



Primena CF efekta, IAR i RAPD metoda u evaluaciji kompetitivnosti inokulisanog sa autohtonim sojevima *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Dragana Jošić • Nataša Rasulić • Đorđe Kuzmanović •
Miroslav Miladinović • Aleksandra Stanjoković • Radmila Pivić

received: 20 February 2012, accepted: 4 April 2012

© 2012 IFVC

doi:10.5937/ratpov49-1586

Izvod: Ova istraživanja su pratila kompetitivnu sposobnost *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* soja T49B1 prema autohtonoj populaciji na černozemu, pseudogleju i ritskoj crnici. Identifikacija bakterija u nodulima izvršena je na osnovu kalkofluor efekta (CF), a potvrđena je IAR i RAPD (SPH1 prajmer) profilima. Nodulacija sojem T49B1 konstatovana je počev od 71,78% na pseudogleju do 89,56% na černozemu. U odnosu na neinokulisane biljke u sva tri tipa zemljišta je potvrđeno da ovaj soj ima veoma visoku kompetitivnost, kao i sposobnost da uspostavi efektivnu simbiozu i poveća sadržaj proteina u biljci.
Cljučne reči: IAR, kalkofluor efekat, RAPD, *Rhizobium*, sojevi, zemljišta

Uvod

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* je mikrosimbiont deteline i veoma je rasprostranjen u zemljištima Srbije. Mnogi autohtoni izolati su selektovani u laboratorijskim uslovima i kao mikrobiološko azotno đubrivo primenjuju se više decenija. Razvojem novih tehnika tipizacije i determinacije, omogućena je bolja selekcija i praćenje ponašanja introdukovanih sojeva u zemljištu.

Egzopolisaharidna (EPS) produkcija kod *Rhizobium leguminosarum* i njihov kalkofluor fluorescentni (CF) fenotip imaju značajnu ulogu u tipizaciji ovih bakterija i njihovom praćenju u prirodi. Sukcinoglikan (EPS I), koji ima ključnu ulogu u simbiozi, omogućava da kolonije ovih bakterija fluoresciraju pod UV svetlom na medijumu koji sadrži kalkofluor. Sojevi koji proizvode galaktoglikan (EPS II) ne pokazuju ovu osobinu, kao ni sukcinoglikan-mutanti. Selektivno bojenje mutanata bojom Sudan B-crno omogućilo je razdvajanje od EPS II i tipizaciju na osnovu EPS I / EPS II fenotipa (Liu et al. 1998).

Pored EPS tipizacije, važna fenotipska karakteristika sojeva je i osobina različitih sojeva iste vrste da pokazuju različitu prirodnu rezistentnost na antibiotike – IAR (*Intrinsic*

Antibiotic Resistance) (Hartmann & Amarger 1991). Sve češće se za analizu velikog broja sojeva koristi IAR multidisk sistem ili replikativni sistem sa antibioticima na odgovarajućim podlogama, npr. YMA (*yeast mannitol agar*) za *Rhizobium* (Vasquez –Arroyo et al. 1998).

Sa razvojem tehnika molekularne biologije dobijeno je mnogo informacija o organizaciji genoma i varijabilnosti, pa se ova osobina primenjuje i pri tipizaciji sojeva (Dooley et al. 1993, Laguerre et al. 1994, 1996, Vandamme et al. 1996, Šimon & Salava 2006, Rodríguez Blanco et al. 2010). Primarna tipizacija se postiže PCR metodama baziranim na direktnoj analizi simultano amplifikovanih multiplih DNA fragmenata razdvojenih gel elektroforezom (PCR DNA fingerprinting). RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) je najviše rasprostranjena varijanta PCR sa nasumičnim prajmerima i ima široku primenu. Jedan od često korišćenih prajmera pri tipizaciji rizobia je SPH1. Prvi ga je upotrebio Dooley et al. (1993), a kasnije i mnogi autori (Versalovic et al. 1994, Paffetti et al. 1996, Teumroong & Boonkerd 1998, Laguerre et al. 1996, Josic et al. 2008).

