

Identification of Indigenous *Bradyrhizobium japonicum* Strains Isolated from Different Soil Types in Western Slavonia

Sanja SIKORA
Sulejman REDŽEPOVIĆ

SUMMARY

Fast and reliable strain identification methods are needed for studying *Bradyrhizobium japonicum* field population as well as for the selection the most efficient strains for commercial inoculant production. The main aim of the present investigation was to compare different methods for identification of indigenous *B. japonicum* strains isolated from different soil types in western Slavonia. Physiological tests, intrinsic antibiotic resistance, SDS-PAGE (sodium dodecil sulphate polyacrilamide gel electrophoresis) of total cell proteins and RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis were used for strains identification and the assessment of variability within natural *B. japonicum* population. The results of each method were converted to two-dimensional binary matrix and dendrograms, showing relative similarity among *B. japonicum* strains, were obtained by using biostatistical NTSYS programe. The results showed that among all the methods used in this work, that RAPD analysis was the most sensitive and reliable for strain identification. The lowest level of differentiation among *B. japonicum* strains were determined by using intrinsic antibiotic resistance. All the methods used in this work, with the exception of intrinsic antibiotic resistance, revealed that all field isolates essentially differed from commercial strains and so can be regarded as indigenous strains for that area. Protein and RAPD profiles very clearly indicated that among natural field population two highly divergent group of strains can be determined.

KEY WORDS

***Bradyrhizobium japonicum*, indigenous strains, nitrogen fixation, strain identification**

Department of Microbiology
Faculty of Agriculture University of Zagreb
Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Croatia
E-mail: ssikora@agr.hr

Received: September 20, 2000

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully acknowledge the help of prof.dr. Jasna Kniewald and Mihela Jakominić, M.S. (Department for Chemistry and Biochemostrы- Laboratory for Toxicology, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb) with the strain identification by using SDS-PAGE of total cell proteins.



Identifikacija autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* izoliranih iz različitih tipova tala zapadne Slavonije

Sanja SIKORA
Sulejman REDŽEPOVIĆ

SAŽETAK

Proučavanje prirodne populacije *Bradyrhizobium japonicum* kao i selekcija najučinkovitijih sojeva za komercijalnu proizvodnju, nameće potrebu za brzim i pouzdanim metodama identifikacije. Glavni cilj ovih istraživanja je komparacija različitih metoda za identifikaciju autohtonih sojeva *B. japonicum* izoliranih iz različitih tipova tala zapadne Slavonije. Fiziološki testovi, ispitivanje otpornosti na antibiotike, SDS-PAGE (sodium dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza) ukupnih staničnih proteina i RAPD (random amplified polymorphic DNA) analiza, korišteni su za identifikaciju sojeva i utvrđivanje varijabilnosti unutar prirodne populacije *B. japonicum*. Rezultati svake navedene metode prevedeni su u dvodimenzionalnu binarnu matricu i nakon analize podataka primjenom biostatističkog NTSYS programa, dobiven je dendrogram koji pokazuje relativnu sličnost između istraživanih sojeva. Na osnovi rezultata svih primjenjenih metoda utvrđeno je da je RAPD analiza najosjetljivija i najpouzdanija za identifikaciju sojeva. Najmanje razlike između *B. japonicum* sojeva utvrđene su ispitivanjem otpornosti na antibiotike. Na osnovi rezultata svih metoda, sa iznimkom prirodne otpornosti na antibiotike, utvrđeno je da se izolati bitno razlikuju od referentnih sojeva iz komercijalnog inokuluma te se mogu smatrati autohtonim za to područje. Proteinski i RAPD profili jasno su ukazali na postojanje dvaju bitno različitih grupa sojeva unutar prirodne populacije.

KLJUČNE RIJEČI

autohtoni sojevi, *Bradyrhizobium japonicum*, fiksacija dušika, identifikacija sojeva

Zavod za mikrobiologiju
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
E-mail: ssikora@agr.hr
Primljeno: 20. rujna 2000.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se prof.dr. Jasni Kniewald i mr. Miheli Jakominić (Zavod za kemiju i biokemiju - Laboratorij za toksikologiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta) na pomoći pri identifikaciju sojeva primjenom SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina.



