

Bioraznolikost i značaj kvržičnih bakterija koje noduliraju slanutak, leću i lupinu

Godinić, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:972406>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



BIORAZNOLIKOST I ZNAČAJ KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SLANUTAK, LEĆU I LUPINE

DIPLOMSKI RAD

Darija Godinić

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

BIORAZNOLIKOST I ZNAČAJ KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SLANUTAK, LEĆU I LUPINE

DIPLOMSKI RAD

Darija Godinić

Mentor:

Prof. dr. sc. Sanja Sikora

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Darija Godinić**, JMBAG 1003106882, rođena 08.08.1994. u Varaždinu, izjavljujem
da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Bioraznolikost i značaj kvržičnih bakterija koje noduliraju slanutak, leću i lupine

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Darije Godinić**, JMBAG 1003106882, naslova

BIORAZNOLIKOST I ZNAČAJ KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SLANUTAK, LEĆU I LUPINE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Sanja Sikora mentor

2. Prof. dr. sc. Nina Toth član

3. Prof. dr. sc. Ana Pospíšil član

Zahvala

Najveću zahvalu upućujem mentorici prof. dr. sc. Sanji Sikori koja me je uspješno vodila tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko joj hvala na razumijevanju i strpljenju.

Posebnu zahvalu upućujem mami Zdenki i ocu Danijelu te dečku Kristijanu na podršci i strpljivosti koje su pokazali tijekom mog školovanja i izrade diplomskog rada. Veliko hvala mojim roditeljima koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh te podržavali moju želju za školovanjem.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. CILJ RADA.....	2
2. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA	3
2.1. SIMBIOZNA FIKSACIJA DUŠIKA.....	6
2.1.1. ZNAČAJ BIOLOŠKE FIKSACIJE DUŠIKA	7
2.1.2. FIKSATORI DUŠIKA	8
2.2. PREDSJETVENA BAKTERIZACIJA MAHUNARKI	11
3. MAHUNARKE.....	14
3.1. UPOTREBA MAHUNARKI.....	15
3.2. OGRANIČAVAJUĆI ČIMBENICI PRINOSA MAHUNARKI	17
3.3. LUPINA.....	18
3.3.1. PODRIJETLO LUPINA	18
3.3.2. PROIZVODNJA I GOSPODARSKA VRIJEDNOST LUPINA	19
3.3.3. HRANIDBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST LUPINA	20
3.3.4. MORFOLOŠKA SVOJSTVA LUPINA.....	21
3.3.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA I AGROEKOLOŠKI UVJETI UZGOJA LUPINA	22
3.4. LEĆA	23
3.4.1. PODRIJETLO LEĆE.....	24
3.4.2. PROIZVODNJA I GOSPODARSKA VRIJEDNOST LEĆE	24
3.4.3. HRANIDBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST LEĆE.....	25
3.4.4. MORFOLOŠKA SVOJSTVA LEĆE	27
3.4.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA I AGROEKOLOŠKI UVJETI UZGOJA LEĆE	28
3.5. SLANUTAK	29
3.5.1. PODRIJETLO SLANUTKA	30
3.5.2. PROIZVODNJA I GOSPODARSKA VRIJEDNOST SLANUTKA....	30
3.5.3. HRANIDBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST SLANUTKA	31

3.5.4.	MORFOLOŠKA SVOJSTVA SLANUTKA.....	32
3.5.5.	BIOLOŠKA SVOJSTVA I AGROEKOLOŠKI UVJETI UZGOJA SLANUTKA.....	34

4. RAZNOLIKOST KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU LUPINE, LEĆU I SLANUTAK 35

4.1.	KVRŽIČNE BAKTERIJE KOJE NODULIRAJU LUPINE	35
4.2.	KVRŽIČNE BAKTERIJE KOJE NODULIRAJU LEĆU.....	40
4.3.	KVRŽIČNE BAKTERIJE KOJE NODULIRAJU SLANUTAK	43

5. ZAKLJUČAK 46

6. POPIS LITERATURE 47

7. ŽIVOTOPIS 64

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Darije Godinić**, naslova

BIORAZNOLIKOST I ZNAČAJ KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SLANUTAK, LEĆU I LUPINE

Očuvanje mikrobne raznolikosti tla i iskorištavanje korisnih mikrobioloških procesa postaje vrlo značajno u novim konceptima razvoja poljoprivrede. Mahunarke se uzgajaju prvenstveno zbog sjemena i vrlo su značajne u prehrani zbog visokog sadržaja proteina. Iznimno je važna i njihova uloga kao krmnih kultura te primjena u zelenoj gnojidbi. Za agroekosustave vrlo je značajna simbioza rizobija i mahunarki. Rizobije su skupina bakterija tla koje noduliraju mahunarke i uspostavljaju simbiozni odnos u kojemu se odvija fiksacija atmosferskog dušika. U cilju iskorištavanja simbiozne fiksacije dušika, provodi se inokulacija sjemena mahunarki čime se smanjuje potreba za primjenom mineralnih gnojiva. U novije vrijeme, otkrivene su nove vrste rizobija što je dovelo do značajnih promjena u taksonomiji i novih mogućnosti njihove primjene. Za uspjeh inokulacije važno je izabrati sojeve koji moraju biti visoko učinkoviti, kompatibilni sa određenim sortama mahunarki, adaptirani na nepovoljne uvjete staništa i kompetitivni sa autohtonim sojevima. Stoga se ističe važnost selekcije sojeva rizobija s ciljem odabira najkvalitetnijeg za inokulaciju i uzgoj određene mahunarke sa svrhom povećanja prinosa i kvalitete proizvoda te većeg iskorištavanja procesa fiksacije dušika.

Ključne riječi:

biološka fiksacija dušika, mahunarke, rizobije, *Lupinus* spp., *Lens culinaris* Medik. subsp. *culinaris*., *Cicer arietinum* L.

Summary

Of the master's thesis – student **Darija Godinić**, entitled

BIODIVERSITY AND SIGNIFICANCE OF RHIZOBIA NODULATING CHICKPEA, LENTIL AND LUPIN

Preservation of soil microbial diversity and utilization of beneficial microbiological processes is becoming crucial in new concepts of agricultural development. Legumes are grown primarily for their seeds and are essential in the human diet due to their high protein content. Their role as forage crops as well as green manure is also very important. The symbiosis of rhizobia and legumes is of great significance for agroecosystems. Rhizobia are a group of soil bacteria that nodulate legumes and establish a symbiotic relationship in which fixation of atmospheric nitrogen takes place. In order to utilize symbiotic nitrogen fixation, inoculation of legume seeds is performed thus reducing the need for the application of mineral fertilizers. More recently, new species of rhizobia have been discovered which has led to significant changes in taxonomy and new possibilities for their application. For the success of inoculation, it is necessary to choose strains that must be highly efficient, compatible with certain varieties of legumes, adapted to adverse environmental conditions and competitive with indigenous strains. Therefore, the importance of rhizobial selection is emphasized with the aim of choosing the highest quality strain for inoculation and cultivation of a specific legume in order to increase yield and product quality and allow greater use of nitrogen fixation process.

Keywords:

biological nitrogen fixation, legumes, rhizobia, *Lupinus* spp., *Lens culinaris* Medik. subsp. *culinaris*, *Cicer arietinum* L.

1. UVOD

Mahunarke su skupina biljaka koja pripada razdjelu Magnoliophyta, razredu Magnoliopsidae i redu Fabales te porodici Fabaceae (Cardoso i sur. 2013.). Rasprostranjene su od tropskih područja do subpolarnih zona. Većina vrsta su zeljaste, jednogodišnje i višegodišnje biljke, ali ima i drveća i grmova. Veliki je broj vrsta koje se uzgajaju za ljudsku i stočnu hranu kao što su leća, slanutak, grah, bob odnosno lupina, a odlika im je visok sadržaj proteina. Za ljudsku prehranu koriste se kao zrele ili nezrele sjemenke. U mnogim zemljama one su glavni izvor proteina i nadopuna žitaricama. Unatoč povoljnim agroekološkim uvjetima, uzgoj leće, slanutka i lupine u Republici Hrvatskoj je zanemaren i u padu.

Za poljoprivrednu proizvodnju vrlo je značajna simbioza kvržičnih bakterija i mahunarki. Mahunarke mogu zadovoljiti velik dio svojih potreba za dušikom na ekološki prihvatljiv način simbioznom fiksacijom dušika. Kvržične bakterije imaju jedinstvenu sposobnost tvorbe kvržica na korijenu mahunarki u kojima pomoću enzima nitrogenaze pretvaraju inertni atmosferski dušik u biljkama pristupačan amonijačni oblik.

Dušik je važan segment rasta i razvoja biljaka čiji nedostatak u tlu je često limitirajući faktor u biljnoj proizvodnji. Sposobnost mahunarki da s rizobijama fiksiraju elementarni dušik iz atmosfere ima veliku energetska, ekološka i ekonomsku važnost. Proizvodnja visoko kvalitetne, proteinima bogate hrane uglavnom ovisi o dostupnom dušiku. Da bi se postigla simbioza korijena mahunarke i kvržične bakterije potrebno je provesti inokulaciju sjemena. Vrlo bitno je prilagoditi soj bakterija kulturi koju se inokulira. Inokulacijom se bakterije fiksatori dušika nanose na sjeme ili u tlo te tako svaka pojedina biljka nakon što razvije korijen dolazi u kontakt s kvržičnim bakterijama koje nastanjuju korijen mahunarke. Na taj način, bakterije dobivaju hranu od biljke, a biljci pružaju dušik koji fiksiraju iz atmosfere. Fiksirani dušik obogaćuje tlo te je dostupan i narednim usjevima.

Brojne vrste rizobija mogu tvoriti simbiozne odnose s lećom, slanutkom i lupinama i u tlu su često prisutni kompetitivni autohtoni sojevi tih bakterija koji su dobro prilagođeni na nepovoljne uvjete tla stoga je važno odabrati visoko učinkovite sojeve koji su kompetitivni i otporni na razne nepovoljne uvjete u tlu.

Osim što mahunarke unose dušik u tlo, prorahljuju tlo i popravljaju njegove fizikalne, kemijske i biološke karakteristike. Neke mahunarke suzbijaju korove te umanjuju mogućnost stvaranja bolesti i razvoj štetnika na drugim kulturama.

Osigurati hranu za rastuće stanovništvo bez štetnih utjecaja na okoliš, jedan je od najvećih problema današnjice. Da bi prehranili stanovništvo, veliki udio proizvođača poseže za neprihvatljivom primjenom velikih količina gnojiva i pesticida na poljoprivrednim površinama kako bi postigli visoke prinose. Takvim postupcima se degradira kvaliteta tla, a posljedično i postojanje biološkog svijeta (mikroorganizama) u tlu. Jedan od odgovora na problem nedovoljne proizvodnje dovoljne količine hrane i zaštite prirodnih resursa je u načelima održive poljoprivrede. Održiva poljoprivreda je razvojni sustav proizvodnje koji kombinira ekološke i ekonomske elemente proizvodnje kao i ljudsku brigu za zdravljem (Redžepović i sur. 2007.).

Načela održive poljoprivrede su ponajprije iskorištavanje korisnih mikrobioloških procesa, biološka zaštita biljaka, obnova tla, korištenje prirodnih neprijatelja u zaštiti bilja kao i primjena nusprodukata poljoprivrede i drugih djelatnosti. U održivoj poljoprivredi ograničena je primjena sredstava za zaštitu bilja i mineralnih gnojiva i svih zahvata obrade koji degradiraju tlo i onečišćuju okoliš štiteći tako biološku raznolikost i integritet ljudi i drugih organizama koji tamo žive.

U sklopu održive poljoprivrede posebnu bi ulogu trebali imati leguminozni usjevi, bilo da se usijavaju u okopavinske usjeve bilo da se siju kao pokrovni usjev ili kao živi malč (Butorac 1999.). Na taj način se osiguravaju dodatne količine biološki vezanog dušika i smanjuje se opasnost od njegovog štetnog utjecaja na podzemnu vodu u obliku nitrata. Istodobno se smanjuje i opasnost od erozije.

1.1. CILJ RADA

Glavni cilj ovog rada je prikazati ulogu simbioznih asocijacija kvržičnih bakterija i nekih mahunarki kako bi se iskorištavanjem bioraznolikosti i korisnih mikrobioloških procesa osigurala proizvodnja usjeva bogatih proteinima i zaštitili prirodni resursi.

2. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA

Biološka fiksacija dušika (BNF) je proces u kojem neki mikroorganizmi usvajaju elementarni dušik iz atmosfere te ga preko enzima nitrogenaze reduciraju do amonijaka koji se onda koristi za sintezu proteina. Iza fotosinteze, drugi je po važnosti kao biološki proces na Zemlji (Rascio i La Rocca 2013.).

U procesu fiksacije dušika enzim nitrogenaza ima glavnu ulogu jer omogućuje redukciju atmosferskog dušika u amonijak koji je biološki iskoristiv (Dean i sur. 1993.). Prije industrijske revolucije, biološka fiksacija dušika bila je dominantan izvor reaktivnog dušika u biosferi. U novije vrijeme, ljudska aktivnost znatno je povećala stvaranje reaktivnog dušika, ponajviše sintezom mineralnih dušičnih gnojiva i uzgojem kultura koje podržavaju BNF, a također i nenamjernim sagorijevanjem fosilnih goriva (Galloway i sur. 2008.).

Biološka fiksacija dušika dijeli se na asimbioznu u kojoj mikroorganizmi žive slobodno u tlu i vodama, asocijativnu u kojoj žive na površini korijena i simbioznu gdje žive u zajednici s određenim biljkama. Organizmi koji mogu fiksirati atmosferski dušik pripadaju skupini prokariota i nazivaju se diazotrofi. Asimbiozni fiksatori dušik fiksiraju u slobodnoživućem stanju, dok ga ostali fiksiraju tvoreći asocijativne ili simbiozne odnose sa raznim biljkama.

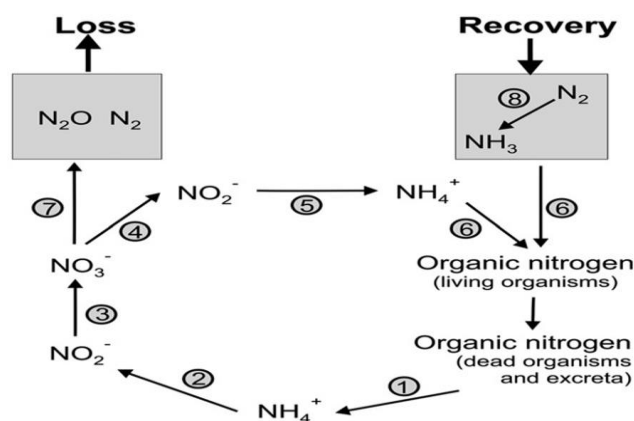
Dušik (N) je sastavni element mnogih esencijalnih tvari biljnog metabolizma poput aminokiselina, proteina, nukleinskih kiselina, klorofila. U prirodi, najveće količine dušika nalaze se u atmosferi u molekularnom obliku N_2 , ali s obzirom da biljke dušik mogu usvajati u samo dva oblika, amonijačnom i nitratnom, sav dušik iz atmosfere nisu u mogućnosti iskoristiti. Njegov nedostatak uzrokuje usporen rast cijele biljke i kloroze, a višak uzrokuje tvorbu velike lisne mase, biljke su krhke i neotporne na bolesti, čuvanje i okus povrća su loši zbog smanjene sinteze šećera (Lešić i sur. 2004.). Ulazak organskog dušika u lance hrane prirodnih ekosustava u osnovi je posljedica aktivnosti fotoautotrofnih organizama (cijanobakterija, alga i kopnenih biljaka). Ti primarni proizvođači preuzimaju dušik iz okoliša uglavnom kao nitrat, reduciraju ga u amonijak, a zatim amonijak asimiliraju u organske spojeve kako bi tvorili aminokiseline (Stacey 2007.).

Međutim, ovaj postupak asimilacijske redukcije nitrata nije jedina promjena kroz koju prolazi dušik. Dušik u biosferi prolazi kroz mnoge oblike, u rasponu od reduciranog, NH_3 (ili NH_4^+), do najoksidiranijeg NO_3^- u biogeokemijskom ciklusu.

Mineralizacija dušika je pretvaranje organskog dušika u anorganski dušik. Amonifikacija je pretvorba organskog dušika u amonijak, a u tlu se amonijak brzo oksidira u nitrata pod djelovanjem nitrifikatora. Amonifikaciju provode saprofitne bakterije i gljive koje odvajaju NH_3 od organskih dušičnih spojeva i otpuštaju ovaj reducirani oblik anorganskog dušika u okoliš. Nitrifikacija je oksidacija amonijaka preko nitrita do nitrata, a odvija se posvuda u tlu. Provode ju pretežno kemoautotrofne bakterije koje crpe energiju iz oksidacije amonijaka u nitrite (npr. *Nitrosomonas* spp.) i od nitrita do nitrata (npr. *Nitrobacter* spp.). Konačni produkt nitrifikacije je nitrat, visoko mobilan anion u tlu koji se lako ispire u podzemne vode. Ciklus se zatvara asimilacijom amonijaka u aminokiseline koja dovodi do oporavka organskog dušika (Rascio i La Rocca 2013.).

Bez obzira na to, postoje i biološki putevi nepovratnog gubitka dušika. Jedan od njih provode fakultativne anaerobne bakterije. Ti mikroorganizmi (npr. *Pseudomonas* spp. i *Alcaligenes* spp.) dovode do procesa disimilacijske redukcije nitrata koji se naziva denitrifikacija. U anoksičnim uvjetima aktiviraju anaerobno disanje koristeći nitratske i druge oksidirane oblike dušika umjesto kisika kao završne akceptore elektrona u respiratornom lancu. To dovodi do nastanka plinovitih oblika dušika (N_2O ili N_2) koji se gube u atmosferi.

Još jedan široko rasprostranjen postupak koji u znatnoj mjeri doprinosi gubitku fiksiranog dušika kao N_2 u različitim prirodnim okruženjima otkriven je nedavno. Ovaj postupak se naziva anaerobna amonijeva oksidacija (anammox) koju provode kemoautotrofne („anammox“) bakterije, poput *Brocadia anammoxidans* i *Scalindua* spp. koje dobivaju energiju za rast iz oksidacije NH_4^+ u N_2 u potpunoj odsutnosti kisika koristeći nitrite kao akceptore elektrona.



Slika 2.1. Pojednostavljena shema dušičnog ciklusa koja pokazuje korake koje provode živi organizmi: (1) amonifikacija; (2,3) nitrifikacija; (4, 5) asimilacijsko smanjenje nitrata; (6) asimilacija amonijaka; (7) denitrifikacija i (8) fiksacija dušika.

Izvor: Rascio i La Rocca (2013.)

U prirodnim ekosustavima dolazi do obnavljanja dušika, potrebnog za zadovoljavanje prehrambenih potreba organizama kroz biološku fiksaciju dušika. Ovaj je proces od vitalne važnosti zbog redukcije molekularnog dušika (N_2) do amonijaka (NH_3), čime se ekosustavima Zemlje osigurava oko 200 milijuna tona N godišnje (Rascio i La Rocca 2013.). Procijenjeno je da 80 do 90 % dušika koji je dostupan biljkama u prirodnim ekosustavima potječe od biološke fiksacije dušika.

Dušik čini gotovo 80 % atmosfere, ali biljkama je metabolički nepristupačan zbog izuzetne stabilnosti trostruke kovalentne veze. Sposobnost kataliziranja enzimske redukcije N_2 u NH_3 ograničena je na neke prokariote koji su definirani kao mikroorganizmi koji fiksiraju dušik ili dijazotrofni mikroorganizmi koji su široko rasprostranjeni u svim ekosustavima kao slobodnoživući organizmi ili u simbiozi s mahunarkama. Ti prokarioti koji fiksiraju N_2 mogu biti anaerobni, fakultativni aerobi, aerobni ili fotosintetski organizmi. Svi provode redukciju N_2 enzimatskim kompleksom nazvanim nitrogenaza. Kompleks nitrogenaze sastoji se od dva različita enzima: dinitrogenaza reduktaza i dinitrogenaza. (Igarashi i Seefeldt 2003.). Dinitrogenaza reduktaza je homodimerni (α_2) Fe-protein od oko 70 kilodaltona(kDa) s 4Fe-4S klasterom, koji veže adenzin-trifosfat (ATP) i prenosi elektrone u dinitrogenazu. Potonji enzim je tetramerni ($\alpha_2\beta_2$) FeMo protein od oko 220 kDa. Sadrži dva Mo – Fe – S klastera i promjenjivi broj Fe – S klastera i veže N_2 . Oba enzima su vrlo osjetljivi na kisik, koji ih brzo inaktivira (Dixon i Wheeler 1986.).

