

Suzbijanje nematoda korjenovih kvržica (Meloidogyne spp.) u mrkvi

Greganić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:151:947649>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



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](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Greganić, apsolvent

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

SUZBIJANJE NEMATODA KORIJENOVIH KVRŽICA (*MELOIDOGYNE* SPP.) U

MRKVI

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Greganić, apsolvant

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**SUZBIJANJE NEMATODA KORIJENOVIH KVRŽICA (*MELOIDOGYNE SPP.*) U
MRKVI**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Mirjana Brmež, mentor
3. Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, član

Osijek, 2018.

Sadržaj

1. UVOD.....	2
2. PREGLED LITERATURE	9
3. MATERIJAL I METODE	11
4. REZULTATI	21
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. LITERATURA	26
8. SAŽETAK	29
9. SUMMARY	30
10. POPIS TABLICA.....	31
11. POPIS SLIKA	32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Nematode su živi organizmi koje nalazimo u mnogobrojnim ekosustavima. Prvi zapisi o nematodama dolaze iz davne 1743.g. kada su uočene promjene na klasu pšenice. Napad nematode *Anquine tritici* ostavlja gale na klasu, odnosno lažna zrna. Nematode pripadaju razredu *Nematoda* (oblića), koji se dijeli na dva podrazreda, a to su: *Secernentea* (*Phasmida*) i *Adenophora* (*Aphasmida*) (Siddiqi, 1997.).

Nematode su vrlo važna sastavnica tla, jer osim što sudjeluju u brojnim životnim procesima, smatraju ih najdominantnijom skupinom živih organizama u tlu (Chen i sur., 2010.). Prema navodima (Bongers i Ferris, 1999.) na svijetu je poznato između 40 000 i 10 000 000 vrsta nematoda. Yeates (2010.) ističe kako se nematode mogu pronaći gdje god ima živih organizama s kojima su često u interakciji.

Nematode se sve više koriste u ekološkim ispitivanjima i monitoringu onečišćenja. S obzirom na rast ljudske populacije i smanjenje resursa koje možemo koristiti, vrlo je važno osvijestiti ljude da moraju voditi računa o razinama onečišćenja tla, kao i o zdravlju tla i bioraznolikosti, bez koje nebi ni bilo života na Zemlji.

Tijelo nematoda je mliječno bijele do žućkaste boje, jer neposjeduju pigment. Na njihovom tijelu razlikuje se prednji dio s glavom, srednji dio koji seže sve do analnog otvora, te stražnji dio, odnosno rep koji je pozicioniran iz analnog otvora (Oštrec, 1998.). Zbog njihovog kožnog pokrova, koji je građen od nekoliko različitih slojeva, često se kaže da je tijelo nematoda „cijev u cijevi“. Veličina nematoda varira, pa tako one mogu biti sićušne i nevidljive ljudskom oku ili toliko velike da postižu i do 8 m dužine (*Placentonema gigantisima*). Veliki značaj u poljoprivrednoj proizvodnji imaju biljno-parazitne nematode koje prave veliku štetu na biljkama, te im smanjuju prinose. Osim smanjenja prinosa, nematode, npr. *Xiphinema indeks*, prenose opasne viruse koji prave probleme u vinogradarstvu. Prisustvo nematoda u tlu utvrđuje se uzimanjem uzoraka tla i pregledom pod mikroskopom. Neke vrste nematoda su nametnici ljudi i životinja te se proučavaju u okviru humane i veterinarske nematologije. Uzročnik trihineloze je nematoda *Trihinella spiralis*, koja je jedan od najznačajnijih zoonoza kod ljudi i životinja.

Osim štetnih nematoda, postoje i one korisne koje se koriste u mnogim znanstvenim istraživanjima. Jedna od poznatih korisnih nematoda jest *Chenorhabditis elegans* koja je koristi kao „model organizam“.

Da bi nematode preživjele, vrlo im je važna voda, jer se zadržavaju u filmu vode oko čestice tla. Zbog mogućnosti suše u ljetnim mjesecima, nematode su sklone migracijama u potrazi za vodom, te ulaze u dublje slojeve tla. Na njihovu pojavu, veliki utjecaj imaju poroznost, aeriranost, sadržaj organske tvari, vlaga i mnoge druge karakteristike tla (Ferris, 2003.).

Značajna podjela nematoda je u trofičke i c-p grupe. Funkcioniranje ovih grupa se temelji na utvrđenim zajednicama nematoda, koje su osnova za izračunavanje indeksa uznemirenja, odnosno pomoću ovog indeksa možemo utvrditi stanje u tlu. Neke nematode bolje podnose onečišćenja tla od drugih, te one nastanjuju uznemirena područja i zovemo ih kolonizeri. Kolonizeri imaju vrlo kratak životni ciklus i veliki koeficijent reprodukcije. Također, postoje i perzisteri, nematode koje su osjetljive na onečišćenja, te oni imaju dulji životni ciklus, ali manji koeficijent reprodukcije. Osim ovih nematoda, postoje i podjela po trofičkim grupama, kao što su omnivore, predatori i fungivore.

Osim najčešćih pet trofičkih grupa (biljni paraziti, bakterivore, fungivore, omnivore i predatori), u tlu postoje i nematode koje se hrane jednostaničnim eukariotima, nematode koje se hrane različitim infektivnim stadijima parazita i nematode koje se hrane supstratom (Yeates i sur., 1993.).

Kvantitativni pokazatelj stanja zajednice nematoda u tlu jest indeks zrelosti ili Maturity index, koji je temeljen na pretpostavci, da sve nematode, s obzirom na način života, mogu biti raspoređene na c-p skali od 1-5. Ova skala predstavlja vrijednost za pojedine porodice nematoda jer unutar jedne porodice, rodovi imaju sličan životni ciklus. Iz ovog indeksa zrelosti izostavljene su fitoparazitne nematode. Njihov način života se uvelike razlikuje od načina života neparazita, te ovisi o višim biljkama. Zato je utemeljena posebna c-p skala na kojoj je izostavljena c-p grupa 1. Da bi izračunali srednje vrijednosti frekvencija pojedinih grupa fitoparazitnih nematoda, utemeljen je biljno-parazitni indeks- Plant Parasitic Index (PPI).

Značaj nematoda korijenovih kvržica (*Meloidogyne* spp.)