Efektivnost introdukovanih sojeva zavisi od njegove prilagodivosti uslovima sredine i kompetitivne sposobnosti, pa je neophodno proveriti ove osobine pre primene inokulacije na određenom lokalitetu. U ovom radu praćena

D. Jošić* • N. Rasulić • Đ. Kuzmanović • M. Miladinović • A. Stanjoković • R. Pivić

Institute of Soil Science, Teodora Drajzera 7, 11000 Belgrade, Serbia
e-mail: josicdragana@yahoo.com

Supported by Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Project No. TR 37006.

je kompetitivnost selektovanog soja T49B1 i prirodne populacije *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* u černozeu, pseudogleju i ritskoj crnici.

Materijal i metode rada

Seme bele deteline *Trifolium repens* L. sorte Viola inokulisano je sojem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T49B1, koji ima jaku produkciju sukcinoglukana, određen IAR i RAPD profil. Ogled u polju je postavljen sa inokulisanom i neinokulisanom varijantom na 3 tipa zemljišta: u Jabuci kod Pančeva (JP) na černozeu (pH u 1M KCl 7.30; 2.13% humusa; 36.4 mg/100g zemljišta P_2O_5 ; 21.4 mg/100g zemljišta K_2O i 14.86 mg/100g zemljišta $CaCO_3$), u Progoreocima kod Arandelovca (PA) na pseudogleju (pH u 1M KCl 4.35; 3.11% humusa; 0.8 mg/100g zemljišta P_2O_5 ; 8.2 mg/100g zemljišta K_2O , 0 mg/100g zemljišta $CaCO_3$) i u Vojlovici kod Pančeva (VP) na ritskoj crnici (pH u 1M KCl 6.75; 4.26% humusa; 34 mg/100 g zemljišta P_2O_5 ; više od 40 mg/100 g zemljišta K_2O , 0 mg/100 g zemljišta $CaCO_3$).

Kao materijal za proveru kompetitivnosti korišćeni su bakterijski izolati *R. leguminosarum* bv. *trifolii* iz nodula biljaka bele deteline. Metodom slučajnog odabira formirana su po 4 uzorka sa svakog tipa zemljišta: kontrolni sa po 15 neinokulisanih biljaka i 3 inokulisane varijante sa po 15 biljaka. Sa svake biljke nasumično je odabrano po 3 nodula (45 nodula po varijanti). Nodula su odsečene sa minimalnim delom korena, isprane sterilnom destilovanom vodom i sterilisane (Vincent 1970), a zatim raspoređene u mikrotitar ploče, presečene sterilnim skalpelom i izgnječene u 50 μ l sterilnog fiziološkog rastvora, odakle su replikatorom zasejane u triplikatu na YMA medijumu sa dodatkom 0,02% kalkofluor boje (Calcofluor White M2R, Sigma). Bakterije su gajene 7 dana da bi se uočile jasne razlike u fluorescenciji. Efekat kalkofluor fluorescencije je očitao po Reed et al. (1991). Identifikacija mutanata koji proizvode EPS I ili EPS II izvedena je metodom po Liu et al. (1998) Sudan Black B bojenjem. Izdvojene su kolonije sa CF4+ efektom, pod pretpostavkom da su se zadržale osobine inokulantnog soja. Provera osobina izolata izvršena je preko IAR fenotipa. Adekvatne koncentracije antibiotika (tetraciklin, streptomycin, ampicilin, hloramfenikol i gentamicin) dodate su YMA podlozi zagrejanom do 50°C. Kolonije sa CF4+ efektom resuspendovane su u 50 μ l YEM medijuma u mikrotitar pločama i pomoću replikatora sa 48 mesta prenete na agarizovane podloge. Bakterije su gajene na 28°C 72 h (zbog usporenog rasta usled prisustva antibiotika).