Prema Newton (2007.) molibden nitrogenaza je dugo proučavan enzimski kompleks koji se nalazi u svim dijazotrofima. Međutim, ostale dvije alternativne nitrogenaze identificirane su u nekim slobodnoživućim bakterijama koje pripadaju rodovima *Azotobacter* i *Rhodopseudomonas* i u nekim cijanobakterijama. Ovi osebujni dijazotrofni organizmi mogu sintetizirati, osim Mo-Fe-nitrogenaze, vanadij-nitrogenazu (V-N₂-aza) i nitrogenazu koja zahtijeva samo Fe (Fe-N₂-aze).

Alternativne nitrogenaze mogu služiti kao zamjenski putevi za fiksaciju dušika u uvjetima nedostatka molibdena. One su strukturno slične Mo-N₂-azi i djeluju i na isti način te imaju iste zahtjeve za aktivnost i reaktivni su na isti raspon supstrata (Stacey 2007.)

U redukciji dušika koju provodi Mo-N₂-aza, koja se također naziva i konvencionalna nitrogenaza, oksidirana dinitrogenaza reduktaza prihvata elektron od davatelja (reducirani feredoksin ili reducirani flavodoksin) i veže dvije molekule ATP-a.

Konačno, FeMo protein vrši prijenos elektrona (i protona) na vezno N₂ mjesto na MoFe kofaktoru (Rascio i La Rocca 2013.).

2.1. SIMBIOZNA FIKSACIJA DUŠIKA

Simbiozni odnos bakterija i biljaka je glavni način na koji dušik dopjeva u zemljinu biosferu. Provode ga aktinomicete roda *Frankia*, a fiksiraju dušik u kvržicama na korjenju ne-leguminoznih biljaka, zatim neke cijanobakterije s biljkama iz roda *Azolla*, a najpoznatiji simbiozni odnos je između rizobija i mahunarki. Najznačajniji tip simbiotske fiksacije dušika za poljoprivredna tla je simbioza bakterija iz rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium* s većinom biljaka iz porodice mahunarki.

Simbioza se temelji na obostranoj koristi partnera u kojoj mahunarke opskrbljuju bakterije ugljikom odnosno energijom koja im je potrebna za odvijanje procesa fiksacije, dok mahunarke dobivaju dušik koji je reduciran do amonijskog oblika (Sulieman i Phan Tran 2014.). Simbioza je rezultat molekularnog dijaloga između biljnog domaćina i simbionta (Keller i sur. 2017.).

Međusobna interakcija rizobija i mahunarki započinje razmjenom signala i prepoznavanjem simbiotskih partnera, nakon čega slijedi pričvršćivanje rizobije na korijenove

dlačice. Preko svog korijena, biljke otpuštaju u rizosferu flavonoide. Kao reakcija na biljne flavonoide, kod mikrosimbionta (rizobija) dolazi do produkcije i aktivacije signalnih molekula - Nod faktora. Prepoznavanjem Nod faktora od strane biljke dolazi do deformacije korjenovih dlačica, a bakterije napadaju biljku novoformiranom infekcijskom niti koja raste kroz nju. Istodobno, kortikalne stanice se mitotički aktiviraju, stvarajući primordijalnu kvržicu. Infekcijske niti rastu prema primordijalnoj kvržici, a bakterije se zatim otpuštaju u citoplazmu stanica domaćina, okruženu biljnom peribakteroidnom membranom (PBM). Nakon toga primordijalna kvržica se razvija u zrelu kvržicu, dok se bakterije diferenciraju u svoj endosimbiotski oblik koji je poznat i pod nazivom bakteroid. Bakterioidi zajedno s okolnim PBM-om nazivaju se simbiozom. U ovoj fazi bakterije sintetiziraju nitrogenazu koja katalizira redukciju dušika. Produkt fiksacije dušika, amonijak, tada se transportira u biljku (van Kammen 1984.).

Zahvaljujući ovom procesu moguće je uzgajati brojne mahunarke poput lupina, graha, leće, boba, graška, slanutka i soje diljem svijeta čak i na tlima koja su iscrpljena i siromašna dušikom.

2.1.1. ZNAČAJ BIOLOŠKE FIKSACIJE DUŠIKA

Dušik je važan element svih živih organizama, a opskrba dušikom je presudna za ekologiju i biogeokemiju kopnenih i vodenih ekosustava. Dostupnost biološkog dušika u ekosustavima ograničava niz fizikalnih procesa kao što su otopljeni nitrati koji se otpuštaju iz otpadnih voda te bioloških kao što su denitrifikacija i anamoks. Biološka fiksacija dušika je proces koji pruža najveći izvor dušika u prirodnom okruženju radi nadoknade njegovih gubitaka. Međutim, količine vezanog dušika uvelike variraju u različitim ekosustavima (Rascio i La Rocca 2013.). Biološkom fiksacijom dušika biljke direktno iskorištavaju dušik.

Degradacija tla rezultat je niza procesa od kojih je najočitija i najoštrija erozija tla zato što rezultira gubitkom samog tla. Tijekom erozije gornji sloj tla se uklanja što dovodi do gubitka organske tvari i mnogih hranjivih tvari. Erodirano tlo se gubi i istodobno se smanjenjuju koncentracije preostalih hranjivih sastojaka u tlu. Čak i tamo gdje erozija tla nije veliki problem, postoji kontinuirani gubitak hranjivih tvari iz poljoprivrednih tala zbog uklanjanja usjeva, ispiranja, a posebno su značajni gubici dušika u plinovitom obliku. Gubici dušika se mogu

uravnotežiti i s dodatkom dušičnih gnojiva i biološkom fiksacijom dušika.

Degradacija tla može se dogoditi i kao rezultat onečišćenja. Posebno treba uzeti u obzir fiksaciju N_2 tamo gdje je tlo zagađeno teškim metalima. U koncentracijama premalim da uzrokuju fitotoksične učinke, dugotrajno onečišćenje tla teškim metalima rezultira izumiranjem asimbioznih i simbioznih fiksatora dušika (Brookes i sur. 1986.; Lorenz i sur. 1992.) što može dovesti do kompletnog prestanka fiksacije.

Uloga BNF-a u zadovoljenju budućih prehrambenih potreba rastućeg stanovništva vrlo je važna. Održivost poljoprivredne proizvodnje je predmet mnogobrojnih istraživanja i politike u posljednjem desetljeću, ali s različitim interpretacijama o tome što se smatra održivim. Proizvodnja mora biti prihvatljiva i mora se povećati u mnogim područjima kako bi se zadovoljile potrebe sve veće populacije.

BNF smanjuje onečišćenje podzemnih voda do kojih dolazi zbog prekomjernog korištenja mineralnih dušičnih gnojiva stoga je ovaj proces od velike ekološke važnosti. Biljke mogu apsorbirati samo mali dio dušičnih gnojiva, a Jensen i sur. (2012.) procjenjuju da se čak 30-50 % gubi iz tla u podzemne vode uzrokujući globalno onečišćenje. U procesu denitrifikacije višak dušika u tlu razlažu mikroorganizmi kojim nastaje N_2O . Iskorištavanje procesa simbiozne fiksacije dušika pridonosi očuvanju kvalitete tla te smanjenju emisije stakleničkih plinova.

Da bi se proizvelo mineralno dušično gnojivo potrebno je iskorištavanje neobnovljivih fosilnih izvora čije se zalihe svakodnevno smanjuju, a istovremeno potreba za njima raste. Spaljevanjem fosilnih goriva emitiraju se staklenički plinovi. Stoga se može govoriti i o ekološkom i o energetsom značaju simbiozne fiksacije dušika jer ovaj proces koristi sunčevu energiju za konverziju dušika u amonijak.

2.1.2. FIKSATORI DUŠIKA

Najpoznatiji simbiozni odnos je onaj između rizobija i mahunarki koji ima i najveću važnost u poljoprivrednoj proizvodnji. Većina vrsta mahunarki može fiksirati atmosferski dušik (N_2) putem simbiotskih bakterija (rizobija) u korijenovim kvržicama. Jedna od najbolje proučenih interakcija biljaka i mikroorganizama je simbioza između rizobija i mahunarki, poput soje, slanutka, leće, graška, graha, lucerne i djeteline (Poole i sur. 2018.). Rizobije (grč. rhiza- korijen, bios- život, tj. život na korijenu) su gram negativne štapičaste bakterije koje ne mogu

samostalno fiksirati dušik. To su pokretljive, brzorastuće bakterije koje žive slobodno u tlu. Njihovo generacijsko vrijeme je od 2 do 4 sata, a na površini agara stvaraju velike kolonije promjera 2-4 mm nakon tri do pet dana uzgoja u laboratoriju (Saharan i Nehra 2011.). Rizobija mora preživjeti često teške uvjete u tlu i natjecati se s autohtonom mikrobiotom prije uspostavljanja simbioze (Poole i sur. 2018.). Mogu živjeti potpuno slobodno u tlu kao saprofiti, no tada su zastupljeni u mnogo manjem broju nego u rizosferi biljaka. Na korijenu biljaka žive kao endofiti. Tipična vrsta roda je *R. leguminosarum* (Frank 1889.). Rod *Rhizobium* sadrži više od 70 vrsta, a one uključuju sojeve koji na korijenu induciraju kvržice u kojima može i ne mora doći do simbiotičke fiksacije dušika.

Do danas je opisano više od 130 vrsta rizobija koje su razvrstane u 15 rodova. Do naglog porasta broja novootkrivenih vrsta došlo je zbog sve većeg broja istraživanja mikrosimbionata nekih egzotičnih vrsta mahunarki. Zbog velikog napretka u metodama često dolazi do reklasifikacija, reorganizacija unutar rodova i porodica te promjena kriterija za opisivanje pojedinih taksonomskih jedinica (Rajnović 2017.).

Taksonomija rizobija započela je 1888. godine kada je Martinus Willem Beijerinck izolirao bakterije iz kvržica na korijenu graška i utvrdio da su one odgovorne za proces fiksacije dušika. Te je bakterije nazvao *Bacillus radicicola* (Beijerinck 1888.). Kasnije je Frank promijenio ime u *Rhizobium* s izvorno samo jednom vrstom, *R. leguminosarum* (Frank 1889.) nakon čega su sve otkrivene vrste koje noduliraju biljke pripadale rodu *Rhizobium*. Početkom 20. stoljeća, klasifikacija rizobija se temeljila na vrsti mahunarki koje mogu nodulirati. Wilson je predložio da se ovakav pristup napusti jer su pronađene brojne vrste koje mogu nodulirati biljke izvan ovako definiranih skupina (Wilson 1944.). Zatim slijedi podjela rizobija na temelju brzine njihova rasta na hranjivom mediju u dvije skupine: brzorastuće (*Rhizobium*) i spororastuće (*Bradyrhizobium*) (Jordan 1984.).

Woese je svrstao bakterije koje noduliraju mahunarke u razred alfabroteobakterija na temelju analize sekvenci 16S rRNA gena čime je započeo veliku promjenu u taksonomiji rizobija (Woese i sur. 1984.). Od tada je sekvenciranje ovih gena postalo osnovna metoda koja je omogućila identifikaciju brojnih novih vrsta i rodova, ali i dovela do nekoliko značajnih promjena u klasifikaciji rizobija. Prva vrsta u čijem je opisu korišteno sekvenciranje 16S rRNA gena je *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero i sur. 1991.).

Godine 1992. izolirano je šest bakterija iz kvržica mahunarke *Neptunia natans*. Izolati su bili fenotipski i genotipski različiti od do tada poznatih vrsta te su svrstani u novi rod

Allorhizobium (De Lajudie i sur. 1992.). Jarvis i sur. (1997.) opisali su rod *Mesorhizobium* i utvrdili da vrste *Rhizobium loti*, *Rhizobium ciceri* i *Rhizobium meditteraneum* pripadaju ovom rodu. Druge dvije vrste iz roda *Rhizobium* (*Rhizobium fredii* i *Rhizobium meliloti*) reklasificirane su u rod *Sinorhizobium* koji je kasnije preimenovan u *Ensifer*.

Tijekom istraživanja raznolikosti rizobija došlo je do brojnih promjena u njihovoj taksonomiji, a ni danas njihova taksonomija nije jednoznačno prihvaćena. Pod pojmom rizobija neki znanstvenici i dalje smatraju sve bakterije koje mogu nodulirati biljke, drugi ih dijele na „stare, klasične“ i „nove“ rizobije (Peix i sur. 2015.). U „stare“ rizobije ubrajaju se vrste rodova *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* i *Rhizobium*. Nedavno su opisana dva nova roda *Neorhizobium* (Mousavi i sur. 2014.) i *Pararhizobium* (Mousavi i sur. 2015.). Ovi rodovi pripadaju porodici Rhizobiaceae, redu Rhizobiales, razredu alfaproteobakterija

„Novim“ rizobijama nazivaju se atipične bakterije koje mogu nodulirati biljke (Peix i sur. 2015.). One pripadaju alfaproteobakterijama, ali porodicama koje ne uključuju klasične rodove rizobija. Mahunarke mogu nodulirati i vrste iz razreda betaproteobakterija. Moulin i sur. (2001.) su izolirali iz kvržica *Mimosa spp.* vrste roda *Burkholderia*. Pripadaju alfaproteobakterijama, ali porodicama koje ne uključuju stare rodove rizobija. Lemaire i sur. (2015.) su utvrdili da su betaproteobakterije rasprostranjene u kvržicama nekoliko redova mahunarki. „Nove“ rizobije uključuju rodove *Aminobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* i *Shinella* iz razreda alfaproteobacteria i rodove *Paraburkholderia* (prije *Burkholderia*) i *Cupriavidus* iz razreda betaproteobacteria (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Simbiozni geni poput nodA, nifH ili nodC koje nazivamo pomoćni (engl. auxiliary, accessory) su vrlo korisni u proučavanju biogeografije izolata te su osnova za definiranje simbioznih biovarijeteta. Biovarijeteti su grupe sojeva unutar iste vrste koji mogu uspostaviti simbiozu s određenom mahunarkom. Jordan (1984.) je ovakve grupe nazvao „biovar“ uočivši da se nodulacijski plazmidi mogu prenositi između sojeva. Definirao je biovare *viciae*, *trifolii* i *phaseoli* unutar vrste *R. leguminosarum* prema biljkama koje mogu nodulirati. Vinuesa i sur. (2005.) su opisali prvi biovar iz roda *Bradyrhizobium*, vrste *Bradyrhizobium japonicum*. Rogel i sur. (2011.) su predložili termin „simbiovar“ koje je i prihvaćen te zamjenjuje dotadašnji „biovar“.

Neke značajne vrste iz roda *Rhizobium* su *R. leguminosarum* koji ima 3 simbiovara *R. leguminosarum* sv. *viciae*, sv. *trifolii* i sv. *phaseoli*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. galegae*, *R. lupini*, *R. phaseoli*, *R. fabae*, *R. pisi*.

Većina rizobija ima uzak raspon domaćina na primjer, *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* nodulira samo djetelinsku rod *Trifolium*.

Biološka N fiksacija odražava aktivnost filogenetski raznolikog popisa bakterija. Genetske i molekularne tehnike sada pružaju efikasna sredstva za identifikaciju organizama koji fiksiraju dušik, a primjena ovih tehnika u različitim okruženjima proširile su znatno naše razumijevanje tih organizama.

U prošlosti se većina evaluacije BNF-a smatrala rizobijalnim i aktinoriznim simbiozama. Novija istraživanja pokazala su da postoji mnoštvo mikroorganizama koji su sposobni za BNF, uključujući arheje, kao i mnoge prethodno neotkrivene bakterije (Reed 2011.) Čak je i za najpoznatiju simbiozu između mahunarki i rizobija otkriveno da je mnogo raznovrsnija i kompleksnija nego što se prije mislilo. S novim otkrićima u rasponu od dodatnih mikrobioloških partnera koji noduliraju mahunarke i učinkovito fiksiraju N₂ (Gyaneshwar i sur. 2011.) do raznolikih puteva kojim se noduliraju i inficiraju (Sprent 2007.)

Vitousek i sur. (2013.) ističu kako je naša povećana sposobnost identificiranja organizama koji vrše BNF nadmašila je naše razumijevanje načina reguliranja BNF-a u tim različitim organizmima. Okolišni i fiziološki uvjeti koji mogu ograničiti BNF su niska razina raspoložive energije, visoka razina O₂ na mjestu fiksacije, visoka razina reaktivnog N u okruženju i niska dostupnost drugih resursa, a posebno fosfora (P), željeza (Fe), kalija (K) i molibdena (Mo).

2.2. PREDSJETVENA BAKTERIZACIJA MAHUNARKI

Proces primjene cjepiva na sjeme ili u tlo zove se inokulacija, sinonim je i bakterizacija. Guthrie je 1896. izjavio "da će se pokazati da je bakterizacija jedan od najvrednijih doprinosa koje je znanost ikada dala praktičnoj poljoprivredi,,. Najveći uspjeh proizašao iz znanstvenih istraživanja BNF-a nesumnjivo je razvoj rizobijalnih cjepiva. Upotreba cjepiva omogućila je uspješno uvođenje mahunarki u nove sustave uzgoja gdje kompatibilnih rizobija nije bilo

prisutno u tlu. Primjeri uključuju unošenje soje u SAD-u i Brazilu. Unatoč dugogodišnjim istraživanjima bakterizacije, jedini primjer gdje se široko prihvaća bakterizacija rizobija je na soji (Giller i Cadisch 1995.).

Rani pokušaji bakterizacije bili su osnovni, poput premještanja tla s polja dobro noduliranih mahunarki na polja bez mahunarki (Fred i sur. 1932.). Bakterizacija sjemena mahunarki korištenjem čistih kultura rizobija počela se provoditi u Europi 1880-ih nakon revolucionarnog rada Hellriegela i Beijerincka (Perret i sur. 2000.). Beijerinck je prvo izolirao i uzgajao čiste kulture rizobija i koristio ih za infekciju mahunarki koje su rasle u sterilnom tlu. U roku od nekoliko godina, kulture rizobija bile su dostupne na europskim tržištima da bi poljoprivrednici mogli inokulirati čitav niz vrsta (Guthrie 1896.). Zagovaralo se cijepljenje i sjemena i tla. Od tog vremena, proizvodnja i distribucija cjepiva postala je ustaljena praksa u mnogim zemljama. Herridge (2008.). navodi kako se mišljenja razlikuju o trenutnoj količini cjepiva koje koriste poljoprivrednici. Singleton i sur. (1997.) navode da svjetska proizvodnja cjepiva na bazi treseta iznosi oko 2000 tona godišnje, što je dovoljno za 20 milijuna hektara tla gdje su zasijane mahunarke, dok je Phillips (2004.) izračunao da površina inokuliranih mahunarki svake godine iznosi 44 milijuna ha ili 25 % površina zasijanih mahunarkama.

Primjenom bakterizacije sjemena na mahunarkama utječe se na povećanje prinosa i mase bez dodavanja značajnih količina dušičnih gnojiva. Kod poljoprivrednih proizvođača to je veoma pozitivno jer ne moraju dodatno ulagati, a time se pojeftinjuje i proizvodnja.

Cjepivo bi trebao sadržavati samo bakterije koje mogu stvarati kvržice i fiksirati velike količine dušika da bi bilo efikasno. Treba sadržavati samo jedan soj rizobija ili njih nekoliko (FAO 1984.). Današnja cjepiva sadrže visoke selekcionirane i kvalitetne sojeve kvržičnih bakterija kojima se fiksira velika količina dušika. Za visoki prinos mahunarki, nedostatak dušika je vrlo često ograničavajući faktor, sama bakterizacija ga sprječava čime se smanjuje i unos mineralnog dušičnog gnojiva. Time se otklanja i rizik da će količina fiksiranog dušika biti premala ili da će sama fiksacija izostati.

Cjepiva se danas naširoko koriste u raznim dijelovima svijeta. Jeftina su, prihvatljiva za okoliš i jednostavna za upotrebu bez nuspojava u većini slučajeva. Tamo gdje tla ne sadrže specifičnu rizobiju potrebnu za uspostavljanje učinkovite simbioze, bakterizacija je nužna zbog osiguravanja da su u rizosferi biljke dostupne velike i učinkovite populacije rizobija (Beck i Duc 1991.).

Postoje dva načina aplikacije cjepiva. Najčešće se upotrebljavaju cjepiva koja se apliciraju na sjeme zbog lake aplikacije i učinkovitosti. Aplikaciju cjepiva direktno u tlu potrebno je učiniti kad se sjeme mahunarki sije u toplo, suho i kiselo tlo te pri drugim nepovoljnim uvjetima.