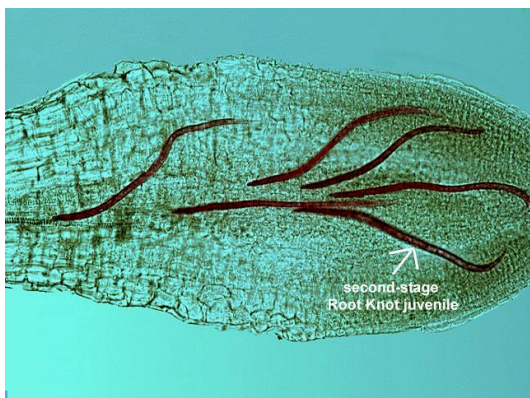
Postoji veliki broj korisnih i štetnih nematoda. Štetne nematode su veliki problem u poljoprivrednoj proizvodnji. Vrlo veliku štetu na velikom broju biljnih vrsta prave nematode korijenovih kvržica (Slika 1.) (*Meloidogyne* spp.).



Slika 1. Nematoda korijenovih kvržica (*Meloidogyne* spp.)

<http://www.karensgardentips.com/growing-garden-plants/garden-pests-diseases/root-knot-nematodes-meloidogyne-spp-and-how-to-control-them/>

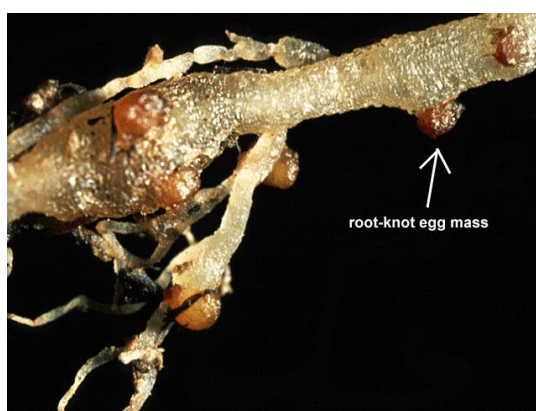
Hrane se citoplazmom biljne stanice, potpuno prodiru u korijen biljke, te se zbog toga nazivaju endoparazitima. Ženka ove nematode ima prošireno tijelo, kruškolikog izgleda, te ne formira cistu. Boja njezinog tijela je mliječno bijela, veličina varira od 0,5-0,8 mm×0,4-0,5 mm. Što se tiče mužjaka, nešto su veći, te im se veličina kreće između 0,8-2 mm. Tijelo mužjaka je crvoliko. Ličinka 2. stadija je infektivna, te ona ulazi u korijen u kojem se hrani (Slika 2.). Kada ličinka sazrije, izgubi moć kretanja. Ženke tvore želatinoznu masu u koju odlažu jaja u zadnjem stadiju presvlačenja (Slika 3.). Takva masa sadrži i do 2000 jaja i smještena je na površini korijena biljke (Slika 4.). Količina jaja ovisi o uvjetima. Što su uvjeti bolji, to se formira više jaja. Osim temperaturnih uvjeta, važna je i biljka domaćina, te tlo. U praksi, lakša tla pogoduju razvoju ovih nematoda, u odnosu na teža tla.



Slika 2. Drugi stadij ličinke korijenove nematode



Slika 3. Ženka i masa s jajima korijenove nematode



Slika 4. Želatinozna masa na korijenu biljke

Izvor: <http://www.clfs.umd.edu/entm/pdiag/nematology/rootknot.html#what>

Ova vrsta nematoda su polifagi, te prave štetu na više od 3000 biljnih vrsta. Također, imaju visok potencijal razmnožavanja, te uzrokuju smanjenje prinosa. Tijekom 2016. godine, *Meloidogyne* su pronađene u gotovo cijeloj Hrvatskoj (Vinkovci, Osijek, Zadar, Metković, Međimurje i dr.) i to na paprici, mrkvi, peršinu, lubenicama, krastavcima, luku, šćiru, rajčici i celeru (Slika 5.).



Slika 5. Oštećenja na luku i mrkvi

Izvor: <http://212.39.106.150/galerija/laboratorij-za-nematode/65/>

Meloidogyne su s vremenom postali štetnici svi klimatskih zona, te prave velike štete u zaštićenim prostorima, kao i na otvorenom. Nažalost, u praksi, proizvođači povrća nerijetko prekasno uvide problem s nematodama korijenovih kvržica, jer su one nevidljive golim okom. Tek nakon pojave prvih simptoma, pregledava se nasad. Oštećenja koja se javljaju uslijed napada su kvržice i zadebljanja na korijenu, račvanje i bradatost korijena, biljka slabije usvaja vodu i hranjive tvari, venuće, te smanjenje uroda i kvaliteta proizvoda (Slika 6. i 7.).

Ponekad, pregledom korijena se ne vide kvržice, ali biljka pokazuje znakove venuća. Ne rijetko se ti znakovi zamjene s nedovoljnom ishranjenosti, biljnim bolestima ili nedovoljnom količinom vode u tlu.



Slika 6. i 7. Simptomi izazvani nematodama korijenovih kvržica (*Meloidogyne* spp.) na mrkvi

Foto: Mirjana Brmež

Mjere suzbijanja nematoda korijenovih kvržica (*Meloidogyne* spp.)

Nematode korijenovih kvržica se mogu prenijeti zaraženim sadnim materijalom ili presadnicama, vjetrom, vodom, ali najveću ulogu u prenošenju ima čovjek. Prenošnje antropogenim putem može biti preko alata, oruđa, obuće, gume od traktora i dr. Zbog toga, dezinfekcija je vrlo važna stavka pri svakom izlaženju iz zaražene parcele.

Mjere suzbijanja ovih nematoda su različite. Uglavnom se u praksi preporuča integrirana zaštita kultura. Integrirana zaštita uključuje kombinaciju nekoliko različitih mjera protiv nematoda. Zbog polifagnosti ovih štetnika, otežan je izbor kultura u plodored. Osim integrirane zaštite, preporuča se provođenje i drugih mjera zaštite, kao što su agrotehničke mjere, biološke mjere (pripravci na osnovi bakterija i entomopatogenih nematoda), fizikalne mjere (sterilizacija i solarizacija), te u konačnici i kemijsko suzbijanje dopuštenim sredstvima

Mjere zaštite smo podijelili na:

Agrotehničke mjere- plodoredom, uzgojem otpornih sorata, navodnjavanjem, korištenjem zdravog sadnog materijala, obradom tla, suzbijanjem korova se nastoji smanjiti brojnost nematoda korijenovih kvržica.

