

# UTJECAJ TEMPERATURE NA RAZVOJ FITOPATOGENIH GLJIVA

---

Vranješ, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:243452>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Luka Vranješ

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ TEMPERATURE NA RAZVOJ FITOPATOGENIH GLJIVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Luka Vranješ

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ TEMPERATURE NA RAZVOJ FITOPATOGENIH GLJIVA**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. Prof. dr. sc. Nada Parađiković, član

**Osijek, 2017.**

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE .....                               | 2  |
| 2.1. <i>Sclerotinia Sclerotiorum (Lib.) de Bary</i> ..... | 2  |
| 2.2. <i>Botrytis cinerea Pers.</i> .....                  | 7  |
| 2.3. <i>Chalara elegans Nag Ray&amp;Kendr.</i> .....      | 10 |
| 3. MATERIJAL I METODE .....                               | 13 |
| 3.1. Priprema hranjive podloge i kultura .....            | 13 |
| 3.2. Nacjepeljivanje .....                                | 14 |
| 4. REZULTATI .....  | 17 |
| 4.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....                | 17 |
| 4.2. <i>Botrytis cinerea</i> .....                        | 19 |
| 4.3. <i>Chalara elegans</i> .....                         | 20 |
| 5. RASPRAVA .....   | 22 |
| 6. ZAKLJUČAK .....  | 24 |
| 7. POPIS LITERATURE .....                                 | 25 |
| 8. SAŽETAK .....  | 28 |
| 9. SUMMARY .....  | 29 |
| 10. POPIS SLIKA .....                                     | 30 |
| 11. POPIS TABLICA .....                                   | 32 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....                    | 33 |
| BASIC DOCUMENTATION CARD .....                            | 34 |

## 1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja pod utjecajem je mnogih čimbenika koji utječu na njene mogućnosti i produktivnost. Od klimatskih, geografskih, socioekonomskih, organizacijskih i tehnoloških pa sve do onih u vidu štetnika, korova i biljnih bolesti. U vremenu kada svjetsko stanovništvo i potrebe za hranom rapidno rastu, a obradive površine se smanjuju, sve je veći naglasak na maksimalizaciji uroda i preveniranju šteta svih vrsta pa tako i šteta od bolesti. Kako bi u tome uspjeli potrebno je dobro poznavati biologiju samih uzročnika bolesti, odnosno čimbenike koji najviše utječu na njihov rast i razvitak. Razlikujemo parazitske (biotske) i neparazitske (abiotske) bolesti biljaka, a gljive su najbrojniji uzročnici biljnih bolesti. Fitopatogene gljive uzrokuju više od 70% bolesti parazitskog podrijetla, a osim po brojnosti, gljive se ističu i štetama koje uzrokuju. Učinkovito se suzbijaju primjenom fungicida, a provode se i razne agrotehničke te higijenske mjere radi smanjenja i prevencije zaraze.

Za gotovo sve fitopatogene gljive i njihov razvoj najvažniji čimbenik uz vlagu i pogodnog domaćina je temperatura. U ovom diplomskom radu predmet istraživanja su 3 fitopatogene gljive, *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. (uzročnik sive plijesni), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (uzročnik bijele truleži) i *Chalara elegans* Nag Ray et Kendr. (uzročnik crne truleži korijena) i njihov rast i razvoj na različitim temperaturama (10, 15, 20, 25 i 30°C) na hranjivoj podlozi u laboratorijskim uvjetima. Cilj rada je utvrditi koliko su navedene temperature pogodne za rast i razvoj ovih triju uzročnika bolesti te usporediti dobivene rezultate s ranijim istraživanjima i literaturnim izvorima.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary uzročnik je bijele truleži. Zemljišni je fakultativni parazit koji napada biljke u svim stadijima rasta i razvoja te njihove plodove nakon žetve i berbe. Hoes i Huang (1975.) navode da gljiva stvara bijeli micelij na površini napadnutih biljnih organa (Slika 1.), a u miceliju se razvijaju crne sklerocije koje predstavljaju glavni izvor zaraze. *Sclerotinia sclerotiorum* polifagni je uzročnik bolesti koji parazitira na preko 400 biljnih vrsta iz 75 porodica (Boland i Hall, 1994.). Pojava crnih sklerocija na ili u bolesnim tkivima je siguran dijagnostički znak zaraze ovom bolešću. Ivić (2016.) opisujući bijelu trulež na rajčici navodi da ovisno o tome na kojem dijelu biljke nastaju, sklerocije mogu biti okruglaste, izdužene ili nepravilnog oblika, duge od nekoliko milimetara do više od dva centimetra, isprva



Slika 1. Micelij *S. sclerotiorum* na salati

([http://www.agro.basf.hr/agroportal/hr/hr/crop\\_protection/pest\\_lexikon/pest\\_lexicon\\_426.html](http://www.agro.basf.hr/agroportal/hr/hr/crop_protection/pest_lexikon/pest_lexicon_426.html))

bijele, no vrlo brzo tamne te poprimaju sivu boju, a ubrzo i karakterističnu crnu boju. Parazitira na brojnim kultiviranim (suncokret, soja, uljana repica, lucerna, duhan, grah, rajčica, krastavac, mrkva...) ali i na korovnim

vrstama (mračnjak, ambrozija, čičak, oštrodлакavi šćir...) (Jurković i Ćosić, 2004., Ćosić i sur., 2008.). Posebno osjetljive porodice su *Brassicaceae* (kupus, cvjetača), *Fabaceae* (grah, mahune), *Cucurbitaceae* (krastavac, lubenica, dinja) i *Asteraceae* (suncokret, salata). Veće štete pričinjava u plastenicima i staklenicima uslijed gustog sklopa i gomilanja infektivnog materijala uslijed uzgoja biljaka u monokulturi.

Mikić i sur. (2014.) navode da je uzročnik bijele truleži široko rasprostranjen, ali prevladava u područjima s relativno hladnijim i vlažnijim vremenom. Optimalne su temperature za razvoj *S. sclerotiorum* između 15 i 21°C, uz visoku vlažnost zraka. U godinama s vlažnim i prohladnim proljećem može prouzročiti velike štete na uljanoj repici na kojoj se javlja u vidu paleži klijanaca, truleži stabljike i zaraze komuški unutar kojih se između sjemenja stvaraju sitne

sklerocije. Rane infekcije dovode do polijeganja i propadanja biljaka. Na starijim biljkama uočavaju se prstenaste pjege na prizemnom dijelu. Tkivo razmekšava i za visoke vlažnosti nastaje bijeli micelij, a kasnije i sklerocije. Oboljele biljke se povijaju i venu.

Na suncokretu (Slika 2.) uzrokuje 4 tipa simptoma tj. stanja: propadanje sjemena i palež klijanaca (inficirano sjeme ili napad gljivica iz tla ako nakon sjetve dođe razdoblje prohladnog i vlažnijeg vremena), korijenski tip bolesti (od početka butonizacije, venuće biljaka, nekroza prizemnog dijela, gusti bijeli micelij za vlažnog vremena, sklerocije), truljenje srednjeg dijela stabljike (od cvatnje do zriobe, tkivo potamni – bijeli micelij za vlažnog vremena, nekroza, lomljenje stabljike) te truljenje glave (krajem cvatnje na donjoj strani vlažne sivozelene pjege, tkivo razmekša i trune, između sjemenki gusti bijeli micelij i sklerocije). Čosić i sur. (2005.)



Slika 2. Micelij na stabljici suncokreta (<http://agronomija.rs/2013/bela-trulez-suncokreta-sclerotinia-sclerotiorum/>)

pratili su pojavu bolesti na stabljikama suncokreta na površinama PIK-a Vinkovci. 2001. godine *Sclerotinia sclerotiorum* bila je dominantan uzročnik bolesti na stabljikama suncokreta uslijed izrazito povoljnih vanjskih uvjeta (u lipnju palo 251 mm kiše tijekom 14 dana, a srednja mjesečna temperatura bila je 18 °C). U 2002. i 2003.

godini pojava bolesti bila je sporadična jer su izostali tako povoljni uvjeti za njen razvoj. Na osnovu trogodišnjih istraživanja autori su zaključili da su *S. sclerotiorum* i *P. helianthi* bili najznačajniji paraziti stabljika suncokreta.

Vratarić i Sudarić (2009.) navode da su na soji najznačajnije mikoze plamenjača soje (*Peronospora manshurica*), bijela trulež korijena i stabljike soje (*Sclerotinia sclerotiorum*) te *Diaporthe/Phomopsis* kompleks. *S. sclerotiorum* je sve više prisutna u Hrvatskoj i predstavlja potencijalno jednog od najagresivnijih patogena na soji, posebno u kišnim godinama. Štete su značajno veće ako do zaraze dođe u ranijoj fazi razvoja biljaka soje.

Sklerocije (Slika 3.) *S. sclerotiorum* kompaktne su nakupine pseudoparenhima gljive oko kojeg se stvara tvrda i čvrsta kora, a gljivi služe za preživljavanje te neizravno za razmnožavanje (Ivić, 2016.). Nakon formiranja putem biljnih ostataka dospijevaju na tlo ili u tlo. Ivić (2016.) navodi da u većini tala preživljavaju tri do osam godina, no nakon treće godine bez biljaka domaćina njihov broj izrazito pada. Broj sklerocija po jedinici površine ili kilogramu tla može biti vrlo različit, ponajviše ovisno o kulturi koja se prethodno uzgajala. Na preživljavanje sklerocija u tlu manje utječu vlaga i temperatura, a jače mikroorganizmi tla te je poznato više od 30 vrsta bakterija i gljiva koje su kolonizatori, antagonisti ili mikoparaziti sklerocija *S. sclerotiorum*, što se danas nastoji iskoristiti u biološkoj zaštiti od bijele truleži (Ivić, 2016.). Vitalnost sklerocija



Slika 3. Sklerocije u stabljici suncokreta

([http://www.pisvojevodina.com/RegionKI/Lists/Photos/Slike%202014/Suncokret/\\_w/sklerocije%201.JPG.jpg](http://www.pisvojevodina.com/RegionKI/Lists/Photos/Slike%202014/Suncokret/_w/sklerocije%201.JPG.jpg))

je vrlo velika posebno ako su na povoljnoj dubini u tlu kada mogu biti vitalne i preko tri godine (Hoes i Huang, 1975.). Sklerocije koje su dublje u tlu dugovječnije su u odnosu na sklerocije koje se nalaze pliće u tlu. Dubina od 10-30 cm povoljnija je za vitalnost sklerocija od dubine od 5 cm (Ćosić i sur., 2012.). Sklerocije *S. sclerotiorum* mogu ostati vitalne i više od osam godina te služe za održavanje gljive u tlu.