UVOD

Bakterija tla, *Bradyrhizobium japonicum*, koja ima sposobnost vezivanja atmosferskog dušika u simbioznom odnosu sa sojom, je od izuzetne važnosti za poljoprivrednu proizvodnju. Predsjetvena bakterizacija sjemena soje učinkovitim sojevima *B. japonicum* je postala redovita agrotehnička mjera u Hrvatskoj budući se na ovaj način može znatno reducirati gnojidba mineralnim dušikom što ima značajne ekonomske i ekološke posljedice. Poznato je da se različiti sojevi *B. japonicum* međusobno znatno razlikuju po svojoj simbioznoj učinkovitosti. Zbog toga je selekcija visoko učinkovitih sojeva od presudnog značaja u proizvodnji preparata za bakterizaciju. Međutim, glavna poteškoća kod uvođenja novih sojeva kvržičnih bakterija u određeni okoliš je problem kompeticije sa visoko adaptiranim autohtonim sojevima i ponekad sa nepovoljnim uvjetima okoliša. U mnogim slučajevima, ovi infektivni autohtoni sojevi ne fiksiraju dušik tako učinkovito kao komercijalni sojevi iz inokuluma. Mnogi čimbenici kao što su utjecaj rizosfere, voda, pH tla, salinitet, temperatura, toksini i predatori te utjecaj raznih pesticida i mineralne gnojide dušikom, interakcijski djeluju i utječu na nodulaciju leguminoza sa vrlo raznolikim sojevima kvržičnih bakterija (Redžepović et al. 1990, Redžepović et al. 1991).

Identifikacija sojeva određene vrste kvržičnih bakterija je važna za bolje razumijevanje i uspješnije iskorištavanje prirodnog procesa fiksacije atmosferskog dušika. To se naročito odnosi na selekciju najkvalitetnijih sojeva za komercijalnu proizvodnju kao i kod proučavanja ekologije i kompeticijskih odnosa koji vladaju u prirodnim sredinama. Obzirom na značaj proučavanja prirodne populacije *B. japonicum* i nedostatak takvih podataka za naša uvjete, ovim istraživanjima započelo se sa izolacijom i identifikacijom autohtonih sojeva u tlima zapadne Slavonije. Međutim, identifikacija sojeva *B. japonicum* i posebno autohtonih izolata neprekidno ostaje jedna od glavnih poteškoća kod proučavanja učinkovitosti i kompeticije premda postoje vrlo različite metode koje se koriste u tu svrhu. Problem je što metode za diferencijaciju često vrlo srodnih sojeva, moraju istovremeno biti pouzdane, dovoljno osjetljive i brze da se mogu primijeniti na veliki broj sojeva. Danas se primjenjuju raznovrsne metode za identifikaciju sojeva kvržičnih bakterija zasnovane na fenotipskim ili genotipskim karakteristikama. Kovencionalne metode uključuju različite serološke metode (Keyser et al. 1984, Sawada et al. 1989, Weber et al. 1989, Leung et al. 1994); ispitivanje prirodne otpornosti na antibiotike (Josey et al. 1979, Mueller et al. 1988), proučavanje ukupnih staničnih proteina primjenom SDS-poliakrilamid gel elektroforeze (Roberts et al. 1980, Sadowski et al. 1987, Moreira et al. 1993), utvrđivanje osjetljivosti na bakteriofage (Schmidt et al. 1986), produkcije rhizobitoxina (Devine et al. 1988). Pojedine metode su se s vremenom pokazale nedovoljno specifičnim i osjetljivim budući je više različitih sojeva moglo biti identično označeno. Postalo je jasno da je

potrebna tehnika koja će omogućiti identifikaciju baziranu na ukupnoj genetskoj konstituciji stanice prije nego na nekoliko izabраниh svojstava. U novije vrijeme, razvijene su različite tehnike koje diferenciraju sojeve na molekularnom nivou i koje se široko primjenjuju za karakteriziranje sojeva i utvrđivanje genetske raznolikosti i odnosa između različitih organizama (Caetano-Anolles et al. 1991, Hartman i Amarger 1991, de Brujin 1992, Minamisawa et al. 1992). Među različitim molekularnim metodama, utvrđeno je da RAPD (random amplified polymorphic DNA) analiza je vrlo korisna i jednostavna metoda za brzu diferencijaciju sojeva (Mazurier et al. 1992, Dooley et al. 1993, Fani et al. 1993). Razlike između određenih sojeva utvrđene su komparirajući polimorfizam amplificiranih DNA fragmenata uz primjenu kratkih oligonukleotidnih primera arbitrarne sekvence.

Glavni cilj ovih istraživanja je izolacija i identifikacija autohtonih sojeva *B. japonicum* iz različitih tipova tala zapadne Slavonije. Obzirom da nema univerzalno prihvaćene metode za identifikaciju sojeva, ovim istraživanjima želi se procijeniti prikladnost i pouzdanost različitih metoda za diferencijaciju *B. japonicum* sojeva i utvrđivanje varijabilnosti unutar prirodne populacije.

