Utjecaj površinske sterilizacije sjemena na klijavost ambrozije (Ambrosia artemisiifolia L.)

Carin, Natalija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:207031

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ POVRŠINSKE STERILIZACIJE SJEMENA NA KLIJAVOST AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

DIPLOMSKI RAD

Natalija Carin, univ. bacc. ing. agr

Zagreb, rujan, 2020

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij

Fitomedicina

UTJECAJ POVRŠINSKE STERILIZACIJE SJEMENA NA KLIJAVOST AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

DIPLOMSKI RAD

Natalija Carin, univ. bacc. ing. agr

Mentor: doc. dr. sc. Maja Šćepanović

Neposredni voditelj: Valentina Šoštarčić, mag. ing. agr.

Zagreb, rujan 2020

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Natalija Carin, JMBAG 0178099918 , izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ POVRŠINSKE STERILIZACIJE SJEMENA NA KLIJAVOST AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

Svojim potpisom jamčim:

− da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada

− da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, primjereno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada

− da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnoga ili stručnog studija

− da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor

− da sam upoznata s odredbama Etičkoga kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (čl. 19.).

U Zagrebu, _____ (datum) _____ (potpis studenta)

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Natalija Carin**, JMBAG 0178099918, naslova

UTJECAJ POVRŠINSKE STERILIZACIJE SJEMENA NA KLIJAVOST AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____

Povjerenstvo	Potpisi
1.izv.prof. dr. sc. Maja Šćepanović, mentor	član _____
2. doc. dr. sc. Joško Kaliterna	član _____
3. izv. prof. dr. sc. Klara Barić	član _____

Neposredni voditelj

Valentina Šoštarčić, mag. ing. agr. _____

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof..dr.sc Maji Šćepanović na iskazanom povjerenju, stručnom vodstvu i korisnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada i utrošenom vremenu za sve moje upite i korekcije ovoga rada.

Posebnu zahvalu upućujem neposrednoj voditeljici. Valentini Šoštarčić, mag. ing. agr na pomoći pri postavljanju i izvođenju pokusa istraživanja te potrebne programske podrške za dobivanje rezultata.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Joško Kaliterna na pomoći tijekom izvođenja pokusa.

Zahvaljujem se i članovima izvannastavne aktivnosti „*Čudesni svijet korova*“ na pomoći pri postavljanju istraživanja za potrebe ovoga rada.

Na kraju, zahvaljujem se i mojoj obitelji, prvenstveno svome ocu, majci i sestri, koji su mi uvijek bili najveća podrška u dosadašnjim školovanju i podupirali me tijekom izrade diplomskog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1
2 PREGLED LITERATURE..... 2
3 HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... 8
3.1 Hipoteze..... 8
3.2 Ciljevi istraživanja..... 8
4 MATERIJALI I METODE..... 9
4.1 Preliminarno istraživanje..... 9
4.2 Površinska sterilizacija sjemena ne-fungicidnim tretmanima..... 9
4.3 Postavljanje testa klijavosti i utvrđivanje klijavosti..... 11
4.4 Identifikacija gljiva razvijenih na kontroli/tretmanu..... 12
4.5 Statistička obrada podataka..... 12
5 REZULTATI..... 13
5.1 Preliminarno istraživanje..... 13
5.2 Rezultati sterilizacije sjemena 14
5.3 Identifikacija roda gljiva prisutnih na sjemenu nakon sterilizacije..... 16
6 RASPRAVA..... 20
7 ZAKLJUČCI..... 24
8 POPIS LITERATURE..... 25

Sažetak

Diplomskog rada studentice Natalije Carin, naslova

UTJECAJ POVRŠINSKE STERILIZACIJE SJEMENA NA KLIJAVOST AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

Gljive su prirodno prisutne u tlu i dolaze u doticaj s biljkama i njihovim sjemenjem. Većina ovih interakcija je korisna, ali postoje i negativne interakcije koje imaju posljedice za zdravlje i razvoj biljke. U znanstvenim istraživanjima u kojima se kao osnova za predviđanje ponika korovne vrste u usjevu promatra klijanje sjemena, prisutnost patogena može predstavljati ograničavajući čimbenik u dobivanju pouzdanih podataka.

Istraživanje je provedeno na sjemenu biljne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. s ciljem da se identificiraju gljive koje se javljaju na površini sjemena te da se utvrdi ukupna klijavost i vijabilnost sjemena pri različitim tretmanima za površinsku sterilizaciju sjemena. Tretmani u istraživanju uključivali su pet različitih otopina: 4%-tni natrijev hipoklorit (NaOCl), 70%-tni etanol (C_2H_6O), 10%-tni kalcijev hipoklorit ($Ca(ClO)_2$), 3%-tni vodikov peroksid (H_2O_2) te 1%-tni kalij permanganat ($KMnO_4$). Sjemenke su sterilizirane uranjanjem u navedene otopine, kroz period od 3, 6, 9, 12 i 15 minuta, uz ručno miješanje.

Najveća klijavost postignuta je potapanjem sjemena ambrozije u natrijev hipoklorit (98%, 6 minuta), vodikov peroksid (95%, 6 minuta) i kalijev permanganat (92%, 15 minuta) i nije se značajno razlikovala u odnosu na netretirano sjeme (kontrola, 95%). Niži postotak klijavosti zabilježen je primjenom kalcijevog hipoklorita (79%, 3 minuta), dok je najniža klijavost sjemena zabilježena potapanjem u 70%-tni etanol (57%, 9 minuta). Izolacijom gljiva s površine sjemena i sa površine filter papira neposredno oko sjemena iz četiri različite populacije utvrđena je prisutnost gljiva iz tri roda: *Alternaria*, *Fusarium* i *Penicillium*. U najvećem stupnju zastupljenosti na svim populacijama utvrđena je gljiva iz roda *Alternaria*. Najveći broj gljiva utvrđen je na sjemenu potopljenim u 10%-tni kalcijev hipoklorit (105). Najmanje gljiva utvrđeno je na sjemenu potopljenom u 1%-tni kalijev permanganat (30) i 4%-tni natrijev hipoklorit (19).

Zbog malog broja razvijenih gljiva na sjemenu te zbog pozitivnog utjecaja na klijavost, potapanje sjemena ambrozije u 4%-tni natrij hipoklorit se pokazao najboljim tretmanom za sterilizaciju površine sjemena vrste *Ambrosia artemisiifolia* L..

Ključne riječi: natrijev hipoklorit, površinska sterilizacija, gljive, sjeme ambrozije, klijavost

Summary

Of the master's thesis - student Natalija Carin, entitled

EFFECTS OF SURFACE STERILIZATION OF SEEDS ON THE GERMINATION OF AMBROSIA (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

Fungi are naturally present in the soil and come into contact with plants and their seeds. Most of these interactions are beneficial but there are also negative interactions that can have grave consequences for plant growth and development. In research where weed germination is observed in the crop as a basis for predicting the emergence of the weed species, the presence of pathogens may be a limiting factor in obtaining reliable data. The study was conducted on the seed plant species *Ambrosia artemisiifolia* L. with the aim to identify fungi that occur on the seeds and determine the total germination and viability of seeds after various treatments for seed sterilization. The study included treatments with 4% sodium hypochlorite (NaOCl), 70% ethanol (C_2H_6O), 10% calcium hypochlorite ($Ca(ClO)_2$), 3% hydrogen peroxide (H_2O_2), and 1% potassium permanganate ($KMnO_4$). The seeds are sterilized by immersion in the above solutions, over a period of 3, 6, 9, 12 and 15 minutes, with manual mixing.

The percentage of germination of the seeds of ambrosia at the control is 95%, the highest germination was achieved by sterilisation with sodium hypochlorite (98%, 6 minutes), hydrogen peroxide (95%, 6 minutes) and potassium permanganate (92%, 15 minutes). A lower germination rate was observed with calcium hypochlorite (79%, 9 minutes), while the lowest germination was reported with treatment with 70% ethanol (57%, 9 minutes). Isolating fungi from the surface of the seed on the filter paper from the seed, the presence of fungi from these genus was detemined: *Alternaria*, *Fusarium* and *Penicillium.* Most prevalent genus of fungi was *Alternaria* in all populations. The highest number of fungi was reported on treatment with 10% calcium hypochlorite (105). At least fungi have occurred on sterilization treatments using 1% potassium permanganate (30) and sodium hypochlorite (19).

The best results were obtained using 4% sodium hypochlorite. Because the treatment provided good sterilization against fungi, had a positive effect on germination on the seeds of *Ambrosia artemisiifolia* L. it is condiered the best treatment among the ones tested.

Key words: sodium hypochlorite, surface sterilization, fungi, ambrosia seed, germination

1. UVOD

Na Zemlji postoji oko 380 000 vrsta biljaka i 2,2 - 3,8 milijuna vrsta gljiva **(Hawksworth i Lücking 2017)**. Veliku većinu gljiva čine korisne vrste ali postoje i vrste koje parazitiraju na biljkama. Takve gljive nazivano fitopatogenim.

Od davnina fitopatogene gljive su poznati kao uzročnici bolesti. One uzrokuju oko 70- 80% biljnih bolesti. **(Zeilinger i sur. 2016)**. Do danas je poznato oko 100 000 vrsta gljiva. Oko 100 vrsta gljiva uzrokuje bolesti kod čovjeka i životinja, dok bolesti kod biljaka uzrokuje više od 10 000 vrsta gljiva. Svaka biljka može biti napadnuta nekom vrstom fitopatogenih gljiva, i svaka fitopatogena gljiva može napasti jednu ili više vrsta biljaka **(Cooper 2007)**. Bez obzira na uzročnika, kod bolesnih biljaka remete se životni procesi: primanje vode, mineralnih tvari, hraniva, izgradnja organskih spojeva i njihovo premještanje unutar biljke, a to se vidi u simptomima karakterističnima za svakog uzročnika. Parazitske bolesti koje uzrokuju gljive nazivamo mikoze.

Iz navedenog, jasno je kako je prisustvo patogena na biljnim vrstama nepoželjno. Primjerice, u istraživanjima u kojima se kao osnova za predviđanje ponika korovne vrste u usjevu promatra klijanje sjemena, prisutnost navedenih patogena može predstavljati ograničavajući čimbenik. Kod ove vrste laboratorijskih istraživanja prati se klijavost sjemena korova i do dva mjeseca, ovisno o istraživanoj temperaturi i/ili istraživanoj koncentraciji polietilen glikola koji simulira vlagu tla. Razvoj patogena na sjemenu korova najčešće ometa klijanje, pa rezultati mogu biti nepouzdani jer se ne može točno definirati razlog neproklijalog sjemena odnosno je li inhibicija klijavosti pod utjecajem patogena ili dormantnosti sjemena.

Stoga je potrebno provesti sterilizaciju sjemena u svrhu dobivanja čistog i zdravog biljnog materijala za potrebe istraživanja. U tu svrhu razvijaju se metode sterilizacije sjemena. Kako se biljne vrste međusobno razlikuju, tako nisu ni sve metode sterilizacije jedinstvene za dobru sterilizaciju kod svih vrsta. Tretman mora osigurati dobru zaštitu od patogena, a da pri tome ne utječe ili ne ometa druge životne procese sjemena. Za kultivirane biljke postoje već utvrđeni protokoli sterilizacije, ali za korovne vrste nisu provedena istraživanja za odabir ili razvoj adekvatnog protokola sterilizacije. Većina istraživanja patogena na korovima je u svrhu njihovog biološkog suzbijanja ili utvrđivanje utjecaja patogena na preživljavanje korova u tlu.

Svrha ovog istraživanja je razviti metodu sterilizacije sjemena korovne vrste *Ambrosia artemsiifolia* L. kako bi se smanjio ili zaustavio razvoj gljiva na površini sjemena, a da se pri tome ne smanji klijavost sjemena i ne uspori/ubrza prirodna dinamika klijanja sjemena.

2. PREGLED LITERATURE

Ambrosia artemisiifolia L. (ambrozija ili pelinolisni limundžik), korovna je jednogodišnja širokolisna vrsta iz porodice glavočika (Asteraceae). Prema podacima iz literature ambrozija u povoljnim uvjetima može proizvesti i do 62 000 sjemenki po biljci ovisno o veličini biljke, načinu razvoja, kompetitivnosti i ekološkim uvjetima. **(Kazinczi i sur. 2008)**. Zbog velike sjemenske proizvodnje i karakterističnog izgleda sjemena, sjeme ambrozije je lako za prikupiti za potrebe laboratorijskih istraživanja. Međutim, biljka je u doticaju s različitim mikroorganizmima, od kojih neki mogu biti patogeni.