Sklerocije kliju u micelij ili generativno u apotecij s askusima i askosporama. Optimum za generativno klijanje je 10-20°C. Ivić (2016.) navodi da se apoteciji *S. sclerotiorum* stvaraju na sklerocijima koji se nalaze u tlu do pet centimetara dubine, onda kada je tlo zasićeno vlagom, a temperatura tla između 10 °C i 22 °C, dok su optimalne temperature za stvaranje apotecija od 12 °C do 15 °C. Temperatura najčešće nije ograničavajući čimbenik za stvaranje apotecija, no zato vlažnost tla ima veći utjecaj te da bi došlo do formiranja apotecija vlažnost tla treba biti blizu saturacije tijekom 7 do 14 dana. Za klijanje askospora i infekciju potrebna je slobodna voda ili visoka vlaga na površini biljnog tkiva i to 48 do 72h te dodatni izvor energije poput mrtvog tkiva u ranama, polena, odumrlih dijelova cvijeta i sl. uz temperaturu 18 do 26 °C (Jurković i Čosić, 2004.). Askospore kliju u prisutnosti vode ili pri relativnoj vlažnosti zraka višoj od 98 %, a zaraza se može razviti u širokom rasponu temperatura, od 5 °C do 30 °C, a temperature od 15 °C do 25 °C smatraju se optimalnima (Ivić, 2016.). Oslobođanje askospora iz askusa odvija se 20 do 40 dana nakon formiranja, a šire se zračnim strujanjima te tako dolaze na površinu domaćina (Čosić i sur. 2005.). Vitalnost askospora je vrlo velika te pri niskoj vlazi i 19-24 °C ostaju klijave oko 45 dana, a na 5-7°C i nekoliko mjeseci.

Glavne mjere zaštite od ove bolesti su agrotehničke: višegodišnji plodored (3-8 godina ovisno o intenzitetu zaraze), sjetva zdravog i dezinficiranog sjemena, tolerantni hibridi, uništavanje samoniklog suncokreta, soje, uljane repice i korova domaćina, izbjegavanje sjetve u blizini površina na kojima su u prošloj godini bile biljke podložne zarazi ovim uzročnikom bolesti (Jurković i Čosić, 2004.). Kemijska zaštita rajčice protiv bijele truleži olakšana je i zato što su ista sredstva (aktivne tvari) djelotvorna na bijelu trulež i na sivu plijesan (*Botrytis cinerea*), a siva plijesan općenito je štetnija, važnija i češća bolest rajčice, naročito u uzgoju u zaštićenim prostorima (Ivić, 2016.).

Različiti čimbenici utječu na razvoj *S. sclerotiorum* u laboratorijskim uvjetima. Gljiva na hranjivim podlogama stvara bijeli micelij te crne sklerocije kao i u poljskim uvjetima na napadnutim biljnim organima. Porast i izgled micelija te sve karakteristike sklerocija (razvoj, razmještaj, boja i veličina) mogu značajno ovisiti o vrsti podloge, temperaturi, pH vrijednosti te samom izolatu *S. sclerotiorum*. Micelij *S. sclerotiorum* izoliran iz rajčice, patlidžana, paprike i krumpira na PDA podlozi je bijele do sive boje (Kim i Cho, 2003.). Minimalna temperatura za razvoj micelija iznosi 1 °C, a maksimalna 30 °C, dok se optimalna temperatura kreće od 22 do 24 °C. Gljivu se vrlo lako izolira na svim podlogama, jednostavna je za determinaciju, a raste i razvija se na temperaturi 1 do 30 °C dok je optimalna temperatura za razvoj 24 °C (Vratarić i Sudarić, 2009.).

Sklerociji su crne boje, najčešće okruglasti ili cilindrični, no mogu biti i drugih, vrlo nepravilnih oblika. Oblik sklerocija često ovisi o domaćinu iz kojeg je patogen izoliran. Razvoj micelija i sklerocija na podlogama ovisi i o pH vrijednosti pa je u neutralnoj ili alkalnoj sredini razvoj sklerocija inhibiran. Coung i Dohroo (2006.) navode da je najbolji razvoj micelija i sklerocija pri vrijednosti pH 5, dok na pH 7,5-8 uopće nije došlo do njihova formiranja.

Mikić i sur. (2014.) istraživali su utjecaj hranjive podloge (krumpir dekstrozni agar (PDA) i podloga od mrkve) i temperature (15, 22 i 30 °C) na rast i razvoj micelija i formiranje sklerocija gljive *Sclerotinia sclerotiorum*. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima 2013. godine. Statističkom obradom podataka utvrdili su da podloga i temperatura značajno utječu na porast micelija i formiranje sklerocija. Statistički značajno bolji razvoj micelija ostvaren je na PDA podlozi te na temperaturama 15 i 20 °C, u odnosu na drugi ispitivani supstrat (mrkva) i temperaturu 30 °C. Sklerociji su se formirali samo na PDA podlozi i na dvije niže temperature, a sklerociji formirani na 15 °C bili su veći od sklerocija formiranih na 20 °C.

Na PDA podlozi optimalna temperatura za razvoj micelija *S. sclerotiorum* kreće se od 20 do 25 °C (Spotts i Cervantes, 1996., Jeon i sur., 2006.). Na višim temperaturama (30°C) ne dolazi do formiranja micelija ili je porast značajno slabiji. Kim i Cho (2003.) navode da je minimalna temperatura za formiranje micelija 1°C.

Pri laboratorijskim istraživanjima sklerociji se najčešće formiraju na marginama kolonije (Kohn, 1979.). Prema Humpherson-Jonesu i Cookeu (1977.) uz najčešći raspored na marginama, u kulturi se sklerociji mogu stvarati i u nizovima koncentričnih krugova ili nekom drugom nepravilnom rasporedu. Na 30 °C nema njihovoga razvoja. Adams i Tate (1976.) navode da je optimalna temperatura za formiranje sklerocija između 15 i 25 °C, a općenito do njihova formiranja dolazi u širokom temperaturnom rasponu od 0 do 30 °C. Sklerocije formirane na nižoj temperaturi općenito su krupnije od sklerocija razvijenih na višoj temperaturi. Kohn (1979.) navodi da kulture *S. sclerotiorum* uzgajane na PDA podlozi pri temperaturi 15-20°C kontinuirano proizvode krupnije sklerocije. Purdy i Grogan (1954.) pak navode da se najveće sklerocije formiraju pri temperaturi 25°C.

## 2.2. *Botrytis cinerea* Pers.

Nespolni (anamorfni) *Botrytis cinerea* Pers. i spolni (telemorfni) *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel su stadiji u životnom ciklusu iste fitopatogene gljive. Ainsworth (1971.) navodi da se kao pripadnik roda *Botrytis* gljiva svrstava u pododjel *Deuteromycota*, razred *Hyphomycetes*, porodicu *Moniliaceae*, a prema spolnom stadiju, kojemu mnogi taksonomi daju prednost, u pododjel *Ascomycota*, razred *Discomycetes*, porodicu *Sclerotiniaceae*. Nespolni stadij je dominantan i ima važnu ulogu u epidemiologiji gljive, a spolni stadij u prirodi je rijedak i nema važnu ulogu u životnom ciklusu gljive.

*Botrytis cinerea* Pers. uzročnik je sive plijesni – sivkasto smečkastog micelija s konidioforima i konidijama na zaraženom biljnom tkivu. Fakultativni je parazit i polifag te zaražava veliki



Slika 4. *B. cinerea* na jagodama (<http://grama.com.hr/bolesti-jagoda>)

broj biljnih vrsta. Prema Jarvisu (1977.) ima više od 200 biljnih domaćina. Radman (1978.) navodi da je polifagnost diferencijacija brojnih formi i biotipova unutar vrste koji su prilagođeni vrstama biljaka koje su vrlo udaljene po botaničkoj sistematici. Javlja se na svim kontinentima i u širokom rasponu klimatskih

uvjeta no najviše u umjerenom klimatu. Napada biljke u polju i u zaštićenim prostorima. Domaćini su joj povrtna kultura (luk, krastavci, rajčica, grašak, špinat, paprika, kupus, grah, bundeve...), ratarske kulture (soja, uljana repica, suncokret, duhan...) te plodovi voćaka (jagode (Slika 4.), kupine, maline...) i posebno bobice vinove loze. Najčešća je i najopasnija bolest mnogih od gore navedenih kultura posebno ukoliko pred kraj vegetacije ili u berbi padne veća količina kiše što može smanjiti prinos i do 50%. Osim šteta tijekom vegetacije uzrokuje i štete nakon berbe te tijekom skladištenja i transporta.

Na suncokretu se javlja u gotovo svim uzgojnim područjima, posebno u izrazito kišnim godinama u drugom dijelu vegetacije, iako suncokret može biti inficiran tijekom cijele vegetacije. Intenzitet napada ovisi o tolerantnosti domaćina, oborinama, relativnoj vlaži zraka i temperaturi. Zaražava lišće, peteljke, stabljiku i glave suncokreta te uzrokuje palež klijanaca i propadanje mladih biljaka. Simptomi su tamne pjege koje nakon 5 do 6 dana prekrije gusta siva prevlaka koja je siguran dijagnostički znak i bez laboratorijskih ispitivanja. Napadnuta tkiva omekšaju, lišće i peteljke posljedično venu, a stabljike se mogu polomiti. Glave suncokreta inficirane su sa donje strane obično uz rub. Pri ranijoj zarazi te vlažnom i toplom vremenu glave se raspadaju, a sjeme je gotovo u potpunosti inficirano. Na sivom višestaničnom miceliju u tami uz visoku vlagu nastaju sivi konidiofori s obiljem konidija koje zračne struje prenose na velike udaljenosti.

Na vinovoj lozi uzrokuje izravne (smanjenje prinosa) i neizravne štete (slabija kakvoća vina). Zaražava listove, mladice, peteljkovinu, cvat i bobice (Slika 5.). Na listovima se pojavi žućkasta pjega. Na mladicama izaziva trulež vršnog dijela, a kod napada na peteljke otpada dio ili cijeli cvat. Bobe su najčešće zaražene pred zriobu (posmeđe, a za vlažnog vremena prekrije ih prevlaka konidiofora i konidija), a rijetko zelene. Zelene bobice imaju hidrofobnu voštanu prevlaku na kojoj se vlaga teško zadržava, a kako rastu voštana prevlaka postaje sve tanja i



Slika 5. Simptomi *B. cinerea* na bobicama (<https://www.syngenta.hr/news/vinova-loza/siva-plijesan-trulez-grozda-botryotinia-fuckeliana-botrytis-cinerea>)

isprekidana. Napad započinje u precvjetavanju kada gljiva živi saprofitski na ostacima cvjetova i ne pričinjava štetu. Tada treba početi sa suzbijanjem. U fazi zelene ili kisele plijesni dolazi do zaraze peteljki i bobica (smežuraju se i osuše). Zatim dolazi do stvaranja velikog broja konidija i prelaska u fazu sive plijesni u užem smislu. Spore kličaju u širokom rasponu temperatura s optimumom od 20 - 23 °C. Međutim, za infekcije je ipak presudna dužina vlaženja organa loze. Nakon odumiranja zaraženih biljnih dijelova živi kao saprofit. U vinogradu se nalazi na rozgvi, ispod kore u formi micelija ili sklerocija, osušenim listovima, rozgvi na tlu. U proljeće na tim sklerocijama nastaje veliki broj konidija. Prezimljuje i u pupovima, tako da u proljeće postoji obilan izvor zaraze. Ukoliko u jesen temperature budu visoke, a relativna vlaga zraka niska, micelij se razvije samo u pokožici i ne prodire dublje u plod, pokožica je dezorganizirana pa voda jače isparava, a bobice se smežuraju. Gljiva se zbog niske vlage ne umnaža, a za ishranu koristi više kiseline i manje šećera zbog čega vino kasnije dobije posebnu aromu uz visoku koncentraciju šećera (plemenita plijesan).

