

**DESTRUKTIVNE METODE ISTRAŽIVANJA VIJABILNOSTI SJEMENA  
PELINOLISNOG LIMUNDŽIKA (*Ambrosia artemisiifolia* L.)**Matej BATINIĆ,\* Valentina ŠOŠTARČIĆ, Mirela JAGANJAC, Barbara ĐUKIĆ,  
Maja ŠĆEPANOVIĆSveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod herbologiju, Svetošimunska  
cesta 25, 10000 Zagreb\*Izvod iz diplomskog rada „*Usporedba destruktivnih metoda za utvrđivanje  
vijabilnosti sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.*“ Sveučilište u  
Zagrebu Agronomski fakultet

mscepanovic@agr.hr

Prihvaćeno: 2017-11-22

Za procjenu dinamike nicanja korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. potrebno je ustanoviti udjel vijabilnog sjemena u banci sjemena tla. Vizualno nije moguće razdvojiti dormantno od klijavog i mrtvog sjemena pa je sjeme potrebno dodatno testirati. Destruktivne metode određivanja vijabilnosti bili su test klijavosti + tetrazol (TTC), samostalan TTC te crush-test (test pritiska). Budući da svaka od navedenih metoda ima određena ograničenja te da su tetrazol i crush-test u određenom dijelu subjektivne metode, cilj je ovoga rada bio usporediti destruktivne metode određivanja vijabilnosti sjemena i ustanoviti daju li TTC i crush-test pouzdane i ponovljive rezultate. Laboratorijsko je istraživanje provedeno na sjemenu pelinolisnog limundžika prikupljenom u rujnu 2014. na lokalitetu Popovača. U pokusu I) sjeme pelinolisnog limundžika testirano je testom klijavosti + TTC testom, TTC testom i crush-testom. Pokus II) podijeljen je na provjeru pouzdanosti TTC-a i crush-testa. Kod TTC testa u pokusu a) testirana je razlika u vizualnoj percepciji dvaju različitih ocjenjivača i istog ocjenjivača u vremenskom odmaku između dvaju ocjenjivanja (60 min.), a u pokusu b) cilj je bio odrediti eventualne razlike između ocjena istog ocjenjivača za obje polovice istog sjemena te ocjene jednog ocjenjivača jedne polovice sjemena s ocjenom drugog ocjenjivača druge polovice sjemena. Kod crush-testa određivana je razlika između dvaju ocjenjivača gdje je jednu polovicu sjemena ocjenjivao prvi, a drugu polovicu drugi ocjenjivač. Rezultati istraživanja pokazuju da ne postoje veće razlike u vijabilnosti sjemena između testa klijavosti + TTC testa, TTC testa ni crush-testa. Prva ocjena TTC testa istog ocjenjivača u vremenskom odmaku od 60 minuta u odnosu na drugu ocjenu nije znatno promijenjena. Također, rezultati usporedbe prve i druge ocjene obaju ocjenjivača pokazuju da su na sličan način procjenjivali vijabilnost sjemena što potvrđuje pouzdanost i ponovljivost TTC testa. Međutim, polovice istog sjemena pelinolisnog limundžika nisu jednako ocijenjene kod obaju ocjenjivača (pokus b). Crush-test daje objektivne rezultate

procjene vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika jer njime nije ustanovljena znatnija razlika u procjeni vijabilnosti između dvaju ocjenjivača.

**Ključne riječi:** pelinolisni limundžik, crush-test, test kljavosti, tetrazol-test, vijabilnost sjemena

## **DESTRUCTIVE METHODS FOR VIABILITY TEST OF *Ambrosia artemisiifolia* L.**

### **SUMMARY**

In order to estimate the germination dynamic of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) it is necessary to determinate percentage of viable seed in the soil seed bank. Since is impossible to visually distinguish dormant from germinating and dead seed, it is necessary to conduct some additional tests. Destructive methods to test seed viability are: germination test + tetrazolim (TTC), individual tetrazolium (TTC) and crush test. Each of these methods have some limitations and since tetrazolium and crush test are in certain part subjective methods, the aim of this research was to: I) compare the viability results of destructive methods and II) to determine if TTC test and crush test can give reliable and repeatable results. Laboratory research was conducted on common ragweed seed which was collected in September 2014 in Popovača. In experiment I seed was tested through germination test + TTC test, individual TTC test and crush test. Experiment II was seperated on reliability of testing TTC and crush test. In TTC test in experiment a difference in visual perception of 2 evaluators and the same evaluator in time interval between 2 evaluations (60') was tested, and in experiment b aim was to determine possible differences between evaluations of the same evaluators for both halves of same seed, and to compare evaluations from 1st evaluator who evaluated one half of the seed with another half which was evaluated by 2nd evaluator. In crush test, difference between two evaluators was determined where one seed half seed was evaluated by 1st evaluator and other half by 2nd evaluator. Results showed that there were no significant difference in seed viability between germination test + TTC test, individual TTC test and crush test. First evaluation in TTC test from the same evaluator in time lag from 60 minutes compared to another one, was not significantly changed. Also, the results of the comparison of the first and second evaluations of both evaluators indicate that they evaluated the viability of the seed in a similar way, confirming the reliability and repeatability of the TTC test (experiment a). The halves of the same seed of common ragweed were not evaluated the same by both evaluators (experiment b). Crush test gave objective results in seed viability estimation because with this test it was not determined significant difference in assesment of viability between both evaluators.

