

## UTJECAJ PREDSJETVENIH TRETMANA NA BAZI BIOSTIMULATORA NA SVOJSTVA KLIJAVOSTI GRAHA PRI NISKIM TEMPERATURAMA

### INFLUENCE OF SEED PRIMING TREATMENTS BASED ON BIOSTIMULANTS ON THE GERMINATION PARAMETERS OF COMMON BEAN AT LOW TEMPERATURES

**Monika Vidak, Marija-Magdalena Kovačec, Z. Šatović,  
Klaudija Carović-Stanko**

#### SAŽETAK

Tradicijski kultivari graha (*Phaseolus vulgaris* L.) pokazuju različitu otpornost na niske temperature, što se očituje u njihovoj sposobnosti klijanja, rasta i prinosa. Ove su varijacije ključne za odabir odgovarajućih kultivara za specifične okolišne uvjete. Poželjne karakteristike uključuju brzo i ujednačeno klijanje i nicanje, čak i pri niskim temperaturama što osigurava bolju prilagodbu biljke i stabilniji prinos u različitim klimatskim uvjetima. Optimalna je temperatura za klijanje i nicanje graha između 18 i 22 °C, dok je minimalna temperatura za klijanje 8 °C, pri kojoj sjemenke kliju usporeno. Zbog toga se grah obično sije krajem travnja ili početkom svibnja, tada do cvatnje dolazi sredinom ljeta kada su najviše temperature i suša, što može rezultirati abortiranjem cvjetova i mahuna te negativno utjecati na prinos. Cilj je ovog rada bio utvrditi utjecaj predsjetvenih tretmana na bazi biostimulatora na svojstva klijavosti sjemena dva tradicijska kultivara graha ('Trešnjevac' i 'Biser') u uvjetima nižih temperatura od optimalnih. Ranije klijanje graha pri nižim temperaturama omogućilo bi raniju sjetvu, a samim time i raniju cvatnju i formiranje mahuna, čime bi se izbjegli nepovoljni uvjeti visokih ljetnih temperatura i suše. Laboratorijskim pokusom ispitan je utjecaj temperature od 10, 15 i 20 °C na klijanje sjemenki graha predtretiranih biostimulatorima Eco Green, Exelgrow i Organico. Rezultati su pokazali da na klijavost sjemenki graha značajno utječe temperatura i primjena biostimulatora. Biostimulatori su bili korisni za kultivar 'Trešnjevac' pri temperaturama od 15 i 20 °C, dok pri temperaturi od 10 °C nisu imali nikakav učinak, odnosno, utvrđeno je da niske temperature nisu prikladne za klijanje ovog kultivara. S druge strane,

biostimulatori su negativno djelovali na klijanje kultivara 'Biser' pri svim temperaturama, osim biostimulatora Exelgrow koji je pri temperaturi od 10 °C pridonio većem postotku prokljalih sjemenki te bržem klijanju sjemena.

Ključne riječi: klimatske promjene, okolišni uvjeti, otpornost, *Phaseolus vulgaris* L.

#### ABSTRACT

Common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) have different resistance to low temperatures, which is reflected in their germination, growth and yield. These differences are crucial for the selection of suitable landraces for specific environmental conditions. Desirable characteristics include fast and uniform germination and rapid emergence, even at low temperatures, which ensures better adaptation of the plant and a more stable yield under different climatic conditions. The optimum temperature for germination and emergence of beans is between 18 and 22 °C, while the minimum temperature for germination is 8 °C, at which the seeds germinate slowly. For this reason, beans are usually sown in late April or early May, resulting in flowering in midsummer when temperatures and drought are at their highest, which can lead to aborted flowers and pods and reduce yield. The aim of this work was to determine the influence of seed treatments with biostimulants on the germination parameters of seeds of two common bean landraces ('Trešnjevac' and 'Biser') at low temperatures. Earlier germination of the common bean at lower temperatures would allow earlier sowing and thus earlier flowering and pod formation, which could avoid unfavourable conditions such as high summer temperatures and drought. In the laboratory experiment, the influence of temperatures of 10, 15 and 20 °C on the germination of common bean seeds prepared with the biostimulants Eco Green, Exelgrow and Organico was tested. The biostimulants were useful for the cultivar 'Trešnjevac' at temperatures of 15 °C and 20 °C, while they had no effect at a temperature of 10 °C, i.e. it was found that low temperatures are not suitable for the germination of this cultivar. On the other hand, biostimulants had a negative effect on the germination of cultivar 'Biser' at all temperatures, with the exception the biostimulant Exelgrow, which contributed to a higher percentage of germinated seeds and faster seed germination at a temperature of 10 °C.

Key words: climate changes, environmental conditions, *Phaseolus vulgaris* L., resistance

## UVOD

Grah (*Phaseolus vulgaris* L.) je najraširenija mahunarka u Hrvatskoj, a njegova se proizvodnja temelji na tradicijskim kultivarima velike morfološke raznolikosti, koja se najviše očituje u veličini sjemenke i boji sjemene ljuske (Vidak i sur., 2022.). Grah je porijeklom iz Srednje i Južne Amerike te se kultivari graha razlikuju po svojoj prilagođenosti različitim klimatskim i ekogeografskim uvjetima (De Ron i sur., 2016.). Kultivari graha prilagođeni su relativno hladnim i vlažnim klimatskim uvjetima s optimalnom prosječnom dnevnom temperaturom za reproduktivni razvoj od 20 do 25 °C (De Ron i sur., 2016.), a uzgajaju se u širokom rasponu klimatskih uvjeta, gdje su podložni nizu abiotičkih stresova među kojima su najučestaliji visoka temperatura i suša (Traub i sur., 2018.). Klimatske će promjene sve više povećavati površine koje su neprikladne za proizvodnju graha, ponajviše zbog visokih temperatura (Araújo i sur., 2014.; Li i sur., 2021.).