Uzročnik bolesti se može naći na odumrlim biljnim ostacima (Cvjetković, 2010.). Sklerocije u suhom biljnom tkivu mogu ostati vitalne i dvadesetak godina. Mjere zaštite su: sjetva zdravog dezinficiranog sjemena otpornijih genotipova, višegodišnji plodored, sadnja višegodišnjih nasada pravcu puhanja glavnih vjetrova, duboko zaoravanje zaraženih biljnih ostataka, uništavanje korova u usjevu i u blizini usjeva te primjena kemijskih sredstava koja se mogu koristiti i preventivno i kurativno (na većini kultura). Genetska varijabilnost i mnoštvo biotipova *B. cinerea* otežavaju i smanjuju djelotvornost kemijskih mjera borbe, posebice uslijed razvitka biotipova otpornih na većinu sredstava sintetiziranih i korištenih u posljednjih 20 godina (Fernandez i sur., 2014.)

Za razvoj ove gljive potrebna je visoka relativna vlažnost zraka i temperatura između 2 i 35 °C (optimum 20 do 25 °C). Svjetlost (može kličati i u tami ali puno slabije), kiselost sredine i starost konidija uz visoku relativnu vlagu zraka i temperaturu utječu na razvoj bolesti. Fernandez i sur. (2014.) navode da su optimalni uvjeti za razvoj *B. cinerea* 15-25 °C i relativna vlažnost zraka viša od 95 % no gljiva se razvija i pri nižim temperaturama obzirom da do klijanja konidija i rasta micelija može doći i kod 0 °C. Cvjetković (2010.) navodi da su optimalne temperature za klijanje spora 20 do 23 °C, a za rast i razvoj micelija između 20 i 22 °C. Radman (1978.) navodi da mnogo konidija sposobnih izvršiti infekciju nastaje već kod temperatura od 1 do 3 °C (optimum je između 20 i 30 °C uz 100% vlagu zraka). Williamson i sur. (1994.) navode da ukoliko nije prisutna slobodna voda, za klijanje konidija relativna vlaga zraka treba biti 100%. Klijanje konidija pri visokoj relativnoj vlazi zraka (preko 95%) moguće je uslijed kondenzacije

vode na okolnim površinama. Konidije kliju u kapima vode ili pri RVZ većoj od 90% u širokom temperaturnom rasponu 2-41 °C, a optimum je 20-25 °C.

Istraživanja Fernandez i sur. (2014.) u laboratorijskim uvjetima su pokazala da je najveći porast micelija nakon 7 dana na PDA podlozi zabilježen pri 28 °C, zatim pri 12 °C i najmanji pri 4 °C, a u istraživanje su uvrstili samo te 3 temperature. Van den Berg i Lentz (1968.) utvrdili su da vitalnost i rast *B. cinerea* ovise o relativnoj vlažnosti zraka, temperaturi i izolatu odnosno patotipu. U odsustvu hranjivih tvari vitalnost micelija je varirala od 12 mjeseci pri 95-100 % vlage i 0 °C do manje od mjesec dana pri vlazi manjoj od 95 % i 20 °C ovisno o izolatu. Uz prisustvo hranjivih tvari rast se javljao samo iznad 93 % vlažnosti, a ispod toga rasta nije bilo i micelij bi preživio ispod mjesec dana. Maksimalan rast zabilježen je pri 20 °C. Utvrđeno je da micelij gljive *B. cinerea* preživljava u uvjetima skladištenja povrća, a *S. sclerotiorum* najčešće ne preživi iste uvjete.

### 2.3. *Chalara elegans* Nag Ray&Kendr.

*Chalara elegans* Nag Ray&Kendr. uzročnik je crne truleži korijena. Fakultativni je zemljišni parazit utvrđen na više od 200 vrsta biljaka, a napada biljke iz preko 15 porodica, uglavnom *Fabaceae*, *Solanaceae* i *Cucurbitaceae*. Javlja se na mnogim ukrasnim biljkama u zaštićenim prostorima, a također i na onima koje se proizvode putem presadnica. Maceljki i sur. (2004.)



Slika 6. *C. elegans* na mrkvi  
(<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Thielaviopsis+basicola>)

navode da su od povrća na zarazu najosjetljivije *Solanaceae*, a zaraza se ostvaruje u prvim stadijima vegetacije. Prema Hood i Shew (1996.) najvažnije poljoprivredne kulture domaćini ove gljive su mrkva (Slika 6.), grah, duhan, pamuk, kikiriki i maćuhice. Cvjetković i sur. (2016.) utvrđuju prve nalaze *Thielaviopsis basicola* na matovilcu i *Pythium* vrste na salati u hidroponskom uzgoju u Hrvatskoj.

Cvjetković i sur. (2016.) navode da je *T. basicola* tipični „soil-borne“ patogen, koji prezimljuje u vidu hlamidospora i do nekoliko godina. Zrele hlamidospore fragmentiraju se na pojedinačne stanice koje su sposobne klijati i direktnim prodorom inficirati tkivo

domaćina ili putem prirodnih otvora i rana (Shew i Lucas, 1991). Uz hlamidospore, stvara mnoštvo endokonidija različitih dimenzija. Konidije se šire vodom ili zaraženim presadnicama, odnosno kontaktom zdravog i zaraženog korijenja ili supstrata za uzgoj. Prema Maceljskom i sur. (2004.) hlamidospore *C. elegans* zadržavaju sposobnost infekcije 4-5 godina i primarni su izvor zaraze, a za vrijeme vegetacije gljiva se širi konidijama.

Bolest se u kljاليštima javlja u manjim ili većim oazama (Maceljski i sur., 2004.). Uzrokuje truljenje korijena (Slika 7.), a po crnoj boji često se naziva i crna trulež žila. Zaraženi dijelovi korijena su oštro odijeljeni od zdravih dijelova, a zaraza najčešće kreće od središnjih dijelova odakle se širi u svim pravcima dok cijeli korijen ne propadne (Ward i sur., 2012.).



Slika 7. Korijen duhana zaražen *C. elegans*  
(<http://ephytia.inra.fr/en/C/10756/Tobacco-Fungi-and-related-micro-organisms>)

zaraze dođe u kasnijim stadijima razvoja, zaražene budu samo pojedinačne žile koje se mijenjaju novima tako da je utjecaj *C. elegans* minimalan (Josifović, 1956.). Walker (2008.) kao simptome na nadzemnim dijelovima navodi klorozu i venuće, defolijaciju te zaostajanje u rastu i razvoju biljke. Simptomi bolesti nisu jednaki na svim vrstama i ovise o osjetljivosti, jačini napada (zaražen dio ili cijeli korijenov sustav) i sl. Što su biljke manje i korijen slabiji, štete su veće. Biljke zbog trulog korijenja zaostaju u razvoju, nadzemni dio postane klorotičan i dolazi do venuća.

Iako postoji prikladan domaćin i patogen do zaraze neće doći ukoliko okolišni uvjeti nisu odgovarajući.

Čimbenici poput vlažnosti, temperature i pH tla mogu uvelike utjecati na pojavu bolesti, a kontrolirajući ih smanjuje se ili sprječava pojava bolesti. Razvoju bolesti pogoduje veća vlažnost (70 %), temperature 13-17 °C i tlo neutralne ili blago alkalne reakcije. Bolest se razvija u temperaturnom rasponu od 12 do 23 °C, dok je optimalna temperatura za njen razvoj 17 do

23°C (Maceljčki i sur., 2004.). Kod temperatura od 26 do 30 °C i osjetljive sorte duhana postaju otporne na napad *C. elegans* (Josifović, 1956.). Intenzitet zaraze ovisi o osjetljivosti kultivara, soju *C. elegans* i količini inokuluma. Bolest može uzrokovati značajnije štete kada su biljke izložene stresu (npr. temperaturni ekstremi) dok razvoju bolesti ne pogoduje pH vrijednost supstrata ispod 5,6. U tlu se održava u obliku hlamidospora do 5 godina, a kao saprofitni micelij neograničeno. Zaraženo tlo je glavni izvor zaraze, a glavna mjera suzbijanja je izbjegavanje zemlje kao supstrata u proizvodnji presadnica, a ukoliko se koristi zemlja potrebno je obaviti dezinfekciju. Klijanje hlamidospora potiču izlučevine korijena. Crna boja korijenja može biti dijagnostički znak, no potreban je laboratorijski pregled za točno utvrđivanje dijagnoze. Često dolazi do pogrešnih dijagnoza jer se simptomi bolesti zamjene sa simptomima viška ili manjka vode, simptomima ozljeda nastalih zbog hladnoće ili previsokih temperatura ili pak sa *Rhizoctonia sp.* i *Pythium sp.*



### 3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje utjecaja temperature (10, 15, 20, 25 i 30 °C) na rast i razvoj micelija gljiva *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Chalara elegans* provedeno je u Laboratoriju za fitopatologiju Poljoprivrednoga fakulteta u Osijeku. Započeto je 17.1.2017. pripremom hranjive podloge i pribora u laboratoriju.

#### 3.1. Priprema hranjive podloge i kultura



Slika 8. PDA podloga (Foto: Luka Vranješ)

PDA (Slika 8.) je standardna podloga koja se koristi u laboratorijskim istraživanjima. Pripravljaju se na način da 42 grama gotove podloge s 3 grama čistog tehničkog agara stavljamo u Erlenmeyer tikvicu s 1 l destilirane vode. Podloga se kuha da se sadržaj dobro otopi, a nakon kuhanja mjerimo pH vrijednost. U standardnoj podlozi pH se treba kretati oko 6.5. Ukoliko pH podloge nije odgovarajući dodajemo 0,1 mol NaOH ili 0,1 mol HCl, ovisno o potrebi. Nakon toga tikvica se začepi i stavlja u autoklav. Autoklav je hermetički zatvoren uređaj za sterilizaciju vlažnom toplinom koja je određena temperaturom (121

Izolirane kulture gljiva *Sclerotinia sclerotiorum*, *Chalara elegans* i *Botrytis cinerea* uzgajane su na hranjivoj krumpirovoj podlozi (PDA – Potato Dextrose Agar) proizvođača Biolife u Petrijevim zdjelicama.

