency of indigenous *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains. Genetic characterisation of *R. leguminosarum* bv. *viciae* was performed by two methodologies based on PCR amplification, PCR-RFLP of amplified symbiotic gene region and rep-PCR and RAPD-PCR. Cluster analysis of rep-PCR and RAPD-PCR profiles showed significant differences among *R. leguminosarum* bv. *viciae* isolates. Both methods resulted in identical grouping of strains. Among indigenous strains, indigenous strain K16 was significantly different from all tested strains. The highest differences were detected among reference strains and all field isolates. Based on results of restriction analysis of *nodD* gene regions, two indigenous strains K22 and K23, as well as two reference strains 1001 and 1045 revealed significantly different *nodD* gene types from all other tested strains. So, classifications of *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains by the PCR- amplified symbiotic gene region methods were partly in correlation with classification of strains based on rep and RAPD-PCR. Greenhouse studies were performed for evaluation of symbiotic efficiency of *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains. Quantitative expression of symbiotic efficiency was evaluated by measurement of nodule dry weight, content of total nitrogen in plants, dry matter and herbage yield of plants. All strains nodulated forage pea but with different efficiency. The highest nodule dry weight from all tested strains were determined by inoculation with strains K23, K22, K17, K20 so it could be characterised as highly infective strains. Significant differences in dry matter and herbage yield of forage pea were determined depending on the strain used. The results indicate that two indigenous *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains K16 and K26 can be characterised as the most efficient of all strains used in this study. This preliminary results of symbiotic efficiency as well as other symbiotic properties of these strains should be further investigated in field trials with different field pea cultivars. Results of this study provides an ecological framework that can be used for selection of efficient rhizobial strains that are adapted to local environmental factors and could be used in production of high quality rhizobial inoculants.

UVOD

Mahunarke se smatraju poželjnim biljnim vrstama i sastavnim dijelom plodoreda jer pospješuju plodnost i strukturu tla, ostavljaju tlo opskrbljeno dušikom, smanjuju potrebu za primjenom dušičnih mineralnih gnojiva budući da potrebe za dušičnim hranivom mogu podmiriti putem simbioznog odnosa s rizobijima u procesu biološke fiksacije dušika. Osim toga, imaju i jedinstvenu ulogu u ekološkoj poljoprivredi, jer pripadaju u usjeve koji su korisni za okoliš i klimu (Topol i Kanižai Šarić, 2013). Jedna od značajnijih krmnih mahunarki je stočni ili krmni grašak čiji značaj se ogleda u prilagodljivosti na različite uvjete,

brojnosti kultivara i velikim mogućnostima korištenja u stočarskoj proizvodnji (Štafa, 1997; Krizmanić i sur., 2015, 2017). Grašak se uglavnom koristi za proizvodnju zrna, ali i cijele biljke same ili u kombinaciji sa žitaricama. Prednost dvo-komponentnih usjeva je u boljem gospodarenju tлом, boljem iskorištavanju fiksiranog dušika, povoljnijem odnosu probavljivih bjelančevina i suhe tvari za opskrbu energijom i bjelančevina u ishrani preživača (Uher i sur., 2009; Čupić i sur., 2010). Osim toga, stočni grašak u simbioznom odnosu s rizobijima može ostvariti značajne prinose bez potrebe korištenja