U rano proljeće, temperatura i vlaga u sjetvenom sloju ključni su abiotički čimbenici koji utječu na klijanje i nicanje sjemena (Balasubramanian i sur., 2004.). Optimalni je temperaturni raspon za nicanje graha u kontroliranim uvjetima između 20 i 30 °C, u takvim je uvjetima uočeno nicanje već na 8 °C (Balasubramanian i sur., 2004.). No, grah najbrže niče na temperaturi od 18 do 22 °C (Lešić i sur., 2004.). Odnosno, grah je toploljubiva biljna vrsta (Xia i sur., 2016.) kojoj ne odgovaraju previsoke temperature tijekom reproduktivnog razvoja (Traub i sur., 2018.; Suárez i sur., 2020.). Zbog stresa uzrokovanog klimatskim promjenama dolazi do ekstremnih vrućina i produljenja trajanja razdoblja bez kiše što je vrlo štetno za pojedine faze razvoja graha. Visoke temperature zraka tijekom dana (> 30 °C) i tijekom noći (> 22 °C) dovode do smanjenja prinosa (Suárez i sur., 2020.). Odnosno, visoke temperature tijekom cvatnje negativno utječu na rast peludne cijevi, klijanje peluda i oplodnju, ali i na abortiranje cvjetova i mahuna što dovodi do nejednakog sazrijevanja i negativno se odražava na prinos (Traub i sur., 2018.; Suárez i sur., 2020.). Samim time, proizvodnja sjemena/zrna graha postaje vrlo rizična što je jako zabrinjavajuće uzimajući u obzir ključnu ulogu graha u globalnoj sigurnosti hrane (Nadeem i sur., 2021.).

Mogućnost ranije sjetve, odnosno klijanja sjemena na nižim temperaturama od uobičajenih imalo bi značajnu ulogu za proizvodnju (De Ron i sur., 2016.) jer bi grah dolazio ranije u fazu cvatnje te bi se izbjegle visoke temperature tijekom cvatnje i plodonošenja. Grah ne tolerira hladnoću i stoga temperatura tla

uzrokuje neujednačeno nicanje, smanjuje gustoću sklopa biljaka, potiče bolesti kod biljaka i truljenje neprokljalih sjemenki jer dolazi do pucanja staničnih membrana (Nleya i sur., 2005.). Predsjetvenim tretmanima sjemena moguće je potaknuti klijanje i nicanje sjemena pri nižim temperaturama (Siddique i Kumar, 2018.). Takvim tretmanima dolazi do povećanja otpornost sjemena na stres jer se pospešuju fiziološke reakcije samog sjemena te se povećava stopa klijavosti kao i ujednačenost klijanja (Fallah i sur., 2018.). Primjena biostimulatora u predsjetvenim tretmanima poboljšava ujednačenost klijanja te utječe na rast i razvoj biljaka u različitim vremenskim uvjetima (Majkowska-Gadomska i sur., 2017.).

Cilj rada bio je utvrditi utjecaj biostimulatora na svojstva klijavosti sjemena kod dva tradicijska kultivara graha ('Trešnjevac' i 'Biser') u uvjetima temperatura nižih od optimalnih jer bi klijanje graha na nižim temperaturama omogućilo raniju sjetvu, a samim time i raniju cvatnju te formiranje mahuna.

## MATERIJALI I METODE

### *Materijali korišteni u istraživanju*

U ovom istraživanju korišteno je po 600 sjemenki od dva tradicijska kultivara graha, 'Trešnjevac' i 'Biser'. (Slika 1.).



*Slika 1. Sjeme tradicijskih kultivara graha 'Trešnjevac' (A) i 'Biser' (B)*

*Figure 1 Seeds of common bean landraces 'Trešnjevac' (A) i 'Biser' (B)*

Sjeme graha bilo je predtretirano biostimulatorima Eco Green, Organico i Exelgrow. Eco Green je prirodni mineralni prah dobiven iz minerala kalcita tribomehaničkom aktivacijom ([http://www.agroledina.hr/eco\\_green.php](http://www.agroledina.hr/eco_green.php)). Exel Grow je biostimulator na bazi ekstrakata morskih algi (*Ascophyllum nodosum*) koji zbog dvostruke fermentacije posjeduje više razine bioaktivnih tvari prirodnog podrijetla nego ostali biostimulatori. Uz njih sadrži i kalij, aminokiseline i fulvinske kiseline (<https://www.adama.com/nederland/nl/gewasbescherming/groeiregulatie/exelgrow>). Biostimulator Organico organski je mikrobiološki preparat u čijem su sastavu su auksini, giberalini, citokinini, aminokiseline, antibiotici, vitamini D, E, K i B kompleksa (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 i B12), aminokiseline (prolin), aktivatori inducirane rezistentnosti (ISR i SAR), hitanaza, siderofore, glutation, gluklan, mikroenkapsulanti, okvašivači, korisni mikroorganizmi kao što su bakterije iz roda *Bacillus* (*Bacillus subtilis* i *Bacillus megaterium*) te gljivice (kvasci) *Saccharomyces* sp. (<https://www.biogeist.hr/proizvod/organico-1-l/>).

#### *Tijek istraživanja*

Istraživanje je provedeno na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu na Zavodu za sjemenarstvo (sada: Zavod za biljnu bioraznolikost) tijekom prosinca 2021. i siječnja 2022. godine kako bi se utvrdio utjecaj predsjetvenih tretmana (biostimulatora) na klijanje sjemena dva tradicijska kultivara graha ('Trešnjevac' i 'Biser') pri niskim temperaturama (10, 15 i 20 °C). Sjeme je bilo predtretirano biostimulatorima Eco Green, Organico i Exelgrow. Pri svakoj od triju temperatura (10, 15 i 20 °C) korišteno je 200 sjemenki od svakog kultivara, po 50 sjemenki tretiranih svakim od biostimulatora (Eco Green, Organico i Exelgrow) te 50 sjemenki koje nisu bile tretirane (kontrola) (Tablica 1.).