Istraživanja biljnih patogena na ili u biljakama uglavnom su usmjerena na uzgajane vrste kojima biljni patogeni nanose štetu u vidu smanjena prinosa ili pak naštete izgledu ukrasnih biljaka. **Wilman (2014)** navodi kako patogene gljive mogu izazvati gubitke u usjevima i do 75% te da je najčešće vrijeme širenja gljiva za vrijeme rasta biljke. Također, **Yadav i Singh (2011)** navode kako kontaminacija mikroorganizmima biljnog materijala za istraživanja u prosjeku uzrokuje gubitak od 3 do 15%. Sjeme prikupljeno iz polja često je u doticaju sa različitim bakterijama i gljivama **(Halloin 1975; Klich 1986; Howell 2002; Ahmad et al. 2012)**. Glavni izvor infekcije su biljni ostaci, ali i zaraženo sjeme i sadni materijal, ako su presadnice uzgojene u zaraženom supstratu. Patogen koji se može dugo održati u tlu se smatra tipičnim „soil-borne" patogenom **(Sever i Cvjetković 2016)**. Upravo zbog toga, većina se sjemena kultiviranog bilja tretira odgovarajućim fungicidom prije sjetve kako bi se omogućio nesmetan ponik. Međutim, kod korovnih vrsta prisutnost patogena na sjemenu značajno je manje istražena, a također predstavlja ograničavajući čimbenik klijanja. Dosadašnjih istraživanja u ovom području je malo i uglavnom se povezuju s ekologijom, odnosno utjecajem patogena na preživljavanje sjemena korova u banci sjemena tla ili češće pronalaženjem učinkovitog načina biološkog suzbijanja **(Dalling et al. 2010)**. Sterilizacija biljnog materijala (sjemena) za laboratorijska istraživanja je najteži dio u razvijanju protokola za uzgoj kultura in vitro **(Oluwakemi i sur. 2018)**.

Najčešće utvrđeni mikororganizmi na površini biljaka su bakterije i gljive. U istraživanju na biljkama uzgojenima *in vitro* i sa zaraženih presadnica **Leifert i sur. (1991)** izolirali su gljive iz rodova: *Fusarium, Neurospora, Aspergillus*, *Microsporium*, *Cladosporium* i *Philalophora. Rhodotorula* i *Candida*. **Gerber i sur. (2011)** navode oko 20 gljivičnih patogena prisutnih na odraslim biljkama ambrozije dok **Feher (2013)** izolacijom gljiva s površine sjemena ambrozije utvrđuje da su dva najzastupljenija roda: *Alternaria* i *Penicillium*. **Nagrale i sur. (2016)** opisuju rod *Alternaria* kao jedan od najrasprostranjenijih i ekonomski štetnih rodova, navodeći da 20% gubitka prinosa različitih usjeva je uzrokovano ovom gljivom. Gljive se najčešće razmnožavaju nespolno, u obliku spora. Spore mogu biti različitih oblika i veličina te je najčešći oblik širenja pomoću vjetra. **Bezjak (1958)** navodi kako su spore gljiva prirodno prisutne u zraku u Hrvatskoj, navodeći rodove *Alternaria* i *Penicillium* među najčešćima i najbrojnijima.

Schafer i **Kotanen (2004)** u svom istraživanju provode niz pokusa u kojima izoliraju gljive s površine sjemena kako bi utvrdili da li je prisustvo patogenih gljiva u tlu povezano sa mortalitetom sjemena prirodno prisutnih biljaka u različitim prirodnim staništima (suhe, mokre i mezofilne livade te borova šuma i šuma javora i breza). Nakon testa klijavosti, s dormantnog i mrtvog sjemena izolirano je oko 100 vrsta gljiva. Najučestalija gljiva bila je *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. koja je zabilježena na 88% cjelokupno prikupljenog sjemena. U drugom djelu istraživanja, autori su testirali patogenost gljiva da bi utvrdili potencijalni utjecaj gljiva na klijavost. Rezultati su se razlikovali ovisno o patogenu i biljnoj vrsti ali je na većini biljnih vrsta klijavost bila smanjena za više od 50%. Autori zaključuju da patogeni utječu na populaciju, raspodjelu i klijavost biljnih vrsta, ali da utjecaj ovisi o staništu i interakcijama između biljke i patogena.

U suzbijanju fitopatogenih gljiva najčešće se koriste fungicidi. To su najučinkovitija sredstva i najčešća mjera zaštite kultiviranih biljaka protiv patogenih gljiva i pseudogljiva. Uz fungicide, najčešće mjere sterilizacije biljnog materijala za laboratorijska istraživanja uključuju: toplinu, elektrone, protugljivične proizvode i biološku kontrolu (prirodno prisutne gljive u tlu poput gljiva iz roda *Trichoderma*, te bakterije rodova *Pseudomonas* i *Bacillius*, rizobakterije, streptomicete i biofungicidi, napravljenih od rizobakterija i streptomiceta) (**Kang et al. 2015; Mancini i Romanazzi 2013)**. Pregledom literature utvrđeni su najčešće korišteni načini površinske sterilizacije sjemena u laboratorijskim uvjetima: natrij hipoklorit (NaOCl), vodik peroksid (H_2O_2), 70%-tni etanol (C_2H_6O), kalcijev hipoklorit ($Ca(ClO)_2$), živin (II) klorid ($HgCl_2$) te kalij permanganat ($KmNO_4$). Iako ne postoji standardizirana metoda sterilizacija površine sjemena ambrozije, istraživanja su provedena na drugim vrstama u istu svrhu pronalaska optimalne metode sterilizacije sjemena.

Wilson (1915) je proveo istraživanje o učinkovitosti kalcijevog hipoklorita kao moguću metodu sterilizacije na različitim vrstama sjemenki nakon nezadovoljavajućih rezultata sterilizacije tada komercijalnim sredstvima (živin (II) klorid, etanol, formalin, vodikov peroksid). U istraživanju koristi 2%-tni kalcijev hipoklorit s različitim razdobljima izlaganja sjemena te utvrđuje vrijeme koje je potrebno za sterilizaciju sjemena i vrijeme u kojem izloženost otopini ima negativan utjecaj na sjeme. Također navodi kako se potrebno vrijeme sterilizacije razlikuje između vrsta. Autor zaključuje kako su hipokloritne soli dovoljno pouzdana metoda sterilizacije te da ne oštećuje sjeme. **White (1938)** potvrđuje tvrdnju uspješno testirajući kalcijev hipoklorit na sjemenu salate. **Miché i Balandreau (2001)** također istražuju korištenje hipokloritne soli za potrebe sterilizacije sjemena za naknadnu inokulaciju. Za uspješnost tretmana navode da sredstvo treba biti dovoljno snažno da suzbije neželjene gljive i omogući naknadnu inokulaciju bez negativnih utjecaja na razvoj inokuliranih gljiva. Istraživanje je uključivalo sjeme riže tretirano sa 10%-tnom otopinom vodikovog peroksida na 10 minuta te kasnije sa 1%-tnom otopinom kalcijevog hipoklorita na sat vremena. Autori su utvrdili da hipokloritne soli imaju negativan učinak na naknadnu inokulaciju sjemenki gljivama. **Wilson i Punyasingha (1939)** navode kalcijev hipoklorit kao metodu za sterilizaciju površine korijenovih kvržica na vrstama *Dalea*

alopecuroides (Aiton) Bullock, *Glycine max* L., *Melilotus alba* Medik. i *Trifolium repens* L.. **Baiyeri i Mbah (2006)** su na vrsti *Treculia africana var. africana* Decne istraživali postoji li povezanost između metode sterilizacije i vremena skladištenja sjemena. U istraživanju autori su uspoređivali da li različito vrijeme sjetve sjemena s biljke i sterilizacija sa natrijevim hipokloritom ima utjecaj na klijanje sjemena i razvoj lisne mase. Tretmani su uključivali utjecaj roka sjetve: 0 (neposredna sjetva nakon uzimanja s majčinske biljke), 3, 6 i 9 dana nakon skladištenja i utjecaj otopina različitih koncetracija za sterilizaciju: sterilna voda (kontrola), 5%-tna i 10%-tna otopina natrij hipoklorita. Rezultati ukazuju da sjeme koje je duže skladišteno daje lošije postotke klijavosti i deformirane klijance dok kraće vrijeme skladištenja uzrokuje bolje klijanje i manje deformacija. Autori nakon njihovog istraživanja zaključuju da 10%-tna otopina natrijevog hipoklorita za sterilizaciju te sadnja nakon 3 do 6 dana skladištenja daje optimalne rezultate.

Lindsey i sur. (2017) optimizirali su metodu sterilizacije sjemena vrste *Arabidopsis thaliana* L.. U istraživanju uspoređuju dvije metode sterilizacije sjemena za ovu vrstu: komercijalna varikina (natrij hipoklorit) u kombinaciji sa surfaktantom Tween-20 i 6%-tni klor (plinovita faza). Autori uspoređuju učinkovitost dviju prethodno navedenih metoda na osnovu postotka klijavosti i suzbijanje mikroorganizama na površini sjemena. Za oba tretmana utvrđeni su optimalni uvjeti sterilizacije bez negativnog utjecaja na klijavost: 40-80% na 10 minuta sa otopinom natrij hipoklorita i 6,1% ili 16,5% sa plinovitom fazom klora na sat vremena. Za sterilizaciju sjemena čija površina nije glatka, **Gawel i Bollen (1960)** navode kombinaciju 0,5%-tne otopine vodikovog peroksida i 40%-tne otopine perocetne kiseline ($C_2H_4O_3$). Tretman gdje je sjeme tretirano otopinom vodikovog peroksida u intervalu od 55 sati, te kasnije 5,5 sati u otopini peroksiocetne kiseline pokazao je optimalne rezultate i signifikantan učinak na postotak klijavosti. Napominju kako se ove otopine koriste i za sterilizaciju sjemena žitarica.

Za sve kultivirane vrste biljaka propisana je dopuštena doza primjene sredstva za zaštitu. Međusobno biljke između sebe imaju različite propisane doze i različite dopuštene intervale izlaganja sredstvima kako bi se postigao najbolji učinak. Premala ili prevelika količina nekog sredstva i nepovoljan period izlaganja mogu imati negativan utjecaj na biljku. **Zhao i sur. (2006)** provode istraživanje na sjemenu vrste *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC. U istraživanju koriste otopine vodikovog peroksida i kalijevog permanganata te utvrđuju da vodikov peroksid, u koncetraciji od 1-2%, ima slab pozitivan učinak na klijanje dok male količine kalijevog permanganata (0,1-0,5%) inhibiraju klijanje. **Amoah i sur. (2007)** uspoređuju različite metode dezinfekcije listova salate gdje koriste i kalijev permanganat, navodeći kako je tretman imao dobar učinak na smanjenje broja bakterija pri tretiranju 3 - 4 sekunde i u periodu izlaganja od 2 minute.