mineralnih dušičnih gnojiva (Brkić i sur., 2004; Blažinkov i sur., 2007, 2014). Iako se radi o prirodnom procesu, utjecaj čovjeka je često od presudnog značaja ako se želi postići potpuni svrsishodni učinak. To se odnosi na odabir najučinkovitijeg soja rizobija za određene ekološke uvjete kao i za sortu biljke domaćina. Izabrani visoko učinkoviti sojevi unose se u tlo putem predstetvene bakterizacije sjemena mahunarki, no problem uspješnoj bakterizaciji može biti postojanje autohtonih sojeva u tlu (Sikora i sur., 2002; Ballard i sur., 2004; Riah i sur., 2014; Cardoso i sur., 2017). U mnogim tlima dokazano je postojanje autohtonih sojeva rizobija koji su visoko kompetitivni, ali ne fiksiraju dušik toliko učinkovito kao uneseni komercijalni sojevi (Argaw i Mnalku, 2017). Područje Koprivničko-križevačke županije poznato je kao stočarski kraj koji ima visoke i stalne potrebe za uzgojem proteinski visokovrijednih krmnih kultura. Uz uzgoj stočnog graška preporučljiva je mjera i predstetvene bakterizacije s visoko učinkovitim, kompetitivnim, selekcioniranim sojevima radi dobivanja željenih prinosa, više kakvoće proteina uz smanjena ulaganja (Uher i sur., 2009). Pretpostavlja se da i u tlima Koprivničko-križevačke županije postoje autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju stočni grašak. Iz tog razloga, glavni cilj ovih istraživanja je utvrditi zastupljenost i genetsku raznolikost prirodnih populacija rizobija te procijeniti simbioznu učinkovitost izoliranih autohtonih sojeva koji bi se potencijalno mogli koristiti u poljoprivrednoj praksi.

MATERIJAL I METODE

Istraživanja se ciljano odnose na regiju sjeverozapadne Hrvatske, a konkretno se radi o tlima na području Koprivničko-križevačke županije. Uzorci tla uzeti su s različitih lokacija iz oraničnog horizonta (0-30 cm) (Tablica 1). Laboratorijske analize kemijskih svojstava uzoraka tala obuhvatile su: određivanje reakcije tla u vodi i 1 M KCl-u, sadržaja humusa (%) metodom Tjurina, ukupnog dušika (%) mikro Kjeldahlovom metodom te opskrbljenost fiziološki aktivnim hranivima – fosforom (mg P_2O_5 /100 g tla) i kalijem (mg K_2O /100 g tla) AL metodom.

Površinski sterilizirano sjeme stočnog graška sorte Maksimirski ozimi posijano je u tlo sakupljeno sa navedenih lokacija. U fazi pune cvatnje sakupljene su kvržice iz

kojih su izolirani autohtoni sojevi primjenom standardne metode po Vincentu (1970). U istraživanje je uključeno 17 autohtonih sojeva (Tablica 1) i referentni sojevi *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1001 i 1045 dobiveni iz IGER kolekcije sojeva (Velika Britanija). Za izolaciju ukupne genomske DNA sojeva korišteni su specifični kitovi DNeasy Tissue Kit 250 (Quiagen). U svrhu identifikacije sojeva vrste *R. leguminosarum* bv. *viciae* amplificirana je *nodC* regija sa specifičnim oligonukleotidnim klicama *nodCf* i *nodCr* koje amplificiraju *nodC* gene kod vrste *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Moschetti i sur., 2005). Primjenom PCR-RFLP od *nodD* genske regije utvrđuje se raznolikost istraživanih sojeva na plazmidnoj razini, a korištene su klice NBA12/NBF 12 (Laguerre i sur., 1996). Za restrikcijsku analizu korištena su tri restrikcijska enzima: *MspI*, *HaeIII* i *CfoI* (Roche, Njemačka). Genetska raznolikost autohtonih sojeva provedena je RAPD i rep-PCR metodom. U svrhu amplifikacije kod rep-PCR korištene su klice REP 1R, REP 2I, ERIC 1R i ERIC 2 i BOX A1R, a za RAPD metodu korištene su četiri oligonukleotidne klice (P2,P4,P5,P6). Svojstva odabranih klica kao i temperaturni profili rep-PCR i RAPD opisani su u radovima Sikora i sur. (2002, 2003) i Bradić i sur. (2003). Dendrogrami su konstruirani u R okruženju za statističke izračune i vizualizaciju (verzija 3.0.2; R Core Team, 2013) pomoću programskog paketa „cluster“ (Maechler i sur., 2016). Konstrukcija dendrograma temelji se na genetskoj sličnosti izolata i UPGMA algoritmu.