Otopina biostimulatora i destilirane vode (dH<sub>2</sub>O) napravljena je prema uputama proizvođača. Sjemenke graha močene su u otopini šest sati u mraku te izvađene iz otopine, isprane pod tekućom vodom, zatim pod dH<sub>2</sub>O i osušene između papirnatih ručnika na sobnoj temperaturi. Po 10 sjemenki u pet ponavljanja posloženo je u sterilizirane Petrijeve zdjelice na dvostruki filter papir namočen s dH<sub>2</sub>O. Sjeme je naklijavano devet dana u komori za ispitivanje klijavosti u kontroliranim uvjetima (ISTA, 1993.), na konstantnoj temperaturi od 10, 15 i 20 °C, 70 % vlage te režimu svjetla 16 sati dan i 8 sati noć. Unutar tih devet dana, svaka 24 sata praćen je broj proklijalih sjemenki čiji je korjenčić bio  $\geq 2$  mm, a zadnji je dan utvrđen konačni broj proklijalih i neproklijalih sjemenki.

**Tablica 1. Prikaz predtretmana i broja sjemenki tradicijskih kultivara graha ('Trešnjevac' i 'Biser') u pokusu**

**Table 1 Seed priming treatments and number of common bean seeds (landraces 'Trešnjevac' and 'Biser') used in experiment**

Naziv Term	Predtretman Seed priming treatment	Kratice Abbreviation	Vrijeme močenja Soaking time	Broj sjemenki Number of seeds		
				10 °C	15 °C	20 °C
Kontrola Control	-	Tr1	-	50	50	50
Eco Green	Predtretman Seed priming treatment 1	Tr2	6 sati u mraku 6 hours in the dark	50	50	50
Exelgrow	Predtretman Seed priming treatment 2	Tr3		50	50	50
Organico	Predtretman Seed priming treatment 3	Tr4		50	50	50

### Statistička obrada podataka

Na kraju pokusa izračunata su sljedeća svojstva klijavosti prema navedenim formulama:

- (1) Klijavost (*Germinability*,  $G$ ; %)

$$G = \frac{n_k}{n} \times 100$$

$n_k$  - broj proklijalih sjemenki

$n$  - ukupan broj sjemenki u pokusu (Scott i sur., 1984.).

- (2) Prosječno vrijeme klijanja (*Mean germination time*,  $MGT$ ; dan)

$$MGT = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

$t_i$  - vrijeme od početka pokusa do vremena opažanja ( $i$ )

$n_i$  - broj proklijalih sjemenki u vremenu  $i$

$k$  - posljednji dan klijanja (Ranal i sur., 2009.).

- (3) Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja (*Coefficient of variation of the germination time, CV<sub>t</sub>; %*)

$$CV_t = \frac{s_t}{\bar{t}} 100$$

$s_t$  - standardna devijacija vremena klijanja  
 $\bar{t}$  - prosječno vrijeme klijanja (Ranal i sur., 2009.).

- (4) Srednja stopa klijavosti (*Mean germination rate, MR*) (Ranal i sur., 2009.)

$$MR = 1/t$$

- (5) Pouzdanost procesa klijanja (*Uncertainty of the germination process, U*)

$$U = - \sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i$$

a  $f_i$  prema formuli :

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

$f_i$  - relativna učestalost klijanja  
 $n_i$  - broj prokljalih sjemenki u vremenu ( $i$ )  
 $k$  - posljednji dan opažanja (Ranal i sur., 2009.).

- (6) Ujednačenost procesa klijanja (*Synchrony of the germination process, Z*)

$$Z = \frac{\sum_{i=1}^k C_{n_i 2}}{C_{\sum n_i 2}}$$

pri čemu je:

$$C_{n_i 2} = \frac{n(n_i - 1)}{2}$$

$C_{ni,2}$  - kombinacija sjemena klijalog dva po dva u vremenu ( $i$ )

$n_i$  - broj prokljalih sjemenki u vremenu ( $i$ )

$Z$  - kvocijent između sume parcijalne kombinacije prokljalih sjemenki (dvije po dvije) u vremenu ( $i$ ) i konačnog broja prokljalih sjemenki na kraju pokusa, pretpostavljajući da se klijanje sjemenki koje su klijale u određenom vremenu događalo simultano (Ranal i sur., 2009.).

(7) Indeks klijavosti (*Germination index, GI*)

$$GI = \sum_{i=1}^k \frac{n_i}{t_i}$$

$t_i$  - vrijeme od početka pokusa do vremena opažanja  $i$

$n_i$  - broj prokljalih sjemenki u vremenu  $i$

$k$  - posljednji dan klijanja (Farooq i sur., 2005.; AOSA, 1983.).

Dvosmjerna analiza varijance (*two-way ANOVA*) provedena je u svrhu utvrđivanja značajnih razlika između tretmana (predtretman i temperatura) za navedena svojstva. Izračun je proveden pomoću naredbe PROC GLM u programu SAS (SAS Institute, 2004.). Razlike između tretmana utvrđene su pomoću Tukeyjevog testa ( $P < 0.05$ ). Izvorne vrijednosti svojstava  $G$  i  $CV_i$  izražene u postotku su transformirane prije analize pomoću formule  $y = \arcsin(x/100)$ .

## REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem ispitivan je utjecaj predsjetvenih tretmana biostimulatorima (Eco Green, Exelgrow i Organico) na klijanje sjemena dva tradicijska kultivara graha ('Trešnjevac' i 'Biser') u uvjetima niskih temperatura (10, 15 i 20 °C). Utvrđeno je da je pri svakoj temperaturi prokljao značajan broj sjemenki osim pri temperaturi od 10 °C pri kojoj nije prokljala ni jedna sjemenka kultivara 'Trešnjevac' bez obzira na predtretman te je zbog valjanosti statističke analize taj tretman izuzet iz analize.