Za RAPD analizu korišćen je SPH1 prajmer (Dooley et al. 1993), a amplifikacione reakcije su izvođene u 50 μ l zapremine koja je sadržala: 10x reakcioni bufer (Applied Biosystems); 2mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems); 200 μ M smeše dNTP (Sigma Genosys); 50pM prajmera (Sigma Genosys); 1U AmpliTaq Gold polimeraze (Applied Biosystems) i 50ng DNA. Produkti PCR reakcija su razdvojeni na 1,5% agaroznom gelu, obojeni rastvorom etidium bromida (5 μ g/ml TBE) i fotografisani. Na uzorku od 30 biljaka koje sadrže nodule sa izolatima CF 4+ fenotipa i kontrolnom uzorku od 15 biljaka, za svaki tip zemljišta određen je sadržaj proteina u suvoj biljnoj masi (Bradford 1976).

Rezultati i diskusija

Ispitivanje kompetitivnosti soja T49B1 sa autohtonom populacijom mikrosimbionata deteline u ogledima postavljenim na černozeu, pseudogleju i ritskoj crnici bazirano je na njegovoj osobini intezivne fluorescencije, tj. CF 4+ fenotipa. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* mogu proizvoditi obe vrste egzopolisaharida: sukcinoglikan i galaktoglikan. Bakterije koje proizvode sukcinoglikan pokazuju plavozelenu ili žutozelenu fluorescenciju pod uticajem ultraljubičaste svetlosti ukoliko su rasle na podlozi koja sadrži kalkofluor (Leigh et Walker, 1994) tj. boju koja vezuje celulozu i druge polisaharide sa β - glikozidnim vezama. Bakterije koje ne proizvode egzopolisaharide odlikuju se sitnim i suvim kolonijama, kao i odsustvom kalkofluor efekta. Razlike u produkciji egzopolisaharida sa različitim fluorescencijom i različitim stepenom produkcije sukcinoglukana i galaktoglukana jasno se uočavaju naročito pri kultivisanju izolata u mešanoj kulturi. Korišćen pri inokulaciji, introdukovani soj T49B1 se može jasno uočiti u mešanoj kulturi sa izolatima prirodne populacije bakterija koje nemaju izražen ovaj efekat. Međutim, ukoliko u prirodnoj populaciji postoje bakterije sa identičnim fenotipskim efektom, ne bi se razlikovale od inokulantnog soja. Zbog toga je uvedena provera preko IAR profila, kao i molekularna detekcija na osnovu RAPD metode.

Analizom CF efekta iz uzorka od 135 nodula sa svakog tipa zemljišta za inokulisanu varijantu i 45 nodula za neinokulisanu varijantu biljaka ustanovljeno je da je CF4+ fenotip zastupljen preko 70% u nodulima inokulisanih biljaka (Tab. 1). Kod neinokulisanih biljaka ovaj fenotip se nije ispoljio (CF vrednost se kretala od 0 do 2+), što ukazuje na odsustvo obilne produkcije sukcinoglukana kod autohtone populacije *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Tabela 1. Zastupljenost nodula sa CF 4+ fenotipom, tip IAR i RAPD profila i sadržaj proteina u svojoj biljnoj masi.

Table 1. Percentage of nodules with CF 4+ phenotype, IAR and RAPD pattern types and protein contents

Uzorak Sample	Broj izolata sa CF4+ fenotipom No. of isolates with CF4+ phenotype	% zastupljenosti CF4+ fenotipa Appearance of CF4+ phenotype (%)	Tip IAR profila IAR pattern type	Tip RAPD profila CF4+ kolonija RAPD pattern type of CF4+ colony	Sadržaj proteina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ SBM) Protein content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ SDW)	Indeks povećanja sadržaja proteina Protein content increasing index
JP-1	34,3 \pm 2,3	76,22	I	A	223,3 \pm 11,3	
JP-2	39,7 \pm 0,5	88,22	I	A		1,46
JP-3	40,3 \pm 2,06	89,56	I	A		
JP- \emptyset	0	0	/	/	153 \pm 2,16	
VP-1	35,7 \pm 0,9	79,33	I	A		
VP-2	39,7 \pm 1,04	82,22	I	A	185,3 \pm 7,65	1,21
VP-3	38,7 \pm 1,01	86,00	I	A		
VP- \emptyset	0	0	/	/	152,7 \pm 0,8	
VP-2* (14)	1 \pm 0	2,22	II	B	/	/
PA-1	33,0 \pm 0,8	73,33	I	A		
PA-2	34,7 \pm 1,4	77,11	I	A	174,3 \pm 4,45	1,18
PA-3	32,3 \pm 1,9	71,78	I	A		
PA- \emptyset	0	0	/	/	146,7 \pm 1,9	