U svrhu procjene simbiozne učinkovitosti autohtonih i referentnih sojeva, postavljen je vegetacijski pokus po shemi slučajnog bloknog rasporeda u tri ponavljanja. Površinski sterilizirano sjeme sorte Maksimirski ozimi bakterizirano je s autohtonim i referentnim sojevima te posijano u lonce s kvarcnim pijeskom. U fazi pune cvatnje sakupljeno je 10 biljaka po loncu radi utvrđivanja sljedećih parametara: mase suhe tvari kvržica, sadržaj ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke, prinosa zelene mase, prinosa suhe tvari u nadzemnom dijelu biljke.

Rezultati vegetacijskog pokusa su statistički obrađeni putem GenStat V (The Numerical Algorithms Group Ltd., Oxford, UK) statističkog programa.

Table 1. Origin and designation of indigenous field pea rhizobial strains and chemical properties of soil**Tablica 1.** Porijeklo i oznake autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju grašak te kemijske značajke uzoraka tla

Strain designation	Location	pH(H ₂ O)	pH(KCl)	Humic (%)	Total N (%)	AL-P ₂ O ₅ (mg/100 g)	AL-K ₂ O (mg/100 g)
Oznaka soja	Lokacija	pH(H ₂ O)	pH(KCl)	Humus(%)	Ukupni N (%)	AL-P ₂ O ₅ (mg/100 g)	AL-K ₂ O (mg/100 g)
K14	Majurec	6,16	4,75	1,8	0,09	4,60	22
K250	Sv. Ivan Žabno	6,99	5,51	2,3	0,16	6,80	24
K157	Pofuki	6,24	5,06	2,0	0,13	4,60	22
K201	Gregorovec	7,27	6,56	3,6	0,25	34,72	78
K285	Kamešnica	7,05	5,81	2,1	0,14	3,40	20
K556	Marinovec	6,27	4,59	1,9	0,10	1,77	24
K642	Cepidlak	6,06	4,50	2,3	0,15	3,20	18
K16	Gračina	5,37	4,27	2,0	0,13	6,1	15,8
K17	Sv Ivan Žabno	6,12	4,89	1,9	0,11	10,7	17,5
K18	Sv. Petar Čistec	5,66	4,54	1,7	0,08	1,6	13,0
K19	Kloštar Vojakovački	6,75	5,68	1,4	0,08	1,1	8,4
K20	Križevci	7,35	7,15	0,7	0,05	4,8	13,5
K22	Sv. Petar Orehovec	6,54	5,70	3,2	0,20	35,6	23,5
K23	Križevački Ivanac	6,16	4,84	3,2	0,19	7,1	14,5
K24	Komin	6,49	5,12	2,4	0,17	4,6	14,0
K25	Mali Raven	6,14	5,22	2,4	0,17	3,1	14,0
K26	Veliki Raven	5,90	4,94	3,1	0,18	10,5	15,3

REZULTATI I RASPRAVA

Genetska identifikacija izolata iz kvržica stočnog graška provedena je primjenom specifičnih oligonukleotidnih klica koje amplificiraju *nodC* regiju vrste *R. leguminosarum* bv. *viciae* i koja se navodi kao mogući molekularni marker za navedenu vrstu. Utvrđeno je da svi izolati i uključeni referentni sojevi imaju karakteristični fragment veličine oko 220 bp, što potvrđuje njihovu pripadnost navedenoj vrsti. Svi izolati i referentni sojevi analizirani su metodom *nodD* PCR-RFLP kojom se procjenjuje njihova raznolikost na razini nodulacijskih gena. Nakon restrikcijske analize dobiveni su karakteristični molekularni profili koji su korišteni za izradu zajedničkog dendrograma (Slika 1).