*Analiza varijance (ANOVA) za svojstva klijavosti sjemena graha*

Tablica 2. prikazuje analizu varijance (ANOVA) za svojstva klijavosti sjemena graha kultivara 'Trešnjevac'. Utvrđene su značajne razlike za sva svojstva između temperatura, tretmana i temperatura × tretman, osim za svojstvo Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja ( $CV_t$ ) između tretmana i interakcije temperatura × tretman.

**Tablica 2. Analiza varijance za svojstva klijavosti kultivara 'Trešnjevac'**

**Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for common bean cultivar 'Trešnjevac' seed germination characteristics**

Izvor varijabilnosti Source of variability	n-1	G (%)	MGT (dan / day)	$CV_t$	MR	U	Z	GI
Temperatura Temperature	1	*	***	*	***	***	***	***
Tretman Treatment	3	*	***	n.s.	***	***	***	***
Temperatura × tretman Temperature × treatment	3	*	***	n.s.	**	*	*	***

G – Klijavost / Germinability (%); MGT - Prosječno vrijeme klijanja / Mean germination time;  
 $CV_t$  - Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja / Coefficient of variation of the germination time;  
 MR - Srednja stopa klijavosti / Mean germination rate;  
 U - Pouzdanost procesa klijanja / Uncertainty of the germination process;  
 Z - Sinkronizacija procesa klijanja / Synchrony of the germination process;  
 GI - Indeks klijavosti / Germination index.

<sup>ns</sup>P > 0.05, \*0.05 > P > 0.01, \*\*0.01 > P > 0.001, \*\*\*P < 0.001

Analiza varijance za svojstva klijavosti sjemena graha kultivara 'Biser' prikazana je u Tablici 3. Utvrđene su značajne razlike za sva svojstva između temperatura i interakcija temperatura × tretman. Između tretmana utvrđene su značajne razlike za svojstva Klijavost (G) i Indeks klijavosti (GI), Koeficijent varijabilnosti vremena ( $CV_t$ ), Pouzdanost procesa klijanja (U) dok za svojstva Prosječno vrijeme klijavosti (MGT), Srednja stopa klijavosti (MR) i Sinkronizacija procesa klijanja (Z) nije utvrđena statistički značajna razlika.

**Tablica 3. Analiza varijance za svojstva klijavosti kultivara 'Biser'**

**Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for common bean cultivar 'Biser' seed germination characteristics**

Izvor varijabilnosti/ source of variability	n-1	G (%)	MGT (dan/ day)	CV <sub>t</sub>	MR	U	Z	GI
Temperatura/ temperature	2	***	***	***	***	***	**	***
Tretman/ treatment	3	***	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	***
Temperatura × Tretman/ Temperature × treatment	6	**	**	***	***	***	***	***

G – Klijavost / Germinability (%); MGT - Prosječno vrijeme klijanja / Mean germination time;  
CV<sub>t</sub> - Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja / Coefficient of variation of the germination time;  
MR - Srednja stopa klijavosti / Mean germination rate;  
U - Pouzdanost procesa klijanja / Uncertainty of the germination process;  
Z - Sinkronizacija procesa klijanja / Synchrony of the germination process;  
GI - Indeks klijavosti / Germination index.

<sup>ns</sup>P > 0.05, \*0.05 > P > 0.01, \*\*0.01 > P > 0.001, \*\*\*P < 0.001

### *Razlike između interakcija tretmana i temperatura za svojstva klijavosti sjemena graha*

Na temperaturi od 10 °C nije proklijala ni jedna sjemenka graha kultivara 'Trešnjevac' što se može objasniti činjenicom da tijekom klijanja na niskim temperaturama, u sjemenu bogatom bjelančevinama može doći do oštećenja citoplazmatske membrane te je samim time klijanje otežano, a broj proklijalih sjemenki znatno smanjen (Szczerba i sur., 2021.). S obzirom na to da je utvrđeno da kultivar 'Trešnjevac' ima veći postotak bjelančevina od 'Bisera' (Palčić i sur., 2018.), ovim je rezultatima potvrđeno da niske temperature nisu prikladne za klijanje kultivara 'Trešnjevac'. Za ostale sjemenke za svojstvo Klijavosti (G) (Graf 1.) kod kultivara 'Trešnjevac' nije utvrđena niti jedna statistički značajna razlika među interakcijama iako je broj proklijalih sjemenki kod interakcije Te2\*Tr1 (15 °C + kontrola) bio za osam manji u odnosu na broj proklijalih sjemenki kod ostalih interakcija.

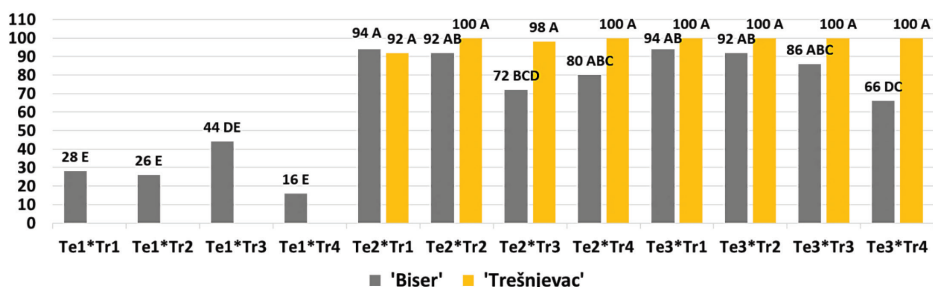
U Grafu 1. vidljivo je da je značajno najmanje sjemenki kultivara 'Biser' proklijalo pri temperaturi od 10 °C pri interakcijama Te1\*Tr1 (10 °C + kontrola), Te1\*Tr2 (10 °C + Eco Green), i Te1\*Tr4 (10 °C + Organico) kao i pri interakciji Te1\*Tr3 (10 °C + Exelgrow) koja se nije značajno razlikovala