* izolat sa CF4+ fenotipom koji ne odgovara IAR profilu soja T49B1 / isolate with CF4+ phenotype with different IAR pattern from T49B1 strain

Procenat zastupljenosti inokulantnog soja sa CF4+ fenotipom kretao se od minimalne vrednosti za pseudoglej (71,78) do maksimalne vrednosti za černoziem (89,56). Ovi podaci pokazuju da je primenjeni inokulantni soj visoko kompetitivan, s obzirom da su dobrim kompetitorima u literaturi smatrani sojevi sa vrednošću oko 70% (Svenning et al. 2001, Joshi et al. 2009).

Provera zastupljenosti inokulacijom introdukovanog soja T49B1 izvršena je IAR tipizacijom, uz kokultivaciju izolata iz nodula i čiste kulture ovog soja. Potvrđeno je da svi izolati, osim jednog izolata iz ritske crnice VP-2(14), koji imaju CF4+ fenotip, pokazuju identičan IAR profilu soja T49B1 (tip I). Izolat VP-2(14) pokazao je tip II profila prirodne rezistencije na antibiotike, koji se

razlikovao od tipa I po rezistenciji na obe ispitivane koncentracije ampicilina (Tab. 2).

Fenotipska karakteristika sojeva *Rhizobium* da imaju različitu prirodnu rezistentnost na antibiotike iskorišćena je za proveru uniformnosti CF4+ izolata iz nodula i upoređivanjem sa tipom profila soja T49B1, tj. kao dodatni parametar. Već su Shishido & Pepper (1990) grupisali prirodne izolate *Rhizobium meliloti* na osnovu plazmidnog profila i IAR na ampicilin, novobiocin i kanamicin. Koristeći IAR kao dodatni parametar determinisani su izolati različitih populacija *Rhizobium* (Antoun et al. 1982, Jenkins & Bottomley 1985, Broughton et al. 1987). U različitim tipovima zemljišta Srbije autohtona populacija *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pokazala je veoma veliku raznovrsnost IAR profila (Jošić

Tabela 2. IAR profil soja T49B1 i izolata VP-2-b

Table 2. IAR pattern of T49B1 strain and VP-2-b isolate

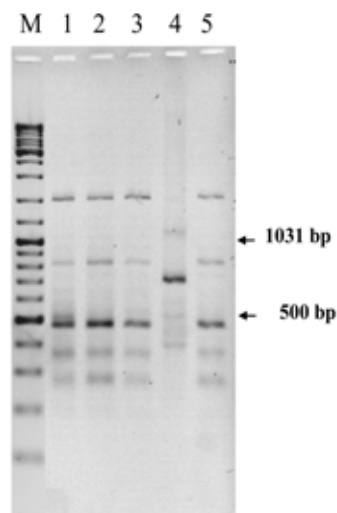
Soj- izolat Strain- isolate	tip IAR profila IAR pattern type	Antibiotici Antibiotics ($\mu\text{g}/\text{ml}$)									
		Tet*		Sm		Amp		Cm		Gen	
		3	4	5	30	40	40	50	3	5	
T49B1	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
VP-2 (14)	II	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

* Tet- tetraciklin; Sm- streptomycin; Amp- ampicilin; Cm- hloramfenikol; Gen- gentamicin / Tet- tetracycline; Sm- streptomycin; Amp- ampicillin; Cm-chloramphenicol; Gen- gentamicin