°C), tlakom vodene pare (102 Pa) i vremenom (20-40 min). Sterilizacija je proces kojim se uništavaju mikroorganizmi i njihove spore do te mjere da se ne mogu dokazati.

Agar je pripremljen prema uputama proizvođača (2-3 g tehničkog agara na 1 l vode u Erlenmeyerovu tikvicu) i kuhan otprilike pola sata do vrenja. Nakon kuhanja, tikvica je



Slika 9. Kolekcija kultura (Foto: Luka Vranješ)

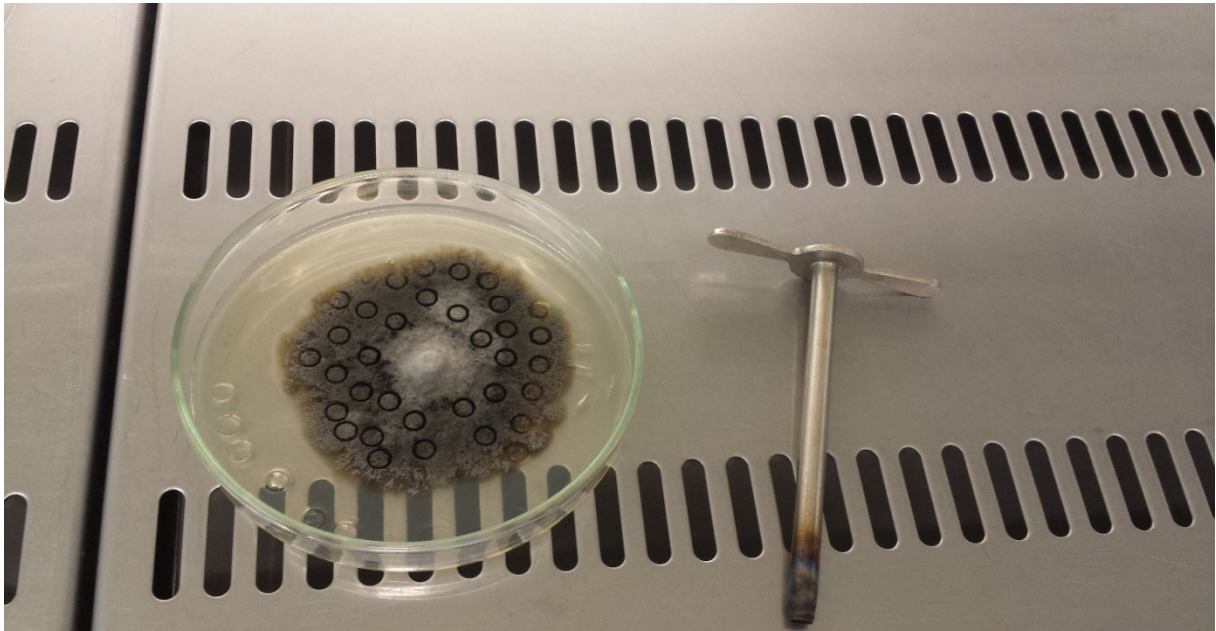
zamotana u novinski papir i stavljena u autoklav na 20 min. Tako sterilizirani agar izlili smo u Petrijeve zdjelice promjera 9 cm i stavili na hlađenje da se podloga stvrdne kako bi bila pogodna za nacjepljivanje. Dva dana kasnije koristeći čuvani materijal odnosno kolekciju kultura gljiva (Slika 9.) pristupili smo nacjepljivanju triju gljiva (*S. sclerotiorum*, *B. cinerea* i *C. elegans*) na ohlađenu hranjivu podlogu u 3 Petrijeve zdjelice (svaka gljiva u posebnu zdjelicu). Nakon toga zdjelice su ostavljene u termostatu komorama na temperaturi 20 °C kako bi do sljedećeg tjedna gljive dovoljno narasle za početak istraživanja.

### 3.2. Nacjepljivanje

Nacjepljivanje se odvijalo unutar laminarija Iskra PIO (Slika 10.) koji je prethodno dezinficiran. Laminarij je uređaj s ventilacijskim sustavom za zaštitu od kontaminacije.



Slika 10. Laminarij (Foto: Luka Vranješ)

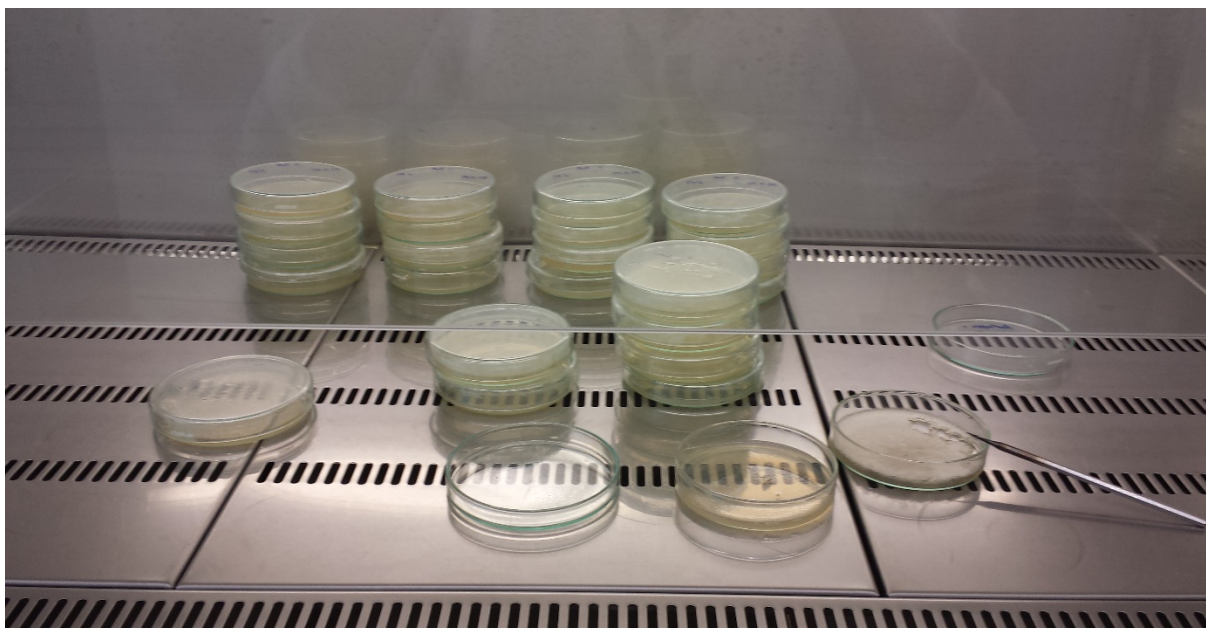


Slika 11. Kružni metalni rezač (Foto: Luka Vranješ)

U sterilnim uvjetima unutar laminarija otvorene su zdjelice s razvijenim micelijem gljiva. Pomoću kružnog metalnog rezača (Slika 11.) načinjeni su kružni isječki micelija promjera 5 mm. Metalni rezač prethodno je dezinficiran u alkoholu, a zatim i iznad otvorenog plamena. Kružni isječki (Slika 12.) gljive promjera 5 mm uzimani su pomoću sterilne igle i nasađivani na središte hranjive podloge u svaku zdjelicu. Iгла je prije uporabe dezinficirana alkoholom, a nakon toga izložena otvorenom plamenu nekoliko sekundi. Izrezani uzorak se postavlja tako da je micelij gljive okrenut prema dolje odnosno u dodiru je s podlogom kako bi gljiva brže započela sa rastom.

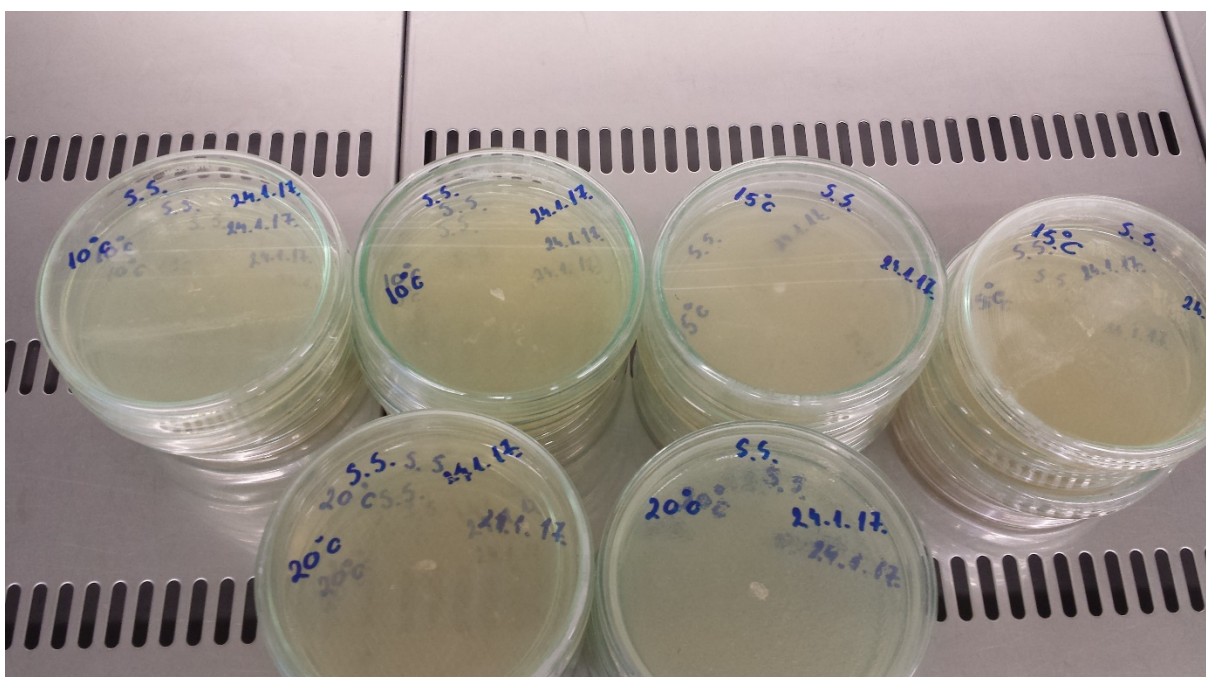


Slika 12. Kružni isječki micelija *C. elegans* (Foto: Luka Vranješ)



Slika 13. Petrijeve zdjelice prilikom naciepljivanja (Foto: Luka Vranješ)

Petrieve zdjelice su inkubirane na pet različitih temperatura i to 10, 15, 20, 25 i 30 °C. Za svaku temperaturu naciepljeno je 8 Petrijevih zdjelica (4 ponavljanja s dvije zdjelice) po gljivi (Slika 13.) što zajedno iznosi 40 zdjelica za svaku gljivu (Slika 14.) odnosno ukupno 120 zdjelica za tri gljive. Razvoj micelija gljiva mjereno je 3., 7., 10. i 14. dan od naciepljivanja, a za *Chalara elegans* uslijed sporijeg rasta i 17. dan. Mjeren je njihov promjer na 2 unakrsna mjesta i srednja vrijednost uzimana je kao reprezentativni pokazatelj razvoja.