Koriste se različite formulacije cjepiva: praškasti, granulirani, tekući, prethodno inokulirano sjeme i liofilizirani pripravci. U našoj zemlji postupak bakterizacije najčešće se upotrebljava prije sjetve primjenom praškastog cjepiva izravno na sjeme (Blažinkov i sur. 2015.). Važno je da cjepivo koje sadrži žive bakterije bude čuvano u adekvatnim uvjetima, zaštićeno od sunca i topline.

Kako bi bakterizacija bila uspješna najvažnije je odabrati kvalitetne sojeve rizobija. Cilj selekcije rizobija je pronaći soj koji će biti kompetitivniji od autohtonih sojeva iste vrste kako bi inficirao određenu mahunarku i stvorio dovoljan broj kvržica te pronaći soj koji će biti otporan na nepovoljne uvjete u tlu. Poznato je da se različiti sojevi rizobija razlikuju po svojstvima kao što je simbiozna učinkovitost, kompatibilnost s drugim rizobijama u tlu, kompatibilnosti s biljkom domaćinom i sposobnosti prilagodbe stresnim uvjetima u tlu (Sikora i sur. 2014.). Genetska stabilnost, osobito u uvjetima stresa, bitna je za bilo koji soj koji se preporučuje za upotrebu u komercijalnim cjepivima (Hungria i sur. 2000.).

Brojni biotički i abiotički čimbenici mogu nepovoljno utjecati na bakterizaciju zbog čega može doći do izostanka nodulacije. Biotički čimbenici podrazumijevaju prisutnost autohtonih sojeva rizobija koji mogu biti zastupljeni u velikom broju u tlu, no neučinkoviti su, ali kompetitivni jer su dobro prilagođeni na uvjete koji ondje prevladavaju.

Važan abiotički faktor je optimalna temperatura. Za većinu kvržičnih bakterija optimum se kreće u rasponu od 25 do 30 °C dok su gornje granice između 32 i 47 °C. Rizobije su izložene nepovoljnim temperaturama i kada žive slobodne u tlu, ali i unutar kvržica.

Povećan salinitet tla je jedan od glavnih abiotičkih čimbenika koji utječu na uspjeh bakterizacije i simbiozne fiksacije dušika. Visoke koncentracije soli mogu štetno utjecati na rizobije kao rezultat toksičnosti ili kao posljedica osmotskog stresa (Zahran 1999.). Sadržaj vode u tlu također je važan abiotički čimbenik koji ima utjecaj na rast rizobija i simbioznu fiksaciju dušika. U suhim tlima dolazi do slabije nodulacije mahunarki zbog smanjenja broja rizobija, ali i zbog utjecaja takvih uvjeta na rast biljke. Sušni uvjeti nepovoljno utječu na infekcije korijenovih dlačica i formiranje infekcijske niti što uzrokuje smanjenje broja kvržica (Graham 1981.). Nodulaciju mogu potaknuti niske količine nitrata ili amonijaka prisutnog u tlu,

a visoke koncentracije mineralnog dušika mogu ograničiti uspjeh simbioze mahunarki i rizobija. Dokazano je da NO_3 zaustavlja infekciju korijena, razvoj nodula i aktivnost nitrogenaze (Muller i Perreira 1995.).

3. MAHUNARKE

Porodica mahunarki (Fabaceae) sastoji se od oko 19.300 vrsta unutar 750 rodova, rasprostranjenih po cijelom svijetu, a pojavljuju se kao zeljaste i drvenaste biljne vrste (Lewis i sur. 2005.). Mahunarke su skupina biljaka koja pripada razdjelu Magnoliophyta, razredu Magnoliopsidae i redu Fabales te porodici Fabaceae. Trenutno je porodica mahunarki podijeljena u tri potporodice, Caesalpinioideae, Mimosoideae i Papilionoideae (Cardoso i sur. 2013.). Predložena je nova klasifikacija mahunarki sa šest potporodica na temelju sekvenci gena plastid matK (LPWG 2017.). Šest predloženih potporodica su Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae i Papilionoideae (Andrews i Andrews 2017.).

Saraf i sur. (2017.) navode da se pojedine mahunarke se uzgajaju zbog zrna, a neke se koriste kao krmne kulture. Zrnata mahunarka koja se najviše koristi kao ratarska kulture je soja (*Glycine max* L. Merr.). U ishrani ljudi i stoke uzgajaju se su grah (*Phaseolus vulgaris* L.), grašak (*Pisum sativum* L.), bob (*Vicia faba* L.), slanutak (*Cicer arietinum* L.), leća (*Lens culinaris* Medik.), sjekirica (*Lathyrus sativus* L.), lupina (*Lupinus* spp.) i crnookica (*Vigna unguiculata* L.). Najvažnije krmne mahunarke su lucerna (*Medicago sativa* L.) i crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.).

Mahunarke koloniziraju puno različitih ekosustava, od kišnih šuma i arktičko-alpskih regija do pustinja (Schrire i sur. 2005.). Kako navode Lewis i sur. (2005.) treća su najbrojnija obitelj cvjetnih biljaka iza porodica Asteraceae i Orchidaceae. Uzgajaju se kao usjevi za prehranu ljudi i životinja, a upotrebljavaju se za proizvodnju papira, goriva, drva, ulja, izvor su sirovina za proizvodnju kemikalija i lijekova te se uzgajaju kao ukrasne biljke.

Glavni su element svjetske poljoprivrede i važan čimbenik u prehrani ljudi i hranidbi životinja zato što su glavni izvor biljnih i kompleksnih proteina. Svake godine mahunarke doprinose poljoprivredi s 21 milijuna tona fiksiranog dušika (Herridge i sur. 2008.).

Sadrže dijetalna vlakna, malo masti, ne sadrže zasićene masti i trans masne kiseline,

te su bez kolesterola. Važan su čimbenik u prirodnom ciklusu dušika, a u poljoprivredi su korisne zbog poboljšanja plodnosti tla vezanjem atmosferskog dušika (De Ron 2015.). Zahvaljujući svojim važnim biološkim značajkama, mahunarke predstavljaju najvrijednije izvore hrane koji se konzumiraju u cijelom svijetu i osiguravaju dostupnost hrane u gotovo svim dijelovima svijeta. Mahunarke imaju visoku hranidbenu vrijednost za ljude i životinje, nadopunjuju usjeve žitarica kao izvor prehrambenih proteina i znatno doprinose ukupnom unosu proteina, uglavnom u vegetarijanskoj prehrani (Shafique 2014.).

3.1. UPOTREBA MAHUNARKI

Prema prehrambenoj i poljoprivrednoj organizaciji (FAO 2015.), mahunarke (grah, grašak, slanutak i leća) predstavljaju važnu komponentu zdrave prehrane jer nude jeftiniji alternativni izvor proteina u usporedbi s proteinima životinjskog podrijetla.

Uz velika hranjiva svojstva, njihovu raznolikost i povezanost s rizosfernim mikroorganizmima, mahunarke nude učinkovitu alternativu za poboljšanje biljne proizvodnje, obnavljanje degradiranih tala i ravnotežu njihovih ekosustava (Beebe i sur. 2013.). Uzgajanje važnih kultura kao što su mahunarke, mora biti održivo, jer se predviđa da će klimatske promjene utjecati na smanjenje prihoda za poljoprivrednike (Bozzola i sur. 2018.) posebno u Sjevernoj Africi, gdje su strukturna agronomska pitanja intenzivirana teškim socioekonomskim uvjetima. Pružaju mnogo koristi tlu pa se obično koriste kao pokrovni usjev. Produciraju znatne količine organskog dušika (poboljšanje prinosa mahunarki inokulacijom rizobijama), povećavaju organsku tvar u tlu, poboljšavaju poroznost i strukturu tla, smanjuju pH i zbijenost tla i ublažavaju probleme bolesti (SAD Ministarstvo poljoprivrede 1998.).

Vrste kao što su lupina, leća, grašak i grahorica unosile su se u tlo kao zelena gnojidba prije 2000 godina. Zelena gnojidba je jedan od najučinkovitijih načina povećanja plodnosti tla, vodozračnih režima i uvjeta za rad mikroorganizama tako što se zaoravaju kultivirane biljke, cijele ili dijelovi, te se razgrađuju u tlu i obogaćuju ga organskom tvari (Lešić i sur. 2004.). Značajna je jer mahunarke simbiotski vežu molekularni dušik iz atmosfere. Višestruko pozitivno djeluje na svojstva tla i prinos. Zelenom gnojidbom se poboljšava i struktura tla što se postiže povećanjem sadržaja organske tvari u tlu kako bi se uspostavila ravnoteža s gubicima koji nastaju zbog obrade, sprječava ispiranje biljnih hraniva u intervalima između dva

usjeva, povećava rezerve dušika u tlu kada se u tlo unose leguminozni usjevi, intenzificira mikrobiološke procese u tlu te sprječava površinsku eroziju tla.

Razlikuju se leguminozni i neleguminozni usjevi za zelenu gnojidbu. Od leguminoznih usjeva najznačajniji su lupine (plava, bijela, žuta i višegodišnja), lucerna, soja, bob, grahorica, leća, crvena i bijela djetelina. Neke leguminozne usjeve treba prvenstveno koristiti za proizvodnju krme, a tek potom kao siderate (Butorac 1999.). Količina zelene mase koja se zaorava je oko 100 kg N/ha.

Usjeve koji se uzgajaju za zelenu gnojidbu kao što su leća, lupine i slanetak treba smatrati i pokrovnim usjevima zato što štite površinu tla od negativnih vanjskih čimbenika. Pokrovni usjevi se često zovu pokrivačima tla jer štite površinu od erozije te sprječavaju ispiranje nitrata i onečišćenje podzemnih voda. Površinski malč pruža hranjive tvari i energiju za mikroorganizme ispod površine tla koji biološki obrađuju dio tla. Pokrovni usjev promiče povećanje biološke raznolikosti, ne samo ispod površine, nego i nadzemno. Broj korisnih insekata veći je tamo gdje su pokrovni usjev i malč (Jaipal i sur. 2002.), a oni pomažu u kontroli populacije štetnih insekata. Pokrovni usjev štiti tlo od erozije vodom ili vjetrom te ujedno pospješuje upijanje i zadržavanje vode u tlu.

Konsocijacija ili kombinacija kultura ili združena sjetva je uzgoj više kultura na istom mjestu u isto vrijeme. U združenoj sjetvi mogu biti korištene različite kulture, međutim, potrebno je paziti da ne postoji alelopatsko djelovanje između kultura kako bi rast i razvoj bio nesmetan. Primjer združene sjetve je pokrovni usjev kombinacijom bijele rotkve, zobi i mahunarki u kojem bijela rotkva nakuplja hranjive tvari iz donjih slojeva tla i razbija tvrde agregate ispod površine, dok zob smanjuje zbijenost tla i sprječava eroziju, a mahunarke vežu dušik iz tla i daju obilje organske tvari za zelenu gnojidbu proljetnih usjeva (Međimurec 2018.)

Česte su biljne smjese mahunarki i žitarica. Zajedno se siju pšenica, grašak i grahorica kao voluminozna krma ili za proizvodnju zrna. Postoji potencijal za slanetak ili leću kao predusjev ili kao ozime kulture u toplijim krajevima. Prednost ovakvog uzgoja je visok prinos kvalitetne krme i rano napuštanje tla što omogućuje planirani uzgoj narednih usjeva (Gantner i sur. 2015.).

Mahunarke uvelike doprinose održivom gospodarenju okolišem zahvaljujući sposobnosti fiksacije dušika sa simbioznim bakterijama pri čemu može doći do povećanog prinosa i smanjenja uporabe mineralnih gnojiva, čime se izbjegava zagađenje tla. Posljednjih desetljeća postignut je slab napredak kako bi se poboljšala njihova proizvodnja. Problem u

njihovom uzgoju odnosi se na nestabilan prinos, bolesti i štetnike te slabu prilagodbu (De Ron i sur. 2015.).

3.2. OGRANIČAVAJUĆI ČIMBENICI PRINOSA MAHUNARKI

Primjenom mahunarki u poljoprivredi koja se temelji na biološkoj raznolikosti, značajno se povećavaju mogućnosti ekosustava, poput otpornosti na biotski stres, smanjenja pesticida i gnojiva te održivosti oparašivača. Stoga je od velike važnosti stvoriti nova znanja i inovativne biotehnološke alate za potpuno iskorištavanje, valorizaciju i širenje germplazmi mahunarki kao odgovor na pojačanu sušu i slanost uzrokovanu klimatskim promjenama, posebno u vrlo osjetljivim područjima, poput Mediterana (Martinelli i sur. 2020.) .

Osim nedostatka fosfora i / ili dušika, suša i salinitet su ograničavajući čimbenici prinosa zrna mahunarki, a ta će ograničenja biti pogoršana klimatskim promjenama, posebno kod malih gospodarstava. Smanjenje raspoloživosti vode posebno je prijeteće za mahunarke, što pokazuje redukcija proizvodnje graha od 60 % širom svijeta i 80 % smanjenja prinosa zrna u nekim sušnim regijama (Cuellar-Ortiz i sur. 2008.). Suša također smanjuje unos vode i utječe na brze i dugoročne mehanizme prilagodbe biljnih vrsta na klimatske promjene.

Reakcije na biljni stres mogu se okarakterizirati početnom fazom alarma, u kojem se aktiviraju mehanizmi za suočavanje sa stresom koji usporavaju procese povezane s rastom, nakon čega slijedi faza otpornosti u kojoj biljka pokušava izdržati stres i popraviti s tim povezane štete. Ako biljka ostaje pod tim stresom, ona će zadržati „dojam“ stresa koji će utjecati na reakciju u slučaju sličnog naknadnog stresa čak i u sljedećim generacijama. Molekularni mehanizmi takve biljne memorije nisu jasno razumljivi, premda se smatra da epigenomske modifikacije igraju ključnu ulogu u ovom fenomenu (Conrath i sur. 2015.).

Međutim, ovo je istraživačko područje još uvijek u velikoj mjeri nedovoljno istraženo, jer je provedeno vrlo malo studija na temu epigenomike leguminoza (Kim i sur. 2015.). Epigenomika označava sve ono što utječe na mijenjanje, izražavanje i očitovanje gena, a ne dolazi od promjena u samom genetičkom kodu. Koliko je poznato nema objavljenih

epigenomskih studija za slanutak i grah, a vrlo malo studija bavi se njihovim odgovorima na abiotičke stresove uključujući i sušu.

Veza između prisutnosti specifičnih rizobijalnih sojeva i tolerancije na sušu također se može utvrditi kako bi se identificirali oni sojevi koji značajno doprinose toleranciji na sušu genotipova različitih mahunarki, a posebno za slanutak i grah. U mahunarkama dolazi do značajnog kašnjenja starenja listova izazvanog sušom u noduliranim u odnosu na nenodulirane biljke, neovisno o soju rizobije. Glavni se mehanizmi sastoje u povećanim koncentracijama kalija, uravnoteživanju raspodjele ugljika između škroba i šećera i pojačavanjem rezervi osmolata tijekom suše. Slijedom toga, nodulirane biljke općenito bi se oporavile od suše za razliku od nenoduliranih biljaka (Martinelli i sur. 2020.)

3.3. LUPINA

Među mahunarkama važno mjesto zauzima lupina. Lupine imaju dugu povijest kao ukrasne biljke u vrtovima i kao poljoprivredni usjevi. Četiri vrste lupine stekle su poljoprivrednu važnost, uskolisna ili plava lupina (*Lupinus angustifolius* L.), bijela lupina (*Lupinus albus* L.), žuta lupina (*Lupinus luteus* L.) i andska lupina (*Lupinus mutabilis* L.) (Van de Noort 2017.). Iz latinskog naziva *Lupinus*, što znači vučiji, izveden je hrvatski naziv vučike. U Hrvatskoj je lupina poznata i pod nazivima: vučji grah, vučak, bob vučak, vučji bob, bučjak, vučnjak, vučjak, vučac, divlja ili turska kava (Kolac 1998.)

3.3.1. PODRIJETLO LUPINA

Lupina ima 4000 godina dugu povijest u poljoprivredi (Kurlovich 2002.). Nastale su od divljih vrsta iz Sredozemlja i Amerike (Gagro 1997.) Adaptacija se najprije dogodila u mediteranskoj regiji, nakon čega se kultivirala na američkom kontinentu. Međutim, pravi proboj koji je lupinu učinio modernim poljoprivrednim kulturom dogodio se u Europi i Australiji (Van de Noort 2017.).

Lupina (*Lupinus* spp.) je uzgajana u drevnoj Grčkoj i Egiptu 2000. godina prije Krista za

prehranu ljudi i životinja, kao i za kozmetiku i lijekove. Oko 1000-800 godine prije Krista, *Lupinus albus* korišten je za zelenu gnojidbu u starom Rimu, a kasnije i u drugim mediteranskim zemljama. Dva stoljeća kasnije (700. do 600. pr. Kr.), vrsta *L. mutabilis* adaptirana je na uvjete klime i tla na američkom kontinentu. Godine 1860. vrsta *L. angustifolius* korištena je za proizvodnju stajskog gnoja u baltičkim zemljama, a kasnije i u Njemačkoj. Metode za odabir mutanta s niskoalkaloidnim lupinom razvijene su u Njemačkoj krajem 1920-ih. Kasnije su se slatke vrste lupine razvile između 1930-tih i 1970-tih.

U devedesetim godinama prošlog stoljeća, nekoliko vrsta lupine, uključujući *Lupinus cosentinii*, *L. atlanticus*, *L. pilosus* i *L. polyphyllus* Lindl., uzgajano je u Australiji i Rusiji (Clements i sur. 2005.; Kurlovich 2002.). Starije vrste lupina imale su gorak okus zbog prisutnosti alkaloida. Zbog toga su se namakale u slanoj vodi kako bi se uklonili gorki sastojci alkaloida, u svrhu konzumacije. Klasične tehnike uzgoja stvorile su slatke vrste lupine s niskim sadržajem alkaloida bez potrebe za namakanjem. Visok udio bjelančevina (30-40 %) zajedno sa sadržajem složenih ugljikohidrata, bez probavljivog škroba, lupine čini jedinstvenim među graškom, graham i lećom (Van de Noort 2017.).

3.3.2 PROIZVODNJA I GOSPODARSKA VRIJEDNOST LUPINA

Zapadna Australija najveći je proizvođač lupina (90%) na svijetu, a dominantna vrsta je *L. angustifolius*. Godišnja prihod od proizvodnje lupina iznosi preko 2 milijuna funti. Pored Australije, druge zemlje koje proizvode lupine su Čile, Rusija, Poljska, Maroko, Južna Afrika i Španjolska (www.lupins.org).

Ona uspijeva na težim, manje plodnim i kiselim, ali i na pjeskovitim tlima. Dobro razvijen korijenov sustav drenira tlo, usvaja teže topiva hraniva čime popravlja biološka, kemijska i fizikalna svojstva tla (Gargo 1997.).

Prema Pospišil (2010.), visoka koncentracija proteina u sjemenu značajka je lupina, dok neke vrste imaju i visoku koncentraciju ulja kao primjerice *L. mutabilis*. Sije se kao glavni i naknadni usjev te za proizvodnju krme visoke kvalitete. Zastupljena je najviše u hranidbi životinja gdje se koristi zelena masa i sjeme.

Gagro (1997.) navodi da su sve vrste lupine prikladne za zelenu gnojidbu jer daju veliku

zelenu masu i nakupljaju velike količine dušika. Također, ističe da se sjeme lupina treba močiti, prati i ispirati ili kuhati prije davanja životinjama.

Zbog jako razvijenog korijenovog sustava lupine mogu usvajati teško topive fosfate iz tla i gnojiva, što omogućuje nesmetanu primjenu sirovih fosfata za tu kulturu. Time taj fosfor postaje dostupan svim kulturama koje slijede nakon toga (Butorac 1999.)

Upotreba lupine danas je ograničena zbog niske proizvodnje. U posljednjih 20 godina otkrivena su nova svojstva lupine zbog kojih se koristi u proizvodnji različite funkcionalne hrane (Prusinski 2017.). Lupina pronalazi značaj i u industriji gdje se od bjelančevina proizvode umjetna vlakna, plastika, i dr., a od ulja se dobiva boja i sapun (Pospišil 2010.). Koristi se i za ispašu i za zelenu gnojidbu.

3.3.3. HRANIDBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST LUPINA

Među graškom, grahom i lećom, lupina ima najviše proteina i dijetalnih vlakana (Van de Noort 2017.). Sjeme sadrži 40-50 %, a zelena masa 4-28 % proteina. U sjemenu ima približno 30 % ugljikohidrata, 4-6 % ulja, 12-14 % celuloze, a mineralnih tvari oko 3,5 % (Gagro 1997.).