2004), tako da je očekivana razlika u ovom profilu između introdukovanog soja i autohtone populacije. Međutim, genotipizacijom pomoću RAPD metode, dokazali smo da je u nodulima sa izolatima IAR profila tipa I i CF4+ fenotipom, zastupljen introdukovani soj. Izolat iz ritske crnice VP-2(14) koji ima CF4+ fenotip i IAR profil tipa II - sa rezistencijom na ampicilin, razlikovao se i po RAPD profilu. Biljka sa nodulom koji je sadržao ovaj izolat, kao i biljke koje nemaju nodule sa izolatima koji poseduju CF4+ fenotip, isključena je iz analize sadržaja proteina. Kako se radi o 1 od 3 ispitivana nodula sa istog korena biljke, koji ima izolat sa izmenjenom rezistencijom na 1 antibiotik, a 2 nodula sa inokulantnim sojem, jedna od pretpostavki je da je soj T49B1 mutacijom stekao rezistenciju na ampicilin i time promenio svoj IAR i RAPD profil. Drugu pretpostavku da je slabo zastupljeni autohtoni izolat sa obilnom produkcijom sukcinoglukana kompetirao sa inokulantnim sojem, ne potkrepljuje činjenica da u kontrolnoj varijanti autohtona populacija nije pokazala prisustvo CF4+ fenotipa, iako ta mogućnost nije isključena. Prema dosadašnjim istraživanjima, ovaj fenotip je manje zastupljen kod autohtone populacije *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nego kod populacije *Sinorhizobium meliloti* (Jošić i sar 2001, Jošić 2004).

RAPD proveru je izvršena na po 3 izolata sa CF4+ fenotipom iz svake grupe sa sva 3 tipa zemljišta i izolatom VP-2(14) koji je ispoljio različit IAR profil (Sl. 1). Upoređivanjem RAPD profila soja T49B1 i dobijenih profila iz ispitivanih izolata potvrđeno je da je inokulantni soj odgovoran za prisutni CF4+ fenotipski efekat, a da se RAPD profil izolata VP-2(14) razlikuje. Pošto u nodulima neinokulisanih varijanti nije bilo izolata sa CF4+ efektom, nije ustanovljen njihov PCR fingerprint. RAPD metod je efikasan pri praćenju kompetitivnosti prilikom selekcije efektivnih sojeva *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Šimon 2006, Šimon & Salava 2006). Melanin produkciju kao specifičnu osobinu inokulantnog soja i tipizaciju GTG₅-PCR metodom iskoristili su Rodríguez Blanco et al. (2010) za praćenje kompetitivne sposobnosti *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Najveći sadržaj proteina ustanovljen je kod inokulisanih i neinokulisanih biljaka na černozeu, a najmanji na pseudogleju. U poređenju sa neinokulisanim, inokulisane varijante sa istog tipa zemljišta imale su značajno povećan sadržaj proteina, što je potvrdilo visoku efikasnost azotifikacije soja T49B1 koja je ustanovljena u kontrolisanim uslovima u laboratoriji. Indeks povećanja prinosa iznosio je 1,46 kod biljaka sa černozeu, zatim 1,21 kod biljaka sa ritske crnice, a 1,18 kod biljaka sa pseudogleja.



Slika 1. RAPD profili izolata sa CF4+ fenotipom. M-marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania); 1. soj T49B1 [tip A]; 2. izolat JP-1(1); 3. izolat VP-2(11); 4. izolat VP-2(14) [tip B]; 5. izolat PA-3(8)

Fig. 1. RAPD patterns of isolates with CF4+ phenotype. M-marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania); 1. strain T49B1 [type A]; 2. isolate JP-1(1); 3. isolate VP-2(11); 4. isolate VP-2(14) [type B]; 5. isolate PA-3(8)

Potencijal simbiotske azotifikacije zavisi od prisustva i aktivnosti autohtone populacije rizobia u zemljištu. Denton et al. (2002, 2003) su ustanovili dominantnost i veći procenat formiranja nodula autohtone populacije rizobia u alkalnim zemljištima u odnosu na introdukovani soj *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. U zemljištima Srbije je utvrđeno da su kvržične bakterije specifične za detelinu, lucerku, pasulj i grahoricu široko zastupljene (Vojinović & Petrović 1961, Vojinović i sar. 1989a) kao i da se razlikuju u efektivnosti, prirodnoj otpornosti na različite koncentracije antibiotika (Radin 1995, Jošić i sar. 1998, 2004) i u kompetitivnoj sposobnosti (Vojinović i sar. 1989b, Jošić i sar. 2006). U Srbiji su najzastupljenija zemljišta tipa černozeu, aluvijuma, smonice, gajnjače, pseudogleja, rankera ali i njihovi varijeteti. Ona se odlikuju različitim fiziko-hemijskim osobinama koje uslovljavaju promenljiv sadržaj i brojnost zemljišnih mikroorganizama (Govedarica & Jarak 1995). Ove osobine uslovljavaju i različite mehanizme adaptacije bakterija, što se odražava i na kompetitivnu sposobnost rizobia. Zbog toga se ispituje ne samo efektivnost, već i kompetitivnost pri selekciji „elitnih“ sojeva (Šimon 2006, Šimon & Salava 2006).