MATERIJAL I METODE

Uzimanje uzoraka tla

Uzorcima tla za izolaciju sojeva *B. japonicum* uzimani su sa poljoprivrednih površina zapadne Slavonije koje se koriste za intenzivnu ratarsku proizvodnju. Sojevi *B. japonicum* izolirani su iz oraničnog horizonta slijedećih tipova tala: aluvijalno karbonatno oglejeno i neoglejeno, aluvijalno nekarbonatno oglejeno, eutrično smeđe, lesivirano na lesu, pseudoglej na zaravni, hipoglej mineralni, pseudoglej-glej, amfiglej mineralni i euglej vertični. Ovim istraživanjima su obuhvaćene površine od ukupno cca 4000 ha. Fizikalne i kemijske karakteristike navedenih tipova tala detaljno su obrađene u Pedološkoj studiji za potrebe izrade projekta agromelioracija Čačavica (Vidaček et al., 1991).

Izolacija sojeva *B. japonicum*

Površinski sterilizirano sjeme soje (sorta Hrvatica) posijano je direktno u sakupljene uzorke tla pod bakteriološki kontroliranim uvjetima u stakleniku. U fazi pune cvatnje, sa korijena soje uzete su kvržice iz kojih su dalje izolirani sojevi *B. japonicum* standardnom postupkom (Vincent, 1970). Nakon postupka izolacije iz kvržica i pročišćavanja tako dobivenih kultura proveden je test provjere autentičnosti izolata u inertnom supstratu pod kontroliranim uvjetima (Vincent, 1970). Ukupno je izolirano preko 30 čistih kultura, od kojih je 13 korišteno za daljnju identifikaciju i karakterizaciju (tab.1). Dva soja *B. japonicum* iz komercijalnog inokuluma (D 344 i USDA 311 b 122, Beltsville -Hup⁺) također su uključena u ispitivanja kao referentni sojevi (S1 i S2).

Tablica 1. Porijeklo izolata *B. japonicum*
Table 1. Origins of *B. japonicum* isolates

Tip tla Soil type	Broj profila Profile number	Oznaka izolata Isolate designation
Pseudoglej glej - Pseudogley-gley	P-177	S3
Euglej vertični - Eugley vertic	P-199	S4
Amfiglej mineralni - Amphigley mineral	P-205	S5
Aluvijalno karb. oglej.- Fluvisol calcareous gleyic	P-113	S6
Lesivirano na lesu - Luvisol on loess	P-131	S7
Aluvijalno karb. neoglej. - Fluvisol calcareous non-gleyic	P-143	S8
Pseudoglej na zaravni - Pseudogley on level terrain	P-125	S9
Aluvijalno nekarb. oglej. - Fluvisol non-calcareous gleyic	P-151	S10
Aluvijalno karb. oglej. - Fluvisol calcareous gleyic	P-113	S11
Eutrično smeđe - Eutric cambisol	P-133	S12
Hipoglej mineralni - Hipogley mineral	P-141	S13
Pseudoglej na zaravni - Pseudogley on level terrain	P-189	S14
Pseudoglej na zaravni - Pseudogley on level terrain	P-227	S15

Fiziološki testovi

Metoda auksenograma korištena je za određivanje izvora ugljika koje ispitivani sojevi *B. japonicum* mogu usvajati (Smibert i Krieg, 1994). Ispitivanja su izvršena na pločama sa YMA podlogom (Vincent, 1970), samo bez dodatka manitola, koje su inokulirane odgovarajućim sojem *B. japonicum*. Na suhu površinu inokulirane hranjive podloge nanešeni su sterilni filter diskovi koji su prethodno impregnirani 10% otopinom odgovarajućeg ugljikohidrata. Nakon inkubacije na 28°C promatran je rast kulture.

Sojevi *B. japonicum* testirani su na sposobnost usvajanja slijedećih ugljikohidrata: ksiloze, arabinoze, ramnoza monohidrata, fruktoze, glukoze, galaktoze, manoze, celobioze, laktoze monohidrata, maltoze, melibioze, saharoze, trehaloze dihidrata, melezitioze, rafinoze pentahidrata, salicina, adonitola, manitola sorbitola i inozitola.