**Key words:** *Ambrosia artemisiifolia* L., crush-test, germination test, tetrazol test, seeds viability

## UVOD

Pelinolisni limundžik (*Ambrosia artemisiifolia*) jedna je od najvažnijih korovnih vrsta današnjice široj javnosti najviše poznata po prekomjernoj produkciji peluda koji uzrokuje alergijske reakcije kod ljudi i životinja. Na ruderalnim mjestima, gdje najčešće raste kao biljka soliter, može stvoriti i do 8 milijuna peludnih zrnaca (Mezei i sur., 1995). Procjenjuje se da će klimatske promjene pogodovati i daljnjem širenju ove vrste što dodatno može utjecati na zdravlje alergičnih ljudi (Chapman i sur., 2016).

Iako alergeni pelud pričinjava zdravstvene probleme, uspješno dugoročno suzbijanje ove korovne vrste moguće je jedino ako se priječi unos i reducira potencijal iz banke sjemena tla. Pelinolisni limundžik proizvodi velike količine sjemena koje u tlu ostaju vijabilne i nekoliko desetaka godina predstavljajući izvor zakorovljenosti u sljedećim godinama. Ujesen, nakon fiziološkog dospijea sjemena, roška pelinolisnog limundžika dospijeva u tlo obogaćujući banku sjemena tla. Već u trenutku osipanja sjeme posjeduje primarnu dormantnost, odnosno nije odmah sposobno klijati. Ulaskom u tlo sjeme prelazi u sekundarnu dormantnost u kojoj i dalje nije sposobno za klijanje. Da bi sjemenke mogle klijati, moraju tijekom zimskog razdoblja proći fazu stratifikacije u hladnim i vlažnim uvjetima tla. Sjeme pelinolisnog limundžika tako može prolaziti kroz ove ciklične dormantnosti i nekoliko puta, čak i do 40 sezona (Baskin i Baskin, 1977). Upravo je ciklična dormantnost sjemena glavni razlog razvučenog razdoblja nicanja pelinolisnog limundžika što otežava njegovo suzbijanje u poljoprivrednim usjevima, ali i produžava razdoblje polinacije alergenog peluda.

S obzirom na to da je pelinolisni limundžik biljna vrsta koja proizvodi velike količine sjemena (Fumanal i sur., 2007) koje ostaju u banci sjemena tla dormantne i nekoliko desetaka godina (Toole i Brown, 1946), dinamika će populacije ovisiti o rezervama sjemena u banci sjemena tla. Stoga se poznavanjem sastava i gustoće sjemenki korova u banci sjemena tla može predvidjeti buduća zakorovljenost, ali i procijeniti učinkovitost svih prethodno provedenih mjera suzbijanja na dotičnoj površini.

Najčešće korištena metoda analize banke sjemena tla je metoda ispiranja gdje se suspenzija ispire kroz sustav sita kako bi se izdvojile sjemenke iz tla. Da bi se međutim saznalo jesu li izdvojene sjemenke žive, potrebno je provoditi dodatne testove za određivanje vijabilnosti sjemena. Iako postoje i nedestruktivne metode (određivanje tipa sjemena na osnovi mase sjemena, sposobnosti električne provodljivosti te na osnovi sposobnosti bubrenja), najčešće su metode određivanja vijabilnosti sjemena korištene i u ovome radu destruktivne metode: test klijavosti + tetrazol-test, samostalni tetrazol-test (TTC) i crush-test.

Test klijavosti standardna je metoda određivanja klijavosti svih biljnih vrsta i jedna je od najčešće korištenih metoda jer je prilično jednostavna i lako

dostupna metoda. Ovim se testom dobije podatak o postotku klijavih sjemenki unutar određene sjemenske populacije, međutim nije moguće dobiti informaciju o broju živih (dormantnih) sjemenki unutar te populacije. Stoga je sve neprokljalo sjeme potrebno dodatno testirati tetrazol-testom. U TTC testu koristi se trifenil tetrazol klorid, bijeli prah topiv u vodi koji se koristi kao redoks indikator u biokemijskim pokusima, a ukazuje na dijelove tkiva u kojima se odvija stanično disanje. Priznat je kao ispravan test za određivanje vijabilnosti sjemena i jedna je od najpopularnijih tehnika određivanja vijabilnosti korova u 21. stoljeću (Borza i sur., 2007), iako je otkriven 1949. (Lakon, 1949), a na našim područjima upotrebljavan i 80-ih godina prošlog stoljeća (Ujević i Ujević, 1982). Uvođenjem ovoga testa, s testom klijavosti ili bez njega, znatno je unaprijeđeno određivanje vijabilnog sjemena unutar sjemenske populacije. Naime, industrija sjemena treba u kratkom vremenu informacije o vijabilnosti kako bi donijeli brze odluke u marketingu sjemena (Elias i Garay, 2004), što se može postići upravo ovim testom. U nekim institucijama za ispitivanje kvalitete sjemena dopušteno je izdavati certifikat o vijabilnosti sjemena baziran na tetrazol- testu, dok se test klijavosti ne dovrši do kraja. Prednost je TTC testa brza procjena vijabilnosti sjemena. Nedostatak ovog testa leži u njegovoj nepraktičnosti jer je potrebno imati određeno znanje kako ne bi došlo do krive evaluacije. Crush-test je vremenski kraća opcija od TTC testa i smatra se njegovom alternativom. U ovome se testu koristi pritisak na sjeme kako bi se nakon oštećenja sjemene ovojnice vidio tekući sadržaj koji sjemenke izbacuju iz živih stanica nakon pritiska (Borza i sur., 2007).

