

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Laura Koščak, univ. bacc. ing. agr.

**Razvoj standardizirane metode prekidanja fiziološke
dormantnosti sjemena ambrozije: unapređenje
biotest metode utvrđivanja rezistentnih populacija**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Sveučilištu u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za herbologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šćepanović i neposrednim voditeljstvom Valentine Šoštarčić, mag. ing. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020. Dio istraživanja financiran je iz projekta Ministarstva poljoprivrede „*Monitoring rezistentnosti štetnih organizama na sredstva za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj (2018.-2020.)*“.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Hipoteze i ciljevi istraživanja	10
3. Materijali i metode rada.....	11
3.1. Sakupljanje i priprema sjemena ambrozije.....	11
3.2. Laboratorijski pokusi.....	13
3.2.1. <i>Hladno skladištenje sjemena.....</i>	<i>13</i>
3.2.2. <i>Stratifikacija sjemena.....</i>	<i>13</i>
3.2.3. <i>Kemijske metode prekidanja dormantnosti ambrozije.....</i>	<i>14</i>
3.2.4. <i>Kondicioniranje sjemena u vodi i otopini.....</i>	<i>16</i>
3.2.5. <i>Utvrđivanje klijavosti i dinamike klijanja ambrozije.....</i>	<i>19</i>
3.2.6. <i>Utvrđivanje vijabilnosti sjemena ambrozije TTC testom.....</i>	<i>20</i>
3.3. Plastični pokus	21
3.4. Statistička obrada podataka	24
4. Rezultati rada	25
4.1. Laboratorijski pokusi.....	25
4.1.1. <i>Klijavost ambrozije u ovisnosti o dužini skladištenja sjemena.....</i>	<i>25</i>
4.1.2. <i>Klijavost stratificiranog sjemena ambrozije.....</i>	<i>27</i>
4.1.3. <i>Klijavost sjemena ambrozije pri kemijskim tretmanima.....</i>	<i>28</i>
4.1.4. <i>Dinamika klijanja sjemena ambrozije pri različitim kemijskim tretmanima.....</i>	<i>29</i>
4.1.5. <i>Klijavost kondicioniranog sjemena ambrozije.....</i>	<i>33</i>
4.2. Plastični pokus	34
4.2.1. <i>Nicanje ambrozije nakon tretiranja i kondicioniranja sjemena hormonima rasta i dušičnim gnojivima.....</i>	<i>34</i>
4.2.2. <i>Opis deformacija biljaka ambrozije uzrokovanih primjenom kemijskih tretmana i metode kondicioniranja.....</i>	<i>38</i>
5. Rasprava	41
6. Zaključci	50
7. Zahvale.....	51
8. Popis literature	52
9. Sažetak	61
10. Summary.....	62
Životopis.....	63

1. Uvod

Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.) je najučestalija korovna vrsta kontinentalne Hrvatske (Ostojić, 2011). Uz značajne gubitke prinosa većine poljoprivrednih usjeva, ambrozija predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Procjenjuje se da je $\frac{1}{4}$ stanovnika Europe alergična na njen pelud, a alergijske reakcije javljaju se već pri koncentraciji peludi od 5 do 20 zrnaca po m³ zraka (Bullock i sur., 2010). Samo jedna biljka ambrozije stvara do osam milijuna alergeni peludnih zrnaca (Medzihradszky i Jarai-Komlodi, 1995) koji se vjetrom šire i do 300 km (Pleše, 2003). Zbog toga su alergijske reakcije zabilježene i u područjima na kojima ova invazivna vrsta još nije prisutna. Iako rasprostranjena u većini Europskih zemalja, najveća koncentracija alergene peludi utvrđena je za područje Republike Hrvatske i susjednih država poput Srbije, Mađarske, Slovenije, Italije i dr. (Lommen i sur., 2018; Šikoparija i sur., 2017; Storkey i sur., 2014).

Zbog šteta koje čini kao korovna i alergena biljna vrsta, suzbijanje ambrozije iziskuje velike financijske utroške u zdravstvenom i poljoprivrednom sektoru (Milakovic i Karrer, 2016). Dodatan problem u suzbijanju ove vrste jesu populacije ambrozije koje su razvile rezistentnost na često korištene herbicide u poljoprivrednim usjevima. Danas je ambrozija jedna od 22 korovne vrste koje su razvile rezistentne biotipove na herbicid glifosat što uzrokuje veliki problem u suzbijanju ove vrste na nepoljoprivrednim površinama. Još veći problem su populacije rezistentne na herbicide koji se redovito koriste u ratarskim usjevima dokazane u većini Europskih zemalja (Heap, 2020). I u Hrvatskoj je 2019. godine dokazana rezistentnost ambrozije na herbicid oksasulfuron koji se redovito koristio u soji (Brijačak i sur., 2020). Pretpostavka je da su ove populacije rezistentne i na druge herbicide istoga mehanizma djelovanja (inhibitori acetolaktatsintaze) koji se učestalo koriste u najvažnijim ratarskim kulturama: kukuruzu, šećernoj repi, suncokretu i strnim žitaricama.

Stoga je pravovremeno otkrivanje rezistentnih populacija korova ključno u biljnoj proizvodnji jer može usporiti daljnja širenja ovih populacija koje više nisu osjetljive na dotada primjenjivane herbicide (Lykholat i sur., 2018). Dodatan su problem populacije korova koje razvijaju višestruku rezistentnost, odnosno istovremenu rezistentnost na dva ili više različita mehanizama djelovanja herbicida. Kako bi se poljoprivrednim proizvođačima na vrijeme sugerirala promjena herbicida, odnosno korištenje herbicida drugoga mehanizma djelovanja te obavezno uključivanje nekemijskih mjera suzbijanja korova, važno je utvrditi jesu li populacije korova razvile rezistentnost i/ili višestruku rezistentnost na određeni herbicid.

Zbog toga je rano otkrivanje rezistentnosti ključan korak u sustavu suzbijanja korova. Proces dokazivanja rezistentnosti korova na herbicide dosta je složen jer je potrebno primijeniti različite metode i tehnike, ovisno o istraživanoj korovnoj vrsti i istraživanom mehanizmu djelovanja herbicida. Ukratko, dva su osnovna načina dokazivanja rezistentnosti: PCR tehnika u laboratorijskim uvjetima i biotest metoda u kontroliranim uvjetima plastenika/staklenika ili u poljskim uvjetima. U oba slučaja glavni su uvjet za provođenje testova razvijene biljke ambrozije, a za što je preduvjet klijavo sjeme. Upravo je potreba za dobivanjem klijavog sjemena ambrozije najzahtjevniji dio postupka dokazivanja rezistentnosti i razlog zbog kojega kod ove korovne vrste taj postupak traje i više od godinu dana.

Posebice je zahtjevno potaknuti klijanje sjemena ambrozije sakupljenog s poljoprivrednih površina. Upravo je ovo i glavni cilj kod utvrđivanja rezistentnosti jer sjeme ambrozije koje potječe s poljoprivrednih površina ima značajno nižu klijavost, ali veću dormantnost od sjemena biljaka koje se razvijaju uz cestu ili na zapuštenim površinama (Kazinczi i sur., 2006; Di Tommaso, 2004). Ova je pojava posljedica interpopulacijske varijabilnosti ove korovne vrste i prilagodbe različitim okolišnim uvjetima.

Jedna biljka ambrozije prosječno proizvede oko 4000 sjemenki godišnje (Fumanal i sur., 2007), a često i višestruko više, ali je klijavost fiziološki zrelog sjemena vrlo niska. Sjeme ambrozije izloženo i optimalnim uvjetima klijanja nije sposobno klijati (Willemsen, 1971). Ono sjeme koje osipanjem s majčinske biljke dospije u tlo može ostati vijabilno (živo) i do nekoliko desetaka godina (Milakovic i Karrer, 2016; Ali i sur., 2011). U tlu sjeme također ulazi u fazu mirovanja koje je rezultat prilagodbe na zimsko razdoblje, a s ciljem sprječavanja odumiranja klijanaca od posljedica smrzavanja (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006; El-Keblawy, 2003). Pojam mirovanje ili dormantnost znači da su sjemenke u potpunosti klijave, ali ne mogu dovršiti svoj razvojni proces zbog vanjskih uvjeta kao što su svjetlo, temperatura, kisik i vlaga (Simpson, 1990). Za razliku od poljoprivrednih usjeva, korovi su biljne vrste sa specifičnim karakteristikama koje ih svrstavaju u zasebnu skupinu biljnih vrsta. To su prije svega prilagodljivost, periodičnost u klijanju (dormantnost) te velika sjemenska proizvodnja. Upravo razvijajući dormantno sjeme, korovi se lako prilagođavaju na različite pedo-klimatske uvjete (Šarić, 1991).

Sjeme korova koje tijekom razvoja i sazrijevanja na majčinskoj biljci ulazi u fazu mirovanja predstavlja primarnu, a sjeme koje miruje zbog nepovoljnih uvjeta u tlu predstavlja sekundarnu dormantnost (Hillhorst, 1995). Suprotno od sjemena nekih biljnih vrsta koje ne prolaze primarnu dormantnost, ali ne kliju zbog sekundarne dormantnosti uzrokovane nepovoljnim uvjetima u tlu (Baskin i Baskin, 2004), ambroziji je svojestvena primarna

dormantnost zbog čega sjeme nije sposobno klijati ni u optimalnim uvjetima za klijanje (Baskin i sur., 2000; Anderson i Milberg, 1998). Upravo je poznavanje fenomena primarne dormantnosti sjemena ambrozije ključno kod provođenja biotestova za dokazivanje rezistentnosti. Za potrebe takvih istraživanja koristi se sjeme s biljaka ambrozije koje su preživjele tretman herbicida (suzbijanje), a posjeduju primarnu dormantnost.

Primarna dormantnost sjemena zapravo je širi pojam jer ne opisuje razlog zašto fiziološki zrelo sjeme ne klije i u uvjetima optimalnim za klijanje. Zbog toga je nužno klasificirati, odnosno odrediti tip dormantnosti za određenu biljnu vrstu kako bi se mogla odrediti i metoda poticanja klijavosti (Baskin i Baskin, 2014). Ambrozija razvija endogeni tip dormantnosti za razliku od nekih korovnih vrsta, primjerice *Abutilon theophrasti* Med. (europski mračnjak), kod kojega je dormantnost egzogena i uzrokovana nepropusnom sjemenom ovojnicom (Ali i sur., 2011; Can i sur., 2009). Endogeni tip dormantnosti prisutan kod vrste *A. artemisiifolia* naziva se još fiziološkom dormantnosti, a uključuje biljne hormone regulatore rasta – giberelinsku kiselinu (GA) i apscizinsku kiselinu (ABA) (Baskin i Baskin, 2004; Willemsen i Rice, 1972). Zapravo se radi o „modelu ravnoteže“ između inhibitora (ABA) i promotora (GA) klijanja koji simultano i antagonistički reguliraju, održavaju i uzrokuju završetak dormantnosti. ABA (producirana u embriju) uzrokuje dormantnost još za vrijeme formiranja sjemena, a GA promovira klijanje ne-dormantnog sjemena (Baskin i Baskin, 2014; El-Maarouf-Bouteau i Bailly, 2008). Nadalje, količina GA potrebna za klijanje fiziološki zreloga sjemena ovisna je o količini ABA koja se formira za vrijeme sazrijevanja sjemena. To znači da će sjeme koje u vrijeme sazrijevanja sadržava nisku koncentraciju ABA zahtijevati nižu koncentraciju GA za klijanje (slabo dormantno sjeme) i obrnuto, sjeme s visokom koncentracijom ABA zahtijevat će visoku koncentraciju GA (jako dormantno sjeme). Dakle, dormantnost sjemena uvelike ovisi o omjeru endogenih promotora i inhibitora (Black, 1970; Kelly, 1969; Amen, 1968) pa će do prekida dormantnosti kod ambrozije doći kada sadržaj promotora dominira nad inhibitorima. Treći hormon koji je uključen u proces klijanja sjemena je etilen koji prekida dormantnost i potiče klijavost mnogih biljnih vrsta (Matilla, 2000) na način da smanjuje osjetljivost sjemena na endogenu ABA (Ghassemian i sur., 2000). Osim hormonske ravnoteže, veliku ulogu imaju i enzimi (celulaze, glukonaze i dr.) koji sudjeluju u opuštanju sjemene ovojnice (El-Maarouf-Bouteau i Bailly, 2008).

Fiziološku dormantnost Baskin i Baskin (2004) dijele na visoku, srednju i nisku. Dok je za većinu viših biljaka karakteristična niska fiziološka dormantnost (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006), pretpostavka je da *A. artemisiifolia* posjeduje srednji tip dormantnosti. Naime, Page i Nurse (2015) iznose da druga vrsta ovoga roda, *A. trifida*, također posjeduje srednji tip

fiziološke dormantnosti, a uvjeti koji omogućavaju prekidanje ovog tipa dormantnosti su: oslobođeni embrio daje normalne klijance, hladna stratifikacija u trajanju od dva do tri mjeseca prekida dormantnost, suhim skladištenjem sjemena skraćuje se dužina potrebne stratifikacije i giberelinska kiselina potiče klijanje (Baskin i Baskin, 2004).

Tip srednje fiziološke (endogene) dormantnosti sjemena zahtijeva primjenu određenih predtretmana u laboratorijskim uvjetima kako bi se prekinula dormantnost i potaknulo klijanje sjemena (Page i Nurse, 2015). U poljskim uvjetima sjemenke ambrozije moraju tijekom zimskog razdoblja proći fazu jarovizacije u hladnim i vlažnim uvjetima tla da bi mogle klijati (Dinelli i sur., 2013). Također, u kontroliranim (laboratorijskim) uvjetima sjemenke ambrozije klijanje ostvaruju tek nakon dužeg skladištenja na niskim temperaturama (4 °C) (Willemsen, 1975). Podaci iz literature (Schutte, 2007; Willemsen, 1971), kao i iskustva djelatnika Zavoda za herbologiju (Zagreb), ukazuju da je sjeme ambrozije potrebno skladištiti i do šest mjeseci u navedenim uvjetima kako bi se potaknula klijavost. Međutim, podaci iz literature ukazuju da se dužim skladištenjem sjemena smanjuje njegova vijabilnost (Jaganjac, 2017; Kazinczi i sur., 2008) i takvo sjeme postane neupotrebljivo. Vijabilno sjeme je potrebno dodatno kemijski tretirati dušičnim gnojivima ili sintetskim hormonima kako bi se postignula relativno zadovoljavajuća klijavost. Međutim, vrlo često i nakon provedene stratifikacije i kemijskih tretmana klijavost sjemena ambrozije i dalje bude nezadovoljavajuća. Ovo predstavlja problem kod provođenja pokusa u kojima je potrebno dobiti veliki broj klijavog sjemena - poput testova dokazivanja rezistentnosti. Dodatan problem kod ove korovne vrste je utvrđena intrapopulacijska i interpopulacijska varijabilnost. Ona rezultira time da sjeme s biljaka ambrozije iz iste populacije, ali i sjeme iz različitih populacija, posjeduju visok stupanj funkcionalnog polimorfizma i time različit stupanj klijavosti. Primjerice, u istraživanju o jačini morfološke i funkcionalne varijabilnosti sjemena ambrozije utvrđeno je da sjeme prikupljeno s dvije različite lokacije s deset majčinskih biljaka po populaciji značajno varira u broju klijavog, dormantnog i mrtvog sjemena. Tako je za lokaciju Jastrebarsko utvrđena prosječna klijavost od 87,2 %, dok je za populaciju prikupljenu na lokaciji Popovača klijavost 2,3 puta manja (41,7 %), uz značajno veći postotak mrtvog sjemena (Šoštarčić i sur., 2020). Ova interpopulacijska i intrapopulacijska varijabilnost sjemena ambrozije otežava dobivanje veće količine klijavog sjemena i zahtijeva pronalazak učinkovitih metoda za poticanje klijavosti.

Najčešće korištena metoda prekidanja primarne dormantnosti sjemena ambrozije jest **metoda stratifikacije** koja podrazumijeva skladištenje sjemena ambrozije u hladnim i vlažnim uvjetima. Kod ove metode sjeme se postavlja u vlažni sterilni pijesak u hladnjak, a

dužina stratifikacije varira u ovisnosti o korovnoj vrsti. Kod ambrozije najbolja klijavost postiže se pri stratifikaciji 12 tjedana na 4 °C, a potom naklijavanjem pri temperaturama 10/20, 15/25 ili 20/30 °C na svjetlu, odnosno 20/30 °C u mraku (Wilmensen, 1975). Uspoređujući stratifikaciju na 3, 4, 5 i 10° C autor navodi da se najbolja klijavost postiže stratificiranjem na 4 °C.

Prema dosadašnjim protokolima za utvrđivanje rezistentnih populacija roda *Ambrosia*, poticanje klijavosti standardno se provodi metodom stratifikacije (Harre i sur., 2019; Moretti i sur., 2018; Vink i sur., 2012; Norsworthy i sur., 2010; Westhoven i sur., 2008) u trajanju od 12 tjedana. S obzirom na važnost „skraćivanja“ procesa prekidanja dormantnosti sjemena ambrozije, cilj istraživača je ovaj dugotrajan postupak zamijeniti bržom metodom (Harre i sur., 2019; Karrer, 2016).

Istraživanja u kojima se potiče klijavost sjemena vrsta roda *Ambrosia* poput tretiranja tioureom zastupljeni su u literaturi, međutim rezultati vrlo često ukazuju na ograničen uspjeh (Ballard i sur., 1996; Tieng, 1962), odnosno lošiji od stratifikacije. Novija istraživanja (Harre i sur., 2019; Page i Nurse, 2015) na primjeru vrste *A. trifida* prikazuju obećavajuće rezultate primjenom mehaničkih (izdvajanje embrija iz roške) i kemijskih (giberelinska kiselina) metoda.

Još 60-ih godina prošloga stoljeća Kosikova (1960) navodi dobar uspjeh **mehaničkih metoda** u poticanju klijavosti ambrozije. Ove metode uključuju ručno (brus papirom) skarificiranje vanjske sjemene ovojnice (Willemsen, 1971), odstranjivanje „krune“- najšireg dijela sjemena i izdvajanje embrija iz roške, a s ciljem oslobađanja embrija iz sjemene ovojnice (Harre i sur., 2019). Na ovaj bi se način omogućilo brže i učinkovitije usvajanje vode i poticanje klijavosti (Slika 1).



Slika 1. Primjer sjemena vrste *A. trifida*, lijevo prirodno sjeme, u sredini sjeme s odrezanom krunom i desno oslobođeni embrio (preuzeto iz Page i Nurse, 2015)

Izdvajanjem embrija iz roške vrste *A. trifida* Page i Nurse (2015) ostvarili su čak 96 %-tnu klijavost vijabilnog sjemena i to bez prethodnog stratificiranja. Samo izdvajanje embrija, iako vrlo učinkovita, delikatna je i radno-intenzivna metoda. Ipak, prema autorima je metoda koja značajno brže potiče klijavost od stratifikacije. Iako sistematski pripadaju istom rodu, sjeme vrste *A. trifida* krupnije je od vrste *A. artemisiifolia* pa je pretpostavka da će izdvajanje embrija biti još delikatnije kod obične ambrozije, koja je i cilj ovog rada. Ovo je i glavni razlog zbog kojega do sada nema objavljenih radova o mogućnosti izdvajanja embrija iz roške ambrozije kao metode poticanja klijavosti. Dodatno, ova metoda u navedenom je radu provedena na sjemenu starom 10 mjeseci i na populaciji sakupljenoj s nepoljoprivredne površine. Zbog toga Harre i sur. (2019) dovode u pitanje uspjeh metode na tek sakupljenom sjemenu i na sjemenu s poljoprivrednih površina koje karakteristično posjeduju jači stupanj fiziološke dormantnosti (Schutte i sur., 2012).

Jedna od novijih metoda za brže poticanje klijavosti sjemena jest **metoda kondicioniranja**, predložena od Harre i sur. (2019) za sjeme vrste *A. trifida*. Autori ovu metodu opisuju kao proces koji uključuje rezanje „krune“ sjemena i aeraciju sjemena u otopini i vodi. Ovakav način prekidanja dormantnosti temelji se na poticanju pojačane respiracije sjemena uzrokovane inhibicijskim tvarima unutar embrija i perikarpa sjemena (Tieng, 1962). Također, utvrđeno je da je otpuštanje ugljičnog dioksida (CO₂) te ujedno i poticanje klijavosti dormantnog sjemena uspješnije kod embrija oslobođenog iz sjemene ovojnice nego kod netaknutog sjemena (Davis, 1930). Kisik je važna komponenta u poticanju klijavosti sjemena jer izravno utječe na proces disanja, odnosno stvaranja dovoljne količine energije oksidacijom glukoze i razgradnjom proteina (Aoki i sur., 2006). U uvjetima nedostatka vode aktivira se apscizinska kiselina (ABA), prethodno spomenuta kao jedna od glavnih inhibicijskih komponenti klijanja sjemena (Vukadinović i sur., 2014). Voda je u velikim količinama prisutna već pri embriogenezi, ali se značajno smanjuje starenjem tj. stvaranjem sjemene ovojnice, a njezina količina kod razvijenog sjemena manja je od 0,10 g po gramu suhe tvari. Zbog toga ponovno izlaganje sjemena vodi djeluje stimulacijski na klijanje (El-Maarouf-Bouteau i Bailly, 2008). Kod ove metode nije potrebno obavljati izdvajanje embrija već se sjeme horizontalno zarezuje te se potom stavlja u aeriranu otopinu s ciljem da se nakon 48 sati embrio oslobodi. Autori ovu metodu navode kao učinkovitu, a vremenski i tehnički manje zahtjevnju u usporedbi s dosadašnjim metodama prekidanja dormantnosti. Literaturnih podataka za kondicioniranje sjemena ambrozije također do sada nema.