Prirodna otpornost na antibiotike

Svi izolati i referentni sojevi testirani su na prirodnu otpornost na slijedeće antibiotike: ampicilin (25 i 50 µg/ml), eritromicin (100 i 250 µg/ml), kanamicin (50 µg/ml), karbenicilin (500 i 600 µg/ml), kloramfenikol (100 i 500 µg/ml), nalidiksična kiselina (30 i 50 µg/ml), penicilin (25 i 50 µg/ml), rifampicin (100 i 500 µg/ml), streptomycin 100 µg/ml i tetraciklin (30 i 100 µg/ml). Ispitivani antibiotici su u navedenim koncentracijama unešeni u YMA podlogu, a inokulum je bila tekuća kultura različitih sojeva *B. japonicum*. Rezultati su očitani nakon 5 i 10 dana inkubacije na 28°C.

SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina

Ukupni stanični proteini su ekstrahirani iz svih sojeva *B. japonicum* (Smibert i Krieg, 1994) i analizirani primjenom sodium dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeze (SDS-PAGE) prema nešto modificiranoj metodi Laemmly (1970). Dimenzije korištenih gelova su 10.2 cm x 8.2 cm x 1.5 mm. Svaki gel sastoji se od

4% akrilamidnog gela za koncentriranje (gornji dio) i 12.6% akrilamidnog gela za razdvajanje (donji dio). U svaku jažicu nanešeno je 30 µl uzorka koji sadrži 25 µg proteina. Elektroforeza je provedena kod konstantne struje od 40 mA. Nakon elektroforeze gelovi su obojeni koristeći 0.1% otopinu boje komasin plavo.

RAPD analiza

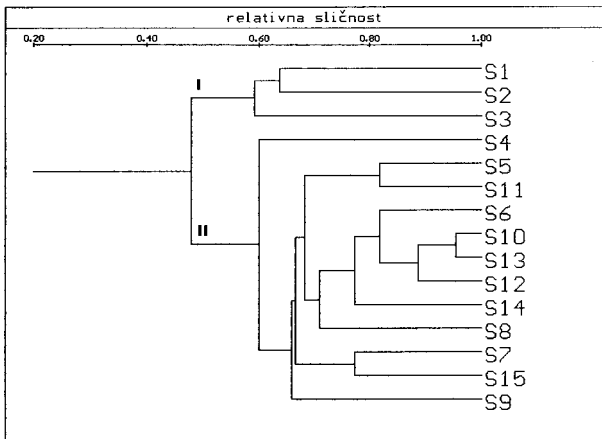
Izolacija ukupne genomske DNA kao i uvjeti PCR amplifikacije opisani su u radu Sikora et al. (1997). U navedenom radu, korišteno je šest različitih oligonukleotidnih primera sa GC sadržajem od 70% dok su u ova istraživanja uključena još dodatno četiri primera sa GC sadržajem 50% i slijedećih sekvenci (5'-3'): P7-TCGATACAGG, P14- GATCAAGTCC, P16-GATCCACGTAC, P20- GATCAATCGC.

Analiza podataka

Podaci svake korištene metode su prevedeni u dvodimenzionalnu binarnu matricu i analizirani primjenom biostatističkog programa NTSYS-pc (Rohlf, 1990). Za svaki par sojeva izračunat je Sm koeficijent (simple matching) dok je UPGMA algoritam korišten za hijerarhijsku klaster analizu i konstrukciju dendrograma.

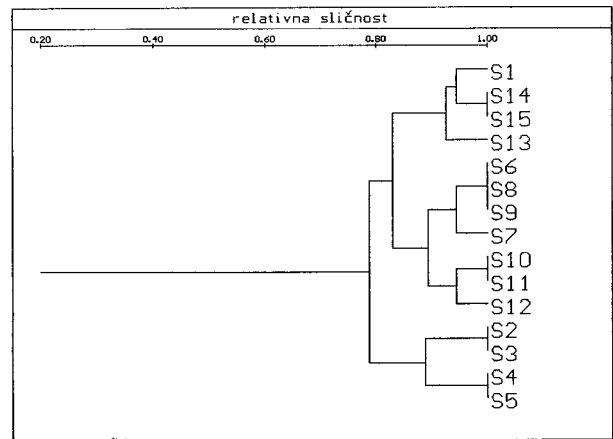
REZULTATI

U cilju karakterizacije izolata *B. japonicum* i utvrđivanja varijabilnosti unutar prirodne populacije, određivan je odnos ispitivanih sojeva prema različitim ugljikohidratima. Ispitano je 20 različitih monosaharida, disaharida, trisaharida, polisaharida, glukozida i polihidroksi spojeva kao potencijalnih izvora ugljika za različite sojeve *B. japonicum*. Rezultati (slika 1.) pokazuju da su najveće razlike utvrđene između referentnih sojeva (S1 i S2) i soja S3 u odnosu na sve ostale izolate (relativna sličnost 0.48). Sojevi S1, S2 i S3 sačinjavaju prvi glavni klaster dok je ostalih 12 izolata grupirano u drugi. Premda su referentni sojevi i izolati