jedino od interakcija  $Te_2*Tr_3$  i  $Te_3*Tr_4$ . Iako kultivar 'Biser' ima manji postotak bjelančevina u sjemenkama u odnosu na kultivar 'Trešnjevac' (Palčić i sur., 2018.) i dalje je bjelančevinasta mahunarka pa su ovi rezultati u skladu s prošlim istraživanjima koja upućuju na to da bjelančevinaste kulture lošije kliju pri niskim temperaturama (Szczerba i sur., 2021.). Odnosno, grah, koji sadrže bjelančevine visoke kinetičke stabilnosti, klije na višim temperaturama i toploljubiva je biljna vrsta (Xia i sur., 2016.). Budući da su skladišni proteini izvor hranjivih tvari tijekom klijanja sjemena, važno je vrijeme i kinetika njihove razgradnje (Müntz i sur., 2001.). Kinetička stabilnost (tj. razgradivost) skladišnih proteina zajedno s aktivnošću endogenih proteaza može doprinijeti određivanju pri kojoj će temperaturi sjeme klihati (Lutts i sur., 2016.; Xia i sur., 2016.). Na niskim temperaturama ( $\leq 10$  °C) proteolitička aktivnost može biti dovoljna da razgradi skladišne proteine u mahunarkama hladne sezone kao što je npr. grašak, što dovodi do klijanja. Nasuprot tome, za toploljubive mahunarke, proteolitička aktivnost na  $\leq 10$  °C možda neće biti dovoljna za razgradnju kinetički stabilnih skladišnih proteina, što rezultira izostankom klijanja. Na višim temperaturama ( $\geq 15$  °C) obje vrste mahunarki mogu klihati jer je proteolitička aktivnost dovoljna (Xia i sur., 2016.).

Dakle, jedan od najučinkovitijih čimbenika za upijanje vode i klijanje sjemena je temperatura jer utječe na unos vode i reaktivaciju metaboličkih procesa te će doći do mnogih fizioloških, biokemijskih i molekularnih poremećaja s odstupanjem temperature prilikom klijanja od optimalne (Ali i Elozeiri, 2017.)

Također, navedeni rezultati potvrđuju istraživanje Nleya i sur. (2005.) koji su utvrdili da je 12 različitih genotipova graha, koji se uzgajaju u Zapadnoj Kanadi i od kojih su neki potencijalno otporniji na niže temperature, samo tri genotipa imaju sposobnost klijanja pri temperaturi ispod 10 °C, ali s malim postotkom klijavosti. No, iako bez statističke značajnosti, utvrđeno je da je sjeme kultivara 'Biser' predtretirano biostimulatorom Exelgrow na bazi morskih algi imalo bolju klijavost ( $G=44$ ) u odnosu na kontrolu ( $G=28$ ) pri temperaturi od 10 °C. Ovi su rezultati u skladu s istraživanjem Carvalho i sur. (2013.) kojim je utvrđeno da predtretman ekstrakta morskih algi pozitivno utječe na broj proklijalih sjemenki graha kao i na brzinu klijanja u odnosu na kontrolu već nakon 15 minuta močenja u otopini ekstrakta morskih algi.

Monika Vidak i sur.: Utjecaj predsjetvenih tretmana na bazi biostimulatora na svojstva klijavosti graha pri niskim temperaturama



Graf 1. Učinak interakcije temperatura i pretretmana na klijavost (G, %) kultivara graha 'Biser' i 'Trešnjevac'

Graph 1 Effect of the interaction of temperature and seed priming treatments on germination (G, %) of the common bean cultivars 'Biser' and 'Trešnjevac'

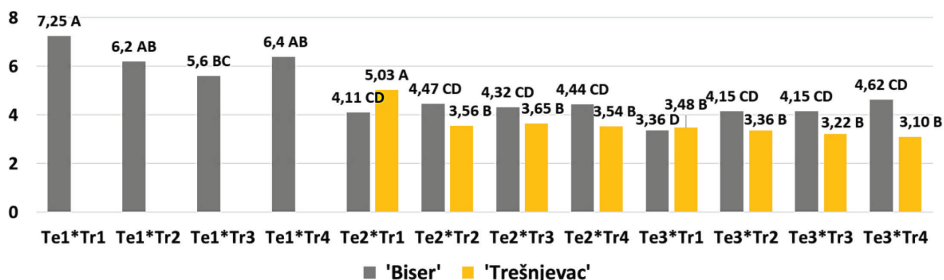
Te1- 10 °C, Te2 -15 °C, Te3 – 20 °C. Tr1 – kontrola / control; Tr2 – Eco Green; Tr3 – Exelgrow; Tr4 – Organico.

Vrijednosti u stupcima označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa ( $P < 0.05$ ) / Values followed by the same letter in each column are not significantly different based on the Tukey test at 0.05 probability.

Za svojstvo Prosječno vremena klijanja (MGT) interakcija  $Te_2*Tr_1$  (15 °C + kontrola) značajno se razlikovala od svih ostalih interakcija, odnosno klijanje sjemena kultivara 'Trešnjevac' najspornije je pri temperaturi od 15 °C u kontrolnim uvjetima (Graf 2.). Kultivar 'Trešnjevac' je značajno najbrže proklijao pri temperaturi od 15 °C kada je bio predtretiran biostimulatorima Organico = 3,54; Eco Green = 3,56; Excelgrow = 3,65 dana). Na 20 °C je najbrže proklijao kada je sjeme bilo predtretirano biostimulatorom Organico (3,10 dana), iako bez statističke značajnosti. Utvrđeno je da predtretmani ubrzavaju klijanje sjemena, a brže klijanje može dovesti do bolje konkurentnosti s korovima u polju (Lutts i sur., 2016.).