Fizikalne mjere- solarizacija tla (zračenje tla) i termička sterilizacija tla (vodena para ili vruća voda) pokazale su se vrlo korisnim. Solarizacija se obavlja u ljetnim mjesecima, kada se tlo prekrije folijom kako bi se povisila temperatura (max. 41°C). Termička sterilizacija se pokazala učinkovitom, ali su za ovu mjeru potrebni veliki novčani izdaci.

Biološke mjere- sve više se istražuju entomopatogene nematode koje su se pokazale učinkovitima u suzbijanju nematoda roda *Meloidogyne*. Ličinke entomopatogenih nematoda se razvijaju u unutrašnjosti tijela kukca, luče otrovne tvari i uzrokuju smrt (Grewal i sur., 2005.). Simbioza entomopatogenih nematoda s bakterijama *Photorhabdus* i *Xenorhabdus*, odlično djeluje jer reducira izlazak infektivnih ličinki iz jaja. Entomopatogenenematode su svrstane u 9 porodica, a najznačajnije su nematode iz porodica: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*, *Phasmarhabditidae* (Oštec, 2001.). Osim entomopatogenih nematoda, koriste se i pripravci koji su na bazi bakterija i nematofagnih gljivica iz rodova: *Aspergillus*, *Verticillium*, *Dactylella* i dr.

Kemijske mjere- primjena kemijskih pripravaka ovisi o kulturi. Na rajčici je dozvoljeno koristiti pripravke na bazi fostiazata, oksamila i fluopirama. Na mrkvi i ostalom korijenastom povrću, zabranjeno je koristiti ova sredstva. Dazomet je djelatna tvar koja je dozvoljena u ukrasnom bilju, nekim povrtlarskim kulturama, duhanu, šumskom bilju. Upotrebljava se najmanje 42 dana prije sjetve, uz uvjet da temperatura tla ne smije biti niža od 8 °C. Nakon površinske primjene, unosi se u tlo na dubinu 15-20 cm, te pokriva folijom. Nakon 40 dana, skida se folija, tlo se provjetri, a prije sadnje u to tlo treba provjeriti da li je tlo fitotoksično ili ne.

Bez obzira na sve ove moguće mjere zaštite, vrlo je važno obaviti pregled tla prije sadnje ili sjetve povrća, jer na taj način se na vrijeme može otkriti prisustvo nematoda korijenovih kvržica.

Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinkovitost preparata na bazi fluopirama i dazometa na nematode korijenovih kvržica u tlu.

2. PREGLED LITERATURE

Pen-Mouratov i sur., (2008.) navodi kako je vegetacijski pokrov vrlo važan abiotski čimbenik koji utječe na pojavu nematoda u tlu. Kulturne mjere kao što su obrada tla, korištenje pokrovnih usjeva, malča i plodored vrlo su bitne jer utječu na zdravlje tla i njegovu produktivnost, te na samu brojnost štetnih organizama u tlu (Abawi i Widmer, 2000.).

Povećanjem broja bakterivora i fungivora u tlu povećava se mineralizacija u tlu, čime se utječe na povećanje razine slobodno živućih nematoda te smanjenje populacije biljno-parazitnih nematoda (Ferris i sur., 1996.). Gnojiva imaju različit utjecaj na zajednicu nematoda. Dodatkom organske tvari u tlo povećava se izvor hrane za slobodno živuće nematode (Bongers i Ferris, 1999.).

Benković-Lačić i sur., (2013.), izvještavaju o povećanju broja biljno-parazitnih nematoda u tretmanima s mineralnom gnojdbom, dok u tretmanima s organskom gnojdbom nije uočen porast nego smanjenje biljno-parazitnih nematoda.

Proučavanjem zajednice nematoda Bullock i sur., (2002.) zaključili su kako se na tlima tretiranim organskim gnojivima povećao broj bakterivora (*Cephalobidae* i *Rhabditiae*).

Yeates i sur., (1997.) navode kako su bakterivore najbrojnija trofička grupa u ekološkoj proizvodnji. Uspoređujući konvencionalan i ekološki uzgoj u tlu utvrđene su razlike u strukturi zajednice nematoda. Time je dokazano kako je na ekološkom tlu veća bioraznolikost, otpornost na uznemirenja i smanjena brojnost biljno-parazitnih nematoda (Neher, 2001; Van Diepeningen i sur., 2006.).

Općenito možemo zaključiti kako je u gospodarenju tlom povećana populacija korisnih bakterivora i smanjena populacija biljno-parazitnih nematoda (Brair i sur., 2007.).

Akhtar i Malik (2000.) u svome istraživanju ističu mogućnosti korištenja alternativnih mjera u suzbijanju nematoda, pored korištenja nematocida. Naime zaoravanjem biljnih ostataka u tlo i korištenjem malča, razgradnjom se oslobađaju spojevi koji imaju nematocidno djelovanje.

Chitwood (2002.) navodi da brojne biljne vrste sadrže određene spojeve kao što su npr.

glukozinolati, fenoli, terpeni, cijanogeni, glikozidi, alkaloidi i dr. za koje je dokazano da imaju toksično djelovanje na brojne štetne organizme u tlu.

Određene biljke su u stanju uništiti ili otjerati štetočinke, poremetiti njihov životni ciklus ili utjecati na njihovu ishranu (Guerena, 2006.).

3. MATERIJAL I METODE

Na parceli u Detkovcu (**43°52'53" N; 17°37'40"E**), postavljen je poljski pokus. Na toj parceli je bila zasijana mrkva (Slika 8.), koja je izvađena tjedan dana prije postavljanja pokusa, tako da je tlo ostalo golo.



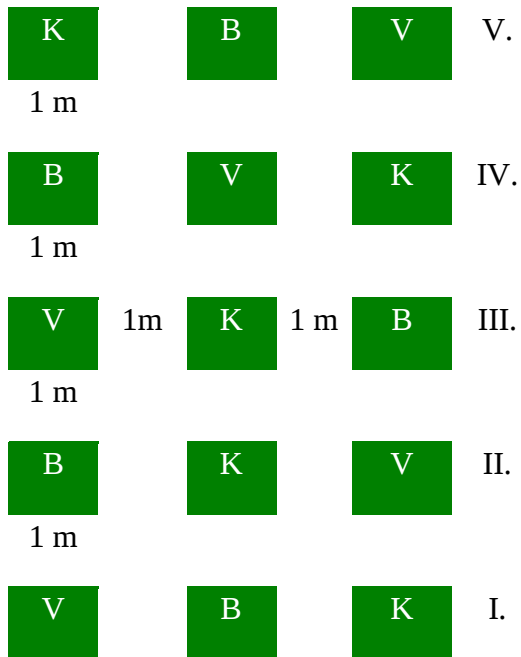
Slika 8. Mrkva na parceli u Detkovcu

Foto: Mirjana Brmež

Postavljanje pokusa i tretmani

Pokus je postavljen po slučajnom blok rasporedu, u tri tretmana (kontrola, Velum Prime i Basamid granulat), te 5 ponavljanja (ukupno 15 članova) (Shema 1.).