S obzirom na to da svaka od navedenih metoda ima određena ograničenja te da su TTC test i crush-test u određenom dijelu subjektivne metode, cilj je ovoga rada bio usporediti tri destruktivne metode određivanja vijabilnosti sjemena (testom klijavosti + TTC test, TTC testom i crush-testom) i ustanoviti postoje li između TTC testa i crush-testa razlike u pouzdanosti ovisno o subjektivnosti različitih ocjenjivača i mogućnost ponovljivosti istih.

## MATERIJALI I METODE RADA

Sjeme korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* prikupljeno je na lokalitetu u Popovači (N 45056' 22" E 16068' 11") u zapuštenom vinogradu u rujnu 2014. Laboratorijsko istraživanje provedeno je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za herbologiju. Istraživanje je podijeljeno na dva dijela: I) Određivanje vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika destruktivnim metodama: test klijavosti + TTC test, TTC test te crush-test te II) Određivanje pouzdanosti i ponovljivosti rezultata TTC testa i crush-testa procjenom razlika u ocjeni između dvaju ocjenjivača i ponovnom ocjenom nakon 60 min. Opis pojedinih metoda istraživanja u skladu s navedenim ciljevima istraživanja prikazan je u nastavku teksta.

## I) Određivanje vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika destruktivnim metodama

### Test klijavosti + tetrazol-test

Sjemenke pelinolisnog limundžika postavljene su u sterilizirane Petrijeve zdjelice na filter-papir. Posijano je 100 sjemenki pelinolisnog limundžika u četiri repeticije. Potom su Petrijeve zdjelice stavljene u klima-komoru na temperaturni režim od 25 °C/15 °C s fotoperiodom od 12 sati dana i 12 sati noći. Klijavost je provjeravana tri puta tjedno tijekom tri tjedna. Proklijalim sjemenom smatrano je sjeme s vidljivom radikulom > 1 mm.

Vijabilnost sjemena ( $V_1$ ) određena je prema sljedećoj formuli (Borza i sur., 2007):

$$V_1 = \frac{G + CR}{N} \times 100$$

gdje G predstavlja proklijale sjemenke, CR potencijalno žive sjemenke, a N ukupan broj posijanih sjemenki.

Klijavost je praćena tri tjedna, nakon čega je neprokljalo sjeme podvrgnuto tetrazol-testu. Neprokljalo sjeme potopljeno je u vodu 17 sati, na sobnoj temperaturi od 25 °C te je idući dan prepolovljeno na dvije polovice. Veća je polovica stavljena u eppendorf-epruvete i potopljena u otopinu trifenil tetrazol klorida na 24 sata na 30 °C te obavljena ocjena obojenosti embrija (slika 1). Sve sjeme u istraživanju koje je procijenjeno kao djelomično obojeno (0,5) tretirano je kao mrtvo sjeme (Karrer i sur., 2016). Postotak vijabilnost sjemena nakon provođenog TTC testa ( $V_2$ ) određen je prema sljedećoj formuli (Borza i sur., 2007):

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

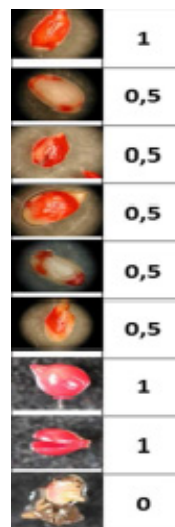
gdje G predstavlja proklijale sjemenke, T neprokljale sjemenke pozitivne na T test, a N ukupan broj posijanih sjemenki.

### Tetrazol-test

TTC test proveden je i bez prethodnog provođenja testa klijavosti. Upotrijebljeno je 100 sjemenki pelinolisnog limundžika. Metoda provođenja tetrazol-testa identična je kao kod gore opisanog tetrazol-testa provedenog na neprokljalim sjemenkama testa klijavosti.