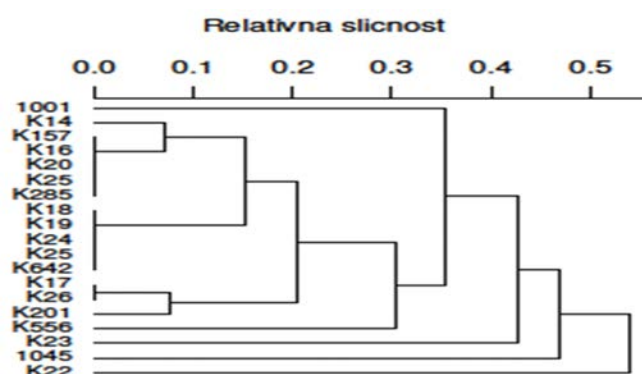


Figure 1. Dendrogram of field pea rhizobial strains derived from combined *MspI*, *HaeIII* and *CfoI* restriction patterns of amplified *nodD* gene fingerprints

Slika 1. Dendrogram sojeva koji noduliraju grašak konstruiran na osnovi molekularnih profila dobivenih nakon restrikcijske analize amplificiranine *nodD* genskih profila primjenom enzima *MspI*, *HaeIII* i *CfoI*

Na osnovu *nodD* genskih profila većina istraživanih sojeva ima vrlo srodne nodulacijske regije, a najveće razlike u spomenutoj regiji su utvrđene kod referentnih sojeva 1001 i 1045 i dva izolata K23 i K22. Za procjenu genetske raznolikosti autohtonih i referentnih sojeva korištena je rep-PCR metoda. Dendrogram na slici 2 pokazuje da se istraživani sojevi mogu na osnovu njihovih rep-PCR profila podijeliti u dvije glavne grupe. Prva grupa sadrži dva soja, referentni 1001 i izolirani soj K16 relativne sličnosti 0,22. Druga glavna grupa sadrži ostale istraživane sojeve relativne sličnosti 0,27, a najveća sličnost je utvrđena među sojevima K25 i K24 te K642 i K14. Primjenom RAPD metode, ukupna genomska DNA iz 19 sojeva je amplificirana pomoću četiri različite oligonukleotidne klice.

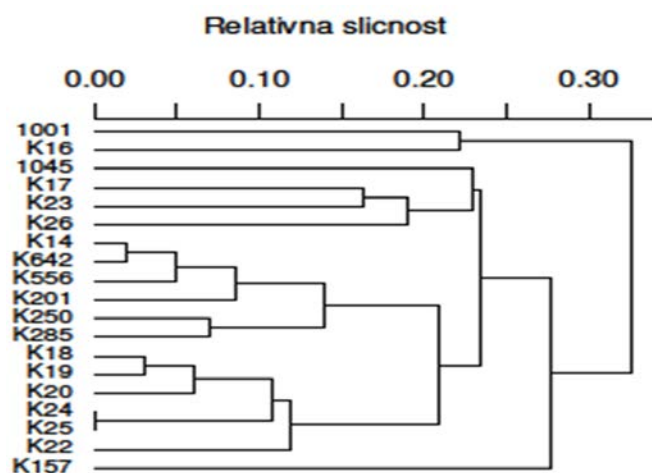


Figure 2. Dendrogram of indigenous and reference field pea rhizobial strains derived from rep-PCR fingerprints generated using ERIC, BOX, REP primers

Slika 2. Dendrogram autohtonih i referentnih sojeva koji noduliraju grašak dobiven na osnovi rep-PCR profila dobivenih primjenom ERIC, BOX, REP klica