Escamilla i sur. (2019) na različitim kultivarima sjemena soje (*Glycine max* L.) uspoređuju više tretmana sterilizacije sjemena u različitim periodima izlaganja, njihovu uspješnost sterilizacije sjemena kao i učinke na životne procese biljke. Od 55 pronađenih gljiva na sjemenu, najveći dio pripada rodovima *Alternaria, Diaphorte* i *Fusarium*. U manjem broju pronađene su i gljive roda *Penicillium*. Tretmani su uključivali: tretman toplom vodom (60°C) na 2 minute, tretman toplinom (50°C) na 1 sat, otopina 2%-tnog kalcijevog hipoklorita na 10 minuta, otopina 2%-tnog natrijevog

hipoklorita na 10 minuta, otopina 5%-tne octene kiseline na 2 minute i 5%-tna otopina mliječne kiseline na 10 minuta. Najboljim tretmanima pripadaju tretman toplom vodom (60°C) (4%), 2%-tni kalcijevim hipokloritom (14,7%) i octenom kiselinom (16,7%). U usporedbi s kontrolom (58,7%), svi tretmani imali su manji broj gljiva zabilježenih na sjemenu. Mliječna kiselina (32%), natrij hipoklorit (39.3%) i tretman toplinom (61,1%) nisu dali zadovoljavajuće rezultate. **Escamilla (2019)** provodi i dodatno istraživanje učinka tretmana koji su imali zadovoljavajuće rezultate sterilizacije sjemena (2%-tnog kalcijevog hipoklorita (10 minuta), 5%-tne ocetne kiseline (2 minute) i tretmana tople vode (2 minute) na klijance soje. Najbolji rezultati ostvareni su potapanjem sjemena u toplu vodu (4%), kalcijev hipoklorit (14.7%) i octenu kiselinu (16.7%) u usporedi sa kontrolom (58.7%). Potapanje sjemena u natrijev hipoklorit nije imao zadovoljavajući učinak (39.3%) dok kod potapanja u 2%-tni kalcijev hipoklorit i 5%-tnu octenu kiseline nije zabilježen negativan učinak na klijance. Zbog dobrog učinka sterilizacije sjemena i bez negativnih učinaka na klijance soje, kao najbolji tretman utvrđen je 2%-tni kalcijev hipoklorit. Na sjemenu vrste *Dracocephalum moldavica* L. najbolji učinak postignut je primjenom 4%-tnog natrijevog hipoklorita u trajanju od 8 min. bez utjecaja na inhibiciju klijanja **(Younesikelaki i sur. 2016)**.

Metode sterilizacije sjemena razvijene su za neke od ljekovitih vrsta primjerice *Alethea officinalis* L. i *Dracocephalum moldavica* L. **(Varasteh i sur. 2015; Younesikelaki i sur. 2016)**. Sjeme ljekovite vrste *Alethea officinalis* L. tretirano je živinim (II) kloridom, natrijevim hipokloritom i etanolom u različitim koncentracijama i različitom periodu izlaganja. Zbog opasnosti od trovanja i njezinog štetnog utjecaja na okoliš, uporaba žive u Europi je zabranjena, ali u drugim državama (Indija, Tajvan, Indonezija i druge zemlje Azije) njezina upotreba je dopuštena u svrhe sterilizacije biljnog materijala. Već 1985. **Dadd i Jacobs** proučavaju utjecaj ostataka živinog (II) klorida na sjemenju. Tvrde da se živin (II) klorid koji nije uklonjen nakon tretmana absorbira u sjeme i može utjecati na klijavost. Slične tvrdnje iznose i za srebrov nitrat ($AgNO_3$). Najbolja učinkovitost suzbijanja patogena (17% kontaminirane površine) postignuta je primjenom 4%-tne otopine natrij hipoklorita (5 min) s ukupnom klijavošću sjemena od 66%. Sterilizacija sjemena sa 70%-tnim etanolom u kombinaciji sa surfaktantom Tween 20 u trajanju od 5 min rezultirala je s osrednjom učinkovitošću (46% kontaminacije), ali bez utjecaja na klijavost (79% klijavosti). Međutim, primjenom istog tretmana, ali u trajanju od 10 min., ostvaren je bolji učinak na suzbijanje patogena (33% kontaminacije), ali i smanjenom selektivnošću (klijavost sjemena (59%) **(Varasteh i sur. 2015)**. Etanol je fitotoksičan za biljke te se zbog toga biljni materijal njime kratko tretira. Najčešće se koristi kao pred-tretman ili u kombinaciji s drugim metodama sterilizacije **(Sen i sur. 2013)**.

Oluwakemi i suradnici (2018) na vrsti *Solanecio biafrae* Oliv. & Hiern uspoređuju tretmane 70%-tnog etanola i 10%-tnog kalcijevog hipoklorita u različitim dozama i vremenskim intervalima. Tretmani kombinacije 70%-tnog etanola na 20 sekundi sa 10%-tnim kalcijevim hipokloritom uzrokovali su potpunu sterilizaciju sjemena (100%) uz ostvarenu klijavost od 90%, dok je tretman sa 70%-tnim etanolom na 3 minute s 10%-tnim kalcijevim hipokloritom na 20 minuta ostvario sterilizaciju sjemena od 100%, ali znatno utjecao na klijavost (60%).

Wenny i Dumroese (1987) navode da najčešće primijenjeni fungicidi, poput kaptana i tirama sve manje koriste u sterilizaciji sjemena zbog nepovoljnih učinaka na klijavost. Kao zamjenu navode 5,25%-tnu otopinu natrijevog hipoklorita. Tretman je uspješno suzbio gljivične populacije na površini sjemena te nije utvrđeno značajno smanjenje klijavosti. **Watts i sur. (1993)** navode da natrijev hipoklorit, srebrov nitrat, kalcijev hipoklorit, živin (II) klorid te fungicidi Benlat i Kaptan ne daju zadovoljavajuće rezultate za sterilizaciju. Umjesto toga, koriste tretman toplinom za sterilizaciju sjemena žitarica. Tretmani su se sastojali od natapanja sjemena u vodi na periode 4, 8, 12 i 24 sati te kasnije prebacivanje u vodu različitih temperatura od 40°C, 50°C, 55°C i 60°C na period od 5 i 10 minuta. Najbolji tretman bio je tretiranje sjemena temperaturom od 50°C na 5 minuta. Kod najhladnijeg tretmana (45°C) nije utvrđen signifikantan učinak na površinsku sterilizaciju dok je kod najtoplijeg tretmana (60°C) došlo do potpune inhibicije klijanja. **Kubota i sur. (2012)** opisuju kako se tretmani suhim zrakom komercijalno koriste u japanskim tvrtkama za zaštitu protiv bolesti uzrokovanih bakterijom *Acidovorax citrulli* na biljkama iz porodice Cucurbitaceae te za sterilizaciju sjemena. Potpuna dezinfekcija sjemena postignuta je tretmanom na 85°C kroz 3-5 dana. **Barney (2003)** u istraživanju koristi otopinu 0.5%-tnog natrijevog hipoklorita s visokim učinkom sterilizacije površine sjemena bez negativnih utjecaja na dinamiku klijanja sjemena u usporedbi s fungicidima mankozeb i kaptan. Fungicidi su utjecali na dinamiku klijanja te inhibirali klijanje sjemena. S ciljem utvrđivanja utjecaja otopina za sterilizaciju na klijavost sjemena, **Sen i sur. (2013)** ispituju različite kombinacije na sjemenu vrste *Achyranthes aspera* L., s i bez ovojnice. U istraživanju koriste 70%-tni etanol, živin (II) klorid, fungicide Flugal (flugazol) i Nysatin (nisatin) i natrijev hipoklorit u različitim koncentracijama i vremenskim intervalima. Tretman s natrijevim hipokoritom u trajanju od 30 minuta dao je najbolje rezultate: 83,44% (s ovojnicom) i 63,88% (bez ovojnice) bez utjecaje na klijanje sa 100% (s ovojnicom) i 60% (bez ovojnice). S povećanom koncentracijom i dužim periodom izlaganja kod svih tretmana utvrđen je negativan učinak (inhibicija) na klijanje.

Srivastava i sur. (2009) uspoređuju tri tretmana sterilizacije na vrsti *Aconitum heterophyllum*. Sjeme je tretirano otopinama živinog (II) klorida u koncentracijama od 0.05%, 0.1% i 0.15%, natrijevog hipoklorita od 0.5,%, 1% i 1.5% i vodikovog peroksida od 5%, 7.5% i 10% na period izlaganja od 2, 5 i 8 minuta. Najbolji tretman na sjemenu (90% klijavosti) bio je sa 7.5%-tnim vodikovim peroksidom u periodu od 5 minuta dok je 0.1%-tni živin (II) klorid u periodu od 5 minuta rezultirao s minimalnom kontaminacijom nodija (100% zdravih nodija) dok su tretmani s natrijevim hipokloritom dali nezadovoljavajuće rezultate. Međutim, **Badoni i Chauhan (2010)** provode istraživanje uspoređujući tretmane 0,1%-tnog živinog (II) klorida i 1%-tnog natrijevog hipoklorita u periodima od 2, 5 i 8 minuta za *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini' U njihovome istraživanju bolji rezultati postignuti su s 1%-tnim natrijevim hipokloritom u periodu od 8 minuta dok je kod živinog (II) klorda utvrđen toksični učinak na biljku. **Zhao i sur. (2006)** utvrdili su kako u koncentraciji od 1-2% vodikov peroksid ima slab pozitivan učinak na klijanje dok male količine kalijevog permanganata od 0,1-0,5% inhibiraju klijanje.

Nove tehnologije poput nanotehnologije i plazme, pronalaze sve više primjena u različitim djelatnostima pa tako i u agronomiji. **Hojjat i Hojjat (2015)** provode istraživanje utjecaja nanočestica srebra (AgNPs) na različite parametre biljke poput: duljine korijena, biomasa, klijanje sjemena i postotak klijavosti. Napominju kako se srebro koristi u obliku folijarnog spreja za suzbijanje razvoja biljnih bolesti. **Kang i sur. (2015)** testiraju protugljivična svojstva ozona i plazme na sterilizaciji sjemena riže uzrokovano gljivom *Fusarium fujikuro*. Tretmani su ostvarili zadovoljavajuće rezultate. Ozon se još koristi i u svrhe sterilizacije prostorija. **De Groot i sur. (2018)** navode korištenje plazme za poboljšavanje i ubrzavanje klijanja sjemena uz dobru zaštitu od patogena poput gljiva i bakterija.

Za potrebe laboratorijskih istraživanja u kojima se provodi test klijavosti potrebno je osigurati zdrav i čist sjemenski materijal. Testovi klijavosti sjemena korova pri različitoj temperaturi i vlazi provode se kako bi se utvrdili biološki parametri klijanja: biološki minimum i biološki vodni potencijal. **Biološki minimum** ($\mathbf{T_b}$) najniža je temperatura potrebna za nicanje neke vrste, odnosno pri temperaturama nižim od biološkog minimuma, nicanje je jednako nuli **(Gummerson, 1986)**. **Vodni potencijal** ($\mathbf{\Psi_b}$) minimalna je količina vlage u tlu koja je potreba za nicanje. Kako bi se ovakvi tipovi istraživanja mogli provesti potrebno je obaviti sterilizaciju sjemena s ciljem sprječavanja razvoja patogena. Pri tome, odabrana metoda sterilizacije, osim što mora biti učinkovita u sprečavanju razvoja patogena, ne smije poremetiti prirodnu klijavost sjemena (utjecati na vijabilnost i dinamiku klijanja). Pojam dinamika klijavosti podrazumijeva brzinu klijanja sjemena, odnosno vrijeme (broj dana) koje je potrebno za ponik 10, 50 i 90% od ukupnog posijanog sjemena u sjemenskoj populaciji.

3. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1 HIPOTEZE

1. Provođenjem testa klijavosti na površini netretiranog sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. doći će i do razvoja micelija gljiva, a najviše će biti zastupljene vrste iz roda *Alternaria*.
2. Sjeme ambrozije potopljeno u otopine natrijevog hipoklorita (NaOCl), vodikovog peroksida (H_2O_2), 1%-tnog kalijevog permanganata ($KmNO_4$), u svrhu površinske sterilizacije, neće imati smanjenu klijavost u odnosu na netretirano sjeme.
3. Dužina potapanja sjemena ambrozije u otopine (4%-tni natrij hipoklorit, 70%-tni etanol, 3%-tni vodik peroksid, 10%-tni kalcij hipoklorit i 1%-tni kalij permanganant) utjecat će na vijabilnost sjemena ambrozije.

3.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Provjeriti učinkovitost nekoliko različitih tretmana za površinsku sterilizaciju sjemena ambrozije s obzirom na njihov istovremeni inhibitorni učinak na razvoj gljiva i neutralni učinak na klijavost sjemena.
2. Identificirati do razine roda najzastupljenije gljive koje se javljaju na sjemenu korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. u pokusnim uvjetima *in vitro* s ili bez tretmana površinske sterilizacije sjemena

4. MATERIJALI I METODE RADA

U istraživanju je korišteno sjeme korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L., prikupljeno u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske, na lokaciji Jastrebarsko (45°40'18″N 15°39'03″E). Istraživanje u laboratorijskim uvjetima provedeno je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za fitopatologiju i Zavodu za herbologiju. Istraživanje je podijeljeno na četiri dijela:

I) Preliminarno istraživanje
II) Površinska sterilizacija sjemena
III) Postavljanje testa klijavosti i utvrđivanje klijavosti
IV) Identifikacija gljiva razvijenih na netretiranom sjemenu (kontroli)

U nastavku teksta prikazan je opis pojedinih metoda istraživanja. Pokus je postavljen po slučajnom bloknom rasporedu u četiri ponavljanja.