Slika 14. Zdjelice nakon naciepljivanja sa *S. sclerotiorum* (Foto: Luka Vranješ)

## 4. REZULTATI

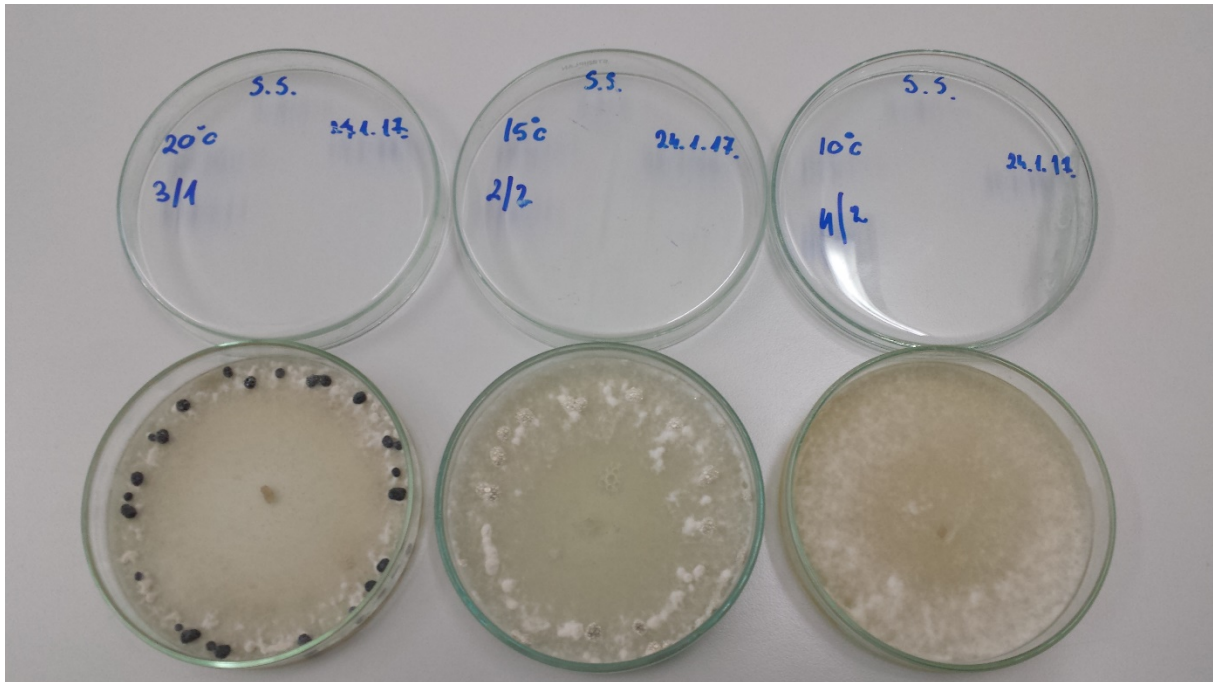
### 4.1. *Sclerotinia sclerotiorum*

Tablica 1. Utjecaj temperature na razvoj micelija *S. sclerotiorum*

| Temperatura<br>(°C) | Promjer micelija (mm) |          |             |              |
|---------------------|-----------------------|----------|-------------|--------------|
|                     | 3. dan                | 7. dan   | 10. dan     | 14. dan      |
| 10                  | 30.75                 | 90       | 90          | 90           |
| 15                  | 30.94                 | 90       | 90          | 90           |
| 20                  | 90                    | 90       | 90          | 90           |
| 25                  | 63.25                 | 90       | 90          | 90           |
| 30                  | 0                     | 5        | 26.88       | 42.88        |
| <b>LSD 0.05</b>     | <b>5.17</b>           | <b>0</b> | <b>5.68</b> | <b>8.67</b>  |
| <b>0.01</b>         | <b>7.15</b>           | <b>0</b> | <b>7.86</b> | <b>11.99</b> |

*Sclerotinia sclerotiorum* 3 dana nakon naciepljivanja na hranjivu podlogu pokazala je statistički vrlo značajno bolji rast pri temperaturi 20 °C te je već trećega dana do rubova ispunila sve Petrijeve zdjelice promjera 90 mm (Tablica 1). Pri temperaturi 30 °C rast nije zabilježen, a pri 25 °C bio je statistički vrlo značajno bolji od rasta na 10 i 15 °C. Već sedmoga dana na svim temperaturama izuzev 30 °C (porast statistički vrlo značajno slabiji) micelij je prerastao zdjelice. Drastično zaostajanje u razvoju micelija pri 30 °C nastavljeno je i 10-og i 14-og dana i u oba slučaja razvoj je bio statistički vrlo značajno slabiji u odnosu na ostale temperature.

Formiranje sklerocija bilo je najbrže pri 20 °C gdje su se već 7-og dana od naciepljivanja sklerocije crne boje potpuno formirale. Istoga dana pristupili smo njihovom vaganju i ustanovili da je prosječna težina sklerocija nakon 7 dana pri 20 °C bila 0.94 g. Sklerocije bijele boje,



Slika 15. *S. sclerotiorum* nakon 7 dana (Foto: Luka Vranješ)

gotovo formirane, bile su vidljive uz poneku potpuno formiranu sklerociju u zdjelicama na temperaturi od 15 °C. Pri 10 °C samo u pojedinim ponavljanjima započeto je njihovo formiranje, a pri 25 °C formiranja sklerocija nije bilo. Sklerocije su u svim slučajevima formirane uz rubove zdjelica u kružnom rasporedu (Slika 15.).



Slika 16. Vaganje sklerocija (Foto: Luka Vranješ)

Ni nakon 10 dana nije započelo formiranje sklerocija pri 25 °C, a pri 10 °C bile su formirane no i dalje bijele boje. Istoga 10-og dana potpuno formirane crne sklerocije s micelija držanog na 15 °C izvagali smo (Slika 16.) i dobili prosječnu težinu od 1.4 g.

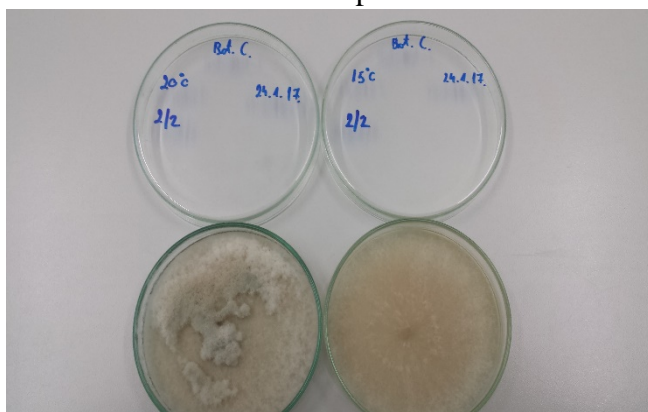
14-og dana sklerocije pri 25 °C i dalje nisu započele s formiranjem, a pri 10 °C su se potpuno formirale i pocrnile te je njihova težina iznosila 1.5 g. Na 30 °C, obzirom na statistički vrlo značajno slabiji rast i razvoj micelija, nije došlo do početka formiranja sklerocija ni nakon 14 dana.

## 4.2. *Botrytis cinerea*

Tablica 2. Utjecaj temperature na razvoj micelija *Botrytis cinerea*

| Temperatura<br>(°C) | Promjer micelija (mm) |             |          |             |
|---------------------|-----------------------|-------------|----------|-------------|
|                     | 3. dan                | 7. dan      | 10. dan  | 14. dan     |
| 10                  | 22.81                 | 72.5        | 90       | 90          |
| 15                  | 24.19                 | 90          | 90       | 90          |
| 20                  | 54.25                 | 90          | 90       | 90          |
| 25                  | 36.13                 | 90          | 90       | 90          |
| 30                  | 0                     | 0           | 0        | 5.44        |
| <b>LSD 0.05</b>     | <b>3.81</b>           | <b>4.55</b> | <b>0</b> | <b>0.7</b>  |
| <b>0.01</b>         | <b>5.27</b>           | <b>6.29</b> | <b>0</b> | <b>0.97</b> |

*Botrytis cinerea* nakon 3 dana imao je statistički vrlo značajno bolji rast pri 20 °C u odnosu na druge temperature, a pri 25 °C statistički vrlo značajno bolji rast u odnosu na 10 i 15 °C (Tablica 2). Na 30 °C rast nije zabilježen sve do 14-og dana, a i tada je bio statistički vrlo značajno slabiji u odnosu na sve ostale temperature. Nakon 7 dana micelij je prerastao zdjelice na 15, 20 i 25



Slika 17. Micelij *B. cinerea* nakon 7 dana (Foto: Luka Vranješ)

°C gdje je rast bio statistički vrlo značajno bolji u odnosu na 10 °C, no razlike u volumenu i izgledu micelija bile su vidljive (Slika 17.). 10-og dana i micelij gljive pri 10 °C prerastao je zdjelicu.