S obzirom na endogenu uvjetovanu dormantnost sjemena ambrozije, **kemijske metode (hormoni i dušična gnojiva)** također se mogu koristiti za poticanje klijavosti. Najčešće se u svrhu stimulacije klijavosti dormantnog sjemena koristi giberelinska kiselina (GA₃) i etefon. GA je hormon koji stimulacijski djeluje na klijanje sjemena na način da pospješuje apsorpciju vode i rast biljaka, a ujedno i pojačava tolerantnost biljaka na povećani salinitet tla što je dokazano kod vrsta *Arabidopsis thaliana* L. - talijin uročnjak i *Sorghum bicolor* (L.) Moench. – stočni sirak (Zhu i sur., 2019; Sun, 2008). Međutim, korištenje GA₃ iako učinkovito financijski je slabije dostupno jer se cijene za kilogram kreću od 150 – 500 američkih dolara (Camara i sur., 2018). Etefon je tvar koja otpušta etilen, a djeluje stimulacijski na klijanje dormantnog sjemena i sjemena izloženog nepovoljnim biotičkim ili abiotičkim utjecajima poput povećanog saliniteta tla koji inhibira apsorpciju vode te usporava vegetativni rast (Corbineau i sur., 2014; Munns, 2002). Osim navedenih hormona, i kinetin (citokinin) je korišten za prekidanje primarne, ali i sekundarne dormantnosti sjemena ambrozije. Samostalno primijenjen nije značajno potaknuo klijavost ambrozije, ali u kombinaciji s etilenom i giberelinom značajno utječe na klijavost stratificiranog i nestratificiranog sjemena ambrozije (Samimy i Khan, 1983). Citokinin ulazi u interakciju s ostalim hormonima te sudjeluje u prekidanju dormantnosti, a na način da potiče biosintezu etilena, odnosno antagonistčki djeluje na endogenu ABA koja inhibira klijanje (Subbiah i Reddy, 2010).

Osim hormonskih promotora klijanja, za prekidanje dormantnosti sjemena koriste se i dušična gnojiva. Dušik je jedan od najvažnijih prirodnih hranjiva koji biljci omogućava da nesmetano dovrši svoj životni ciklus. Stoga egzogena primjena spojeva koji sadrže dušik poput tiouree i kalijevog nitrata stimulacijski djeluju na klijanje dormantnog sjemena mnogih jednogodišnjih i višegodišnjih korovnih vrsta (Khan i sur., 2017; El-Keblawy i Gairola, 2016). Tako se primjenom kalijevog nitrata (0,2 %) (Puttha i sur., 2014) i tiouree (2 %) (Yamada, 1954) uspješno potaknulo klijanje sjemena bijele lobode - *Chenopodium album* L. (Lemić i sur., 2014). Dušična gnojiva izravno utječu na povećanje propusnosti stanične membrane i metabolizam ugljikohidrata na način da aktiviraju enzime koji sintetiziraju proteine zadužene za poticanje klijavosti sjemena (Ghobadi i sur., 2012). Ipak, tretmani dušičnim gnojivima kod nekih korovnih vrsta poput *Rhynchosia capitata* (Heyne ex Roth) ne utječu stimulacijski na klijanje sjemena (Ali i sur., 2011), stoga je potrebno provjeriti i njihov utjecaj na klijanje sjemena ambrozije.

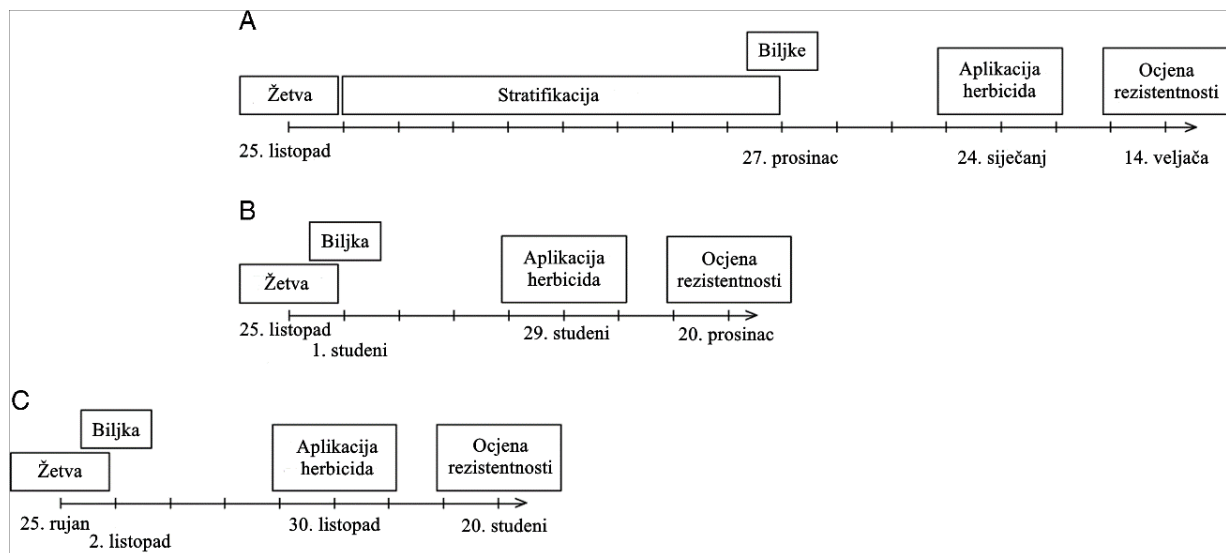
Metoda kojom će se prekinuti primarna dormantnost i potaknuti klijavost sjemena ambrozije mora uz to zadovoljiti i ove biotičke uvjete:

- ostvariti uobičajenu dinamiku (brzinu) klijanja sjemena,
- ostvariti normalan razvoj klijanaca i mladih biljaka ambrozije.

Metode koje bi potaknule klijavost, ali i izazvale ubrzanu dinamiku klijanja ambrozije ne mogu se koristiti kod testova utvrđivanja bioloških parametara klijanja korovnih vrsta, koji su preduvjet za razvoj prognoznih modela nicanja korova (Šoštarčić i sur., 2020). S druge strane, metode koje potiču klijavost, ali izazivaju abnormalan izgled klijanaca i rast biljaka nisu prihvatljive za korištenje pri provođenju biotest metode utvrđivanja rezistentnosti i učinkovitosti herbicida. Osim biotičkih uvjeta, cilj je dobiti brzu, relativno jednostavnu, tehnički nezahtjevnju i financijski prihvatljivu metodu.

Ideju skraćivanja/ubrzanja postupka dobivanja klijavog sjemena, za potrebe testiranja rezistentnosti, shematski su prikazali Harre i sur. (2019), prilagođeno i prikazano na crtežu 1.

Kako bi sjeme vrste *A. trifida* proklijalo, nužno ga je stratificirati u trajanju od 8 tjedana što znači da je potrebno minimalno 112 dana od berbe do dobivanja rezultata (A). Kad bi se pronašla učinkovita metoda koja bi zamijenila stratifikaciju, tad bi se ovaj postupak za duplo ubrzao (B). Također, kad bi se pronašla metoda koja bi omogućila dobivanje klijavog sjemena i iz onih populacija koje se sakupe prije žetve usjeva (C) tad bi se 86 dana ranije dobili podaci o statusu rezistentnosti (C).



A-primjenom stratifikacije od 8 tjedana nakon sakupljanja sjemena podaci o rezistentnosti dobivaju se 112 dana nakon žetve;

B-metoda kojom se dormantnost prekida bez stratifikacije nakon sakupljanja sjemena podaci se dobivaju nakon 57 dana;

C-metoda bez stratifikacije, a koja omogućuje sakupljanje sjemena prije žetve usjeva skratila bi postupak za 86 dana

Crtež 1. Skraćivanje dobivanja klijavog sjemena za potrebe testiranja rezistentnosti (prevedeno i prilagođeno iz Harre i sur., 2019)

Dosadašnji podaci iz literature ukazuju da na sjemenu ambrozije nisu obavljene cjelovite metode poticanja klijavosti. Također, ne postoji standardizirani protokol poticanja klijavosti ove korovne vrste. Ukoliko rezultati dobiveni primjenom tretmana pokažu da je primarnu dormantnost moguće prekinuti u kraćem roku od do sada primjenjivanih metoda, bit će to od iznimne važnosti i koristi za daljnja istraživanja u kojima je potrebno u što kraćem roku potaknuti klijanje sjemena ambrozije kako bi se u realnom vremenu takva istraživanja mogla provoditi.

2. Hipoteze i ciljevi istraživanja

HIPOTEZE

1. Klijavost sjemena ambrozije značajno će se razlikovati u ovisnosti o starosti sjemena - sjeme staro godinu dana (2018) imat će značajno manju klijavost od novoga sjemena (2019).
2. Metodom stratifikacije potaknut će se klijavost sjemena ambrozije starog godinu dana, ali će se zadovoljavajuća klijavost ostvariti kod držanja sjemena u vlažnim i hladnim uvjetima više od osam tjedana. Kod stratificiranja sjemena iz 2018., neovisno o trajanju stratifikacije, neće se ostvariti zadovoljavajuća klijavost..
3. Kemijskim tretmanima potaknut će se klijavost ambrozije obje populacije. Primjenom hormona rasta (giberelinske kiseline i etefona) potaknut će se klijavost ambrozije bolje nego primjenom dušičnih gnojiva (kalijev nitrat i tiourea).
4. Metoda kondicioniranja (vodene otopine) potaknut će klijavost obje populacije ambrozije s jednakim ili boljim učinkom u odnosu na stratifikaciju sjemena.
5. Nicanje, visina i nadzemna masa biljaka iz sjemena tretiranog s hormonima rasta ili dušičnim gnojivima neće se značajno razlikovati u odnosu na netretirano sjeme. Određene blaže deformacije pojavit će se na biljkama tretiranim hormonima rasta.

OPĆI CILJ ISTRAŽIVANJA

Utvrđiti brzu, jednostavnu i učinkovitu metodu koja će skratiti primarnu dormantnost i potaknuti klijavost ambrozije, a neće negativno utjecati na dinamiku klijanja te nicanje i rast ambrozije.

SPECIFIČNI CILJ ISTRAŽIVANJA

- 1.) Utvrđiti klijavost naturalnog sjemena ambrozije obje populacije (2018. i 2019.)
- 2.) Utvrđiti klijavost stratificiranog sjemena ambrozije obje populacije pri pet različitih režima stratifikacije (2, 4, 6, 8 i 12 tjedana)
- 3.) Utvrđiti klijavost i dinamiku klijanja sjemena obje populacije tretiranog hormonima rasta i dušičnim gnojivima
- 4.) Utvrđiti klijavost i dinamiku klijanja kondicioniranog sjemena obje populacije
- 5.) Utvrđiti nicanje, dinamiku nicanja, visinu biljaka i izgled klijanaca ambrozije tretiranih dušičnim gnojivima i hormonima rasta.

3. Materijali i metode rada

Dvofaktorijski pokus prekidanja dormantnosti sjemena ambrozije proveden je u dva dijela: **laboratorijski pokusi** (potpoglavlje 3.2.) i **pokusi u plasteniku** (potpoglavlje 3.3.). U laboratorijskom dijelu pokusa istraživana je različita **dužina hladnog skladištenja sjemena** (potpoglavlje 3.2.1.), **različita dužina stratifikacije** sjemena ambrozije (potpoglavlje 3.2.2.), **kemijske** (potpoglavlje 3.2.3.) te metoda **kondicioniranja** (potpoglavlje 3.2.4.). Tretmani koji su postigli najbolju klijavost ambrozije u laboratorijskom dijelu pokusa postavljeni su i u **plasteničkom dijelu pokusa** (potpoglavlje 3.3.).

3.1. Sakupljanje i priprema sjemena ambrozije

Prvi faktor u istraživanju bila je starost sjemena ambrozije. Sjeme ambrozije sakupljeno je 2018. i 2019. godine, a predstavlja populaciju A i B. Populaciju A predstavlja sjeme iz 2018., a prikupljeno je u Požeško-slavonskoj županiji, Badljevini (45° 30' 42"; 17° 11' 34") te skladišteno **12 mjeseci** u hladnjaku na 4°C. Sjeme populacije B prikupljeno je u Zagrebačkoj županiji, Topolje (45°42' 36"; 16° 20' 24"), u listopadu 2019. te odmah korišteno u istraživanju (bez hladnog skladištenja). Sjeme obje populacije sakupljeno je u fiziološkoj zrelosti (listopad) s više od dvadeset razvijenih biljaka ambrozije te promiješano. Ovako dobiven uzorak sjemena izabran je da odgovarajuće predstavlja genetsku varijabilnost striktno alogamne biljne vrste (Burgos i sur. 2013). Sjeme je prije postavljanja pokusa očišćeno gumenim čistačem sjemena te stavljeno u papirnate vrećice do početka provođenja pokusa.

S obzirom na pretpostavku povezanosti veličine sjemena korova s njihovom klijavošću, kao što je prethodno utvrđeno za vrstu *Ambrosia trifida* (Schutte, 2007), ali i utvrđene morfološke i funkcionalne varijabilnosti sjemena ambrozije (Šoštarčić i sur., 2020), sjeme je ručno kalibrirano tj. sortirano prema veličini i boji (Slika 2 i 3). Također je izuzeto prazno, odnosno sjeme bez embrija, koje je provjereno pritiskanjem sjemena pincetom i uklanjanjem mekanog sjemena (Guillemain i Chauvel, 2011) (Slika 4). Samo je to ujednačeno sjeme i ono sjeme koje vizualno nije imalo oštećenja od predatora korišteno u pokusu. Za obje populacije izračunata je masa tisuću sjemenki prije i nakon kalibracije (Tablica 1).

Tablica 1. Masa tisuću sjemenki ambrozije A i B populacije

Populacija	Masa 1000 sjemenki (g)	
	nekalibrirano sjeme	kalibrirano sjeme
A (2018)	5,25	5,06
B (2019)	4,98	4,78



Slika 2. Sjeme ambrozije populacije A (2018) (lijevo - kalibrirane; desno - nekalibrirane)



Slika 3. Sjeme ambrozije populacije B (2019) (lijevo - kalibrirane; desno - nekalibrirane)



Slika 4. Pritiskanje sjemena pincetom radi uklanjanja mrtvog sjemena iz uzorka

3.2.Laboratorijski pokusi

3.2.1. Hladno skladištenje sjemena

S ciljem utvrđivanja primarne dormantnosti sjemena i utjecaja hladnog skladištenja na klijavost, sjeme obje populacije ambrozije stavljeno je u hladnjak na 4 °C. Odmah nakon berbe (B populacija), odnosno nakon 12 mjeseci hladnog skladištenja (A populacija) sjeme je stavljeno u hladnjak na 0, 2, 4 i 6 mjeseci (B) odnosno 12, 14, 16 i 20 mjeseci (A). Nakon svakog režima hladnog skladištenja, proveden je test klijavosti (*potpoglavlje 3.2.5.*) s ciljem utvrđivanja klijavosti ambrozije.

3.2.2. Stratifikacija sjemena

Drugi faktor u istraživanju bila je stratifikacija sjemena koja je standardni tretman kod poticanja klijavosti ambrozije. Stratificirano je sjeme obje populacije (A i B) na način da je u staklene Petrijeve posude promjera 250 mm i visine 25 mm postavljeno 100 grama steriliziranog kvarcnog pijeska u koji je dodano 50 mL destilirane vode te posijano sjeme ambrozije. Prije stavljanja u sterilni pijesak, sjeme ambrozije je sterilizirano kako bi se spriječila pojava patogena. Sterilizacija sjemena obavljena je potapanjem u 3 %-tni vodikov peroksid u trajanju od šest minuta (Carin i sur., 2019) (Slika 5). Sjeme je potom procijeđeno

kroz prethodno sterilizirano laboratorijsko cjedilo te prije polaganja u sterilni pijesak isprano pet puta destiliranom vodom (Slika 6 i 7).



Slika 5. Sterilizacija sjemena ambrozije



Slika 6. Ispiranje sjemena nakon sterilizacije



Slika 7. Polaganje sjemena u sterilni pijesak

Korišteno je pet režima stratifikacije: 0, 2, 4, 6, 8 i 12 tjedana. Nakon polaganja sjemena u sterilni pijesak, Petrijeve posude su zatvorene parafilmskom trakom kako bi se spriječila evaporacija te postavljene u hladnjak na 4 °C. Ovaj dio istraživanja započeo u studenom 2019. godine. Nakon svakog režima stratifikacije (0-12 tjedana), sjeme ambrozije izvađeno je iz sterilnog pijeska te je postavljen test klijavosti (*potpoglavlje 3.2.5.*).

3.2.3. *Kemijske metode prekidanja dormantnosti ambrozije*

Prema podacima iz literature (Harre i sur., 2019; Page i Nurse, 2015) i iskustvima djelatnika Zavoda za herbologiju, odabrano je 15 različitih kemijskih tretmana za poticanje klijavosti ambrozije (Tablica 2). Svi tretmani primijenjeni su na obje populacije (nestratificirano sjeme). Za poticanje klijavosti ambrozije korištena su dušična gnojiva (kalijev nitrat i tiourea) i sintetski hormoni (giberelinska kiselina i etefon), kao i sve njihove međusobne kombinacije s ciljem utvrđivanja eventualnog antagonističkog ili sinergističkog učinka.

Etefon i giberelinska kiselina u svim su tretmanima korišteni u koncentraciji 1mM, kalijev nitrat 198 mM, a tiourea 263 mM. Tretmani s dušičnim gnojivima korišteni su na dva načina: potapanjem u otopinu u trajanju od 24 sata (Tretmani 6. i 8.) te zalijevanjem sjemena

u Petrijevim posudicama (Tretmani 5. i 7.), a tretmani s hormonima samo zalijevanjem (Tretmani 3.-4., 9.-13., 15.-16.).

Kemijske otopine (Tretmani 9.-16.) pripravljene su na način da su određene količine giberelina, etefona te kalijevog nitrata i tiouree otopljene u destiliranoj vodi kako bi se dobile otopine zadane koncentracije ukupnog volumena 100 mL. Otopina giberelinske kiseline zatim je stavljena u ultrasoničnu kupku (Bandelin, Sonorex TK 52) kako bi se homogenizirala, dok su ostale otopine homogenizirane pomoću magnetske miješalice (BIOSAN, MMS 3000) (Slika 8). Ovaj dio istraživanja započet je u veljači 2020. godine.



Slika 8. Homogeniziranje otopina pomoću ultrasonične kupke (lijevo) i magnetske miješalice (desno)

Tablica 2. Tretmani s dušičnim gnojivima i sintetskim hormonima

R.br.	Tretman	Kemijska formula djelatne tvari	Koncentracija (mM)
1	Destilirana voda	-	-
2	Destilirana voda (24 sata potopljeno)	-	-
3	Etefon*	2-kloretilfosfonska kiselina $C_2H_6ClO_3P$	1
4	Giberelin (GA_3)*	$C_{19}H_{22}O_6$	1
5	Tiourea	CH_4N_2S	263
6	Tiourea (24 sata potopljeno)		263
7	Kalijev nitrat	KNO_3	198
8	Kalijev nitrat (24 sata potopljeno)		198
9	Etefon+ GA_3		1+1
10	GA_3 +Tiourea		1+263
11	Etefon + Tiourea		1 + 263
12	Etefon + KNO_3		1 + 198
13	GA_3 + KNO_3		1 + 198
14	Tiourea + KNO_3		263 + 198
15	Etefon+ GA_3 +Tiourea		1+1+263
16	GA_3 +Tiourea+Etefon+ KNO_3		1+263+1+198

*Gibberellic acid for synthesis (Millipore); Ethrel (SL) – etefon 480 g/L (Bayer)

3.2.4. Kondicioniranje sjemena u vodi i otopini

Sa sjemenki ambrozije odstranjena je vanjska ovojnica ručnom skarifikacijom pomoću brus papira kako bi se omogućilo oslobađanje embrija u procesu kondicioniranja (Slika 9). Korištena je modificirana metoda Harre i sur. (2019) u kojem je i zarezivanjem „krune“ sjemena vrste *A. trifida* oslobođen embrio. Međutim, u ovom pokusu znatno sitnije sjeme ambrozije nije bilo moguće na ovaj način zarezati jer je embrio ambrozije gotovo srastao sa sjemenom ovojnicom pa je izdvajanje embrija iz roške obavljeno ručnom skarifikacijom (Slika 11).



Slika 9. Kondicionirano sjeme ambrozije (desno-skarificirano sjeme; sredina i lijevo-skarificirano sjeme nakon kondicioniranja)

Kondicioniranje je obavljeno na tretmanima s dušičnim gnojivima i sintetskim hormonima koji su značajno potaknuli klijavost ambrozije u prethodnom pokusu (*potpoglavlje 3.2.4.*), a započeto je u ožujku 2020. godine. U destiliranoj vodi otopljene su određene količine GA₃, etefona, GA₃ + etefon i tiouree kako bi se dobile otopine zadane koncentracije ukupnog volumena 200 mL (Tablica 3).