4.1. Preliminarno istraživanje

Preliminarno istraživanje provedeno je s ciljem odabira populacije sjemena koja će se koristiti u daljnjem pokusu kao i utvrđivanja prisutnih gljiva na površini sjemena ambrozije.. Testirano je sjeme četiri populacije ambrozije sakupljene u različitim razdobljima. Populacije su označene lokacijom i vremenom sakupljanja: Jastrebarsko 2014; Jastrebarsko 2016; Šašinovečki Lug 2016 i Ivanić Grad 2017.

Pokus je postavljen 25. rujna 2018. postavljenjem sjemena ambrozije na filter papir uz dodatak destilirane vode. Sjetva je obavljena bez sterilne komore, bez sterilizacije i bez ispiranja sterilnom vodom. Petrijeve posude sa sjemenom postavljene su u klima komoru na optimalni temperaturni režim za klijanje ambrozije (25/15°C; 12h:12h). Deset dana nakon sjetve očitana je klijavost te je provedena identifikacija gljiva razvijenih na površini sjemena. Kriterij odabira populacije za nastavak provođenja istraživanja temelji se na minimalno 60%-tnoj klijavosti sjemena ambrozije.

4.2. Površinska sterilizacija sjemena

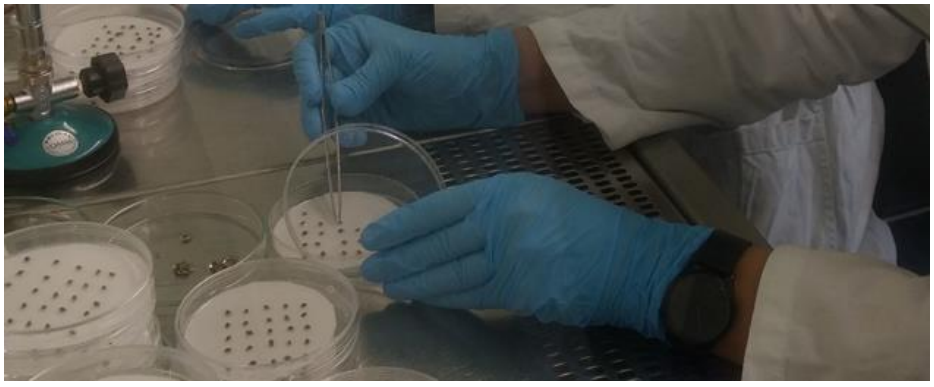
Istraživanje je uključivalo potapanje sjemena ambrozije u otopine: 4%-tnog natrijevog hipoklorita (NaOCl), 70%-tnog etanola (C_2H_6O), 10%-tnog kalcijevog hipoklorita ($Ca(ClO)_2$), 3%-tnog vodikovog peroksida (H_2O_2), 1%-tnog kalijevog permanganata ($KMnO_4$). U istraživanju je uključeno i netretirano sjeme (kontrola, ispiranje sterilnom vodom) i ukupno je bilo 26 tretmana (Tablica 4.2.1). Sterilizacija sjemena otopinama 4%-tnog NaOCl , 3%-tnog H_2O_2, 1%-tnog $KMnO_4$ te sjetva steriliziranog sjemena provedene su 5. prosinca 2018., dok su sterilizacija sjemena otopinama 70%-tnog C_2H_6O i 10%-tnog $Ca(ClO)_2$ i sjetva steriliziranog sjemena provedene 6. prosinca 2018. U svakom tretmanu korišteno je 100 sjemenki, ukupno 2 600 sjemenki

ambrozije. Sjemenke su sterilizirane uranjanjem u navedene otopine, tijekom 3, 6, 9, 12 i 15 minuta, uz ručno miješanje.

Tablica 4.2.1. Popis primijenjenih tretmana (otopina za sterilizaciju sjemena) i vrijeme trajanja potapanja sjemena u svaku otopinu

NAZIV	SREDSTVO	VRIJEME (min)
T1	KONTROLA	-
T2-T6	4% NaOCl	3,6,9,12,15
T7-T11	70% C_2H_6O	3,6,9,12,15
T12-T16	10% $Ca(ClO)_2$	3,6,9,12,15
T17-T21	3% H_2O_2	3,6,9,12,15
T22-T26	1% $KmnO_4$	3,6,9,12,15

Nakon sterilizacije, sjeme je procijeđeno kroz prethodno sterilizirano laboratorijsko cjedilo te je isprano pet puta sterilnom destiliranom vodom. Postavljeno je na sterilni filter papir u prethodno steriliziranu staklenu Petrijevu zdjelicu te u sterilnu komoru do završetka svih tretmana i početka sjetve (Slika 4.2.1).



Slika 4.2.1. Sjetva sjemena ambrozije na filter papir u sterilnoj komori (snimila: Carin, N.)

4.3. Postavljanje testa klijavosti

Sjeme ambrozije je posijano pincetom na sterilni filter papir u plastične Petrijeve zdjelice promjera 30 milimetara, uz dodatak sterilne destilirane vode. Za svaki tretman sjetva je obavljena u 4 repeticije po 25 sjemenki ambrozije. Svaka Petrijeva zdjelica je uz rub zatvorena parafilmom (Parafilm, Behr, Njemačka) kako bi se spriječio gubitak vlage.

Posijano sjeme postavljeno je u klima komoru na temperaturni režim 25/12°C te fotoperiod 12:12 h. Utvrđivanje klijavosti sjemena ambrozije provedeno je 23. prosinca 2018 (18 dana nakon sjetve). Klijavim sjemenom smatrano je sjeme čija je radikula iznosila više od 1 mm. Postotak klijavosti izračunat je prema formuli: klijavost (%) = broj proklijalih sjemenki / broj posijanih sjemenki x 100.



Slika 4.3.1 Proklijalo sjeme ambrozije
(snimila: Carin, N.)

4.4. Identifikacija gljiva razvijenih na netretiranom sjemenu

Pojava gljiva na ili neposredno oko sjemena na filter papiru kontinuirano je praćena sve do očitavanja klijavosti. Utvrđivanje brojnosti patogena na svakom istraživanom tretmanu provedeno je 20. prosinca 2018. Brojnost gljiva utvrđena je na svakom tretmanu. Gljive su potom uzorkovane s površine sjemena i/ili podloge (filter papira) oko sjemenki te sterilnom iglom prenesene na hranjivu podlogu krumpir dekstroza agar (KDA) te su kultivirane u tami pri 25°C.

Precjepljivanjem jedne hife s ruba tako dobivenih kolonija na novu podlogu KDA dobiven je čisti izolat pojedinih gljiva koje su dalje kultivirane pri istim uvjetima svjetla i temperature. Gljive su potom identificirane do razine roda prema morfološkim obilježjima nastalih kolonija (boja, izgled zračnog micelija, brzina rasta i dr.) i/ili prema obilježjima spora (boja, oblik, broj stanica i dr.) te plodnih tijela. Za identifikaciju su korišteni determinacijski ključevi za gljive.

4.5. Statistička obrada podataka

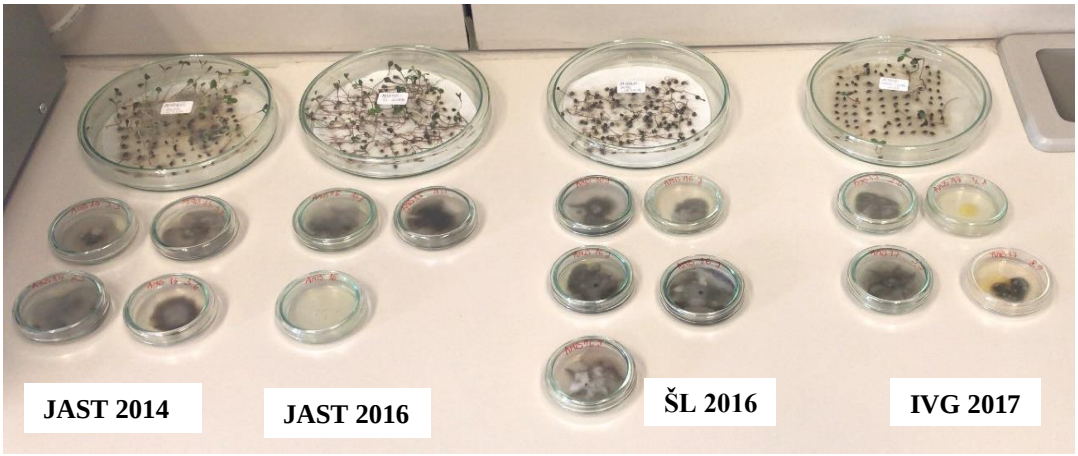
Dobiveni podaci (% klijavosti) obrađeni su analizom varijance, pri čemu je korišten kompjuterski program SAS (SAS Inst., 1997). Nakon signifikantnog F-testa, za usporedbu srednjih vrijednosti korišten je LDS test uz P=0,05.

5. REZULTATI RADA

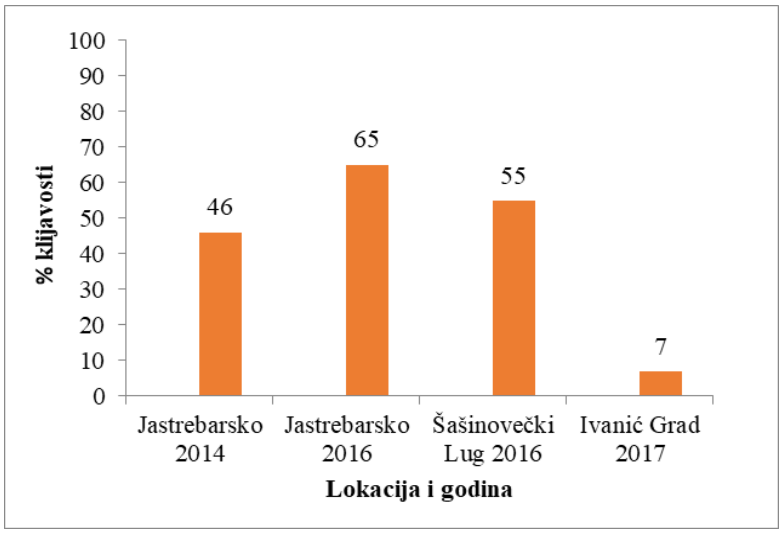
Rezultati istraživanja prikazani su po pojedinim dijelove istraživanja: preliminarno istraživanje, rezultati sterilizacije sjemena, identifikacija roda gljiva prisutnih na sjemenu nakon sterilizacije

5.1. Preliminarno istraživanje

U grafu 5.1.1 prikazani su rezultati preliminarnog istraživanja utvrđivanja klijavosti sjemena ambrozije. Testirane su četiri populacije sjemena iz tri različite godine s različitih lokacija. Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je da je sjeme s lokacije Jastrebarsko iz 2016 godine zadovoljilo kriterije odabira za daljnje istraživanje jer je ostvarilo prosječnu klijavost od 65%.



Slika 5.1.1 Gljive izolirane iz Petrijevih zdjelica sa sjemenom (snimio: Kaliterna, J.)