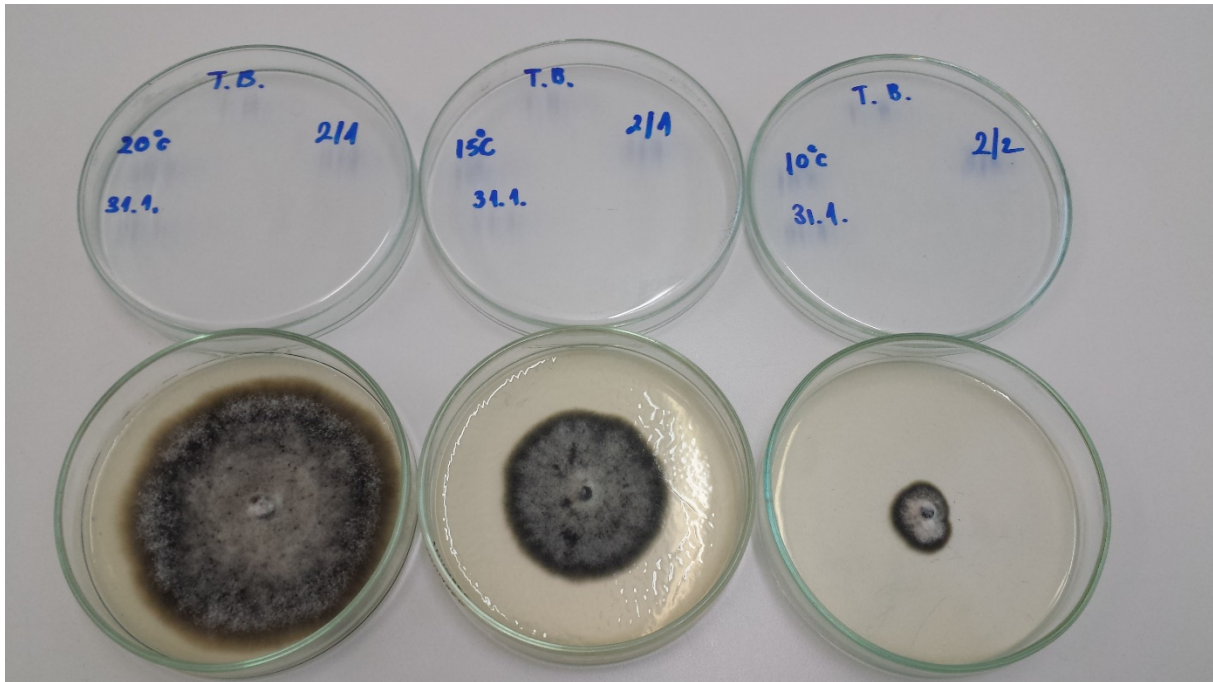
### 4.3. *Chalara elegans*

Tablica 3. Utjecaj temperature na razvoj micelija *Chalara elegans*

| Temperatura<br>(°C) | Promjer micelija (mm) |             |             |              |              |
|---------------------|-----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
|                     | 3. dan                | 7. dan      | 10. dan     | 14. dan      | 17. dan      |
| 10                  | 0                     | 8.13        | 10.88       | 17.88        | 19.06        |
| 15                  | 0                     | 20.56       | 27.81       | 39.44        | 47.88        |
| 20                  | 11.06                 | 29.75       | 40.81       | 58.5         | 73.5         |
| 25                  | 12.06                 | 28.75       | 37.38       | 43           | 52.06        |
| 30                  | 6.94                  | 20          | 29.38       | 42.31        | 51.56        |
| <b>LSD 0.05</b>     | <b>1.58</b>           | <b>3.73</b> | <b>6.89</b> | <b>11.34</b> | <b>9.44</b>  |
| <b>0.01</b>         | <b>2.19</b>           | <b>5.16</b> | <b>9.54</b> | <b>15.69</b> | <b>13.05</b> |

*Chalara elegans* je nakon 3 dana najbolje rasla na 20 i 25 °C dok na 10 i 15 °C rast nije zabilježen, a pri 30 °C je bio statistički značajno slabiji (Tablica 3). 7-og dana rast je zabilježen na svim temperaturama no pri 10, 15 i 30 °C bio je statistički značajno slabiji, a isti trend zadržan je i 10-og dana.

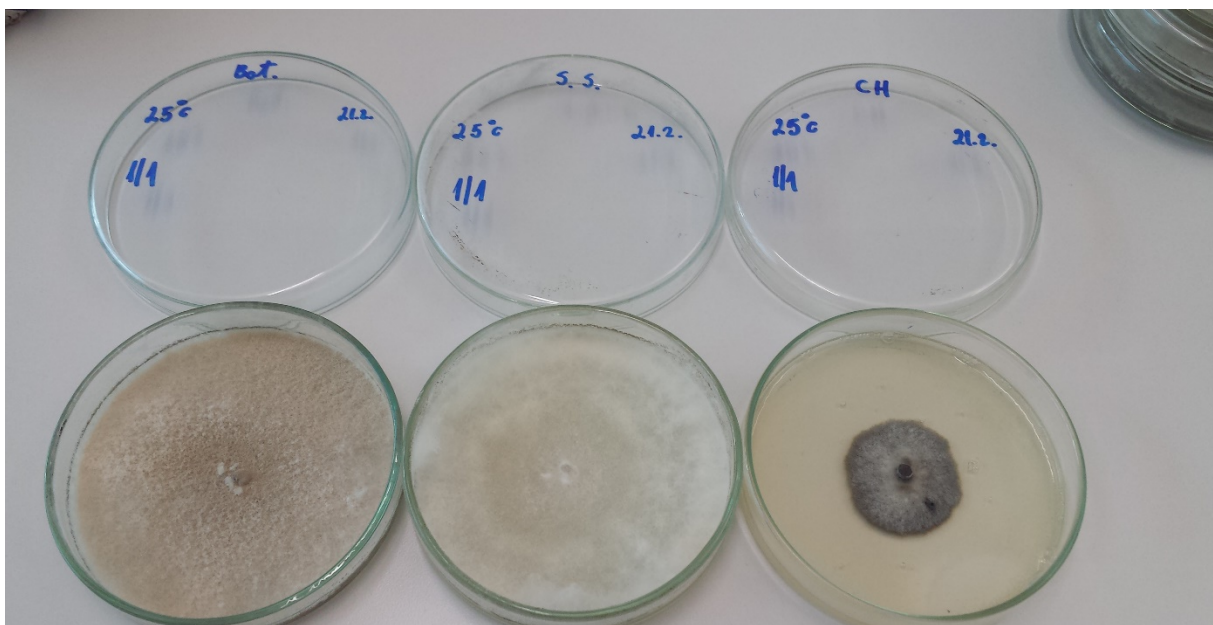




Slika 18. *C. elegans* nakon 17 dana (Foto: Luka Vranješ)

14 dana od naciepljivanja micelij pri temperaturi od 20 °C pokazao je statistički vrlo značajno bolji rast u odnosu na 10, 15 i 30 °C, a značajno bolji rast u odnosu na 25 °C. 17-og dana pokazalo se da je rast najbolji na 20 °C (Slika 18.) jer je bio statistički vrlo značajno bolji od rasta na svim ostalim temperaturama.

Obzirom na znatno sporiji rast i razvoj micelija gljive *Chalara elegans* u odnosu na *S. sclerotiorum* i *B. cinerea* (Slika 19.) na svim temperaturama, njen razvoj praćen je 3 dana duže, no ni nakon tog 17-og dana ni u jednom ponavljanju pri niti jednoj od temperatura nije došlo do prerastanja Petrijeve zdjelice.



Slika 19. Usporedba nakon 7 dana (Foto: Luka Vranješ)

## 5. RASPRAVA

*S. sclerotiorum* razvija se u širokom temperaturnom rasponu. Prema Iviću (2016.) to znači 5 do 30 °C, a optimum je 15 do 25 °C. Istražujući njen razvoj na ovih 5 temperatura (10, 15, 20, 25 i 30 °C) dobili smo rezultate koji su sukladni dostupnoj literaturi. Naime, prema našem istraživanju micelij gljive najbolje i najbrže se razvijao pri 20 °C (već nakon 3 dana prerastao 90 mm), a zatim pri 25 °C. Kim i Cho (2003.) navode da je micelij *S. sclerotiorum* izoliran iz rajčice, patlidžana, paprike i krumpira na PDA podlozi bijele do sive boje, a tako je bilo i u našem istraživanju. Gljivu se lako izolira na svim podlogama, jednostavna je za determinaciju, a raste i razvija se na temperaturi 1 do 30 °C dok je optimum 24 °C (Vratarić i Sudarić, 2009.), s čime se naši rezultati uglavnom poklapaju. Mikić i sur. (2014.) utvrdili su da je bolji razvoj micelija ostvaren na PDA podlozi pri 15 i 20 °C, u odnosu na drugi supstrat i 30 °C što je gotovo identično našim rezultatima obzirom da smo trećeg dana zabilježili najbrži rast pri 20 i 25 °C, a 7-og dana micelij je prerastao zdjelice i pri 10 i 15 °C te pokazao širok temperaturni raspon u kojemu se razvija ova gljiva. Naš je zaključak da se na PDA podlozi optimalna temperatura za razvoj micelija *S. sclerotiorum* kreće od 20 do 25 °C što se slaže i s navodima drugih autora (Spotts i Cervantes, 1996., Jeon i sur., 2006. itd.). Kim i Cho (2003.) navode da je minimalna temperatura za formiranje micelija 1 °C. Nakon 3 dana u našem istraživanju pri 30 °C rasta micelija nije bilo, na 20 °C bio je najveći rast, a pri 25 °C značajno jači u odnosu na 10 i 15 °C, no već sedmoga dana i na 10, 15 i 25 °C micelij je prerastao zdjelice. Drastično zaostajanje u razvoju micelija pri 30 °C nastavljeno je i 10-og i 14-og dana u odnosu na ostale temperature što se također slaže sa gore navedenom literaturom i rezultatima drugih.

Formiranje sklerocija bilo je najbrže pri 20 °C gdje su se već 7-og dana formirale crne sklerocije čija je prosječna težina bila 0.94 g. Sklerocije su formirane uz rubove zdjelica, tj. na marginama kolonije u kružnom rasporedu (Slika ), a takav raspored navode i drugi autori (Kohn, 1979.). Adams i Tate (1976.) navode da do njihova formiranja dolazi pri 0 do 30 °C, a optimum je 15 do 25 °C, a Purdy (1954.) navodi da se najveće sklerocije formiraju pri temperaturi 25 °C, no u našem istraživanju ni nakon 14 dana sklerocije nisu počele s formiranjem pri 25 °C te se naši rezultati ne slažu s navedenim rezultatima. Nakon 10 dana potpuno su formirane crne sklerocije pri 15 °C, a njihova težina bila je 1.4 g. Mikić i sur. (2014.) navode da su sklerociji formirani na 15 °C bili veći od sklerocija formiranih na 20 °C, a to se potvrdilo i u našem istraživanju (20 °C – 0.94 g., 15 °C – 1.4 g.). Kohn (1979.) navodi da kulture *S. sclerotiorum* uzgajane na PDA podlozi pri temperaturi 15-20 °C kontinuirano proizvode krupnije sklerocije, no u našem

slučaju 14-og dana pri 10 °C sklerocije su se potpuno formirale i težile 1.5 g., što je znatno teže od onih formiranih pri 20 °C (0.94. g.) te se ne slaže sa Kohnovim zaključkom. Na 30 °C, obzirom na statistički vrlo značajno slabiji rast i razvoj micelija, nije došlo do početka formiranja sklerocija ni nakon 14 dana.