Za svojstvo Prosječno vrijeme klijanja (MGT) kod kultivara 'Biser' utvrđeno je da značajno najviše vremena za klijanje potrebno pri temperaturi od 10 °C u kontrolnim uvjetima ( $Te_1*Tr_1$ ), a najmanje u interakciji  $Te_3*Tr_1$  (20 °C + kontrola), odnosno klijanje je značajno brže pri temperaturama od 15 i 20 °C. Odnosno, predtretmani biostimulatorima imali su negativan učinak na klijanje pri svim temperaturama s izuzetkom biostimulatora Exelgrow koji je pri temperaturi od 10 °C pridonio većem postotku proklijalih sjemenki u kraćem vremenu. Ranije je već utvrđeno da kultivar 'Biser' jako brzo usvaja vodu

(nakon 6 sati) u odnosu na 'Trešnjevac' te tijekom močenja 24 sata dolazi do pucanja sjemenki i do klijanja sjemena kultivara 'Biser' (Vidak i sur., 2022.). Ovime je utvrđeno da kultivaru 'Biser' ne odgovara močenje od 6 ili više sati te bi trebalo provesti istraživanje s močenjem sjemenki kultivara 'Biser' kraće vrijeme.



Graf 2. Učinak interakcije temperatura i pretretmana na Prosječno vrijeme klijanja (MGT, dan) kultivara graha 'Biser' i 'Trešnjevac'

Graph 1 Effect of the interaction of temperature and seed priming treatments on Mean germination time (MGT, day) of the common bean cultivars 'Biser' and 'Trešnjevac'

Te1- 10 °C, Te2 -15 °C, Te3 – 20 °C. Tr1 – kontrola / control; Tr2 – Eco Green; Tr3 – Exelgrow; Tr4 – Organico.

Vrijednosti u stupcima označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa ( $P < 0.05$ ) / Values followed by the same letter in each column are not significantly different based on the Tukey test at 0.05 probability.

Iz Tablice 4. je vidljivo da je najniži Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja (CV) utvrđen za kultivar graha 'Trešnjevac' kod interakcije Te3\*Tr4 (20 °C + Organico) te se on statistički značajno razlikuje interakcija Te2\*Tr1, Te2\*Tr2 i Te2\*Tr3. Utvrđeno je da je značajno najveća Srednja stopa klijavosti (MR), Indeks klijavosti (GI) i Sinkronizacije procesa klijanja (Z) u interakciji Te3\*Tr4 (20 °C + Organico), a najniža u interakciji Tr2\*Tr1 (15 °C + kontrola). Dok je značajno najniža Pouzdanost procesa klijanja (U) bila u interakciji Te3\*Tr4 (20 °C + Organico), a najviša u interakciji Te2\*Tr1 (15 °C + kontrola).

**Tablica 4. Učinak interakcije temperatura i pretretmana na ostala svojstva klijavosti sjemena graha kultivara 'Trešnjevac'**

**Table 4 Effect of the interaction of temperature and seed priming treatments on the rest germination parameters of the common bean cultivar 'Trešnjevac'**

Izvor varijabilnosti Source of variability	CV <sub>t</sub>	MR	U	Z	GI
Te2*Tr1	24, 30 A	0, 20 C	1, 89 A	0, 22 C	1, 98 C
Te2*Tr2	21, 59 A	0, 28 B	1, 23 B	0, 41 BC	2, 92 AB
Te2*Tr3	20, 60 A	0, 27 B	1, 22 B	0, 42 BC	2, 79 B
Te2*Tr4	20, 13 AB	0, 28 AB	1, 07 B	0, 46 BC	2, 93 AB
Te3*Tr1	17, 73 AB	0, 29 AB	0, 84 B	0, 62 B	2, 99 AB
Te3*Tr2	16, 13 AB	0, 30 AB	0, 96 B	0, 53 B	3, 05 AB
Te3*Tr3	14, 48 AB	0, 31 AB	0, 68 BC	0, 66 AB	3, 16 AB
Te3*Tr4	7, 00 B	0, 32 A	0, 24C	0, 89 A	3, 26 A

Te2 -15 °C, Te3 - 20 °C. Tr1 - kontrola / control; Tr2 - Eco Green; Tr3 - Exelgrow; Tr4 - Organico.

CV<sub>t</sub> - Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja / Coefficient of variation of the germination time;

MR - Srednja stopa klijavosti / Mean germination rate;

U - Pouzdanost procesa klijanja / Uncertainty of the germination process;

Z - Sinkronizacija procesa klijanja / Synchrony of the germination process;

GI - Indeks klijavosti / Germination index.

Vrijednosti u stupcima označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa (P < 0.05)/ Values followed by the same letter in each column are not significantly different based on the Tukey test at 0.05 probability.

Najniži koeficijenti varijabilnosti vremena klijanja (CV<sub>t</sub>) kod kultivara graha 'Biser' (Tablica 5.) utvrđeni su kod interakcija Te1\*Tr2 (10 °C + Eco Green) i Te1\*Tr4 (10 °C + Organico) te se one značajno razlikuju od ostalih interakcija. Najniža Srednja stopa klijavosti (MR) utvrđena je u interakcijama Te1\*Tr1 (10 °C + kontrola) i Te1\*Tr4 (10 °C + Organico), a najviša u interakciji Te3\*Tr1 (20 °C + kontrola). Za svojstvo Pouzdanost procesa klijanja (U) značajno se od ostalih interakcija razlikuju interakcije Te1\*Tr2 (10°C + Eco Green), Te1\*Tr4 (10 °C + Organico), Te3\*Tr1 (20 °C + kontrola) s izuzetkom interakcije Te1\*Tr3 (10 °C + Exelgrow) koja se značajno ne razlikuje od interakcije Te3\*Tr1 (20°C + kontrola). Za svojstvo Sinkronizacija procesa klijanja (Z) interakcije Te1\*Tr2 (10 °C + Eco Green), Te1\*Tr4 (10 °C + Organico), Te3\*Tr1 (20 °C + kontrola) značajno se razlikuju od svih ostalih interakcija. Interakcija Te1\*Tr2 (10 °C + Eco Green) i Te3\*Tr3 (20 °C +