Tablica 3. Kemijski tretmani s dušičnim gnojivima i sintetskim hormonima korišteni metodom kondicioniranja

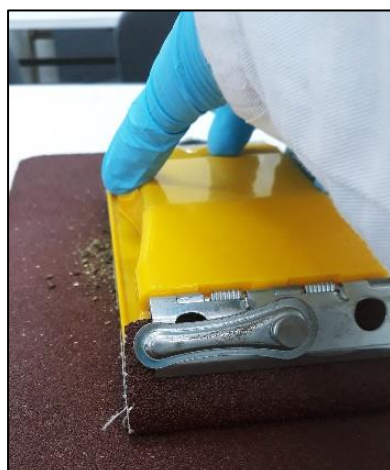
R.br.	Tretman	Kemijska formula djelatne tvari	Koncentracija (mM)
1	Naturalno sjeme (kontrola)	-	-
2	Skarificirano sjeme	-	-
3	Skarificirano kondicionirano	-	-
4	Etefon	2-kloretilfosfonska kiselina C ₂ H ₆ ClO ₃ P	1
5	Giberelin (GA ₃)	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	1
6	Tiourea (24 sata potopljeno)	CH ₄ N ₂ S	263
7	Etefon+GA ₃		1+1

Unutar odmjerne tikvice s otopinom ili destiliranom vodom postavljena je cijev koja dodiruje dno površine, a spojena je na uređaj s omogućenim dotokom zraka (FLAMINGO, Crawfish 1800). Otvor na vrhu posude zatvoren je parafilmskom trakom kako bi se spriječilo isparavanje, ali i zbog stabilizacije cijevi u posudi. Zrak je kroz cijev pušten jednoliko s ciljem

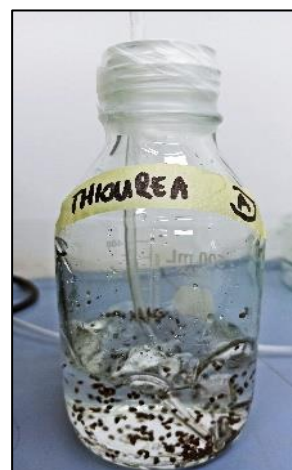
sprječavanja istjecanja vode ili vodene otopine te zbog osiguranja konstantnog (jednolikog) kretanja sjemenki unutar posude (Slika 12). Nakon 48 sati izvađeno je sjeme (embrio) ambrozije iz odmjerne tikvice te je na kondicioniranom sjemenu proveden test klijavosti. . Prije stavljanja u posudu (kondicioniranja), sjeme ambrozije je skarificirano ručno pomoću brus-papira granulacije P 40 (Masin i sur., 2010). Sjeme ambrozije postavljeno je na podlogu od brus papira te je otklanjanje (skarifikacija) sjemene ovojnice obavljeno u nekoliko kraćih ponavljanja kako se oslobođeni embrio ne bi oštetio (Slika 10). Izdvojeni embrio obavijen je i nakon skarifikacije unutarnjom sjemenom ovojnicom. Tako dobiveni uzorak sjemena (Slika 10) steriliziran je vodikovim peroksidom u trajanju od dvije minute kako bi se spriječila pojava patogena. Uzorak sjemena zatim je postavljen u pripremljene vodene otopine ili destiliranu vodu ukupnog volumena 200 mL te je započeta metoda kondicioniranja.



Slika 10. Uzorak ručno skarificiranog sjemena ambrozije (lijevo) i prirodnog sjemena (desno)



Slika 11. Skarifikacija sjemena ambrozije



Slika 12. Kondicioniranje sjemena u vodenoj otopini tiouree

3.2.5. Utvrđivanje klijavosti i dinamike klijanja ambrozije

Utvrđivanje **ukupne klijavosti** ambrozije obavljeno je za sve istraživane metode (stratifikaciju, kondicioniranje i kemijske tretmane) provođenjem testa klijavosti. U jednokratne sterilne plastične Petrijeve posudice postavljeno je po 25 sjemenki ambrozije u 4 ponavljanja, ukupno 100 sjemenki ambrozije po svakom istraživanom tretmanu. Na dno posudice postavljen je sterilni filter papir u koji je dodano 5 mL otopine ili destilirane vode. Prije postavljanja sjemena obavljena je sterilizacija potapanjem sjemena ambrozije u 3 %-tni vodikov peroksid u trajanju od šest minuta. Nakon sjetve Petrijeve posudice su hermetički zatvorene parafilmskom trakom i potom postavljene u klima komoru (Memmert, UF 260) na temperaturni režim 25/15 °C uz 70 % vlage te fotoperiod 12 h : 12 h (dan : noć). Intenzitet osvjetljenosti u komori bila je 40 – 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

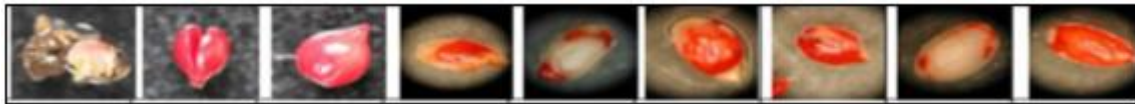
Dinamika klijanja (brzina klijanja) utvrđivana je jednom dnevno očitavanjem broja proklijalih sjemenki. Klijavim sjemenom smatralo se ono s vidljivom radikulom više od 1 mm (Slika 13), a klijavost je utvrđivana sve do trenutka kada pet dana nije utvrđen novi ponik u svakoj Petrijevoj posudi. Istovjetni pokus ponovljen je nakon mjesec dana također s 25 sjemenki ambrozije po tretmanu u 4 ponavljanja. Dinamika klijanja utvrđivana je za tretmane s dušičnim gnojivima i sintetskim hormonima (Tablica 2).



Slika 13. Proklijalo sjeme ambrozije s vidljivom radikulom >1 mm

3.2.6. Utvrđivanje vijabilnosti sjemena ambrozije TTC testom

Nakon obavljenog testa klijavosti utvrđen je postotak vijabilnog sjemena na netretiranom sjemenu obje populacije s ciljem da se isključi mrtvo sjeme. Utvrđivanje vijabilnosti obavljeno je TTC testom (ISTA, 2003). Svo neprokljalo sjeme obje populacije potopljeno je na 12 sati u vodu kako bi se potaknulo bubrenje sjemena i aktivirali procesi disanja. Potom je sjeme vertikalno prerezano na dvije polovice i svaka polovica stavljena je u zasebnu ependorf epruvetu u koju je dodano 1 mL otopine tetrazolium klorida. Nakon 48 sati obavljena je vizualna ocjena vijabilnosti sjemena prema obojenosti embrija (Elias i Garay, 2004). Obojanost embrija definirana je broјčano kao 0, 0,5 i 1 pri čemu 0 predstavlja neobojeni embrio, 0,5 djelomično obojeni, a 1 potpuno obojeni embrio (Slika 14).



Slika 14. Klasifikacija obojenosti za korovnu vrstu *Ambrosia artemisiifolia* (www.ragweed.eu)

Djelomično i potpuno obojani embrio definiran je kao živo sjeme, dok je neobojeni embrio definiran kao mrtvo sjeme. Postotak vijabilnosti sjemena nakon provedenog TTC testa (V_2) utvrđen je prema sljedećoj formuli (Borza i sur., 2007) gdje G predstavlja prokljale sjemenke, T neprokljale sjemenke pozitivne na T test, a N ukupan broj posijanih sjemenki.

$$V_2 = \frac{G+T}{N} * 100 \%$$

3.3. Plastični pokus

Pokus u plasteniku postavljen je s ciljem utvrđivanja nicanja i razvoja mladih biljaka ambrozije iz sjemena tretiranog dušičnim gnojivima i sintetskim hormonima metodom potapanja sjemena i metodom kondicioniranja sjemena iz laboratorijskoga dijela istraživanja. Glavni cilj ovoga dijela istraživanja bio je utvrditi eventualne nepravilnosti u nicanju i početnom rastu ambrozije kao što je zamijećeno u literaturi na biljkama vrste *A. trifida* (Harre i sur., 2019; Tieng, 1962). Korišteno je sjeme obje populacije s onih tretmana koji su značajno potaknuli klijavost ambrozije u laboratorijskom dijelu pokusa. Isti tretmani primijenjeni su na sjeme ambrozije potapanjem i kondicioniranjem (Tablica 4).

Tablica 4. Kemijski tretmani s dušičnim gnojivima i sintetskim hormonima korišteni u plastičnom dijelu pokusa

Tretmani	Koncentracija (mM)	
Naturalno sjeme (kontrola)	destilirana voda	-
	destilirana voda	
Potapanje sjemena^a	etefon	1
	GA ₃	1
	etefon+GA ₃	1+1
	tiourea	263
Kondicioniranje^b	destilirana voda	
	etefon	1
	GA ₃	1
	etefon+GA ₃	1+1
	tiourea	263

^a sjeme prije sjetve potopljeno 24 sata u 50 mL otopine

^b u 200 mL otopine na skarificiranom sjemenu ambrozije (prije postavljanja sjemena na kondicioniranje u destiliranu vodu, sjeme je ručno skarificirano)

Uzgojne posude napunjene su mješavinom sterilne zemlje¹ i supstrata (Potground H) u podjednakom težinskom omjeru (Slika 15). U tako pripremljen medij posijane su kalibrirane sjemenke ambrozije na dubinu od 1,5 cm (Dinelli i sur., 2013; Guillemain i Chauvel, 2011). Sjemenke ambrozije prije sjetve potopljene su u posude na 24 sata u vodene otopine ili destiliranu vodu. Pokus je postavljen u osam repeticija po 20 sjemenki za obje populacije i za svaki istraživani tretman, ukupno 160 uzgojnih posuda. Sjemenke su posijane na način da je najuži dio sjemena iz kojega se razvija radikula usmjeren prema dnu posude (Harre i sur., 2019) (Slika 16). Uzgojne posude zatim su postavljene u plastenik. U tablici 5 prikazane su temperature u plasteniku za vrijeme trajanja pokusa mjerene sandom (HOBO UA-001-08). Za svaku posudu osiguran je i sustav za navodnjavanje (GARDENA, Master) kako bi se održala vlažnost medija (Slika 17).

Tablica 5. Prosječna srednja dnevna temperatura u plasteniku za vrijeme trajanja pokusa

Mjesec	Dekada	°C
Ožujak	I	14
	II	16
	III	13,8
Travanj	I	14,8
	II	16,9
	III	17
Svibanj	I	16,7
	II	16,2
	III	16,7

Procjena utjecaja tretmana na rast ambrozije proveden je subjektivnim i objektivnim mjerenjima. Svaki dan praćeno je nicanje ambrozije, a poniklim biljkama smatrale su se one s potpuno otvorenim kotiledonima (Slika 18). U tri navrata, u razmaku od sedam dana, mjerila se visina hipokotila, visina cijele biljke te subjektivno procjenjivala eventualna oštećenja i deformacije rasta ambrozije.

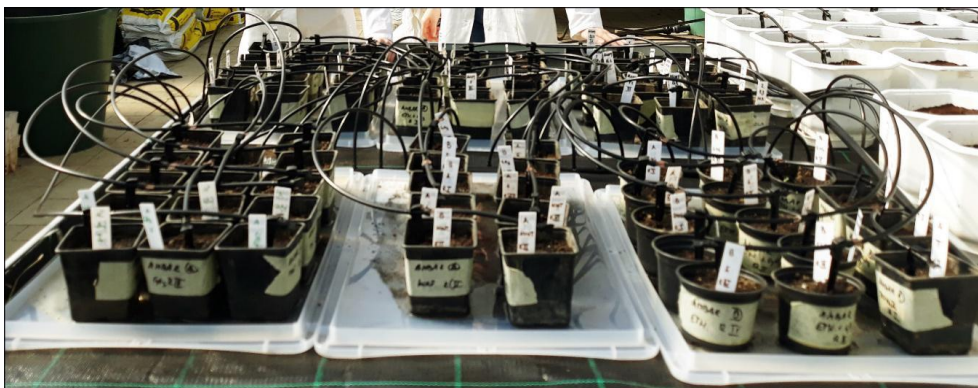
¹ Tlo je uzorkovano s Pokušališta Šašinovec te sterilizirano na 100 °C/30 min kako bi se eliminirale sve sjemenke korova (Dahlquist i sur., 2001). Tlo je neutralnog pH 7.74 (H₂O), 7.04 (KCl), 4,22 % humusa i 2,9 % kalcijevog karbonata. Tip tla je pjeskovita glina.



Slika 15. Priprema medija za sjetvu (lijevo) i sjetva sjemena ambrozije u uzgojne posude (desno)



Slika 16. Mjerenje biljaka ambrozije



Slika 17. Uzgojne posude spojene na sustav za navodnjavanje u plasteniku



Slika 18. Potpuno otvoreni kotiledoni ambrozije

3.4. Statistička obrada podataka

Ukupna klijavost, nicanje, visina hipokotila, visina biljke i masa biljaka obje populacije ambrozije pri istraživanim tretmanima obrađeni su dvosmjernom analizom varijance (tretman i populacija) u programu SAS 8.0. Nakon signifikantnog F testa za usporedbu srednjih vrijednosti korišten je LSD test za $P=0,05$.

Dobiveni podaci o dnevnom utvrđivanju klijavosti korišteni su za prikaz dinamike klijanja koristeći logističku funkciju u statističkom programu Bioassay 97 (Onofri, 2001). Utvrđeno je vrijeme (broj dana) potrebno za ponik 10 % (t_{10}), 50 % (t_{50}) i 90 % (t_{90}) sjemena od ukupno prokljalog sjemena pri svakom istraživanom tretmanu. Dobiveni podaci o prosječnom broju dana ($t_{10}-t_{90}$) potrebnom za klijanje sjemena ambrozije za istraživane tretmane na obje populacije obrađeni su analizom varijance te nakon signifikantnog F testa srednje vrijednosti uspoređene su LSD testom za $P=0,05$.

Pokus (laboratorijski) je ponovljen dva puta (četiri repeticije za svaki istraživani tretman). Paretovim t-testom (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest2/>) je analizirana varijabilnost između ponovljenih pokusa, a s obzirom da nije utvrđena statistički značajna razlika, podaci su analizirani u osam repeticija.

4. Rezultati rada

4.1.Laboratorijski pokusi

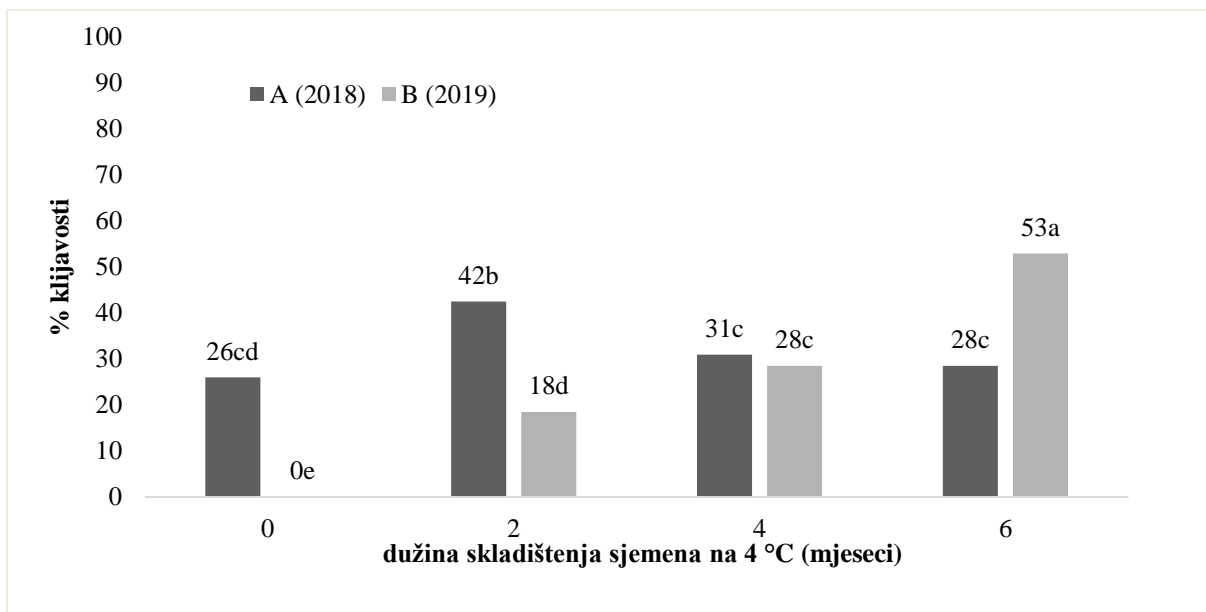
U tablici 6. prikazani su rezultati analize varijance za klijavost sjemena ambrozije pri istraživanim tretmanima. Klijavost ambrozije značajno se razlikovala ovisno o dužini skladištenja sjemena, stratificiranja sjemena, korištenom kemijskom tretmanu te metodi kondicioniranja. Utvrđena je značajna razlika u klijavosti između dvije populacije na svim tretmanima. Također je utvrđena signifikantna interakcija skladištenje sjemena x populacija, kemijski tretman x populacija, stratifikacija x populacija te kondicioniranje x populacija.

Tablica 6. Analiza varijance za klijavost ambrozije pri istraživanim tretmanima

Izvor varijabilnosti	n-1	F_{exp}			
		Skladištenje sjemena	Stratifikacija	Kemijski tretmani	Kondicioniranje
Tretman (T)	19	0,001	<0,01	<0,01	<0,01
Populacija (P)	1	<0,01	<0,01	0,007	<0,01
T x P	19	<0,01	0,022	<0,01	<0,01

4.1.1. Klijavost ambrozije u ovisnosti o dužini skladištenja sjemena

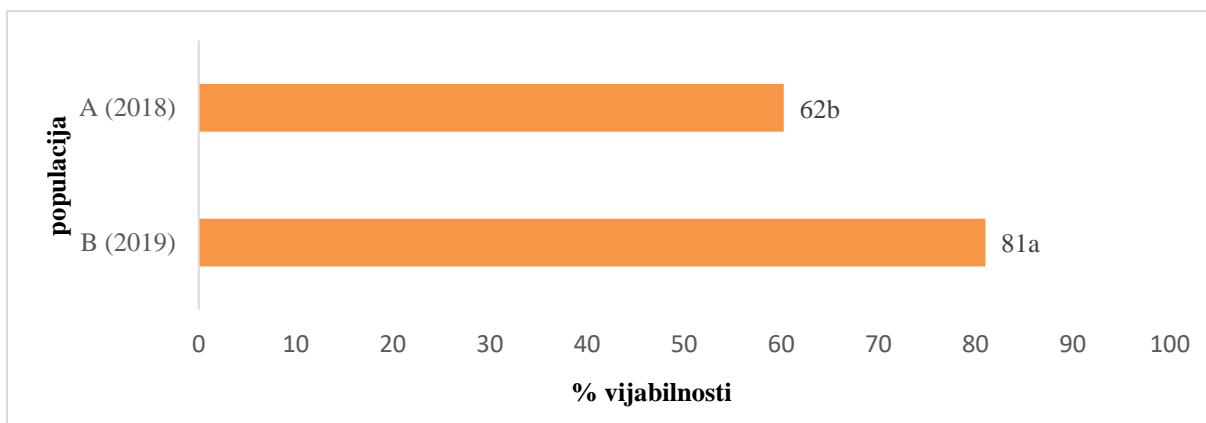
Klijavost sjemena ambrozije značajno se razlikovala u ovisnosti o dužini hladnog skladištenja sjemena na 4 °C (Grafikon 1). Kod populacije B (2019), neposredno nakon sakupljanja sjemena (0) nije proklijala nijedna sjemenka ambrozije. Povećanjem dužine skladištenja klijavost se značajno povećavala, a najveća klijavost utvrđena je šest mjeseci nakon skladištenja kad je proklijalo 53 % sjemena. Suprotan trend utvrđen je kod A populacije (2018) gdje je sjeme u trenutku testiranja bilo staro 12, 14, 16 i 20 mjeseci. Kod ovog sjemena najveća klijavost utvrđena je 2 mjeseca nakon postavljanja pokusa (14 mjeseci staro sjeme) gdje je proklijalo 42 % sjemena. Klijavost se smanjivala s dužinom skladištenja sjemena pa je na sjemenu starom 16 i 20 mjeseci klijavost bila značajno manja nego na sjemenu starom 12 i 14 mjeseci.



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=8,16\%$); u trenutku postavljanja pokusa, sjeme populacije B bilo je skladišteno 0, 2, 4 i 6 mjeseci, a sjeme populacije A 12, 14, 16 i 20 mjeseci

Grafikon 1. Klijavost sjemena obje populacije ambrozije 0, 2, 4 i 6 mjeseci od postavljanja pokusa

Nakon četiri mjeseca hladnog skladištenja, neprokljalo sjeme obje populacije podvrgnuto je TTC testu radi utvrđivanja vijabilnosti sjemena. Kod populacije B utvrđeno je više vijabilnih sjemenki nego kod populacije A (Grafikon 2).



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=9,64\%$)

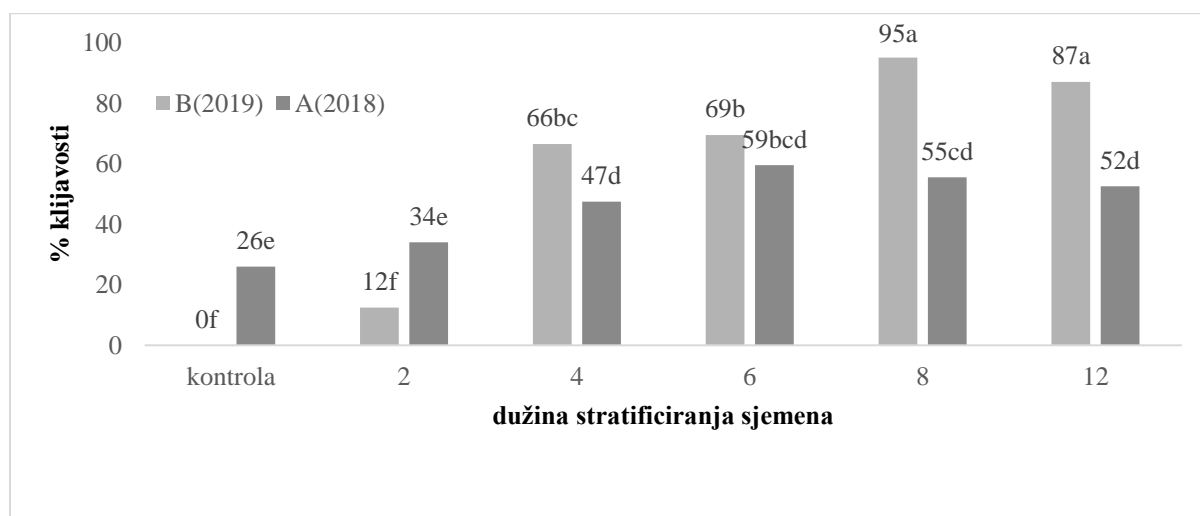
Grafikon 2. Ukupna vijabilnost sjemena ambrozije ovisno o starosti populacije

4.1.2. Klijavost stratificiranog sjemena ambrozije

Klijavost ambrozije signifikantno se razlikovala između populacija ovisno o trajanju režima stratifikacije (Grafikon 3). Kod starijeg sjemena (A) prosječna klijavost je iznosila 37 % dok je stratificirano sjeme iz B populacije ostvarilo gotovo dvostruko bolju klijavost (63 %).