Sjeme lupine bogato je bjelančevinama jedinstvenih svojstava, masnim kiselinama s poželjnim omjerima omega-6 i omega-3 kiselina, vlaknima i drugim specifičnim komponentama kao što su oligosaharidi, antioksidanti ili neškrobni ugljikohidrati te je zbog toga bijela lupina poželjna u prehrani. Sastojci u sjemenu lupine imaju pozitivno djelovanje u liječenju dijabetesa, hipertenzije, pretilosti, kardiovaskularnih bolesti i raka debelog crijeva. Također, imaju pozitivan učinak na koncentraciju lipida, glikemiju, apetit i otpornost na inzulin. Sjeme lupine se između ostaloga koristi i za proizvodnju brašna bez glutena, fermentiranih proizvoda, tjestenina, kao zamjena za bjelančevine mesa i jaja. Oligosaharidi imaju potencijalnu vrijednost u imunološkom sustavu jer imaju antioksidativno i antitumorsko djelovanje i smanjuju sadržaj kolesterola. Problem alergenskih svojstava sjemena bijele lupine veže se za samo neke vrste bjelančevina i alkaloida (Prusinski 2017.).

3.3.4. MORFOLOŠKA SVOJSTVA LUPINA

Korijen lupine je vretenast, jako razvijen, prodire duboko u tlo (više od 2 metra), ima veliku upojnu snagu zbog čega dobro usvaja teže pristupačna hraniva. Korijen se dobro grana i širi u stranu. Na korijenu lupine razvija se veliki broj kvržica, bez obzira na tip tla, njegovu plodnost, kiselost ili uvjete uzgoja .

Stabljika lupine je uspravna, okrugla, manje ili više razgranata, posuta dlačicama, visoka do šezdesetak centimetara do dva metra. Čvrsta je i debela, pa ne poliježe. Glavna stabljika i postrane grane završavaju cvjetovima, pa stabljika ima ograničeni rast.

List se sastoji od glavne peteljke, na čijem se završetku nalazi 5 do 11 listića, složenih prstasto. Listići su izduženi i eliptični do ovalni i obrnuto jajoliki te su posuti dlačicama.

Cvjetovi se oblikuju na vrhu stabljike i postranih grana u skupinama s više cvjetova. Boja ovisi o vrsti, može biti plava, bijela ili žuta. Plava i bijela lupina su samooplodne, a žuta i višegodišnja stranooplodne.

Plod je mahuna koja je gruba, kožasta, dlakava i na vrhu zašiljena. Unutar nje se nalazi tri do deset sjemenki. Sjeme je okruglasto, sa strane spljošteno, različite veličine i boje, što ovisi o vrstama (Gagro 1997.).



Slika 3.4.4.1. Plava lupina (*L. angustifolius* L.)
Izvor: www.alchetron.com



Slika 3.4.4.2. Bijela lupina (*L. albus* L.)

Izvor: www.tropical.theferns.info

3.3.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA I AGROEKOLOŠKI UVJETI UZGOJA LUPINA

Lupine zahtjevaju agroekološke uvjete s dovoljno topline i vode. Najmanje topline potrebno je plavoj lupini, a najviše bijeloj. Minimalna temperatura za klijanje je oko 3 °C. O vrsti lupine ovise i najpovoljnije temperature za klijavost, a tijekom vegetacije one iznose između 20 i 25 °C. Lupinama je za rast i razvoj potrebno i puno vode jer oblikuju veliku masu korijena i nadzemne organe. Najosjetljivija je na nedostatak vode tijekom oblikovanja cvjetnih pupova i cvatnje. Zbog razvijenog korijenovog sustava može se opskrbljivati vodom iz dubljih slojeva tla pa je suša manje pogađa. Za rast i razvoj lupina važan čimbenik je i svjetlost zato što pripadaju biljkama dugoga dana (Gagro 1997.).

Vrsta tla je glavni čimbenik koji određuje rast lupina. Čini se da lupine (*L. angustifolius*, *L. albus*) u nekim sredinama, rastu na širokom rasponu tla, uključujući sitno-teksturirana, alkalna tla (Corbin 1978.). Također postoje različite preferencije među vrstama prema tipu tla (Gladstones 1970.). Lupine zahtjevaju dobro drenirana tla (Gladstones i Crosbie 1978.). Neke lupine mogu rasti i na dubokim (> 50 cm) i plitkim (<20 cm) tlima, iako može postojati određena varijacija između vrsta. Varijacije između vrsta mogu biti povezane s morfologijom korijena (White 1990.).

Lupine mogu uspijevati na tlima širokog pH i teksturnog raspona. Otkriveno je da lupine prirodno rastu na tlima s ekstremnim vrijednostima pH od 4 do čak 8,5 s teksturama od grubih pijeska do sitnih glina (Gladstones i Crosbie 1978.). Međutim, velika većina populacije lupina

nalazi se na lakim tlima pjeskovito ilovaste ili ilovaste teksture s pH vrijednosti između 5,5 i 7 (Gladstones 1974.; Gladstones i Crosbie 1978.). Od kultiviranih vrsta, žuta lupina može imati najveću sklonost kiselim i neutralnim tlima (White 1990.). Nađena je na tlima pH manjim od 7, a najčešće na tlima između pH 5 i 6 (Gladstones 1970., 1974.; Gladstones i Crosbie 1978.).

3.4. LEĆA

Kultivirana leća (*Lens culinaris* Medik. subsp. *culinaris*) je mahunarka koja se tradicionalno uzgaja na Bliskom istoku, u Južnoj Aziji, Etiopiji, sjevernoj Africi i u manjoj mjeri u južnoj Europi gdje je vrlo popularna zbog svoje prehrambene vrijednosti. Njezina sposobnost da raste na siromašnim tlima i u nepovoljnim uvjetima okoliša, a da proizvodi visokokvalitetne bjelanjčevine, učinila ju je jednim od glavnih usjeva u sušnim regijama, posebno na Bliskom Istoku, Južnoj Aziji i Sjevernoj Africi gdje je osnova prehrane. Obično se uzgaja u rotaciji sa žitaricama (Muehlbauer i McPhee 2007.). Erskine i sur. (1994.) navode da se leća svrstava među najstarije i najcjenjenije mahunarke Starog svijeta (Azija, Afrika). Proizvodnja se u cijelom svijetu povećavala tijekom posljednjih nekoliko desetljeća (FAO 2010.).

Leća ima udio proteina od 24 do 26 % no proteinima nedostaju aminokiseline koje sadrže sumpor, međutim, sadrži relativno velike količine lizina (Newman i sur. 1988.). Lizin je esencijalna aminokiselina poznata po svojim antivirusnim svojstvima. Pomaže u sprječavanju izbijanja herpesa i prehlada, a potrebna je u proizvodnji hormona te rastu i održavanju zdravlja kostiju, kako u djece, tako i u odraslih.

Obzirom na veličinu smjemena leće razlikuju se dvije vrste: sitnosjemena leća (*Lens culinaris* subsp. *culinaris* var. *microsperma*) koja potječe iz jugozapadne Azije i krupnosjemena leća (*Lens culinaris* subsp. *culinaris* var. *macrosperma*) koja potječe sa Sredozemlja (Kolak 1994.). Krupnosjemena ili čileanska leća ima veliko sjeme 6-9 mm u promjeru i masu 1000 sjemenki > 50 g. Sitnosjemena ili perzijska leća ima male sjemenke promjera 2–6 mm i mase 1000 sjemenki < 45 g. Sjemenke su obično u obliku leće, a sitnosjemena leće može imati sjeme okruglastog oblika. Boja sjemena može biti crvena, zelena, siva, smeđa, crna ili pjegava. Kotiledoni mogu biti crveni, žuti ili zeleni (Nleya i sur. 2016.).

3.4.1. PODRIJETLO LEĆE

Leća se uzgaja od davnina, a prema nalazima sjemena u Europi je uzgajana u mlađem kamenom dobu (Gagro 1997.).

Podrijetlo leće nije jasno (Zohary 1972.). Prihvaćena teorija do 1973. godine koju je predložio Barulin (1930.) stavlja podrijetlo uzgoja leće između Hindu Kusha i Himalaje. Kislev i Bar-Yosef (1988.) smatraju da je leća najranije pripitomljena biljka na Bliskom Istoku na temelju prisustva mahuna među ostacima ugljena koji su pronađeni s arheoloških nalazišta, ali upozorili su da nema dovoljno dokaza koji bi potvrdili ovu tvrdnju.

Divlja leća široko je rasprostranjena na Mediteranu. Maxted i sur. (2010.) napravili su in situ i ex situ analizu koristeći taksonomske, ekološke, zemljopisne i podatke o očuvanju za 672 divlje svojte leće prikupljene iz podataka ICARDA (Međunarodnog centra za poljoprivredna istraživanja u suhim područjima) i GBIF-a (Globalni Institut o biološkoj raznolikosti) kao i podatke koje su autori prikupljali tijekom 25 godina. GAP analiza, postupak kojim se uspoređuje raspodjela taksona i vegetacijskih tipova, pomaže u identificiranju biološke raznolikosti (Scott i sur. 1993). Maxted i sur. (2010.) su utvrdili regije s najviše vrsta leće (tri do četiri vrste) od poluotoka Krima i duž jugoistočne Turske, preko istočnih mediteranskih zemalja Sirije, Jordana, Izraela i Palestinske uprave. Regije s dvije vrste uključuju Španjolsku, Balkan, Albaniju, Grčku i zapadnu Tursku.

3.4.2. PROIZVODNJA I GOSPODARSKA VRIJEDNOST LEĆE

Svjetska proizvodnja leće iznosi oko 3,59 milijuna tona godišnje. Prosječna godišnja svjetska proizvodnja leće u razdoblju od 1999. do 2003. godine iznosila je 3,1 milijuna tona godišnje na 3,8 milijuna ha. Glavni proizvođači bili su Indija (948.000 t na 1,43 milijuna ha), Kanada (616.000 t na 554.000 ha) i Turska (473.000 t na 490.000 ha). U tropskoj Africi glavni je proizvođač Etiopija s godišnjom proizvodnjom od 47 000 t na 78 000 ha. Oko 60 % proizvodnje leće u Africi (uključujući Sjevernu Afriku) potječe iz Etiopije, gdje se površina s lećom smanjila

od sredine 1980-ih, ali se taj trend krajem 1990-ih promijenio. U Malaviju se leća uzgaja u sjevernom dijelu kako bi se opskrbila indijska zajednica.

Svjetski izvoz leće u razdoblju 1998.-2002. iznosio je oko 1 milijun tona godišnje. Glavni izvoznici s prosječnim godišnjim izvozom bili su Kanada (430.000 t), Turska (127.000 t), Australija (124.000 t) i Indija (120.000 t). Glavni uvoznici bili su Egipat (90.000 t), Šri Lanka (86.000 t) i Turska (81.000 t) (www.uses.plantnet-project.org).

U Hrvatskoj se leća uzgaja relativno malo, a perspektiva da se površine povećaju je mala (Gagro 1997.). Uzgaja se za ljudsku prehranu samo na obiteljskim gospodarstvima na području Dalmacije (Čupić i sur. 2012.; Ozimec i sur. 2015.). Na tržište dolazi pretežno iz Makedonije (Lešić i sur. 2004.). Iako je poznata po prilagodbi na loše uvjete tla i tolerantna je na sušu, populacija domaće leće je gotovo nestala te joj prijeti izumiranje (Ozimec i sur. 2015.).

3.4.3. HRANIDBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST LEĆE

Leća se smatra dobrim izvorom proteina zbog čega predstavlja značajnu namirnicu za zemlje u razvoju i stanovnike s niskim prihodima. Od hranjivih tvari, sjemenke leće sadrže najviše ugljikohidrata među kojima škrob ima najveći udio (Hoover i sur. 2010.).

Leća je vrijedan izvor ukupnih prehrambenih vlakana. Ima relativno niski udio masnoće i prema tome nizak udio energije. Ryan i sur. (2007.) utvrdili su da sjemenke leće sadrže ukupnu masnoću od oko 1,4 g / 100 g. Željezo je također prisutno u značajnim količinama u leći. Leća sadrži cink u tragovima. Drugi minerali u tragovima koje sadrži leća su bakar, mangan, molibden i bor. Leća je značajan prehrambeni izvor vitamina uključujući folat (B9), tiamin (B1), riboflavin (B2) te ostale vitamine topive u vodi: niacin, pantotenska kiselina i piridoksin. Osim toga, Ryan i sur. (2007.) u leći su utvrdili vitamin E (a, b i c tokoferole).

Leća ima i snažno antioksidativno djelovanje na ljudski organizam (Faris i sur. 2012.). Spominjala se još u drevnom liječenju kao lijek, a Pedanije Dioskorid, grčki liječnik začetnik farmakognozije, dokumentirao je leću kao terapijsku biljaku (Lardos 2006.). Sjemenke leće danas se u narodnoj medicini mnogih etničkih grupa koriste za liječenje različitih bolesti. Koriste se oralno za liječenje dijabetesa, lokalno kao vodena pasta za liječenje kožnih infekcija

i za liječenje opekline, nakon pečenja, mljevenja i nanošenja izravno na zahvaćena područja (Sezik i sur. 2001.)

Leća se koristi i kao izvor lektina za liječenje i profilaksu retrovirusnih infekcija, uključujući infekcije ljudskim virusom imunodeficijencije- HIV-a (Alexandre 2010.)

Snažno se sugerira da je konzumacija mahunarki korisna u prevenciji i kontroli dijabetesa. Stoga se preporučuje konzumiranje raznovrsnih namirnica s ugljikohidratima iz leće i ostalih mahunarki, kako za opću populaciju, tako i za osobe s dijabetesom, posebice tip II.

Otkriveno je da leguminozna vlakna leće sprečavaju poremećaj metaboličke kontrole za štakore s dijabetesom kada je ukupan unos ugljikohidrata povećan, što ukazuje da ugljikohidrati leće, uključujući njihova prehrambena vlakna, mogu imati obećavajuće benefite za bolesnike s dijabetesom (Calle-Pascual i sur. 1983.)

Leća je dijetalna komponenta koja se tradicionalno konzumira u populaciji u kojoj je karcinom debelog crijeva, dojke i prostate nizak. U studiji na 90.630 žena, leća ili grah bile su jedine dvije namirnice koje su pokazale obrnutu povezanost s rizikom od raka dojke (Adebamowo i sur. 2005.). U Turskoj je leća smatrana hranom za koju su epidemiološka ispitivanja pokazala da je povezana sa smanjenim rizikom od različitih vrsta karcinoma. U dizajnu kontrolnog slučaja na 186 afroameričkih muškaraca i žena, rezultati su otkrili da je konzumiranje mahunarki, uključujući leću, negativno povezano s rizikom od razvoja kolorektalnog karcinoma (Agurs-Collins i sur. 2006.). Razlozi koji stoje iza povezanosti konzumiranja leće i smanjenog rizika od raka i pojavnosti mogu se pripisati različitim naslijeđenim karakteristikama i sastojcima leće.

Brojna relevantna literatura potvrđuje da je leća jedna od najhranjivijih i najzdravijih namirnica poznatih čovjeku. Prema najnovijim definicijama, leća bi se mogla smatrati profilaktičkom i terapijskom funkcionalnom hranom zbog velikog sadržaja esencijalnih makronutrijenata, većinom funkcionalnih proteina, ugljikohidrata i esencijalnih mikronutrijenata. Sadrži i bioaktivne fitokemikalije poput fitata i polifenola. Zapravo, leća sadrži impresivan arsenal specijaliziranih metabolita, minerala i bioaktivnih sastojaka koji su se pokazali perspektivnim u liječenju i prevenciji nekoliko ljudskih kroničnih bolesti (Faris i sur. 2012.).

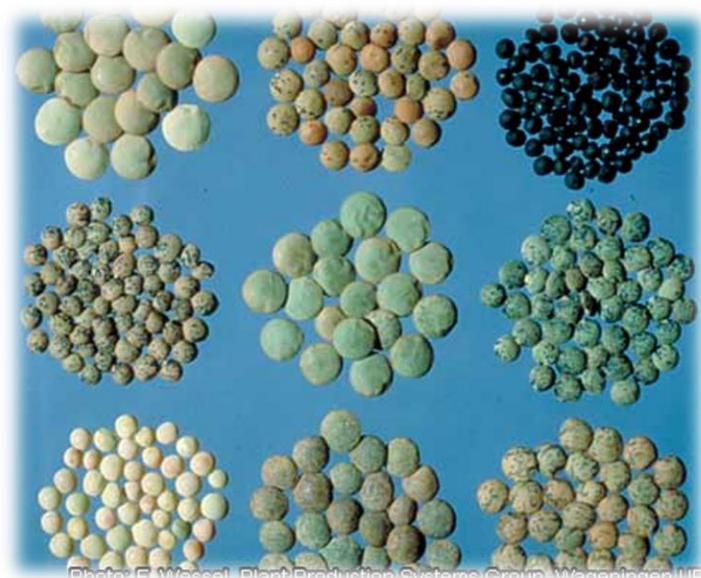
3.4.4. MORFOLOŠKA SVOJSTVA LEĆE

Korijen je slabije razvijen nego što je to slučaj kod drugih mahunarki, prodire pliće u tlo i manje u širinu, međutim, dosta dobro upija hraniva iz rizosfere. Na korijenu su prisutne kvržične bakterije.

Stabljika je zeljasta, na presjeku četvrtasta, visine 15 do 70 cm. Posuta je dlačicama, a završava vegetativnim vrhom.

Cvjetovi su mali, samooplodni, različite boje. Cvjetanje je dugotrajno.

Plod leće je mahuna romboidnog ili ovalnog oblika, dužine 0,5 do 2,0 cm. Unutar mahune se nalaze dvije do tri sjemenke. Boja sjemenki varira između zelene, žute ili tamne (Gagro 1997.).



Slika 3.5.4.1. Različite vrste sjemenka leće

Izvor: www.uses.plantnet-project.org



Slika 3.5.4.2. Leća (*L. culinaris* L.)

Izvor: www.agroklub.com

3.4.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA I AGROEKOLOŠKI UVJETI UZGOJA LEĆE

Leća je biljka tople klime. Minimalna temperatura za klijanje iznosi 15°C. Osjetljiva je na niske temperature. Minimalna temperatura nicanja je 15 °C , a optimalna temperatura 18 do 21 °C. Na optimalnim temperaturama sjeme leće klija u 5–6 dana. Cvatnja započinje 6–7 tjedana nakon sjetve. Leća je obično samoplodna, ali može doći i do 1 % unakrsnog oprašivanja insektima. Ciklus rasta kreće se od 80–110 dana za rane sorte, a 125–130 dana za kasne sorte (www.uses.plantnetproject.org). Leća je biljka dugoga dana, ali postoji razlika među kultivarima (Gagro 1997.).

Leća se uglavnom uzgaja na različitim tipovima tala, podnosi bazična i malo zaslanjena tla (Lešić i sur. 2004.), ali može uspjevati i na kamenitim tlima (Gagro 1997.). Dobro podnosi sušu, ali i stagnirajuću vodu nakon obilnog pljusk. Uzgaja se i na tlima s neravnotežom biogenih minerala kao što su željezo i bor koji ograničavaju prinos, što je slučaj u Indiji i Etiopiji (Ali i sur. 2000.). U svijetu se usjev leće često uzgaja u plodoredu sa žitaricama. U mediteranskoj regiji, sjevernoj Africi, dijelovima Etiopije, istočne Europe i Sjeverne Amerike, leća je komponenta plodoreda koja uključuje žitarice i stočnu hranu (Nleya i sur. 2016.).

Leća ima veliku potražnju za biljnim hranivima jer u sjemekama akumulira veliku količinu dušika, fosfora i sumpora. Primjerena primjena esencijalnih makronutrijenata kao što

su fosfor, kalij i sumpor neophodna je za postizanje visokog prinosa. Dušik se akumulira putem biološke N-fiksacije, mineraliziranog N ili N gnojiva ili kombinacijom ovih izvora. Za visoki prinos važan je i mikroelement molibden (Nleya i sur. 2016.).

3.5. SLANUTAK

Slanutak (*Cicer arietinum* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice mahunarki. Slanutak se u cijelom svijetu konzumira kao bogat izvor bjelančevina i zauzima treće mjesto među najvažnijim mahunarkama (Jain i sur. 2013.). U prehrani baziranoj na žitaricama u jugoistočnoj, zapadnoj i istočnoj Aziji te sjevernoj Africi, slanutak daje visokokvalitetne bjelančevine, posebno za vegetarijance i osobe kojima je meso preskupo. Koristi se i kao hrana za stoku, a ima značajnu ulogu u poljoprivrednim sustavima u plodoredu sa žitaricama, gdje doprinosi održivosti proizvodnje i smanjuje potrebu za gnojidbom dušikom fiksiranjem atmosferskog dušika. Slanutak je jedna od najotpornijih mahunarki na sušu.