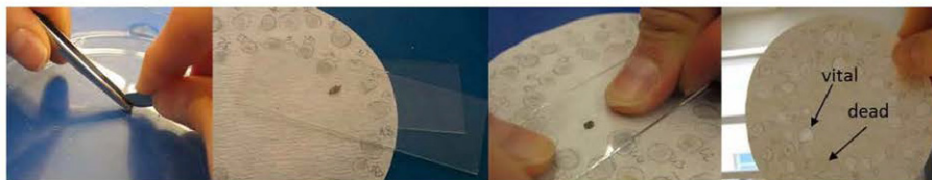
**Slika 1.** Klasifikacija obojenosti za korovnu vrstu *Ambrosia artemisiifolia* (<http://ragweed.eu/>)

**Fig. 1** Color classification for weed species *Ambrosia artemisiifolia* (<http://ragweed.eu/>)



## Crush test

Crush-test proveden je na 100 sjemenki pelinolisnog limundžika. Sjeme je prepolovljeno i obje su polovice pritisnute uz pomoć predmetnog stakalca te je promatrana prisutnost vodenog traga na filter-papiru. Ako je uočen mokri trag, sjeme je klasificirano kao živo, a ako je filter-papir ostao suh, kao mrtvo sjeme (slika 2.).



Slika 2. Postupak provođena crush-testa (izvor: <http://ragweed.eu>)

Fig. 2 Procedure implementation of crush testa (izvor: <http://ragweed.eu>)

## II) Pouzdanost i ponovljivost rezultata ocjene vijabilnosti sjemena destruktivnim metodama

Metoda provođena tetrazol i crush-testa bila je identična metodi opisanoj u poglavlju I. Pri izvedbi ovog dijela testa uzeto je po 100 sjemenki u dvije serije za tetrazol-test i za crush-test. Provjera ponovljivosti tetrazol-testa sastojala se od dvaju paralelnih pokusa (a i b), a sudionici pokusa bila su dva ocjenjivača (A i B). Pokus a) uključivao je rezanje 100 sjemenki pelinolisnog limundžika te stavljanje samo veće polovice u otopinu trifenil tetrazol klorida. Cilj je bio ustanoviti postoji li razlika u vizualnoj percepciji između dvaju ocjenjivača (A i B) te isto u odnosu na vremenski odmak između ocjenjivanja. Prvi ocjenjivač (A) vizualnom ocjenom procjenjuje obojenje odmah nakon vađenja sjemena pelinolisnog limundžika na filter-papir iz otopine TTC-a. Druga ocjena istog ocjenjivača (A) obavljena je sat vremena nakon prve ocjene. Drugi ocjenjivač (B) na isti je način ocijenio istraživano sjeme. Pokusom b) cilj je bio odrediti eventualne razlike između ocjena istog ocjenjivača za obje polovice istog sjemena te ocjene jednog ocjenjivača jedne polovice sjemena s ocjenom drugog ocjenjivača druge polovice sjemena. Za potrebe provođenja ovog testa korištene su obje polovice 100 sjemenki pelinolisnog limundžika. Svaka je sjemenka razrezana na dva jednaka dijela i obje su sjemene polovice stavljene u zasebne eppendorf-epruvete na kojima su brojevima i slovima označeni parovi polovica, npr. 1A, 1B, 2A, 2B, itd. U svaku eppendorf-epruvetu dodano je 2 ml otopine trifenil tetrazol klorida. Objе sjemene polovice prvo je ocijenio prvi ocjenjivač (A), a zatim drugi ocjenjivač (B).

Kod provođenja crush testa cilj je bio utvrditi pouzdanost odnosno ponovljivost ove metode ovisno o istraživaču (ocjenjivaču). Sjeme je prepolovljeno. Prvu polovicu sjemena ocjenjivao je prvi ocjenjivač (A), dok je drugi ocjenjivač (B) na isti način ocjenjivao drugu polovicu.

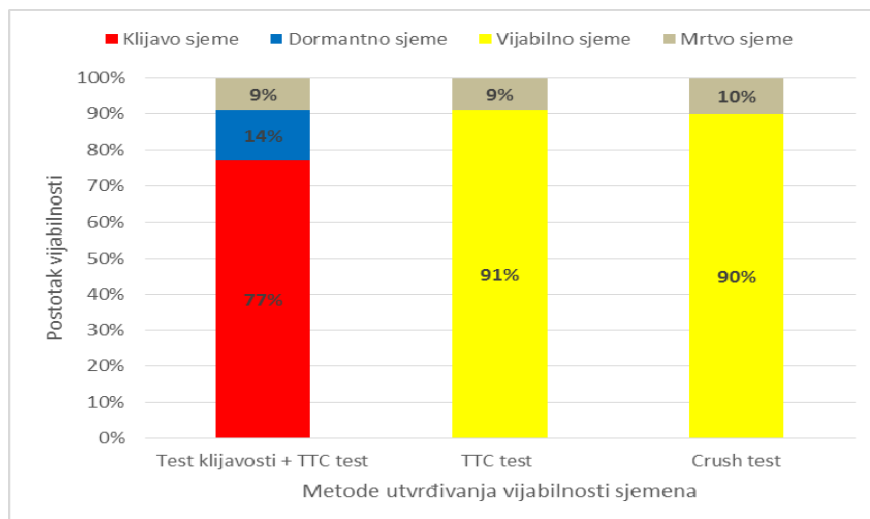
Podatci o vijabilnosti sjemena ustanovljeni TTC i crush-testom statistički su obrađeni Kappa- testom (Altman, 1991) tako da je određivan postotak