Kod sjemena iz 2019. godine (B) najveća klijavost utvrđena je nakon 8 (95 %) i nakon 12 tjedana stratifikacije (87 %). Kod kraćeg držanja stratificiranog sjemena klijavost je bila značajno manja. Nakon 4 i 6 tjedana prosječna klijavost je iznosila 66 % i bila je značajno veća nego kad se sjeme stratificiralo 0 i 2 tjedna. Kod nestratificiranog sjemena nije utvrđena ni jedna proklijala sjemenka ambrozije.

Nasuprot tome, kod starijeg sjemena (A) podjednaka klijavost utvrđena je nakon 4, 6, 8 i 12 tjedana stratifikacije i prosječno je utvrđeno od 47 % do 59 %, ovisno o režimu stratifikacije. Samo je kod dva tjedna stratifikacije, kod ove populacije, klijavost bila značajno smanjena.



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=12,71$ %)

Grafikon 3. Klijavost sjemena ambrozije obje populacije (A i B) pri različitim režimima stratifikacije (0, 2, 4, 6, 8 i 12 tjedana)

4.1.3. *Klijavost sjemena ambrozije pri kemijskim tretmanima*

Klijavost sjemena ambrozije obje populacije značajno se razlikovala primjenom različitih kemijskih tretmana (Grafikon 4). Prosječno je sjeme populacije B (2019) postignulo veću klijavost (45 %) te se statistički značajno razlikuje od populacije A (2018), gdje je prosječna klijavost bila 44,19 %.

Kod obje populacije najveća klijavost ambrozije utvrđena je kod tretiranja sjemena etefonom i etefonom + GA₃. Primjenom ovih tretmana, kod populacije A utvrđena je prosječna klijavost od 78 - 85 %, a kod populacije B 88 - 95 %. Također kod sjemena B populacije nije utvrđena signifikantna razlika u klijavosti kad je sjeme tretiranom s etefon + KNO₃ (78 %) u odnosu na gore spomenute tretmane – etefon i etefon + GA₃. Kod sjemena A populacije tretiranje tiouream (74 %) također nije imalo manju klijavost u usporedbi s navedenim tretmanima. Na svim ostalim tretmanima, kod obje populacije, utvrđena je značajno manja klijavost sjemena ambrozije.

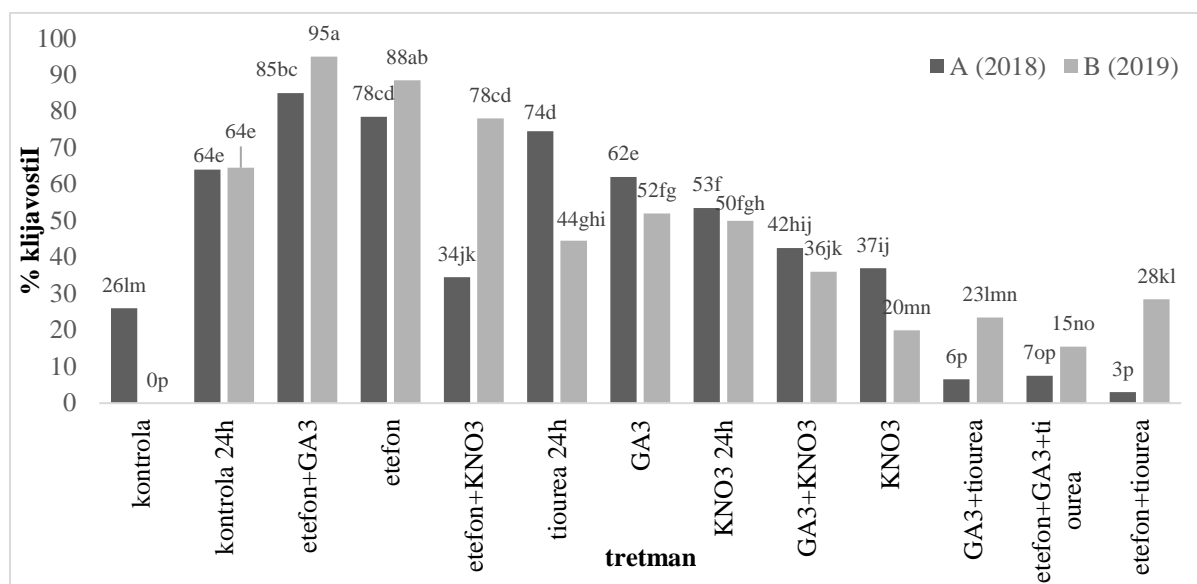
Iako je klijavost bila značajno smanjena u odnosu na gore navedene tretmane, potapanjem sjemena u vodu na 24 sata značajno se poboljšala klijavost ambrozije kod obje populacije (64-64 %) u odnosu na netretirano sjeme ambrozije (kontrola). Samo je još tretiranjem s GA₃ (62 %) kod sjemena A populacije ostvarena slična klijavost koja se nije značajno razlikovala od klijavosti ambrozije potopljene u vodi na 24 sata.

Na svim ostalim tretmanima, na obje populacije, utvrđena je klijavost manja od 60 %. Ipak je utvrđena značajno bolja klijavost u odnosu na netretirano (kontrolno) sjeme na tretmanima: etefon + KNO₃, GA₃, GA₃ + KNO₃, KNO₃, KNO₃ 24 sata i tiourea 24 sata za populaciju A te GA₃, KNO₃ 24 sata, tiourea 24 sata i GA₃ + KNO₃ za populaciju B.

Statistički značajna razlika u klijavosti ambrozije između populacija utvrđena je tretiranjem sjemena s GA₃ jer je kod starijeg sjemena (A) utvrđena značajno bolja klijavost (62 %) u odnosu na mlađe sjeme (52 %).

Najniža klijavost populacije A utvrđena je kod tretiranja sjemena ambrozije s etefonom i tiouream (3 %), etefon + GA₃ + tiourea (7%) te GA₃ + tiourea (6 %). Klijavost na ovim tretmanima je bila niža od netretiranog (kontrolnog) sjemena. Slično je i kod B populacije gdje je najniža klijavost utvrđena tretiranjem sjemena ambrozije etefon + GA₃ + tiourea (15 %) te GA₃ + tiourea (23 %). Kod populacije B tretiranjem sjemena s KNO₃ (20 %) također se klijavost ambrozije nije značajno razlikovala od navedenih tretmana.

U grafikonu nije prikazana klijavost sjemena ambrozije tretiranih s tiourea + KNO₃ i GA₃ + tiourea + KNO₃ (Tablica 2) jer na navedenim tretmanima nije utvrđena ni jedna prokljajala sjemenka ambrozije.



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=8,40\%$)

Grafikon 4. Klijavost sjemena ambrozije obje populacije (A i B) primjenom kemijskih tretmana

4.1.4. Dinamika klijanja sjemena ambrozije pri različitim kemijskim tretmanima

Analizom varijance utvrđena je značajna statistička razlika u broju dana potrebnih za ponik 10 %, 50 % i 90 % sjemena od ukupnog broja prokljalog sjemena tretiranih različitim kemijskim tretmanima (Tablica 7). Također je utvrđena značajna razlika u dinamici klijanja između dvije populacije sjemena ambrozije tretiranih kemijskim tretmanima. Prosječan broj dana (d) potreban za ponik 10 %, 50 % i 90 % sjemena manji je kod populacije B (4,1, 7,3 i 14,1) u odnosu na populaciju A (5,4, 9,6 i 19,1 d).

Tablica 7. Analiza varijance za dinamiku klijanja ambrozije pri istraživanim tretmanima

Izvor varijabilnosti	n-1	F _{exp}		
		t ₁₀	t ₅₀	t ₉₀
Tretman (T)	12	<0,001	<0,001	<0,001
Populacija (P)	1	<0,001	<0,001	<0,001
T x P	12	<0,001	<0,001	<0,001

Zbog utvrđene signifikantne interakcije tretman x populacija (Tablica 7) podaci o dinamici klijanja (t_{10} , t_{50} i t_{90}) prikazani su za obje populacije i za sve tretmane (Tablica 8). Dinamika klijanja prikazana je za 10 tretmana kod kojih je utvrđena prosječna klijavost > 50 %.

Tablica 8. Procijenjeni broj dana potrebnih za ponik 10 % (t_{10}), 50 % (t_{50}) i 90 % (t_{90}) sjemena od ukupnog broja proklijalog sjemena ambrozije obje populacije

TRETMAN	POPULACIJA					
	A (2018)			B (2019)		
	t_{10}	t_{50}	t_{90}	t_{10}	t_{50}	t_{90}
Kontrola	2,5a	6,2a	16,5ab	4,5bc	10,4f	25,1e
Kontrola 24 sata	12,4e	16,1f	21,4de	3,9b	7,2d	13,5c
Etefon+GA ₃	2,3a	6,4ab	18,4bc	1,2a	2,5a	5,9a
Etefon+KNO ₃	4,1b	8,6c	19,1bcd	5,7c	8,9e	14,2c
Etefon	2,7a	6,8ab	18,5bc	1,8a	4,6bc	11,9bc
GA ₃	3,3ab	7,6bc	17,8bc	2,4a	5,4c	12,4bc
GA ₃ +KNO ₃	3,4ab	7,0ab	14,8a	7,8d	10,5f	14,1c
KNO ₃	5,6c	10,0d	20,1cde	8,5d	11,1f	14,4c
KNO ₃ 24 sata	8,7d	13,9e	22,5e	4,4b	8,8e	19,6d
Tiourea 24 sata	9,2d	13,8e	21,8de	1,2a	3,5ab	10,2b

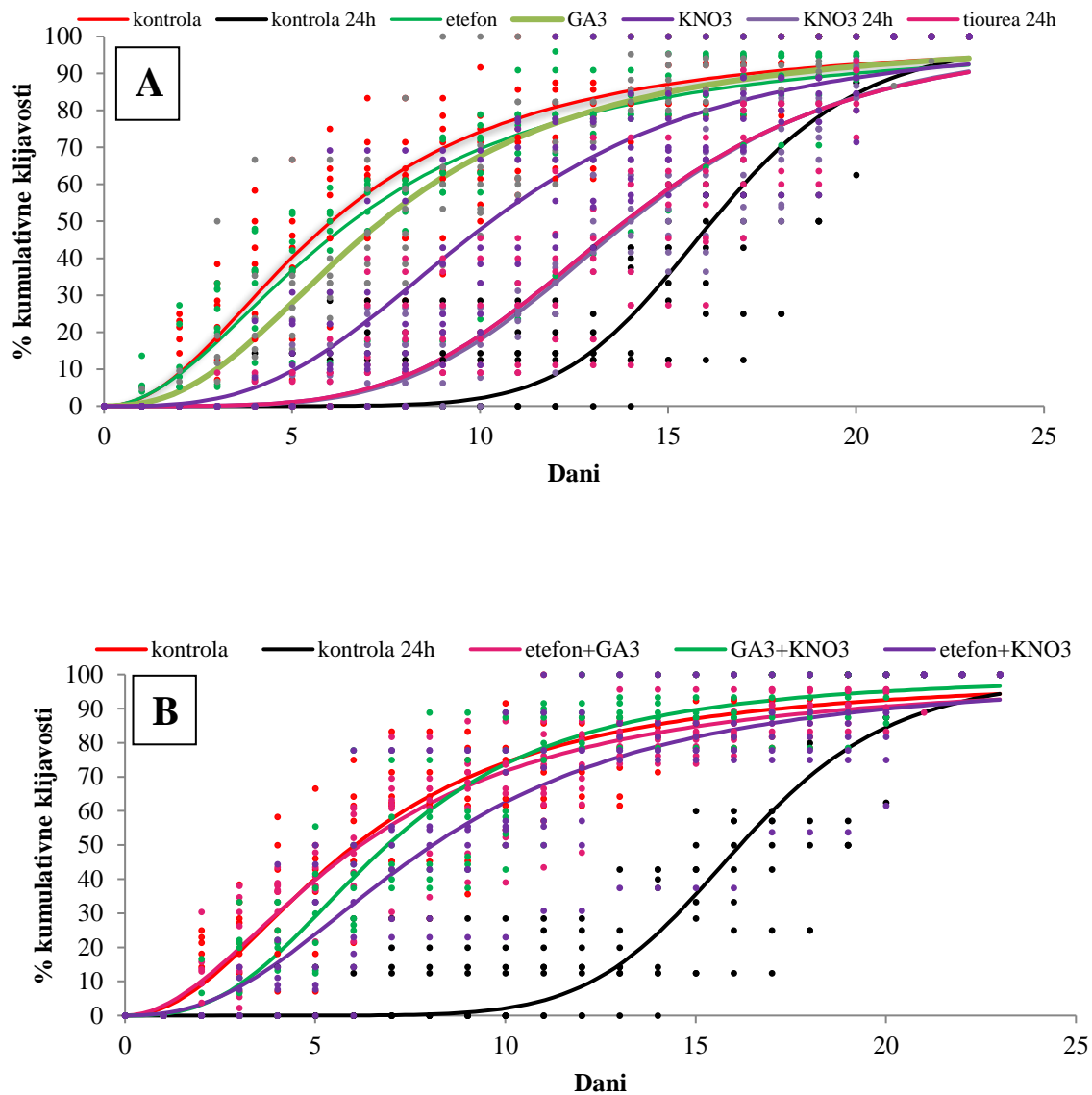
vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri $P=0,05$; $LSD_{(T_{10})}=1,24$ dana; $LSD_{(T_{50})}=1,33$ dana; $LSD_{(T_{90})}=2,79$ dana

Kemijski tretmani utjecali su na početnu klijavost (t_{10}) sjemena ambrozije obje populacije. Na netretiranom sjemenu klijavost je započela nakon prosječno 2,5 dana (d) kod populacije A, odnosno za 4,5 d kod populacije B. Ova sporija početna klijavost kod B populacije je i statistički opravdana. Polovica klijanja (t_{50}) kod populacije A uslijedila je prosječno nakon 6,2 dana, a kod populacije B nakon 10,4 dana što je također statistički opravdano. I kraj klijanja (t_{90}) je imao sličan trend bržeg klijanja kod populacije A (16,5 d) u odnosu na populaciju B (25,1 d).

Kod potapanja sjemena ambrozije u vodu na 24 sata utvrđeno je suprotno jer su sva tri parametra dinamike klijanja (t_{10} , t_{50} i t_{90}) bili značajno brži kod B populacije u odnosu na A populaciju. Također je utvrđen suprotni trend, odnosno kod B populacije je potapanjem

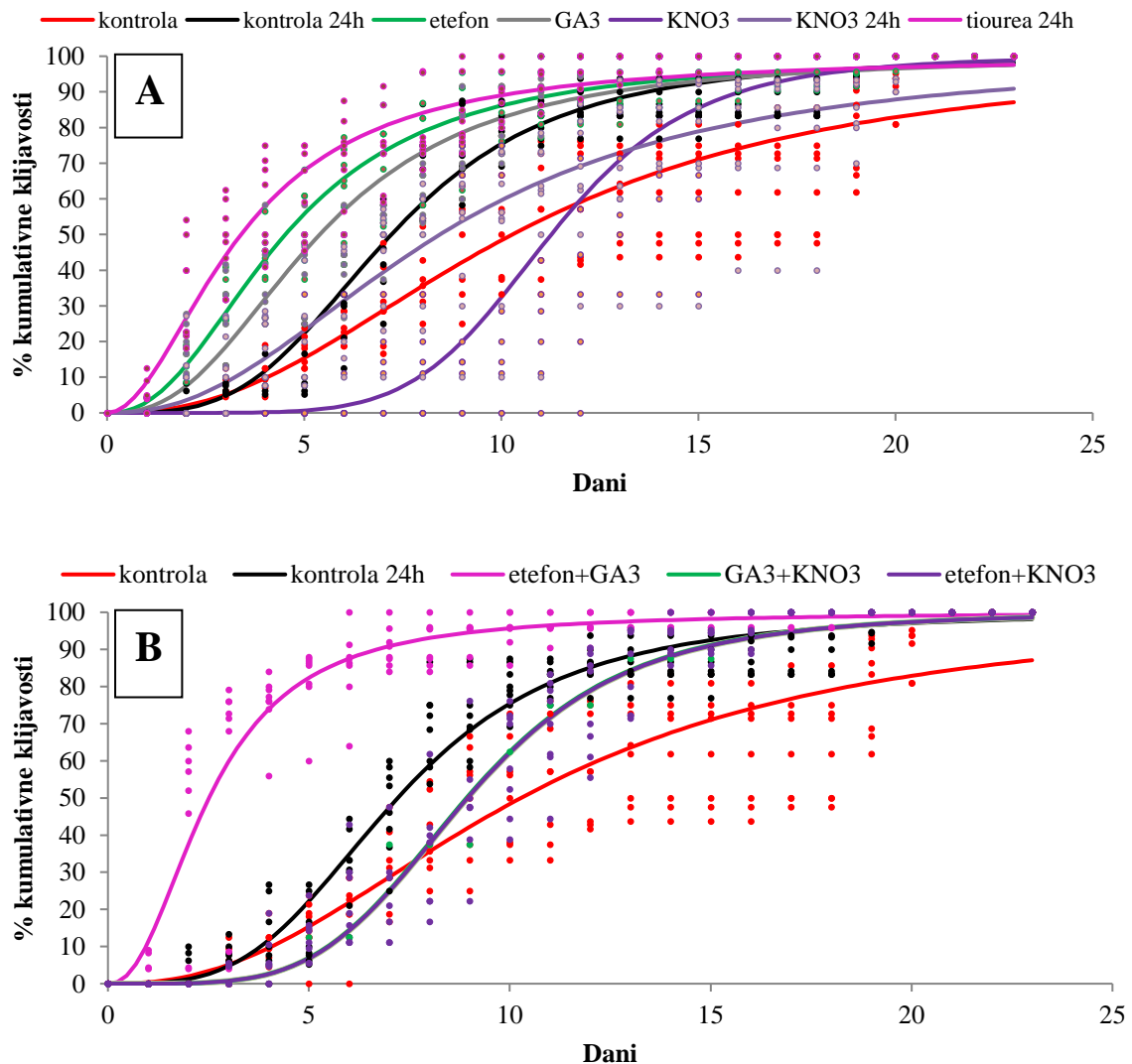
sjemena u vodu na 24 sata značajno ubrzana dinamika klijanja, a kod A populacije značajno usporena dinamika klijanja sjemena ambrozije.

Kod A populacije ovi tretmani nisu ubrzali niti usporili početak klijanja (10 %) u odnosu na kontrolni tretman: etefon + GA₃, etefon + KNO₃, etefon, GA₃, GA₃ + KNO₃. Sredina klijanja (50 %) nije se statistički razlikovala u odnosu na netretirano sjeme na tretmanima: etefon + GA₃, etefon, GA₃ te GA₃ + KNO₃ (Grafikon 5).



Grafikon 5. Dinamika klijanja sjemena ambrozije (A populacija) nakon tretiranja kemijskim tretmanima. Linija predstavlja model (logistička funkcija), a točkice izmjerene vrijednosti(A-dinamika klijanja na pojedinačnim tretmanima; B-dinamika klijanja na kombinacijama tretmana)

Kod B populacije početak klijavosti ambrozije (t_{10}) bio je jednak netretiranom sjemenu samo na tretmanima: etefon + KNO_3 i KNO_3 24 sata. Ostali tretmani su značajno ubrzali klijavost ambrozije u odnosu na kontrolni tretman. Sredina klijanja ambrozije (t_{50}) ove populacije nije ubrzana ni usporena na sljedećim tretmanima: etefon + KNO_3 , GA_3 + KNO_3 , KNO_3 te KNO_3 24 sata. Ostali tretmani su ubrzali sredinu klijanja ambrozije. Kraj klijanja (t_{90}) kod ove populacije je bio ubrzan na svim istraživanim tretmanima u odnosu na netretirano sjeme (Grafikon 6).