Proizvodnja slanutka u većini zemalja nije dovoljna zbog sve veće potražnje. Taj se problem povećava kako populacija raste, a događa se premalo promjena u cilju povećanja površina pod usjevima slanutka (Singh 1997.)

Sharma i sur. (2013.) navode tri različita oblika kultiviranog slanutka na temelju oblika, veličine i boje sjemena. Tip "desi" karakteriziraju uglavnom ružičasti cvjetovi, smeđa, sitna sjemenka s visokim udjelom vlakna koji se primarno uzgaja u Južnoj Aziji i Africi, a tip "kabuli", s bijelim cvjetovima, bež, krupna sjemenka s niskim udjelom vlakna, uzgaja se na Mediteranu. Treći tip, „intermedijarni ili graškasti“ tkz. „galubi“ tip karakterizira srednja do mala krupnoća, okrugle, graškaste sjemenke.

3.5.1. PODRIJETLO SLANUTKA

Kultivirani slanutak, *Cicer arietinum* L., je jedna od prvih mahunarki koja je kultivirana u starom svijetu (Afrija, Azija) (van der Maesen 1972.). Slanutak je najvjerojatnije nastao na području današnje jugoistočne Turske i u susjednim područjima Sirije. Na temelju elektroforeze proteina sjemena, Ladizinsky i Adler (1976.) smatrali su *C. reticulatum* divljim potomstvom kultiviranog slanutka, a jugoistočnu Tursku kao središte podrijetla usjeva (Singh 1997.).

Botaničari su postavili nekoliko različitih teorija podrijetla slanutka. De Candolle (1883.) je utvrdio da slanutak potječe s područja južno od Kavkaza i sjevera Perzije. Vavilov (1926.) je identificirao dva osnovna izvorna središta, jugozapadnu Aziju i Sredozemlje, te jedno sekundarno središte podrijetla, Etiopiju. Napomenuo je da linije s velikim sjemenkama obiluju oko sliva Mediterana, dok su male sjemenske linije dominantne na istoku. Postoje jezični dokazi da je slanutak s velikim sjemenkama stigao do Indije preko afganistanskog glavnog grada Kabula prije otprilike dva stoljeća i stekao ime na hindskom jeziku „Kabuli chana“ (chana = slanutak) (van der Maesen 1972.). Kako navodi Singh (1997.) slanutak s malim sjemenkama naziva se „desi“, a navedeni nazivi se koriste za razlikovanje dva glavna tipa slanutka.

3.5.2. PROIZVODNJA I GOSPODARSKA VRIJEDNOST SLANUTKA

Tijekom 1990-ih svjetska proizvodnja slanutka iznosila je prosječno oko 8 milijuna tona na 10,5 milijuna hektara. U 2000-im se proizvodnja povećala na 8,5 milijuna zbog povećanog prinosa. Najveća proizvodnja slanutka zabilježena je u razdoblju od 2011.–2013. s prosječnom proizvodnom površinom od 13 milijuna ha. Povijesno, Azija je bila glavni proizvođač slanutka koja je u razdoblju 2009.–2013. proizvodila 85,1 % svejetske proizvodnje, zatim slijede Australija (5,3 %), Afrika (5,0 %), Amerika (3,8 %) i Europa (0,9 %). Slanutak se uzgaja u oko 80 zemalja svijeta. Indija proizvodi dvije trećine svjetskih usjeva, a nakon stalnog pada u devedesetima, proizvodnja se povećava posljednjih godina. Sličan se trend dogodio i u Pakistanu, drugom najvećem svjetskom proizvođaču.

Proizvodnja slanutka u europskim državama od 1960. godine drastično se smanjila za 60–97 %. S druge strane, u nekim je zemljama proizvodnja znatno porasla kao što je zabilježeno u Australiji, četvrtom najvećem svjetskom proizvođaču, gdje su se područja pod slanutkom naglo povećala tijekom 2000-ih. Potrošnja slanutka je uglavnom mnogo veća u zemljama koje ga proizvode, kao što su Indija (5,1 kg per capita) i Pakistan (4,4 kg per capita), nego u razvijenim zemljama koje ga ne proizvode, kao što je Velika Britanija (0,2 kg per capita) (Knights i Hobson 2016.).

Zbog otpornosti na sušu slanutak se za ljudsku prehranu u Hrvatskoj najviše uzgaja u primorskim krajevima, Dalmaciji i Istri, ali ga se može pronaći i u kontinentalnim krajevima (Čupić i sur. 2012., Ozimec i sur. 2015.). Domaći sitnozrni slanutak se uzgaja kao ratarska, a krupnozrni kao povrtna kultura. Obzirom da su sve manje prisutni u proizvodnji površine zasijane slanutkom nisu poznate (Ozimec i sur. 2015.). Uzgajaju se tradicijske sorte iz vlastito proizvedenog sjemena (Čupić i sur. 2012.; Ozimec i sur. 2015.). Iako zrno i zelena masa imaju vrijednost za prehranu domaćih životinja, zbog malih površina u Hrvatskoj nemaju značaja za tu svrhu (Gagro 1997.).

3.5.3. HRANIDBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST SLANUTKA

Slanutak je važan dio prehrane u većini zemalja koje ga proizvode, a sve više dobiva na popularnosti i u drugim dijelovima svijeta (Knights i Hobson 2016.).

Dobar je izvor ugljikohidrata i proteina, a kvaliteta proteina smatra se višom nego kod ostalih mahunarki. Slanutak sadrži značajne količine svih esencijalnih aminokiselina osim aminokiselina koje sadrže sumpor, a koje se mogu nadopuniti dodavanjem žitarica u svakodnevnu prehranu. Sjeme slanutka ima oko 20 % kvalitetnih bjelančevina koje sadrže 18 esencijalnih aminokiselina, oko 50 do 60 % ugljikohidrata, nešto manje od 3 % ulja, oko 3 % celuloze i oko 4 % mineralnih tvari (Gagro 1997.).

Od ugljikohidrata sadržanih u slanutku, škrob je glavni skladišni ugljikohidrat, a zatim slijede dijetalna vlakna, oligosaharidi i šećeri, poput glukoze i saharoze. Iako su lipidi prisutni u malim količinama, slanutak je bogat nutritivno važnim nezasićenim masnim kiselinama kao

što su linolna i oleinska kiselina. Od minerala prisutni su kalcij, magnezij, fosfor i posebno kalij u sjemenkama slanutka. Slanutak je i vrijedan izvor važnih vitamina poput riboflavina, niacina, tiamina, folata i prekursora vitamina A, β -karotena.

Kao i kod ostalih mahunarki, sjemenke slanutka sadrže i tvari koje imaju potencijalno toksičan učinak na organizam, ali one se mogu smanjiti ili eliminirati različitim tehnikama kuhanja. Ima nekoliko potencijalnih zdravstvenih koristi, a u kombinaciji s drugim mahunarkama i žitaricama mogao bi imati blagotvorne učinke na neke od važnih ljudskih bolesti poput kardio vaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, probavnih bolesti i nekih vrsta raka.

U semi aridnim tropima slanutak je važan dio prehrane stanovništva koje si iz ekonomskih razloga nije u mogućnosti nabavljati meso zbog čega izostaje konzumacija životinjskih bjelančevina, a također su važan dio prehrane vegetarijanaca po izboru (Jukanti 2012.). Dobar je izvor ugljikohidrata i proteina, što zajedno čini oko 80 % ukupne mase suhog sjemena (Chibbar i sur. 2010.).

Potencijalno se može smatrati funkcionalnom hranom zbog visokog udjela proteina i vlakana. Slanutak je bez kolesterola i dobar je izvor dijetalnih vlakana, vitamina i minerala (Wood i Grusak 2007.). Sveukupno, slanutak je važan usjev mahunarki s raznolikim nizom potencijalnih prehrambenih i zdravstvenih koristi.

3.5.4. MORFOLOŠKA SVOJSTVA SLANUTKA

Korijen je vretenast i dobro razvijen. Ima dobru upojnu snagu, prodire do metar i više u dubinu. Na korijenu se mogu naći kvržice. Stabljika je uspravna, ravna i posuta dlačicama. U visinu naraste od 30 do 60 cm (Gagro 1997.).

Plod je valjkasta mahuna različite krupnoće, čiji broj po biljci varira od svega nekoliko do 100. Oblik mahune romboidan, duguljast ili jajolik (Singh 1997.).

"Desi" tip slanutka ima uglate sjemenke oblika glave ovna, neravne površine i obojene sjemene ovojnice. "Kabuli" tip ima nepravilno zaobljene sjemenke oblika sovine glave, naborane površine, a sjemena ljuska nije obojana. "Gulabi" tip ima sjemenke poput graška, okruglaste, glatke površine i boje od crne preko smeđe do narančaste, žute i bijele, čak zelene. Boja sjemena je važna prepoznatljiva karakteristika slanutka obzirom da su prepoznate 21 različita boja i nijansa (Pundir i sur. 1988.).

Cvjetovi su obično samooplodni. Boja latica je bijela, plava, žuta ili ružičasta (Gagro 1997.).



Slika 3.6.4.1. Sjemenke slanutka

Izvor: www.seeds-gallery.com



Slika 3.6.4.2. Slanutak (*C. arietinum* L.)

Izvor: www.sciencesource.com

3.5.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA I AGROEKOLOŠKI UVJETI UZGOJA SLANUTKA

Slanutak klija kod 2 do 3°C, a optimalna temperatura za klijanje je između 20 do 25 °C, no može podnijeti i niske temperature do minus 16 °C (Gagro 1997.). Slanutak dobro podnosi povremenu sušu zbog dubokog korijenovog sustava. Međutim, gubitak prinosa sjemena zbog terminalne suše može biti i do 60 % (Siddique i Krishnamurthy 2016.). U vrijeme cvatnje je osjetljiviji na pomanjkanje vode. Slanutak pripada u biljke dugog dana.

Uspješno se uzgaja na različitim vrstama tla u cijelom svijetu, od grube teksture pijeska do fine teksture praškaste gline. U idealnom slučaju, slanutak je najprikladniji za duboka, neutralna do alkalna tla s finom teksturom (pješčana ilovača, ilovača i dobro isušena glina) s pH od 5,5–9,0 i dobrim kapacitetom zadržavanja vode (Siddique i Krishnamurthy 2016.).

Niz kemijskih i fizikalnih čimbenika tla ograničava rast slanutka. Najvažnija od njih je slanost, jer je slanutak razmjerno netolerantni prema ionskim neravnotežama karakterističnim za slana tla. Tla s povećanom količinom natrija se povezuju s povećanom gustoćom mase, niskom infiltracijom vode i lošom aeracijom što je često na sjeveru Indije i drugim regijama gdje je pH tla vrlo visok. Usporeni rast korijena i loša nodulacija inhibiraju rast slanutka i produktivnost u takvim uvjetima. Ostali važni faktori tla su kiselost (loša nodulacija), nedostatak željeza i cinka te, nedostatak ili toksičnost bora (Knights i Hobson 2016.).

Duljina vegetacije je od dva do četiri mjeseca (Gagro 1997.). Zrnate mahunarke trebaju kontinuiranu opskrbu fosforom tijekom njihove vegetacije. Manjak fosfora je rasprostranjen problem u Južnoj Aziji i Africi i primjena od 60 kg P₂O₅ po 1 ha ima za posljedicu povećan prinos slanutka. Međutim, slanutak je manje osjetljiv na nedostupnost fosfora nego ostale mahunarke i žitarice jer uz pomoć eksudata korijena može iskorištavati druge izvore fosfora koji su nedostupni većini biljaka. Korijenski eksudati s organskim kiselinama također otapaju netopljivi bakar, cink, željezo i mangan čime se izbjegava njihov nedostatak.

4. RAZNOLIKOST KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU LUPINE, LEĆU I SLANUTAK

4.1. KVRŽIČNE BAKTERIJE KOJE NODULIRAJU LUPINE

Značaj roda *Lupinus* spp. drastično se povećava zbog njegovih blagotvornih svojstava za zdravlje i prehranu ljudi (Cabello-Hurtado i sur. 2016.), te nedavnog istraženih novih genomskih resursa i prvog nacrtu genoma (Hane i sur. 2016.). Lupine su također pogodne za studije simbioze jer su do danas jedini poznati rod leguminoza koji nisu u stanju formirati arbuskularnu mikoriznu simbiozu (Gonzalez-Sama i sur. 2004.). Stepkowiak i sur. (2007.) navode da su lupine uglavnom nodulirane raznim sojevima *Bradyrhizobium*, uglavnom *B. japonicum* i *B. canariense* u Starom svijetu (Azija, Afrika), te *B. japonicum* u Novom svijetu (Europa i Amerika).

Biljke iz roda *Lupinus* noduliraju se brzo i sporo rastućim rizobijama. Međutim, spororastuća rizobija češće je izolirana iz ove mahunarke (Barrera i sur. 1997.; Bottomley 1994.). Podaci dobiveni iz rRNA gena s malom podjedinicom (SSU) ukazuju na vrlo prisnu vezu između nekih bradirizobija izoliranih iz lupine i *Bradyrhizobium japonicum* (Barrera i sur. 1997.). U spororastuće bradirizobije koje učinkovito noduliraju lupinu pripadaju *B. canariense* i *B. japonicum* (Velazquez i sur. 2010.; Stepkowski i sur. 2011.), *B. elkanii* (Granada i sur. 2015.), *B. valentinum* (Duran i sur. 2014.) i *B. lupini* (Peix i sur. 2015.) vrste. Brzorastuće bakterije koje noduliraju *Lupinus* spp. klasificirani su u rodove *Ochrobactrum* (Trujillo i sur. 2005.), *Microvirga* (Ardley i sur. 2012.) i *Phyllobacterium* (Valverde i sur. 2005.).

Vrsta *Rhizobium lupini* izolirana je iz kvržica *Lupinus* spp. i uključena je u Odobrene popise bakterijskih imena 1980. godine. Soj DSM 30140T se smatrao izvornim sojem vrste *R. lupini* (Peix 2015.). Peix i sur. (2015.) su potvrdili da soj DSM 30140T pripada vrsti *B. japonicum*, ali i da ne može biti izvorni soj *R. lupini*, jer je ova vrsta učinkovito nodulirala lupinu, dok je soj DSM 30140T uspio nodulirati soju, ali ne i lupinu. Budući da je izvorni soj *R. lupini* uvrstio u USDA kolekciju L.W. Erdman pod pristupnim brojem USDA 3051T, analiziran je taksonomski status ovog soja, pokazujući da iako pripada rodu *Bradyrhizobium*, a ne rodu *Rhizobium*, on je filogenetski udaljen od *B. japonicum* i usko povezan s *B. canariense*. Tipični soj *R. lupini* USDA 3051T i *B. canariense* BTA-1T dijele 16S rRNA, recA i glnII sekvence gena

sa sličnostima od 99,8 %, 96,5 % i 97,1 %. Vrijednost DNA-DNA hibridizacije je od 36 %, a razlikovali su se i po fenotipskim karakteristikama i neznatnim udjelima nekih masnih kiselina. Stoga su predložili reklasifikaciju vrste *Rhizobium lupini* kao *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. Tipični soj je USDA 3051T (5CECT8630T5LMG 28514T) (Peix 2015.).

Prema izvornom opisu *R. lupini* (Eckhardt i sur. 1931.) karakteristike *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. su sljedeće. Gram-negativni štapići različitih veličina od 1,1 do 3,3 µm duljine i širine od 0,1 do 0,3 µm. Spororastući, formiraju bijele, vlažne, blago uzdignute i glatke kolonije na agaru. Izaziva nastanak kvržica na lupinama. Sljedeće dodatne karakteristike određene su tijekom studije Peixa i sur. (2015). Strogo je aerobni, rast pri pH 4,5 je negativan, a optimalan pH za rast je pH 7. Optimalna temperatura za rast mu je na 28 °C. Rast je negativan u prisutnosti 1 % NaCl ili više. Ne reducira nitrate. Hidroliza ureaze i eskulina slabo je pozitivna. Otporan je na ampicilin, penicilin, kloksacilin, polimiksin B, ciprofloksacin, gentamicin i eritromicin, a osjetljiv je na tetraciklin, cefuroksim i neomicin. Nodulira *Lupinus albus*, ali ne i *Glycyne max* (Peix i sur. 2015.).

U studiji koju su proveli Trujillo i sur. (2004.) iz kvržica *Lupinus honoratus* izolirana su dva brzorastuća soja, LUP21 i LUP23. Filogenetska analiza zasnovana na sekvenci gena 16S i 23S rRNA pokazala je da izolati pripadaju rodu *Ochrobactrum* unutar razdjela *Proteobacteria*. Ovaj rod pripada obitelji Brucellaceae i prvi su ga opisali Holmes i sur. (1988.) s jednom vrstom, *Ochrobactrum anthropi*. Kasnije su opisane još četiri vrste različitog podrijetla: *Ochrobactrum intermedium* iz kliničkih izvora (Velasco i sur. 1998.), *Ochrobactrum grignonense* i *Ochrobactrum tritici* iz tla i rizosfere pšenice (Lebuhn i sur. 2000.), te *Ochrobactrum gallinifaecis* iz pilećeg izmeta (Kampfer i sur. 2003.). Analiza profila plazmida pokazala je prisutnost tri plazmida. Geni nodD i nifH bili su smješteni na tim plazmidima i dobili su njihove sekvence. Sekvence su pokazale blisku srodnost s nodD i nifH genima rizobijalnih vrsta, sugerirajući da su nodD i nifH geni soja LUP21T stečeni horizontalnim prijenosom gena. Polifazna studija koja uključuje fenotipska, kemotaksonomska i molekularna obilježja sojeva izoliranih u istraživanju pokazala je da oni pripadaju novoj vrsti roda *Ochrobactrum* za koju je predložen naziv *Ochrobactrum lupini* sp. nov. soj LUP21T (Trujillo i sur. 2004.).

Valverde i sur. (2005.) izolirali su bakterijski soj PETP02T iz kvržica *Trifolium pratense* koji raste u Španjolskoj. Filogenetska analiza slijeda gena 16S rRNA pokazala je da taj soj predstavlja pripadnika roda *Phyllobacterium*. Međutim, odstupanje koje je pronađeno sa

sekvencom gena 16S rRNA od jedne prepoznate vrste ovog roda, *Phyllobacterium myrsinacearum*, ukazalo je da soj PETP02T pripada drugoj vrsti. Rezultati hibridizacije DNA-DNA, fenotipski testovi i analize masnih kiselina potvrdili su da ovaj soj predstavlja novu vrstu roda *Phyllobacterium*, za koju je predložen naziv *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. Tipični soj je PETP02T (= LMG 22712T = CECT 7015T). Ovaj soj je strogo aerobni i koristi nekoliko ugljikohidrata kao izvor ugljika. Ne reducira nitrate, ne proizvodi ureazu, arginin dihidrolazu, želatinazu ili β -galaktozidazu. NodD gen ovog soja pokazuje slijed koji je usko povezan sa sojevima koji su sposobni nodulirati lupinu. Testovi su pokazali da je taj soj sposoban proizvesti kvržice i u *Trifolium repens* i u *Lupinus albus*.

Keller i sur. (2017.) inokulirali su tri vrste lupine (*L. albus*, *L. luteus*, *L. mariae-josephae*) s dva soja *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* i *B. valentinum*). Za svaku vrstu lupine uspoređivali su ekspresiju gena između funkcionalnih i nefunkcionalnih interakcija i odredili različito eksprimirane (DE) gene. Utvrdili su da su kvržice *L. luteus* i *L. mariae-josephae* (nodulirani samo jednim sojem *Bradyrhizobium*) bogatije DE genima nego *L. albus* (nodulacija s oba mikrosimbionata, ali nefunkcionalna s *B. valentinum*) i da dijele veći broj ovih gena među njima nego s *L. albus*.