identičnih odgovora pomoću Kappa-statistike, koja je dobar pokazatelj ujednačenosti dviju ili više metoda, uzimajući u obzir njihovu slučajnu pojavnost kad dva ocjenjivača ocjenjuju istu stvar. Kappa-koeficijent je uvijek manji ili jednak 1. Vrijednost 1 podrazumijeva savršeno poklapanje ocjena, a vrijednosti manje od 1 podrazumijevaju manje poklapanje ocjena. Prema istom autoru loša je pouzdanost kad je koeficijent manji od 0,20, slaba pouzdanost kad je 0,20 – 0,40, umjerena 0,40 - 0,60, dobra pouzdanost kod 0,60 - 0,80 te vrlo dobra pouzdanost kad koeficijent izosi 0,80 – 1,00

## REZULTATI I RADA

### I) Rezultati destruktivnih metoda određivanja vijabilnosti sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.

Testom klijavosti ustanovljeno je 77 % klijavog sjemena korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia*. Naknadnim provođenjem tetrazol-testa na neprokljalim sjemenkama nakon provedenog testa klijavosti, ustanovljeno je da od 23 % neprokljalih 14 % predstavlja dormantno, a kod 9 % je bilo mrtvo sjeme. Prema tome, u uzorku je ustanovljeno 91 % vijabilnog sjemena. Kod metode određivanja vijabilnosti sjemena istraživane vrste samo TTC testom je ustanovljeno također 91 % vijabilnog sjemena i 9 % mrtvog sjemena u populaciji. Gotovo isti rezultati (90 %) o vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika dobiveni su i provedbom crush-testa (graf 1.).



**Grafikon 1.** Usporedba rezultata triju istraživanih destruktivnih metoda određivanja vijabilnosti sjemena

**Fig. 1** Comparison of the results of three destructive methods for seed viability detection

## II) Pouzdanost i ponovljivost rezultata subjektivne ocjene tetrazol i crush testom

### Tetrazol-test (pokus a)

Statističkom analizom dobivenih podataka ustanovljen je postotak identičnih odgovora između dvaju ocjenjivača i vremenskog odmaka između ocjenjivanja jednog ocjenjivača (tablica 1.).

**Tablica 1.** Usporedba vizualne percepcije ocjenjivača (A i B) te vremenskog odmaka između ocjenjivanja na jednoj polovici sjemena

**Table 1** Comparison of the visual perception of the evaluator (A and B) and the time lag between the evaluation of one half of the seed

Ocjenjivač	Sjeme identično ocijenjeno (%)	Kappa koeficijent
A –A	99	0,98
B –B	92	0,84
A <sub>1</sub> –B <sub>1</sub>	94	0,88
A <sub>2</sub> –B <sub>2</sub>	95	0,90

A-A = 1. ocjena ocjenjivača A odmah i 2. ocjena nakon 60'

B-B = 1. ocjena ocjenjivača B odmah i 2. ocjena nakon 60'

A<sub>1</sub>-B<sub>1</sub> = 1. ocjena ocjenjivača A i 1. ocjena ocjenjivača B

A<sub>2</sub>-B<sub>2</sub> = 2. ocjena ocjenjivača A i 2. ocjena ocjenjivača B

Ocjena vijabilnosti sjemena kod obaju ocjenjivača vrlo je pouzdana (Kappa-koeficijent 0,84 -0,98). Ocjenjivač A ima 99 % istih odgovora uspoređujući prvu i drugu ocjenu, a ocjenjivač B 92 % istih odgovora. Osim toga vidi se da se prva ocjena ocjenjivača A i prva ocjena ocjenjivača B poklapaju u čak 94 % odgovora, odnosno 95 % kod druge ocjene.

### Tetrazol-test (pokus b)

Ocjene vijabilnosti obaju ocjenjivača (A i B) između prve i druge polovice sjemenki kreću se od 46 do 57 % identičnih ocjena (tablica 2.) što je Kappa-koeficijentom protumačeno kao loša pouzdanost. Kod ocjenjivača A poklapanje ocjena između prve i druge polovice sjemena iznosi 57 % istih ocjena, a kod ocjenjivača B 46 %. Kad je prvu polovicu ocjenjivao ocjenjivač A, a drugu polovicu ocjenjivao ocjenjivač B, poklapanje ocjena iznosilo je 56 % , a kod obrnute situacije poklapanje je iznosilo 52 %.