Grafikon 6. Dinamika klijanja sjemena ambrozije (B populacija) nakon tretiranja kemijskim tretmanima. Linija predstavlja model (logistička funkcija), a točkice izmjerene vrijednosti (A-dinamika klijanja na pojedinačnim tretmanima; B-dinamika klijanja na kombinacijama tretmana)

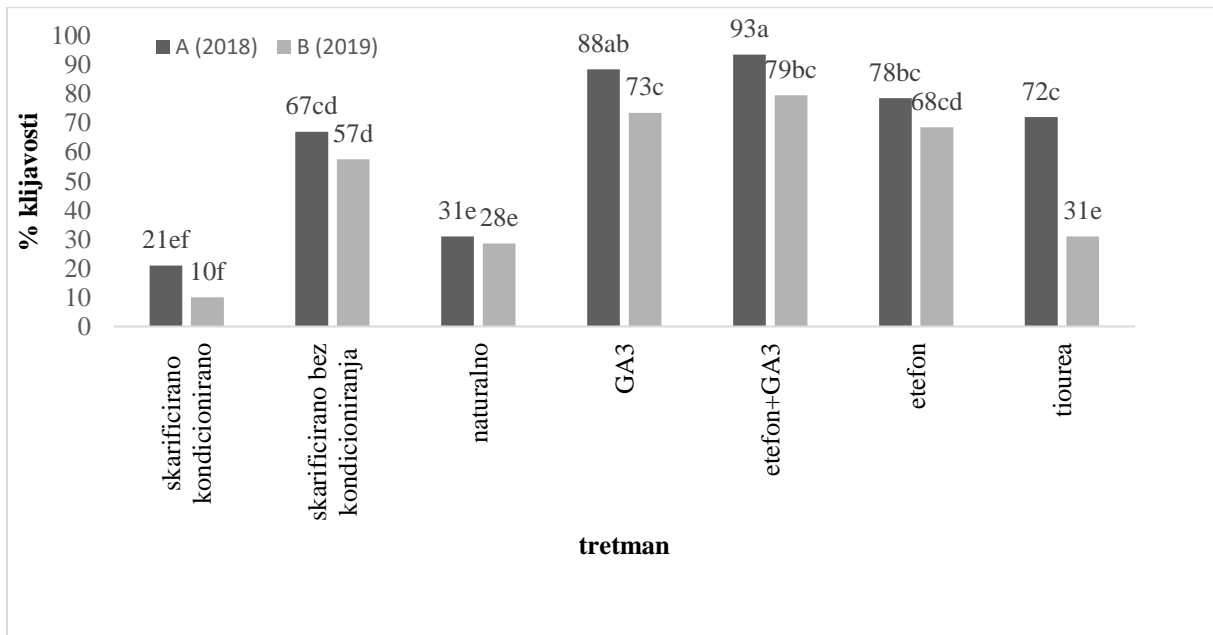
4.1.5. Klijavost kondicioniranog sjemena ambrozije

Klijavost kondicioniranog sjemena značajno se razlikovala u ovisnosti o starosti sjemena (populaciji), ali i u ovisnosti o primijenjenom tretmanu u aeriranoj vodenoj otopini (kondicioniranje) (Grafikon 7). Prosječno je na starijoj populaciji (A) utvrđena značajno veća klijavost (64 %) u odnosu na mlađu (B) populaciju (49 %). Kod obje populacije, vodene otopine s hormonskim regulatorima i dušičnim gnojivima značajno su poboljšale klijavost u odnosu na sjeme koje je kondicionirano samo u vodi.

Kod starije populacije (2018) najveća klijavost ostvarena je na sjemenu kondicioniranom u otopini etefon + GA₃ (93 %) i GA₃ (88 %). Kondicioniranjem sjemena u vodenoj otopini etefona i tiouree ostvarena je značajno niža klijavost (78 % i 72 %) u odnosu na vodenu otopinu etefon + GA₃.

Kod mlađe populacije (2019) nije utvrđena značajna razlika u klijavosti sjemena ambrozije kondicioniranom u vodenim otopinama GA₃, etefon + GA₃ i etefon dok je kondicioniranjem u otopini tiouree ostvarena značajno niža klijavost.

Kod obje populacije samo skarifikacijom sjemena (bez kondicioniranja) ostvarena je klijavost koja se nije značajno razlikovala od kondicioniranog sjemena u otopinama etefona i tiouree.



vrijednosti označene istim slovom statistički se ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=11,14\%$)

Grafikon 7. Klijavost kondicioniranog sjemena ambrozije obje populacije

4.2. Plastenički pokus

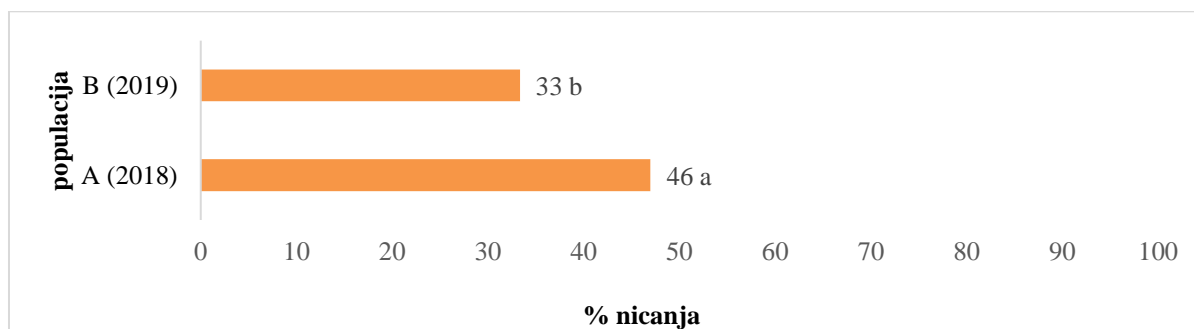
U tablici 9. prikazani su rezultati analize varijance za nicanje i početni rast ambrozije pri istraživanim tretmanima u plasteničkom dijelu pokusa. Masa i visina hipokotila značajno su se razlikovali ovisno o primijenjenom kemijskom tretmanu te metodi kondicioniranja. Utvrđena je značajna razlika u nicanju ambrozije između dvije populacije na svim tretmanima. Također je utvrđena signifikantna interakcija kemijski tretman x populacija za mjereni parametar svježe mase biljaka uzgajanih u plasteniku kao i značajna interakcija kondicioniranje x klijavost i kondicioniranje x svježa masa biljaka. Dužina hipokotila značajno se razlikovala primjenom kemijskih tretmana i metode kondicioniranja sjemena.

Tablica 9. Analiza varijance za nicanje i početni rast kondicioniranog i sjemena tretiranog s dušičnim gnojivima i hormonima

Izvor varijabilnosti	Kemijski					Kondicioniranje			
	n-1	nicanje	svježa masa	visina hipokotila	visina biljke	nicanje	svježa masa	visina hipokotila	visina biljke
Tretman (T)	20	ns	**	**	ns	**	**	**	ns
Populacija (P)	1	**	**	ns	**	ns	ns	ns	ns
T x P	20	ns	**	ns	ns	**	**	ns	ns

4.2.1. Nicanje ambrozije nakon tretiranja i kondicioniranja sjemena hormonima rasta i dušičnim gnojivima

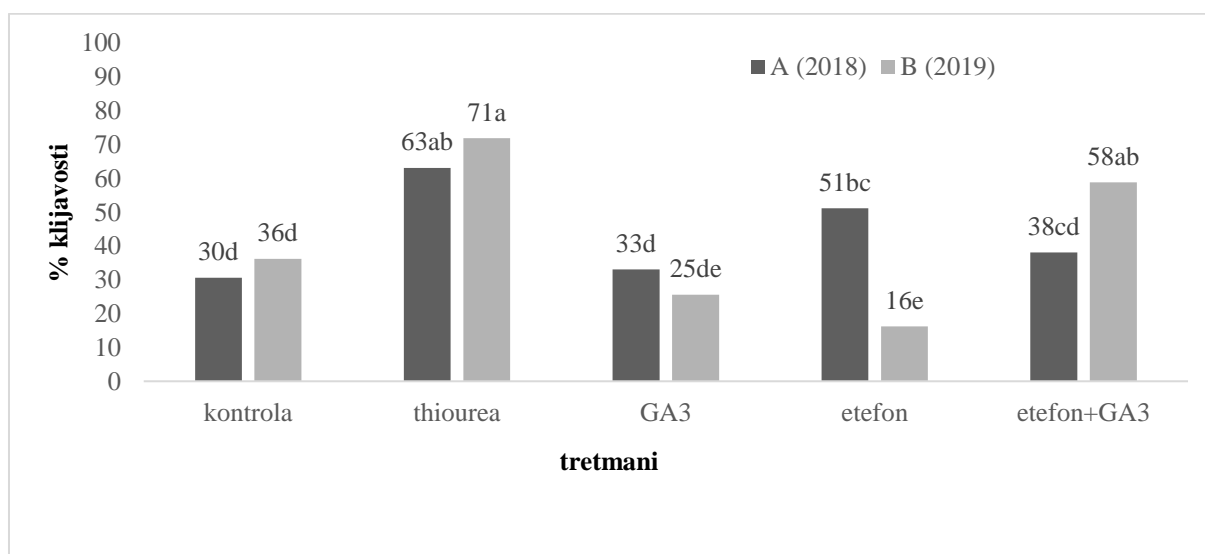
Nicanje ambrozije značajno se razlikovalo između populacija, a neovisno o primijenjenom kemijskom tretmanu (Grafikon 8). Kod starijeg sjemena (A) prosječno nicanje je iznosilo 46 % dok je sjeme iz B populacije ostvarilo značajno manju prosječnu klijavost (33 %).



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=5,6\%$)

Grafikon 8. Ukupno nicanje sjemena ambrozije tretiranog s hormonima i dušičnim gnojivima

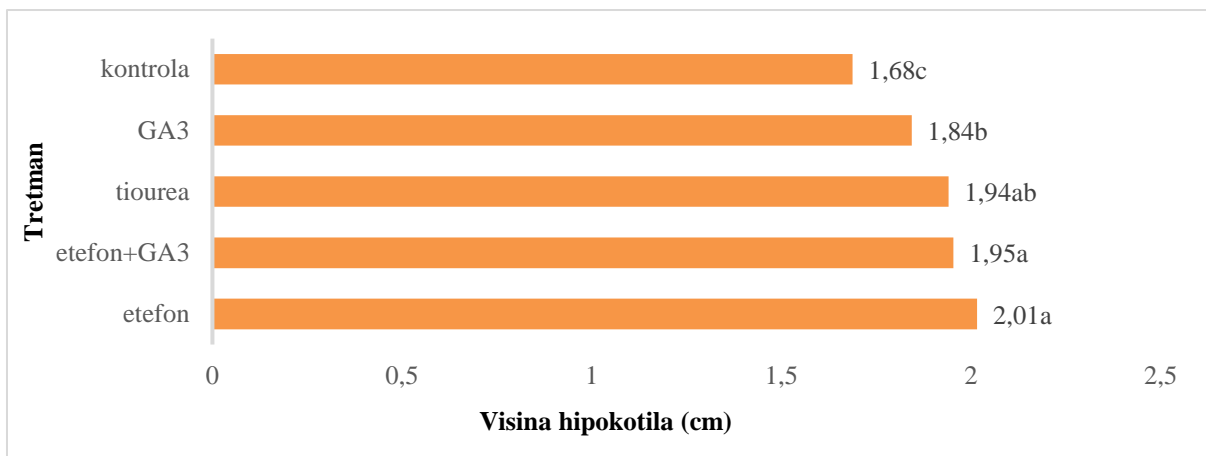
Nicanje ambrozije također se značajno razlikovalo između populacija ovisno o primijenjenom tretmanu kondicioniranja (Grafikon 9). Kod starijeg sjemena (A) prosječno nicanje je iznosilo 43 % dok je sjeme iz B populacije ostvarilo manju prosječnu klijavost (41 %). Najbolja klijavost obje populacije bila je na sjemenu kondicioniranom u vodenoj otopini tiouree (63 % i 71 %). Od navedenog tretmana samo se statistički ne razlikuje tretman etefon + GA₃ za sjeme iz 2019. godine (58 %). Ostali tretmani nisu značajno utjecali na klijavost sjemena u odnosu na sjeme kondicionirano u aeriranoj vodi (kontrola).



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=13,92\%$)

Grafikon 9. Ukupno nicanje kondicioniranog sjemena ambrozije obje populacije

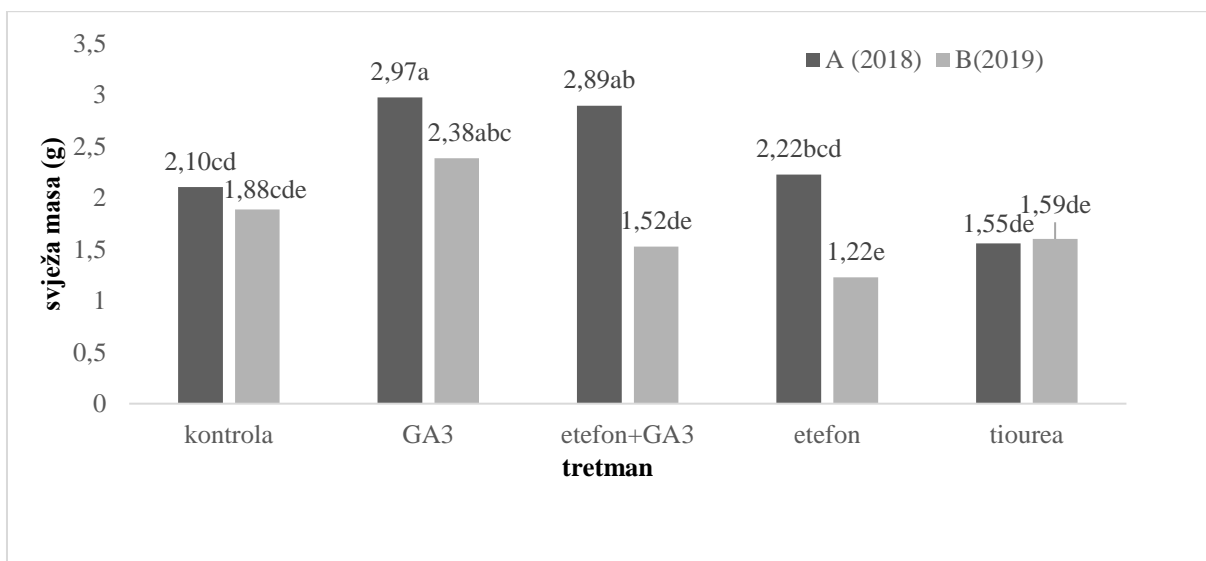
Dužina hipokotila i svježa masa biljaka ambrozije značajno se razlikovala između populacija, ovisno o kemijskom tretmanu (Grafikon 10). Samo je visina biljaka bila značajno različita između populacija neovisno o primijenjenom kemijskom tretmanu. Kod starije populacije (A) prosječna dužina hipokotila iznosila je 1,92 cm dok je kod B populacije prosječna dužina iznosila 1,8 cm. Kod populacije A najduži hipokotil zabilježen je primjenom etefona (2,13 cm), a statistički se ne razlikuje od tretmana na kojem je primijenjena tiourea (2,01 cm). Dužina hipokotila na tretmanu GA₃ (1,81 cm) statistički se značajno ne razlikuje od kontrolnog tretmana (1,66 cm). Dužina hipokotila populacije B nije značajno različita primjenom tiouree i GA₃ (1,85 i 1,87 cm), dok je primjena tretmana etefon i etefon + GA₃ značajno utjecala na dužinu hipokotila biljaka ambrozije (1,90 i 1,92 cm) u odnosu na kontrolni tretman.



vrijednosti označene istim slovom statistički se ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=0,09$ cm)

Grafikon 10. Utjecaj tretmana potapanja sjemena na visinu hipokotila (cm) biljaka ambrozije

Na mjerenom parametru svježa masa biljaka utvrđena je interakcija tretman x populacija (Grafikon 11). Na tretmanu GA_3 na obje populacije izmjerena je najveća svježa masa ambrozije (2,97 i 2,38 g). Od navedenog tretmana nije se razlikovala primjena etefon + GA_3 za populaciju A (2,89 g). Ostali tretmani nisu signifikantno različiti u odnosu na kontrolne tretmane A i B populacije (2,10 i 1,88 g).

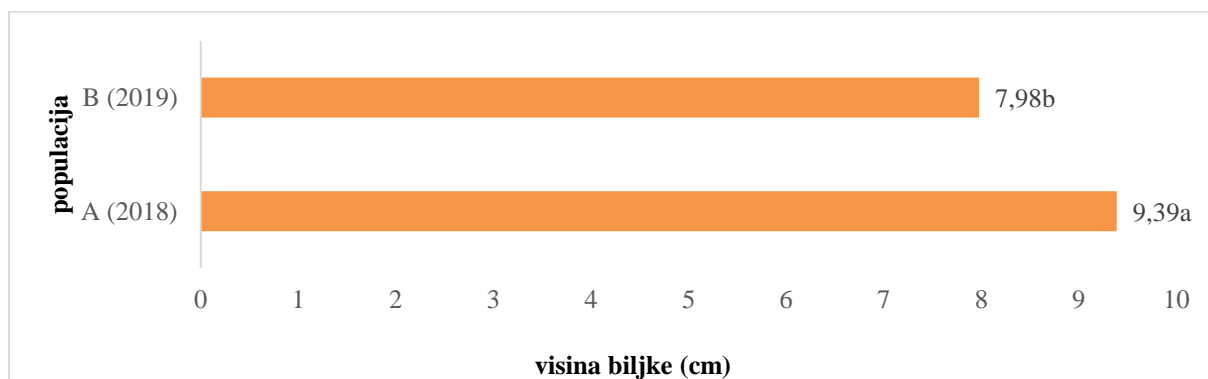


vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=0,70$ g)

Grafikon 11. Utjecaj tretmana potapanja sjemena na svježu masu (g) biljaka ambrozije

Visina biljaka ambrozije bila je signifikantno različita između populacija (Grafikon 12). Prosječna visina biljaka populacije A iznosila je 9,39 cm, a za populaciju B 7,98 cm. Najveća visina biljke ambrozije starije populacije A izmjerena je na tretmanu etefon + GA_3

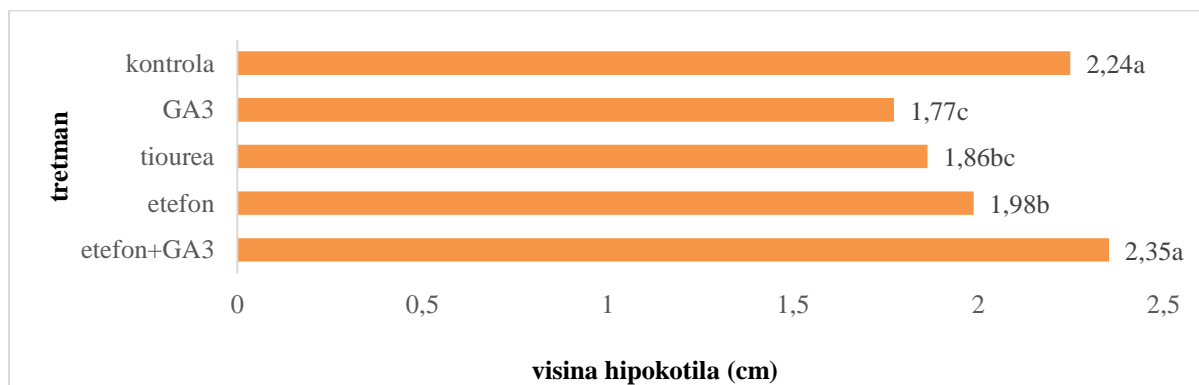
(10,14 cm), a kod populacije B na tretmanu GA₃ (8,40 cm). Visina biljaka na kontroli A i B populacije je 9,03 i 8,60 cm.



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=0,56$ cm)

Grafikon 12. Utjecaj tretmana potapanja sjemena na visinu (cm) biljaka ambrozije

Dužina hipokotila biljaka ambrozije signifikantno se razlikovala između tretmana kondicioniranja (Grafikon 13). Kod starije populacije (A) prosječna dužina hipokotila iznosila je 2,14 cm dok je kod B populacije prosječna dužina iznosila 1,94 cm. Kod populacije A najduži hipokotil izmjeren je kondicioniranjem skarificiranog sjemena u vodenoj otopini etefon + GA₃ (2,39 cm), a statistički se ne razlikuje od kontrolnog tretmana (2,27 cm). Najmanja izmjerena dužina hipokotila bila je na tretmanu GA₃ (1,79 cm) koji se značajno razlikuje od ostalih tretmana i kontrolnog tretmana. Dužina hipokotila populacije B nije signifikantno različita kondicioniranjem u otopini etefon + GA₃ (2,30 cm) u odnosu na kontrolni tretman (2,22 cm). Na tretmanima: tiourea, GA₃ i etefon izmjeren hipokotil značajno je manji u odnosu na kontrolni tretman.



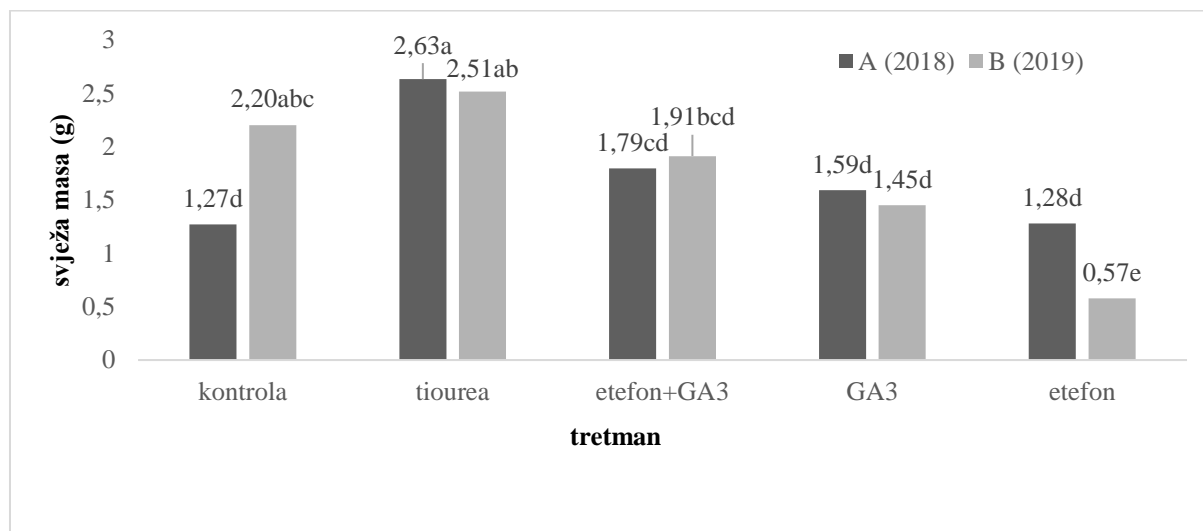
vrijednosti označene istim slovom statistički se ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=0,17$ cm)

Grafikon 13. Utjecaj tretmana kondicioniranja sjemena na visinu hipokotila (cm) biljaka ambrozije

Svježa masa biljaka značajno se razlikovala između populacija, a ovisno o primijenjenom tretmanu kondicioniranja (Grafikon 14). Značajno najveća svježa masa biljaka ambrozije obje populacije bila je na sjemenu kondicioniranom u otopini tiouree (2,63 i 2,51

g), a statistički se signifikantno ne razlikuje od kontrolnog tretmana B populacije (2,20 g). Ostali tretmani ne razlikuju se opravdano od kontrolnih tretmana, osim biljaka B populacije čije je sjeme kondicionirano u otopini etefona što je ujedno i najmanja izmjerena svježa masa (0,57 g).