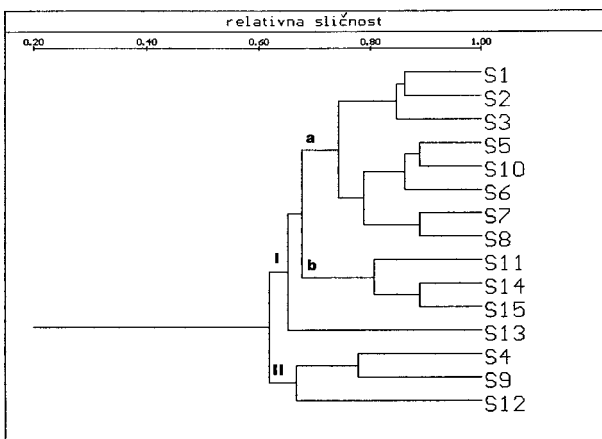
Slika 1. Dendrogram *B. japonicum* sojeva dobiven na osnovi podataka o sposobnosti iskorištavanja različitih supstrata

Figure 1. Dendrogram of *B. japonicum* strains derived from substrate utilization data



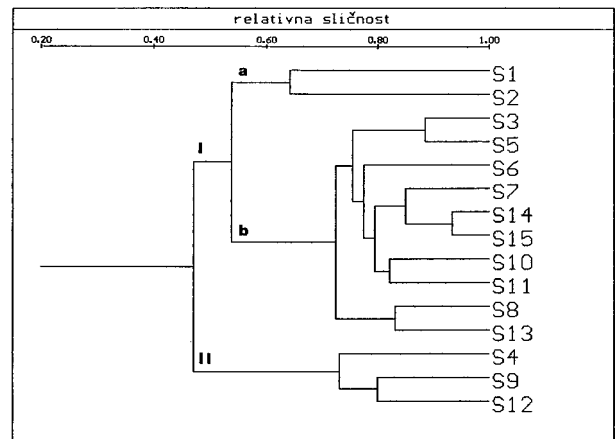
Slika 2. Dendrogram *B. japonicum* sojeva dobiven na osnovi podataka o prirodnoj otpornosti na antibiotike

Figure 2. Dendrogram of *B. japonicum* strains derived from intrinsic antibiotic resistance data



Slika 3. Dendrogram *B. japonicum* sojeva dobiven na osnovi proteinskih profila primjenom SDS-PAGE

Figure 3. Dendrogram of *B. japonicum* strains derived from protein profiles by using SDS-PAGE



Slika 4. Dendrogram *B. japonicum* sojeva dobiven na osnovi RAPD profila uz primjenu 10 različitih oligonukleotidnih primera

Figure 4. Dendrogram of *B. japonicum* strains derived from RAPD profiles generated by using 10 different oligonucleotide primers

S3 grupirani u zajednički klaster i između njih postoje znatne razlike. Stupanj sličnosti za referentne sojeve iznosi 0.64, a za soj S3 0.59. U drugoj glavnoj grupi sojeva, soj S4 se izdvaja od ostalih (relativna sličnost 0.60) kao i soj S9 (relativna sličnost 0.66).

Osim toga, ispitivana je otpornost svih sojeva *B. japonicum* na 10 antibiotika u različitim koncentracijama. Poznato je da se sojevi kvržičnih bakterija međusobno znatno razlikuju po svojoj otpornosti na antibiotike pa se i ta karakteristika često koristi pri opisivanju i identifikaciji sojeva. Međutim, u ovim istraživanjima nisu utvrđene veće razlike između sojeva na osnovi njihove otpornosti na ispitivane antibiotike. Samo kod slijedeća četiri antibiotika - eritromicin (100 µg/ml), nalidiksična kiselina (30 i 50 µg/ml), rifampicin (100 i 500 µg/ml) i penicilin (50 µg/ml) utvrđene su izvjesne razlike između ispitivanih sojeva dok su kod primjene ostalih antibiotika dobiveni isti rezultati za sve

sojeve. Tako su svi sojevi otporni na ampicilin (25 i 50 µg/ml), karbenicilin (500 i 600 µg/ml), penicilin (25 µg/ml) dok su svi pokazali osjetljivost u slučaju primjene tetraciklina (30 i 100 µg/ml), streptomcina (100 µg/ml), kloramfenikola (100 i 500 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) i eritromicina (250 µg/ml). Dendrogram (slika 2.) pokazuje da je utvrđen visoki stupanj sličnosti između sojeva na osnovi ovoga svojstva (relativna sličnost >0.90).