Shema pokusa 1.



Tretmani u pokusu su slijedeći:

K – kontrola – bez nematocida, čista voda

V – primjena preparata Velum Prime (0,625 l/ha) (Proizvođač Bayer d.o.o.)

B – primjena nematocida Basamid granulat - dazomet (50 g/m²) (Proizvođač Orchem)

Veličina parcele bila je 17m x 7m (119 m²) (Slika 9.), dok je pojedina parcelica odnosno jedan tretman u ponavljanju iznosio 1m² (Slika 10.).

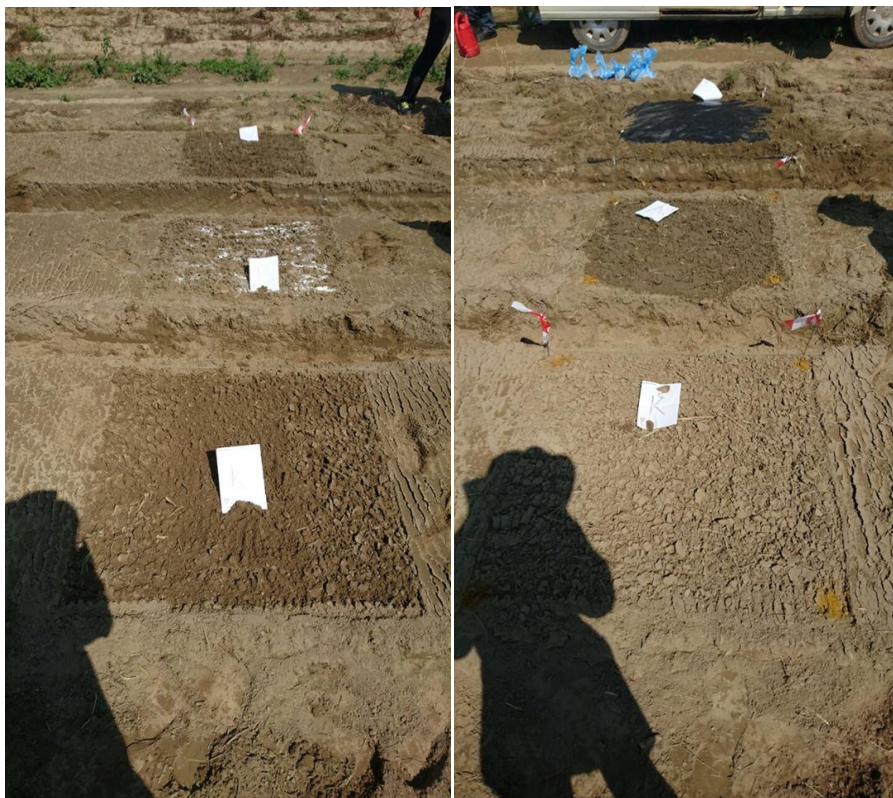


Slika 9. Parcela u Detkovcu
Foto: Mirjana Brmež



Slika 10. Parcelice veličine 1m²
Foto: Mirjana Brmež

Da bi tlo bilo vlažnije prije primjene preparata Basamid granulat i Velum Prime, na svaku parcelicu dodano je 1l vode. Na dijelove (Slika 11. i 12.) koji su označeni s V dodan je Velum Prime u dozi 0,625l/ha, a na parcelice s oznakom B inkorporiran je Basamid granulat u dozi od 50 g/ m². Na kontrolne parcelice aplicirana je čista voda.



Slika 11. i 12. Parcelice s preparatima
Foto: Mirjana Brmež

Basamid granulat najbolje djeluje na temperaturama od 10-15°C. Na temperaturama preko 20°C stavlja se crna folija (Slika 13.) zbog prebrzog osobađanja plina. Folija se ostavlja 40 dana na polju, te se nakon toga skida. Parcele na kojima je apliciran preparat Velum Prime, te na kontrolnim parcelama tlo nije prekrivano folijom.



Slika 13. Basamid granulat prekriven folijom
Foto: Mirjana Brmež

Temperatura zraka na dan postavljanja pokusa odnosno prvog uzorkovanja iznosila je 28°C, a temperatura tla je iznosila 23°C, te je mjerena sondom AQUATERR T-300 (Slika 14.). Dubina za mjerenje temperature tla iznosila je 20 cm. Istom sondom, mjerena je i vlaga tla na dubini od 20 cm, te je iznosila 55%.



Slika 14. Sonda AQUATERR T-300

Izvor: <http://www.aquaterr.net/products-T300.html>

Daljnje kemijske analize tla su se obavljale na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Rezultati analize prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Kemijska analiza tla na kojem je proveden pokus u Detkovcu

<i>uzorak</i>	<i>dubina (cm)</i>	<i>pH (H₂O)</i>	<i>pH (KCl)</i>	<i>AL- P₂O₅ mg /100 g</i>	<i>AL- K₂O mg /100 g</i>	<i>org. tvar (%)</i>	<i>CaCO₃ (%)</i>
Detkovac	0-30	8,20	7,89	28,86	10,86	1,55	5,04

Mjesto pokusa pripada skupini karbonatnih tala s visokom izmjenjivom kiselošću (pHKCl) i srednjim sadržajem karbonata (CaCO₃). Koncentracija fosfora (AL-P₂O₅) nam pokazuje da uzorak iz Detkovca pripada bogato opskrbljenim tlima. Koncentracija kalija (AL-K₂O)

je izrazito niska u odnosu na druge parametre. Zbog malog sadržaja organske tvari odnosno humusa, tlo svrstavamo u tla siromašna humusom.