Između populacija nije utvrđena statistički opravdana razlika u visini biljka primjenom metode kondicioniranja, stoga podaci nisu prikazani.



vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju pri $P=0,05$ ($LSD=0,67g$)

Grafikon 14. Utjecaj tretmana kondicioniranja sjemena na svježu masu (g) biljaka ambrozije

4.2.2. Opis deformacija biljaka ambrozije uzrokovanih primjenom kemijskih tretmana i metode kondicioniranja

Deformacije uzrokovane primjenom kemijskih tretmana i metode kondicioniranja ogledale su se formiranjem internodija između kotiledona i prvih pravih listova (Slika 19), što nije uobičajeno za ambroziju kojoj su prvi pravi listovi sjedeći (Slika 20). Također su utvrđene i deformacije prvih pravih listova (Slika 21) u odnosu na izgled prvih pravih listova na netretiranom sjemenu (Slika 22). Primjenom tiouree nisu uočene deformacije biljaka ambrozije. Ove promjene bile su prisutne na tretmanima etefon + GA₃, etefon i GA₃ (Slika 23).

Deformacije u vidu stvaranja internodija uočene su potapanjem sjemena i to na tretmanu etefon + GA₃ (7 biljaka) kod populacije A te je na dvije biljke zabilježena deformacija prvih pravih listova. Primjenom metode kondicioniranja stvaranje internodija uočeno je na tretmanima GA₃ (1 biljka) i etefon + GA₃ (2 biljke). To je ukupno 3,1 %

oštećenih biljaka na populaciji A. Na populaciji B primijećene su jednake deformacije te je potapanje sjemena u etefon + GA₃ (2 biljke) i GA₃ (2 biljke) rezultiralo stvaranjem internodija, a biljke s razvijenim internodijem imale su i deformirane prve prave listove.

Kondicioniranjem sjemena u aeriranoj otopini GA₃ i etefon + GA₃ razvijen je internodij na samo jednoj biljci. Još je na tretmanu etefon došlo do deformacije prvih listova na jednoj biljci ambrozije. To je ukupno 2,2 % oštećenja od ukupnog broja biljaka ambrozije iz plasteničkog dijela istraživanja.



Slika 19. Stvaranje internodija između kotiledona i prvih pravih listova



Slika 20. Sjedeći prvi pravi listovi ambrozije



Slika 21. Deformacije prvih pravih listova



Slika 22. Uobičajen izgled prvih pravih listova ambrozije



Slika 23. Prikaz deformacija biljaka ambrozije na primijenjenim tretmanima

5. Rasprava

Za većinu viših biljaka karakteristična je niska fiziološka dormantnost sjemena (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006) koja uvjetuje nemogućnost klijanja samo kratki period nakon sazrijevanja sjemena. *A. artemisiifolia* posjeduje srednji tip dormantnosti što znači da se klijavost ostvaruje držanjem sjemena u hladnim i vlažnim uvjetima u trajanju od dva do tri mjeseca, odnosno oslobađanjem embrija ili tretiranjem sjemena giberelinskom kiselinom (Baskin i Baskin, 2004).

Prva hipoteza ovoga istraživanja bila je da će se klijavost sjemena ambrozije značajno razlikovati u ovisnosti o starosti sjemena. Pretpostavka je također da je primarna dormantnost sjemena ambrozije uvjetovana dužinom skladištenja sjemena u hladnim uvjetima. Rezultati istraživanja potvrđuju pretpostavku o povezanosti primarne dormantnosti s dužinom hladnog skladištenja sjemena (4 °C). Kod svježeg sakupljenog sjemena ambrozije (populacija B) nije zabilježena nijedna proključala sjemenka. Povećavanjem dužine skladištenja sjemena, povećavala se i njegova klijavost te je nakon šest mjeseci utvrđeno 53 % klijavog sjemena. Ruziev i sur. (2020) također navode da se klijavost *A. trifida* veća od 60 % ostvarila tek nakon 11 mjeseci hladnog skladištenja. Također, sjeme vrste *Portulaca oleracea* L. (tušt) skladišteno pet mjeseci na sobnoj temperaturi postignulo je skoro duplo veću ukupnu klijavost i brži ponik u odnosu na svježeg sakupljeno sjeme (El-Keblawy i Al-Ansari, 2011), a slično je i kod nekih vrsta koje pripadaju porodici slakova (Convolvulaceae) (Gehan Jayasuriya i sur., 2008).

Iako primarna dormantnost sjemena opada hladnim skladištenjem, rezultati ovoga istraživanja ukazuju da kod dužeg skladištenja sjemena dolazi do opadanja klijavosti. Sjeme staro 12 mjeseci (populacija A), skladišteno na 4 °C do postavljanja pokusa, ostvarilo je „početnu“ klijavost od 26 %. Nakon dva mjeseca (sjeme staro 14 mjeseci) klijavost je značajno porasla (42,5 %) da bi nakon četiri i šest mjeseci (sjeme staro 16 i 20 mjeseci) klijavost značajno opala i iznosila 31 %, odnosno 28,5 % (Grafikon 1). Iako nije moguće međusobno uspoređivati klijavost sjemena različitih populacija, a posebno zbog različitog stupnja klijavosti populacija ambrozije uslijed funkcionalnog polimorfizma (Šoštarčić i sur., 2020; Gutterman, 2000; Baskin i Baskin, 2014), rezultati ukazuju da starost sjemena utječe na klijavost. Tako je kod mlađe populacije klijavost hladnim skladištenjem rasla, a kod starije populacije skladištenje u istim uvjetima uzrokovalo je opadanje klijavosti. Ovome u prilog idu i rezultati utvrđene dinamike klijanja sjemena ambrozije u kojima je na većini primijenjenih

tretmana mlađe sjeme imalo bržu početnu, srednju i završnu klijavost u odnosu na starije sjeme (Tablica 8, Grafikoni 5 i 6). Ovaj pad klijavosti „starijeg“ sjemena može se povezati s padom vijabilnosti sjemena na što ukazuju rezultati utvrđivanja vijabilnosti sjemena TTC u kojemu je vijabilnost sjemena ambrozije za oko 20 % manja kod duže skladištenog sjemena (Grafikon 2). Podaci iz literature također ukazuju da kod dužeg skladištenja klijavost i vijabilnost sjemena opadaju. Testirajući četiri populacije sjemena ambrozije različite starosti Jaganjac (2017) je utvrdila najveću klijavost kod najmlađeg sjemena ambrozije (76 %). Klijavost je proporcionalno opadala sa starošću sjemena pa je na četiri godine starom sjemenu iznosila 22 %. Slično je utvrđeno i za druge korovne vrste (Shaban, 2013; Shaidae i sur., 1969). Osim u laboratoriju, povezanost klijavosti sjemena s njegovom starošću utvrđivana je i u poljskim uvjetima ukopavajući sjeme ambrozije u tlo i potom mjereći njegovu klijavost (Milanova i Nakova, 2002). Sjeme ambrozije koje je bilo u tlu šest mjeseci ostvarilo je 88-93 %-tnu klijavost, a sjeme ukopano osam mjeseci u tlu ostvarilo je klijavost od 45 %, a niska klijavost moguća je i zbog patogena u tlu koji dovode do smrtnosti sjemena.

Iako se klijavost fiziološki zrelog sjemena ambrozije povećava s dužim trajanjem hladnog skladištenja, rezultati istraživanja ukazuju da i nakon šest mjeseci skladištenja ukupna klijavost nije prelazila 58 %, stoga je za potrebe dobivanja veće količine klijavog sjemena potrebno pronaći metodu prekidanja fiziološke dormantnosti sjemena ambrozije. Ovo je posebice važno jer podaci ukazuju da dugim skladištenjem opada vijabilnost sjemena pa je učinkovitu metodu prekidanja dormantnosti potrebno razviti na „mlađem“ sjemenu.

Druga hipoteza ovoga istraživanja bila je pretpostavka da će se metodom stratifikacije potaknuti klijavost sjemena ambrozije, ali da neće biti jednako učinkovita kod sjemena različite starosti. Stratifikacija sjemena je metoda tijekom koje dolazi do promjene razine fitohormona, odnosno smanjenja sadržaja ABA kao inhibitora klijanja i povećanja sadržaja GA₃ kao stimulatora klijanja (Bourgoin i Simpson, 2004). Bolja klijavost postiže se izlaganjem sjemena dužem trajanju stratifikacije (Shaykhi i sur., 2015) što je bio slučaj i u ovom radu (Grafikon 3). Sjeme „novije“ (B populacije) postiglo je zadovoljavajuću klijavost dužim trajanjem stratifikacije dok starije sjeme (A populacije) nije postiglo zadovoljavajuću klijavost niti kod jednog režima stratifikacije. Kod mlađeg sjemena koje prethodno nije hladno skladišteno klijavost je rasla povećanjem dužine stratifikacije te nakon osam tjedana stratificiranja iznosila 95 %. Nasuprot tome, na sjemenu koje je prethodno hladno skladišteno 12 mjeseci zadovoljavajuća klijavost nije ostvarena ni kod jednog režima stratifikacije, a kretala se do maksimalnih 59 % nakon šest tjedana stratifikacije. Ovo je i očekivano s obzirom na to da je TTC testom utvrđen značajan pad vijabilnosti kod ovog sjemena.

Nasuprot tome, na mlađem se sjemenu nakon 8 i 12 tjedana stratifikacije ostvarila visoka klijavost. Willemsen (1975) navodi da se stratifikacijom sjemena ambrozije u trajanju od devet tjedana ostvaruje 67 %-tna klijavost. Nakon osam tjedana stratifikacije prethodno hladno skladištenog sjemena 10 mjeseci, klijavost vrste *A. trifida* iznosila je 83 % (Page i Nurse, 2015). Kod hladnog skladištenja sjemena osam tjedana, a potom stratifikacije u trajanju od dodatnih osam tjedana, klijavost ove vrste iznosila je oko 40 % (Harre i sur., 2019). Za razliku od vlastitog istraživanja, ovi rezultati ukazuju da kod vrste *A. trifida* vijabilnost sjemena sporije opada. Sudeći prema rezultatima ovoga istraživanja stratifikacijom se čak potaknula klijavost sjemena *A. trifida* značajno bolje kad je sjeme prethodno bilo određeno razdoblje hladno skladišteno, što je suprotno nego kod vrste *A. artemisiifolia*.

Meyer i Monsen (1991) navode da je dužina potrebne stratifikacije uvjetovana i interpopulacijskom varijabilnošću. Naime, utvrđeno je da je period stratifikacije različit za populacije iste vrste koje obitavaju na geografski različitim područjima, a ovisno o dužini trajanja zime. Slično navode i Cavieres i Arroyo (2000) za sjeme vrste *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (facelija) sakupljeno s 1600 i 2200 metara nadmorske visine koje zahtijeva kraći period stratifikacije kako bi se postigla zadovoljavajuća klijavost, dok sjeme s većih nadmorskih visina, gdje se duže zadržava snježni pokrivač, zahtijeva duži period stratifikacije. Osim starosti i područja s kojega je sjeme sakupljeno, i rezistentnost može utjecati na dužinu trajanja stratifikacije. Utvrđeno je da nestratificirano sjeme vrste *Echinochloa oryzicola* Vasinger (koštan) sporije klije u odnosu na stratificirano sjeme, dok je kraćim trajanjem stratifikacije kod rezistentnog sjemena zabilježena veća prosječna klijavost u odnosu na osjetljivo sjeme (Boddy i sur., 2013). Povezanost dužine potrebne stratifikacije s rezistentnošću sjemena bilo bi zanimljivo provjeriti i za vrstu *A. artemisiifolia*, što je ideja za nastavak ovoga istraživanja.

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je osam tjedana stratifikacije učinkovita metoda za poticanje klijavosti sjemena ambrozije što sugerira većina autora (Harre i sur., 2019; Moretti i sur., 2018; Vink i sur., 2012; Norsworthy i sur., 2010; Westhoven i sur., 2008; Kaczinski, 2006; Willemsen, 1975). Međutim, ovo je relativno dugotrajna metoda koja zahtijeva minimalno osam tjedana držanja sjemena u vlažnom pijesku u frižideru. S ciljem bržeg prekidanja dormantnosti sjemena ambrozije, potrebno je dobiti jednako učinkovitu, ali bržu metodu.

Stoga je **treća hipoteza** ovog istraživanja bila pretpostavka da će egzogena primjena hormona rasta i dušičnih gnojiva potaknuti klijavost ambrozije obje populacije. Dodatno, pretpostavka je da će se klijavost ambrozije bolje potaknuti primjenom hormona rasta.

Rezultati istraživanja potvrđuju hipotezu da hormoni potiču klijavost ambrozije, i to neovisno o starosti sjemena. Ipak, hormoni rasta značajno su bolje potaknuli klijavost sjemena koje nije hladno skladišteno (B populacija) u odnosu na sjeme hladno skladišteno 12 mjeseci (A populacija). Od hormona rasta korišteni su giberelinska kiselina (GA_3) i etefon (etilen), a najbolja klijavost za obje populacije utvrđena je primjenom kombinacije hormona: etefon + GA_3 (85 i 95 %). Kod „mlađeg“ sjemena (B) samo primjena etefona značajno je potaknula klijavost ambrozije (88,5%), kao i kombinacija etefona s dušičnim gnojivom- KNO_3 (78 %).

Etefon je kemijska tvar koja se često koristi kao zamjena za etilen, a najmanja preporučena koncentracija etefona u istraživanjima u kojima se njegovom primjenom potiče klijavost sjemena je 1 mM (Goudey i sur., 1987), što je korišteno i u ovom radu. U vodenoj otopini etefona dolazi do razgradnje na etilen te fosfatne i kloridne ione zbog čega otopina poprima kiselina svojstva te se razgradnja etefona usporava ili potpuno prekida (Biddle i sur., 1976). Rezultati istraživanja Zhang i Wen (2010) ukazuju da egzogena primjena etefona nije najpovoljnija zamjena etilenu, što potvrđuju mjerenjem ekspresije receptora etilena primjenom različitih kemijskih tvari među kojima je i etefon. Primjenom etefona, ekspresija receptora bila je šest puta veća nakon četiri, a 12 puta veća nakon samo osam sati od tretiranja. Tretiranje čistim etilenom nakon četiri i osam sati bilo je približno tretiranju etefonom, ali je nakon 12 sati od primjene etilen doveo do 14 puta veće ekspresije, dok je učinak etefona značajno pao pa je ekspresija bila veća tek četiri puta. Međutim, primjena etilena kao plina na sjeme biljnih vrsta tehnički je zahtjevnija, a rezultati istraživanja ukazuju da i etefon potiče klijavost. Etefon sam ili u kombinaciji s GA_3 , KNO_3 i tioureom značajno je ubrzao dinamiku klijanja „mlađeg“ ne-skladištenog sjemena (B populacija) (Tablica 8, Grafikon 6). Međutim, to nije bio slučaj kod sjemena koje je prethodno hladno skladišteno (A populacija). Ubrzana dinamika klijanja sjemena nije poželjno svojstvo kod utvrđivanja bioloških parametara klijanja korovnih vrsta pa se kod takvih istraživanja primjena etefona na neskladištenom sjemenu ambrozije ne bi mogla preporučiti kao metoda prekidanja fiziološke dormantnosti. Ukoliko se u takvim istraživanjima koristi hladno skladišteno sjeme, primjena etefona ne ubrzava dinamiku klijanja pa bi primjena etefona ili kombinacije etefon+ GA_3 mogla biti zamjena za metodu stratifikacije čime se „uštedi“ osam tjedana držanja sjemena ambrozije u hladnjaku u vlažnom pijesku. I literaturni podaci ukazuju da prekidanje dormantnosti sjemena etilenom varira ovisno o starosti sjemena, a pretpostavka je da sjeme koje je duže skladišteno zahtijeva manju količinu etilena od svježeg sakupljenog sjemena (Corbineau i sur., 2014), što su Corbineau i sur. (1988) utvrdili i na sjemenu suncokreta (*Helianthus annuus* L.). Primjenom etefona u koncentraciji 3 mM na svježeg sakupljenom

sjemenu vrste *A. trifida* Harre i sur. (2019) također postižu bolju klijavost u odnosu na sjeme hladno skladišteno osam tjedana. Klijavost svježe sakupljenog sjemena bila je oko 30 % dok je na skladištenom sjemenu postignuta klijavost oko 20 %.

U istraživanju je korišten i drugi hormon rasta - GA₃, antagonist ABA koja inhibira klijanje u nepovoljnim uvjetima (Gupta i Chakrabarty, 2013). Primjenom GA₃ u ovom istraživanju klijavost je bila značajno bolja na sjemenu prethodno hladno skladištenom nego na neskladištenom sjemenu, iako je klijavost iznosila „skromnih“ 60 % na hladno skladištenom sjemenu. Egzogeni primjena hormona na sjeme ambrozije provjeravali su i Samimy i Khan (1983) te također utvrdili relativno skroman doprinos GA₃ klijanju sjemena koje nije prethodno skladišteno. Međutim, utvrđen je aditivan učinak kod kombinirane primjene GA₃ s drugim hormonima - etefonom i kinetinom (citokinin). Samostalna primjena GA₃ na sjeme ambrozije koje prethodno nije hladno skladišteno ostvarila je klijavost od 15 %. Slično, samostalna primjena etefona ostvarila je klijavost od 17 %, a kinetina svega 3 %. Međutim, kombinacijom ova tri hormona – GA₃ + etefon + kinetin ostvarena je klijavost od 47 %. Kod sjemena koje je prethodno skladišteno 20 dana na 4 °C, ova kombinacija hormona ostvarila je klijavost od 69 %. I sjeme vrste *A. trifida*, hladno skladišteno 10 mjeseci, ostvaruje klijavost oko 65 % egzogenom primjenom GA₃. Naknadnom stratifikacijom (8 tjedana) ovog sjemena, na koje je potom egzogeno primijenjen GA₃, klijavost iznosi 95 % (Page i Nurse, 2015). Ovi rezultati, kao i rezultati vlastitog istraživanja, ukazuju na potrebu da sjeme ambrozije prije egzogene primjene kemijskih tretmana određeno vrijeme bude hladno skladišteno.

Uspoređujući samostalnu primjenu GA₃ i etefona, rezultati istraživanja ukazuju da je etefon učinkovitiji u poticanju klijavosti ambrozije od GA₃. Kao i kod prethodnih autora, kombiniranjem oba hormona postignuta je najveća klijavost i to čak kod sjemena koje nije prethodno hladno skladišteno (95 %). Rezultati istraživanja stoga ukazuju na visoku učinkovitost etefon + GA₃ na neskladištenom sjemenu ambrozije čime se postupak prekidanja fiziološke dormantnosti značajno ubrzava. Ovime se omogućava postupak uzgoja biljaka ambrozije ubrzo nakon sakupljanja u jesen i skraćuje dugotrajan postupak utvrđivanja rezistentnih populacija. Ubrzana dinamika klijanja neskladištenog sjemena ambrozije (B populacija) utvrđena je na svom sjemenu na kojemu su primijenjeni hormoni rasta. Sjeme tretirano etefon + GA₃ već je za 2,5 dana doseglo 50 %-tnu klijavost, etefonom za 4,6, a GA₃ za 5,4 dana što je značajno brže nego netretirano sjeme kojemu je trebalo 10,5 dana da dosegne 50 %-tnu klijavost (Tablica 8). Pretpostavka je da ubrzana dinamika klijanja sjemena ambrozije tretirano hormonima rasta ne predstavlja problem kod uzgoja biljaka ambrozije za

potrebe provođenja testova rezistentnih biotipova. Ovo bi naknadno trebalo utvrditi u pokusu u kojemu bi se na biljke ambrozije uzgojene iz sjemena tretiranog hormonima i netretiranog sjemena aplicirao herbicid te utvrdilo pokazuju li određena odstupanja u rastu. Nasuprot tome, na sjemenu koje je 12 mjeseci hladno skladišteno (A populacija) primjenom hormona, dinamika klijanja nije se razlikovala u odnosu na netretirano sjeme.