Exelgrow) značajno se ne razlikuju. Značajno najviši Indeks klijavosti (GI) utvrđen je kod interakcije Te3\*Tr1 (20 °C + kontrola), a najniži u interakcijama Te1\*Tr1, Te1\*Tr2, Te1\*Tr3, Te1\*Tr4, odnosno pri temperaturi od 10 °C bez obzira na predtretman. Veći postotak klijavosti i kraće trajanje klijanja u danima rezultira većim Indeksom klijavosti (G) (Kader, 2005.).

**Tablica 5. Učinak interakcije temperatura i predtretmana na ostala svojstva klijavosti sjemena graha kultivara 'Biser'**

**Table 5 Effect of the interaction of temperature and seed priming treatments on the rest germination parameters of the common bean cultivar 'Biser'**

Izvor varijabilnosti Source of variability	CV <sub>t</sub>	MR	U	Z	GI
Te1*Tr1	19, 13 A	0,14 E	1, 33 AB	0, 03 C	0, 41 D
Te1*Tr2	5, 50 B	0, 17 ED	0, 37 D	0, 67 AB	0, 43 D
Te1*Tr3	22, 68 A	0, 18 ED	1, 18 BC	0, 27 C	0, 82 D
Te1*Tr4	0, 00 B	0, 16 E	0, 0 D	1, 00 A	0, 27 D
Te2*Tr1	38, 19 A	0, 24 B	1, 66 AB	0, 29 C	2, 53 AB
Te2*Tr2	29, 95 A	0, 23 BC	1, 92 A	0, 21 C	2, 27 AB
Te2*Tr3	32, 48 A	0, 23 BC	1, 84 AB	0, 19 C	1, 83 BC
Te2*Tr4	27, 82 A	0, 22 BC	1, 68 AB	0, 23 C	1, 98 BC
Te3*Tr1	25, 30 A	0, 30 A	0, 58 CD	0, 76 A	2, 95 A
Te3*Tr2	30, 55 A	0, 24 B	1, 68 AB	0, 26 C	2, 53 AB
Te3*Tr3	33, 27 A	0, 24 B	1, 44 AB	0, 34 BC	2, 28 AB
Te3*Tr4	27, 88 A	0, 22 BCD	1, 59 AB	0, 26 C	1, 55 C

Te2 -15 °C, Te3 – 20 °C. Tr1 – kontrola / control; Tr2 – Eco Green; Tr3 – Exelgrow; Tr4 – Organico.

CV<sub>t</sub> - Koeficijent varijabilnosti vremena klijanja / Coefficient of variation of the germination time;

MR - Srednja stopa klijavosti / Mean germination rate;

U - Pouzdanost procesa klijanja / Uncertainty of the germination process;

Z - Sinkronizacija procesa klijanja / Synchrony of the germination process;

GI - Indeks klijavosti / Germination index.

Vrijednosti u stupcima označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa (P < 0.05)/ Values followed by the same letter in each column are not significantly different based on the Tukey test at 0.05 probability.

## ZAKLJUČAK

Ovi rezultati sugeriraju da primjena biostimulatora može poboljšati klijavost nekih kultivara graha pri nižim temperaturama, omogućujući raniju sjetvu i potencijalno povećanje prinosa izbjegavanjem negativnih utjecaja ljetnih vrućina i suše. Međutim, učinkovitost biostimulatora varira među različitim kultivarima, što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se optimizirala upotreba biostimulatora za različite kultivare graha.

Sjemenke tradicijskog kultivara graha 'Trešnjevac' ne kliju pri temperaturi od 10 °C vjerojatno zbog većeg sadržaja bjelančevina u sjemenu u odnosu na 'Biser' jer u sjemenu bogatom bjelančevinama može doći do oštećenja citoplazmatske membrane te je samim time klijanje otežano, a broj proklijalih sjemenki znatno smanjen. Tradicijski kultivar 'Biser' imao je smanjenu klijavost pri niskim temperaturama od 10 °C u odnosu na 15 i 20 °C bez obzira na predtretman.

Biostimulatori su kod tradicijskog kultivara graha 'Trešnjevac' imali pozitivan učinak na postotak proklijalih sjemenki i brzinu klijanja pri temperaturama od 15 °C i 20 °C.

Kod tradicijskog kultivara graha 'Biser' biostimulatori su imali negativan učinak na klijanje pri svim temperaturama s izuzetkom biostimulatora Exelgrow koji je pri temperaturi od 10 °C pridonio većem postotku proklijalih sjemenki u kraćem vremenu.

## LITERATURA

1. Ali A. S., Elozeiri A. A. (2017.): Metabolic Processes During Seed Germination. *Advances in Seed Biology*. U: *Advances in Seed Biology*, Jimenez-Lopez J.C., ur. IntechOpen, London.
2. AOSA. Association of Official Seed Analysts (1983.): *Seed Vigor Testing Handbook*. Contribution No. 32: 89.
3. Araújo S. S., Beebe S., Crespi M., Delbreil B., González E. M., Gruber V., Lejeune-Henaut I., Link W., Monteros M. J., Prats E., Rao I., Vadez V., Patto M. C. V. (2014.): Abiotic Stress Responses in Legumes: Strategies Used to Cope with Environmental Challenges. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34 (1–3): 237–280.