Quiñones i sur. (2013.) odabrali su soj *Bradyrhizobium canariense* (L-7AH) zbog njegove otpornosti na metale i sposobnosti nodulacije bijele lupine (*L. albus* L.) iz kolekcije prethodno stvorenih rizobijalnih sojeva iz tla rudarske četvrti Almadén (Španjolska) s različitim stupnjem onečišćenja živom. Biljke su inokulirane ili sojem L-7AH (koji je tolerantan na Hg) ili sojem L-3 (osjetljiv na Hg, upotrijebljen kao kontrola), i tretirane hranjivim otopinama dopunjenim različitim koncentracijama HgCl_2 u komori za rast. Vrsta *L. albus* L. inokulirana sojem L-7AH nodulirala je čak i pri najvišoj koncentraciji žive, dok oni inokulirani sojem L-3 gotovo da nisu imali kvržice u koncentraciji Hg iznad 25 milimola. Biljke inokulirane sojem L-7AH, ali ne one s kontrolnim sojem, uspjele su akumulirati velike količine žive u korijenu i kvržicama. Nodulacija sojem L-7AH omogućila je biljkama da održavaju konstantnu razinu klorofila i karotenoida u lišću i visoku fotosintetsku učinkovitost, dok se kod onih inokuliranih sojem L-3 sadržaj pigmenta i fotosintetska učinkovitost značajno smanjila kako se koncentracija žive povećavala. Nitrogenazna aktivnost biljaka nodulirana sojem L-7AH ostala je konstantna u svim korištenim koncentracijama žive. Rezultati sugeriraju da se ovaj simbiotski par može upotrijebiti za rizoremedijaciju tla onečišćenih živom.

S ciljem uvođenja bijele lupine (*Lupinus albus* L.) za uzgoj na tuniskim vapnenačkim tlima, Tounsi-Hammami i sur. (2019.) su ispitali i karakterizirali kompatibilne autohtone rizobije. Dvije sorte bijele lupine (*L. albus* L.), Mekna i Lumen, korištene su za izolaciju rizobija u uzorcima tla prikupljenih sa 56 lokacija s visokim sadržajem aktivnog vapna (0–49%). Nodulacija se dogodila na samo 15 uzoraka tla. Lokalna sorta, Mekna, razvila je znatno više kvržica i imala je veću sposobnost nodulacije na više tala od uvezene sorte Lumen. Analiza je pokazala je da su sojevi povezani sa rodovima *Agrobacterium*, *Rhizobium* i *Neorhizobium*. Testovi za infektivnost istaknuli su određenu nodulacijsku specifičnost na razini sorte biljaka, jer sojevi koji potječu iz Mekne mogu samo nodulirati ovu sortu, dok sojevi izolirani iz Lumen sorte mogu nodulirati obje vrste. Nakon inokulacije, primjena gotovo svih istraživanih sojeva rezultirala je značajnim povećanjem mase suhe tvari biljaka. Sojevi *Agrobacterium* sp. izolirani iz bijele lupine bez gena *nodA* i *nodC* ne mogu se amplificirati, ali mogu nodulirati i imati učinak na poticanje rasta biljaka. Prilagođeni i učinkoviti sojevi rizobije detektirani su kao obećavajući kandidati za razvoj inokulanta i predstavljaju doprinos uspješnom uzgoju bijele lupine u Tunisu, posebno sorti Mekna (Tounsi-Hammami i sur. 2019.).

Karim (2012.) je ispitao četiri različita inokulanta *Bradyrhizobium* sp. u stakleničkim i poljskim eksperimentima kako bi se uspoređivali njihovi učinci na rast, prinos i biološku fiksaciju dušika. U pokusu u stakleniku uspoređivani su bakterijski sojevi na uskolisnoj i bijeloj lupini u različitim supstratima u kontroliranom okolišu, dok je poljski pokus testirao njihove karakteristike u prirodnim uvjetima. Pokus u stakleniku proveden je s 3 kultivara uskolisne lupine (Haags Blaue, Boruta i Sonet) i 1 kultivarom bijele lupine (Ludic). Biljke su uzgajane u 3 različita supstrata s 5 tretmana sojeva *Bradyrhizobium* (nekinokulirana kontrola, komercijalni inokulant za treset HAMBI 3118 i tekuće kulture HAMBI 3115, HAMBI 3116 i HAMBI 3118). U pokusu u stakleniku, inokulacija je značajno povećala veličinu korijena (45,8-64,4 %), veličinu kvržica (237.0-266.6 %), suhu masu i visinu biljke (38.3-46 %), broj kvržica (620-659 %) i sadržaj klorofila (29.0-38.5 %) u odnosu na neinokulirane kontrole. Različiti tipovi tala odnosno supstrata u koju su lupine posađene također su utjecali na rast i prinos lupine, s boljim rezultatima opaženim u tlu. Najbolji rezultati dobiveni su inokulacijom sa sojem HAMBI 3115 u tlu. Neinokulirane biljke i čak i inokulirane biljke uzgajane u mediju s pijeskom pokazale su relativno loše rezultate, što je bilo očiglednije kod visoko prinosnih kultivara, Boruta i Ludic, nego kod nisko rodni sorti, Haags Blaue i Sonet. Tretmani inokulacije također su pokazali značajno veći sadržaj dušika u korijenu (1,96-2,54 % N). Poljski pokus pokazao je značajno

povećanje izboja (14,4-47,9 %), korijena (11,9-29,1 %) i sjemena (13,8- 68,6 %), suhe težine i visine biljaka (3,6-10,7 %), mahune biljke (10,7-50,6 %) i udjela klorofila (5,7-20,7 %) nakon inokulacije tri kultivara uskolisne lupine. Neinokulirane biljke koje su uzgajane u tlu u pokusu u stakleniku i u poljskom pokusu producirale su kvržice, što je pokazalo prisutnost autohtonih sojeva koje fiksiraju dušik. Soj HAMBI 3115 se pokazao najbolji u pogledu rasta lupine, prinosa i biološke fiksacije dušika u pokusu u stakleniku i u poljskom pokusu. Učinkovitost komercijalnog inokulanata na bazi treseta soja HAMBI 3118 nadmašila je sve ostale inokulante u poljskom pokusu, ali ne i u pokusu u stakleniku, pokazujući važnost nosača. Rezultati su pokazali da na rast i prinos lupine snažno utječe inokulacija s odgovarajućim sojem *Bradyrhizobium* i karakteristike tla. Odabirom odgovarajućeg soja *Bradyrhizobium* za inokulaciju i uzgoj kultivara u skladu sa zahtjevima tla može se povećati prinos lupine.

Msaddak i sur. (2017.) ispitali su genetsku raznolikost bakterijske populacije koja nodulira *Lupinus luteus* (žutu lupinu) u sjevernom Tunisu. Filogenetske analize 43 izolata zasnovanih na parcijalnim sekvencama gena *recA* i *gyrB* grupirale su ih u tri skupine, od kojih dva pripadaju rodu *Bradyrhizobium* (41 izolat), a jedan rodu *Microvirga* (2 izolata), rodu koji nikada prije nije opisan kao mikrobiom ove vrste lupine. Među 14 opisanih vrsta roda *Microvirga* (Safronova i sur. 2017.), samo 4 su simbionti mahunarki i označeni su kao *M. lotononidis* i *M. zambiensis*. Biljka domaćin je *Listia angolensis* (Ardley i sur. 2012.), a u novije vrijeme i *M. vignae*, koja nodulira *Vigna unguiculata* (Radl i sur. 2014.). Iznenađujuće, *Bradyrhizobium* soj s dva izolata Llu4 i LluTb2 može predstavljati novu vrstu koja je definirana zasebnim položajem između *B. manausense* i *B. denitrificans*. Ispitana je simbioza između izolata i žute lupine. Sojevi *Bradyrhizobium* nodulirali su *Ornithopus compressus* za razliku od dva soja *Microvirga*. Na temelju ovih podataka zaključeno je da su simbionti žute lupine u sjevernom Tunisu uglavnom sojevi *B. canariense* i *B. lupini*, a preostali sojevi pripadaju u dvije skupine koje prethodno nisu identificirane kao endosimbionti žute lupine. Jedan koji odgovara novom rodu *Bradyrhizobium*, a drugi rodu *Microvirga*.

Ardley i sur. (2012.) izolirali su iz kvržica mahunarka *Listia angolensis* (Zambija) i *Lupinus texensis* (Teksas) sojeve gram-negativnih, nesporogenih bakterija u obliku štapića te su identificirane kao rod *Microvirga* (Yates i sur. 2007.). Koliko je poznato, niti jedan soj *Microvirga* ranije nije okarakteriziran kao simbiot mahunarki (Ardley i sur. 2012.). Analiza gena 16S rRNA dva izolata mahunarke *Listia angolensis* (sojevi WSM3674 i WSM3686) pokazali su da su usko povezani s rizobijom koja nodulira *Lupinus texensis* koje rastu u Teksasu (Andam

i Parker 2007.). Prema filogenetskom stablu gena 16S rRNA, sojevi iz mahunarka *Listia angolensis* i *Lupinus texensis* bili su najuže povezani s *Microvirga flocculans* [prije *Balneimonas flocculans* (Weon i sur. 2010.)], vrstom opisanom iz soja izoliranog iz Japana (Takeda i sur. 2004.). Trenutno su imenovane i okarakterizirane još četiri vrste roda *Microvirga*, *Microvirga subterranea* (Kanso i Patel 2003.), *M. guangxiensis* (Zhang i sur. 2009.), *M. aerophila* i *M. aerilata* (Weon i sur. 2010.), izolirane iz australskih geotermalnih voda, rižinog polja u Kini i atmosferskih uzoraka iz Koreje.

Prema genotipskoj, fenotipskoj i kemotaksonomskoj analizi utvrđeno je da rodovi *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. i *Microvirga zambiensis* sp. nov., iz razreda alfa proteobakterija, s izolatima Lut6T, WSM3557T i WSM3693T koji predstavljaju odgovarajuće vrste sojeva noduliraju mahunarke *Lupinus texensis* i *Listia angolensis*.

4.2. KVRŽIČNE BAKTERIJE KOJE NODULIRAJU LEĆU

Leća može ispuniti svoju punu ili djelomičnu potrebu za dušikom za rast i razvoj od svog simbiotskog partnera. Taha i sur. (2018.) navode *Rhizobium laguerreae* kao glavnog simbionta leće.

Iako je provedeno nekoliko studija kako bi se procijenila raznolikost i identitet rizobija koje noduliraju članove porodice Fabaceae, malo je izvještaja koji istražuju rizobije koje noduliraju leću. Dosadašnja istraživanja provedena na rizobijama koje noduliraju leću uglavnom su procijenila njihove simbiotske učinke na rast biljaka i opisala njihove biokemijske karakteristike i toleranciju na stresne uvjete (sol i temperaturu) (Tegegn 2006.). Raznolikost rizobija koje noduliraju leću također je opisana na osnovi plazmidnih profila, RFLP i rep-PCR (PCR koji se temelji na ponavljajućim elementima), ali trenutno nema podataka o sekvenci (Laguerre i sur. 1992.; Tegegn 2006.). Količina fiksiranog dušika ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući biljni i rizobijalni genotip. Zbog toga je važno procijeniti autohtonu raznolikost populacije kvržičnih bakterija i ispitati potencijalne nove djelotvorne sojeve inokulanata. Nekoliko studija ispitalo je genetsku raznolikost i sposobnost rizobija koje noduliraju članove porodice Fabaceae. Svi su zaključili da je *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* glavna nodulacijska vrsta i simbiovar u porodici Fabaceae (Tian i sur. 2010.). Sva istraživanja

provedena na simbiotskim bakterijama leće također su potvrdila da je vrsta *R. leguminosarum* bv. *viciae* simbiot leće u mnogim zemljama u kojima se uzgaja u Kanadi, zapadnoj Aziji, sjevernoj Africi, Francuskoj, Kini i Alžiru (Caamaño i sur. 2017.). U Bangladešu su izolirane i identificirane tri nove vrste koje noduliraju leću, *Rhizobium bangladeshense*, *Rhizobium lentis* i *Rhizobium binae* (Rashid i sur. 2015.)

Rashid i sur. (2015.) su da bi utvrdili bakterijsku raznolikost i identitet rizobija koje noduliraju leću u Bangladešu, proveli filogenetsku analizu gena (16S RNA gena, *recA*, *atpD* i *glnII* i nodulacijskih gena (*nodC*, *nodD* i *nodA*) 36 bakterijskih izolata iz 25 lokaliteta u cijeloj zemlji. Analize su pokazale da se većina izolata (30 od 36) odnosi na vrste *Rhizobium etli* i *Rhizobium leguminosarum*. Samo tih trideset izolata uspjelo je ponovno nodulirati leću u laboratorijskim uvjetima. Geni koji kodiraju proteine pokazali su 89,1–94,8% genetsku sličnost s odgovarajućim genima *R. etli* i *R. leguminosarum*. Iste analize pokazale su da se dijele u tri različita filogenetske skupine. Razlikovanje ovih skupina od usko srodnih vrsta je potkrijepljeno ERIC-PCR-om visoke rezolucije i fenotipskim karakteristikama poput temperaturne tolerancije, rasta na kiselo-alkalnom mediju (pH 5,5–10,0) i osjetljivosti na antibiotike. Filogenetske analize temeljene na tri nodulacijska gena (*nodA*, *nodC* i *nodD*) i unakrsnim inokulacijskim ispitivanjima potvrdile su da su nodulacijski geni povezani s genima vrste *R. leguminosarum* sv. *viciae*, ali su grupirani u posebnu skupinu. Dakle, multilokusna filogenetska analiza i fenotipska obilježja pokazuju da su za nodulaciju leće u Bangladešu odgovorne najmanje tri različite vrste. Te se vrste razlikuju od *R. etli* i *R. leguminosarum* vrsta te mogu odgovarati novim vrstama u rodu *Rhizobium*.

Tijekom 2011., Wondwosen i sur. (2016.) proveli su eksperiment u polju i u loncima radi utvrđivanja učinkovitosti sojeva *Rhizobium* na dva kultivara leće u južnoj Etiopiji. Istraživanje je provedeno kako bi se procijenila učinkovitost autohtonih sojeva *Rhizobium* prethodno izoliranih iz kvržica leće (kultivar TESHLE). Korišteno je šest rizobijalnih inokulanata, a od toga četiri autohtona i dva komercijalna. Inokulirane biljke rezultirale su znatno većim brojem kvržica, većom masom suhe tvari kvržica, prinosom zrna u odnosu na neinokulirane biljke. U poljskom pokusu Inokulacija leće sa sojem Lt29 i Lt5 povećala je prinos sjemena za 59%, odnosno 44%. Slično tome, prinosi zrna povećani su tijekom pokusa u loncu za 92% i 67% u odnosu na kontrolne tretmane inokulacijom sa sojevima Lt29 i Lt5. Najveće razine fiksacije N postignute su u inokuliranim biljkama sa sojem Lt29. Poljska i ispitivanja u loncu pokazala su da inokulacija leće s nativnim sojevima rizobija zamjenjuje potrebu za

mineralnim dušičnim gnojivima kako bi se optimizirali prinosi leća.

Leća se uzgaja u čileanskim mediteranskim sušnim područjima i na područjima s tlima koja su erodirana. Sepúlveda-Caamaño i sur. (2017.) proveli su istraživanje u kojem su inokulirali leće rizobijama u koinokulaciji s rizobakterijama koje potiču rast (PGPR) kako bi se postigla veća biomasa, ubrzala nodulacija i povećala fiksacija dušika. Cilj ovog istraživanja bio je odabir rizosfernih bakterija (PGPR) iz leće i procjena njihovog utjecaja na nodulaciju leće u istodobnoj inokulaciji s rizobijom. Šezdeset i tri izolata rizobakterija leće dobiveni su iz devet tala u mediteranskom području. Oni su molekularnim analizama reducirani na 57 različitih sojeva. Sojevi su ocijenjeni prema kompatibilnosti s rizobijom, od čega je 38 soja bilo kompatibilno s rizobijama. Deset odabranih sojeva identificirano je kao *Pseudomonas spp.* kroz sekvenciranje 16S rRNA. Sojeve su inokulirali na korijen leće koje su rasle na vrećicama za klijanje sjemena kako bi se procijenilo stvaranje kvržica. Soj LY50a povećao je ranu nodulaciju za 85% u usporedbi s kontrolom inokuliranom samo s rizobijom (AG-84). Zaključno, bakterije rizofere s čileanskih mediteranskih tla mogu se koristiti kao promotori rasta biljaka leće.

Taha i sur. (2018.) u svom su istraživanju procijenjenili genetsku raznolikost 268 rizobija koje noduliraju leću (*L. culinaris*) prikupljenih s 40 obrađenih polja u glavnim regijama proizvodnje leće u Maroku. Tri kromosomska gena *recA*, *glnII* i *atpD* i jedan zajednički simbiotski gen (*nodC*) sekvencionirani su i analizirani kako bi se identificirali lokalni simbioti leće. Vrsta *R. laguerreae* je glavni simbiot kultivirane leće u Maroku i prvi put se dobiva veliki uzorak jedinki za ovu vrstu. Sve prethodne studije pokazale su da je vrsta *R. leguminosarum* glavna endosimbiotska vrsta leće koja fiksira dušik, s rijetkim izuzetkom, kao u Tunisu gdje su vrste *Ensifer numidicus* ili *Mesorhizobium amorphae* sv. *ciceri* povezani s lećom (Sami i sur. 2016.) ili u Bangladešu s nekoliko novih vrsta roda *Rhizobium* poput vrsta *R. lentis*, *R. bangladeshense* i *R. binae* (Rashid i sur. 2015.) Stoga su rezultati ove studije neočekivani. Velika većina izolata koji su dobiveni pripada vrsti *R. laguerreae*. Vrsta *R. laguerreae* nedavno je opisana kao zasebna vrsta od vrste *R. leguminosarum* (Saïdi i sur. 2014.). Prvo je izoliran kao simbiot boba (*Vicia faba*), a uzorkovan je iz Perua, Španjolske i Tunisa.

4.3. KVRŽIČNE BAKTERIJE KOJE NODULIRAJU SLANUTAK

Slanutak može fiksirati atmosferski dušik kroz svoje kvržice s rizobijama. Te su bakterije su specifične za vrste i slabo preživljavaju na teksturiranim kiselim tlima. Stoga je inokulacija sjemena rizobijama potrebna za normalan rast slanutka na tlima gdje se prije nije uzgajao slanutak. U tlima siromašnim dušikom mala početna doza dušika ($10\text{--}25 \text{ kg N ha}^{-1}$) može potaknuti rast korijena i dovesti do povećanja prinosa sjemena. Trenutno su rizobije koje noduliraju slanutak uključene u rod *Mesorhizobium*, a dvije su vrste koje tvore kvržice pri interakciji s korijenom slanutka opisane kao specifični mikrosimbionti: *M. ciceri* i *M. mediterraneanum*. Ipak, izolati koji se odnose na najmanje tri druge vrste (*M. amorphae*, *M. loti* i *M. tianshanense*) također noduliraju slanutak (Rai i sur. 2012.).

Simbioza slanutka (*Cicer arietinum* L.) i *Rhizobium leguminosarum* sv. *ciceri* godišnje proizvede do 176 kg ha^{-1} ovisno o sorti, bakterijskom soju i faktorima okoliša (Beck i sur. 1991.). Međutim, slanutak se smatra osjetljivim na povećane koncentracije soli i prema tome, salinitet je jedan od najvažnijih okolišnih čimbenika koji ograničavaju proizvodnju i biološku fiksaciju slanutka u aridnim i semi aridnim područjima. Nekoliko istraživanja provedenih na slanutku (Garg i Singla 2009.) pokazali su da povišeni salinitet usporava rast biljaka, smanjuje stopu fiksacije dušika te broj kvržica. Procjenjuje se da oko 40% svjetske kopnene površine ima potencijalne probleme slanosti, a većina tih područja ograničena je na tropske i mediteranske regije (Bouhmouch i sur. 2005.). Povećana koncentracija soli može ograničiti simbiozu utječući na preživljavanje i širenje rizobija u tlu i rizosferi, inhibirajući infekcijski proces, izravno utječući na smanjenje funkcije kvržica ili smanjujući rast biljke, fotosintezu i potražnju za dušikom. Nadalje, povećani salinitet može ozbiljno promijeniti fotosintetski metabolizam ugljika i sadržaj klorofila u listovima, kao i fotosintetsku učinkovitost (Balibrea i sur. 2003.). Postoji široka varijacija među sojevima rizobija koje noduliraju slanutak u njihovoj sposobnosti rasta i preživljavanja u fiziološkim uvjetima. Primjerice, upotreba rizobije izolirane iz slanog okoliša poboljšala je nodulaciju slanutka u slanim tlima (Ibrahim i Salih 1980.), dok su osjetljivi sojevi *Rhizobium* proizveli lošu nodulaciju i fiksaciju N_2 pri slanim uvjetima (Saxena i Rewari 1992.). Divlje (prirodno rastuće) mahunarke u sušnim regijama podliježu teškim okolišnim uvjetima. Dakle, simbiotske rizobije prirodno rastućih mahunarki tolerantnije su na neke ekološke uvjete (sol, jaka suša, povišene temperature itd.) nego rizobije iz kultiviranih

mahunarki. U stvari, rizobije otporne na sol izolirane iz divljih mahunarki imaju specifična svojstva koja im daju ekološki značaj i te se rizobije mogu koristiti kao bio-gnojiva u slanim tlima (Zahran 2001.). Da bi se procijenila simbiotska učinkovitost sojeva *Rhizobium leguminosarum* sv. *ciceri* izoliranih iz višegodišnjeg divljeg slanutka (*Cicer anatolicum*) u usporedbi sa standardnom bakterijskom kulturom, N primjenom i neinokuliranom kontrolom pod stresnim uvjetima (zaslanjeno tlo) Oğütçü i sur. (2009.) napravili su istraživanje. U tu svrhu iz divljih slanutaka dobivena su 4 soja (DN1, DN7, TN3 i TN4). Sjeme slanutka inokulirano je tim sojevima i uzgajano u loncima koji sadrže sterilni pijesak pri različitim koncentracijama NaCl u kabinetu za rast biljaka. Masa suhe težine korijena i izdanaka, broj i suha masa kvržica, sadržaj klorofila i dušika u biljci, fiksirana količina dušika su se smanjivale s porastom razine saliniteta. U slučaju povećanog saliniteta i pri normalnim uvjetima inokulacija sa sojevima *R. leguminosarum* sv. *ciceri* značajno je povećala sve gore navedene parametre u usporedbi s neinokuliranom kontrolom. Međutim, rizobije koje noduliraju slanutak pokazale su različitost u svojoj toleranciji na sol. Biljke inokulirane sa sojevima DN7 i TN4 proizvele su veću masu izboja, povećale suhu težinu kvržica, ukupni N i fiksirani N u normalnim uvjetima nego biljke inokulirane sa sojevima DN1 i TN3. Ovi rezultati pokazali su da je slanutak sposoban rasti i opstati u tlu s povećanim sadržajem soli nakon inokulacije sojevima *R. leguminosarum* sv. *ciceri* izoliranih iz slanutka, posebno sojevi DN7 i TN4 (Oğütçü i sur. 2009.).