**Tablica 2.** Usporedba vizualne percepcije ocjenjivača (A i B) na objema polovicama sjemena**Table 2** Comparison of the visual perception of the evaluator (A and B) on both half of the seed

Ocjenjivač	Sjeme identično ocijenjeno (%)	Kappa koeficijent
A <sub>1.2</sub> - A <sub>2.2</sub>	57	0,13
B <sub>1.2</sub> - B <sub>2.2</sub>	46	-0,07
A <sub>1.2</sub> - B <sub>2.2</sub>	56	0,11
B <sub>1.2</sub> - A <sub>2.2</sub>	52	0,03

A<sub>1.2</sub> - A<sub>2.2</sub> = ocjena ocjenjivača A za prvu (1.2) i drugu (2.2) polovicu sjemena

B<sub>1.2</sub> - B<sub>2.2</sub> = ocjena ocjenjivača B za prvu (1.2) i drugu (2.2) polovicu sjemena

A<sub>1.2</sub> - B<sub>2.2</sub> = ocjena ocjenjivača A za prvu (1.2) polovicu sjemena i ocjena ocjenjivača B za drugu (2.2) polovicu istog sjemena

B<sub>1.2</sub> - A<sub>2.2</sub> = ocjena ocjenjivača B za prvu (1.2) polovicu sjemena i ocjena ocjenjivača A za drugu (2.2) polovicu istog sjemena

### Crush-test

Ocjene vijabilnosti kod 100 sjemenki iz prve serije čije su polovice ocjenjivali oba ocjenjivača, poklapaju se u 94%, a kod 100 sjemenki iz druge serije u 82% što je kappa koeficijentom protumačeno kao dobra odnosno vrlo dobra pouzdanost (tablica 3).

**Tablica 3.** Usporedba vizualne percepcije ocjenjivača A za prvu polovicu sjemenke i ocjenjivača B za drugu polovicu iste sjemenke**Table 3** Comparison of the visual estimation of evaluator A for the first half of the seed and B for the second half of the same seed

Serija	Ocjenjivač	Sjeme identično ocijenjeno (%)	Kappa koeficijent
1.	A-B	94	0,88
2.	A-B	82	0,64

A-B ocjena ocjenjivača A za prvu polovicu sjemena i ocjena ocjenjivača B za drugu polovicu istog sjemena

## RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se pomoću testa klijavosti u kombinaciji s TTC testom, crush-testom i samostalnim tetrazol-testom dobiju vrlo slični rezultati vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika (graf 1.). Stoga će odabir odgovarajuće metode za određivanje vijabilnosti ovisiti ponajviše o potrebnim podacima, odnosno predmetu pojedinog istraživanja,

opremljenosti laboratorija te o vremenu koje istraživač ima na raspolaganju. Ako se provodi samo test klijavosti, koji je inače standardna metoda određivanja klijavosti biljnih vrsta, kod korovnih se vrsta ne dobiju potpuni podatci jer je ustanovljeno 77 % klijavih sjemenki. Stoga je ovaj test nužno kombinirati s nekom drugom metodom (tetrazol ili crush-testom) kako bi se dobili podatci o vijabilnom sjemenu, odnosno o onom sjemenu koje je potencijalno sposobno dati živu biljku. Stoga se danas u istraživanjima najčešće i koriste kombinacija testa klijavosti i tetrazol-testa za određivanje postotka dormantnog sjemena unutar određene sjemenske populacije. Rezultatima ovog istraživanja također je potvrđena kombinacija testa klijavosti i tetrazol-testa vrlo pouzdanom metodom određivanja količine nedormantnog (klijavog), dormantnog i mrtvog sjemena. Samo se kombiniranjem ovih dviju metoda mogu precizno razdvojiti ova tri stanja sjemena. Naime, samostalnim tetrazol i crush-testom dobiveni su podatci o vijabilnom i mrtvom sjemenu, ali nedostaje informacija o dormantnom sjemenu što je za kratkoročnu prognozu buduće zakorovljenosti posebice zanimljivo.

Drugi je cilj ovog istraživanja bio ustanoviti pouzdanost i ponovljivost destruktivnih metoda tetrazol i crush-testa. Pri ocjenjivanju tetrazol-testa percepcija procjene vijabilnosti kod obaju ocjenjivača nije se znatno promijenila u vremenskom odmaku od 60 minuta. Također je usporedbom ocjena obaju ocjenjivača zaključeno da su na sličan način procjenjivali vijabilnost sjemena. Kod prve ocjene istraživača A i B, ocjene su se poklapale u 94 %, a kod druge ocjene 95 %. Ovi rezultati pokazuju da tetrazol-test ne ovisi o tome tko je istraživač, što potvrđuje ponovljivost ove metode. Međutim, rezultati također pokazuju da je ocjena kod TTC testa znatno više subjektivna kad se ocjenjuju obje polovice sjemena (pokus b). Naime, ocjene ocjenjivača A i B kod prve i druge polovice sjemenki kreću se od 46 do 57 % identičnih ocjena (tablica 2.), što je statistički procijenjeno kao slabo pouzdano. Polovice istog sjemena nisu jednako ocijenjene od strane obaju ocjenjivača, a razlog tome može biti nejednoliko rezanje sjemenki odnosno neravnomjerna zastupljenost embrija u polovicama sjemena, što je vrlo važno za provođenje TTC testa. Čak i kad je isti ocjenjivač ocjenjivao obje polovice sjemena, pouzdanost je bila vrlo niska (tablica 2.). Borza i sur. (2007) također navode da točnost provođenja tetrazol-testa uvelike ovisi o iskustvu i znanju ocjenjivača i razumijevanju embrionalne strukture sjemena. Autori pogotovu ističu da je ovu metodu teško primijeniti na malim sjemenkama korova kao što su *Setaria* spp., gdje je čak nužno identificirati embrij pod znatnim povećanjem. Iako je pelinolisni limundžik korovna vrsta s nešto većim sjemenom, rezultati isktraživanja također pokazuju da je dosta teško ravnomjerno razrezati sjeme kako bi se na objema polovicama mogla ustanoviti vijabilnost sjemena, što je rezultiralo niskom pouzdanošću u pokusu b. Nasuprot tome, kad se uzimala samo vizualno veća polovica sjemena (pokus a), ustanovljena je visoka podudarnost između ocjenjivača. U istraživanjima ove tematike najčešće se i uzima samo veća