Za razvoj *B. cinerea* potrebna je visoka relativna vlažnost zraka i temperatura 2-35 °C (optimum 20-25 °C). Fernandez i sur. (2014.) navode da su optimalni uvjeti za razvoj *B. cinerea* 15-25 °C i relativna vlažnost zraka viša od 95 %, a Cvjetković (2010.) navodi da su optimalne temperature za rast i razvoj micelija 20-22 °C. Van den Berg i sur. (1968.) utvrdili su maksimalan rast *B. cinerea* pri 20 °C. Naši rezultati sukladni su gore navedenim istraživanjima i potvrđuju iste rezultate. Naime, *Botrytis cinerea* nakon 3 dana pokazao je statistički vrlo značajno bolji rast pri 20 °C u odnosu na sve druge temperature, a pri 25 °C statistički vrlo značajno bolji rast u odnosu na 10 i 15 °C (Tablica 2). Na 30 °C rast nije zabilježen sve do 14-og dana, a i tada je bio statistički vrlo značajno slabiji u odnosu na sve ostale temperature. Nakon 7 dana micelij je prerastao zdjelice na 15, 20 i 25 °C gdje je rast bio statistički vrlo značajno bolji u odnosu na 10 °C. 10-og dana i micelij gljive pri 10 °C prerastao je zdjelicu. Fernandez i sur. (2014.) zabilježili su najveći porast micelija nakon 7 dana na PDA podlozi pri 28 °C, zatim pri 12 °C i najmanji pri 4 °C, što je unatoč različitim ispitivanim temperaturama, na tragu naših rezultata pri nižoj temperaturi, no u suprotnosti sa našim rezultatom pri višoj temperaturi.

Razvoju *C. elegans* pogoduje temperaturni raspon od 12-23 °C, a optimalna temperatura za njen razvoj je 17-23 °C (Maceljski i sur., 2004.). U našem istraživanju nakon 3 dana najbolje je rasla na 20 i 25 °C, dok na 10 i 15 °C rast nije zabilježen, a pri 30 °C bio je statistički značajno slabiji (Tablica 3). 7-og dana rast je zabilježen na svim temperaturama no pri 10, 15 i 30 °C bio je statistički značajno slabiji, a isti trend zadržan je i 10-og dana. Nakon 14 dana micelij je pri temperaturi od 20 °C pokazao statistički vrlo značajno bolji rast u odnosu na 10, 15 i 30 °C, a značajno bolji rast u odnosu na 25 °C. 17-og dana rast je na 20 °C (Slika ) bio statistički vrlo značajno bolji od rasta na svim ostalim temperaturama. Ni nakon 17 dana ni u jednom ponavljanju pri niti jednoj od temperatura nije došlo do prerastanja Petrijeve zdjelice, no micelij pri 30 °C (51.56 mm) na kraju je rastom prestigao micelij pri 25 °C (48.31 mm) što djelomično odudara od ranijih istraživanja i literature (Maceljski i sur., 2004., Josifović, 1956.) koja tako visoke temperature ne ubraja u pogodne za razvoj *C. elegans*.

## 6. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je istražiti utjecaj različitih temperatura (10, 15, 20, 25 i 30 °C) na rast tri fitopatogene gljive, *Botrytis cinerea* Pers. (uzročnik sive plijesni), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (uzročnik bijele truleži) i *Chalara elegans* Nag Ray et Kendr. (uzročnik crne truleži korijena) na hranjivoj PDA podlozi. U našem istraživanju došli smo do slijedećih zaključaka.

*Sclerotinia sclerotiorum* razvija se u širokom temperaturnom rasponu. Najbolji razvoj (statistički vrlo značajno bolji) micelija bio je pri 20 °C gdje je zdjelica promjera 90 mm ispunjena već nakon 3 dana. Pri 25 °C micelij se trećega dana razvio statistički vrlo značajno bolje u odnosu na 10 i 15 °C, no 7-og dana na svim trima temperaturama micelij je prerastao zdjelice. Početak rasta micelija pri 30 °C zabilježen je tek 7-og dana i do kraja mjerenja bio je statistički vrlo značajno slabiji u odnosu na sve ostale temperature. Sklerocije su se najbrže razvile na 20 °C (nakon 7 dana), no bile su lakše od ostalih (0.94 g). Pri 15 °C sklerocije su formirane nakon 10 dana i težile su 1.4 g, a pri 10 °C nakon 14 dana i težile su 1.5 g. U svim slučajevima sklerocije su formirane uz rubove zdjelica u kružnom rasporedu.

*Botrytis cinerea* najbolje se razvijala pri 20 °C (statistički vrlo značajno bolje), a zatim pri 25 °C te 15 °C i na svim navedenim temperaturama prerastao je zdjelice 7-og dana. Nakon 10 dana isto se dogodilo i pri 10 °C. Sudeći prema rezultatima temperatura od 30 °C nije pogodna za razvoj gljive obzirom da je do njega došlo tek 14-og dana i bio je statistički vrlo značajno slabiji.

*Chalara elegans* najbolje je rasla pri 20 °C te je nakon 17 dana njen porast bio statistički vrlo značajno bolji u odnosu na sve ostale temperature. Pri 10 i 15 °C rast je započeo tek 7-og dana, no bio je statistički značajno slabiji kao i rast micelija pri 30 °C. Na kraju mjerenja (nakon 17 dana) se pokazalo da je rast pri 15, 25 i 30 °C bio podjednak, no statistički vrlo značajno slabiji u odnosu na 20 °C. Pri niti jednoj od temperatura nije došlo do ispunjenja zdjelice i rast micelija općenito je bio sporiji u odnosu na prethodne dvije kulture.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Adams P.B., Tate C.J. (1976): Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. *Plant Disease Report*, 60: 515-518.
2. Ainsworth G. C., (1971.): *Dictionary of the Fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.
3. Boland G.J., Hall R. (1994): Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93-108.
4. Coung N.G., Dohroo N.P. (2006): Morphological, cultural and physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk rot of cauliflower. *Omonrice*, 14: 71-77.
5. Cvjetković B. (2010.): *Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze*, Zrinski d.d., Čakovec.
6. Cvjetković B., Sever Z., Fabek S. (2016): Bolesti korijena u hidroponskom uzgoju i osvrt na parazite *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris i *Pythium* sp.. *Glasilo biljne zaštite*, 16(6), 548-556.
7. Ćosić J., Jurković D., Vrandečić K., Duvnjak T. (2005): Pojava bolesti na stabljikama suncokreta u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda*, 11(1), 11-16.
8. Ćosić J., Vrandečić K., Jurković D., Ereš I., Poštić J. (2008.): Parazitna mikopopulacija zrna soje. *Poljoprivreda*, 14(1): 5.-8.
9. Ćosić J., Jurković D., Vrandečić K., Kaučić D. (2012.): Survival of buried *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in undisturbed soil. *Helia*, 35(56):
10. Fernández J., Fernández-Baldo M., Sansone G., Calvente V., Benuzzi D., Salinas E., Raba J., Sanz M. (2014.): Effect of temperature on the morphological characteristics of *Botrytis cinerea* and its correlated with the genetic variability. *Journal of Coastal Life Medicine*; 2(7): 543-548.
11. Hoes J.A., Huang H.C. (1975): *Sclerotinia sclerotiorum*: viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology*, 65: 1431–1432.
12. Hood M. E., Shew H. D. (1996.): Pathogenesis of *Thielaviopsis basicola* on a susceptible and resistant cultivar of Burley tobacco. *Phytopathology*, 86: 38-43.
13. Humpherson-Jones F.M., Cooke R.C. (1977): Morphogenesis in sclerotium-forming fungi II. Rhythmic production of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *New Phytology*, 78: 181-187.
14. Ivić D. (2016): Bijela trulež [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] na rajčici. *Glasilo biljne zaštite*, 16(5), 500-504.

15. Jarvis W. R. (1977.): Botryotinia and Botrytis species, taxonomy, physiology and pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture Monograph No. 15.
16. Jeon Y.-J., Kwon H.-W., Nam J.-S., Kim S.H. (2006): Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from paprika. *Mycobiology*, 34(3): 154-157.
17. Josifović M. (1956.): Poljoprivredna fitopatologija. Naučna knjiga, Beograd.
18. Jurković D., Ćosić J. (2004.): Bolesti suncokreta. U: Suncokret (*Helianthus annuus* L.), Vratarić i sur. (ur.). Poljoprivredni institut Osijek, 283-328.
19. Kim W.G., Cho W.D. (2003): Occurrence of *Sclerotinia* rot in solanaceous crops caused by *Sclerotinia* spp. *Mycobiology*, 31(2): 113-118.
20. Kohn L. M. (1979): A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon*, 9: 365-444.
21. Maceljčki M., Cvjetković B., Ostojić Z., Igrac Barčić J., Pagliarini N., Oštrec L.J., Barić K., Ćizmić I. (2004.): Štetočinje povrća. Zrinski, Čakovec.
22. Mikić I., Radan Z., Ćosić J., Vrandečić K. (2014): Utjecaj hranjive podloge i temperature na razvoj *Sclerotinia sclerotiorum*. *Poljoprivreda*, 20(2), 8-11.
23. Purdy L.H., Grogan R.C. (1954): Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. *Phytopathology*, 44: 36-38.
24. Radman Lj. (1978.): Bolesti ratarskih kultura. Sarajevo.
25. Shew H. D., Lucas G. B. (1991.): Compendium of tobacco diseases. American phytopathological society.
26. Spotts R.A., Cervantes L.A. (1996): *Sclerotinia* Rot on pears in Oregon. *Plant disease*, 80: 1262-1264.
27. Van Den Berg L., Lentz C. P. (1968.): The effect of relative humidity and temperature on survival and growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*, 46(12): 1477-1481, 10.1139/b68-203
28. Vratarić M., Sudarić A. (2009). Važnije bolesti i štetnici na soji u Republici Hrvatskoj. *Glasnik Zaštite Bilja*, 32(6), 6-23.
29. Walker M. (2008.): Black root rot: *Thielaviopsis basicola*. Plant Disease Diagnostic Clinic, Ithaca.
30. Ward N. A., Bachi P. R., Kaiser C. A. (2012.): Black root rot of ornamentals. Plant Pathology Fact Sheet, University of Kentucky.

31. Williamson B. G., Duncan G. H., Harrison J. G., Harding L. A., Zimand G. (1994.):  
Grey mold (*Botrytis cinerea*) of roses. Scottish crop research institute annual report  
1993:91-93. 25

## 8. SAŽETAK

U laboratorijskim uvjetima na hranjivoj PDA podlozi istraživano je utjecaj različitih temperatura (10, 15, 20, 25 i 30 °C) na rast i razvoj triju fitopatogenih gljiva – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (bijela trulež), *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. (siva plijesan) i *Chalara elegans* Nag Ray et Kendr. (crna trulež korijena). *S. sclerotiorum* najbrže se razvila pri 20 °C (nakon 3 dana - 90 mm) a zatim pri 25 °C. Pri 30 °C rast je bio statistički vrlo značajno slabiji, a pri 10 i 15 °C podjednak (7-og dana - 90 mm). Sklerocije su se najbrže formirale pri 20 °C, i to nakon 7 dana te su težile 0.94 g. Pri 10 °C formirane su najkasnije i to 14-og dana, a težile su 1.5 g. Na 25 i 30 °C nije došlo do formiranja sklerocija. *B. cinerea* najbrže se razvijala na 20 °C, a zatim na 25 °C, dok na 30 °C nije zabilježen gotovo nikakav rast (5.44 mm nakon 14 dana). Na 10 °C dosegla je 90 mm 10-og dana, a na svim ostalim temperaturama (izuzev 30 °C) nakon 7 dana. *Chalara elegans* nakon 17 dana pokazala je statistički vrlo značajno bolji rast pri 20 °C (73.5 mm), a pri 15, 25 i 30 °C rast je bio podjednak (47.88 mm, 52.06 mm i 51.56 mm). Pri 10 °C micelij je imao statistički vrlo značajno slabiji rast u odnosu na sve ostale temperature (19.06 mm). Na niti jednoj od temperatura micelij nije dostigao promjer zdjelice od 90 mm.