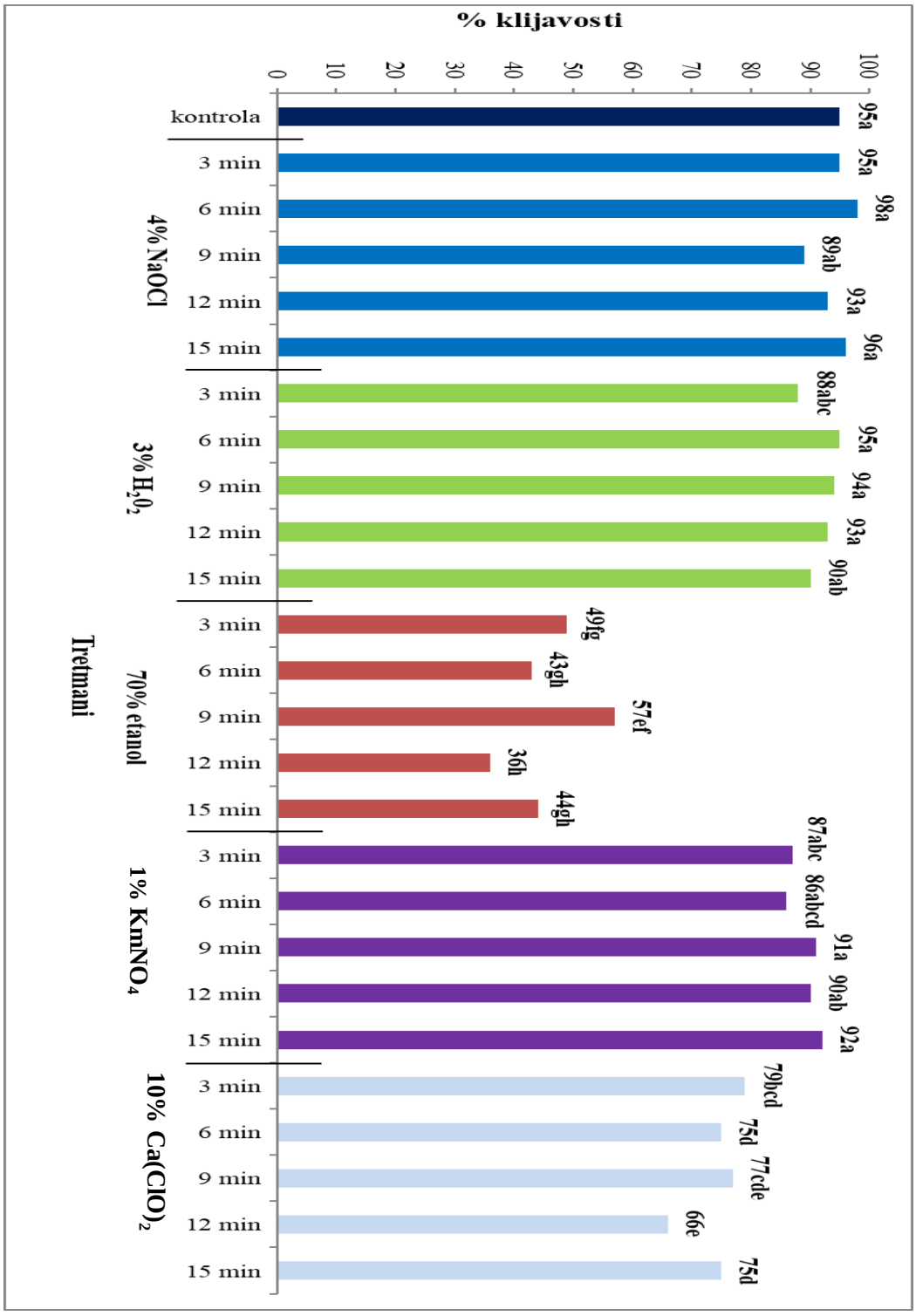
Graf 5.1.1 Rezultati preliminarnog istraživanja klijavosti sjemena

Uz provjeru klijavosti, izolacijom gljiva iz pokusnih Petrijevih zdjelica utvrđeno je prisustvo gljiva u svim populacijama.

5.2 Rezultati sterilizacije sjemena

Klijavost sjemena ambrozije tretiranog različitim otopinama za sterilizaciju sjemena prikazana je u grafu 5.2. Prosječan postotak klijavosti sjemena ambrozije iznosio je 79,7%. Na netretiranom sjemenu ostvarena je klijavost od 95%. Najveća klijavost (98%) postignuta je sterilizacijom natrijevim hipokloritom, vodikovim peroksidom (95%) i kalijevim permanganatom (92%). Niži postotak klijavosti (79%) utvrđen je primjenom kalcijevog hipoklorita, dok je najniža klijavost (57%) sjemena ambrozije zabilježena na tretmanu na kojem je primjenjivan 70%-tni etanol.

Unutar iste otopine za sterilizaciju sjemena, dužina potapanja sjemena uglavnom nije utjecala na različitu klijavost ambrozije. Tako je sterilizacijom sjemena natrijevim hipokloritom, postignuta klijavost od 89% prilikom izlaganja sjemena periodu od 9 minuta, do 98% pri periodu od 6 minuta, ali bez statistički značajne razlike. Sterilizacija vodikovim peroksidom rezultirala je klijavošću sjemena od 88% pri periodu izlaganja u trajanju od 3 minute sve do 95% pri izlaganju od 6 minuta bez statistički opravdane razlike. Također je i kod tretiranja sjemena ambrozije kalijevim permanganatom klijavost ambrozije bila slična prethodno navedenim tretmanima: 86% pri izlaganju od 6 minuta sve do 92% izlaganjem sjemena tretmanu 15 minuta. Nešto niži rezultati, u iznosu od 66% pri izlaganju od 12 minuta, do 79% pri izlaganju sjemena 3 minute, postignuti su primjenom kalcijevog hipoklorita. Najniži postotak klijavosti sjemena ambrozije, postignut je primjenom 70%-tnog etanola. U navedenom tretmanu, zabilježena je klijavost od 36% pri izlaganju sjemena tretmanu u periodu od 12 minuta, do 57% pri izlaganju u trajanju 9 minuta.



Graf 5.2 Postotak klijavosti sjemena pri različitim periodima izlaganja sjemena različitim tretmanima sterilizacije zlaganja sjemena različitim tretmanima sterilizacije

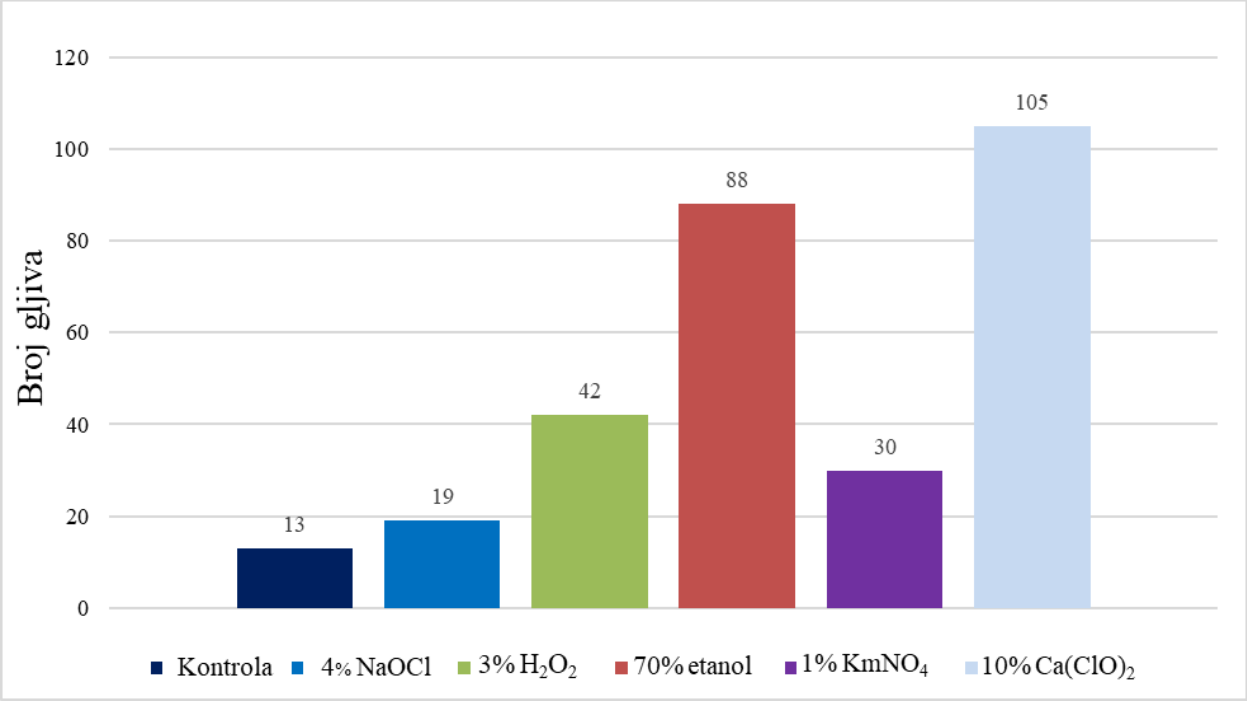
*tretmani koji se nisu statistički razlikovali pri P=0.05 označeni su istim slovima

5.3 Identifikacija roda gljiva prisutnih na sjemenu nakon sterilizacije

Na svim tretmanima sterilizacije sjemena ambrozije, utvrđena je pojava, odnosno razvoj različitih vrsta gljiva. Najmanji utvrđen broj gljiva bio je 19, a najveći 105. Ukupan broj gljiva odnosi se na sve vrste gljiva nastale na svih pet pokusnih perioda izlaganja sjemena tretmanima sterilizacije (Graf 5.3.1). Broj utvrđenih gljiva na kontroli iznosi 13.

Najveći broj gljiva zabilježen je u tretmanu s 10%-tnim kalcijevim hipokloritom. Na navedenom tretmanu je utvrđena pojava 105 gljiva na sjemenu ambrozije. Velik broj gljiva utvrđen je i primjenom 70%-tnog etanola, a ukupan broj iznosi 88. Na oba tretmana prethodno je utvrđena manja klijavost sjemena. Niži rezultati postignuti su primjenom tretmana sterilizacije pomoću 3%-tnog vodikovog peroksida. Broj prisutnih gljiva je 42, što je dvostruko manje od prethodno navedenih tretmana sterilizacije sjemena.

Najmanje gljiva pojavilo se na tretmanima sterilizacije pomoću 1%-tnog kalijevog permanganata i 4%-tnog natrijevog hipoklorita. Na tretmanima s kalijevim permanganatom utvrđeno je 30 gljiva, dok na tretmanima s natrijevim hipokloritom taj broj iznosi 19, a ujedno je i tretman s najmanjom pojavom gljiva na sjemenu ambrozije.



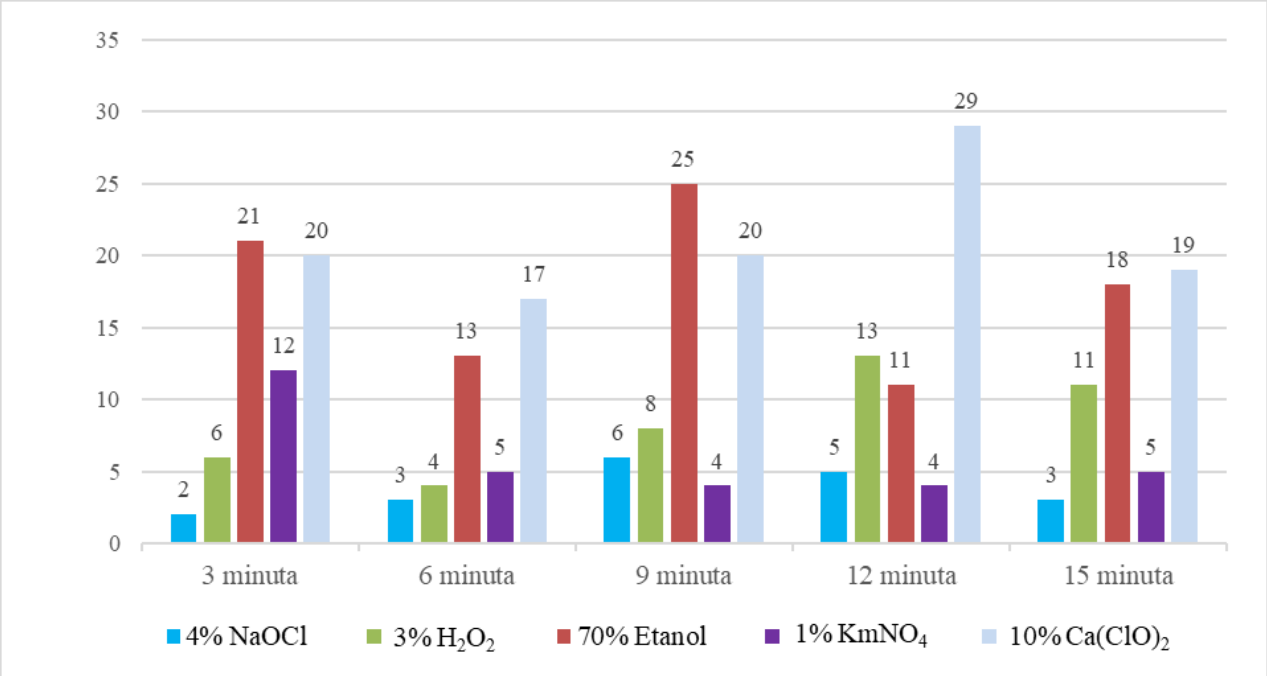
Graf 5.3.1 Ukupno utvrđen broj gljiva na kontroli i različitim tretmanima sterilizacije sjemena

Pojava gljiva na tretmanima sterilizacije sjemena ambrozije razlikuje se ovisno o periodu izlaganja samog sjemena određenom tretmanu (Graf 5.3.2). Na svih pet perioda izlaganja sjemena, utvrđena je najveća prisutnost gljiva na tretmanima sterilizacije pomoću 10%-tnog kalcijevog hipoklorita i 70%-tnog etanola. Za navedene tretmane, zabilježena je pojava 11 gljiva primjenom

etanola u periodu izlaganja od 12 minuta, pa sve do 29 primjenom kalcijevog hipoklorita u jednakom periodu izlaganja sjemena ambrozije.