Osim hormonskih regulatora rasta, u istraživanju je utvrđivana i klijavost ambrozije tretirane dušičnim gnojivima - KNO_3 i tiourea. Ova gnojiva potiču apsorpciju kisika u sjemenu (Hilton i Thomas, 1986) pozitivno djelujući na klijanje, a kasnije i fitness biljaka (Sarmadi i sur., 2014). U ovom je istraživanju primjenom dušičnih gnojiva postignuta niža klijavost od tretmana s hormonskim regulatorima rasta što je i pretpostavljeno u hipotezi istraživanja. Potapanjem sjemena ambrozije u vodenu otopinu KNO_3 u trajanju od 24 sata postignuta je klijavost oko 50 % kod obje populacije. Zapravo dodatak KNO_3 nije potaknuo klijavost jer je potapanjem u čistu vodu klijavost obje populacije bila 64 %. Tek u kombinaciji s etefonom klijavost je iznosila 78 %, ali samo na sjemenu koje prethodno nije skladišteno. Na hladno skladištenom sjemenu kombinacija KNO_3 i etefona nije poboljšala klijavost u odnosu na netretirano sjeme. Kod sjemena ambrozije tiourea je značajno poboljšala klijavost (74,5 %), ali samo na hladno skladištenom sjemenu 12 mjeseci. Za razliku od podataka u ovom radu, Page i Nurse (2015) iznose zadovoljavajuće rezultate poticanja klijavosti vrste *A. trifida* s KNO_3 na sjemenu koje je hladno skladišteno 10 mjeseci. U njihovom istraživanju ovo je gnojivo čak imalo bolji učinak od GA_3 . Visoka klijavost ove vrste (98 %) postignuta je kad se KNO_3 primijenio na isto sjeme koje je prethodno stratificirano osam tjedana. U radu Harre i sur. (2019) klijavost skladištenog sjemena *A. trifida* na tretmanu tiourea bila je oko 20 %, neskladištenog sjemena oko 30 %, što je bio slučaj i primjenom GA_3 i etefona. Dušična gnojiva ne utječu izravno na dormantnost sjemena, ali je moguće da djeluju na prekidanje ograničenja klijanja, a djelotvorni su kod niže razine dormantnosti sjemena (Benech-Arnold i sur., 2000). Ovo je mogući razlog zbog kojega je klijavost „starije“ populacije (A) bila značajno veća u odnosu na noviju populaciju (B 2019). Primjenom KNO_3 (0,2 %) i tiouree (2 %) uspješno se potiče i klijanje sjemena *Chenopodium album* L. - bijela loboda (Lemić i sur., 2014). Varijabilni rezultati dobiveni primjenom dušičnih gnojiva na sjeme ambrozije u ovom istraživanju ukazuju da bi se učinak gnojiva na poticanje klijavosti trebao testirati i na prethodno stratificiranom sjemenu, što sugeriraju i Page i Nurse (2015).

Osim izravnog tretiranja sjemena kemijskim tretmanima, u istraživanju je korištena i metoda kondicioniranja (**četvrta hipoteza**), odnosno potapanje skarificiranog sjemena ambrozije u aeriranu vodu, odnosno u aeriranu vodenu otopinu dušičnih gnojiva ili hormona

(Tablica 3). Značajno bolja klijavost utvrđena je kondicioniranjem „starijeg“ sjemena ambrozije u odnosu na „mlađe“ (Tablica 6 i Grafikon 7). Kod obje populacije, u aeriranoj vodenoj otopini etefon + GA₃ ostvarena je najbolja klijavost (93,5 % i 79,5 %). Kondicioniranje sjemena je metoda kojom se potiču oksidacijski procesi u sjemenu. Međutim, smatra se da postoji granica oksidacije koja određuje hoće li sjeme proklijati. Ukoliko je razina oksidacije ispod ili iznad intervala potrebnog za klijanje, a specifičan je za pojedinu biljnu vrstu, signalne molekule za kisik koje reguliraju klijanje neće dozvoliti da se odvije klijanje dormantnog sjemena (Bailly i sur., 2008; Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006). Ukoliko duže natapanje sjemena nema utjecaja na klijanje, kao što je to kod vrste *Sclerocarya birrea* (A. Rich) Hochst. - marula (Moyo i sur., 2009), pretpostavlja se da je dormantnost takvog sjemena endogena (Karimmojeni i sur., 2013; Gehan Jayasuriya i sur., 2008), što i jest slučaj kod ambrozije. Ponovno izlaganje sjemena vodi nakon skladištenja djeluje stimulacijski na klijanje (El-Maarouf-Bouteau i Bailly, 2008). Dodatkom oba hormona rasta u aeriranu vodu, klijavost obje populacije ambrozije se značajno poboljšala. Međutim, preduvjet za kondicioniranje je skarifikacija ili ekscizija sjemena kako bi se oslobodio embrio. Oba načina oslobađanja embrija su tehnički zahtjevna, a rezultati ukazuju da se ovu metodu samo isplati koristiti kod „starijeg“ sjemena jer je učinkovitija od stratifikacije i potapanja sjemena u vodene otopine hormona rasta. Nasuprot tome, kod mlađeg sjemena ova je metoda ostvarila podjednaku klijavost kao i kod stratifikacije sjemena ili čak lošiju klijavost u odnosu na potapanje sjemena. Slične su rezultate dobili Harre i sur. (2019) na sjemenu vrste *A. trifida*. Ipak, autori povezuju učinak ove metode s prethodnim hladnim skladištenjem sjemena ove vrste. Tako se u destiliranoj vodi ili otopini etefona, GA₃ i tiouree postignula klijavost od oko 35 %. Međutim, kad je sjeme prethodno osam tjedana hladno skladišteno, kondicioniranjem sjemena u destiliranoj vodi klijavost je iznosila 80 %. Zanimljivo je istaknuti da je kondicioniranjem u otopini hormona ili tiouree klijavost i dalje iznosila 35 %.

Juvenilni stadij biljaka predstavlja najranjivije razdoblje u životnom ciklusu biljnih vrsta (Vange i sur., 2004). Za vrijeme ovoga razdoblja ključan je razvoj klijanaca jer on izravno utječe na razvoj i fitnes odraslih biljaka, stoga je posljednji cilj ovoga istraživanja bio utvrditi nicanje i početni rast biljaka ambrozije razvijenih iz sjemena tretiranog dušičnim gnojivima i hormonima rasta uz pretpostavku da navedeni tretmani neće uzrokovati značajnije deformacije u rastu ambrozije. Analiza varijance (Tablica 9) pokazuje da u većini slučajeva nije utvrđena značajna razlika u mjerenim parametrima. Kod ambrozije kod koje je sjeme kondicionirano u otopini hormona rasta ili tiouree nije utvrđena značajna razlika u nicanju,

svježoj masi, visini hipokotila i visini biljaka između populacija. Također, biljke se visinom nisu razlikovale neovisno o dodatku hormona rasta, tiouree ili destilirane vode. I kod potapanja sjemena u hormone rasta ili tioureu nije utvrđena značajna razlika u nicanju niti visini biljaka. Kod obje metode tretiranja sjemena (potapanje ili kondicioniranje) utvrđena je značajna razlika u svježoj nadzemnoj masi biljaka i visini hipokotila ambrozije. Tako je tretiranjem sjemena etefonom ili etefon + GA₃ utvrđen viši hipokotil u odnosu na netretirano sjeme ili sjeme tretiranom s tiouream (Grafikon 10). Također i svježja nadzemna masa biljaka iz sjemena tretiranog s etefon + GA₃ i GA₃ bila je veća nego kod netretiranih biljaka ili kod tretmana s tiouream ili etefonom.

Vizualno promatrajući biljke u plateniku, jedine razlike na pojedinim biljkama tretirane hormonima rasta bile su vidljive u formiranju internodija između kotiledona i prvih pravih listova, što nije uobičajeno kod ambrozije kojoj su prvi pravi listovi sjedeći. Poneke deformacije prvih pravih listova također su uočene na biljkama čije je sjeme tretirano hormonima rasta (etefon + GA₃, etefon i GA₃), a što nije bio slučaj kod biljaka tretiranih tiouream ili kod netretiranih biljaka. Ipak, postotak ovih biljaka kod kojih su uočene određene deformacije bio je vrlo nizak i kretao se od 2,2 % (deformacije prvih listova) do 3,1 % (razvoj internodija). U nešto većem postotku, na „starijoj“ populaciji primijećeno je stvaranje internodija potapanjem sjemena u etefon + GA₃ (4,37 %). Nasuprot tome, kod te iste kombinacije, ali primjenom metode kondicioniranja, opisani simptomi bili su vidljivi samo na dvije biljke. Kao što je i **petom hipotezom** pretpostavljeno, razvoj biljaka ambrozije nije bio „ugrožen“ kad je njihovo sjeme tretirano s dušičnim gnojivima. Stimulacija rasta biljaka i poneke blage deformacije utvrđene su kod primjene hormona rasta, a ponajviše kod kombinacije etefon + GA₃. Ovakav stimulirajući rast i očekivan je jer je slično utvrđeno i u laboratorijskom pokusu gdje je najbolja, ali i najbrža početna, srednja i završna klijavost utvrđena na sjemenu tretiranom s kombinacijom ovih hormona. Slično navode i Harre i sur. (2019) na klijancima vrste *A. trifida* u kojima je kod nekih biljaka utvrđen abnormalan rast, a korištene su iste koncentracije hormona kao i u ovom istraživanju. Potapanje ili kondicioniranje sjemena ambrozije u vodenoj otopini tiouree u ovom istraživanju nije rezultiralo abnormalnim rastom. Tieng (1962) upozorava da bi povećanje koncentracije tiouree s 2 na 6 mM moglo dovesti i do 50 %-tne smrtnosti klijanaca ambrozije nakon uspješnog klijanja. U ovome radu značajno veće koncentracije nisu uzrokovale fitotoksična oštećenja, na što upućuju i prijašnja iskustva s 2 %-tnom vodenom otopinom tiouree od strane djelatnika Zavoda za herbologiju (Zagreb). Važno je naglasiti da abnormalni izgled klijanaca nastaje i zbog nepravilnog zarezivanja sjemena koje se provodi prije njegovog postavljanja u

aeriranu otopinu. Međutim, to je isključeno u ovom istraživanju u kojemu se oslobađanje sjemena provelo skarifikacijom bez direktnog utjecaja na embrio.

Većina je postavljenih hipoteza u ovom istraživanju potvrđena. Metodu stratifikacije moguće je zamijeniti potapanjem ili kondicioniranjem sjemena u otopinama hormona rasta i time brže dobiti klijavu sjeme ambrozije. S obzirom na to da su primjenom hormona rasta ipak utvrđene određene deformacije u početnom rastu ambrozije u plasteniku, a u laboratorijskom pokusu brža dinamika klijanja, potrebno je provjeriti utječu li ove „smetnje“ na daljnji rast biljaka. Također, za dobivanje pouzdanih rezultata kod pokusa utvrđivanja rezistentnosti ambrozije na herbicide, ove je biljke potrebno tretirati herbicidima te usporediti njihovu reakciju u odnosu na biljke s netretiranim sjemenom.

Kao što je u uvodu opisano, cilj je standardizirati metodu poticanja klijavosti ambrozije i prilagoditi je testovima utvrđivanja rezistentnih populacija. Ukoliko se u plasteniku/stakleniku testovi za utvrđivanje rezistentnosti provode u proljeće (travanj/svibanj), tada od sakupljanja sjemena u jesen pa do početka pokusa u proljeće prođe oko šest mjeseci. Temeljem rezultata ovog istraživanja sugerira se da vijabilnost sjemena nakon šest mjeseci neće opasti. Dugotrajnu metodu stratifikacije u ovom slučaju moguće je zamijeniti tretiranjem ili kondicioniranjem sjemena hormonima rasta ili dušičnim gnojivima. Ukoliko je potrebno dobiti zadovoljavajuću klijavost odmah nakon sakupljanja sjemena (za pokuse utvrđivanja rezistentnosti u komori rasta), metodu stratifikacije također je moguće zamijeniti tretiranjem ili kondicioniranjem sjemena s hormonima rasta i/ili kombinacijom hormona rasta i dušičnih gnojiva. Ipak, ubrzana dinamika nicanja i određene blaže deformacije biljaka tretirane hormonima rasta ukazuju na potrebu daljnjeg istraživanja ponašanja ovih biljaka.

Nadalje, rezultati istraživanja ukazuju na pad vijabilnosti sjemena koje se duže skladišti. Dakle, u slučaju da se pokus utvrđivanja rezistentnosti provodi 12 - 16 mjeseci nakon sakupljanja sjemena, potrebno je imati značajno veću količinu sjemena kako bi se mogle uzgojiti biljke ambrozije.

Iako vrlo učinkovita, primjena hormona rasta, a pogotovo GA₃ financijski je zahtjevnija. Stoga se u slučaju skromnijih financijskih mogućnosti za poticanje klijavosti ambrozije predlaže koristiti metodu stratifikacije, koja je i u ovom istraživanju „opravdala“ standardni tretman poticanja klijavosti.

6. Zaključci

Nakon provedenog laboratorijskog i plasteničkog istraživanja o utjecaju tretiranja dormantnog sjemena iz različitih godina dušičnim gnojivima i hormonima rasta na klijanje, dinamiku klijanja i početni rast ambrozije, može se zaključiti sljedeće:

- Klijavost sjemena ambrozije značajno se razlikovala u ovisnosti o starosti sjemena. Hladnim skladištenjem sjemena koje je nakon sakupljanja odmah korišteno klijavost sjemena raste, a vijabilnost ne pada. Nakon šest mjeseci hladnog skladištenja klijavost je iznosila 59 %. Kod sjemena koje je prethodno hladno skladišteno 12 mjeseci, klijavost sjemena značajno opada s dužim hladnim skladištenjem.
- Stratifikacijom sjemena može se potaknuti klijavost ambrozije, ali učinak stratifikacije ovisi o starosti sjemena. Na sjemenu iz 2019. godine ostvarena je 95 %-tna klijavost nakon osam tjedana stratifikacije. Nasuprot tome, na sjemenu iz 2018. godine, neovisno o dužini stratifikacije, nije se ostvarila zadovoljavajuća klijavost.
- Egzogeno primjena hormona rasta potaknula je klijavost ambrozije obje populacije bolje od egzogene primjene dušičnih gnojiva. Najbolja klijavost ostvarena je egzogenom primjenom etefon + GA₃ (85 - 95 %). Na mlađem sjemenu (B populacija) primjena hormona rasta ubrzala je dinamiku klijanja ambrozije.
- Metodom kondicioniranja potaknula se klijavost ambrozije obje populacije (52 - 70 %). U odnosu na egzogenu primjenu dušičnih gnojiva ili metodu stratifikacije ova metoda nije ostvarila bolje učinke na klijavost ambrozije.
- Početni rast biljaka (nicanje, visina hipokotila, visina i masa biljaka) razvijenih iz tretiranog sjemena ambrozije nije se razlikovao od netretiranog sjemena. Primijećene su blage deformacije biljaka ambrozije tretiranih s hormonima rasta.

7. Zahvale

Ovim putem se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Šćepanović za svu podršku, poticaj, pomoć i vodstvo prilikom izrade ovoga rada te za sve korisne znanstvene savjete i ustrajnost prilikom izvođenja pokusa, posebice tijekom „COVID-19“ krize i velikog zagrebačkog potresa. Neizmjereno sam Vam zahvalna.

Želim se također zahvaliti Valentini Šoštarčić, mag. ing. na pristupačnosti, razumijevanju i stručnoj pomoći te korisnim savjetima prilikom izrade pokusa i za svu pomoć oko statističke obrade podataka.

Također se zahvaljujem Josipu Lakiću, mag. ing na stručnoj pomoći prilikom postavljanja plasteničkog dijela pokusa. Nadalje, zahvaljujem se praktikantima Zavoda za herbologiju na pomoći prilikom priprema za postavljanje pokusa.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za herbologiju te djelatnicima Zavoda za hranidbu životinja na korištenju laboratorija te korisnim savjetima, strpljenju i stručnoj pomoći pri kemijskom dijelu istraživanja.

Zahvaljujem se svojoj dugogodišnjoj prijateljici Ines Holeš, mag. educ. philol. croat. et mag. paed. na lektoriranju rada te dečku Karlu Tomcu, studentu fizike i kemije na PMF-u na nesebičnom dijeljenju znanja iz kemije te velikoj pomoći i podršci.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i nesebičnoj pomoći tijekom studiranja te upornom poticanju, čime su mi uvelike olakšali pisanje ovoga rada, ali i cjelokupno studiranje. Velika im hvala na svemu.

Laura Koščak

8. Popis literature

1. Ali, H. H., Tanveer, A., Nadeem, M. A., Asghar, H. N. (2011). Methods to break seed dormancy of *Rhynchosia capitata*, a summer annual weed. *Chil. J. Agric. Res.* 71(3), 483-487.
2. Amen, R. D. (1968). A model of seed dormancy. *Bot. Rev.* 34, 1-31.
3. Anderson, L., Milberg, P. (1998). Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Sci. Res.* 8, 29-38.
4. Aoki, N., Scofield, G. N., Wang, X. D., Offler, C. E., Patrick, J. W., Furbank, R. T. (2006). Pathway of Sugar Transport in Germinating Wheat Seeds. *Plant Physiol.* 141 (4), 1255-1263.
5. Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331, 806-814.
6. Ballard, T. O., Foley, M. E., Bauman, T. T. (1996). Germination, viability, and protein changes during cold stratification of giant ragweed (*Ambrosia trifida* L.) seed. *J. Plant Physiol.* 149, 229-232.
7. Baskin, C. C., Baskin, J. M. (2014). Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. 2nd. Academic Press. San Diego. CA.
8. Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1-16.
9. Baskin, J. M., Baskin, C. C., Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Spec. Biol.* 15(2), 139-152.
10. Benech-Arnold, R. L., Sanchez, R. A., Forcella, F., Kruka, B. C., Ghersa, C. M. (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Res.* 67 (2), 105–122.
11. Biddle, E., Kerfoot, D. G. S., Kho, Y. H., Russell, K. E. (1976). Kinetic studies of the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonic acid in aqueous solution. *Plant Physiol.* 58, 700–702.
12. Black, M. (1970). Seed germination and dormancy. *Sci. Prog.* 58, 379-394.
13. Boddy, L. G., Bradford, K. J., Fischer, A. J. (2013). Stratification Requirements for Seed Dormancy Alleviation in a Wetland Weed. *PLoS One.* [online] 8 (9), e71457. DOI: 10.1371/journal.pone.0071457. Pristupljeno 10. siječanj 2020.

14. Borza, J. K., Westerman, P. R., Liebman, M. (2007). Comparing estimates of seed viability in three foxtail (*Setaria*) species using the imbibed seed crush test with and without additional tetrazolium testing. *Weed Tech.* 21, 518-522.
15. Bourgoin, A., Simpson, J. D. (2004). Soaking, moist-chilling, and temperature effects on germination of *Acer pensylvanicum* seeds. *Can. J. For. Res.* 34, 2181-2185.
16. Brijačak, E., Šoštarčić, V., Pintar, A., Lakić, J., Barić, K., Šćepanović, M. (2020). Prvi dokazi rezistentnosti ambrozije na ALS herbicide u Republici Hrvatskoj i Europi. 64. Seminar biljne zaštite, Opatija 4. do 7. veljače 2020.
17. Bullock, J. M., Chapman, D., Schafer, S., Roy, D., Girardello, M., Haynes, T., Beal, S., Wheeler, B., Dickie, I., Phang, Z., Tinch, R., Čivić, K., Delbaere, B., Jones-Walters, L., Hilbert, A., Schrauwen, A., Prank, M., Sofiev, M., Niemela, S., Raisanen, P., Lees, B., Skinner, M., Finch, S., Brough, C. (2010). Assessing and controlling the spread and the effects of common ragweed in Europe. *Nat. Environ. Res. C. UK.*
18. Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C., Davis, V. M., Shaner, D., Norsworthy, J. K., Ritz, C. (2013). Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Sci.* 61, 4-20.
19. Camara, M. C., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., de Oliveira, J., Faulds, C., Bertrand, E., Soccol, C. R. (2018). Current advances in gibberellic acid (GA₃) production, patented technologies and potential applications. *Planta*. [online] 1-14. DOI: 10.1007/s00425-018-2959-x. Pristupljeno 5. srpanj 2020.
20. Can, E., Celikatas, N., Hatipoglu, R., Avcı, S. (2009). Breaking seed dormancy of some annual *Medicago* and *Trifolium* species by different treatments. *Turk. J. Field Crops.* 14(2), 72-78.
21. Carin, N., Šoštarčić, V., Šćepanović, M. (2019). Ne-fungicidne metode za sterilizaciju sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. 64. Seminar biljne zaštite, Opatija 4. do 7. veljače 2020.
22. Cavieres, L. A., Arroyo, M. T. K. (2000). Seed germination response to cold stratification period and thermal regime in *Phacelia secunda* (Hydrophyllaceae): Altitudinal variation in the Mediterranean Andes of central Chile. *Plant Ecol.* 149, 1-8.
23. Corbineau, F., Rudnicki, R. M., Come, D. (1988). Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. *Physiol. Plant.* [online] 73, 368-373. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00612.x. Pristupljeno 1. veljača 2020.

24. Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. (2014). Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Plant Sci.* [online] 5, 1-13. DOI: 10.3389/fpls.2014.00539. Pristupljeno 10. siječanj 2020.
25. Davis, W. E. (1930). Primary dormancy, after-ripening, and the development of secondary dormancy in embryos of *Ambrosia trifida*. *Am. J. Bot.* 17, 58-76.
26. Di Tommaso, A. (2004). Germination behavior of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations across a range of salinities. *Weed Sci.* 52,1002-1009.
27. Dinelli, G., Marotti, I., Catizone, P., Bosi, S., Tanveer, A., Abbas, R. N., Pavlovic, D. (2013). Germination ecology of *Ambrosia artemisiifolia* L. and *Ambrosia trifida* L. biotypes suspected of glyphosate resistance. *Cent. Eur. J. Biol.* 8, 286–296.
28. Elias, S., Garay, A. (2004). Tetrazolium test (tz), a fast, reliable test to determine seed viability, Oregon State University Seed Laboratory.
29. El-Keblawy, A. (2003). Effects of a chenedimorphism on dormancy and progeny traits in the two ephemerals *Hedypnois cretica* and *Crepis aspera* (Asteraceae). *Can. J. Bot.* 81, 550–559.
30. El-Keblawy, A., Al-Ansari, F. (2011). Effects of site of origin, time of seed maturation, and seed age on germination behavior of *Portulaca oleracea* from the Old and New Worlds. *Can. J. of Bot.* [online] 78, 279-287. DOI: 10.1139/b00-001. Pristupljeno: 1. ožujak 2020.
31. El-Keblawy, A., Gairola, S. (2016). Dormancy Regulating Chemicals Alleviate Innate Seed Dormancy and Promote Germination of Desert Annuals. *J. Plant Growth Regul.* [online] 1-12. DOI: 10.1007/s00344-016-9640-z. Pristupljeno 20. veljača 2020.
32. El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. (2008). Oxidative Signaling in Seed Germination and Dormancy. *Plant Signal. Behav.* [online] 3 (3), 175-728. DOI: 10.4161/psb.3.3.5539. Pristupljeno 5. ožujak 2020.
33. Finch-Savage, W. E., Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171 (3), 501-523.
34. Fumanal, B., Chauvel, B., Bretagnolle, F. (2007). Estimation of pollen and seed production of common ragweed in France. *Ann. Agric. And Environ. Med.* 14, 233–236.
35. Gehan Jayasuriya, K. M. G., Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2008). Dormancy, germination requirements and storage behavior of seeds of Convolvulaceae (Solanales) and evolutionary considerations. *Seed Sci. Res.* 18, 223-237.

36. Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., McCourt, P. (2000). Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*. [online] 12 (7), 1117-1126. DOI: 10.1105/tpc.12.7.1117. Pristupljeno 23. travanj 2020.
37. Ghobadi, M., Shafei-Abnavi, M., Honarmand, S. J., Ghobadi, M. E., Mohammadi, G. R. (2012). Effect of hormonal priming (GA₃) and osmo priming on behavior of seed germination in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Agric. Sci.* 4, 244–250.
38. Goudey, J. S., Saini, H. S., Spencer, M. S. (1987). Uptake and fate of ethephon ([2-chloroethyl]phosphonic acid) in dormant weed seeds. *Plant Physiol.* 85, 155–157.
39. Guillemain, J. P., Chauvel, B. (2011). Effects of the seed weight and burial depth on the seed behavior of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Biol. & Manag.* 11 (4), 217-223.
40. Gupta, R., Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant. *Plant Signal. & Behav.* [online] 8: 9.e25504. 1-5.
41. Gutterman, Y. (2000). Maternal effects on seeds during development. Str. 59-84. U: Fenner, M., ed *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. New York. CABI.
42. Harre, N. T., Weller, S. C., Young, B. G. (2019). An improved method to shorten physiological dormancy of giant ragweed (*Ambrosia trifida*) seed. *Weed Sci.* 67, 205-213.
43. Heap I., International survey of herbicide resistant plants. 2020. <http://www.weedscience.org>. Pristupljeno 1. prosinac 2019.
44. Hillhorst, H. W. M. (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci. Res.* 5, 61-73.
45. Hilton, J. R., Thomas, J. A. (1986). Regulation of pre germinative rates of respiration in seeds of various seed species by potassium nitrate. *J. Exp. Botany.* 37, 1516-1524. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4002599/pdf/psb-8-e25504.pdf>. Pristupljeno 20. ožujak 2020.
46. ISTA– International Seed Testing Association. (2003). *ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing*. Bassersdorf: ISTA, 1: 171.
47. Jaganjac, M. (2017). Utjecaj porijekla i starosti sjemena na vijabilnost sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet. Diplomski rad.

48. Karimmojeni, H., Bazrafshan, A. H., Majidi, M. M., Torabian, S., Rashidi, B. (2013). Effect of maternal nitrogen and drought stress on seed dormancy and germinability of *Amaranthus retroflexus*. *Plant Spec. Biol.* [online] 29 (3), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12022>. Pristupljeno 1. prosinac 2019.
49. Karrer, G. (2016). A standard protocol for sampling and handling of seed material. HALT Ambrosia – final project report and general publication of project fundings. *Julius-Kuhn-Archiv.* [online] 455, 9-12. DOI: 10.5073/jka.2016.455.02 Pristupljeno 2. srpanj 2020.
50. Kazinczi, G., Beres, I., Novak, R., Biro, K., Pathy, Z. (2008.). Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*): A review with special regards to the results in Hungary. I. Taxonomy, origin and distribution, morphology, life cycle and reproduction strategy. *Herbologia* 9 (1).
51. Kazinczi, G., Biro, K., Beres, I., Ferger, B. (2006). Intraspecific differences in the germination of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). (Fajon belüli), (intraspecifikus) különbségek az ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.) csírázásában). *Növényvédelem.* 42, 477-481.
52. Kelly, R. J. (1969). Absciscic acid and gibberellic acid regulation of seed germination and dormancy. *Biologist.* 51, 91-99.
53. Khan, M. A., Shaikh, F., Zehra, A., Zaheer Ahmed, M., Gul, B., Ansari, R. (2017). Role of chemicals in alleviating salinity and light related seed dormancy in sub-tropical grasses. *Flora.* 233, 150-155.
54. Kosikova, P. G. (1960). Germination of seeds of some weeds and ruderal plants after treatment with gibberellic acid at various concentrations. *Doklady Akademii nauk SSSR.* 160, 922-924.
55. Lemić, M., Šćepanović, M., Barić, K., Svečnjak, Z., Jukić, Ž. (2014). Metode prekidanja dormantnosti sjemena bijele lobode (*Chenopodium album* L.). *Agronomski glasnik.* 76 (1-2), 45-60.
56. Li, X., Fei, R., Chen, Z., Fan, C., Sun, X. (2020). Plant hormonal changes and differential expression profiling reveal seed dormancy removal process in double dormant plant-herbaceous peony. *PLoS ONE.* [online] 15(4), e0231117. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231117>. Pristupljeno 7. srpanj 2020.
57. Lommen, S., Hallmann, C., Jongejans, E., Chauvel, B., Leitsch Vitalos, M., Aleksanyan, A., Toth, P., Preda, C., Šćepanović, M., Onen, H., Tokarska, Guzik, B., Anastasiu, P., Dorner, Z., Annamária, F., Karrer, G., Nagy, K., Pinke, G., Tiborcz, V.,

- Zagyvai, G., Müller-Schärer, H. (2018). Explaining variability in the production of seed and allergenic pollen by invasive *Ambrosia artemisiifolia* across Europe. *Bio. Invas.* [online] 20 (6), 1475 - 1491. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1640-9>.
Pristupljeno 11. prosinac 2019.
58. Lykholat, Y. V., Grigoryuk, I. P., Khromykh, N. O., Shupranova, L. V., Sudak, V. V. (2018). Analysis of the metabolic resistance of *Ambrosia artemisiifolia* L. to the herbicides. *Ann. Agrar. Sci.* 16 (1), 60-64.
 59. Masin, R., Loddo, D., Benvenuti, S., Zuin, M. C., Macchia, M., Zanin, G. (2010). Temperature and water potential as parameters for modeling weed emergence in central-northern Italy. *Weed. Sci.* 58, 216-222.
 60. Matilla, A. J. (2000). Ethylene in seed formation and germination. *Seed Sci. Res.* 10, 111-126.
 61. Medzihradzky, Z., Jarai – Komlodi, M. (1995). I come from America, my name is Ambrosia – some feature of the ragweed. 9th EWRS Symposium Budapest 1995. „Challenger for Weed Science in a Changing Europe“. 57-64.
 62. Meyer, S., Monsen, S. B. (1991). Habitat-correlated variation in mountain big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *vayesana*) seed germination patterns. *Ecology.* 72, 739–742.
 63. Milakovic, I., Karrer, G. (2016). The influence of mowing regime on the soil seed bank of the invasive plant *Ambrosia artemisiifolia* L. *NeoBiota.* 28, 39-49.
 64. Milanova, S., Nakova, R. (2002). Some morphological and bioecological characteristics of *Ambrosia artemisiifolia* L.
 65. Moretti, M. L., Van Horn, C. R., Robertson, R. R., Segobye, K., Weller, S. C., Young, B. G., Johnson, W. G., Sammons, R. D., Wang, D., Ge, X., d'Avignon, A., Gaines, T. A., Westra, P., Green, A. C., Jeffry, T., Lesperance, M. A., Tardif, F. J., Sikkema, P. H., Hall, C., McLean, M. D., Lawton, M. B., Schulz, B. (2018). Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*. Part 2. Rapid response physiology and non-target site resistance. *Pest Manag. Sci.* 74, 1079-1088.
 66. Moyo, M., Kulkarni, M. G., Finnie, J. F., Van Staden, J. (2009). After-ripening, light conditions, and cold stratification influence germination of marula [*Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro] seeds. *HortScience.* 44 (1), 119–124.
 67. Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment.* 25, 239-250.

68. Norsworthy, J. K., Jha, P., Steckel, L. E., Scott, R. C. (2010). Confirmation and control of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in Tennessee. *Weed Technol.* 24, 64-70.
69. Onofri, A. (2001). BIOASSAY97: A New EXCELt VBA Macro to Perform Statistical Analyses on Pesticide Dose-Response Data.
70. Ostojić, Z. (2011). The changes of the composition of weed flora in Southeastern and Central Europe as affected by cropping practices – Croatia. U Šarić T., Ostojić Z., Stefanović L., Deneva Milanova S., Kazinczi G., Tyšer L., ur. The changes of the composition of weed flora in Southeastern and Central Europe as affected by cropping practices. *Herbologia*, 12 (1), 8-12.
71. Page, E. R., Nurse, R. E. (2015). Comparing Physical, Chemical, and Cold Stratification Methods for Alleviating Dormancy of Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*) Seeds. *Weed Tech.* 29, 311-317.
72. Pleše, V. (2003). Je li moguće izbjeći limundžik (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Hrvatske šume.* 79/80, 28-29.
73. Puttha, R., Goggi, A., Gleason, M., Jogloy, S., Kesmala, T., Vorasoot, N., Banterng, P., Patanothai, A. (2014). Pre-chill with gibberellic acid overcomes seed dormancy of Jerusalem artichoke. *Agron. Sustain. Dev.* [online] 34 (4), 869-878. DOI: 10.1007/s13593-014-0213-x. Pristupljeno: 25. srpanj 2020.
74. Ruziev, F., Park, I. K., Umurzokov, M., Khaitov, B., Bo Bo, A., Jia, Q. W., Hien, L. T., Sup Choi, J., Park, K. W. (2020). Seed Germination Ecology of Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*) in Korea. *Weed Turf. Sci.* 9 (1), 21-28.
75. Samimy, C., Khan, A. A. (1983). Secondary dormancy, growth-regulator effects, and embryo growth potential in curly dock (*Rumex crispus*) seeds. *Weed Sci.* 31, 153-158.
76. Sarmadi, R., Asli, D. E., Eghdami, A. (2014). Effect of seed priming by potassium nitrate on nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Farm. & Alli. Sci.* 3(3), 312-316.
77. Schutte, B. J. (2007). *Biology and Ecology of Ambrosia trifida* L. Seedling Emergence. Ph.D dissertation. Columbus. OH: The Ohio State University.
78. Schutte, B. J., Regnier, E. E., Harrison, S. K. (2012). Seed dormancy and adaptive Seedling emergence timing in giant ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed Sci.* 60, 19–26.
79. Shaban, M. (2013). Effect of water and temperature on seed germination and emergence as a seed hydrothermal time model. 1(12), 1686-1691.

80. Shaidae, G., Dahl, B. E., Hansen, R. M. (1969). Germination and emergence of different age seeds of six grasses. *J. Range Manag.* 22, 240-245.
81. Shaykhi, A. H., Nassiry, B. M., Kachouei, M. A. (2015). Effect of some treatments on seed dormancy, germination and antioxidant enzymes of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Seeds. Cerc, Agron. Moldova.* 68 (2), 79-90.
82. Simpson, G. M. (1990). *Seed dormancy in grasses.* Cambridge, UK, Cambridge University Press.
83. Storkey, J., Stratonovitej, P., Chapman, D. S., Vidotto, F., Semenov, M. A. (2014). A Process-Based Approach to Predicting the Effect of Climate Change on the Distribution of an Invasive Allergenic Plant in Europe. *PLoS ONE.* [online] 9(2), e88156. DOI:10.1371/journal.pone.0088156. Pristupljeno 1. prosinac 2019.
84. Subbiah, V., Reddy, K. J. (2010). Interactions between ethylene, abscisic acid, and cytokinin, during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *J. Biosci.* [online] 35, 451–458 DOI: 10.1007/s12038-010-0050-2. Pristupljeno: 5. svibanj 2020.
85. Sun, T. P. (2008). Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book.* [online] 6:e0103. DOI: 10.1199/tab.0103. Pristupljeno 1. svibanj 2020.
86. Šarić, T. (1991). *Atlas korova.* Svjetlost. Sarajevo.
87. Škoparija, B., Skjøth, C. A., Celenk, S., Testoni, C., Abramidze, T., Alm Kübler, K., Belmonte, J., Berger, U. i sur. (2017). Spatial and temporal variations in airborne *Ambrosia* pollen in Europe. *Aerobiologia.* 33, 181-189.
88. Šoštarčić, V., Masin, R., Turčinov, M., Carin, N., Šćepanović, M. (2020). Morfološka i funkcionalna intrapopulacijska varijabilnost sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. *J. of Cen. Eur. Agric.* 21 (2), 366-378.
89. Tieng, M. T. (1962). *Germination Inhibition and Promotion of Ragweed (Ambrosia trifida L.) and Smartweed (Polygonum pensylvanicum L.).* Ph.D dissertation. West Lafayette, Purdue University.
90. Vange, V., Heuch, I., Vandvik, V. (2004). Do seed mass and family affect germination and juvenile performance in *Knautia arvensis*? A study using failure-time methods. *Acta Oecologica.* [online] 25, 169-178. DOI: 10.1016/j.actao.2004.01.002. Pristupljeno: 6. lipanj 2020.
91. Vink, J. P., Soltani, N., Robinson, D. E., Tardif, F. J., Lawton, M. B., Sikkema, P. H. (2012). Occurrence and distribution of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida* L.) in southwestern Ontario. *Can. J. Plant Sci.* 92, 533-539.

92. Vukadinović, V., Jug, I., Đurđević, B. (2014). Ekofiziologija bilja. Poljoprivredni fakultet, Osijek.
93. Westhoven, A. M., Davis, V. M., Gibson, K. D., Weller, S. C., Johnson, W. G. (2008). Field presence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*), common lambsquarters (*Chenopodium album*), and giant ragweed (*Ambrosia trifida*) biotypes with elevated tolerance to glyphosate. *Weed Tech.* 22, 544-548.
94. Willemsen, R. W. (1971). Mechanism of seed dormancy in *Ambrosia artemisiifolia*. Disertacija. Oklahoma.
95. Willemsen, R. W. (1975). Effect of stratification temperature and germination temperature on germination and the induction of secondary dormancy in common ragweed seeds. *Am. J. Bot.* [online] 62 (1), 1-5. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1975.tb12333.x>. Pristupljeno 1. prosinac 2019.
96. Willemsen, R. W., Rice, E. L. (1972). Mechanism of seed dormancy in *Ambrosia artemisiifolia*. *Am. J. Bot.* 59, 248-257.
97. Yamada, I. (1954). On the dormancy of weed seeds. I. Effect of thiourea on breaking dormancy. *Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn (Sapporo) Res., Bull.* 67, 58-62.
98. Zhang, W., Wen, C. K. (2010). Preparation of ethylene gas and comparison of ethylene responses induced by ethylene, ACC and ethephon. *Plant Physiol. & Biochem.* 48, 45-53.
99. Zhu, G., An, L., Jiao, X., Chen, X., Zhou, G., McLaughlin, N. (2019). Effects of gibberellic acid on water uptake and germination of sweet sorghum seeds under salinity stress. *Chil. J. Agric. Res.* 79 (3), 415-424.

9. Sažetak

Laura Koščak

Razvoj standardizirane metode prekidanja fiziološke dormantnosti sjemena ambrozije: unapređenje biotest metode utvrđivanja rezistentnih populacija

Poznavanje fenomena primarne dormantnosti sjemena ambrozije ključno je kod provođenja biotestova za dokazivanje rezistentnosti. Cilj ovog rada bio je dobiti brzu, relativno jednostavnu, tehnički nezahtjevnu i financijski prihvatljivu metodu poticanja klijavosti i nicanja fiziološki dormantnog sjemena ambrozije. Rezultati istraživanja ukazuju na smanjenje klijavosti i vijabilnosti sjemena ambrozije kod dužeg hladnog skladištenja (12-18 mjeseci). Nasuprot tome, kod svježe sakupljenog sjemena, hladnim skladištenjem (0-6 mjeseci) klijavosti sjemena raste. Metodom stratifikacije u trajanju od osam tjedana moguće je prekinuti fiziološku dormantnost sjemena ambrozije svježe sakupljenog sjemena (klijavost 95 %). Egzogenom primjenom sintetskih hormona i njihovom kombiniranom primjenom s dušičnim gnojivima također je moguće potaknuti klijavost ambrozije. Tretiranje sjemena ambrozije kombinacijom etefon + GA₃ ostvarena je visoka klijavost obje populacije (85 i 95 %). Na mlađem sjemenu primjenom ovih hormona ubrzava se dinamika klijanja ambrozije. Kondicioniranjem sjemena ambrozije u vodenoj otopini etefon + GA₃ ostvarena je zadovoljavajuća klijavost obje populacije. U plasteničkom pokusu su utvrđene blage deformacije biljaka tretirane hormonima rasta. Biljke ambrozije su razvile duži hipokotil i masa je veća od netretiranih kontrolnih biljaka. Utvrđene su i blage deformacije u vidu stvaranja internodija i abnormalnog izgleda prvih pravih listova na malom broju biljaka obje populacije tretiranih hormonima rasta.

Egzogena primjena hormona rasta i/ili kondicioniranje sjemena u vodenoj otopini hormona rasta značajno potiče klijavost svježe sakupljenog sjemena ambrozije. Zbog ubrzane dinamike klijanja i blagih deformacija početnog rasta ambrozije u daljnjim istraživanjima potrebno je utvrditi pokazuju li ove biljke odstupanja u rastu i kada su naknadno tretirane herbicidima.

Ključne riječi: *etefon, GA₃, KNO₃, tiourea, kondicioniranje*

10. Summary

Laura Koščák

Development of a standardized method for breaking the physiological dormancy of common ragweed seeds: improvement of the biotest method for determining resistant populations

Understanding the phenomenon of primary dormancy which occurs in common ragweed seeds is crucial for assessing the resistance studies. The aim of this study was to develop fast, relatively simple, technically non-demanding and financially acceptable method for promotion of germination of physiological dormant common ragweed seeds. Results of this study shows that germination and viability of seeds are decreased after a long period of cold-storage (12-18 months). Contrary, germination rate of fresh harvested seeds increased after cold-storage conditions (0-6 months). Stratification for 8 weeks successfully broke the physiological dormancy of fresh harvested ragweed seeds (germination rate 95 %). Exogenous application of synthetic growth promoting hormones or their combined application with nitric nutrient compounds are also able to induce germination rate of common ragweed seeds. Applying the combination of ethephon + GA₃ resulted in high germination rate for both tested populations (85 and 95 %). The germination speed was accelerated on fresh seeds treated with growth hormones. Conditioning of ragweed seeds in ethephon + GA₃ water solution resulted in satisfying germination rate for both populations. Greenhouse part of study showed that some plants developed deformations in growth such as highest hypocotyl and biomass in regard to non-treated control plants. Also, some mild deformations were determined, like procreation of internodes and abnormal appearance of first true leaves. This was determined on small number of plants from both populations that developed from seeds treated with growth promoting hormones.

Exogenous application of hormones and/or conditioning in hormone solutions increased the germination rate of fresh harvested seeds. Afterwards, accelerated germination dynamics and mild deformations demand conduction of more future studies directed to finding out if some deviations in growth affects the results in resistance assessments.

Key words: *ethephon, GA₃, KNO₃, thiourea, conditioning*

Životopis

Laura Koščak rođena je 27. rujna 1994. u Našicama. Godine 2014. upisuje Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, smjer Zaštita bilja na kojem, obranom rada pod nazivom „*Interakcije virusa i biljaka domaćina*“, dobiva titulu prvostupnika inženjera agronomije. Godine 2017. nastavlja studiranje na istom fakultetu na MS studiju Fitomedicine, a iste godine predstavlja Agronomski fakultet na Smotri Sveučilišta u Zagrebu. U prosincu 2018. godine kao član izvannastavne aktivnosti „Čudesni svijet korova“ sudjeluje kao izlagač na Međunarodnom sajmu poljoprivrede, poljoopreme i mehanizacije – „CroAgro“. U akademskoj godini 2018./2019. nagrađena je Dekanovom nagradom za rad „*Alelopatski potencijal pokrovnih biljaka na klijavost, dinamiku klijanja i početni rast koštana (Echinochloa crus-galli L.) i sivog muhara (Setaria glauca L.)*“. Rezultati ovog rada nagrađeni su najboljim studentskim posterom u znanstvenoj kategoriji na 64. Seminaru bljne zaštite, Opatija, 4. – 7. veljače 2020. U sklopu edicije „Čudesni svijet korova“ u Gospodarskom listu objavila je stručni rad pod nazivom „*Zombi krastavac*“ o korisnoj strani korovne vrste *Datura stramonium*, a u znanstvenom časopisu *Fragmenta phytomedica* objavila je pregledni znanstveni rad Koščak, L., Šoštarčić, V., Šćepanović, M. (2019) „*Biologija, ekologija i štetnosti korovne vrste Solanum nigrum*“. Koautorica je i na 1 znanstvenom radu Brijačak, E., Koščak, L., Šoštarčić, V., Kljak, K., Šćepanović, M. (2020) „*Sensitivity of yellow foxtail (Setaria glauca L.) and barnyardgrass (Echinochloa crus-galli L.) to the aqueous extracts or dry biomass of cover crops*“ (DOI: 10.1002/jsfa.10603) objavljenom u časopisu *Journal of The Science of Food and Agriculture*. Članica je izvannastavne aktivnosti „Čudesni svijet korova“ od akademske godine 2017./2018., a od akademske godine 2019./2020. voditeljica je znanstvene sekcije ove izvannastavne aktivnosti.