**Ključne riječi:** *S. sclerotiorum*, *C. elegans*, *B. cinerea*, temperatura, micelij, rast, hranjiva podloga



## 9. SUMMARY

The influence of different temperature (10, 15, 20, 25 and 30 °C) on growth and development of 3 phytopathogenic fungi - *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (white mold), *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. (grey mould) and *Chalara elegans* Nag Ray et Kendr. (black root rot) was researched on PDA nutrition media in laboratory conditions. *S. sclerotiorum* had the fastest development at 20 °C (90 mm after 3 days) and at 25 °C. Growth was significantly slower at 30 °C, but at 10 and 15 °C growth rate was almost identical (90 mm after 7th day). Sklerotia were first formed after 7 days at 20 °C and weighed 0.94 g. The last sklerotia formed were those at 10 °C after 14 days and weighed 1.5 g. At 25 °C and 30 °C sklerotia did not even begun to emerge. *B. cinerea* had the fastest development at 20 °C, and then at 25 °C, while at 30 °C growth almost did not occur (5.44 mm after 14 days). Mycelium reached 90 mm after 10 days at 10 °C and after 7 days at all other temperatures (except 30 °C). After 17 days *Chalara elegans* had significantly better growth at 20 °C (73.5 mm) and at 15, 25 and 30 °C mycelium had a similar growth rate (47.88 mm, 52.06 mm and 51.56 mm). Significantly slower mycelium growth was at 10 °C (19.06 mm). Mycelium did not reach 90 mm in diameter at any temperature.

**Key words:** *S. sclerotiorum*, *C. elegans*, *B. cinerea*, temperature, mycelium, growth, nutrition media

## 10. POPIS SLIKA

|   |    |
|---|----|
| Slika 1. Micelij <i>S. sclerotiorum</i> na salati<br>( <a href="http://www.agro.basf.hr/agroportal/hr/hr/crop_protection/pest_lexikon/pest_lexicon_426.html">http://www.agro.basf.hr/agroportal/hr/hr/crop_protection/pest_lexikon/pest_lexicon_426.html</a> ) .....                            | 2  |
| Slika 2. Micelij na stabljici suncokreta ( <a href="http://agronomija.rs/2013/bela-trulez-suncokreta-sclerotinia-sclerotiorum/">http://agronomija.rs/2013/bela-trulez-suncokreta-sclerotinia-sclerotiorum/</a> ) .....  | 3  |
| Slika 3. Sklerocije u stabljici suncokreta<br>( <a href="http://www.pisvojevodina.com/RegionKI/Lists/Photos/Slike%202014/Suncokret/_w/sklerocije%201_JPG.jpg">http://www.pisvojevodina.com/RegionKI/Lists/Photos/Slike%202014/Suncokret/_w/sklerocije%201_JPG.jpg</a> ).....                    | 4  |
| Slika 4. <i>B. cinerea</i> na jagodama ( <a href="http://grama.com.hr/bolesti-jagoda">http://grama.com.hr/bolesti-jagoda</a> ).....   | 7  |
| Slika 5. Simptomi <i>B. cinerea</i> na bobicama ( <a href="https://www.syngenta.hr/news/vinova-loza/sivaplijesan-trulez-grozda-botryotinia-fuckeliana-botrytis-cinerea">https://www.syngenta.hr/news/vinova-loza/sivaplijesan-trulez-grozda-botryotinia-fuckeliana-botrytis-cinerea</a> ) ..... | 8  |
| Slika 6. <i>C. elegans</i> na mrkvi<br>( <a href="http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Thielaviopsis+basicola">http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Thielaviopsis+basicola</a> ) .....  | 10 |
| Slika 7. Korijen duhana zaražen <i>C. elegans</i> ( <a href="http://ephytia.inra.fr/en/C/10756/Tobacco-Fungi-and-related-micro-organisms">http://ephytia.inra.fr/en/C/10756/Tobacco-Fungi-and-related-micro-organisms</a> ) .....   | 11 |
| Slika 8. PDA podloga (Foto: Luka Vranješ) .....   | 13 |
| Slika 9. Kolekcija kultura (Foto: Luka Vranješ) .....   | 14 |
| Slika 10. Laminarij (Foto: Luka Vranješ) .....  | 14 |
| Slika 11. Kružni metalni rezač (Foto: Luka Vranješ) .....   | 15 |
| Slika 12. Kružni isječci micelija <i>C. elegans</i> (Foto: Luka Vranješ) .....  | 15 |
| Slika 13. Petrijeve zdjelice prilikom nacijepljivanja (Foto: Luka Vranješ).....   | 16 |
| Slika 14. Zdjelice nakon nacijepljivanja sa <i>S. sclerotiorum</i> (Foto: Luka Vranješ).....  | 16 |
| Slika 15. <i>S. sclerotiorum</i> nakon 7 dana (Foto: Luka Vranješ) .....  | 18 |
| Slika 16. Vaganje sklerocija (Foto: Luka Vranješ) .....   | 18 |

|  |    |
|--|----|
| Slika 17. Micelij <i>B. cinerea</i> nakon 7 dana (Foto: Luka Vranješ)..... | 19 |
| Slika 18. <i>C. elegans</i> nakon 17 dana (Foto: Luka Vranješ).....        | 21 |
| Slika 19. Usporedba nakon 7 dana (Foto: Luka Vranješ) .....                | 21 |

## 11. POPIS TABLICA

|   |    |
|---|----|
| Tablica 1. Utjecaj temperature na razvoj micelija <i>S. sclerotiorum</i> .....  | 17 |
| Tablica 2. Utjecaj temperature na razvoj micelija <i>Botrytis cinerea</i> ..... | 19 |
| Tablica 3. Utjecaj temperature na razvoj micelija <i>Chalara elegans</i> .....  | 20 |

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, smjer Zaštita bilja

## UTJECAJ TEMPERATURE NA RAZVOJ FITOPATOGENIH GLJIVA

Luka Vranješ

### Sažetak

U laboratorijskim uvjetima na hranjivoj PDA podlozi istraživano je utjecaj različitih temperatura (10, 15, 20, 25 i 30 °C) na rast i razvoj triju fitopatogenih gljiva – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (bijela trulež), *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. (siva plijesan) i *Chalara elegans* Nag Ray et Kendr. (crna trulež korijena). *S. sclerotiorum* najbrže se razvila pri 20 °C (nakon 3 dana - 90 mm) a zatim pri 25 °C. Pri 30 °C rast je bio statistički vrlo značajno slabiji, a pri 10 i 15 °C podjednak (7-og dana - 90 mm). Sklerocije su se najbrže formirale pri 20 °C, i to nakon 7 dana te su težile 0.94 g. Pri 10 °C formirane su najkasnije i to 14-og dana, a težile su 1.5 g. Na 25 i 30 °C nije došlo do formiranja sklerocija. *B. cinerea* najbrže se razvijala na 20 °C, a zatim na 25 °C, dok na 30 °C nije zabilježen gotovo nikakav rast (5.44 mm nakon 14 dana). Na 10 °C dosegla je 90 mm 10-og dana, a na svim ostalim temperaturama (izuzev 30 °C) nakon 7 dana. *Chalara elegans* nakon 17 dana pokazala je statistički vrlo značajno bolji rast pri 20 °C (73.5 mm), a pri 15, 25 i 30 °C rast je bio podjednak (47.88 mm, 52.06 mm i 51.56 mm). Pri 10 °C micelij je imao statistički vrlo značajno slabiji rast u odnosu na sve ostale temperature (19.06 mm). Na niti jednoj od temperatura micelij nije dostigao promjer zdjelice od 90 mm.

**Rad je izrađen pri:** Poljoprivredni fakultet u Osijeku

**Mentor:** Prof. dr. sc. Jasenka Čosić

**Broj stranica:** 32

**Broj grafikona i slika:** 19

**Broj tablica:** 3

**Broj literaturnih navoda:** 31

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** *S. sclerotiorum*, *C. elegans*, *B. cinerea*, temperatura, micelij, rast, hranjiva podloga

**Datum obrane:** 14. srpnja, 2017.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentor
3. Prof. dr. sc. Nada Parađiković, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agriculture

University Graduate Studies, course Plant protection

## INFLUENCE OF TEMPERATURE ON DEVELOPMENT OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Luka Vranješ

### Summary

The influence of different temperature (10, 15, 20, 25 and 30 °C) on growth and development of 3 phytopathogenic fungi - *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (white mold), *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. (grey mould) and *Chalara elegans* Nag Ray et Kendr. (black root rot) was researched on PDA nutrition media in laboratory conditions. *S. sclerotiorum* had the fastest development at 20 °C (90 mm after 3 days) and at 25 °C. Growth was significantly slower at 30 °C, but at 10 and 15 °C growth rate was almost identical (90 mm after 7th day). Sklerotia were first formed after 7 days at 20 °C and weighed 0.94 g. The last sklerotia formed were those at 10 °C after 14 days and weighed 1.5 g. At 25 °C and 30 °C sklerotia did not even begin to emerge. *B. cinerea* had the fastest development at 20 °C, and then at 25 °C, while at 30 °C growth almost did not occur (5.44 mm after 14 days). Mycelium reached 90 mm after 10 days at 10 °C and after 7 days at all other temperatures (except 30 °C). After 17 days *Chalara elegans* had significantly better growth at 20 °C (73.5 mm) and at 15, 25 and 30 °C mycelium had a similar growth rate (47.88 mm, 52.06 mm and 51.56 mm). Significantly slower mycelium growth was at 10 °C (19.06 mm). Mycelium did not reach 90 mm in diameter at any temperature.

**Thesis performed at:** Faculty of Agriculture in Osijek

**Mentor:** Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

**Number of pages:** 32

**Number of figures:** 19

**Number of tables:** 3

**Number of references:** 31

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** *S. sclerotiorum*, *C. elegans*, *B. cinerea*, temperature, mycelium, growth, nutrition media

**Thesis defended on date:** July 14th, 2017.

### Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, president
2. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. Prof. dr. sc. Nada Parađiković, member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.