U sadašnjosti, održivost poljoprivrede postala je glavno pitanje globalnog značaja s obzirom na to da intenzivno korištenje mineralnih gnojiva negativno utječe na okoliš. Upotreba bio-gnojiva može smanjiti potrebu za mineralnim gnojivima i umanjiti štetne učinke na okoliš. Studije su pokazale pozitivan učinak inokulacije roda *Mesorhizobium* na rast, simbiotske parametre, prinos i kvalitetu slanutka.

U istraživanju koje su proveli Sharma i sur. (2017.) istražena je heterogenost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju slanutak koja je povezana s 18 različitih indijskih kultivara slanutka (*Cicer arietinum*). Fiziološka raznolikost 20 rizobija karakterizirana je na temelju fenotipskih parametara kao što su pH, temperatura i tolerancija na salinitet. Rizobije su podijelili na spororastuće (14 izolata) i brzorastuće (6 izolata). Filogenija 16S rRNA gena otkrila je visok stupanj raznolikosti vrsta među izolatima. Izolat koji tvori kvržice poput ACR15 identificiran je kao *Mesorhizobium ciceri*, dok su drugi izolati pokazali sličnost s drugim vrstama roda *Mesorhizobium*. Ova studija pridonijela je saznanju da osim vrsta *M. ciceri* i *M. mediterraneanum*, slanutak mogu nodulirati i mnoge druge autohtone rizobije što pokazuje

važnost istraživanje autohtonih rizobija. (Sharma i sur. 2017.).

Primjena fungicida u poljima ima negativne učinke na inokulirane mikroorganizme i njihovu aktivnost. Primijenjeni dušik u obliku uree uzrokuje povećanu osjetljivost na bolest, smanjenje prinosa i smanjenje kvalitete sjemena. Trajna uporaba mineralnih gnojiva može utjecati na fizikalno-kemijska svojstva tla i može dovesti do negativnog utjecaja na produktivnost tla. Ovakva praksa rezultira povećanim troškovima proizvodnje, siromaštvom, prijetnja je životu i egzistenciji ljudi (Mubeen i sur. 2006.). Lijek za sve probleme bio je ekološko bio-gnojivo koje se danas koristi u većini zemalja. Bio-gnojiva pomažu u rješavanju povećane slanosti tla i otjecanju kemikalija s poljoprivrednih polja, a dokazano je da su učinkovita zamjena za mineralna gnojiva s manjim unosom kapitala i energije (Hafeez i sur. 2002.). Rizobije se široko koriste kao bio-gnojivo za mahunarke. Poboljšanje učinkovitosti simbioze između mahunarki i rizobija vjerojatno će rezultirati povećanom proizvodnjom proteina u mahunarkama. Simbiotska učinkovitost rizobija koje noduliraju obični grah, soju i druge mahunarke sveobuhvatno se istražuje. Trenutno postoji općenito nedostatak podataka o raznolikosti i simbiotskim svojstvima autohtonih rizobija koje noduliraju različite vrste mahunarki u Pakistanu. Stoga su Qureshi i sur. (2013.) napravili istraživanje kako bi detektirali učinkovite rizobije koje se mogu koristiti kao inokulanti za slanutak. Iz pakistanskih tala su izolirali 19 vrsta rizobija kako bi ih usporedili s komercijalnim bio-gnojivom. Od 27 testiranih sojeva 19 izolata je inficiralo biljku domaćina i efikasno fiksiralo dušik. Označene razlike u minimalnim i maksimalnim vrijednostima promatrane za sve proučavane simbiotske osobine sugeriraju da ispitivani izolati imaju različite mogućnosti fiksacije dušika. Svi izolati postigli su bolji rezultat za sve simbiotske osobine nego komercijalni soj, stoga ovi izolati ne samo da će osigurati potrebe domaćina za dušikom već će povećati i plodnost tla.

5. ZAKLJUČAK

Brojne korisne bakterije imaju važnu ulogu u različitim biokemijskim procesima u tlu koji mogu značajno unaprijediti rast biljaka tla i poboljšati svojstva tla. Između različitih mehanizama djelovanja, neke bakterije mogu potaknuti rast biljaka uspostavljanjem simbioznih odnosa sa biljkama u kojima dolazi do vezanja atmosferskog dušika i njegove redukcije do amonijskog oblika. Među svim mikroorganizmima koji fiksiraju dušik, simbiozni odnosi između mahunarki i rizobija odgovorni su za najveći unos fiksiranog dušika u sustavima biljne proizvodnje (ili u sustavima tlo-biljka). Proizvodnja visoko kvalitetne, bjelančevinama bogate hrane (kao što su mahunarke) uglavnom ovisi o dostupnom dušiku zbog čega je od iznimne važnosti proučavanje simbiozne fiksacije dušika kako bi se unaprijedio uzgoj mahunarki u raznim državama svijeta kao i u Hrvatskoj.

Slanutak (*C. arietinum* L.), lupine (*Lupinus* spp.) i leća (*L. culinaris* L.), su jedne od najstarijih i vrlo značajnih kultura mahunarki u svijetu zbog velikog udjela proteina. Te kulture se prvenstveno proizvode za sjeme, zelenu hranidbu, sijeno, silažu ili zelenu gnojidbu.

Zbog stalnog porasta stanovništva, globalnih promjena, zagađenja okoliša i atmosfere potrebno je uvesti promjene u način uzgoja mahunarki u svijetu te povećati površine na kojima će se uzgajati zbog čega je u budućnosti osobito važno dodatno istražiti njihove simbiozite te proširiti spektar inokulanata na mahunarke kao što su leća, lupine i slanutak.

Provedena istraživanja potvrđuju značaj proučavanja autohtonih populacija i značaj selekcije, postojanje velike prirodne raznolikosti te se na taj način može unaprijediti uzgoj ovih kultura.

6. POPIS LITERATURE

1. Adebamowo C.A, Cho E., Sampson L., Katan M.B., Spiegelman D., Willett W.C., Holmes M.D. (2005.). Dietary flavonols and flavonolrich foods intake and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 114:628–633
2. Agurs-Collins T., Smoot D., Afful J., Makambi K., Adams- Campbell L.L. (2006). Legume intake and reduced colorectal adenoma risk in African–Americans. *J Natl Black Nurses Assoc* 17:6–12 (Abstract)
3. Alexandre K.B., Gray E.S., Lambson B.E., Moore P.L., Choge I.A., Mlisana K., Abdool Karim S.S., McMahon J., OKeefe Chikwamba R., Morris L., Chikwamba R., Morris L. (2010.). Mannose-rich glycosylation patterns on HIV-1 subtype C gp120 and sensitivity to the lectins– Griffithsin– Cyanovirin-N and Scytovirin. *Virology* 402:187–19
4. Andam C. P., Parker, M. A. (2007). Novel alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with *Lupinus texensis*. *Appl Environ Microbiol* 73, 5687–5691
5. Andrews M., Andrews M. E. (2017.). Specificity in *Legume-Rhizobia* Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 705. doi:10.3390/ijms18040705
6. Ardley J. K., Parker M. A., De Meyer S. E., Trengove R. D., O’Hara G. W., Reeve W.G., Howieson J. G. (2012.) *Microvirga lupini sp. nov.*, *Microvirga lotononidis sp. nov.* and *Microvirga zambiensis sp. nov.* are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt 11), 2579–2588. doi:10.1099/ijms.0.035097-0
7. Balibrea M.E., Cuartero J., Bolarin M.C., Perez-Alfocea F. (2003.) Activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance salinity. *Physiologia Plantarum* 118: 38-46.
8. Barrera L. L., Trujillo M. E., Goodfellow M., Garcia F.J, Hernandez- Lucas I., Davila G., van Berkum P., Martinez-Romero E. (1997.). Biodiversity of *Bradyrhizobia* nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1086–1091.
9. Barulina H. (1930). Lentils of the USSR and other countries. *Bulletin of Applied Genetics and Plant Breeding (Leningrad)*, 40(Supplement), 1–319. in Russian.

10. Beck D., Duc G. (1991.). Improving N₂-fixation in faba bean: Rhizobium inoculation and N nutrition. In Present Status and Future Prospects of Faba Bean Production and Improvement in the Mediterranean Countries; Cunero, J.I., Saxena, M.C., Eds.; CIHEAM: Zaragoza, Ethiopia, pp. 97–103.
11. Beck D.P., Wery J., Saxena M.C., Ayadi A. (1991.). Dinitrogen fixation and nitrogen balance in cool-season food legumes. *Agronomy Journal* 83: 334-341.
12. Beebe S.E., Idupulapati M.R., Blair M.W., Acosta-Gallegos J.A. (2013.). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Front. Physiol.*
13. Beijerinck M .W. (1888). Cultur des *Bacillus radicola* aus den Knollchen. *Bot. Ztg.* 46, 740–750.
14. Blažinkov M., Sikora S., Sudarić A., Mesić M., Rajnović I., Redžepović S. (2015). Improvement of *Rhizobial* Inoculants: A Key Process in Sustainable Soybean Production. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. No. 1 80: 25-29
15. Bouhmouch I., Souad-Mouhsine B., Brhada F. (2005.). Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 1103-1113.
16. Bozzola M., Massetti E., Mendelsohn R., Capitanio F. A. (2018.). Ricardian analysis of the impact of climate change on Italian agriculture. *Eur. Rev. Agric. Econ.* 45, 1, 57-79.
17. Butorac A. (1999.) *Opća agronomija*, Zagreb, Školska knjiga,
18. Cabello-Hurtado F., Keller J., Ley J., Sanchez-Lucas R., Jorrín-Novo J.V. i Ainouche A. (2016.). Proteomics for exploiting diversity of lupin seed storage proteins and their use as nutraceuticals for health and welfare, *J. Proteomics.* 143:57–68. doi:10.1016/j.jprot.2016.03.026.
19. Calle-Pascual A.L., Marengo G., Asis M.J., Bordiu E., Romeo S., Martin P.J., Maranes J.P., Charro A.L. (1986.). Effects of different proportions of carbohydrates, polysaccharides/monosaccharides, and different fibers on the metabolic control in diabetic rats. *Metabolism* 35:919–923
20. Cardoso D., Pennington R.T., de Queiroz L.P., Boatwright J.S., van Wyk B.-E., Wojciechowski M.F., Lavin M. (2013.). Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *S. Afr. J. Bot.* 2013, 89, 58–75.

21. Chibbar R.N., Ambigaipalan P., Hoover R. (2010.). Molecular diversity in pulse seed starch and complex carbohydrates and its role in human nutrition and health. *Cereal Chem* 87, 342–352.
22. Clements J. C., Buirchell B. J., Yang H., Smith P. M. C., Sweetingham M. W., Smith, C. J. (2005). Lupin, Chapter 9. In R. Singh, & P. Jauhar (Eds.), *Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement, volume I: Grain legumes*. CRC Press.
23. Conrath U., Beckers G. J., Langenbach C. J., Jaskiewicz M. R. (2015.). Priming for enhanced defense. *Ann.Rev. Phytopathol.* 53
24. Corbin E. J. (1978.). Lupin growing increasing in southern N.S. *W. Agric. Gaz. N.S. W.* 89, 9-11.,
25. Cuellar-Ortiz S.M., de la Paz Arrieta-Montiel M., Acosta-Gallegos J., Covarrubias A.A. (2008.). Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell Environ.* 31, 1399-1409.
26. Čupić T., Gantner R, Popović S, Tucak M, Sudar R, Stjepanović M (2012.). Rasprostranjenost jednogodišnjih mahunarki u Hrvatskoj. U: *Proceedings & abstracts of the 5th international scientific/professional conference Agriculture in nature and environment protection* (Stipešević B, Sorić R, ur.), Glas Slavonije d.d., Osijek: 220-225
27. De Candolle A. (1883.). *Origine des plantes Cultivees*, Paris, pp 208-260.
28. De Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B., Gillis M. (1992.). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 93-96.
29. De Ron AM (2015.). *Grain legumes*. Springer Science+Business Media, New York
30. Dean D. R., Bolin J. T., Zheng L. M. (1993.). Nitrogenase metallocusters: structures organization, and synthesis. *J. Bacteriol* [online] 175: 6737-6744, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC206795/> (pristupljeno 15. svibnja 2020.)
31. Dixon R., Wheeler C.T. (1986.). *Nitrogen fixation in plants*. New York: Chapman and Hall.
32. Duran D., Rey L., Navarro A. (2014.). *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariaejosephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Syst Appl Microbiol* 2014;37:336–41.

33. Eckhardt M. M., Baldwin I. L., Fred E. B. (1931.). Studies of the root-nodule organism of *Lupinus*. *J Bacteriol* 21, 273–285.
34. Erskine W., Smartt J., Muehlbauer F.J. (1994.) Mimicry of lentil and the domestication of common vetch and grass pea. *Econ Bot* **48**, 326–332.
<https://doi.org/10.1007/BF02862334>
35. FAO mrežna stranica [online] <http://www.fao.org/home/en/> (pristupljeno 26. svibnja 2020.)
36. FAO, 2015. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015.
37. Faris M. A.-I. E., Takruri H. R., Issa A. Y. (2012.). Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6(1), 3–16. doi:10.1007/s12349-012-0109-8
38. Frank (1889) *Rhizobium leguminosarum* in Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date (PNU). Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/oclygu>
39. Gagro M. (1997.). Ratarstvo obiteljskoga gospodarstva: žitarice i zrnate mahunarke, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb
40. Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z.E., Freney J.R., Martinelli L.A. Seitzinger S.P., Sutton M.A. (2008.). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889–892. (doi:10.1126/science.1136674)
41. Gantner R., Bukvić G., Steiner Z., Gantner V., Ronta M., Zimmer D., Milošević A., Nikolić J. (2015). Prinos i kvaliteta voluminozne krme raznih smjesa ozimih žitarica i mahunarki. 52. hrvatski i 12. međunarodni simpozij agronoma.
42. Garg N., Singla R. (2009.). Variability in the response of chickpea cultivars to short-term salinity, in terms of water retention capacity, membrane permeability and osmo-protection. *Turk J Agric For* 33: 57-63
43. Giller K. E., Cadisch G. (1995.). Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. *Plant and Soil*, 174(1-2), 255–277. doi:10.1007/bf00032251
44. Gladstones J. S. (1970.). Lupins as crop plants. *Field Crop Abst.* 23, 123-48.
45. Gladstones J. S. (1974.). Lupins of the Mediterranean region and Africa. West. Aust. Dept. Agric. Bull. No. 26.

46. Gladstones J. S., Crosbie G. B. (1978.). Lupin wild types introduced into Western Australia to 1973. West. Aust. Dept. Agric. Bull. No. 43.
47. Gonzalez-Sama A., Lucas M.M, de Felipe M.R., Pueyo J.J. (2004.). An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*), New Phytol. 163 371–380. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01121.x.
48. Graham P.H. (1981.). Some problems of nodulation and symbiotic fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. Field Crops Research 4: 93–112.
49. Granada C.E., Beneduzi A., Lisboa B.B. (2015.). Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Lupinus albus* plants growing in arenized and non-arenized areas. Syst Appl Microbiol 2015;38:323–9.
50. Gyaneshwar P., Hirsc A. M., Moulin L., Chen W.-M., Elliott G. N., Bontemps C., James E. K. (2011.). Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24(11), 1276–1288. doi:10.1094/mpmi-06-11-0172
51. Hafeez F.Y., Hameed S., Zaidi A.H, Malik K.A. (2002.) Bio-fertilizers for Sustainable Agriculture. In: Azam, F., M.M. Iqbal, C. Inayatullah and K.A. Malik (eds.), Techniques for Sustainable Agriculture, Pp: 67–73. Nuclear Institute of Agriculture and Biology, Faisalabad, Pakistan
52. Hane J.K., Ming Y., Kamphuis L.G., Nelson M.N., Garg G., Atkins C.A., Bayer P.E., Bravo A., Bringans S., Cannon S, Edwards D., Foley R., Gao L., Harrison M.J., Huang W., Hurgobin B., Li S., Liu C.W., McGrath A., Morahan G., Murray J., Weller J., Jian J., Singh K.B. (2016.). A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant-microbe interactions and legume evolution, Plant Biotechnol. J. doi:10.1111/pbi.12615.
53. Holmes B., Popoff M., Kiredjian M., Kersters K. (1988.) *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinic specimens and previously known as group Vd. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:406–41.
54. Hoover R., Hughes T., Chung H.J., Liu Q. (2010.). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: a review. Food Res Int 43:399–413
55. Hungria M., Vargas M. A. T. (2000.). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research 65: 151-164

56. Ibrahim M.E., Salih F.A. (1980.). Chickpea nodulation under saline conditions in northern Sudan. International Chickpea Newsletter 2: 16-17.
57. Igarashi R.Y., Seefeldt L.C. (2003.). Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 38: 351–384.
58. Internetska stranica [online]<http://www.lupins.org/lupins/> (pristupljeno 20.6.2020.)
59. Internetska stranica USDA. (1998). Soil Quality – Agronomy Technical Note [online] http://soils.usda.gov/sqi/management/files/sq_atn_6.pdf (pristupljeno 26. svibnja 2020.)
60. Jain M., Misra G., Patel R. K., Priya P., Jhanwar S., Khan A. W., Chattopadhyay D. (2013). A draft genome sequence of the pulse crop chickpea doi.org/10.1111/tpj.12173
61. Jaipal S., Singh S., Yadav A., Malik R.K., Hobbs P.R. (2002.). Species diversity and population density of macro-fauna of rice–wheat cropping habitat in semi-arid subtropical northwest India in relation to modified tillage practices of wheat sowing. Herbicide-resistance management and zero-tillage in the rice–wheat cropping system. Proc. Int. Workshop, Hissar, India, 4–6 March 2002, Malik R.K, Balyan R.S, Yadav A& Pahwa S.K. 2002pp. 166–171. Eds. Hissar, India:CCS Haryana University.
62. Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., CleyetMarel J.C., Gillis M. (1997.). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 895- 898
63. Jensen E.S., Peoples M.B., Boddey R.M.; Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves B.J.R., Morrison M.J. (2012.). Legumes for mitigation of climate change and provision of feedstocks for biofuels and biorefineries. Agronomy for Sustainable Development 32: 329–364
64. Jordan D.C. (1984). Family III Rhizobiaceae. U: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vol I (ur. Krieg N.R., Holt J.G.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, str. 234-242.
65. Jukanti A. K., Gaur P. M., Gowda C. L. L., Chibbar R. N. (2012.). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition 108, S11–S26, doi: 10.1017/S0007114512000797

66. Kampfer P., Buczolits S., Albrecht A., Busse H.J., Stackebrandt E. (2003.). Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:893–896.
67. Kalso S., Patel B. K. C. (2003). *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. Int J Syst Evol Microbiol 53, 401–406.
68. Karim A. (2012.) Evaluation of *Bradyrhizobium* strains for lupins in Finnish conditions. Master's thesis, University of Helsinki, Department of Agricultural Science Plant Production Science / Crop Science, May 2012
69. Keller J., Imperial J., Ruiz-Argueso T., Privet K., Lima O., Michon-Coudouel S. , Biget M., Salmon A., Ainouche A., Cabello-Hurtado F. (2017.) RNA sequencing and analysis of three *Lupinus* nodulomes provide new insights into specific host-symbiont relationships with compatible and incompatible *Bradyrhizobium* strains, Plant Science <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.10.015>
70. Kim K.D., El Baidouri M., Abernathy B., Iwata-Otsubo A., Chavarro C., Gonzales M., Libault M., Grimwood J., Jackson S.A. (2015). A Comparative Epigenomic Analysis of Polyploidy-Derived Genes in Soybean and Common Bean. Plant Physiol. 168 (4), 1433-1447.
71. Kislev M. E., Bar-Yosef O. (1988.). The Legumes: The earliest domesticated plants in the Near East. *Current Anthropology*, 29(1), 175–179.
72. Knights E. J., Hobson K. B. (2016.). Chickpea Overview. Reference Module in Food Science. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.00035-4
73. Kolak I. (1994.). Sjemenarstvo ratarskih i krmnih kultura. Nakladni zavod globus. Zagreb
74. Kolak I. (1998.). Vučika (*Lupinus spp.*):monografija. Hrvatsko agronomsko društvo Zagreb .
75. Kurlovich B. S. (2002.). Lupins (geography, classification, genetic resources and breeding). (P. 468). St. Petersburg: N.I. Vavilov Institute of Plant
76. Ladizinsky G., Adler A. (1976.). Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. Theor. Appl. Genet., 48:197-204
77. Laguerre G., Mazurier S.I., Amarger N. (1992.). Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. FEMS Microbiol. Ecol. 101, 17–26.