Uzorkovanje tla

U tri navrata provedeno je uzorkovanje tla. Prvo uzorkovanje provedeno je 08.09.2016. godine. Ovo uzorkovanje provelo se prije primjene preparata, te se smatra početnim stanjem. Uzorci koji su prikupljeni, uzimani su s 15 parcelica (Slika 15.). Dana 23.09.2016. provedeno je drugo uzorkovanje. Tada je preparat Velum Prime u tlu bio 15 dana, te je uzorkovano 10 parcelica, nasumično parcelice s preparatom Velum Prime i kontrolne parcelice. Nakon što je prošlo 41 dan od postavljanja pokusa, izvršeno je treće uzorkovanje, odnosno 19.10.2016. i uzorci su prikupljeni s 15 parcelica, odnosno sa svih parcelica. Sve skupa je pregledano 40 uzoraka.



Slika 15. Uzorkovanje parcelica

Foto: Mirjana Brmež

Za uzimanje uzoraka tla, koristila se sonda promjera 2 cm, te se uzorkovalo na dubinu od 5-30 cm. Na svakoj parcelici uzimalo se 15 uboda sondom po cik-cak metodi. Količina tla koja je prikupljena u plastične vrećice iznosila je 1 kg (Slika 16. i 17.). Uzorci su označeni i spremljeni u hladnjak. Daljnja analiza uzoraka obavljala se na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku.



Slika 16. Uzimanje uzoraka
Foto: Mirjana Brmež



Slika 17. Uzimanje uzoraka
Foto: Mirjana Brmež

Izdvajanje nematoda

Izdvajanje, prebrojavanje i determinacija nematoda obavljani su na Zavodu za zaštitu bilja, Katedri za entomologiju i nematologiju, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

Za izdvajanje nematoda korištena je Baermanova metoda lijevka (Slika 18.).

S obzirom da efikasnost ekstrakcije nematoda opada ako se poveća veličina uzorka, u ovoj analizi uzeto je 50 g tla po uzorku, prema EPPO-vom diagnostičkom protokolu u nematologiji (PM 7/119 (1) Nematode extraction).



Slika 18. Baermanova metoda lijevka
Foto: Ivana Greganić



Slike 19. i 20. Prosijavanje uzorka tla i vaganje
Foto: Ivana Greganić

Ova metoda se radi s lijevcima na koje je pričvršćena gumena cijev koja je stegnuta na kraju. Lijevak je u uspravnom položaju na stalku. Unutar lijevka se stavlja sito na koji je stavljen filter papir. Uzorak tla prvo prosijavamo na situ, te važemo na vagi (Slika 19. i 20.). Lijevak ispunimo vodom do ruba (Slike 23. i 24.). Važno je napomenuti, da se voda nepreljeva preko uzorka tla. Nakon nekog vremena, nematode prelaze u vodu koja se nalazi u lijevku. Tijekom 24-48 sati, prikupi se 5-10 ml suspenzije s nematodama, te je ta suspenzija spremna za daljnju analizu (Zec i sur., 2012.).



Slike 21. i 22. Uzorak tla u vrećicama i pripremljena sita
Foto: Ivana Greganić



Slike 23. i 24. Uzorak tla u situ

Foto: Ivana Greganić

Ključevi po kojima je obavljena determinacija nematoda su: Andrassy (1984., 1988., 1993.), Bongers (1994.), Hunt, (1993.), Mai i Lyon (1975.), Lamberti i Taylor (1979.) te Jepson, (1987.).

Ispitivanje fitotoksičnosti

Prilikom drugog uzorkovanja, 23.09.2016. godine, na 5 parcelica na kojima je apliciran preparat Velum Prime, uzeti su uzorci tla za provjeru fitotoksičnosti, te je napravljen Kresse test. Uzorci koji su prikupljeni, dostavljeni su u laboratorij na analizu, a u tlo je posijana zelena salata. Rezultati za fitotoksičnost očitani su nakon 5 dana.

Isti test proveden je i na parcelicama s Basamid granulat, ali se ovaj test proveo tijekom trećeg uzorkovanja koje je bilo 19.10.2016. godine.

Analiza rezultata

Analiza rezultata obuhvaćala je analizu brojnosti nematoda roda *Meloidogyne* u svim tretmanima i svim tretmanima uzorkovanja. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu SAS 9.1.

4. REZULTATI

U tablici broj 2. prikazani su rezultati obavljenih ispitivanja učinkovitosti preparata Velum Prime i preparata Basamid granulat, a u tablici 3. prosječna brojnost nematoda prije i poslije primjene preparata Velum Prime i preparata Basamid granulat.

Tablica 2. Rezultati prosječnih vrijednosti broja nematoda roda *Meloidogyne* u 50 g tla po tretmanima 41 dan nakon primjene nematocida

Datum 19.10.2016. (3. uzorkovanje)	Kontrola (K)	Velum Prime (0,625 l/ha) (V)	Basamid granulat (50g/m ²) (B)
Prosječna brojnost nematoda iz roda <i>Meloidogyne</i> u 50 g tla	57,60 ^a	15,60 ^b	13,80 ^b

❖ U usporedbi po kolonama vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne (P≤0,01)

Rezultati analiza s obzirom na vrijeme uzorkovanja prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Prosječna brojnost nematoda roda *Meloidogyne* (prosjek od 5 ponavljanja) prije i poslije primjene preparata Velum Prime i Basamid granulat

Broj uzorka	Oznaka uzorka	Prosječna brojnost biljno parazitnih nematoda roda <i>Meloidogyne</i> u 50 g tla		
		Prije primjene nematocida (08.09.2016.)	Poslije primjene nematocida (23.09.2016.)	Poslije primjene nematocida (19.10.2016.)
1.	K - Kontrola	76,00	68,60	57,60
2.	V-Velum Prime (0,625 l/ha)	48,80	25,00**	15,60**
3.	B-Basamid granulat(50g/m ²)	62,00		13,80**

– usporedba po kolonama

* - statistička značajnost na nivou 0.05

** - statistička značajnost na nivou 0.01

U tablici 4. prikazani su detaljni podatci o pojavljivanju nematoda u svim ponavljanjima za sve tretmane.

