

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Iva Pavić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ BIOLOŠKOG PREPARATA NA ZARAZU KLIJANACA
KUKURUZA S *FUSARIUM GRAMINEARUM***

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEKU

Iva Pavić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ BIOLOŠKOG PREPARATA NA ZARAZU KLIJANACA
KUKURUZA S *FUSARIUM GRAMINEARUM***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, mentor
3. prof. dr. sc. Brigita Popović, član

Osijek, 2023.

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Sistematika i značaj gljiva roda <i>Fusarium</i> i vrste <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe... 3	
2.2. Simptomi zaraze vrstama roda <i>Fusarium</i>	4
2.3. Biologija parazita.....	7
2.4. Zaštita	7
2.5 Proizvodnja kukuruza u Hrvatskoj	7
2.6. Biostimulatori i njihov značaj	9
2.7. Utjecaj biostimulatora na sjeme kukuruza.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
4. REZULTATI	20
4.1. RASPRAVA.....	24
5. ZAKLJUČAK:	26
6. SAŽETAK:.....	27
7. SUMMARY:	28
8. POPIS LITERATURE:	29
9. POPIS SLIKA	32
10. POPIS TABLICA.....	33

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Kukuruz (*Zea mays* L.) jednogodišnja je ratarska biljka iz porodice trava (*Poaceae*). Jedna je od vodećih poljoprivrednih kultura u svijetu. Podrijetlom je iz Srednje Amerike, a nakon otkrića američkog kontinenta prenesena je u Europu i druge kontinente (Gagro, 1997.).

Važna je biljka koja se koristi u mnogim industrijama, ishrani stoke i svakodnevnom životu ljudi. Njegova važnost očituje se veličinom zasijanih površina u svijetu, te njihovim rastom svake godine. Na prinose i kvalitetu kukuruza utječu agroekološki uvjeti, tehnologija proizvodnje i sortiment. Veliki problem u proizvodnji su korovi koji oduzimaju vodu i hranjiva biljkama. Podnosi proizvodnju u monokulturi, ali daje više prinose u plodoredu. Često se sije kao postrna kultura. Može biti dobar i loš predusjev drugim kulturama. Visoko dohodovna je kultura.

Kukuruz ima veliki agrotehnički značaj te zahtjeva intenzivne uvjete uzgajanja. Pored toga ima i veliki gospodarski značaj što proizlazi iz svojstava same biljke, raznovrsnosti upotrebe i obujma proizvodnje. Naime gotovo svi dijelovi biljke kukuruza mogu biti prerađeni. Danas se proizvodi više od 500 različitih industrijskih prerađevina od kukuruza. Neki dijelovi kukuruza koriste se u prehrani ljudi te u industriji, dok su stabljike s listovima i klipom namjenjene za silažu ili prehranu domaćih životinja. Zrno je osnovna sirovina u pripremljanju koncentrirane stočne hrane te kao takvo ima veliku važnost jer sadrži do 75 % ugljikohidrata, 10 % bjelančevina, 5 % ulja, 15 % mineralnih tvari te 2,5 % celuloze (Gagro, 1997.). Premda je kukuruz kultura od izrazite važnosti, poljoprivredni proizvođači nailaze na razne prepreke u proizvodnji. Jedna od njih je pojava bolesti uzrokovane biljnim štetnicima te patogenima.

Bolesti kukuruza uzrokuju gubitke u žetvi, utječu na kvalitetu pobrane kulture te uzrokuju skladišne gubitke. Najčešće bolesti uzrokovane su biljnim patogenima odnosno gljivama. Godišnji gubitci kreću se oko 9 %. Gljive roda *Fusarium* najznačajniji su uzročnici bolesti kukuruza u svijetu i u Hrvatskoj. Selekcija visoko tolerantnih genotipova kukuruza jedna je od najznačajnijih mjera zaštite. Trulež klipa koju uzrokuje gljiva *Fusarium graminearum* važna je bolest zrna kukuruza u Hrvatskoj te u mnogim drugim hladnim i vlažnim područjima širom svijeta. Osobit problem kod zaraze s *Fusarium* vrstama predstavljaju mikotoksini. Zbog niže kvalitete zrna zaraženog klipa kukuruza uzrokovane brojnim mikotoksinima koje proizvodi sam patogen, bolest je postala veliki problem za stočare. Dva važna mikotoksina su deoksinivalenol i zearalenon (Mirocha i Christensen, 1974.). Male količine mogu biti pogubne za životinje i ljude. Prema tome stvaranje rezistentnosti čini se

kao najučinkovitiji način za kontrolu truleži klipa. Jedan od načina kako poboljšati klijanje posljedično nisko kvalitetnog zrna zaraženog klipa kukuruza je tretman zrna biostimulatorima. Biostimulatori su tvari koje pozitivno utječu na imunološki sustav biljaka i njihov metabolizam, rast i razvoj te im mogu pomoći u prevladavanju stresnih situacija, povećanju prinosa i smanjenju upotrebe gnojiva. Utvrđeno je da biostimulatori pozitivno utječu na klijanje sjemena te mogu imati pozitivan učinak na fiziološku kvalitetu sjemena proizvedenog u sljedećoj generaciji (Palfi i sur., 2017).

Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti utjecaj biostimulatora na klijavost zdravog i inficiranog zrna kukuruza s *Fusarium graminearum* te prikazati razlike.

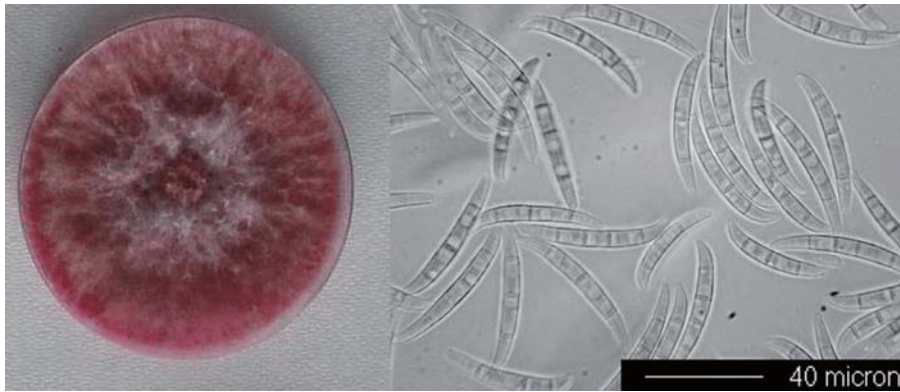
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Sistematika i značaj gljiva roda *Fusarium* i vrste *Fusarium graminearum*

Schwabe.

Rod *Gibberella* pripada pododjelu Ascomycota, razredu Sordariomycetes i porodici Nectriaceae. Karakteristično je da imaju plodište vrčastog oblika koje se zove peritecij. Periteciji mogu nastati pojedinačno ili u složenim plodonosnim tijelima stromama. Spolni stadij je *Gibberella zea* (Schwein.) gdje nastaje peritecij s askusima i askosporama. Nespolni stadij naziva se *Fusarium graminearum* Schwabe., koji stvara makrokonidije koje se formiraju u blijedo narančastim ili crvenkastim sporodohijama. To su nakupine razgranatih konidiofora koji završavaju konidiogenim stanicama s jednim sporogenim otvorom (monofijalide).

Fusarium spp. su označene kao najopasnije vrste za strne žitarice, posebno za pšenicu i ječam. Zob je općenito manje pogođena napadom *Fusarium* spp. nego druge žitarice, ali neke regije (Skandinavija i Kanada) nailaze na ozbiljan problem s paleži zobene metlice. Povoljni uvjeti za infekcije uzrokovane s *Fusarium* spp. uključuju visoku vlažnost i temperature iznad 20 °C. *F. graminearum* jedan je od najčešćih uzročnika paleži klasa žitarica i truleži klipa kukuruza. *F. graminearum* je najčešće izolirana vrsta (Slika 1.) sa kukuruza, pšenice i ječma u Sjevernoj Americi te srednjoj i južnoj Europi (Jurković i sur. 2016.). Bolesti koje uzrokuje *F. graminearum* su gospodarski značajne i imaju dalekosežne posljedice na prinos i kakvoću zrna. *F. graminearum* pripada grupi najdestruktivnijih bolesti sjemena i presadnica različitih vrsta. Parazit negativno utječe na oplodnju, broj zrna i nalivenost, rast i razvoj biljaka, te time na masu 1000 zrna, hektolitarsku masu, klijavost sjemena i tehnološku kakvoću sjemena žitarica. Gubitci jako variraju ovisno o domaćinu, zemljopisnom području, godini, otpornosti sorata/hibrida, organu biljke koji je zaražen, vremenu infekcije, intenzitetu bolesti i patogenosti izolata gljive. (Jurković i sur. 2016.). *F. graminearum* također stvara različite toksine koji mogu kontaminirati hranu te kao takva može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kod životinja i ljudi.



Slika 1. Kultura *Fusarium graminearum* izvor: <https://www.researchgate.net>)

Primarni cilj proizvodnje je maksimalno koristiti površinu zasijanu kukuruzom i postići najveću količinu prinosa po hektaru. U proizvodnoj praksi kukuruz je sve više izložen bolestima i stresnim uvjetima pa ne može u potpunosti iskoristiti svoj genetski potencijal prinosa i kvalitete. Svaka godina donosi nove izazove u obliku bolesti ili stresa. Žitarice zaražene ovim rodom mogu sadržavati povećane razine mikotoksina trihotecena i estrogenog mikotoksina zearalenona te time učiniti zrno neupotrebljivo za ljudsku ili stočnu ishranu (McMullen i sur., 1997.). Kod ljudi, *F. graminearum* izaziva bolesti koje izazivaju razne poteškoće poput mučnine, povraćanja, anoreksije i slično (Bennet i Klich, 2003.). Pretpostavlja se kako za inhibitore sinteze proteina, kronična izloženost trihotecenima ima široke učinke tipa neuroloških poremećaja i imunosupresije (Bennett i Klich, 2003.).

2.2. Simptomi zaraze vrstama roda *Fusarium*

Bolesti koje uzrokuje *F. graminearum* kod kukuruza su palež klijanaca, trulež korijena, stabljike i klipa, odnosno zrna. Zaraženo sjeme ne klije, trune ili ako isklije dolazi do paleži klijanaca (Slika 2.). Trulež sjemena ili klijanaca kukuruza ima za posljedicu prorijeđen usjev, a najčešće se javlja kod uzgoja u uskom plodoredu ili monokulturi te kao posljedica sjetve zaraženog sjemena. Tip simptoma, količina oborina i temperature nakon svilanja kukuruza, kao i tolerantnost pojedinih genotipova su osnovni parametri koji utječu na pojavu i intenzitet pojave truleži klipa. Drugi čimbenici, kao što su fiziološka i kemijska svojstva klipa, svile i zrna te trulež stabljike i oštećenja od štetnika također su važni za pojavu i razvoj bolesti. Trulež klipa i zrna uzrokovana *Fusarium* vrstama se očituju u jačem intenzitetu kod kukuruza koji se sije ranije kao i kod onih koji sporije otpuštaju vlagu iz zrna (Lević i sur., 2004.). U slučaju sjetve zaraženih zrna kukuruza dolazi do nicanja i formiranja slabo razvijenih klijanaca koji propadaju, a neka zrna ni ne izađu ili istrunu u tlu.

Kako je *F. graminearum* gljiva koja predstavlja izvor zaraze u tlu, najosjetljivija zrna su ona koja su mehanički oštećena.

Jedan od simptoma je i trulež stabljike kukuruza (Slika 2.). Trulež se javlja nakon metličanja i svilanja i to kod osjetljivih hibrida dok kod otpornijih se taj simptom truleži stabljike javlja kasnije. Na kori najnižih internodija, osobito oko koljenca mogu se pojaviti tamnije zone različitog oblika i veličine. S napretkom bolesti stabljika dobiva tamniju boju i postaje mekana. Kod vrlo osjetljivih hibrida trulež se može proširiti na sva međukoljenca ispod klipa. Kada se trulež pojavi na korijenu i proširi se na stabljiku tada dolazi do lomljenja i polijeganja stabljike kukuruza. *F. graminearum* inficira vršni dio klipa te zrna bivaju prekrivena gustom prevlakom bjeličastog ili ružičastog micelija i mogu biti manje ili više razgrađena (Slika 3.). U berbi klipovi na polomljenim stabljikama ostaju neobrani pa ih često naseljavaju saprofiti ili zrna takvih klipova kličaju te oni gube svaku vrijednost (Jurković i sur. 2016.). Dolazi do nekroze i propadanja klijanaca i mladih biljaka u ranoj fazi (1 - 2 lista), pri čemu korijen postaje taman i nekrotizira. Biljke koje prežive ovu fazu nastavljaju s rastom jer parazit prelazi u fazu mirovanja (Lević i sur., 2004). Između zrna se može uočiti prevlaka bjeličastog micelija (Slika 4.). Zrna su također zahvaćena, te se s njih trulež širi na oklasak koji uslijed toga oslabi i lako je lomljiv. Ranije zaraze klipova dovode do njegove potpune truleži. (Lević i sur. 2004.) Među ozbiljnijim posljedicama zaraze su mikotoksini producirani od strane gljivičnih vrsta kao što su *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Ovi sekundarni metaboliti su fitotoksični ili štetni za zdravlje ljudi i životinja, te se pokazalo kako je kontrola fitopatogena koji produciraju mikotoksine iznimno teška zbog njihove genetske varijabilnosti i specifičnosti domaćina (Ploetz, 2015.). Vrste roda *Fusarium* koje proizvode mikotoksine glavni su patogeni na žitaricama kao što su pšenica, ječam, kukuruz i zob (Nganje, 2014.). Mikotoksini se mogu nakupiti u tkivima žitarica i povrća i postati opasni po život ili ozbiljno narušiti biološke sustave ljudi i životinja. Mnogi toksini poput fumonizina i trihotecena su toplinski stabilni i ne mogu se deaktivirati kuhanjem. Vrste poput *F. graminearum* i *Fusarium culmorum* patogeni su visokog značaja na žitaricama poput pšenice, kukuruza, zobi i ječma, a također su glavni uzrok kontaminacije trihotecenom u žitaricama koje su rasprostranjene diljem svijeta (Pasquali i sur., 2016.).



Slika 2. Trulež klijanaca kukuruza u uvjetima umjetne zaraze zrna gljivom *Fusarium proliferatum* (Izvor: Lević i sur., 2004.)



Slika 3. Trulež stabljike i vršnog klipa kukuruza (Izvor: ChromosAgro)



Slika 4. Simptomi truleži klipa kukuruza uzrokovane gljivom *Fusarium graminearum* (Izvor: Lević i sur., 2004.)

2.3. Biologija parazita

F. graminearum je fakultativan parazit. Domaćini su mnoge uzgajane i korovne biljke. U zaraženim tkivima gljiva razvija hijalni višestanični micelij. Micelij je u početku bjeličaste boje dok kasnije poprima crvenu, smeđu do grimiznu boju. Boja i intenzitet ovise o podrijetlu i starosti izolata *F. graminearum*, supstratu, temperaturi i drugim okolinskim čimbenicima. (Jurković i sur. 2016.) Konidije i periteciji se razvijaju na miceliju na zaraženim ostacima koji se nalaze na tlu. *F. graminearum* može preživjeti 2-3 godine te također stvarati i peritecije s askosporama na zrnima kukuruza. Spore se mogu širiti na više načina, a smatra se da je kiša najvažnija za konidije, dok je vjetar najvažniji za širenje askospora. (Jurković i sur. 2016.)

2.4. Zaštita

Kako bi spriječili zarazu te pojavu bolesti važno je poduzeti preventivne ili kurative mjere zaštite. Sjetva zdravog sjemena u čisto tlo ili prethodno dezinficiranog sjemena poželjna je u slučaju prevencije zaraze zrna u tlu. Također vrlo je važan plodored kao agrotehnička mjera i potrebno je znati koje je biljke poželjno izmjenjivati s kukuruzom, a to su soja, šećerna repa te suncokret dok za razliku od ovih kultura pšenica kao susjedna biljka kukuruzu može znatno povećati mogućnost zaraze jer je i sama vrlo osjetljiv domaćin za gljivu *F. graminearum*. Jedna od najvažnijih preventivnih mjera zaštite je dekontaminacija tla prije sjetve te duboko zaoravanje žetvenih ostataka. Ostaci iz prošle vegetacije te samonikle vrste (korovi) koji sadrže micelij ili peritecije jedan su od glavnih izvora zaraze. Zbog toga je važno voditi računa o samoniklim domaćinima gljive *F. graminearum*. (Jurković, 2016.).

2.5 Proizvodnja kukuruza u Hrvatskoj

Kada je u pitanju kukuruz, Hrvatska je dvostruko samodostatna. Međutim, iako proizvodimo dva puta više nego što su nam potrebe, znatan dio sirovine odlazi u izvoz, najvećim dijelom u Italiju i Austriju, što nije dobro za domaću poljoprivredu jer se izvozi jeftina sirovina na kojoj drugi zarađuju dok su kod nas prerađivački kapaciteti mahom zatvoreni, uništeni, kao i stočarski sektor koji je u padu već dugi niz godina unatoč mjerama koje se poduzimaju za revitalizaciju stočarstva.

Primjetno je da su posljednjih godina hrvatski ratari započeli mijenjati trendove u proizvodnji odnosno okreću se kvalitetnijim sortama i većoj uporabi znanja u proizvodnji što u konačnici rezultira stabilnošću ove proizvodnje i pokazuje dugoročne perspektive. Ono što je ključno jest pitanje omjera vrijednosti izvoza kukuruza koji je 140 milijuna eura, dok smo s druge strane ogromni uvoznik stočne hrane, mesa i prerađevina na bazi mesa. Proizvodnja kukuruza postala je stabilna i profitabilna, no važno je staviti je u funkciju razvoja lanca vrijednosti u poljoprivredi, a to je moguće kroz stočarstvo. Kukuruz je dominantna kultura, a u razdoblju od 2012. do 2019. godine u ukupnoj proizvodnji žitarica, iskazano količinski, kukuruz je činio udjel oko 59,7 posto. Unatoč činjenici da nam iz godine u godinu pada stočarska proizvodnja, kukuruz ipak ostaje broj jedan na našim poljima. Prema procjenama čak se 80 posto cjelokupne hrvatske proizvodnje ove žitarice odnosi na OPG-ove i obrte. Iako nema službenih podataka, najveći pojedinačni proizvođači ove kulture su veliki poljoprivredni sustavi. Proizvodnja kukuruza u Hrvatskoj pod neposrednim je utjecajem svjetskih trendova, kako klimatskih tako i tržišnih. U Hrvatskoj se ukupno zasijane površine kreću između 250 do 300.000 ha, a najveće površine zabilježene su 2005. godine (319.000 ha). U 2016. godini površine pod kukuruzom su se primjerice smanjile na oko 250.000 ha što je bila posljedica smanjenja potrošnje u stočarskoj proizvodnji. Proizvodnja ima velika godišnja kolebanja, kako u Hrvatskoj tako i u ostalim zemljama EU. Hrvatska proizvodnja u prosjeku se kretala oko 1,8 milijuna tona. Kukuruz se od svih žitarica najviše proizvede na oko 160 milijuna hektara u svijetu. Isto tako, najviše od svih žitarica kukuruza se potroši u hranidbi životinja, pa u prehrani ljudi te u proizvodnji bioetanolu, plastike, vlakana i kukuruznog sirupa. Točnije, u hranidbi životinja potroši se najviše ili 67% svjetske proizvodnje kukuruza pa on od svih ratarskih i industrijskih kultura najviše ili 33% podmiruje energetske i čak 13% proteinskih potreba svjetske animalne proizvodnje. Proizvodnja kukuruza iznimno je važna privredna djelatnost, primjerice u SAD-u je u 2014. ostvarila prihod od gotovo 62 milijarde dolara, što je više nego u proizvodnji svih ostalih žitarica zajedno (Grbeša, 2016.). Izvor: <https://www.tportal.hr/biznis/clanak/proizvodnja-kukuruza-u-hrvatskoj>

2.6. Biostimulatori i njihov značaj

Jedan od glavnih izazova suvremene poljoprivrede predstavlja pitanje kako proizvesti što više hrane, a da se pri tome pazi na očuvanje okoliša i zdravlje ljudi. Znanstvenici kontinuirano pronalaze nove metode u cilju smanjenja prekomjerne upotrebe kemijskih sredstava za zaštitu bilja i mineralnih gnojiva. Jednu od tih metoda čini uporaba prirodnih bioloških preparata koje nazivamo biostimulatori biljaka (Colla i Rouphael, 2015.). Ključni sastav biostimulatora sadrži tvari organskog podrijetla i/ili mikroorganizme koji primjenom povoljno djeluju na kvalitetu usjeva budući da poboljšavaju rast i razvoj biljke, potiču bolje usvajanje hraniva te smanjuju stres. Biološki aktivne tvari biostimulatora su huminske i fulvinske kiseline, proteinski hidrolizati, hitozan i drugi biopolimeri, anorganski spojevi, ekstrakti morskih algi, botanički pripravci, spojevi koji sadrže dušik te korisne gljive i bakterije (du Jardin, 2015.).

Industrijska definicija biostimulatora izvorno je predložena 2012. godine te glasi: "Biljni biostimulatori sadrže tvar(i) i/ili mikroorganizme čija je funkcija kada se primijeni na biljke ili rizosferu stimulirati prirodne procese kako bi se poboljšalo i doprinijelo unosu hranjivih tvari, učinkovitosti hranjivih tvari, toleranciji na abiotski stres te kvalitetu usjeva. Biostimulatori nemaju izravno djelovanje protiv štetočina te stoga ne spadaju u regulatorni okvir pesticida". Definicija koju je predložio du Jardin (2015.), „Biljni biostimulans je svaka tvar ili mikroorganizam koji se primjenjuje na biljke s ciljem poboljšanja učinkovitosti ishrane, tolerancije na abiotski stres i/ili svojstava kvalitete usjeva, bez obzira na sadržaj hranjivih tvari u njemu” predstavlja najjasniji i najvažniji sažet način definiranja biostimulatora. Naše razumijevanje biostimulatora i njihovih potencijalnih učinaka širi se značajnom brzinom. Uloga biostimulatora, posebno u pogledu poticanja rasta i dostupnosti hranjivih tvari, razmatrana je (du Jardin, 2015.) uz brojne općenite preglede, te su opsežno pregledane mnoge kategorije specifičnih biostimulatora kao što su proteinski hidrolizati, ekstrakti morskih algi, silicij, kitozan, huminske i fulvinske kiseline, uloga fosfita, arbuskularnih mikoriznih gljiva, trihoderme, rizobakterija koje potiču rast biljaka. Većina studija provedena je kao pokusi u stakleniku ili na terenu. Literatura se uglavnom bavila vrstama usjeva s velikom zastupljenošću žitarica kao što su pšenica, ječam i kukuruz.

Biostimulator može se primjeniti folijarno i to u 60 % slučajeva, zatim na tlo i na korijenje te u hidroponski micelij. Najmanje se primjenjuje na sjeme i to samo u 10 % slučajeva. (Wozniak i sur., 2020.) Biostimulatori su agronomsko sredstvo koje danas ima sve veću važnost u smanjenju aplikacije gnojiva.

Oni mogu poboljšati poljoprivredno zemljište ili smanjiti gubitke unutar abiotskih stresnih uvjeta. Biostimulatori mogu biti sastavljeni od organskog i anorganskog materijala te drugih komponenti koje nisu otkrivene. Također mogu biti proizvedeni od ostataka hrane ili agroindustrijskih nusproizvoda. Korist nusproizvoda kao sirovog materijala za proizvodnju biostimulatora dio je ekonomske strategije u cilju povećanja održive proizvodnje. Općenito, biostimulatori mogu djelovati na primarni metabolizam i to povećanjem fotosintetske aktivnosti i izvedenih spojeva te mogu stimulirati sekundarni metabolizam aktiviranjem specifičnih biosintetskih puteva. Izolaciju i proučavanje jedne komponente gotovo je nemoguće provesti, a učinkovitost biostimulatora vjerojatno nije posljedica jednog spoja, već sinergičnog djelovanja različitih bioaktivnih molekula (Bulgari, i sur., 2019.). Zapravo učinkovitost biostimulatora uglavnom ovisi o njihovom sastavu koji nažalost ostaje najkritičnija točka s obzirom na poteškoće u karakterizaciji. Kako bi se dobili stabilniji biostimulatori uloženi su naponi da se smanji heterogenost početnih materijala i da se standardiziraju različite korištene tehnologije ekstrakcije. Kontaminacija usjeva fitopatogenim rodovima gljiva kao što su *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* i *Penicillium* obično rezultira mikotoksinima u uskladištenim usjevima ili finalnim proizvodima (kruh, pivo, itd.). Kako bi se smanjila šteta i suzbio rast gljivica, uobičajeno je dodavati antifungalne tvari tijekom rasta u polju ili skladištenja. Mnoge od ovih antifungalnih tvari također su štetne za ljudsko zdravlje te je zbog toga smanjenje njihove koncentracije od velike važnosti za sigurnost hrane. Mnogi istraživači traže način da smanje upotrebu sintetskih antifungalnih spojeva i da implementiraju ekološki prihvatljivije i zdravije biološko oružje protiv proliferacije gljivica i sinteze mikotoksina. Današnja poljoprivreda oslanja se na različite agense za poboljšanje zdravlja, prinosa i nutritivne vrijednosti usjeva. Žitarice sitnog zrna (kao što su pšenica, ječam, zob, raž) i kukuruz glavne su koje se uzgajaju diljem svijeta u različitim klimatskim uvjetima. Područja pogođena sušom, vlažna područja i područja na velikim nadmorskim visinama mogu stvoriti povoljne uvjete za populaciju patogenih gljiva. Zbog širokog spektra klimatskih uvjeta, žitarice i kukuruz mogu biti kontaminirani različitim patogenima što može rezultirati pojavom mikotoksina. Primjena kemijske zaštite može dovesti do smanjenja gljivične infekcije ili kontaminacije mikotoksinima, ali održivost takve primjene u ekonomskim i ekološkim pitanjima nije obećavajuća. Trenutačni trendovi dovode u pitanje sigurnost kemijskih sredstava koja se koriste za očuvanje usjeva, jer se smatraju odgovornima za mnoge kancerogene i toksične učinke kod ljudi i životinja.

Prirodna i biološka sredstva primjenjiva u smanjenju mikotoksigenih gljivica i mikotoksina intenzivno se istražuju dugi niz godina. Ne samo proizvođači, već i potrošači hrane na bazi žitarica, traže prirodne načine zaštite usjeva i smanjenja količine fungicida u finalnim proizvodima. (Giulia, F. i sur. 2022.)

Međuredni usjevi predstavljaju najvažnije usjeve s obzirom na globalno obrađenu površinu. Takvi usjevi uključuju soju, kukuruz, pšenicu, rižu, uljanu repicu, suncokret i pamuk. Uzgoj ovih usjeva općenito je intenzivan sustav uzgoja koji se koristi za postizanje visokih prinosa upotrebom povećanih količina organskih i mineralnih gnojiva. S obzirom na to, kao i smanjenje površine obradivih površina, postaje ključno osigurati visok prinos i kvalitetu alternativnim strategijama, poput uporabe biljnih biostimulatora. Ovi spojevi se sve više prepoznaju kao održivo rješenje za optimiziranje unosa hranjivih tvari, prinosa, kvalitete i tolerancije na abiotičke stresove. Zbog toga biostimulatori postaju najnoviji proizvod od interesa za poljoprivredu u širokom spektru utjecaja na usjeve u redovima i više načina djelovanja. Posljedično, postoji veliki izbor proizvoda na tržištu uz minimalnu državnu regulaciju jer je teško razlučiti kako bi se učinak biostimulatora mijenjao s različitim interakcijama u okolišu te u kombinaciji s čimbenicima proizvodnje koji utječu na produktivnost. Biljni biostimulatori, koji se ponekad nazivaju i poljoprivredni biostimulatori, raznolika su klasifikacija tvari koje se mogu dodavati u okoliš oko biljke te imaju pozitivne učinke na rast i ishranu biljaka, ali i na otpornost na abiotički i biotički stres. Iako se većina biljnih biostimulatora dodaje u rizosferu kako bi se olakšao unos hranjivih tvari, mnogi od njih također imaju zaštitne učinke protiv stresa iz okoliša kao što je nedostatak vode, salinizacija tla i izloženost temperaturama rasta ispod optimalnih. Biostimulatori nisu nutrijenti sami po sebi; umjesto toga oni olakšavaju unos hranjivih tvari ili povoljno pridonose poticanju rasta ili otpornosti na stres. Sve je veća potreba za održivom poljoprivrednom proizvodnjom kako bi se očuvala plodnost tla i smanjio gubitak biološke raznolikosti tla. Mikrobni biostimulatori dio su inovativne tehnologije koja može osigurati poljoprivredne prinose s visokim nutritivnim vrijednostima, prevladavajući negativne učinke proizašle iz promjena u okolišu. Plodnost tla, prema definiciji Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), je “sposobnost tla da održi rast biljaka osiguravajući esencijalne hranjive tvari za biljke i povoljne kemijske, fizičke i biološke karakteristike kao stanište za rast biljaka”. U posljednjih godina uočeno je da je globalno poljoprivredno tlo postalo ozbiljno degradirano.

Konkretno oko 40 % svjetskog poljoprivrednog tla i 24 % svjetskog produktivnog područja bila su izložena gubitku plodnosti, smanjenju proizvodnog kapaciteta i bioraznolikosti. Ovi fenomeni su uglavnom posljedica nekoliko različitih čimbenika uključujući eroziju vodom i vjetrom, salinitet, gubitak organske tvari i onečišćenje okoliša. Posljednjih nekoliko godina istraživanja su se snažno usredotočila na korištenje agroekoloških načela za minimiziranje potencijalno štetnih kemijskih inputa i upravljanje ekološkim odnosima i agrobiološkom raznolikošću. Agroekologija se temelji na očuvanju biološke raznolikosti, jačanju bioloških procesa te biogeokemijskom ciklusu. Korištenje biostimulatora odnosno proizvoda koji mogu ne samo djelovati izravno na biljke, već i održavati produktivnost kroz odabir i stimulaciju korisnih mikroorganizama u tlu, u skladu je s agroekološkim principima. Biljni biostimulatori nova su generacija proizvoda dostupnih na tržištu, što može biti korisno za postizanje poljoprivredne politike održivosti. Oni su definirani Uredbom EU 2019/1009 kao „proizvodi koji potiču procese ishrane bilja neovisno o sadržaju hranjivih tvari u proizvodu s jednim ciljem poboljšanja jednog ili više od sljedećih karakteristika biljke ili biljne rizosfere: učinkovitost korištenja hranjiva, otpornost na abiotički stres, svojstva kvalitete, dostupnost ograničenih hranjivih tvari u tlu ili rizosferi”. Biostimulatori mogu biti sastavljeni od tvari ili smjesa i mikroorganizama, stoga se klasificiraju kao mikrobn ili nemikrobn biljni biostimulatori. U modernoj poljoprivredi prioritet je traženje ekološki prihvatljivih načina za poticanje rasta biljaka i povećanje produktivnosti usjeva. Biostimulatori su skupina tvari prirodnog podrijetla koje pridonose povećanju prinosa biljaka i apsorpciji hranjiva, a smanjuju ovisnost o kemijskim gnojivima. Razvoj biostimulatora iz nusproizvoda stvara put recikliranja i smanjenju otpada, stvarajući koristi za uzgajivače, prehrambenu industriju, tvrtke za registraciju i distribuciju, kao i potrošače. Kriteriji za odabir označenih nusproizvoda za valorizaciju kao biostimulatora su: odsutnost ostataka pesticida, niski troškovi sakupljanja i skladištenja, dostatna opskrba i sinergija s drugim putovima valorizacije. Tijekom godina pokrenuti su projekti na nacionalnoj i međunarodnoj razini kao što su NOSHAN, SUNNIVA i Bio2Bio za istraživanje valorizacije nusproizvoda za prehrambenu i poljoprivrednu industriju te istraživanje načina djelovanja biostimulatora iz tokova organskog otpada. Nekoliko klasa biostimulatora dobivenih iz otpada ili sirovog organskog materijala s komponentama biostimulatora pokazalo se učinkovitim u poljoprivredi i hortikulturi, uključujući vermikompost, kompostirani gradski otpad, kanalizacijski mulj, proteinski hidrolizat i derivate hitina/kitozana. Kako globalno tržište biostimulatora nastavlja rasti, očekuje se da će više istraživanja i razvoja proširiti njihov popis.

Zbog sve veće potražnje za boljim prinosima i kvalitetom hrane i usjeva, traženje ekološki prihvatljivih i održivih načina za proizvodnju reagensa za gnojidbu biološkog podrijetla postalo je glavni cilj u poljoprivredi. Biostimulatori su proizvodi koji mogu djelovati na metaboličke i enzimatske procese biljaka poboljšavajući produktivnost i kvalitetu usjeva. Također pomaže biljkama da se nose s abiotiskim stresom, osobito u ranoj fazi razvoja biljaka. Europsko industrijsko vijeće za biostimulante (EBIC) definira biostimulatore kao „supstancu(e) i/ili mikroorganizme čija je funkcija kada se primijeni na biljke ili rizosferu stimulirati prirodne procese za poboljšanje unosa hranjivih tvari, učinkovitost hranjivih tvari, toleranciju na abiotiski stres i kvalitetu usjeva.” Zbog pozitivnih učinaka biostimulatora na rast biljaka, smanjenje stresa i prevenciju bolesti, primjena biostimulatora pridonosi povećanju proizvodnje, prinosa i kvalitete bilja (Calvo et al., 2014.). Jedna od važnih strategija valorizacije nusproizvoda je iskorištavanje bioaktivnih spojeva za poboljšanje rasta biljaka i otpornosti na patogene. Nekoliko klasa organskog otpada ili nusproizvoda koji su trenutno valorizirani kao biljni biostimulatori za koje se tvrdi da potiču bolji rast biljaka i povećavaju otpornost na štetne organizme. Kombinirane su razne biostimulirajuće tvari prerađene ili ekstrahirane iz različitih klasa izvornog materijala koji se smatraju otpadom i nusproizvodima u poljoprivrednom i prehrambenom sektoru, uključujući tvari iz kompostiranja, PH, hitin i hitozan te druge proizvode biološkog podrijetla. Prema EBIC definiciji, kompost ne spada u kategoriju biostimulatora te se ubraja u biognojiva. Međutim, kompost je izvor agrokemikalija ili mikroba koji potencijalno pokazuju biostimulirajuća svojstva kao što su fitohormoni, aminokiseline i druge tvari koje se iz njega mogu ekstrahirati. Te tvari djeluju u interakciji s procesima signalizacije biljaka i smanjuju negativnu reakciju na stres (Brown i Saa, 2015.). Kompostima se pripisuju tipični biostimulacijski učinci uključujući povećanje unosa hranjivih tvari, poboljšanu obranu od patogena itd. Štoviše, metode primjene bilo folijarno prskanjem ili dodavanje u tlo, ne određuju pokazuje li proizvod biostimulirajuću aktivnost ili ne. U tu svrhu, kompostirani materijal primjer je izvora biostimulatora dobivenih iz otpada, budući da su različite studije povezane s biostimulatorima koristile aktivne sastojke iz komposta za poticanje rasta biljaka i zaštitu od bolesti. Osim toga, kompostiranje je u skladu s konceptom kružne bioekonomije. U posljednje vrijeme različiti biološki preparati (BP) upotrebljavaju se za tretiranje sjemena te se zbog sve većeg interesa provode različita istraživanja kako bi se utvrdio učinak tih tretmana (Colla i sur., 2015.).

Prema Gaidau i sur. (2013.) ukoliko se provodi tretiranje sjemena BP potrebno je da preparat koji se primjenjuje dezinficira i štiti sjeme od uzročnika bolesti i štetnika u tlu, da ne zagađuje ekosustav, da ne sadrži štetne ostatke, da je biorazgradiv te da je jednostavan za upotrebu i transport. Biološki preparati razlikuju se po sastavu aktivnih tvari pa su i odgovori biljke i sjemenskog materijala na učinkovitost takvih preparata različiti (Colla i sur., 2015.). Jedan od vrlo učinkovitih načina upotrebe bio preparata jest oblaganje sjemena u svrhu zaštite biljaka od bolesti (Sarkar i sur., 2018., Ferreira i sur., 2021.). Orzali i sur. (2014.) tretirali su sjeme pšenice BP te time smanjili oboljenje gljivom *F. graminearum* i poboljšali prinos, dok su Gaidau i sur. (2013.) zaključili kako primjena fungicida s hidrolizatima na bazi kolagena, kao i mješavina fungicid-insekticida s hidrolizatima na bazi kolagena djeluje na znatno smanjenje potrebe za kemijskim sredstvima za zaštitu bilja na sjeme žitarica. Schmitt i sur. (2009.) ističu kako tretmani sjemena zahtijevaju znatno manje količine aktivnih sastojaka po hektaru u odnosu na folijarne tretmane te povećavaju klijavost i rast biljaka za razliku od netretiranog sjemena. Indeks bolesti u istraživanju koje su proveli Schmit i sur. (2009.) je u kontrolnoj varijanti bio od 38,3 do 47,5, a u varijantama gdje je primijenjen BP za oblaganje zrna indeks bolesti je bio znatno manji. Također je utvrđeno da su ti klijanci bujnijeg rasta (Schmit i sur. 2009.)

2.7. Utjecaj biostimulatora na sjeme kukuruza

Jedan od načina stimulacije bržeg klijanja i nicanja sjemena te poboljšanog rasta i razvoja mladih biljaka je primjena stimulatora rasta na sjemenu. Biostimulatori aktiviraju životne procese u biljkama, potiču diobu stanica, razmjenjuju procese u njima, jačaju imunitet, čine biljke otpornijima na stres i nepovoljne uvjete. Tretiranje sjemena postala je neizostavna mjera dorade, a tretman preparatima za zaštitu biljaka izuzetno bitan korak u doradi sjemena. Provedenim istraživanjem od strane Beraković i sur. (2021.) utvrđen je utjecaj stimulatora rasta na početni rast i razvoj hibrida kukuruza tretiranjem sjemena s različitim dostupnim komercijalnim stimulatorima rasta. Prema dobivenim rezultatima o utjecaju tretmana sjemena stimulatorima rasta na visinu biljke vidljivo je da su korišteni tretmani stimulatorima rasta pozitivno utjecali na visinu biljke. Statistički je vrlo značajan utjecaj hibrida, tretmana i interakcija hibrida x tretman. Testiranjem izraženih razlika između varijanti tretmana utvrđene su statistički opravdane razlike.

Rezultati utjecaja tretmana sjemena stimulatorima rasta na masu nadzemnog dijela biljke dokazuju da su korišteni preparati pozitivno utjecali na masu nadzemnog dijela biljke. Statistički je vrlo značajan utjecaj hibrida, tretmana i interakcija hibrida x tretman na masu nadzemnog dijela biljke.

U laboratorijskom pokusu je korišten biološki preparat na bazi ekstrakta kapsaicina koji je dokazan kao prirodni fungicid (El-Desouky i Hussain, 2022.). Rast gljivica u uskladištenim žitaricama uzrokuje značajno smanjenje količine i kvalitete žitarica. Procijenjeni godišnji gubici skladištenja uzrokovani gljivicama i drugim štetnim organizmima poput insekata procijenjeni su na milijune dolara. Stoga je ova studija koju su proveli El-Desouky i Hussain, (2022.) imala za cilj procijeniti prirodni kapsaicin (CAP) kao anti-aflatoksin (AF). Pokus je primijenjen u in vitro uvjetima za kontrolu aflatoksina koje proizvodi gljiva *Aspergillus aflatoxiformans* u mediju s ekstraktom kvasca sa saharozom. Zatim su kontaminirali zrna pšenice i kukuruza. Gledao se učinak kapsaicina koji je trebao spriječiti i/ili kontrolirati proizvodnju toksina. Također, ova je studija proširena kako bi se procijenila učinkovitost CAP-a kao fungicida u usporedbi s jednim od komercijalnih kemijskih fungicida. Rezultati su pokazali da su alfatoksini AFB1 i AFB2 bili pogođeni više nego AFG1 i AG2 u zrnu pšenice i kukuruza. Prema rezultatima, postotak inhibicije alfatoksina se povećavao s povećanjem primijenjene koncentracije prirodnog kapsaicina. Konačno, ova studija predlaže da prirodni kapsaicini mogu imati ulogu anti-alfatoksina, tako da bi se mogli koristiti kao učinkoviti aktivni prirodni materijali protiv kontaminacije pšenice i kukuruza, te mogu uspješno zamijeniti kemijske fungicide i pružiti alternativnu metodu za zaštitu žitarica i kontrolu kontaminacije.

3. MATERIJALI I METODE

U laboratorijskom pokusu je korišten biološki preparat (BP) na bazi ekstrakta kapsaicina koji je dokazan kao prirodni fungicid (El-Desouky i Hussain, 2022). Za provedbu pokusa korišteno je zrno kukuruza sa i bez biološkog preparata (Slika 5.) te sterilan i zaraženi pijesak. Pokus je postavljen u 4 tretmana. U svakom tretmanu je bilo četiri ponavljanja po 15 zrna kukuruza u svakom ponavljanju. Uzorci su postavljeni u posudice s pijeskom. Za inokulaciju supstrata (sterilni pijesak) korišten je izolat *F. graminearum*. Supstrat je zaražen zaraženim zrnima kukuruza i zalijevanjem suspenzijom micelija. Sterilni supstrat kontaminiran zrnima kukuruza zaraženim s *F. graminearum* je pripremljen na način da su u sterilni pijesak stavljena zaražena zrna s *F. graminearum*. Supstrat je navlažen i posudice su držane u termostatu na 22 °C 48 h prije sjetve. Zaražena zrna koja su korištena za kontaminaciju supstrata su pripremljena prema metodi Snijders i Eeuwijk (1991.). Zrna kukuruza namočena su u vodi preko noći (Slika 5.). Sljedećeg dana višak vode je dekantiran i zrna su autoklavirana i inokulirana izolatom *F. graminearum*. Inokulirana zrna inkubirana su tri tjedna na 25 °C, zaštićena od sunčeve svjetlosti.



Slika 5. Zrna kukuruza namočena u destiliranoj vodi i biološkom preparatu u Petrijevim zdjelicama

Izvor: Katedra za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)

Zaražena zrna su stavljena u posudice s pijeskom (10 zrna/posudici). Kako bi osigurali dobru zarazu pijeska on je dodatno zalijevan suspenzijom micelija u sterilnoj destiliranoj vodi. Za pripremu suspenzije korištene su 7 dana stare kulture *F. graminearum*. U 40 ml destilirane vode dodan je micelij iz jedne Petrijeve zdjelice (promjer 9 cm). Micelij je sastrugan sterilnim skalpelom te je miksanjem homogeniziran (Slika 6.). Svaki red zrna koja su zasijana je zaliven s 5 ml inokuluma *F. graminearum*. Zrna za sjetvu su dezinficirana na način da su prvo isprana pod mlazom tekuće vode, nakon toga 1 min. su držana u otopini 70 % etanola i potom su isprana dva puta po jednu minutu destiliranom vodom i posušena na sterilnom filter papiru. Dezinficirana zrna su potopljena u otopinu biološkog preparata u trajanju od 4 sata (10 ml BP/120 zrna). Kontrolna zrna su držana u destiliranoj vodi. Za sjetvu je korišteno 15 zrna po posudici. U tretmanima zalijevanja s BP jednokratno nakon sjetve, posijana su zrna zalivena s 5 ml biološkog preparata po redu. Tretmane smo označili oznakama T1, T2, T3 i T4 gdje slovo T označava tretman, a broj od 1-4 broj tretmana (Tablica 1.). Za zalijevanje je korišten razrijeđeni biološki preparat u omjeru 1:3. Biološki preparat je na bazi kapsaicina, a za sada nije komercijaliziran i u tijeku je njegova valorizacija.



Slika 6. Izmiksana smjesa micelija *Fusarium graminearum*

Izvor: laboratorij za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)

Posudice u kojima je postavljen pokus su držane u klima komori na temperaturi 22 °C i svjetlosnom režimu 12 sati dan/12 sati noć (Slika 7./8.). Pokus je redovito zalijevan s destiliranom vodom. Nakon dvadeset dana klijanci su izvađeni iz posudica, intenzitet zaraze je ocijenjen ocjenama od 0 do 5 te je izračunat indeks bolesti prema McKinney (1923). (Tablica 2.)

$$I = (\sum(n \times k)) / (N \times K) \times 100$$

n – broj biljaka po kategorijama

k – broj pojedine kategorije

N – broj svih ispitanih biljaka

K – broj usvojenih kategorija

Nakon izvršene ocjene zaraženosti klijanaca, odvojili smo korijen od biljke te stavili u označene petrijeve zdjelice. Mjerili smo masu biljke i korijena prije i nakon sušenja. Sušenje je provedeno dva puta s razmacima od dva sata. Provedeno je prvo sušenje te još dodatno sušenje procesom liofilizacije. Statistička analiza eksperimentalnih rezultata provedena je pomoću statističkog paketa SAS 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, SAD) korištenjem analize varijance ANOVA i Fisher LSD testa ($P = 0,05$). Statistika je odrađena tako da se gledao utjecaj tretmana na pojedini parametar. Kao parametre računali smo dužinu biljke i korijena te masu biljke i korijena prije i nakon liofilizacije.

Tablica 1. Prikaz tretmana pokusa i uzorci

Tretman	Br.uzorka
Neinokulirano zrno/sterilni pjesak (T1)	1/1
	1/2
	1/3
	1/4
Neinokulirano zrno/zaraženi pjesak (T2)	2/1
	2/2
	2/3
	2/4
Inokulirano zrno BP/sterilni pjesak (T3)	3/1
	3/2
	3/3
	3/4
Inokulirano zrno BP/zaraženi pjesak (T4)	4/1
	4/2
	4/3
	4/4



Slika 7. Klima komora

Izvor: laboratorij za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)



Slika 8. Program za podešavanje uvjeta klima komore

Izvor: laboratorij za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)

4. REZULTATI

Preliminarnim istraživanjem utjecaja novog biološkog preparata na razvoj paleži klijanaca kukuruza pri umjetnoj infekciji s *F. graminearum* utvrđeno je antifungalno djelovanje na *F. graminearum*. Istraživanje je uključivalo 4 tretmana i 4 ponavljanja po tretmanu u različitim kombinacijama upotrebe BP kako bi se utvrdio najbolji način primjene istoga.

Tablica 2. Indeks bolesti

Tretmani	Indeks bolesti
Neinokulirano zrno / sterilan pijesak T1	0
Neinokulirano zrno / zaražen pijesak T2	12,2
Inokulirano zrno BP / sterilan pijesak T3	0,28
Inokulirano zrno BP / zaražen pijesak T4	6,39

Izvor: vlastiti izvor

Najbolji tretman pokazao se T1 gdje smo imali čisto zrno i pijesak te je indeks bolesti iznosio 0 (Tablica 1.). Nadalje T2 tretman ima najveći indeks bolesti i to 12,2. U samom tretmanu nije primjenjen biološki preparat te je posađeno neinokulirano zrno kukuruza u zaraženi pijesak i samim time pojava bolesti je bila očekivana. T4 tretman pokazuje pozitivno djelovanje biološkog preparata na zrna kukuruza u zaraženom pijesku (Slika 9.). Preparat je smanjio indeks bolesti za 5,81 u usporedbi s T2 tretmanom. Drugi najbolji tretman je T3 (Slika 9.) čiji indeks bolesti iznosi 0,28 što je i očekivano s obzirom da smo zrna kukuruza tretirali s biološkim preparatom te ih posadili u sterilan pijesak.



Slika 9. Klijanci kukuruza tretman T3 (gore) i T4 (dolje)

Izvor: laboratorij za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)



Slika 10. Klijanci tretman T2 – sterilno zрно i zaraženi pijesak

Izvor: laboratorij za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)



Slika 11. Klijanci tretman T1 – sterilno zrno i čisti pijesak

Izvor: laboratorij za fitopatologiju (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)

Tablica 3. Utjecaj biološkog preparata ovisno o tretmanima

T	Dužina biljke	Dužina korijena	Masa biljke (prije L)	Masa biljke (nakon L)	Masa korijena (prije L)	Masa korijena (nakon L)
T1	75,78 A	110,33 A	3,27 A	0,33 A	3,31 A	0,48 AB
T2	92,95 A	131,33 A	4,14 A	0,41 A	5 A	0,82 A
T3	82,30 A	129,41 A	3,33 A	0,33 A	4,29 A	0,73 AB
T4	88,61 A	129,47 A	3,07 A	0,32 A	2,78 A	0,44 B
LSD 0,05	18,73	41,25	1,80	0,18	2,53	0,35

Tretmani – T1 (Neinokulirano zrno / sterilni pijesak), T2 (Neinokulirano zrno / zaraženi pijesak), T3 (Inokulirano zrno s BP / sterilni pijesak), T4 (Inokulirano zrno BP / zaraženi pijesak). Oznaka (L - liofilizacija kao proces sušenja). Prikazani podaci predstavljaju srednje vrijednosti četiri ponavljanja (N). Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$), prema Fisherovom LSD testu najmanje značajne razlike.

Prema statistici prikazanoj u tablici 3. utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika među tretmanima za sve elemente mjerenja osim mase korijena nakon liofilizacije. Tretman T4 se statistički razlikuje od tretmana T2 (Slika 12./13.) i kod njega je utvrđena najmanja masa korijena. Među tretmanima T1, T2 i T3 nije bilo statistički značajnih razlika.



Slika 12. T4 tretman – klijanci kukuruza (Izvor: laboratorij za fitopatologiju) (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)



Slika 13. T4 tretman – klijanci kukuruza (Izvor: laboratorij za fitopatologiju) (Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)

4.1. RASPRAVA

Prema našim rezultatima vidimo kako biološki preparat najbolje djeluje kao prevencija bolesti ukoliko ga koristimo prije sjetve. Biološki preparat može dodatno smanjiti intenzitet bolesti ako je patogen već prisutan u našem tlu ili supstratu. Kako vidimo iz Tablice 1. da je najveći indeks bolesti bio kod neinokuliranog zrna posijanog u zaraženi medij, stoga je preporučljivo koristiti biološki preparat kao prevenciju ili za smanjenje i inhibiciju razvoja patogena. Dokaz da je biostimulator vrlo dobra alternativa za kemijsku zaštitu potvrđuje i znanstveno istraživanje Sarkar i sur. (2018.) Ovo istraživanje bavilo se učinkovitošću tekućeg gnojiva morskih algi (SLF) pripremljenog od kombinacija različitih morskih algi kao stimulator za rast *Vigna radiata* (Zlatni grah) te njegovim antagonističkim djelovanjem protiv gljivičnih patogena (*Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani.*, *Sarocladium oryzae*). Pripremljen je 100% SLF, koji je dalje razrijeđen na 60 %, 40 % i 20 %. Sjeme je namočeno u sve četiri koncentracije u razdoblju od 12 sati te nakon toga posađeno. Nakon 60 dana, duljina korijena i izdanka povećana je za 14 %, odnosno 16 %, uz SLF (100 %). Koncentracije ugljikohidrata i proteina, klorofila a i b, te karotenoida također su povećane za 70 %, odnosno 86 %, pri uporabi 100 % SLF. Nadalje, SLF uspješno je inhibirao rast gljivičnog patogena *A. solani*, ali se pokazalo da su drugi testirani sojevi otporni. Ova studija pokazuje da tekuće gnojivo morskih algi može djelovati i kao biostimulator i kao biofungicid za *A. solani* i stoga bi se ovaj SLF mogao koristiti kao potencijalna alternativa kemijskim gnojivima.

Opće je poznato da biostimulatori pozitivno djeluju na porast biljaka, masu suhe tvari i komponente prinosa. Dobiveni rezultati provedenog istraživanja od strane Beraković i sur. (2021.) koji su ispitali utjecaj biostimulatora na sjeme kukuruza, u skladu su s ispitivanjima Miladinov i sur. (2015.) koji su ustanovili da je tretiranje sjemena biostimulatorima rasta prije sjetve imalo značajan utjecaj na parametre klijanja i početni porast. Vinković i sur. (2007.) tretirali su sjeme kukuruza i soje biostimulatorom na bazi prolina i nisu uočili očekivani stimulatívni učinak na klijavost sjemena. Yu i sur. (2014.) navode da bi masa biljke kukuruza bila veća da je sjeme tretirano stimulatorom rasta na bazi NaCl. Svaki tretman sjemena ima prednosti i nedostatke i može imati različite učinke ovisno o biljnim vrstama, stupnju razvoja biljke, dozi početnog sredstva i razdoblju inkubacije.

U našem istraživanju primjena biostimulatora nije statistički značajno utjecala na dužinu klijanaca kukuruza i masu korijena.

Istraživanje koje su proveli El-Desouky i Hussain, (2022.) je pokazalo da prirodni kapsaicini mogu imati ulogu anti-aflatoksina, tako da bi se mogli koristiti kao učinkoviti aktivni prirodni materijali protiv kontaminacije pšenice i kukuruza mikotoksinima, te mogu uspješno zamijeniti kemijske fungicide i pružiti alternativnu metodu za zaštitu žitarica.

Istraživanjem utjecaja biološkog preparata na zarazu klijanaca pšenice s *Fusarium graminearum* koje su proveli Ergović i sur (2022.) utvrđeno je da stupanj zaraze s *F. graminearum* varira ovisno o tretmanu, a najbolji učinak utvrđen je u tretmanu T1 gdje je zrno tretirano s BP posijano u supstrat u kojemu su se već nalazila zrna pšenice zaražena s *F. graminearum*. Indeks bolesti iznosio je 11,7. Tretman T2 razlikovao se od T1 po tome što se BP primjenjivao na površinu (zalijevanjem) kontaminiranog supstrata i utvrđena je manja učinkovitost na razvoj bolesti te je samim time i indeks bolesti bio veći. U tretmanima gdje je zaraza dodatno osigurana zalijevanjem s *F. graminearum*, samo tretiranje zrna biološkim preparatom T4 (indeks bolesti 23,3) pokazalo je bolje djelovanje nego li ono u kojemu je BP primijenjen samo zalijevanjem po površini T6 (indeks bolesti 34,6). Primjena biološkog preparata utjecala je na smanjenje intenziteta bolesti uzrokovane gljivom *F. graminearum* na pšenici. (Ergović i sur. 2022.). U našim istraživanjima također je utvrđeno da je indeks bolesti bio upola manji u tretmanu gdje je korišten biološki preparat na bazi kapsaicina. Sigurno je da takvi biopreparati mogu biti korisna i poželjna alternativa kemijskoj zaštiti žitarica. Za najbolje rezultate preporuča se BP aplicirati na sjeme ratarskih kultura prije sjetve što predstavlja vrlo jednostavan i ekonomičan način upotrebe za poljoprivrednike. Zbog sve veće rezistentnosti patogena na fungicide i opterećenje ekosustava upotrebom kemikalija vrlo je važno da poljoprivredni proizvođači u Republici Hrvatskoj prepoznaju potencijal ovakve vrste proizvoda za zaštitu sjemena ratarskih kultura.

5. ZAKLJUČAK:

Kukuruz (*Zea mays* L.) jednogodišnja je ratarska biljka iz porodice trava (*Poaceae*). Bolesti kukuruza uzrokuju gubitke u žetvi, utječu na kvalitetu pobrane kulture te uzrokuju skladišne gubitke. Znanstvenici kontinuirano pronalaze nove metode u cilju smanjenja prekomjerne upotrebe kemijskih sredstava za zaštitu bilja i mineralnih gnojiva. Jednu od tih metoda čini uporaba prirodnih bioloških preparata koje nazivamo biostimulatori biljaka. Najčešće bolesti uzrokovane su biljnim patogenima odnosno gljivama. Gljive roda *Fusarium* najznačajniji su uzročnici bolesti kukuruza u svijetu i u Hrvatskoj. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj biostimulatora na smanjenje zaraze s *Fusarium graminearum*. Kako bi suzbili ili smanjili utjecaj patogena uz pomoć biološke zaštite koristili smo biološko sredstvo na bazi ekstrakta kapsaicina. Učinkovitost biostimulatora uglavnom ovisi o njihovom sastavu koji nažalost ostaje najkritičnija točka s obzirom na poteškoće u karakterizaciji. Kako bi se dobili stabilniji biostimulatori uloženi su naponi da se smanji heterogenost početnih materijala i da se standardiziraju različite korištene tehnologije ekstrakcije. U našem istraživanju smo utvrdili kako je učinkovito tretirati zrna prije sjetve sa biološkim zaštitnim sredstvom koje će znatno smanjiti pojavu bolesti ili njene simptome te ojačati samu biljku u fazi klijanaca. Potrebna je sve veća potreba za održivom poljoprivrednom proizvodnjom kako bi se očuvala plodnost tla i smanjio gubitak biološke raznolikosti tla. Mikrobnii biostimulatori dio su inovativne tehnologije koja može osigurati poljoprivredne prinose s visokim nutritivnim vrijednostima, prevladavajući negativne učinke proizašle iz promjena u okolišu. Primjenom novih preparata koji pospješuju rast biljaka osiguravamo brži rast biljaka što dovodi do boljeg usvajanja vode i hraniva te bolju kondiciju biljke kada nastupaju stresni i nepovoljni agroklimatski uvjeti. Dodatnim istraživanjima o utjecaju biostimulatora na uzročnike bolesti doprinijet će se boljim spoznajama o pozitivnim učincima biostimulatora rasta u proizvodnji kukuruza.

6. SAŽETAK:

Kukuruz (*Zea mays* L.) jednogodišnja je ratarska biljka iz porodice trava (*Poaceae*). Jedna je od vodećih poljoprivrednih kultura u svijetu. Bolesti kukuruza uzrokuju gubitke u žetvi, utječu na kvalitetu i kvantitet uroda te uzrokuju skladišne gubitke. Najvažnije bolesti ratarskih kultura uzrokuju gljivični biljni patogeni. Najznačajniji patogeni pripadaju vrstama roda *Fusarium*. Mogu uništiti biljku u svim fazama razvoja od zrna u sjetvi, paleži klijanaca pa do klipa koji trune. Kako bi se smanjila upotreba kemijskih fungicida i ostalih kemijskih sredstava za zaštitu bilja promovira se sve više korištenje biostimulatora u zaštiti od patogena. U našim istraživanjima ispitali smo utjecaj jednog neregistriranog biostimulatora na smanjenje zaraze s *F. graminearum*. Utvrđeno je da je indeks bolesti bio upola manji u tretmanu gdje je korišten biološki pripravak na bazi kapsaicina.

Ključne riječi: kukuruz, *Fusarium graminearum*, biostimulatori, indeks bolesti

7. SUMMARY:

Maize (*Zea mays* L.) is an annual field plant from the grass family (Poaceae). It is one of the leading agricultural crops in the world. Maize diseases cause harvest losses, affect the quality and quantity of the crop and cause storage losses. The most important diseases of field crops are caused by fungal plant pathogens. The most important pathogens belong to species of the genus *Fusarium*. They can destroy the plant in all stages of development, from the grain in the sowing, burning of the seedlings to the rotting cob. In order to reduce the use of chemical fungicides and other chemical agents for plant protection, the use of biostimulators in protection against pathogens is increasingly being promoted. In our research of the impact of the one biostimulator on the reduction of infection with *F. graminearum* was researched. It was determined that the disease index was decrease in the treatment where a bio stimulator based on capsaicin was used.

Key words: corn, *Fusarium graminearum* , biostimulators, disease index

8. POPIS LITERATURE:

1. Bennett, J.W. and Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
2. Bulgari, R.; Franzoni, G.; Ferrante, A. (2019.) Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. 306.
3. Beraković, I., Jukić, G., Varnica, I., Plavšić, H., Krizmanić, G., & Josipović, M. (2021). Utjecaj stimulatora rasta na početni porast hibrida kukuruza. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 83(1-2), 53-62.
4. Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 6, 671.
5. Colla, G., and Rouphael, Y. (2015): Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 1–2. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.10.044.
6. Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil*, 383(1), 3-41.
7. Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., Rouphael, Y., (2015): Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38
8. du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196.
9. Grbeša, D. (2016.) Hranidbena svojstva kukuruza. Zagreb
10. El-Desouky, T., i Hussain, H. B. (2022). Influence of natural capsaicin on aflatoxins produced by *Aspergillus aflatoxiformans* in grains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(1), 98-108. DOI: 10.1080/03235408.2021.1999749
11. Ergović, L., Siber, T., Vrandečić, K., Popović, B. (2022.) Utjecaj biološkog preparata na zarazu kljanaca pšenice s *Fusarium graminearum*
12. Ferreira, A., Melkonyan, L., Carapinha, S., Ribeiro, B., Figueiredo, D., Avetisova, G., Gouveia, L. (2021) Biostimulant and biopesticide potential of microalgae growing in piggery wastewater. *Environmental Advances*, 4, 100062. DOI: 10.1016/j.envadv.2021.100062