78. Lardos A. (2006.). The botanical materia medica of the Iatrosophikon- A collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. *J Ethnopharmacol* 104:387–406
79. Lebuhn M., Achouak W., Schlöter M., Berge O., Meier H., Barakat M., Hartmann A., Heulin T. (2000.). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2207–2223.
80. Lemaire B., Van Cauwenberghe J., Chimphango S., Stirton C., Honnay O., Smets E., Muasya A. M. (2015). Recombination and horizontal transfer of nodulation and ACC deaminase (acdS) genes within Alpha- and Betaproteobacteria nodulating legumes of the Cape Fynbos biome. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(11), fiv118. doi:10.1093/femsec/fiv118
81. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak-Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2004.). Povrćarstvo, II dopunjeno izdanje. Zrinski d.d., Čakovec.
82. Lewis G., Schrire B., MacKinder B., Lock M. (2005). *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew Publishing, ISBN 1 900 34780 6, UK
83. Lorenz M.G., Reipschläger K., Wackernagel W. (1992). Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch Microbiol* 157
84. LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxonomy* 66(1): 44–77.
85. Martinelli F., Ollero F. J., Giovino A., Perrone A., Bekki A., Sikora S., El Nabbout R., Bouhadida M., Yucel D., Bazzicalupo M., Mengoni A., Pérez-Montaña F. (2020.). Proposed Research for Innovative Solutions for Chickpeas and Beans in a Climate Change Scenario: the Mediterranean Basin; Sustainability [online], 12, 1315; doi: 10.3390/su12041315
86. Martínez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A. (1991.). *Rhizobium tropici*: a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 417-426.
87. Maxted N., Kell S., Toledo Á., Dulloo E., Heywood V., Hodgkin T. (2010.). A global approach to crop wild relative conservation: Securing the gene pool for food and agriculture. *Kew Bulletin*, 65(4), 561–576.

88. Međimurec T. (2018.). Pokrovni usjevi. Gospodarski list, 20. online <https://gospodarski.hr/rubrike/ratarstvo-krmno-bilje/pokrovni-usjevi/> (pristupljeno 31. svibnja 2020.)
89. Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C. (2001.). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950.
90. Mousavi S.A., Osterman J., Wahlberg N., Nesme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., Lindstrom K. (2014.). Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium- 134 Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 208-215.
91. Mousavi S.A., Willems A., Nesme X., de Lajudie P., Lindstrom K. (2015.). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov, and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 84-90.
92. Msaddak A., Rejili M., Durán D., Rey L., Imperial J., Palacios J. M., Mars M. (2017.). Members of *Microvirga* and *Bradyrhizobium* genera are native endosymbiotic bacteria nodulating *Lupinus luteus* in Northern Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(6).
93. Mubeen F A., Aslam M. A., Sheikh T., Iqbal T., Hameed S., Malik K. A., Hafeez F.Y. (2006.) Response of wheat yield under combine use of Fungicide and Biofertilizer. *International Journal of Agriculture and Biology* 8(5). P. 580-582.
94. Muehlbauer F.J., McPhee K.E. (2007.). Registration of 'Morton' Winter-hardy Lentil, Published in *Crop Sci.* 47:438–439 doi: 10.2135/cropsci2005.12.0490.
95. Muller S.H., Pereira P.A.A. (1995). Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. *Plant and Soil* 177: 55–61.
96. Newman B., Austin M. A., Lee M., King M. C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), 3044–3048.
97. Newton W.E. (2007.). Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Bothe H, Ferguson SJ, and Newton WE (eds.) *Biology of the Nitrogen Cycle*, pp. 109–130. Amsterdam: Elsevier.
98. Nleya T., Vandenberg A., Walley F.L., Deneke D. (2016.). Agronomy of grain growing Lentil: *Agronomy* doi: 10.1016/IBO-12-765490-9/00079-3

99. Oğütçü H., Kasimoğlu C., Elkoca E. (2009.). Effects of rhizobium strains isolated from wild chickpeas on the growth and symbiotic performance of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. Turk J Agric For 34 (2010) 361-371 © TÜBİTAK doi:10.3906/tar-0904-34
100. Ozimec R., Karoglan Kontić J., Maletić E., Matotan Z., Strikić F. (2015.). Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije. Tiskara Zelina d.d., Sv. Ivan Zelina
101. Peix A., Ramirez-Bahena M. H., Flores-Felix J. D., de la Vega P. A., Rivas R. Mateos P. F, Igual J.M., Martinez-Molina E., Trujillo M. E., Velazquez E. (2015.). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 65, 1213–1219 doi: 10.1099/ijs.0.000082
102. Poole P., Ramachandran V., Terpolilli J. (2018.). *Rhizobia*: from saprophytes to endosymbionts. Nature Reviews Microbiology, 16(5), 291–303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
103. Pospíšil A. (2010.). Ratarstvo I. dio. Zrinski dd, Čakovec, 175-182.
104. Prusinski J. (2017.). White lupin (*Lupinus albus* L.) – nutritional and health values in human nutrition – a review. Czech J. Food Sci., 35: 95–105.
105. Quiñones M. A., Ruiz-Díez B., Fajardo S., López-Berdonces M. A., Higuera P. L., Fernández-Pascual M. (2013). *Lupinus albus* plants acquire mercury tolerance when inoculated with an Hg-resistant *Bradyrhizobium* strain. Plant Physiology and Biochemistry, 73, 168–175. doi:10.1016/j.plaphy.2013.09.015
106. Qureshi S.T., Bux H., Khan M.R. (2013.) Symbiotic characterization of *Rhizobia* nodulating *Cicer arietinum* L. isolated from Pakistan. International Journal of Agronomy and Plant Production. Vol., 4 (11), 2912-2918, 2013 online <http://www.ijappjournal.com> (Pristupljeno 30. svibnja 2020.)
107. Radl V., Simoes-Araujo J.L., Leite J. (2014.). *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. Int J Syst Evol Micr 2014; 64:725–30.
108. Rai R., Dash K. P., Mohapatra T., Singh A. (2012.) Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. Indian J Exp Biol 2012 May;50(5):340-50.

109. Rajnović I. (2017.) Bioraznolikost i simbiotična učinkovitost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju grah (*Phaseolus vulgaris* L.), Doktorska dizertacija, Agronomski fakultet, Zagreb
110. Rascio N. i La Rocca N. (2013.) Biological Nitrogen Fixation Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.0068 online
https://www.researchgate.net/publication/285671049_Biological_Nitrogen_Fixation
111. Rashid M.H., Young J.P.W., Everall I., Clercx P., Willems A., Santhosh Braun M., Wink M. (2015.). Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65 (9), 3037–3045, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.000373>.
112. Redžepović S., Čolo J., Blažinkov M., Sikora S., Pecina M., Duraković L. (2007.). Utjecaj biostimulatora rasta i fungicida za tretiranje sjemena soje na učinkovitost simbiotične fiksacije dušika. Sjemenarstvo 24: 169-176
113. Reed S.C., Cleveland C.C., Townsend A.R. (2011.). Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 42, 489–512. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034
114. Rogel M.A., Ormeno-Orrillo E., Martinez-Romero E. (2011.). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. Systematic and Applied Microbiology 34: 96- 104.
115. Ryan E., Galvin K., O'Connor T.P., Maguire A.R., O'Brien N.M. (2007.). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. Plant Foods Hum Nutr 62:85–91
116. Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L. (2017.). *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven. Int J Syst Evol Micr 2017;67:94–100.
117. Saharan B. S., Nehra V. (2011.) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21
118. Saïdi S., Ramírez-Bahena M.H., Santillana N., Zúniga D., Álvarez-Martínez E., Peix A., Mhamdi R., Velázquez E. (2014.). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates

- Vicia faba* on several continents. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64 (Part 1),242–247, <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.052191-0>
119. Sami D., Mokhtar R., Peter M., Mohamed M. (2016.). *Rhizobium leguminosarum symbiovar trifolii*, *Ensifer numidicus* and *Mesorhizobium amorphae symbiovar ciceri* (or *Mesorhizobium loti*) are new endosymbiotic bacteria of *Lens culinaris* Medik. FEMS Microbiol. Ecol. 92 (8), <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw118>
 120. Saraf D., Vidak M., Grdiša M., Carović- Stanko K. (2017.). Klijanje i dormantnost kod mahunarki. Agronomski glasnik 1-2/2017 ISSN 0002-1954
 121. Saxena A.K., Rewari R.B. (1992.). Differential response of chickpea (*Cicer arietinum* L.)-*Rhizobium* combinations to saline soil conditions. Biology and Fertility of Soils 13: 31-34.
 122. Schrire B.D., Lewis GP., Lavin M. (2005.). Biogeography of the *Leguminosae*, In: Legumes of the world, Lewis, G., Schrire, G., Mackinder, B., & Lock, M., (Eds.), 21–54, Royal Botanic Gardens, ISBN 8773043044, Kew, UK
 123. Scott J. M., Davis F., Csuti B., Noss R., Butterfield B., Groves C. (1993.). Gap analysis: A geographic approach to protection of biological diversity. Wildlife Monographs, 123, 3–41.
 124. Sepúlveda-Caamaño M., Gerding M., Vargas M., Moya-Elizondo E., Oyarzúa P., Campos J. (2017). Lentil (*Lens culinaris* L.) growth promoting rhizobacteria and their effect on nodulation in coinoculation with rhizobia. Archives of Agronomy and Soil Science, 64(2), 244–256. doi:10.1080/03650340.2017.1342034
 125. Sezik E., Yesilada E., Honda G., Takaishi Y., Takeda Y., Tanaka T. (2001.). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. J Ethnopharmacol 75:95–115
 126. Shafique A., Rehman S., Khan A., Kazi A. G. (2014.). Improvement of Legume Crop Production Under Environmental Stresses Through Biotechnological Intervention. Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, 1–22. doi: 10.1016/b978-0-12-800875-1.00001-6
 127. Sharma A., Bandamaravuri K. B., Sharma A., Arora D. K. (2017.). Phenotypic and molecular assessment of chickpea rhizobia from different chickpea cultivars of

- India. 3 Biotech, 7(5). doi:10.1007/s13205-017-0952-x online (pristupljeno 31. svibnja 2020.) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5602792/>
128. Sharma S., Upadhyaya H. D., Roorkiwal M., Varshney R. K., Gowda C. L. L. (2013.). Chickpea. Genetic and genomic resources of grain legume improvement, 81–111. doi:10.1016/b978-0-12-397935-3.00004-9
 129. Siddiqui K. H., Krishnamurthy L. (2016.). Chickpea, Agronomy. Reference Module in Food Science. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00192-x
 130. Singh K.B. (1997.). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Field Crops Research Volume 53, Issues 1–3, July 1997, Pages 161-170 doi: 10.1016/S0378-4290(97)00029-4
 131. Singh S. P., Gutiérrez J. A., Molina A., Urrea C., Gepts P. (1991). Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: II. Marker-Based Analysis of Morphological and Agronomic Traits. Crop Science, 31(1), 23. doi:10.2135/cropsci1991.0011183x003100010005x
 132. Sprent J.I. (2007.). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytol. 174, 11–25.(doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x)
 133. Stacey G. (2007). *The Rhizobium*-legume nitrogen-fixing symbiosis. Biology of the nitrogen cycle, 147–163. doi:10.1016/b978-044452857-5.50011-4
 134. Stepkowski T., Hughes C.E., Law I.J., Markiewicz L., Gurda D., Chlebicka A., Moulin L. (2007.). Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: Evidence from nodulation gene trees, Appl.Environ. Microbiol. 73:3254–3264. doi:10.1128/AEM.02125-06.
 135. Stepkowski T., Zak M., Moulin L. (2011.). *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. Syst Appl Microbiol, 34:368–75.
 136. Sulieman S., Phan Tran L. S. (2014.). Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Metabolism and Regulatory Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences. [online] (15)11: 19389.19393, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264117/> (pristupljeno 31. svibnja 2020.)

137. Taha K., Berraho E. B., El Attar I., Dekkiche S., Aurag J., Béna G. (2018.). *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), 113–121.
138. Takeda M., Suzuki I., Koizumi J. I. (2004). *Balneomonas flocculans* gen. nov., sp. nov., a new cellulose-producing member of the α -2 subclass of Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol* 27, 139–145.
139. Tegegn N.D. (2006.). Genetic diversity and characterization of indigenous *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolates of cool-season food legumes growth in the highlands of Ethiopia. PhD Thesis, University of Putra, Malaysia.
140. Tian C.F., Young J.P.W., Wang E.T., Tamimi S.M., Chen W.X. (2010.). Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73 (3),563–576, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00909.x>.
141. Tounsi-Hammami S., Le Roux C., Dhane-Fitouri S., de Lajudie P., Duponnois R., Jeddi F. B. (2019.). Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils.
142. Trujillo M.E., Willems A., Abril A., Planchuelo A.M., Rivas R., Ludena D., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Velazquez E. (2004.) Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, Mar. 2005, p. 1318–1327 Vol. 71, No. 3 doi:10.1128/AEM.71.3.1318–1327.2005 American Society for Microbiology.
143. Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.-M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Velazquez, E. (2005). *Nodulation of Lupinus albus by Strains of Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1318–1327. doi:10.1128/aem.71.3.1318-1327.2005
144. Valverde A., Velazquez E., Fernandez-Santos F. (2005.). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Micr* 2005;55:1985–9.
145. Van de Noort M. (2017.). Lupin. *Sustainable Protein Sources*, 165–183. doi:10.1016/b978-0-12-802778-3.00010-x
146. Van der Maesen L.J.G. (1972.). Origin, history and taxonomy of chickpea. U eds M. C. Saxena and K.B. Singh, *The Chickpea*. CAB International, UK, pp, 11-34

147. Van Kammen A. (1984.). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. Plant MOI. Biol. Rep. 2,43-45.
148. Vavilov N.I. (1926.) Studies on the origin of cultivated plants, Leningrad, pp. 129-238
149. Velasco J., Romero C., Lopez-Goni I., Leiva J., Diaz R., Moriyon I. (1998.). Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov. a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:759–768.
150. Velazquez E., Valverde A., Rivas R. (2010.). Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. Anton Leeuw 2010;97:363–76.
151. Vinuesa P., Silva C., Lorite M.J., Izaguirre-Mayoral M.L., Bedmar E.J. MartínezRomero E. (2005.). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. Systematic and Applied Microbiology 28(8): 702-716.
152. Vitousek P. M., Menge D. N. L., Reed S. C., Cleveland C. C. (2013.). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1621), 20130119–20130119. Wallingford: CAB International.
153. Weon H.-Y., Kwon S.-W., Son J.-A., Jo E.-H., Kim S.-J., Kim Y.-S., Kim B.-Y., Ka J.-O. (2010). Description of *Microvirga aerophila* sp. nov. and *Microvirga aerilata* sp. nov., isolated from air, reclassification of *Balneimonas flocculans* Takeda et al. 2004 as *Microvirga flocculans* comb. nov. and emended description of the genus *Microvirga*. Int J Syst Evol Microbiol 60, 2596–2600.
154. White T. J., Bruns T.D., Lee S.B, Taylor J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics
155. Wilson J. K. (1944.) Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. Soil Science: July 1944 - Volume 58 - Issue 1 - p 61-70
156. Woese C.R., Stackebrandt E., Weisburg W.G., Paster B.J., Madigan M.T., Fowler V.J., Hahn C.M., Blanz P., Gupta R., Nealson K.H., Fox G.E. (1984.). The phylogeny of

- purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* 5: 315-326.
157. Wondwosen T, Wolde-Meskel E., Walley F. (2016.) Symbiotic Efficiency of Native and Exotic *Rhizobium* Strains Nodulating Lentil (*Lens culinaris* Medik.) in Soils of Southern Ethiopia. *Agronomy* 2016, 6, 11; doi:10.3390/agronomy6010011
 158. Wood J.A., Grusak M.A. (2007.). Nutritional value of chickpea. In *Chickpea Breeding and Management*, pp. 101–142 [SS Yadav, R Redden, W Chen and B Sharma, editors].
 159. Yates R. J., Howieson J. G., Reeve W. G., Nandasena K. G., Law I. J., Brau L., Ardley J. K., Nistelberger H. M., Real D., O'Hara G. W. (2007). *Lotononis angolensis* forms nitrogen fixing, lupinoid nodules with phylogenetically unique, fast-growing, pink-pigmented bacteria, which do not nodulate *L. bainesii* or *L. listii*. *Soil Biol Biochem* 39, 1680–1688.
 160. Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968–989.
 161. Zahran H.H. (2001.) *Rhizobium* from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* 2-3: 143-153.
 162. Zhang J., Song F., Xin Y. H., Zhang J., Fang C. (2009). *Microvirga guangxiensis* sp. nov., a novel alphaproteobacterium from soil, and emended description of the genus *Microvirga*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1997–2001.
 163. Zohary D. (1972.). The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Economic Botany*, 26(4), 326–332.

Popis slika:

1. Slika 2.1. Pojednostavljena shema dušičnog ciklusa koja pokazuje korake koje provode živi organizmi: (1) amonifikacija; (2,3) nitrifikacija; (4, 5) asimilacijsko smanjenje nitrata; (6) asimilacija amonijaka; (7) denitrifikacija i (8) fiksacija dušika. Izvor: Rascio i La Rocca 2013.

2. Slika 3.4.4.1. Plava lupina (*L. angustifolius* L.) Izvor: <https://alchetron.com/Lupinus-angustifolius>. Pristupljeno 1.5.2020.
3. Slika 3.4.4.2. Bijela lupina (*L. albus* L.) Izvor: <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Lupinus+albus>. Pristupljeno 3.5.2020.
4. Slika 3.5.4.1. Različite vrste sjemena leće Izvor: [https://uses.plantnet-project.org/en/Lens_culinaris_\(PROTA\)](https://uses.plantnet-project.org/en/Lens_culinaris_(PROTA)). Pristupljeno 3.5.2020.
5. Slika 3.5.4.2. Leća (*L. culinaris* L.) Izvor: <https://www.agroklub.com/povrcarstvo/leca-mahunarka-koja-voli-krumpir-i-cisto-tlo/30674/>. Pristupljeno 3.5.2020.
6. Slika 3.6.4.1. Sjemenke slanutka Izvor: <https://seeds-gallery.com/tr/home/chickpea-seeds-cicer-arietinum.html>. Pristupljeno 7.5.2020.
7. Slika 3.6.4.2. Slanutak (*C. arietinum* L.) Izvor: <https://www.sciencesource.com/archive/Chickpeas--Cicer-arietinum--SS2268316.html>. Pristupljeno 10.5.2020.

7. ŽIVOTOPIS

Darija Godinić rođena je 08. kolovoza 1994. godine u Varaždinu. Završila je srednju školu opće gimnazije u Ivancu 2013. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu koji završava 2016. godine. Završetkom navedenog studija 2016. godine stekla je titulu prvostupnika medicinsko - laboratorijske dijagnostike. Diplomski studij Agroekologije - Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je upisala 2018. godine.