polovica sjemena za procjenu vijabilnosti. Oberson (2014) također navodi da TTC test rezultira visokim postotkom sjemena jednako ocijenjenim u dva navrata od strane dvaju različitih istraživača (92 %), s ipak nešto manjom podudarnosti između istraživača nego između vremenskog odmaka istog istraživača, slično rezultatima ovog rada. Dodatno je autorica istaknula važnost namakanja sjemena u vodu prije rezanja i potapanja u trifenil klorid otopinu jer je sjeme koje nije bilo natopljeno vodom bilo slabije obojeno od namočenoga sjemena.

Pri provođenju crush-testa ustanovljeno je relativno visoko poklapanje u ocjenjivanju između dvaju ocjenjivača, s prosječno 88 % identičnih ocjena (tablica 3.). Problem nejednolikog rezanja sjemena pri provođenju TTC i crush-testa i u recentnoj se literaturi navodi kao jedan od njegovih glavnih nedostataka. Oberson (2014) navodi da kod crush-testa dvije polovice istog sjemena ne daju uvijek slične rezultate (87,5 %). Primjenjujući oba testa (TTC i crush-test) na jednoj od polovica sjemena, autorica je ustanovila 45 % vijabilnih sjemenki kod TTC-a i 88 % kod crush-testa, što pokazuje da je crush-test gotovo za dvostruko procijenio vijabilnost sjemena u odnosu na TTC test. Razlog su tomu, prema mišljenju autorice, djelomično obojene sjemenke (0,5) koje su se isto kao i u ovom radu ocjenjivale kao mrtvo sjeme. Nasuprot tome, u crush-testu već male količine tekućeg sadržaja prisutne na filter-papiru procjenjivale su to sjeme kao vijabilno. Rezultati Sawma i Mohler (2002) također pokazuju da određivanje vijabilnosti sjemena crush-testom može rezultirati odstupanjima od oko 20% u odnosu na TTC test za korovne vrste *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Amaranthus hybridus* L. i *Abutilon theophrasti* Med. Ipak, zbog svoje jednostavnosti, brzine izvođenja i nezahtjevnosti crush-test je rado odabrana metoda velikog broja istraživača, a posebice pogodna za svježe prikupljene sjemenke (pohranjeno do 8 tjedana na hladnom mjestu) pelinolisnog limundžika (Borza i sur., 2007) i kada se testira veliki broj sjemena poput određivanja banke sjemena (Sawma i Mohler, 2002). Iako se u literaturi često tetrazol-test navodi kao najpouzdaniji test, ustanovljeno je da, osim prikazanog problema pri rezanju sjemena, vijabilnost također može varirati i zbog različitog sadržaja vlage u sjemenkama. Tako se vijabilnosti sjemena parazitske vrste *Striga asiatica* (L.) Kuntze s 97 % smanjila na čak 3 % pri povećanju vlage u sjemenu te opet nakon sušenja sjemena povećala na više od 90 % (Mohamed i sur., 1998). Autori stoga sugeriraju da, kada se radi o ovoj vrsti, tetrazol-test ne može biti pouzdan pokazatelj vijabilnosti sjemena, već samo procjena klijavog potencijala pri različitoj vlažnosti sjemena. I kod TTC testa može doći do pogreške pri ocjenjivanju zbog tamnocrvenih taloga nastalih zbog mikrobnog disanja (ISTA, 1985). Stoga Sawma i Mohler (2002) zaključuju da je provođenje crush-testa znatno manje napornije od TTC testa, a pogotovu korisna zamjena za istraživanja gdje je rizik od malih pogrešaka prihvatljiviji.

Odluka o odabiru metode određivanja vijabilnosti sjemena može također ovisiti i o starosti dostupnog sjemena. Na starijim sjemenkama pelinolisnog limundžika crush-test precjenjuje procjenu vijabilnosti jer starije sjeme upije vlagu i daje pozitivne rezultate. Stoga, Karrer i sur. (2016) preporučuju primjenu tetrazol-testa kad nije poznata starost sjemena, što se uglavnom i radi kod sjemena uzetog iz tla.