Dendrogram na slici 3 pokazuje da se istraživani sojevi mogu podijeliti u dvije glavne grupe i to na razini relativne sličnosti 0,63. Prva glavna grupa obuhvaća referentne sojeve i autohtoni soj K16. Druga glavna grupa obuhvaća većinu autohtonih sojeva od kojih najviše izdvaja soj K26. Uspoređujući rezultate RAPD-i rep-PCR metode s PCR-RFLP *nodD* regije, vidljivo je da se autohtoni soj K16 značajno razlikuje od ostalih izoliranih sojeva, ali ne i u pogledu gena za nodulaciju. Slični rezultati potvrđeni su u rezultatima drugih autora odnosno da varijabilnost ukupne DNA nije u korelaciji s varijabilnosti nodulacijske

genske regije (Laguerra i sur., 1996; Mutch i Young, 2004; Depret i sur., 2004, Kajić i sur. 2019). Rezultati svih korištenih metoda ukazuju da se referentni sojevi bitno razlikuju od svih izoliranih sojeva i to na osnovu ukupne genomske DNA kao i na osnovu nodulacijskih gena.

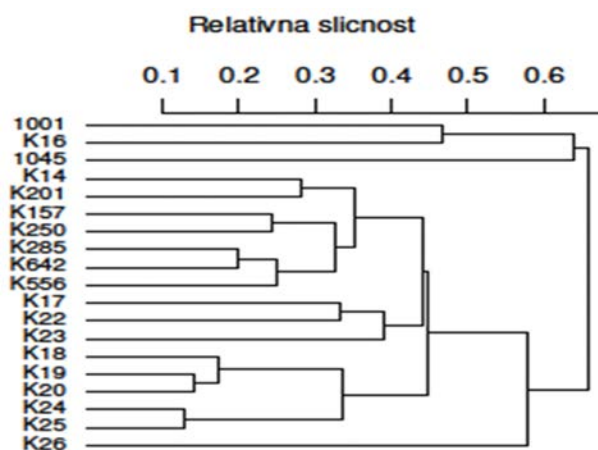


Figure 3. Dendrogram of indigenous and reference field pea rhizobial strains derived from RAPD fingerprints generated using four different primers

Slika 3. Dendrogram autohtonih i referentnih sojeva rizobija koje noduliraju stočni grašak dobiven na osnovi RAPD profila primjenom četiri različite klice

U cilju procjene simbiotične učinkovitosti te kompatibilnosti između istraživanih sojeva i stočnog graška sorte Maksimirski ozimi, postavljen je vegetacijski pokus u plasteniku. Utvrđeno je da svi istraživani sojevi imaju sposobnost nodulacije i uspostavljaju simbiotičnog odnosa sa korištenom sortom stočnog graška. Statističkom obradom podataka za masu suhe tvari kvržica po biljci utvrđene su značajne razlike između istraživanih sojeva kao i u odnosu na kontrolne varijante (Tablica 2). Masa suhe tvari kvržica je parametar koji nam govori o infektivnosti soja to jest o njegovoj sposobnosti da izazove tvorbu kvržica na korijenu stočnog graška. Najveće vrijednosti za masu suhe tvari kvržica po biljci utvrđene su primjenom soja K23 koja se signifikantno ne razlikuje u odnosu na masu suhe tvari kvržica dobivene bakterizacijom s sojevima K22 i K17. Dakle radi se o sojevima koji imaju veću sposobnost nodulacije biljke domaćina. Međutim sojevi koji imaju veću nodulacijsku sposobnost ne moraju uvijek biti i visoko učinkoviti. Učinkovitost nekog bakterijskog soja uvjetovana je genetskim faktorima samog soja i biljke domaćina (Argaw i Mnalku, 2017).