Proteinski profili svih ispitivanih sojeva, dobiveni primjenom SDS-PAGE, prevedeni su u dvodimenzionalnu binarnu matricu i kao rezultat provedene klaster analize konstruiran je dendrogram (slika 3.) koji prikazuje relativnu sličnost između ispitivanih izolata. Broj proteina korištenih za klaster analizu kretao se od 12-15 po soju, a molekularne mase tih proteina bile su u rasponu od 9.79 do 105.21 kDa. Ukupan broj različitih proteina korištenih za diferencijaciju sojeva iznosio je 36 budući

je dio molekularnih masa bio zajednički za sve ili više sojeva. Dendrogram (slika 3.) pokazuje da se na osnovi proteinskih profila, svi ispitivani sojevi mogu podijeliti u dvije glavne grupe (relativna sličnost 0.62). Grupa I može se nadalje podijeliti u dvije podgrupe a i b (relativna sličnost 0.68). Većina sojeva je klasterirana unutar proteinske grupe I podgrupe a, uključujući tu i dva referentna soja (S1 i S2). Unutar I grupe sojeva, najveća sličnost utvrđena je između sojeva S5 i S10; S7 i S8 te S14 i S15. Za referentne sojeve utvrđen je stupanj sličnosti od 0.86. Od svih sojeva grupe I, koji predstavljaju 80% ispitivanih sojeva, značajno se razlikuju sojevi S4, S9 i S12 koji se izdvajaju u zaseban klaster- proteinska grupa II. Premda su navedena tri soja grupirana zajedno u odnosu na sve ostale sojeve, i između njih su utvrđene razlike. Sojevi S4 i S9 su međusobno sličniji (relativna sličnost 0.77) u odnosu na soj S12 (relativna sličnost 0.67).

Od molekularnih metoda, korištena je RAPD analiza za identifikaciju sojeva i utvrđivanje genetske varijabilnosti unutar prirodne populacije *B. japonicum*. Ukupna genomska DNA iz 13 izolata i dva referentna soja je amplificirana primjenom deset različitih dekamernih primera. U cilju dobivanja dovoljnog broja polimorfniha fragmenata koji će omogućiti pouzdane komparacije, nakon korištenja šest različitih primera sa GC sadržajem od 70% (Sikora et al. 1997), u ova istraživanja uključena su još četiri primera sa GC sadržajem od 50%. Sa primerima P1-P6 (GC 70%) dobiveni broj polimorfniha fragmenata korištenih za klaster analizu kretao se od 2-14 po soju dok je veličina tih amplificiraniha produkata bila u rasponu od 0.3 do 3.0 kb. Amplifikacija sa primerima P7, P14, P16 i P20 (GC 50%) rezultirala je znatno manjim brojem polimorfniha fragmenata koji se kretao od 1-6 po soju. Očitane vrijednosti za veličinu tih fragmenata bile su u sličnom rasponu kao i sa primerima koji sadrže 70% GC (0.5-2.8 kb). Ukupan broj polimorfniha fragmenata dobiven uz upotrebu dodatnih primera bio je 29, tako da je dendrogram (slika 4.) koji je korišten za diferencijaciju sojeva i proučavanje genetske varijabilnosti prirodne populacije *B. japonicum*, konstruiran na osnovi ukupno 95 polimorfniha fragmenata. Navedeni dendrogram se u svojim glavnim karakteristikama ne razlikuje od dendrograma dobivenog primjenom šest primera sa 70 %GC. Na osnovi RAPD profila svi istraživani sojevi mogu se podijeliti u dvije glavne grupe. Prva grupa, koja obuhvaća većinu sojeva, sastoji se od dvije jasno diferencirane podgrupe. Referentni sojevi (S1 i S2) formiraju jednu podgrupu dok deset izolata *B. japonicum* pripada drugoj podgrupi. Tri izolata (S4, S9 i S12), koji sačinjavaju drugu glavnu grupu sojeva, značajno se razlikuju od svih ostalih analiziranih sojeva (relativna sličnost 0.47). Navedeni rezultati upućuju da ova tri soja predstavljaju vrlo različitu i odvojenu skupinu bradyrhizobia.

RASPRAVA

U ovim istraživanjima, 13 izolata i dva referentna soja *B. japonicum* identificirano je različitim fenotipskim i

genotipskim metodama kako bi se utvrdila najprikladnija i najpouzdanija metoda za diferencijaciju vrlo srodnih sojeva. Osim toga, identifikacija sojeva omogućuje utvrđivanje varijabilnosti unutar prirodne populacije u različitim tipovima tala zapadne Slavonije.

Rezultati dobiveni primjenom različitih metoda jasno ukazuju na značaj izbora odgovarajuće metode za identifikaciju sojeva. Premda su sve korištene metode, sa iznimkom ispitivanja otpornosti na antibiotike, rezultirale u sličnom grupiranju sojeva, stupanj diferencijacije između sojeva *B. japonicum* izrazito je ovisio o primjenjenoj metodi. Najniži stupanj diferencijacije između različitih sojeva utvrđen je primjenom ispitivanja otpornosti na antibiotike. Grupiranje sojeva na osnovi otpornosti na antibiotike ne može se smatrati pouzdanim obzirom da je veći dio rezultata bio istovjetan za sve sojeve. Zbog premalog broja podataka za relevantnu klaster analizu, dendrogram (slika 2.) ne odražava u pravom smislu odnose između analiziranih sojeva. Ispitivanjem sposobnosti iskorištavanja različitih izvora ugljika, utvrđene su znatno veće razlike između sojeva *B. japonicum*. Referentni sojevi izdvojenu su u zasebnu grupu dok se od ostalih izolata izdvajaju sojevi S4 i S9. Primjena SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina i RAPD analize rezultirala je vrlo sličnim grupiranjem sojeva. Na osnovi proteinskih i DNA profila, sojevi S4, S9 i S12 grupirani su u jasno izdvojenu skupinu sojeva koja se bitno razlikuje od svih ostalih izolata kao i referentnih sojeva. Uspoređujući stupanj osjetljivosti ovih dvaju metoda, može se utvrditi da je viši stupanj diferencijacije utvrđen primjenom RAPD analize. Kada se usporedo promatraju rezultati svih primjenjenih metoda za identifikaciju sojeva *B. japonicum*, može se uočiti da je daleko najosjetljivija i najpouzdanija metoda RAPD analiza. Primjenom ove molekularne metode utvrđene su najveće razlike između ispitivanih sojeva koje konvencionalnim metodama nije bilo moguće uočiti. Amplifikacija genomske DNA sa kratkim, slučajno izabranim oligonukleotidnim primerima rezultirala je karakterističnim i informativnim DNA profilima koji su omogućili brzu i pouzdanu identifikaciju sojeva. Rezultati istraživanja drugih autora također su pokazivala da je RAPD analiza vrlo korisna tehnika za identifikaciju i karakterizaciju različitih bakterijskih sojeva (Mazurier et al. 1992, Lawrence et al. 1993, Stephan et al. 1994, Johansson et al. 1995).

Primjena različitih metoda identifikacije pokazala je da se *B. japonicum* izolati bitno razlikuju od referentnih sojeva iz komercijalnog inokuluma i da se mogu smatrati autohtonim sojevima. Osim toga, utvrđena je značajna prirodna varijabilnost unutar prirodne populacije *B. japonicum*. Svi dobiveni rezultati, a posebno primjenom RAPD analize, pokazuju da se tri izolata (S4, S9 i S12) bitno razlikuju od svih ostalih testiranih sojeva budući sačinjavaju jasno odvojenu skupinu bradyrhizobia. Prema drugim autorima (Hollis et al. 1981, Kuykendall et al. 1992, Minamisawa et al. 1992) također je utvrđeno postojanje najmanje dvaju divergentnih skupina bradyrhizobia. U različitim tipovima tala

zapadne Slavonije, utvrđeno postojanje autohtonih sojeva i znate genetske varijabilnosti unutar prirodne populacije *B. japonicum* nameće potrebu za daljnjim istraživanjima koja se prvenstveno odnose na procjenu njihove simbiozne učinkovitosti i kompatibilnosti sa određenim sortimentom soje kako bi se mogao izvršiti izbor najkvalitetnijih sojeva *B. japonicum*.

Identifikacija i selekcija najučinkovitijih sojeva važna je zbog njihovog iskorištavanja u pripremi komercijalnog preparata za bakterizaciju soje. Uvođenjem najučinkovitijih sojeva, koji su istovremeno prilagođeni uvjetima određenog proizvodnog područja u našoj zemlji, moći će se poboljšati kvalitet inokuluma što ima za posljedicu veće iskorištavanja procesa simbiozne fiksacije dušika.