13. Gagro, M. (1997.): Ratarstvo obiteljskog gospodarstva. Žitarice i zrnate mahunarke. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
14. Gaidau, C., Niculescu, M., Stepan, E., Epure, D.-G., Gidea, M. (2013) New mixes based on collagen extracts with bioactive properties, for treatment of seeds in sustainable agriculture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(9), 792-801.
15. Giulia, F., Giacomo, C., Bhakti, P., Antonio, F., Luka, E. (2022.) Biostimulants on Crops: Their Impact under Abiotic Stress Conditions
16. Jurković, D. (2016.): Pseudogljive i gljive ratarskih kultura. Poljoprivredni fakultet, Osijek.
17. Lević, J., Trkulja, V. i Petrović, T. (2004) Pojava i kontrola fuzarioza klipa i zrna kukuruza. *Glasnik zaštite bilja*, 27 (3), str. 64-81.
18. Miladinov Z. J., Balalić I. M., Radić V. B., Crnobarac J. Ž., Jocković M. Đ., Jokić G. O., Miklič, V. J., (2015.): Utjecaj biostimulatora na klijanje i rani porast klijanca suncokreta, *Journal of Agricultural Sciences* 60(1): 1-9.
19. McMullen, M., Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant disease*, 81(12), 1340-1348.
20. Mirocha. C. J., and Christensen, C. M. (1974). 'Oestrogenic mycotoxins synthesized by Fusarium in Mycotoxins (ed. I. F. ti. Purchase), pp. 129-138. Elsevier. Amsterdam
21. Nganje, W. E., Bangsund, D. A., Leistritz, F. L., Wilson, W. W., Tiapo, N. M. (2004.): Regional Economic Impacts of Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. *Review of Agricultural Economics*, 26(3), 332–347.
22. Orzali, L., Forni, C., & Riccioni, L. (2014). Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to Fusarium graminearum in wheat. *Seed Science and Technology*, 42(2), 132-149.
23. Palfi, M., Matotan, Z., & Matotan, S. (2017): Utjecaj tretiranja sjemena stimulatorom klijanja Ekobooster 1 na početni rast i razvoj paprike. *Sjemenarstvo*, 30(1-2), 45-53.
24. Ploetz, R. C. (2015.): Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512–1521.

25. Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., Vogelgsang, S. (2016.): A European Database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Trichothecene Genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 7.
26. Rouphael Y., Kyriacou M. C., Petropoulos S. A., De Pascale S., Colla G. (2018. a). Improving vegetable quality in controlled environments. *Sci. Hortic.* 234, 275–289. 10.1016/j.scienta.2018.02.033
27. Schmitt, A., Koch, E., Stephan, D., Kromphardt, C., Jahn, M., Krauthausen, H.-J., Forsberg, B., Werner, S., Amein, T., Wright, S.A.I., Tinivella, F., Wolf, J.M. van der, Groot , S.P.C. (2009) Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Phoma valerianellae* on lamb's lettuce seeds. *Journal of Plant Diseases and Protection*
28. Snijders, C. H. A., and Van Eeuwijk, F. A. (1991) Genotype x strain interactions for resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(2), 239–244. DOI: 10.1007/bf00215729.
29. Sarkar, G., Jatar, N., Goswami, P., Cyriac, R., Suthindhiran, K., Jayasri, M. A. (2018) Combination of different marine algal extracts as biostimulant and biofungicide. *Journal of Plant Nutrition*, 41(9), 1163–1171. DOI: 10.1080/01904167.2018.1434201.
30. Vinković T., Parađiković N., Plavšić H., Guberac V., Levai L. (2007.): Maize and soybean seed vigour under influence of seed age, seed treatment and temperature in cold stress test, *Cereal Res. Commun.*, 35(2):1213-1216.
31. Yu T., Bo G., Daowei Z., Junbao Y., Guangdi L., Yujie L., (2014.): Responses of Seed Germination, Seedling Growth, and Seed Yield Traits to Seed Pretreatment in Maize (*Zea mays* L.), *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 834630, 8 pages
32. Wozniak, E., Blaszczyk, A., Wiatrak, P., Canady, M. (2020) Biostimulant Mode of Action: Impact of Biostimulant on Whole Plant Level. U: Geelen, D., Xu, L. (ur.) *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, 205–227. DOI: 10.1002/9781119357254.ch8.

INTERNETSKI IZVORI:

- https://www.researchgate.net/profile/Laila-Naher/publication/281736621_Trichod
- <https://www.google.com/search?q=antifungalno+djelovanje+biostimulatora>
- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01567/full>

10. POPIS SLIKA

Slika 1. *Fusarium graminearum* L. – micelij i makrokonidije

(<https://www.researchgate.net/figure/Fusarium>)

Slika 2. Trulež klijanaca kukuruza u uvjetima umjetne zaraze zrna gljivom *Fusarium proliferatum* (izvor: Lević i sur., 2004.)

Slika 3. Trulež stabljike i inficiranost vršnog klipa kukuruza (Izvor: ChromosAgro)

Slika 4. Simptomi truleži klipa kukuruza uzrokovane gljivom *Fusarium graminearum* (izvor: Lević i sur., 2004.)

Slika 5. Zrna kukuruza namočena u destiliranoj vodi i biološkom preparatu u petrijevim zdjelicama

(izvor: katedra za fitopatologiju – fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek)

Slika 6. Izmiksana smjesa micelija *Fusarium graminearum*

(izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 7. Klima komora (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 8. Program za podešavanje uvjeta klima komore (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 9. Klijanci kukuruza tretman T3 i T4 – rezultati (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 10. Klijanci tretman T2 – sterilno zrno i zaraženi pijesak (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 11. Klijanci tretman T1 – sterilno zrno i čisti pijesak (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 12. T4 tretman – klijanci kukuruza (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

Slika 13. T4 tretman – klijanci kukuruza (izvor: laboratorij za fitopatologiju)

11. POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz tretmana pokusa i uzorci (izvor: katedra za fitopatologiju – vlastito istraživanje – FAZOS)

Tablica 2. Indeks bolesti (izvor: vlastiti izvor)

Tablica 3. Utjecaj biološkog preparata ovisno o tretmanima (izvor: vlastiti izvor)

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij, Zaštita bilja

Iva Pavić

UTJECAJ BIOSTIMULATORA NA KUKURUZ ZARAŽEN GLJIVOM *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Sažetak :

Kukuruz (*Zea mays* L.) jednogodišnja je ratarska biljka iz porodice trava (Poaceae). Jedna je od vodećih poljoprivrednih kultura u svijetu. Bolesti kukuruza uzrokuju gubitke u žetvi, utječu na kvalitetu i kvantitet uroda te uzrokuju skladišne gubitke. Najvažnije bolesti ratarskih kultura uzrokuju gljivični biljni patogeni. Najvažniji patogeni pripadaju vrstama roda *Fusarium*. Mogu uništiti biljku u svim fazama razvoja od zrna u sjetvi, paleži klijanaca pa do klipa koji trune. Kako bi se smanjila upotreba kemijskih fungicida i otalih kemijskih sredstava za zaštitu bilja promovira se sve više korištenje biostimulatora u zaštiti od patogena. U našim istraživanjima ispitali smo utjecaj jednog neregistriranog biostimulatora na smanjenje zaraze s *F. graminearum*. Utvrđeno je da je indeks bolesti bio upola manji u tretmanu gdje je korišten biološki pripravak na bazi kapsicina.

Glavne riječi: kukuruz, *Fusarium graminearum*, biostimulatori, indeks bolesti

Mentor: prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Broj stranica: 35

Broj slika i grafikona: 13

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 32

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Datum obrane: 18. srpanj 2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, mentor
3. prof. dr. sc. Brigita Popović, član

Rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

University Graduate Studies, Plant Protection

Iva Pavić

INFLUENCE OF BIOSTIMULATORS ON CORN INFECTED WITH THE FUNGUS FUSARIUM GRAMINEARUM

Summary:

Maize (*Zea mays* L.) is an annual field plant from the grass family (Poaceae). It is one of the leading agricultural crops in the world. Maize diseases cause harvest losses, affect the quality and quantity of the crop and cause storage losses. The most important diseases of field crops are caused by fungal plant pathogens. The most important pathogens belong to species of the genus *Fusarium*. They can destroy the plant in all stages of development, from the grain in the sowing, burning of the seedlings to the rotting cob. In order to reduce the use of chemical fungicides and other chemical agents for plant protection, the use of biostimulators in protection against pathogens is increasingly being promoted. In our research of the impact of the one biostimulator on the reduction of infection with *F. graminearum* was researched. It was determined that the disease index was decrease in the treatment where a biostimulator based on capsaicin was used

Key words: corn, *Fusarium graminearum* , biostimulators, disease index

Mentor: Karolina Vrandečić, PhD, full professor

Number of pages: 35

Number of figures: 13

Number of tables: 3

Number of references: 32

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Thesis defended on date: July 18, 2023.

Reviewers:

1. Karolina Vrandečić, PhD, full professor, mentor
2. Jasenka Ćosić, PhD, full professor, president
3. Brigita Popović PhD, professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.