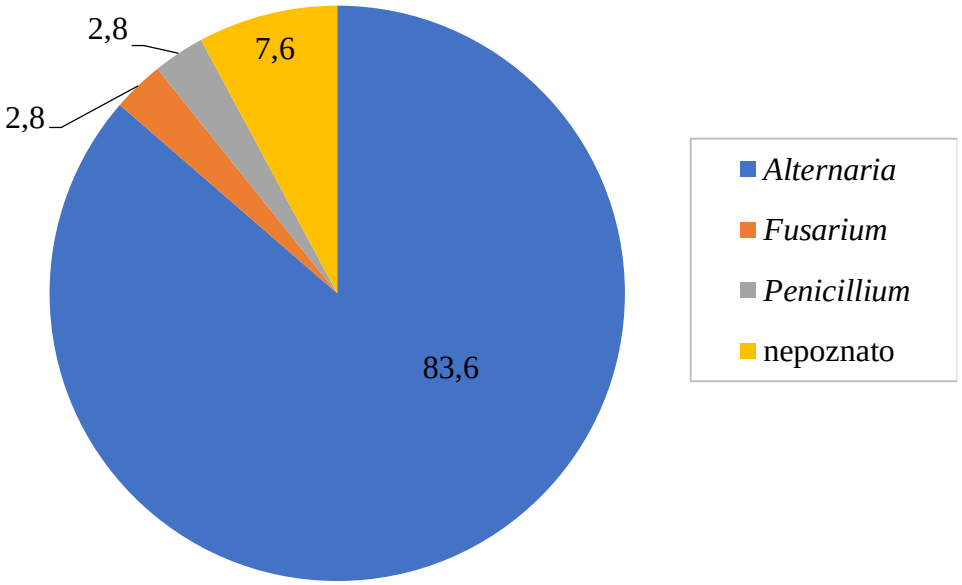
Na tretmanu sterilizacije pomoću kalcijevog hipoklorita najmanji broj gljiva, točnije 17 gljiva, utvrđen je pri izlaganju sjemena tretmanu u trajanju od 6 minuta, a najveći broj, odnosno 29 gljiva pri izlaganju u trajanju od 12 minuta. Primjenom etanola utvrđena je minimalna pojava gljiva u periodu izlaganja od 12 minuta, a broj gljiva iznosi 11, dok najveći broj gljiva na istom tretmanu utvrđen pri izlaganju sjemena u trajanju od 9 minuta, iznosi 25. Na tretmanima sterilizacije s 3%-tnim vodikovim peroksidom, najniži utvrđeni broj gljiva je 4 pri periodu izlaganja od 6 minuta, dok je 13 gljiva, što je najveći broj ovog tretmana, utvrđeno pri izlaganju sjemena periodu od 12 minuta. Na preostala dva tretmana, zabilježen je najmanji broj gljiva na sjemenu ambrozije, gdje je ujedno zabilježena i najveća klijavost.

Broj gljiva na tretmanima sterilizacije pomoću 1%-tnog kalijevog permanganata iznosi svega 4 gljive pri izlaganju u trajanju od 9 i 12 minuta, dok je najveći broj utvrđen pri izlaganju od 3 minute i iznosi 12. Najmanji broj gljiva, u usporedbi s ostalim tretmanima, postignut je primjenom 4%-tnog natrijevog hipoklorita. Na navedenom tretmanu utvrđena je pojava 2-3 gljive pri periodima izlaganja od 3, 6 i 15 minuta. Najveći broj gljiva zabilježen je pri izlaganjima u trajanju od 9 i 12 minuta, a taj broj iznosi 5-6.

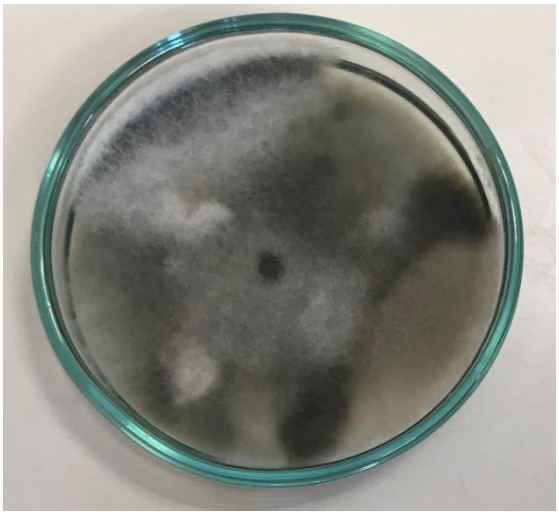


Graf 5.3.2 Ukupan broj gljiva pri različitim periodima izlaganja sjemena različitim tretmanima sterilizacije

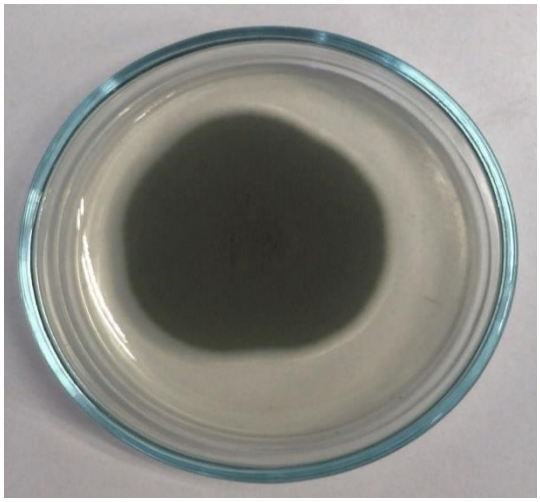
Izolacijom gljiva s površine sjemena i filter papira na sjemenu utvrđena je prisutnost gljiva iz tri roda: *Alternaria, Fusarium* i *Penicillium*. (Graf 5.3.3). U najvećem stupnju zastupljenosti na svim populacijama utvrđena je gljiva iz roda *Alternaria*. Jedan udio (7,6%) od ukupnog broja izoliranih gljiva nije bilo moguće identificirati metodama korištenima u ovom istraživanju.



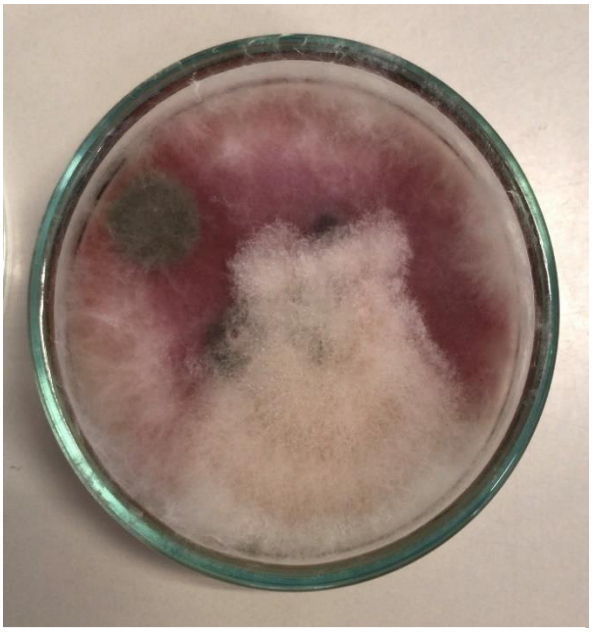
Graf 5.3.3 Udio rodova gljiva utvrđenih na sjemenu ambrozije pri različitim tretmanima



Slika 5.3.1 Gljiva roda *Alternaria* izolirana iz Petrijevih zdjelica sa sjemenom *A. artemisiifolia* L. (snimila: Carin N.)



Slika 5.3.2 Gljiva roda *Penicillium* izolirana iz Petrijevih zdjelica sa sjemenom *A. artemisiifolia* L. (snimila: Carin N.)



Slika 5.3.3 Gljive rodova *Fusarium* (bijelo-ružičasti micelij) i *Alternaria* (sivi micelij) izolirani iz Petrijevih zdjelica sa sjemenom *A. artemisiifolia* L. (snimila: Carin N.)

6. RASPRAVA

S ciljem inhibicije razvoja gljiva i drugih mikroorganizama koji mogu predstavljati kontaminante sjemena ambrozije te negativno utjecati na njegovu klijavost prilikom testova klijavosti, a ujedno i kako bi se utvrdilo sredstvo koje osim navedene inhibicije, također ne utječe značajno na klijavost tog istog sjemena, potrebno je odabrati optimalne tretmane sterilizacije sjemena kao i optimalne periode izlaganja sjemena tim istim tretmanima.

U preliminarnom istraživanju, utvrđivana je klijavost sjemena da bi se moglo odrediti koja je najbolja populacija za provođenje pokusa ovog istraživanja. Najveći broj gljiva pronađen je na populaciji iz Ivanić Grada (2017), koja ujedno ima najmanju klijavost dok je najmanji broj gljiva pronađen na populaciji Jastrebarsko (2016) koja ujedno ima i najveću klijavost, te je ova populacija izabrana za provođenje pokusa.

U provedenom pokusu, tretmani sterilizacije sjemena ambrozije obavljeni su se primjenom 4%-tnog natrijevog hipoklorita, 3%-tnog vodikovog peroksida, 70%-tnog etanola, 1%-tnog kalijevog permanganata i 10%-tnog kalcijevog hipoklorita. Sjeme je bilo izloženo tretmanima u trajanju od 3, 6, 9, 12 i 15 minuta. Za svaki tretman utvrđen je utjecaj na klijavost sjemena kao i broj gljiva na sjemenu. Poželjno svojstvo tretmana za sterilizaciju sjemena je da ne utječe ili minimalno utječe na klijavost te da se smanji pojava gljiva na sjemenu prilikom postavljanja testova klijavosti.

U pokusu su utvrđena tri različita roda gljiva: *Alternaria, Penicillium* i *Fusarium,* od kojih je najzastupljeniji rod *Alternaria*. Ovi rezultati slažu se s navodom od **Fehera (2013)** koji utvrđuje da su dva najzastupljenija roda na ambroziji *Alternaria* i *Penicillium* i sa navodima **Bezjak (1958)** o najčešćim sporama u zraku te istraživanjima koja su proveli **Schafer i Kotanen (2004)**.

Negativan utjecaj, odnosno najniža klijavost sjemena ambrozije, zabilježena je primjenom 70%-tnog etanola. Na tom tretmanu, klijavost je iznosila 36%-57%. Ovakvi rezultati podupiru prethodna istraživanja koja su koristila etanol kao metodu sterilizacije **(Bakhsh i sur. 2016, Lluis Balcells, Martinez i Wang 2009, Sen i sur., 2013, Younesikelaki i sur., 2016)** gdje etanol nije postigao zadovoljavajući ili je imao negativan učinak na klijavost sjemena. Suprotno istraživanju koje su proveli **Oluwakemi i sur. (2018)**, gdje je etanol imao zadovoljavajuće rezultate, u ovom pokusu period izlaganja sjemena bilo je znatno duži, što je mogući razlog nezadovoljavajućih rezultata i fitotoksičnog učinka etanola na sjeme. Daleko veća klijavost utvrđena je na drugim tretmanima, što podupiru prethodna istraživanja.