LITERATURA

- Caetano-Anolles G., Bassam B. J., Gresshoff P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553-557
- de Bruijn F.J. (1992). Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187
- Devine T.E., Kuykendall L.D., O'Neill J.J. (1988). DNA Homology Group and the Identity of Bradyrhizobial Strains Producing Rhizobitoxine-Induced Foliar Chlorosis on Soybean. *Crop Science* 28: 938-941
- Dooley J.J., Harrison S.P., Mytton L.R., Dye M., Cresswell A., Skot L., Beeching J.R. (1993). Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can. J. Microbiol.* 39: 665-673
- Fani R., Bandi C., Bardin M.G., Comincini S., Damiani G., Grifoni A., Bazzicalupo M. (1993). RAPD fingerprinting is useful for identification of *Azospirillum* strains. *Microb. Releases* 1: 217-221
- Hartmann A., Amarger N. (1991). Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. *Can. J. Microbiol.* 37: 600-608.
- Hollis A.B., Kloos W.E., Elkan G.H. (1981). DNA:DNA Hybridization Studies of *Rhizobium japonicum* and Related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.* 123: 215-222
- Johansson M.L., Quednau M., Molin G., Ahrne S. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 155-159
- Josey D.P., Beynon J.L., Johnston A.W.B., Beringer J.E. (1979). Strain Identification in *Rhizobium* Using Intrinsic Antibiotic Resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 343-350
- Keyser H.H., Weber D.F., Uratsu S.L. (1984). *Rhizobium japonicum* Serogroup and Hydrogenase Phenotype Distribution in 12 States. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 613-615
- Kuykendall L.D., Saxena B., Devinae T.E., Udell S.E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38: 501-505.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lawrence L.M., Harvey J., Gilmour A. (1993). Development of a Random Amplification of Polymorphic DNA Typing Method for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3117-3119
- Leung K., Strain S.R., de Bruijn F.J., Bottomley P.J. (1994). Genotypic and Phenotypic Comparisons of Chromosomal Types within an Indigenous Soil Population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 416-426
- Mazurier S., Audurier A., van der Mee N. M., Notermans S., Wernars K. (1992). A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. *Res. Microbiol.* 143: 507-512
- Minamisawa K., Seki T., Onodera S., Kubota M., Asami T. (1992). Genetic Relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* Field Isolates as Revealed by Repeated Sequences and Various Other Characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2832-2839
- Moreira F.M.S., Gillis M., Pot B., Kersters K., Franco A.A. (1993). Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. *System. Appl. Microbiol.* 16: 135-146.
- Mueller J.G., Skipper H.D., Shipe E.R., Grimes L.W., Wagner S.C. (1988). Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* 20: 879-882.
- Redžepović S., Varga B., Sikora S., Heneberg R. (1990). Utjecaj tretiranja sjemena mikroelementima i različitim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* na prinos zrna soje. *Znan. prak. poljopr. tehnol.* 20: 41-47
- Redžepović S., Sikora S., Sertić Đ., Manitašević J., Šoškić M., Klaić Ž. (1991). Utjecaj fungicida i gnojidbe mineralnim dušikom na bakterizaciju i prinos soje. *Znan. prak. poljopr. tehnol.* 21: 43-49
- Roberts G.P., Leps W.T., Silver L.E., Brill W. J. (1980). Use of Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis to Identify and Classify *Rhizobium* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 414-422.
- Rohlf F.J. (1990). NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.60, Exeter Software, Setauket, New York.
- Sadowsky M.J., Tully R.E., Cregan P.B., Keyser H.H., (1987). Genetic Diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Serogroup 123 and Its Relation to Genotype-specific Nodulation of Soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2624-2630.
- Sawada Y., Miyashita K., Tanabe I., Kato K. (1989). Hup Phenotype and Serogroup Identity of Soybean-Nodulating Bacteria Isolated from Japanese Soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35: 281-288

- Schmidt E.L., Zidwick M.J., Abebe H.M. (1986) *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 and diversity among member isolates. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1212-1215
- Sikora S., Redžepović S., Pejić I., Kozumplik V. (1997). Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. J. Appl. Microbiol. 82: 527-531
- Smibert R. M., Krieg N. R. (1994) Phenotypic Characterization. In: Methods for General and Molecular Bacteriology, (P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A.Wood, N.R. Krieg, eds.) American Society for Microbiology, Washington DC, 607-655
- Stephan R., Schraft H., Untermann F. (1994). Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA). Lett. Appl. Microbiol. 18: 260-263.
- Vidaček Ž., Bogunović M., Racz Z., Husnjak S., Kisić I., Sraka M., Špolajr A., Sertić Đ., Redžepović S., Sikora S., Slamić F. (1991). Pedološka studija za potrebe izrade projekta agromelioracija R. J. Čađavica. Fakultet poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu. Institut za agroekologiju . Zagreb.
- Vincent J.M. (1970).: A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Weber D.F., Keyser H.H., Uratsu S.L. (1989). Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from U.S. soybean production areas. Agron. J. 81:786-789

acs65_28