## ZAKLJUČCI

Podatci istraživanja pokazuju na gotovo podjednake rezultate vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika u svim istraživanim destruktivnim metodama (test klijavosti + TTC test, TTC test te-crush test). Tetrazol i crush-test daju objektivne i pouzdano ponovljive rezultate na sjemenu pelinolisnog limundžika ovisno o subjektivnosti različitih ocjenjivača. Percepcija procjene vijabilnosti kod obaju ocjenjivača TTC testa nije znatno promijenjena kod dviju različitih ocjena s vremenskim odmakom od 60 minuta. Također su oba ocjenjivača na sličan način procjenjivala vijabilnost sjemena s visokom podudarnošću istih odgovora u objema ocjenama. Ipak, kad su se ocjenjivale obje polovice sjemena, podudarnost je istih ocjena bila znatno manja, što upućuje na važnost ravnomjernog rezanja sjemena. Kod crush-testa nije ustanovljena veća razlika u procjeni vijabilnosti sjemena pelinolisnog limundžika, iako su se ocjenjivale obje polovice sjemena. Zaključno, vijabilnost sjemena pelinolisnog limundžika može se ustanoviti pomoću svih istraživanih destruktivnih metoda. Odabir metode ovisi isključivo o potrebama i mogućnostima istraživača.

## LITERATURA

ALTMAN, D. G. (1991). Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall.

BASKIN, J. M. i BASKIN, C. C. (1977). Dormancy and germination in seeds of common ragweed with reference to Beal's buried seed experiment. Amer. J. Bot. 64(9): 1174-1176. 1977.

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 tetrazol testing : Weed Technology, 21:518-522.

CHAPMAN, D. S; MAKRA, L., ALBERTINI, R., BONINI, M., PÁLDY A., RODNIKOVA, V., ŠIKOPARIJA, B., WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E., BULLOCK, J. M. (2016). Modelling the introduction and spread of non-native species: international trade and climate change drive ragweed invasion. Global Change Biology. 2016;22:3067–3079.

ELIAS, S. i GARAY, A. (2004). Tetrazol test (TZ) a fast, reliable test to determine seed viability, Oregon State University seed laboratory, [online] ([http:// seedlab.oregonstate. edu/sites/seedlab. oregonstate. edu/files/ value-tz-test-2004. pdf](http://seedlab.oregonstate.edu/sites/seedlab.oregonstate.edu/files/value-tz-test-2004.pdf)), pristupljeno 10. kolovoza 2017.

FUMANAL, B., CHAUVEL, B., BRETAGNOLLE, F. (2007). Estimation of pollen and seed production of common ragweed in France : Annals of Agricultural and Environmental Medicine, V. 14, p. 233–236.

ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (1985). International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 13:300–520.

KARRER, G., LEITSCH-VITALOS, M., HALL, R., KONSTATINOVIC, B., SÖLTNER, U., STARFINGER, U., LESKOVSEK, R., KAZINCZI, G., CHAUVEL, B., JOHAN VAN VALKENBURG, SKALOVA, H., LEIBLEIN-WILD, M., MORAVCOVÁ, L., ULUDAG, A., MATHIASSEN, S. K., LOMMEN, S. (2016). Soil seedbank analysis of *Ambrosia artemisiifolia*, University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, [online]

([http:// internationalragweedsociety.org/smarter/wp-content/uploads/Soil-seed-bank-of-Ambrosia-art-leaflet-new-12-12-2016. pdf](http://internationalragweedsociety.org/smarter/wp-content/uploads/Soil-seed-bank-of-Ambrosia-art-leaflet-new-12-12-2016.pdf)), pristupljeno 10. kolovoza 2017.

LAKON, G. (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. Pl. Physiol., Lancaster, 24, 389-94.

MEZEI, G., JARAI-KOMOLDI, M., MEDZIHRADESKY, Z., CSERHATI, E. (1995). Seasonal allergenic rhinitis and pollen count (a 5-year survey in Budapest). Orvosi Hetilap 136, 1721–1724.

MOHAMED, A. H., EJETA, G., BUTLER, L. G., HOUSLEY, T. L. (1998). Moisture content and dormancy in *Striga asiatica* seeds. Weed Res. 38:257–265.

OBERSON, A. (2014). Soil seed bank dynamics of *Ambrosia artemisiifolia*, How can we get a good estimate of amounts of viable seeds in the soil ?, Bachelor thesis, University of Fribourg (CH)

RAGWEED, (izvor: [www.ragweed.eu/](http://www.ragweed.eu/)), pristupljeno 10. kolovoza 2017.

SAWMA, J. T. i MOHLER, C. L. (2002). Evaluating seed viability by an unimbibed weed crush test in comparison with the tetrazol test. Weed Technology. 16:781–786.

TOOLE, E. H. i BROWN, E. (1946). Final results of the Duvel buried seed experiment : Journal of Agricultural Research, v. 72, p. 201–210.

UJEVIĆ, M. i UJEVIĆ, A. (1982). Tetrazol test u komparaciji s klasičnim metodama ispitivanja klijavosti sjemena, Agronomski glasnik : Glasilo Hrvatskog agronomskog društva, Vol.44 No.5-6 Prosinac 1982., [online] (<http://hrcak.srce.hr/151307>), pristupljeno 20. prosinca 2017.