Table 2. Results from greenhouse studies performed to provide information about nodulation and symbiotic efficiency of tested strains**Tablica 2.** Rezultati vegetacijskog pokusa provedenog u cilju procjene sposobnosti nodulacije i simbiozne učinkovitosti ispitivanih sojeva

Strain	Nodule dry matter weight/ plant (g)	Green mass yield (g)	Dry matter yield in aboveground plant parts(g)	Nitrogen content in plant (%)
Soj	Masa suhe tvari kvržica/ biljka (g)	Prinos zelene mase (g)	Prinos suhe tvari u nadzemnom djelu biljke(g)	Sadržaj ukupnog dušika u biljci (%)
Kontrola (S ₀)	0,000	9,93	3,05	2,50
K14	0,026	34,93	9,80	3,69
K250	0,022	33,27	9,81	3,73
K157	0,025	28,13	9,20	2,98
K201	0,028	42,30	10,74	3,65
K285	0,024	34,83	9,45	3,26
K556	0,028	43,40	11,57	3,76
K642	0,027	45,93	12,90	3,59
K16	0,026	55,27	15,89	4,00
K17	0,041	45,80	11,76	3,77
K18	0,029	48,30	11,83	4,29
K19	0,029	38,13	11,02	3,41
K20	0,039	54,40	14,05	3,67
K22	0,046	53,90	13,88	3,81
K23	0,052	45,10	11,05	4,05
K24	0,030	50,97	13,77	3,85
K25	0,024	37,00	9,83	3,69
K26	0,033	66,43	14,21	4,16
1001	0,028	40,13	10,84	3,98
1045	0,030	51,50	13,03	3,35
	LSD	LSD	LSD	
	P _{5%} = 0,016	P _{5%} = 15,12	P _{5%} = 2,81	

U cilju procjene simbiozne učinkovitosti istraživanih sojeva određivan je prinos zelene mase, sadržaj ukupnog dušika i suhe tvari u nadzemnom dijelu biljke. Prinos zelene mase je parametar od velike važnosti za uzgoj stočnog graška koji je prvenstveno krmna kultura namijenjena ishrani stoke te je bitno dobiti što veće prinose zelene mase. Signifikantno najniži prinos zelene mase je utvrđen kod nebakteriziranih varijanti u odnosu na bakterizaciju svim ispitivanim sojevima. Najveći prinos

zelene mase ostvaren je bakterizacijom s autohtonim sojem K26 koji se signifikantno ne razlikuje od prinosa zelene mase su dobivene bakterizacijom sojevima K16, K20, K22 i referentnim sojem 1045. Signifikantno viši prinosi suhe tvari u nadzemnom dijelu biljke ostvareni uz bakterizaciju istraživanim sojevima u odnosu na prinos suhe tvari bez bakterizacije. Najviši prinos suhe tvari ostvaren je uz primjenu autohtonog soja K16 koji se značajno ne razlikuje od prinosa suhe tvari ostvarenog

uz bakterizaciju sojevima K26, K 20, K22 i K 24. Signifikantno niži prinosi postignuti su bakterizacijom s ostalim ispitivanim sojevima.

U cilju procjene simbiozne učinkovitosti ispitivanih autohtonih i referentnih sojeva izmjerene su i prosječne vrijednosti sadržaja ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke. Najniži sadržaj ukupnog dušika izmjeren je kod biljaka bez bakterizacije, a najviši kod biljka bakteriziranih sojem K18. Sadržaj dušika u nadzemnom dijelu bakteriziranih varijanata kreće se od 2,98% (soj 157) do 4,29%. Bakterizacija stočnog graška pokazala se kao opravdana agrotehnička mjera jer se primjenom svih ispitivanih sojeva postigao opravdano veći sadržaj ukupnog dušika u biljci, prinos zelene mase i prinos suhe tvari u odnosu na nebakterizirane varijante. Na osnovu izmjerenih vrijednosti prinosa zelene mase i suhe tvari, autohtoni sojevi K16, K26 mogu se smatrati simbiozno najučinkovitiji, a potom slijede sojevi K20 i K22. Među slabo učinkovite sojeve ubrajaju se autohtoni soj K157, jer su biljke bakterizirane navedenim sojem imale signifikantno viši prinos zelene mase i suhe tvari jedino od biljaka koje nisu bakterizirane. U pogledu utvrđivanja povezanosti između rasprostranjenosti autohtonih sojeva i ekoloških uvjeta određenog staništa, provedene su kemijske analize tla iz kojih su izolirani autohtoni sojevi. Autohtoni sojevi koji su obuhvaćeni ovim istraživanjima, izolirani su iz tla različitih kemijskih karakteristika. Tla su praktički neutralne do jako kisele reakcije tla, slabo i dosta humozna, kao i različito opskrbljena dušikom, fiziološki aktivnim kalijem i fosforom. Dakle, autohtona populacija sojeva koji noduliraju stočni grašak prisutna je u različitim ekološkim uvjetima u tlu (Tablica 1). Učinkoviti autohtoni sojevi K26 i K16 izolirani su s područja Gračina i Velikog Ravena iz tla kisele do jako kisele reakcije, slabo i dosta humoznog s osrednjim sadržajem fiziološki aktivnog fosfora i kalija. Na osnovu iznesenih podataka utvrđeno je postojanje simbiozno učinkovitih sojeva rizobija koji su prilagođeni nepovoljnijim karakteristikama tla. Rezultati vegetacijskog pokusa su pokazali da navedeni sojevi koji imaju istu simbioznu učinkovitost kao i sposobnost stvaranja kvržica, u pogledu tipa kemijskih karakteristika