4. Balasubramanian P., Vandenberg A., Hucl P. (2004.): Planting date and suboptimal seedbed temperature effects on dry bean establishment, phenology and yield. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 84: 31–36.
5. Carvalho M. E. A., Castro P. D. C., Novembre A. D. C., Chamma H. M. C. P. (2013.): Seaweed extract improves the vigor and provides the rapid emergence of dry bean seeds. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13 (8): 1104–7.
6. De Ron A. M., Rodiño A. P., Santalla M., González A. M., Lema M. J., Martín I., Kigel J. (2016.): Seedling emergence and phenotypic response of common bean germplasm to different temperatures under controlled conditions and in open field. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1087.
7. Fallah S., Malekzadeh S., Pessarakli M. (2018.): Seed priming improves seedling emergence and reduces oxidative stress in *Nigella sativa* under soil moisture stress. *Journal of Plant Nutrition*, 41(1): 29–40.
8. Farooq M., Basra S. M. A., Ahmad N., Hafeez K. (2005.): Thermal Hardening: A new seed vigor enhancement tool in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47 (2): 187-193.
9. ISTA (1993.): *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association, Zürich, Switzerland.
10. Kader M. A. (2005.): A Comparison of Seed Germination Calculation Formulae and the Associated Interpretation of Resulting Data. *Journal & Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, 138: 65–75.
11. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2004.): *Površarstvo*. Zrinski d.d., Čakovec.
12. Li S., You S., Song Z., Zhang L., Liu Y. (2021.): Impacts of Climate and Environmental Change on Bean Cultivation in China. *Atmosphere*, 12: 1591.
13. Lutts S., Benincasa P., Wojtyła L., Kubala S. S., Pace R., Lechowska K., Quinet M., Garnczarska M. (2016.): *Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique*. U: *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*, Araujo S., Balestrazzi, A., ur. IntechOpen, London.
14. Majkowska-Gadomska J., Francke A., Dobrowolski A., Mikulewicz E. (2017.): The effect of selected biostimulants on seed germination of four plant species. *Acta Agrophysica*, 24 (4): 591–599.
15. Müntz K., Belozersky M. A., Dunaevsky Y. E., Schlereth A., Tiedemann J. (2001.): Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52 (362): 1741–1752.

16. Nadeem M. A., Yeken M. Z., Shahid M. Q., Habyarimana E., Yılmaz H., Alsaleh A., Hatipoğlu R., Çilesiz Y., Khawar K. M., Ludidi N., Ercişli S., Aasim M., Karaköy T., Baloch F. S. (2021.): Common bean as a potential crop for future food security: an overview of past, current and future contributions in genomics, transcriptomics, transgenics and proteomics. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35 (1), 759–787.
17. Nleya T., Ball R. A., Vandenberg A. (2005.): Germination of common bean under constant and alternating cool temperatures. *Canadian Journal of Plant Science*, 85: 577–585.
18. Palčić I., Karažija T., Petek M., Lazarević B., Herak Ćustić M., Gunjača J., Liber Z., Carović-Stanko K. (2018.): Relationship between origin and nutrient content of Croatian common bean landraces. *Journal of Central European Agriculture*, 19 (3): 490–502.
19. Ranal M. A., Santana D. G., Ferreira W. R., Mendes-Rodrigues C. (2009.): Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Revista Brasileira de Botanica*, 32 (4): 849-855.
20. Scott S. J., Jones R. A., Williams W. A. (1984.): Review of Data Analysis Methods for Seed Germination. *Crop Science*, 24 (6): 1992.
21. Siddique A., Kumar P. (2018.): Physiological and biochemical basis of pre-sowing soaking seed treatment-an overview. *Plant Archives*, 18 (2): 1933–1937.
22. Suárez J. C., Polanía J. A., Contreras A. T., Rodríguez L., Machado L., Ordoñez C., Beebe S., Rao I. M. (2020.): Adaptation of common bean lines to high temperature conditions: genotypic differences in phenological and agronomic performance. *Euphytica* 216 (28): 1–20.
23. Szczerba A., Płazek A., Pastuszek J., Kopeć P., Hornyák M., Dubert F. (2021.): Effect of Low Temperature on Germination, Growth, and Seed Yield of Four Soybean (*Glycine max* L.) Cultivars. *Agronomy*, 11: 800.
24. Traub J., Porch T., Naeem M., Urrea C. A., Austic G., Kelly J. D. Loeschner W. (2018.): Screening for Heat Tolerance in *Phaseolus* spp. Using Multiple Methods. *Crop Science*, 58: 2459–2469.
25. Vidak M., Lazarević B., Javornik T., Šatović Z., Carović-Stanko K. (2022.): Seed Water Absorption, Germination, Emergence and Seedling Phenotypic Characterization of the Common Bean Landraces Differing in Seed Size and Color. *Seeds*, 1 (4): 324–339.
26. SAS Institute (2004.): SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC, USA.
27. Xia K., Pittelli S., Church J., Colón W. (2016.): Kinetic Stability of Proteins in Beans and Peas: Implications for Protein Digestibility, Seed Germination, and Plant Adaptation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (40), 7649–7657.

**Adrese autora – Authors addresses:**

Doc. dr. sc. Monika Vidak\*,  
e-mail: mvidak@agr.hr  
Prof. dr. sc. Zlatko Šatović,  
e-mail: zsatovic@agr.hr  
Prof. dr. sc. Klaudija Carović-Stanko,  
e-mail: kcarovic@agr.hr  
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet,  
Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb.  
Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost  
i molekularno oplemenjivanje bilja,  
Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb.

Marija-Magdalena Kovačec,  
e-mail: marijamkovacec@gmail.com  
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet,  
Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb

**Primljeno – received:**

17.06.2024.

**Revidirano – revised:**

26.08.2024.

**Prihvaćeno – accepted:**

09.09.2024.