Tablica 4. Brojnost nematoda roda *Meloidogyne* u prvom, drugom i trećem uzorkovanju, za svih pet ponavljanja

Tretman	Ponavljanje	I uzorkovanje (08.09.2016.)	II uzorkovanje (23.09.2016.)	III uzorkovanje (19.10.2016.)
Kontrola	1.	54	54	50
	2.	36	28	34
	3.	42	40	46
	4.	60	61	50
	5.	188	160	108
V (0,625 l/ha)	1.	41	20	18
	2.	31	8	6
	3.	54	32	18
	4.	56	21	20
	5.	62	44	16
B (50 g/m²)	1.	56	-	16
	2.	47	-	16
	3.	43	-	14
	4.	79	-	14
	5.	85	-	9

Rezultati testa fitotoksičnosti

Dana 23.09.2016. godine proveden je test fitotoksičnosti za tretman s preparatom Velum Prime, te nije utvrđena fitotoksičnost.

Kod testa fitotoksičnosti s preparatom Basamid granulat, koji je obavljen od 19.10.2016. godine u trajanju od 5 dana, nije utvrđena fitotoksičnost u četiri ponavljanja (80%), ali u jednom ponavljanju nije bilo ponika biljke (20%).

5. RASPRAVA

Kako za ljude, tako i za okoliš, kemijski pesticidi su štetni, ali su i dalje najrasprostranjeniji način suzbijanja nematoda (Kankam i sur., 2015.). Zbog štetnosti, preporuča se korištenje pesticida s manjim rizikom za ljudsko zdravlje i okoliš.

Fluopiram je registriran 2014. godine kao dopušteno sredstvo za suzbijanje nematoda u mrkvi. Osim korištenja kemijskih pesticida, mnogi autori ukazuju na važnost biološke kontrole, korištenjem drugih resursa koji povoljno utječu na suzbijanje nematoda, a to su esencijalna ulja češnjaka (Anastasiadis i sur., 2011.), korištenje sušenog korova i ostataka biljaka, te korištenje pilećeg stajnjaka.

Slične rezultate ovom istraživanju dobili su Raspudić i sur. 2004., koji su utvrdili značajno smanjenje broja nematoda roda *Meloidogyne* (od 40 na 18 individua u 100 ccm tla) nakon primjene preparata Basamid granulat.

U ispitivanju učinkovitosti preparata Velum Prime i Basamid granulat oba su pokazala zadovoljavajuću učinkovitost. Kako je vidljivo u tablici 2., postoje značajne razlike u brojnosti nematoda roda *Meloidogyne* ($P \leq 0,01$), između tretmana s preparatom Velum Prime i tretmana kontrole, te između tretmana s preparatom Basamid granulat i tretmana kontrole. Tretmani V i B nisu pokazali statistički značajne razlike između brojnosti nematoda roda *Meloidogyne* pri zadnjem uzorkovanju tla.

Tablica 3. prikazuje kako je u drugom i trećem uzorkovanju brojnost nematoda bila niža u odnosu na 1. uzorkovanje s tim da su statistički značajne razlike u brojnosti nematoda roda *Meloidogyne* utvrđene u tretmanu V i tretmanu B, dok u kontrolnom tretmanu nije bilo statistički značajnih razlika između 1., 2. i 3. uzorkovanja tla. S obzirom na pokrivanje tla u tretmanu s preparatom Basamid granulat folijom, te čekanja od 40 dana, drugo uzorkovanje nije provedeno na tom tretmanu.

6. ZAKLJUČAK

Nematode su vrlo važna sastavnica tla, jer osim što sudjeluju u brojnim životnim procesima, smatraju se najdominantnijom skupinom živih organizama u tlu. Od mnogobrojnih korisnih i štetnih nematoda, u ovom diplomskom radu, naglasak je stavljen na proučavanje mogućnosti suzbijanja nematoda korijenovih kvržica, roda *Meloidogyne*, na golom tlu s dva preparata, Velum Prime (fluopiram) te Basamid granulat (dazomet).

Nakon provedbe pokusa i obrade rezultata možemo zaključiti kako su preparati na bazi dazometa i fluopirama reducirali brojnost nematoda korijenovih kvržica i to statistički značajno u odnosu na kontrolne tretmane. Brojnost nematoda tijekom istraživanja ispitivana je tri puta, a najmanja je bila u trećem uzorkovanju, u sva tri tretmana. Brojnost nematoda korijenovih kvržica statistički je značajno pala u oba tretmana s nematocidima (V i B), dok u kontroli nije bilo statistički značajnih razlika između vremena uzorkovanja.

Osim ispitivanja učinkovitosti preparata, obavljen je i test fitotoksičnosti za oba preparata (Velum Prime i Basamid granulat). Preparat Velum Prime nije pokazao fitotoksičnost za biljke, ali preparat Basamid granulat pokazao je fitotoksičnost na 20 % ispitivanih uzoraka, te je trebalo ponovo provjetravati tlo i pričekati s budućom sjetvom.

Iz svega navedenoga, možemo zaključiti kako su oba ispitivana tretmana pokazala zadovoljavajuću učinkovitost u suzbijanju nematoda korijenovih kvržica u odnosu na kontrolu, ali ipak je broj nematoda u oba ispitivana tretmana još uvijek vrlo visok, te bi najvjerojatnije negativno utjecao na buduću proizvodnju povrća na tim parcelama.

7. LITERATURA

1. Abawi, G.S.& Widmer T.L. (2000.): Mechanism of Suppression of *Meloidogyne hapla* and Its Damage by a Green Manure of Sudan Grass, Volume 84: 562 - 585.
2. Akhtar, M., Malik, A. (2000.): Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes. A review. Bioresource Technology Volume 74, pp. 35 – 47.
3. Anastasiadis, I., Kimbaris, A.C., Kormpi, M., Polissiou, M.G., Karanastasi, E. (2011.). The effect of a garlic essential oil component and entomopathogenic nematodes on the suppression of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Hellenic Plant Protection Journal*, 4:21-24.
4. Andrassy, J. (1984.): Klasse nematoda. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. pp. 509.
5. Andrassy, J. (1988.): The super family Dorylamoidea (Nematoda) – a review of Family Dorylaimidae. Opusc. Zool. Budapest 23: 3-63.
6. Andrassy, J. (1993.): A taxonomic survey of family Mononchidae (Nematoda). Acta Zool.Acad.Sci. H. 39: 13-60.
7. Benković-Lačić, T., Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E; Pribetić, Đ.; Lončarić, Z; Grubišić, D. (2013.): Influence of organic and inorganic fertilizers on nematode communities in cornfield. Bulgarian journal of agricultural science. 19: 2; 235-240.
8. Bongers, T. (1994.): De Nematoden van Nederland. KNNV-bibliotheekuitgave 46. Pirola, Schoorl. pp. 408.
9. Bongers, T & Ferris, H. (1999.): Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. Trends in Ecology & Evolution, 14 (6): 224-228.
10. Briar, S.S., Grewal, P.S., Somasekhar, N., Stinner, D., Miller, S. (2007.): Soil nematode community, organic matter, microbial biomass and nitrogen dynamics in field plots transitionig from conventional to organic management. Applied Soil Ecology, 37: 256-266.
11. Bullock, L. R., Barker, K. R., Ristiano, J. B. (2002.): Influences of organic and synthetic soil fertility amandments on nematode trophic groups and community dynamics under tomato. Applied Soil Ecology 21: 233-250.
12. Chen, X.J., Daniell, T.J.,Neilson, R., Flaherty, V.O., Griffihts, B.S. (2010.): A comparison of molecular methods for monitoring soil nematodes and their use as biological indicators, European Journal of Soil Biology, Volume 46: 319 – 324.