U suprotnosti s etanolom, drugi tretmani bili su znatno nižih koncentracija što je moglo utjecati na klijavost i broj razvijenih gljiva na površini sjemena.

Klijavost sjemena na tretmanu s 3%-tnim vodikovim peroksidom iznosila je 88-95%. **Srivastava i sur. (2009)** navode slične rezultate u korištenju 7,5%-tnog vodikovog peroksida gdje

je postignuta klijavost od 90% u periodu od 5 minuta. Suprotno navedenom, istraživanja iz 80-tih godina prošlog stoljeća navode kako primjena 5.25%-tnog vodikovog peroksida rezultira inhibicijom klijavosti sjemena **(Wenny i Dumroese, 1987)**. Autori **Dumroese i sur. (1988)**, navode kako je klijavost od 92% postignuta tretiranjem sjemena nakon stratifikacije, dok je klijavost od 51% postignuta primjenom 5,25%-nog vodikovog peroksida prije stratifikacije sjemena.

U ovom pokusu, osim postignute visoke klijavosti primjenom 3%-tnog vodikovog peroksida, postignuta je i osrednja inhibicija razvoja gljiva (42) dok je kod istraživanja koje provode **Bakhsh i sur. (2016)** s kombinacijom 2%-tne otopine vodikovog peroksida i 5%-tnog n-heksana gdje je utvrđen vrlo visok postotak sterilizacije sjemena od 90%. U usporedbi s tretmanima sterilizacije pomoću 10%-tnog kalcijevog hipoklorita i 70%-tnog etanola, broj gljiva je bio više nego upola manji. Ako isti tretman usporedimo sa sterilizacijom pomoću 4%-tnog natrijevog hipoklorita, broj gljiva je dvostruko veći. Sterilizacija vodikovim peroksidom pokazala je, međutim, najbolje rezultate pri periodu izlaganja u trajanju od 6 minuta.

U pokusu je korištena otopina vodikovog peroksida gdje su postignuti zadovoljavajući rezultati u suzbijanju gljiva, dok u drugim istraživanjima, gdje je agens korišten u kombinaciji sa različitim otopinama, postiže zadovoljavajuće rezultate. Osim manje koncentracije, moguće je da kombinacije s različitim pripravcima potiču bolje djelovanje vodikovog peroksida. Istraživanja sugeriraju kako niža koncentracija i manji period izlaganja sjemena čine vodikov peroksid zadovoljavajućom metodom sterilizacije.

Relativno dobri rezultati postignuti su i primjenom 1%-tnog kalijevog permanganata. Klijavost sjemena ambrozije na navedenom tretmanu bila je vrlo visoka. Najmanja klijavost , ali statistički neopravdana, zabilježena je pri izlaganju od 3 minute, a iznosila je 86%, pri istom tretmanu zabilježen je i najveći broj gljiva, točnije njih 12. Suprotno navedenom, najveća klijavost na tretmanu je 92% pri periodu izlaganja u trajanju od 15 minuta, dok je broj gljiva na tom istom tretmanu 5 što se ne razlikuje znatno od tretmana na kojima je utvrđen najmanji broj gljiva (4) pri izlaganju od 9 i 12 minuta. Kod ovog tretmana vidljivo je da je najveća inhibicija klijavosti i povećan broj gljiva rezultat kratke izloženosti sjemena otopini kalijevog permanganata. Iz prethodnih istraživanja **Sorianoa i sur. (2000), Amoaha i sur. (2007)** i **Subramanya i sur. (2018))** vidljiv je pozitivan učinak kalijevog permanganata na suzbijanje bakterija koje se nalaze na biljnim dijelovima ili na sjemenu ali ne i za gljive, što bi moglo objasniti slab učinak kalijevog permanganata u ovom pokusu. Premda je tretman ostvario dobre rezultate za klijanje sjemena, slabi rezultati pri inhibiciji gljiva, ne čine ovaj tretman pouzdanim. U usporedbi sa natrijevim hipokloritiom i vodikovim peroksidom, kalijev permanganat ne koristi se često za potrebe laboratorijskih istraživanja.

Tretmani s 10%-tnim kalcijevim hipokloritom nisu dali zadovoljavajuće rezultate na klijavost niti za inhibiciju razvoja gljiva. Druga najniža klijavost (66-79%) je utvrđena na ovom tretmanu kao i najveći broj gljiva na sjemenu (105). Ovi rezultati su iznenađujući jer odstupaju od

rezultata drugih istraživanja poput **Oluwakemi i sur. (2018)** koji su imali potpuno čisto sjeme tretmanima s 10%-tnim kalcijevim hipokloritom u periodu od 15 minuta te **Escamilla i sur. (2019)** gdje je tretman 2%-tnog kalijevog hipoklorita bio najbolji za sterilizaciju i bez negativnog učinka na klijanje sjemena soje. Mogući uzroci slabih rezultata u našem pokusu su duži period izlaganja sjemena ovom agensu, gdje je utvrđen negativan učinak na klijanje.

Najbolji rezultati klijavosti i inhibicije razvoja gljiva na sjemenu ambrozije, utvrđeni su na tretmanima sterilizacije pomoću 4%-tnog natrijevog hipoklorita. Klijavost je iznosila 89% - 98%. Klijavost od 98% postignuta je pri izlaganju od 6 minuta. Pri istom izlaganju broj razvijenih gljiva iznosi 3, kao i pri izlaganju u trajanju od 15 min, dok je utvrđena prisutnost samo dvije gljive pri periodu od 3 minute. Najviše gljiva razvilo se pri izlaganju od 9 minuta. Iz prethodnih istraživanja **(Amarasinghe i sur. 2018, Badoni i Chauhan 2010, Baiyeri i Mbah 2006, Barney 2003, Dumroese i sur. 1988, Kiani i sur. 2017, Lindsey i sur. 2017, Martinez i Wang 2009, Sen i sur. 2013, Srivastava i sur. 2009, Varasteh i sur. 2015, Wenny i Dumroese, 1987, Younesikelaki i sur. 2016)** ova metoda sterilizacije je jedna od najčešće korištenih i u većini slučajeva ostvaruje najbolje rezultate sterilizacije bez negativnih učinaka na klijanje sjemena različitih biljnih vrsta u različitim koncentracijama i vremenskog periodu izlaganja.

Ocjenom istraživanih parametara provedenog pokusa, najlošija svojstva utvrđena su na tretmanima sterilizacije provedenim pomoću 70%-tnog etanola i 10%-tnog kalcijevog hipoklorita. Navedeni tretmani iskazali su inhibiciju klijanja sjemena ambrozije. Ovi tretmani ne zadovoljavaju ciljeve sterilizacije sjemena ambrozije neovisno o vremenu izlaganja sjemena tretmanima.

Neočekivani rezultati su postignuti na kontroli. Naime, na kontroli se očekivao najveći broj gljiva, iz razloga da sjeme nije bilo tretirano niti jedom od prethodo navedenih metoda sterilizacije već isključivo sterilnom vodom. Razlog ovakvih rezultata nije u potpunosti jasan. Mogući razlog za ovakve rezultate je možda vezan za površinsku napetost čiste vode u odnosu na otopinu kemikalija korištenih u tretmanima. Pretpostavka je da sam čin potapanja u vodi, s ili bez kemikalija, može možda isprati dio spora sa sjemena. Možemo pretpostaviti i da je ručno mješanje imalo utjecaja u obliku mehaničkog ukljanjanja spora gljiva sa površine sjemena.

Drugi razlog slabog razvoja gljiva na kontroli u usporedbi sa tretmanima je da je vlaženje sjemena prilikom tretmana sterilizacije oslobodilo više nutrijenata s kemijski narušene površine tog sjemena, u odnosu na sjeme sa kontrole pa je to omogućilo bolje klijanje spora gljiva ili rast površinskog ili unutarsjemenskog micelija. Međutim, problem na kontroli ne negira kako se korišteni tretmani u ovom istraživanju međusono razlikuju u usporedbi njihovog utjecaja na klijavost i inhibiciju razvoja gljiva. Ipak, pokus bi trebalo poboljšati i dodatno ponoviti.

Rezultat kontrole sugerira da možda zdravo sjeme ambrozije ima neku prirodnu zaštitu vlastitog sjemena od ovih gljiva koji su uvijek prisutni u prirodi, pa kako je sjeme moralo koevoluirati s tim istim gljivama, možda je uspjelo i razviti zaštitu od tih gljiva, a sterilizirana voda poput kišnice nema negativan učinak na tu prirodnu zaštitu. Možemo predpostaviti da se primjenom sredstvima za sterilizaciju narušilo funkcioniranje te prirodne zaštite, i možda samo

utvrdili da NaOCl najmanje narušava tu zaštitu. Stoga, ovo je potencijalno otkriće nepoznatog mehanizma koje je ambrozija razvila da bi zaštitila svoje sjeme, u osjetljivoj fazi neposredno prije i tijekom klijanja, od mikroorganizama u tlu. Osim kemikalija u pokusu, možda neki drugi čimbenici mogu također narušiti tu prirodnu površinsku antigljivičnu zaštitu sjemena ambrozije.

Također, ovakvi rezultati kontrole mogli bi se objasniti da se uslijed slučajnosti zadesilo to da je na kontrolnim sjemenkama bilo najmanje spora gljiva, to jest, da je slučajno bio najmanje kontaminirano. Ponovljeni pokusi bi to mogli provjeriti da li se radi o neuspjelom pokusu ili otkriću nekog novog, dosada nepoznatog ili malo istraženog fenomena ambrozije.

Od svih provedenih tretmana sterilizacije sjemena ambrozije, najboljim se dokazala primjena 4%-tnog natrijevog hipoklorita. Rezultati ovog istraživanja slični su i prethodnima, podupirući tvrdnju da je ovaj tretman među najčešće korištenim metodama sterilizacije. Osim zadovoljavajućih rezultata, natrijev hipoklorit je jeftin, siguran za korištenje i lako komercijalno dostupan. Međutim, kako iz istraživanja postoji mogućnost da različite metode sterilizacije bolje odgovaraju različitim biljnim vrstama u različitim koncentracijama i periodima izlaganja ne možemo sa sigurnošću ovaj tretman proglasiti najboljim za sve biljne vrste i protiv svih biljnih kontaminirajućih mikroorganizama, već samo za ambroziju. Daljnja istraživanja su potrebna za utvrđivanje službenog protokola za sterilizaciju sjemena vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.

7. ZAKLJUČCI

- Sterilizacija sjemena tretmanima 4%-tnim natrijevim hipokloritom, (98%) 3%-tnim vodikovim peroksidom (95%) i 1%-tnim kalijevim permanganatom (92%) nije rezultirala inhibicijom klijanja
- Inhibicija klijanja zabilježena je na tretmanima 10%-tnog kalcijevog hipoklorita (79%) i 70%-nog etanola (57%)
- Većina gljiva izoliranih sa sjemena pripada rodovima: *Alternaria, Penicilium* i *Fusarium,* a najzastupljeniji rod je *Alternaria*.
- Najveći broj gljiva zabilježen je na tretmanima s 10%-tnim kalcijevim hipokloritom i 70%-tnim etanolom
- Najmanji broj gljiva od svih tretmana s otopljenim sredstvom za sterilizaciju zabilježen je tretiranjem sjemena 4%-tnim natrijevim hipokloritiom.
- Rezultati istraživanja sugeriraju da su najbolji rezultati klijavosti i inhibicije razvoja gljiva postignuti primjenom 4%-tnog NaOCl
- Potrebno je provesti daljnja istraživanja pri izradi službenog protokola za sterilizaciju sjemena ambrozije

8. POPIS LITERATURE

1. Ahmad F., Daglish G.J., Ridley A.W., Walter G.H., (2012). Responses of *Tribolium castaneum* to olfactory cues from cotton seeds, the fungi associated with cotton seeds, and cereals. Entomologia Experimentalis et Applicata (145): 272–281
2. Alam, M., Uddin, M., Amin, M., Razzak, M. Abdur M., Moosa Khatun, M. (2016). Studies on the effect of various sterilization procedure for in vitro seed germination and successful micropropagation of *Cucumis sativus*. International Journal of Pure & Applied Bioscience. 4: 75-81.
3. Amarasinghe M. N. T. R., Wang J-H., Xie W-X., Peng, L-C., Li S-F., Li H. (2018). Seed-sterilization of *Rhododendron wardii* for micropropagation. Sri Lanka Journal of Food and Agriculture (4).
4. Amoah, P., Drechsel, P., Abaidoo, R.C., Klutse, A. (2007). Effectiveness of common and improved sanitary washing methods in selected cities of West Africa for the reduction of coliform bacteria and helminth eggs on vegetables. Tropical Medicine & International Health, 12: 40-50.
5. Badoni, A., Chauhan, J.S., (2010). In Vitro Sterilization Protocol for Micropropagation of Solanum tuberosum cv. 'Kufri Himalini'. Academia Arena, 2(4): 24-27
6. Baiyeri, P., Mbah, B.N. (2006). Surface sterilization and duration of seed storage influenced emergence and seedling quality of African breadfruit (*Treculia africana* Decne). African Journal of Biotechnology. (5): 1393-1396.
7. Bakhsh, A., Anayol1 E.,, Sancak C., Özcan, S. (2016) An efficient and cost effective sterilizing method with least microbial contamination and maximum germination ratio for in vitro cotton (*Gossypium hirsutum* L.) culture, The Journal of Animal & Plant Sciences, 26(3): 868-873
8. Baskin C. C., Baskin M. J. (2014). Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, New York
9. Barampuram, S., Allen, G., Krasnyanski, S. (2014) Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 118 (1): 179-185
10. Barney, D. (2003). Effects of light, surface sterilization, and fungicides on the germination of black huckleberry seeds. Small Fruits Review, 2: 73-80.
11. Bezjak, V. (1958). Gljivična flora atmosfere grada Zagreba. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 9 (2): 179-187.