tla iz kojeg su izolirani, značajno su razlikuju. Navedeni rezultati se navode i kod drugih autora koji su karakterizirali prirodne populacije simbioznih fiksatora dušika (Sikora i Redžepović, 2003; Grossman i sur. 2005; Cauwenberghe i sur. 2015). Međutim, posebno treba istaknuti prednost autohtonih sojeva koja se očituje u njihovoj puno boljoj adaptiranosti na nepovoljne uvjete u tlu obzirom da su sojevi sa najvećom simbioznom učinkovitošću izolirani iz kiselih odnosno jako kiselih tala.

ZAKLJUČAK

Utvrđeno je postojanje autohtonih sojeva rizobija koji noduliraju stočni grašak u svim istraživanim uzorcima tala s područja sjeverozapadne Hrvatske. Primjenom molekularnih metode utvrđena je znatna genetska varijabilnost, a osobito se od svih izolata izdvaja soj K16. Većina autohtonih sojeva ima istu ili vrlo sličnu nodulacijsku *nodD* gensku regiju, osim izolata K22 i K23 koji su pokazali i veću nodulacijsku sposobnost. Utvrđena je djelomična podudarnost u raznolikosti ispitivanih sojeva na razini ukupne DNA i razini plazmidnih nodulacijskih gena. Procjenom simbiozne učinkovitosti ispitivanih sojeva na osnovu prinosa zelene mase i suhe tvari izdvojeni su autohtoni sojevi K26, K16, K20 i K22. Spomenuti autohtoni sojevi K16 i K26 daju i visok sadržaj ukupnog dušika u nadzemnom djelu biljke pa bi ih se moglo izdvojiti kao potencijalno visoko učinkovite sojeve. Rezultate istraživanja u kontroliranim uvjetima potrebno je provjeriti u poljskim uvjetima kao i na većem broju kultivara stočnog graška kako bi se utvrdile najbolje simbiozne zajednice sorte biljke domaćina i soja na tlima različitih svojstava. Sva navedena istraživanja su u cilju selekcije najučinkovitijih sojeva koji se koristili za pripremu kvalitetnog komercijalnog inokuluma kod predstjetvene bakterizacije stočnog graška.

LITERATURA

- Argaw, A., Mnalku, A. (2017) Symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from major highland pulses on field pea (*Pisum sativum* L.) in soil with abundant rhizobial population. *Annals of Agrarian Science*, 15, 410-419.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.005>

- Ballard, R.A., Charman, N., McInnes, A., Davidson J.A. (2004) Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1347-1355. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.016>
- Blažinkov, M., Sikora, S., Uher, D., Mačević, D., Redžepović, S. (2007) Genotypic characterisation of Indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Fiel Population in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72, 153-158.
- Blažinkov, M., Šnajder, A., Barić, K., Sikora, S., Rajnović, I., Redžepović, S. (2014) Utjecaj herbicida na rast sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju grašak (*Pisum sativum* L.). *Agronomski glasnik*, 4-5, 183-191.
- 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, 69-75.
- Brkić, S., Milaković, Z., Kristek, A., Antunović, M. (2004). Pea yield and its quality depending on inoculation, nitrogen and molybdenum fertilization. *Plant soil Environment*, 50, 39-45.
- Cardoso, A.A., Andraus, M.P., de Oliveira Borba, T.C., Garcia Martin-Didonet, C.C., Petrônio de Brito Ferreira, E. (2017) Characterization of rhizobia isolates obtained from nodules of wild genotypes of common bean. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 43-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.002>
- Cauwenberghe, J., Michiels, J., Honnay, O. (2015) Effects of local environmental variables and geographical location on the genetic diversity and composition of *Rhizobium leguminosarum* nodulating *Vicia cracca* populations. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 71-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.001>
- Čupić, T., Popović, S., Gantner, R., Tucak, M., Sudar, R. (2010) Procjena nutritivne vrijednosti cijele biljke bezlišnog tipa krmnog graška u proizvodnji mlijeka. *Mljekarstvo*, 60, 266-272.
- Depret, G., Houot, S., Allard, M., Breuil, M., Nouam, R., Laguerre, G. (2004) Long-term effect of crop management of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 87-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.009>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.12.008>
- Kajić, S., Blažinkov, M., Rajnović, I., Burek Svetec, N., Lekčević, M., Sikora, S. (2019) Phenotypic and genotypic diversity of *Sinorhizobium meliloti* strains isolated from soils in Zadar County. *Journal of Central European Agriculture*, 20 (4), 1116-1125. DOI: <https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.4.2436>
- Krizmanić, G., Čupić, T., Tucak, M., Popović, S. (2015) Utjecaj roka košnje i gnojidbe dušikom na agronomska svojstva ozimog graška (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.). *Poljoprivreda*, 21, 35-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.18047/poljo.21.1.6>
- Krizmanić, G., Čupić, T., Tucak, M., Popović, S. (2017) Agronomska vrijednost oplemenjivačkih linija i sorti jarog stočnog graška (*Pisum sativum* L.) za proizvodnju voluminozne kreme. *Poljoprivreda*, 23, 17-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.18047/poljo.23.1.3>
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M., Charnay, M., Louvrier, P., Mazurier, S., Rigottier-Gois, L., Amarger, N. (1996) Typing of Rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2029-2036.
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K. (2016) Cluster: cluster analysis basics and extensions. R package version 2.0. 4. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.009>
- Mutch, L. A., Young, J.P.W. (2004) Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. *Molecular Ecology*, 13, 2435-2444. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x>
- Riah, N., Béna, G., Djekoun, A., Heulin, K., Laguerre, G. (2014) Genotypic and symbiotic diversity of *Rhizobium* populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 368-375. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.008>
- R Core Team (2013) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sikora, S., Redžepović, S., Bradić, M. (2002) Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. *Microbiological Research*, 157, 157-160.
- Sikora S., Redžepović S. (2003) Genotypic characterization of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR, rep-PCR and RAPD analysis. *Food Technology and Biotechnology*, 41 (1), 61-67.
- Štafa, Z. (1997) Sjetva krmnog (stočnog) graška. *Gospodarski list*, 16, 47.
- Topol, J., Kanižai Šarić, G. (2013) Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. *Agronomski glasnik*, 2-3, 117-134.
- Uher, D., Blažinkov, M., Pisačić, A., Gršić, K., Županac, G. (2009) Značenje novoga genotipa ozimoga graška u proizvodnji mlijeka na obiteljskim gospodarstvima. *Mljekarstvo*, 59, 319-329.
- Vincent, J. M. (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *International Biological Programme Handbook No 15*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.