13. Chitwood, J.D. (2002.): Phytochemical based strategies for nematode control, Annual Review of Phytopathology, Volume 40: 221 – 249.
14. Ferris, H., Eyre, M., Venette, R.C., Lau, S.S. (1996.): Population energetics of bacterial-feeding nematodes, stage-specific development and fecundity rates. Soil Biology and Biochemistry (28): 271 – 280.
15. Ferris, H. (2003.): Nematodes: Ecology, University of California, Davis, pp. 809–812.
16. Grewal, P.S., Ehlers, R.U., Shapiro- Ilan, D.I. (2005.): Nematodes as biocontrol agents CAB International Publishing. Wallingford, pp.394.
17. Guerena, M. (2006.): Nematodes: Alternative Controls; NCAT Agriculture Specialist, pp. 1 - 20.
18. Hunt, D. J. (1993.): Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae – Their systematics and bionomics. CAB INT. Wallingford, UK. 352 p.
19. Jepson, S. B. (1987.): Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, Oxon: C-A-B International, 265.
20. Kankam, F., Sowley, E.N.K., Oppong, N.E. (2014.). Effect of poultry manure on the growth, yield and root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.)
21. Lamberti, F. i Taylor C. E. (1979.): Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species): Systematics, Biology and Control. London: Academic press Inc., 477.
22. Mai, W. F.i Lyon,H.H. (1975.): Pictorial key to genera of plant-parasitic nematodes. Cornell University Press. London. 219 p.
23. Neher, D.A. (2001.): Role of nematodes in Soil Health and their use as indicators, Nematology 33(4): 161 – 168.
24. Oštrec, Lj. (1998.): Zoologija: Štetne i korisne životinje u poljoprivredi. Zrinski. Čakovec, pp. 232.
25. Oštrec, Lj. (2001.): Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Pest Insects, Agriculturae Conspectus Scientificus,Volume 66: 129 – 132.
26. Pen-Mouratov, S., Rodriguez-Zaragoza, S, Steinberger, Y. (2008.): The effect of *Cercidium praecox* and *Prosopis laevigata* on vertical distribution of soil free living nematode communities in the Tehuacán Desert, Mexico. Ecol. Res. (23): 973- 982.
27. Raspudić, E.; Ivezić, M.; Brmež, M. (2004.): Control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in pepper. Prvi kongres hrvatskih znanstvenika iz domovine i inozemstva. Zbornik sažetaka postera znanstvenih novaka izlaganih u inozemstvu

- 2002., 2003. i 2004. /Kniewald, Zlatko (ur.). - Zagreb: Akademija tehničkih znanosti Hrvatske, 2004. 486-486.
28. Siddiqi, M.R. (1997.): Techniques and methodologies for nematode disease diagnosis and nematode identification, FAO Corporate document, pp. 144.
 29. Yeates, G.W., T. Bongers, R.G.M. de Goede, D.W. Freckman & S.S. Georgieva (1993.): Feeding habits in nematode families and genera on outline for soil ecologist. *Journal of Nematology* 25: 315-331.
 30. Yeates, G.W., Bardget, R.D., Cook, R., Hobbs, P.J., Bowling, P.J., Potter, J.F. (1997.): Faunal and microbial diversity in three Welsh grassland soils under conventional and organic management regimes. *Journal of Applied Ecology*, 34: 453-470.
 31. Yeates, W.G. (2010.): Nematodes in ecological Webs, Wiley Online Library, pp. 1-8.
 32. Van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J., Korthals, G.W., van Bruggen, A.H.C. (2006.): Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology*, 31: 120-135.
 33. Zec, M., Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E., Majić, I. (2012.): Usporedba učinkovitosti različitih metoda izdvajanja nematoda iz tla, *Glasilo biljne zaštite* (5), p.6 – 16.

Internet stranice:

1. Van Bezooijen, J. (2006.) Methods and techniques for Nematology. Script, 112 p. <http://www.nem.wur.nl/NR/rdonlyres/CC0A519F-3ADD-4FFA-B473-59062BC9C7F/47004/MethodsandTechniquesforNematology.pdf>.

8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi koje su najpovoljnije mjere zaštite od nematoda korijenovih kvržica, roda *Meloidogyne*. Pokus je postavljen na parceli u Detkovcu, na mjestu gdje je tjedan dana prije bila izvađena mrkva, na pjeskovitom tlu. Pokus je postavljen po slučajnom blok rasporedu, u tri tretmana (kontrola, preparat Velum Prime i preparat Basamid granulat), te 5 ponavljanja.

Provedeni pokus je pokazao kako postoje statistički značajne razlike između primijenjenih nematocida Velum Prime i tretmana kontrole, te preparata Basamid granulat i tretmana kontrole. Statistički značajne razlike u brojnosti nisu uočene između tretmana s preparatom Velum Prime i preparata Basamid granulat. Dobiveni rezultati pokazuju kako je brojnost nematoda u uzorku od 50 g tla, u drugom i trećem uzorkovanju smanjenja s obzirom na prvo uzorkovanje u oba tretmana s primjenjenim kemijskim pripravcima, dok u kontrolnom tretmanu statističke razlike u sva tri vremena uzorkovanja nisu utvrđene.

Iako su preparati na bazi fluopirama (Velum Prime) i dazometa (Basamid granulat) pokazali statistički značajno smanjenje nematoda korijenovih kvržica u tlu, još uvijek su brojnosti preživjelih nematoda bile visoke, te bi najvjerojatnije predstavljale problem u budućoj proizvodnji povrća na tim parcelama.