12. Burdman S., Walcott R.R. (2012): Acidovorax citrulli: gen-erating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Molecular Plant Pathology, 13: 805–815.

13. Choi, J.-.S. (2017). Seed-surface disinfection and germination effects of grapefruit seed extract (GSE) on Lactuca sativa seeds. Toxicology and Environmental Health Sciences. 9: 169-175.

14. Choi, Y., Kiss, L., Vajna L., Shin H. D. (2009) Characterization of a Plasmopara species on *Ambrosia artemisiifolia*, and notes on *P. halstedii*, based on morphology and multiple gene phylogenies, Mycological Research, 113 (10): 1127-1136.

15. Cooper, J., Gardener, M. (2007) Fungal plant pathogens and symptomology, WSU County Extension, SJC, Credit; Dr Tom Schultz https://docplayer.net/28644795-Fungal-plant-pathogens-and-symptomology.html - pristupljeno 21.4.2019.

16. Dadd, A.H. Jacobs, S. E. (1958) The uptake of mercury by seeds treated with mercuric chloride solution, and its subsequent release, Jour. appl. bact. 21 (1): 97-99.

17. Damron E.; Klein C.; Leach M.; Mourot J.; Murphy T.; Seamans A.;Wilson R. (2005) Use of calcium hypochlorite as a sanitizer for seeds used for sprouting: task #2; impact: improved alfalfa decontamination technologies, The University of Arkansas Undergraduate Research Journal 6 , Article 11.

18. Daud, N.H., Jayaraman, S., Mohamed, R. (2012). Methods paper: An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of Aquilaria malaccensis from field sources into tissue culture.; Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 20: 55-58.

19. Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spaun, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellisa, J., Foster, G.D., (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, Molecular Plant Pathology 13: 414-430.

20. Dumroese, R. K., James, R. L., Wenny, D. L., Gilligan, C. J. (1988). Douglas-fir Seed Treatments: Effects on seed germination and seedborne organisms. Idaho Forest Wildlife and Range Experiment Station Conribution 405, https://www.rngr.net/publications/seed-and-seedling-diseases-in-the-western-us/douglas-fir-seed-treatments-effects-on-seed-germination-and-seedborne-organisms/at_download/file - pristupljeno 15.4.2019.

21. Escamilla, D., et al.(2019). Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments. Food science & nutrition 7 (10): 3194-3205.

22. Falkiner, F.R., (1990): The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. International Association for Plant Tissue Culture Newsletter, 60: 13- 22.

23. Feher, M. (2013). Isolation, taxonomy and ecophysiological characterization of endophytic fungi from Ambrosia artemisiifolia. Acta biologica Szegediensis, 57(1): 86

24. Gawel, L. J., Bollen, W. B., (1960) Sterilization of grass seed with peracetic acid, Agronomy Journal , 52 (12): 718-719

25. Gerber, E, Schaffner, U., Gassmann, A, Hinz, H., Seier, M., Müller-Schärer. (2011). Prospects for biological control of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe: Learning from the past. Weed Research. 51: 559 - 573.

26. Grayer, R.J., Kokubun, T., (2001) Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. Phytochemistry 56: 253-263

27. Gour, V.S., Sharma, S.K., Emmanuel, C.J.S.K., Kant, T., (2007): A rapid in vitro morphogenesis and acclimatization protocol for Balanites aegyptiaca (L.) Del- a medicinally important xerophytic tree. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 16: 151-153

28. de Groot, G.J.J.B., Hundt, A., Murphy, A.B. et al.(2018) Cold plasma treatment for cotton seed germination improvement. Science Report 8: 14372

29. Gummerson, R. J. (1986). The effect of constant temperatures and osmotic potential on the germination of sugar beet. J. Exp. Bot. 37: 729 – 741.

30. Halloin J.M. (1975). Postharvest infection of cottonseed by Rhizopus arrhizus, Aspergillus niger, Aspergillus flavus. Phytopathology 65: 1229–1232

31. Hawksworth DL, Lücking R, (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiological Spectrum 4: 79-95.

32. Hojjat S. S., Hojjat, H., (2015). Effect of nano silver on seed germination and seedling growth in fenugreek seed, International Journal of Food Engineering, 1(2): 106-110

33. Horuz S., Aysan Y. (2018). Biological control of watermelon seedling blight caused by Acidovorax citrulli using antagonistic bacteria from the genera Curtobacterium,Microbacterium and Pseudomonas. Plant Protection Science, 54: 138–146.

34. Howell C. R. (2002). Cotton seedling preemergence damping-off incited by Rhizopus oryzae and Pythium spp. and its biological control with Trichoderma spp. Phytopathology, 92:177–180

35. Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D. i Vrandečić, K. (2012). Patogenost Fusarium spp. izoliranih s korova i biljnih ostataka u istočnoj Hrvatskoj za pšenicu i kukuruz. Poljoprivreda, 18 (2): 7-11.

36. Jabeen, N., Shawl, A.S., Dar, A.H., Jan, A., Sultan, P., (2007). Micropropagation of *Inula racemosa* Hook.f. a high valuable medicinal plant. International Journal of Botany, 3(3): 296-301.

37. Kang, M.H., Pengkit, A., Choi, K., Jeon, S.S., Choi, H.W., Shin, D.B., et al. (2015). Differential Inactivation of Fungal Spores in Water and on Seeds by Ozone and Arc Discharge Plasma. PLoS ONE 10(9): e0139263

38. Kazinczi G., Beres I., Novak R., Biro K. i Pathy Z. (2008.). Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*): A review with special regards to there sultsin Hungary. I. Taxonomy, origin and distribution, morphology, life cycle and reproduction strategy. Herbologia 9: 55-91

39. Kiani M., Younesikelaki S.F., Ebrahimzadeh M.H., Savitikadi P., Jogam, P., Sadanandam, A. (2017) studies on the effect of various seed surface sterilization and growing media on the in-vitro germination of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) Indian Journal of Science and Technology. 10 (3)

40. Klich M. A. (1986) Mycoflora of cotton seed from the Southern United States: a three study of distribution and frequency. Mycologia 78: 706–712

41. Lindsey III, B.E., Rivero, L., Calhoun, C.S., Grotewold, E., Brkljacic (2017)., J. Standardized method for high-throughput sterilization of arabidopsis Seeds. J. Vis. Exp. (128)

42. Leifert, C., Ritchie, J. Y., Waites, W.M. (1991) Contaminants of plant-tissue and cell cultures, World Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 452-469

43. Mancini, V., Romanazzi, G., (2013) Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops, Pest Management Science, 70 (6): 860-868.

44. Masin, R. Onofri A., Gasparini V., Zanin, G. (2017). Can alternanting temperatures be used to estimate base temperatures for seed germinaton?, Weed Research, 57 (6): 390-398

45. Miché, L., Balandreau, J. (2001). Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. Applied and environmental microbiology. 67 (7): 3046-3052.

46. Nagpurne Vinay S. A comparative evaluation of fungicides and plant leaf extracts against the fungi associated with seeds of pulses, Int. Res. Journal of Science & Engineering, 2020, Volume 8(3): 115-119.

47. Neergaard P. (1977) Entry Points of Seed Infection. U: Seed Pathology (Paul Neergaard), Macmillan Publishers Limited 1977, Palgrave, London. str. 372-384

48. Oluwakemi, A. B., et al. (2018). Establishing surface sterilization protocol for nodal culture of Solanecio biafrae. , 8th International Biotechnology Conference, Exhibition and Workshop, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 210 (2018) 012007

49. Schafer, M., and Peter M. K. (2004). Impacts of Naturally-Occurring Soil Fungi on Seeds of Meadow Plants. Plant Ecology, 175 (1): 19–35.

50. Sever, Z. i Cvjetković, B. (2016). Venuća rajčice uzrokovana patogenim gljivama iz rodova *Verticillium* i *Fusarium*. Glasilo biljne zaštite, 16 (5), 505-508

51. Srivastava, N., Kamal, B., Sharma, V., Negi, Y.K., Dobriyal, A.K., Gupta, S., Jadon, V.S., (2010): Standardization of sterilization protocol for micropropagation of Aconitum heterophyllum- An endangered medicinal herb. Academia Arena, 2(6): 37-42.

52. Soriano J. M., Rico, H.,. Moltó J.C,. Mañes J, (2000). Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants, International Journal of Food Microbiology, 58, (1–2): 123-128,

53. Subramanya, S. H. et al. (2018). Potassium permanganate cleansing is an effective sanitary method for the reduction of bacterial bioload on raw Coriandrum sativum. BioMed Central research notes 11(1): Article 124

54. Varasteh K.N, Babaei A., Abdoli M. (2015). The effect of different sodium hypochlorite concentrations on seed germination of *Dracocephalum moldavica* L. Austin Journal of Plant Biology. 1 (2) 1007 https://austinpublishinggroup.com/plant-biology/download.php?file=fulltext/ajpb-v1-id1007.pdf - pristupljeno: 20.4. 2019.

55. Watts, J.E., De Villers, O.T., Watts, L. (1993) Sterilization of wheat seeds for tissue culture purposes. South African Journal of Botany. 59 (6): 641-642

56. Wenny, D., Dumroese, R. K. (1987). Germination of conifer seeds surface-sterilized with bleach. Tree Planter's Notes. 38: 18 - 21.

57. White H. L. (1938) The Sterilization of Lettuce Seed, The annals of applied biology. 25 (4): 767-780

58. Wilson, J. K., (1915). Calcium hypochlorite as a seed sterilizer, American Journal of Botany 2(8)

59. Wilson, J.K. and Punyasingha, T. (1939), Surface sterilization of nodules with calcium hypochlorite 1. Agron. J., 31: 1016-1019.

60. Yadav, K., Singh, N., (2011) Effect of seed harvesting season and sterilization treatments on germination and in vitro propagation of *Albizia lebbeck* (L.) Benth, Analele Universităţii din Oradea – Fascicula Biologie, 18 (2): 151-156

61. Younesikelaki, S.F., Ebrahimzadeh, M. H., Kiani, M., Banala, M, Marka, D., Nanna, R. S. (2016). Optimization of seed surface sterilization method and in vitro seed germination in *Althaea officinalis* (L.) - An Important Medicinal Herb. Indian Journal of Science and Technology. Vol 9 (28): 1-6

62. Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., Gomes, E.V., Tsui, C.K.M., Nayak, C., (2016) Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. FEMS Microbiology Reviews 40: 182-207.

63. Zhao R.M., Liu L., Guo Q.S.(2006) Influence of exogenous substance on germination of Platycodon grandiflorum seeds, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 31(12): 966-968