Zaključci

Inokulacija sojem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T49B1 sa obilnom produkcijom sukcinoglukana koja dovodi do CF4+ fenotipa, osobine koju je lako pratiti u kulturi, omogućila je procenu kompetitivne sposobnosti tog soja. Potvrda je izvršena dodatnom fenotipizacijom preko IAR i genotipizacijom preko RAPD profila. Zastupljenost inokulantnog soja T49B1 u nodulima korenova biljaka gajenih na černozeu kretala se 76,22-89,56%, na ritskoj crnici 79,33-86%, a na pseudogleju 71,78-77,11% što ukazuje na njegovu visoku kompetitivnost. Introdukovani inokulantni soj T49B1 je dobru efikasnost fiksiranja azota, ranije ustanovljenu u laboratorijskim uslovima, potvrdio u poljskim uslovima. Indeksi povećanja prinosa od 1,18 do 1,46 u odnosu na prinosa biljaka noduliranih autohtonim izolatima *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ukazuju na opravdanost primene inokulacije efektivnim visoko kompetitivnim sojem.

Literatura

- Antoun H, Bordeleau LM, Prevost D (1982): Strain identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. *Plant Soil* 66: 45-50
- Bradford MM (1976): *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Broughton WJ, Heycke N, Priefer U, Schneider GM, Stanley J (1987): Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: diversity and competitive dominance. *FEMS Microbiol. Lett.* 40: 245-249
- Denton MD, Coventry DR, Murphy PJ, Howieson JG, Bellotti WD (2002): Competition between inoculated and naturalized *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for nodulation of annual clovers in alkaline soil. *Austral. J. Agric. Res.* 53: 1019-1026
- Denton MD, Reeve WG, Howieson JG, Coventry DR (2003): Competitive abilities of common field isolates and commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for clover nodule occupancy. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1039-1048
- Dooley JJ, Harrison SP, Mytton LR, Dye M, Cresswell A, Skot L, Beeching JR (1993): Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can. J. Microbiol.* 39: 665-673
- Doyle JJ (1994): Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 325-349
- Govedarica M, Jarak M (1995): *Mikrobiologija*. Univerzitet N. Sad
- 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
- Jenkins MB and Bottomley PJ (1985): Composition and field distribution of the population of *Rhizobium meliloti* in root nodules of uninoculated field-grown alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 17: 173-179.
- Joshi FR, Desai DK, Archana G, Desai AJ (2009): Enhanced Survival and Nodule Occupancy of Pigeon pea Nodulating *Rhizobium* sp. ST1 expressing *fegA* Gene of *Bradyrhizobium japonicum* 61A152. *OnLine J. Biol. Sci.* 9: 40-51
- Jošić D, Ćorić T, Konstatinov K, Miličić B (1998): Identification of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by p-profile analysis and IAR. 16th World congress of soil science, Montpellier, 20-26th August 1998. *Proceedings*, 1: 207
- Josic D, Popovic-Kuzmanovic D, Terzic-Vidojevic A (2001): Competition between different *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains, 2nd Balkan Conference of microbiology, Thessaloniki, Greece, November 22-24, Abstracts, 156
- Jošić D (2004): Biodiverzitet autohtone populacije kvržičnih bakterija deteline (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*). Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
- Jošić D, Kuzmanović S, Pivić R, Miličić B (2006): The competitive ability of different *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculant strains. *Roumanian Biotechnological Letters*, 11: 2637-2641
- Josic D, Milicic B, Mladenovic Drinic S, Jarak M (2008): Genodiversity of dominant *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from 11 types of soil in Serbia. *Genetika* 40: 179-190
- Laguette G, Allard MR, Revoy F, Amarger N (1994): Rapid identification of rhizobia by restriction fragment polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56-63
- Laguette G, Mavingui P, Allard MR, Charnay MP, Louvrier P, Mazurier SI, 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. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 2029-2036
- Leigh JA, Walker GC (1994): Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trend Genet.* 10: 63-67
- Liu M, Gonzales JE, Willis LB, Walker GC (1998): A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4600-4602
- Pafetti D, Scotti C, Gnocchi S, Fancelli S, Bazzicalupo M (1996): Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2279-2285
- Radin D (1995): Uticaj nekih ekoloških činilaca na razvoj kvržičnih bakterija lucerke *Rhizobium meliloti* izdvojenih iz zemljišta Srbije i njihova azotofiksaciona aktivnost. Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Beograd
- Reed JW, Capage M, Walker GC (1991): *Rhizobium meliloti* *exoG* and *exoJ* mutations affect the ExoX-ExoY system for modulation of exopolysaccharide production. *J. Bacteriol.* 173: 3776-3788
- Rodríguez Blanco A, Sicardi M, Frioni L (2010): Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biol. Fertil. Soils* 46: 419-425.
- Shishido M, Pepper IL (1990): Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22, 11-16
- Šimon T (2006): New *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates: collection, identification and screening of efficiency in symbiosis with clover. *Plant Soil Environ.* 52: 105-110
- Šimon T, Salava J (2006): New *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates: Evaluation of competitiveness for clover nodule occupancy. *Plant Soil Environ.* 52: 441-448
- Svenning MM, Gudmundsson J, Fagerli IL, Leinonen P (2001): Competition for nodule occupancy between introduced strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and its influence on plant production. *Ann. Bot.* 88: 781-787
- Teaumroong N, Boonkerd N (1998): Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by primer-based technology and direct DNA extraction. *Plant Soil* 204: 127-134

- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438
- Vasquez-Arroyo J, Sessitsch A, Martinez E, Pena-Cabriaes J J (1998): Nitrogen Fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 204: 147-154
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski J R (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cellular Biol.* 5: 25-40
- Vincent JM (1970): A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria, International Biological Program me Handbook, No.15, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Vojinović Ž, Miličić B, Radin D, Kuzmanović Đ (1989a): Prisustvo i aktivnost sojeva *R. meliloti* i *R. trifolii* u nekim zemljištima Srbije. *Mikrobiologija* 26: 69-81
- Vojinović Ž, Miličić B, Radin D, Kuzmanović Đ (1989b): Kompetitivna sposobnost mutanata *Rhizobium meliloti* otpornih na streptomycin. I. u dvojnim inokulacijama sa jednim neaktivnim sojem. *Mikrobiologija* 26: 93-106
- Vojinović Ž, Petrović V (1961): Rasprostranjenost nekih važnijih kvržičnih bakterija u zemljištima NR Srbije. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 45: 34-51

Application of CF Effect, IAR and RAPD Methods in Evaluation of Competitiveness between Inoculated and Indigenous Strains of *Rhizobium leguminosarum* Bv. *trifolii*

Dragana Jošić • Nataša Rasulić • Đorđe Kuzmanović •
Miroslav Miladinović • Aleksandra Stanojković • Radmila Pivić

Summary: This paper evaluates the competitive ability of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* strain T49B1 used as inoculant for *Trifolium repens* L. (Viola) and indigenous population of rhizobia from chernozem, stagnosol and humic gleysol. Nodule bacteria were identified using calcofluor effects (CF) based on succinoglycan production, and confirmed by IAR patterns and RAPD fingerprinting (using SPH1 primer). T49B1 nodules occupancy level from 71.78% in pseudogley to 89.56% in chernozem was detected. Inoculation by T49B1 strain showed it to be a very good competitor with the possibility to establish effective symbiosis and increase protein content compared to non-inoculated (control) plants.

Key words: calcofluor effect, IAR, RAPD, *Rhizobium*, soils, strains