Ključne riječi: nematode korijenovih kvržica, *Meloidogyne*, fluopiram, dazomet

9. SUMMARY

The aim of this investigation was to determine the most favorable measures for protection against root knot nematodes, *Meloidogyne* spp. The experiment was set up in Detkovac, where a carrot was removed a week ago, on sandy soil. The experiment was set up by random block design, in three treatments (control, Velum Prime and Basamid granulate), and 5 repetitions.

The experiment showed that statistically significant differences between total number of *Meloidogyne*, at the end of experimental period occurred between treatment V and K, as well as between treatment B and K. Statistically significant differences weren't occurred between treatment with Velum Prime and Basamid granulate preparations. Obtained results showed significant reduction of *Meloidogyne* in second and third sampling in compare to the first sampling in both treatments with the applied chemistry preparations, while in control treatment significant decrease in number of in all three sampling periods not occurred. Although investigated preparation (V and B) showed reduction of root knot nematodes in compare to control treatment, the numbers of survival nematodes (*Meloidogyne*) still remained high and would most likely pose a problem in future vegetable production on these plots.

Keywords: root knot nematodes, *Meloidogyne*, fluopyram, dazomet

10. POPIS TABLICA

Broj tablice	Ime tablice	Stranica
1.	Kemijska analiza tla na kojem je proveden pokus u Detkovcu	15
2.	Rezultati prosječnih vrijednosti broja nematoda roda <i>Meloidogyne</i> u 50 g tla po tretmanima 41 dan nakon primjene nematocida	21
3.	Prosječna brojnost nematoda roda <i>Meloidogyne</i> prije i poslije primjene preparata Velum Prime i Basamid granulat	22
4.	Brojnost nematoda roda <i>Meloidogyne</i> u prvom, drugom i trećem uzorkovanju, za svih pet ponavljanja	23

11. POPIS SLIKA

Broj slike	Ime slike	Stranica
1.	Nematoda korijenovih kvržica (<i>Meloidogyna</i> spp.)	4
2.	Drugi stadij ličinke korijenove nematode	5
3.	Ženka i masa s jajima korijenove nematode	5
4.	Želatinozna masa na korijenu biljke	5
5.	Oštećenja na luku i mrkvi	6
6.	Simptomi izazvani nematodama korijenovih kvržica na mrkvi	6
7.	Simptomi izazvani nematodama korijenovih kvržica na mrkvi	6
8.	Mrkva na parceli u Detkovcu	11
9.	Parcela u Detkovcu	13
10.	Parcelice veličine 1m ²	13
11.	Parcelice s preparatima	14
12.	Parcelice s preparatima	14
13.	Basamid granulat prekriven folijom	14
14.	Sonda AQUATERR T-300	15
15.	Uzorkovanje parcelica	16
16.	Uzimanje uzoraka	17
17.	Uzimanje uzoraka	17
18.	Baermanova metoda lijevka	18
19.	Prosijavanje uzorka tla i vaganje	18
20.	Prosijavanje uzorka tla i vaganje	19
21.	Uzorak tla u vrećicama i pripremljena sita	19
22.	Uzorak tla u vrećicama i pripremljena sita	19
23.	Uzorak tla u situ	19
24.	Uzorak tla u situ	20

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, Ekološka poljoprivreda

SUZBIJANJE NEMATODA KORIJENOVIH KVRŽICA (*MELOIDOGYNE* SPP.) U MRKVI

Ivana Greganić

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi koje su najpovoljnije mjere zaštite od nematoda korijenovih kvržica, roda *Meloidogyne*. Pokus je postavljen na parceli u Detkovcu, na mjestu gdje je tjedan dana prije bila izvađena mrkva, na pjeskovitom tlu. Pokus je postavljen po slučajnom blok rasporedu, u tri tretmana (kontrola, Velum Prime i Basamid granulat), te 5 ponavljanja.

Provedeni pokus je pokazao kako postoje statistički značajne razlike između primijenjenih nematocida Velum Prime, kontrole, te preparata Basamid granulat i tretman kontrole. Statistički značajne razlike u brojnosti nisu uočene između tretmana s preparatom Velum Prime i preparata Basamid granulat. Dobiveni rezultati pokazuju kako je brojnost nematoda u uzorku od 50 g tla, u drugom i trećem uzorkovanju smanjenja s obzirom na prvo uzorkovanje u oba tretmana s primjenjenim kemijskim pripravcima, dok u kontrolnom tretmanu statističke razlike u sva tri vremena uzorkovanja nisu utvrđene. Iako su preparati na bazi fluopirama (Velum Prime) i dazometa (Basamid granulat) pokazali statistički značajno smanjenje nematoda korijenovih kvržica u tlu, još uvijek su brojnosti preživjelih nematoda bile visoke, te bi najvjerojatnije predstavljale problem u budućoj proizvodnji povrća na tim parcelama.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Brmež

Broj stranica: 34

Broj slika: 24

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 34

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nematode korijenovih kvržica, *Meloidogyne*, fluopiram, dazomet

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Mirjana Brmež, mentor
3. Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilišta u Osijeku, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agriculture

University Graduate Studies, course Ecological agriculture

Control of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in carrot

Ivana Greganić

Abstract: The aim of this investigation was to determine the most favorable measures for protection against root knot nematodes, *Meloidogyne*, spp. The experiment was set up in Detkovac, where a carrot was removed a week ago, on sandy soil. The experiment was set up by random block design, in three treatments (control, Velum Prime and Basamid granulate), and 5 repetitions. The experiment showed that statistically significant differences between total number of *Meloidogyne*, at the end of experimental period occurred between treatment V and K, as well as between treatment B and K. Statistically significant differences weren't occurred between treatment with Velum Prime and Basamid granulate preparations. Obtained results showed significant reduction of *Meloidogyne* in second and third sampling in compare to the first sampling in both treatments with the applied chemistry preparations, while in control treatment significant decrease in number of in all three sampling periods not occurred. Although investigated preparation (V and B) showed reduction of root knot nematodes in compare to control treatment, the numbers of survival nematodes (*Meloidogyne*) still remained high and would most likely pose a problem in future vegetable production on these plots.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Brmež

Number of pages: 34

Number of figures: 24

Number of tables: 4

Number of references: 34

Original in: Croatian

Key words: root knot nematodes, *Meloidogyne*, fluopyram, dazomet

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Emilija Raspudić, president
2. Prof. dr. sc. Mirjana Brmež, mentor and member
3. Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, member

Thesis deposited at: Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia.