

Utjecaj predsjetvenih tretmana na klijavost sjemena i morfologiju klijanaca crnog kima u uvjetima osmotskog stresa

Trubelja, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:536330>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ PREDSJETVENIH TRETMANA NA
KLIJAVOST SJEMENA I MORFOLOGIJU
KLIJANACA CRNOG KIMA U UVJETIMA
OSMOTSKOG STRESA**

DIPLOMSKI RAD

Ana Trubelja

Zagreb, rujan, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Biljne znanosti

**UTJECAJ PREDSJETVENIH TRETMANA NA
KLIJAVOST SJEMENA I MORFOLOGIJU
KLIJANACA CRNOG KIMA U UVJETIMA
OSMOTSKOG STRESA**

DIPLOMSKI RAD

Ana Trubelja

Mentor: doc. dr. sc. Martina Grdiša

Zagreb, rujan, 2018

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Ana Trubelja**, 0178096659, rođena dana 20. 05. 1994. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ PREDSJETVENIH TRETMANA NA KLIJAVOST SJEMENA I
MORFOLOGIJU KLIJANACA CRNOG KIMA U UVJETIMA OSMOTSKOG
STRESA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno 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 sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Ana Trubelja**, JMBAG 0178096659, naslova

**UTJECAJ PREDSJETVENIH TRETMANA NA KLIJAVOST SJEMENA I
MORFOLOGIJU KLIJANACA CRNOG KIMA U UVJETIMA OSMOTSKOG
STRESA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | |
|---|--------|-------|
| 1. doc. dr. sc. Martijan Grdiša | mentor | _____ |
| 2. doc. dr. sc. Boris Lazarević | član | _____ |
| 3. doc. dr. sc. Klaudija Carović-Stanko | član | _____ |

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Hipoteze i cilj istraživanja	2
3. Pregled literature	3
3.1. Taksonomija i rasprostranjenost	3
3.2. Povijest upotrebe.....	5
3.3. Morfološka svojstva.....	6
3.4. Kemijska svojstva i upotreba crnog kima	8
3.5. Tehnologija uzgoja crno kima.....	10
3.6. Predsjetveni tretmani u pospješivanju klijavosti sjemena.....	12
4. Materijali i metode.....	16
4.1. Statistička obrada podataka.....	19
5. Rezultati i rasprava	21
6. Zaključak.....	27
7. Popis literature	28
8. Životopis	32

SAŽETAK

Diplomskog rada studentice Ane Trubelja, naslova

UTJECAJ PREDSJETVENIH TRETMANA NA KLIJAVOST SJEMENA I MORFOLOGIJU KLIJANACA CRNOG KIMA U UVJETIMA OSMOTSKOG STRESA

Crni kim (*Nigella sativa* L.) jednogodišnja je biljna vrsta iz porodice žabnjakovki (*Ranunculaceae* Juss.), a u narodu je još poznata i pod nazivima crni kumin i ćukerot. Idealnim klimatskim uvjetima smatraju se hladna i suha područja s malim količinama padalina, ali sama oskudica vode nikako nije prikladna za uzgoj ove vrste. Kako se poljoprivreda i poljoprivredna proizvodnja u zadnjih godina sve više susreće s nedostatkom vlage, javlja se potreba za primjenom određenih tretmana (predsjetvenih tretmana) kojima bi se sjeme moglo pripremiti za takve uvijete. S ciljem utvrđivanja utjecaja predsjetvenih tretmana na klijavost sjemena u uvjetima osmotskog stresa postavljen je dvofaktorijelni pokus na Agronomskom fakultetu Sveučilište u Zagrebu. Ispitana je učinkovitost predsjetvenih tretmana sjemena (močenje sjemena u GA₃, koncentracije 100mg/l te dH₂O kroz 24h) na parametre klijavosti sjemena i morfologiju klijanaca u uvjetima osmotskog stresa (-3 i -5 bara), simuliranog primjenom PEG 6000. U uvjetima osmotskog stresa nije zamijećeno klijanje sjemena. U uvjetima bez osmotskog stresa, značajno najveća ukupna klijavost od 60% utvrđena je kod tretmana s GA₃ (T1). Tretman s destiliranom vodom (T4) i kontrola (T7) imali su manju ukupnu klijavost, odnosno 13,75 i 11,25%, a između njih nije utvrđena značajna razlika. Značajne razlike u morfološkim svojstvima korijena klijanaca utvrđene su kod svojstva duljine i površine, pri čemu su vrijednosti oba svojstva bile značajno veće kod tretmana s GA₃ (T1) u odnosu na tretman s destiliranom vodom (T4), ali se nisu značajno razlikovale od kontrole (T7).

Ključne riječi: crni kim, *Nigella sativa* L., osmotski stres, timokinon, predsjetveni tretmani

SUMMARY

Of the master's thesis - student Ana Trubelja, entitled

EFFECT OF PRIMING TREATMENTS ON SEED GERMINATION AND SEEDLING MORPHOLOGY OF BLACK CUMIN UNDER OSMOTIC STRESS CONDITIONS

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is an annual plant species from the family Ranunculaceae Juss, also known by the common names black cumin and ćukerot. Ideal climate conditions for its production are cold and dry areas with lesser amounts of rainfall; however, water stress conditions are not suitable for its cultivation. In recent years agricultural production is faced with drought and it is necessary to apply certain treatments that would enhance seed germination in such conditions. A two-factorial experiment was conducted at the Faculty of Agriculture, University of Zagreb in order to determine the influence of priming treatments on seed germination and seedling morphology in osmotic stress (-3 and -5 bar) conditions, simulated with the application of PEG 6000. The priming treatments tested were: soaking in GA₃ (100 mg/l) for 24 h and soaking in dH₂O for 24 h. In the osmotic stress conditions seed did not germinate. In conditions without osmotic stress the significantly highest germination percentage of 60% was determined for GA₃ (T1) treatment. Treatment with distilled water (T4) and control (T7) had lower total germination, i. e. 13.75 and 11.25%, and no significant differences were found between them. Significant differences in the morphological properties of the root of the seedlings were found for the length and the surface area. The values of both features were higher in treatment with GA₃ (T1), when compared to the treatment with distilled (T4), however, it did not significantly differ from the control (T7).

Keywords: black cumin, *Nigella sativa* L., osmotic stress, timoquinon, seed priming

1. Uvod

Crni kim (*Nigella sativa* L.) je ljekovita i aromatična biljka rasprostranjena diljem svijeta. Ova nadasve zanimljiva biljna vrsta potječe iz porodice žabnjakovki (*Ranunculaceae* Juss.), a koristi se u ljekovite, prehrambene i dekorativne svrhe, te predstavlja potencijalno isplativu kulturu za uvođenje u poljoprivrednu proizvodnju. Zbog sadržaja aktivnih tvari, u kojima se najviše ističe timokinon, od davnina je korištena u narodnim medicinama diljem svijeta. Posebno se ističe mogućnost primjene u liječenju kancerogenih oboljenja.

Iako se idealnim klimatskim uvjetima smatraju hladna i suha područja s malim količinama padalina, sama oskudica vode nikako nije prikladna za uzgoj ove vrste. Poljoprivreda i poljoprivredna proizvodnja zadnjih se godina sve češće susreće s nedostatkom vlage, koja je nužna kako za klijanje i nicanje, tako i za daljnji razvoj biljke. Suša za posljedicu ima ograničenu proizvodnju, odnosno, manji urod. Na proces klijanja utječe tako da ga usporava ili u potpunosti zaustavlja. Upravo se u ovu priču idealno uklapa primjena predstetvenih tretmana pomoću kojih se poboljšava životna sposobnost sjemena, odnosno povećava mu se postotak i stopa klijanja. Tim se procesom biljkama otvaraju mogućnosti stvaranja rezistentnosti na stresne uvjete te dolazi do smanjivanja vremena od same sjetve do klijanja i sjeme je zaštićeno od abiotičkih i biotičkih čimbenika u ranim fazama rasta. Mnogobrojna su istraživanja potvrdila uspješnost njihove primjene, a tijekom vremena razvijen je niz metoda koje se koriste u svrhu predtretiranja sjemena. Sve te metode imaju isti cilj, a to je vraćanje životnosti sjemena i lakše prilagođavanje stresnim uvjetima. Da bi se što kvalitetnije provela istraživanja o utjecajima i prednostima predtretmana ključno je stvoriti željene stresne uvjete u kontroliranim, laboratorijskim uvjetima. Suša se u laboratorijskim uvjetima postiže primjenom polietilenglikola (PEG), a u istraživanjima s biljkama najčešće su korišteni PEG 6000 i PEG 8000. Ono što je glavna značajka ovih metoda je provođenje prehidracije sjemena koja aktivira prekursore klijanja u samom sjemenu. Uspješnost samog tretiranja nije uvijek jednaka ili zagwarantirana, jer ovisi kako o biljnoj vrsti, tako i o tretmanu. Svakako, krajnji rezultat i uspješnost predtretmana ovisi o vrsti osmotskog stresa kao i o tretiranoj biljnoj vrsti.

2. Hipoteze i cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj predsjetvenih tretmana giberelinskom kiselinom (GA_3) i destiliranom vodom (dH_2O) na klijavost sjemena i morfologiju klijanaca crnog kima u uvjetima osmotskog stresa.

Pretpostavlja se da će primjena navedenih tretmana omogućiti, odnosno, poboljšati klijavost sjemena i pozitivno utjecati na morfološka svojstva klijanaca (duljina korijena, površina korijena, promjer korijena, volumen korijena) u navedenim stresnim uvjetima.

3. Pregled literature

3.1. Taksonomija i rasprostranjenost

Crni kim (*Nigella sativa* L.) poznat i pod nazivima crni kumin i ćukerot, biljna je vrsta iz reda *Ranunculales*, porodice *Ranunculaceae* (žabnjakovke) i roda *Nigella* (Tablica 1) (Uniprot 2018).

Tablica 1. Taksonomska pripadnost crnog kima (*Nigella sativa* L.)

Klasifikacijska kategorija	Naziv
Carstvo (<i>Regnum</i>)	<i>Plantae</i>
Koljeno (<i>Phylum</i>)	<i>Magnoliophyta</i>
Razred (<i>Classis</i>)	<i>Magnoliopsida</i>
Red (<i>Ordo</i>)	<i>Ranunculales</i>
Porodica (<i>Familia</i>)	<i>Ranunculaceae</i>
Rod (<i>Genus</i>)	<i>Nigella</i>
Vrsta (<i>Species</i>)	<i>Nigella sativa</i> L.

Catalogue of Life, 2018.

(Izvor: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/7053338>)

Naziv porodice *Ranunculaceae* potječe od umanjenice latinske riječi *rana* koja u prijevodu znači žaba, stoga se sam naziv može povezati sa staništem mnogih biljaka iz ove porodice, vodom. Vrste iz porodice žabnjakovki stranooplodne su, a oplodnju vrše kukci. Predstavnici iste mogu se pronaći u velikom rasponu hladnog i umjerenog klimatskog pojasa (Grdinić i sur., 2009). Porodica broji oko dvadesetak vrsta rasprostranjenih na području od Mediterana, pa sve do Zapadne Azije, iako je upravo crni kim najvažnija vrsta porodice, koja se uzgaja diljem svijeta (Tulukcu, 2015).

Istočni Mediteran, Južna Europa i Zapadna Azija smatraju se mjestom porijekla ove biljne vrste, a od tuda se širila na druge zemlje i 'osvajala' nova staništa (Slika 1.). Turska je važan floristički centar, zbog svoje klime te geografskog položaja, jer je na tom području prisutno gotovo 10 000 prirodnih biljnih vrsta u koje pripada i crni kim (Tulukcu, 2015).

Rod *Nigella*, prema Zohary (1983), broji 14 vrsta, a prema Dönmez i sur. (2004) 12 vrsta. Heiss i sur. (2011) unutar roda navode 15 vrsta. Najbrojnija je vrsta *Nigella arvensis* s čak pet različitih varijeteta (Tablica 2; Heiss i sur, 2011).



Slika 1. Porijeklo i širenje crnog kima

(Izvor: https://www.researchgate.net/profile/Andreas_Heiss)

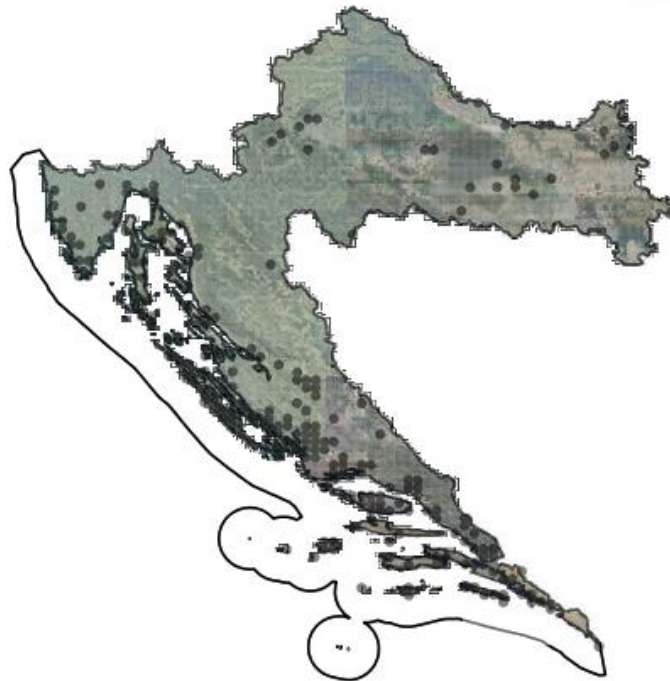
Tablica 2. Vrste roda *Nigella*

R. broj	VRSTA
1.	<i>N. arvensis</i>
2.	<i>N. arvensis</i> var. <i>arvensis</i>
3.	<i>N. arvensis</i> var. <i>assyriaca</i>
4.	<i>N. arvensis</i> var. <i>glauca</i>
5.	<i>N. arvensis</i> var. <i>involucrata</i>
6.	<i>N. arvensis</i> var. <i>trachycarpa</i>
7.	<i>N. ciliaris</i>
8.	<i>N. damascena</i>
9.	<i>N. elata</i>
10.	<i>N. fumariifolia</i>
11.	<i>N. hispanica</i>
12.	<i>N. hispanica</i> var. <i>parviflora</i>
13.	<i>N. integrifolia</i>
14.	<i>N. nigellastrum</i>
15.	<i>N. orientalis</i>
16.	<i>N. oxypetala</i>
17.	<i>N. sativa</i>
18.	<i>N. segetalis</i>
19.	<i>N. stellaris</i>
20.	<i>N. turcica</i>
21.	<i>N. unguicularis</i>

(Izvor: Heiss i sur., 2011)

Na području Turske raste 12 različitih vrsta roda *Nigella* koji su sastavni dio flore tog područja. Crni kim često je uzgajan u turskim pokrajinama Afyon, Isparta, Burdur and Konya (Kara i sur., 2014) citirano prema Baytop, 1984. *Nigella sativa*, od svih vrsta u rodu *Nigella*, jedina se pronalazi u uzgoju na obiteljskim gospodarstvima (Abu-Hammour, 2008). Izuzev velikog značenja Turske u proizvodnji crnog kima, ističe se kao uzgajivač i Indija, odnosno države poput Punjab, Himachal Pradesh, Madhya Pradesh, Jharkhand, Assam, Zapadni Bengal, Andhra Pradesh (Rana, 2012). Također, uzgoj je raširen i uspješan u državama kao što su Pakistan, Sirija, Egipat, Saudijska Arabija, Iran, Cipar i države Europe (Hussian i sur, 2014).

U Hrvatskoj su iz ovog roda prisutne četiri vrste; *Nigella arvensis* L., *Nigella arvensis* L. var. *arvensis*, *Nigella damascena* L. i *Nigella sativa* L. (Slika 2; Nikolić, 2015).



Slika 2. Rasprostranjenost roda *Nigella* u Hrvatskoj
(Izvor: Nikolić, 2015)

3.2. Povijest upotrebe

Padhye i sur. (2008) navode kako ljudski rod od davnina traga za biljkama koje sadrže aktivne tvari korisne u liječenju ljudskih bolesti. Upravo je i jedna od takvih biljaka crni kim. Ulje iz sjemenki ove biljke korišteno je u liječenju raznih bolesti, a u novije vrijeme sve više ispitivanja provodi se s otkrivenom komponentom ulja, timokinonom. Posebno se ističe njegova mogućnost upotrebe u liječenju kancerogenih oboljenja.

Sjeme crnog kima pronađeno je u grobnici faraona Tutankhamena. Prisustvo biljke uz faraone na neki je način označavalo njegovu besmrtnost. Značenje tog čina bilo je 'Od života do vječnosti'. Također, poznavanje crnog kima datira i u zapise Hippokrata (460. pr. Kr. – 380. pr. Kr.) i Dioskorida (40. po. Kr. – 90. po. Kr.), a spominje se i u Bibliji (Padhye i sur., 2008). Iz ovih navoda vidljivo je kako je crni kim bio vrlo cijenjena vrsta ne samo narodne medicine,

već i religije. Muslimani je smatraju jednom od najboljih biljaka za liječenje. Prema proročkim uvjerenjima liječi sve osim smrti (Ahmad i sur., 2013).

Crni kim je, također, važna biljna vrsta u tradicionalnim medicinama Indije, Unani i Ayurvedi. Također, već stoljećima se koristi i u drugim tradicionalnim medicinama kao što su Kineska medicina i Arapska medicina (Padhye i sur., 2008, Balouchi i sur., 2015).

Tijekom povijesti i u raznim narodima biljka je imala i različita imena koja su bila usko povezana s vjеровanjima o njejoj ljekovitosti. Latini su ju nazivali '*Panacea*', a taj naziv označavao je njezinu moć da liječi sve. U Arabiji je bila poznata kao 'Habbah Sawda' i 'Habbat el Baraka', odnosno, sjeme blagostanja (*Seeds of blessing*) (Padhye i sur., 2008).

3.3. Morfološka svojstva

Porodica žabnjakovki (*Ranunculaceae* Juss.), kao i svaka porodica ima određene karakteristike u morfologiji. Biljne vrste unutar ove porodice pripadaju jednogodišnjim ili višegodišnjim, najčešće zeljastim tipovima biljaka, ali se mogu pronaći izuzeci u smislu grmovitih biljaka. Podzemni dio karakterističan je po stvaranju gomolja ili podanaka, koji zbog visokih sadržaja hranjiva služe za prezimljavanje biljaka. Listovi mogu biti jednostavni ili sastavljeni, vrlo se često pojavljuju s rukavcem i u svih je vrsta prisutna peteljka koja može biti duga ili kratka. Cvjetovi su sastavljeni zavojito i kružno, u najvećem postotku dvospolni, a plodnica tučka nalazi se iznad ostalih dijelova cvijeta, odnosno cvjetovi su hipoginski. Cvjetovi su bogati kako tučkovima, tako i prašnicima, a sastavljeni su u pojedinačne ili sakupljene grozdaste i račvaste cvatove. (Grdinić i sur., 2009).

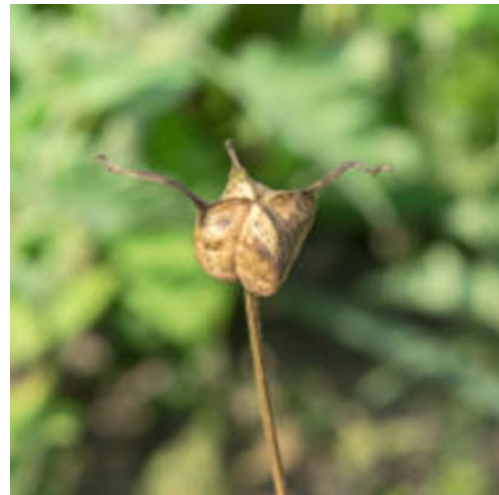
Crni kim (*Nigella sativa* L.) jednogodišnja je biljka čiji se rast proteže od veljače do travnja, dok se žetva provodi od lipnja do kolovoza. Biljka naraste u visinu između 30 i 80 cm. Sama visina stabljike, koja je uspravna i razgranata, uvelike ovisi o uvjetima u kojima se uzgaja. Stabljika je zelenkasto-sive boje, a na njoj se nalaze višestruko perasti zeleni listovi, a prisutne su i vrlo uske liske. Već spomenuta razgranata stabljika, sadrži između 4 i 12 stabljika, a svaka od njih završava lišćem (Kremer, 2007; Naz, 2011; Hussain, 2014; Tulukcu, 2015). Haq i sur. (2015) u svom istraživanju navode kako težina pojedinačne biljke varira između 8,40 g do 16,15 g, listovi su linearnog oblika duljine oko 3 cm.

Cvjetovi su vrlo nježni, izrazito svijetloplave do čak bijele boje, koji sadrže dugačke lapove smještene na vanjskom dijelu i latice na unutarnjem dijelu poslagane zavojito. Cvijet je, karakteristično za porodicu, bogat prašnicima koji pelud izbacuju prema van (Slika 3.). Pet međusobno sraslih oplodnih listića čine tučak, koji se u zreлом stadiju okreće prema van. Prilikom okretanja tučak zahvaća zrele prašnice i dolazi do samooplodnje (Anderson, 2005; Hussain, 2014). Prema Kremeru (2007), cvatnja traje od lipnja do rujna. Abu Hammour (2008), opisuje kako cvatnja započinje na terminalnim i bočnim granama, a zatim se širi na ostale i tako završava na donjim, zadnjim granama.

Nakon oplodnje cvijeta razvija se plod, tobolac ili kapsula, sastavljen od pregrada (Slika 4 i 5.).



Slika 3. Cvijet crnog kima
(Izvor: <https://www.plantea.com.hr/crni-kim/>)



Slika 4. Dozreli plod (tobolac)
(Izvor: <https://www.plantea.com.hr/crni-kim/>)



Slika 5. Izgled pregrada unutar tobolca
(Izvor: <http://nesigurnost.blogspot.com/2014/>)



Slika 6. Sjeme crnog kima
(Izvor: <https://conovehonakopci.cz/rubriky/recepty/domaci-pozivatiny/koreni/>)

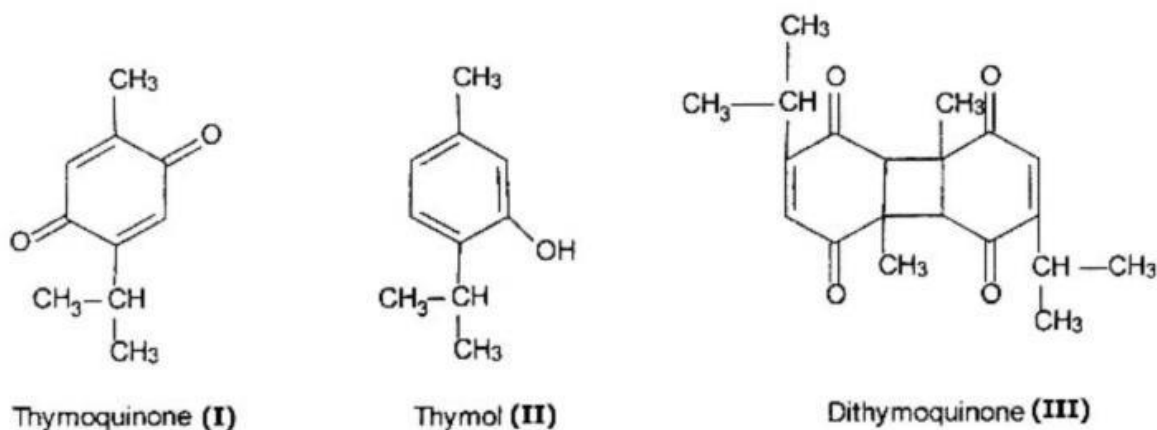
Unutar samih pregrada tijekom dozrijevanja formiraju se u početku zelene, a zatim crne sjemenke. Sjemenke su trokutastog oblika, odnosno, s dvije strane su oštih rubova, dok je treća strana sjemenke konveksna (Slika 6.). Sjeme je izrazito grube teksture i tamno, a karakteristično je i zbog mirisa te pikantnog okusa (Hussain, 2014).

Također, iz istraživanja Haq i sur. (2015), dokazano je da se po kapsuli nalazi od 0,22 g do 0,16 g sjemenaka. Sjeme crnog kima u različitim dijelovima svijeta poznato je pod različitim imenima. Tako je na području Indije često oslovljavan kao kalonji, kalazira ili sjeme luka. Na području Europe učestaliji su nazivi crne sjemenke ili pak crni kumin (Hussain i sur., 2014).

3.4. Kemijska svojstva i upotreba crnog kima

Prešanjem sjemena dobiva se ulje tamno žute do smeđe boje. Često je korišteno u zemljama kao što su Egipat, Sirija, Turska, ali se primjena proširila ka istoku i Aziji, pa i dalje. Tijekom vremena izolirane su različite aktivne tvari za koja su dokazana pozitivna i stimulirajuća djelovanja na ljudski organizam (Hussain i sur., 2014; Balouchi i sur., 2015)..

Prema Datta i sur. (2012) sjeme crnog kima sadrži već spomenuto bazno ulje, eterično ulje, proteine, minerale, ugljikohidrate i vlakna. Baznog ulja ima između 32 i 40%, a ono se sastoji od zasićenih masnih kiselina (palmitinske, stearinske i miristinske) i nezasićenih masnih kiselina (arahidonska, eikosadienska, linoleinska, oleinska i dihomo linoleinska masna kiselina). Sadržaj eteričnog ulja kreće se od 0,4 do 0,45%, a ono sadrži nigelon, timokinon (30-48%), timohidrokinon, ditimokinon, timol, carvakrol, α i β -pinene, d-limonen (Slika 7.). U sastavu baznog ulja nalaze se i proteini koji čine oko 16-19,9%, a u njihovom se sastavu nalaze arginin, lizin, leucin, glutaminska kiselina, metionin, tirozin, prolin i treonin. Minerala ima između 1,79 i 3,74%, a to su kalcij, fosfor, kalij, natrij i željezo. Ugljikohidrata u baznom ulju ima 33,9%, vlakana 5,50% i vode 6-0%. Osim ovih najvažnijih sastavnica treba spomenuti i ostale aktivne tvari koje se u sjemenkama crnog kima nalaze u manjim količinama. Kod tvari u tragovima ističu se alkaloidi, odnosno izokinonski alkaloidi i pirazol alkaloidi, nadalje alfa-hederin, triterpeni i saponini. Sve se češće postavljaju istraživanja koja za cilj imaju ispitivanje učinkovitosti i mogućnosti primjene antikancerogenih agenasa, koji su također sastavni dio sjemenki (Ahmad i sur., 2013).



Slika 7.: Kemijska struktura nekih od sastavnica sjemena (timokinon, timol i ditimokinon)

(Izvor: Padhye i sur., 2008)

Uzevši u obzir ovako velik i raznolik obujam kemijskih komponenti ne čudi da je kim, osim u povijesti, iznimno zanimljiva i često istraživana biljna vrsta i danas.

U radu Forouzanfar i sur. (2014) spominje se kako je sjeme crnog kima tradicionalno korišteno u pučkoj bliskoistočnoj medicini za liječenje raznih bolesti prije više od 2000 godina. Sjeme je korišteno kao diuretik, ekspektorans, purgativ, stimulans, sedativ i karminativ.

Primjena sjemena datira i u Arapsku medicinu, gdje se koristila za liječenje kožnih oboljenja, gastrointestinalnih poremećaja, anoreksije, astme, prehlade, bronhitisa, povišene temperature, gripe i ekcema.

Riaz i sur. (1996), prema D'Antuono i sur. (2002) govori o tome kako se crni kim. može pronaći u terapiji respiratornih i gastrointestinalnih bolesti tradicionalne medicine. U tu svrhu koriste se u svim islamskim zemljama te lokalno u južnoj Europi.

U ljekovite svrhe koriste se sjemenke, odnosno ulje dobiveno iz njih. Najpoznatija, a time i glavna sastavnica ulja je već spomenuti timokinon. On se smatra jednim od najvažnijih spojeva koje ovu biljnu vrstu, odnosno sjeme, čini tako široko upotrebljivim u terapijske svrhe. Između ostalog, spominju se antidijabetičko, antihistaminsko, protuupalno, antimikrobno, antitumorsko, antiastmatsko djelovanje. Pomaže kod snižavanja povišenih vrijednosti krvnog tlaka, ekcema i visoke temperature (D'Antuono i sur., 2002; Hussain i sur., 2014).

U radu Shuid i sur. (2012) navodi se i moguće toksično djelovanje. Istraživanje provedeno na miševima dokazalo je kako su se nakon 4 do 6 sati od primjene ekstrakta crnog kima, na istima počeli pojavljivati znakovi trovanja, odnosno toksičnog djelovanja. Trovanje se manifestiralo kroz smanjenje lokomotornog učinka, smanjenu osjetljivost na dodir i trzanje. Nakon 10 sati od primjene ekstrakta u miševa se počela pojavljivati tahipneja i smanjena konzumacija hrane. Kao srednja letalna doza (LD₅₀) spominje se količina od oko 470 mg/kg tjelesne težine. Također, navedeno je i kako je u raznim ostalim istraživanjima provedenim na miševima i štakorima, dokazano da se crni kim uz praćenje stanja krvne slike može primjenjivati u terapijske svrhe.

Sjemenke crnog kima osim zbog raznih kemijskih komponenti koje im daju svakojaka ljekovita svojstva, često se upotrebljavaju i u kulinarstvu. Sjemenke se najviše koriste kao začini, jer hrani predaju aromu i relativno gorak i ljutkast okus. Njihovu primjenu moguće je pronaći i u proizvodnji kobasica, sira ili pak slatkiša kao što su bomboni. Prilikom kuhanja ili pečenja sjemenke se mogu dodavati u razna jela, a kao primjer mogu poslužiti razne vrste juha i kolača (Hussain i sur., 2014; Assefa i sur., 2015).

Istraživanje Datta i sur. (2012) ukazuje na mogućnost primjene sjemena kao dodatka prehrani domaćih životinja. Takva praksa rezultirala je povećanjem tjelesne težine i većom reproduktivnošću kod janjaca, porastom imuniteta kod pilića, a iskorištavanje hrane od strane organizma također je zabilježilo značajan rast.

3.5. Tehnologija uzgoja crno kima

U preglednom članku Datta i sur. (2012) navode da je uzgoj crnog kima moguć u umjereno hladnim i suhim područjima s malim količinama padalinama u vidu snijega do toplih i vlažnih područja. Hladnija klima s većom količinom oborina pozitivno djeluje na cvatnju i razvoj sjemena.

Od zahtjeva ove vrste prema tlu zapravo se može istaknuti prilagodljivost crnog kima. Široki je raspon različitih tala na kojima ova biljna vrsta uspijeva i na kojima je uzgajana. Najprikladnijima se ipak smatraju pjeskovita slana tla koja su izrazito mikrobiološki aktivna. Uspjeh crnog kima također je moguć i na tlima s puno oborina, dobro dreniranim tlima pa sve do tala na područjima s malo oborina. Idealan pH kreće se između 7,0 i 7,5 (Assefa i sur, 2015).

Poznato je kako je vrijeme sjetve prilagođeno samoj kulturi koja se planira uzgajati, odnosno, vrši se u onom periodu godine ili vegetacijske sezone kada su idealni uvjeti za klijanje i nicanje dotične kulture. U poglavlju u kojem se spominjala rasprostranjenost vidljivo je kako crni kim zapravo ima dosta širok areal uzgoja, prema klimatskim uvjetima u tim područjima. Upravo iz tog razloga moguće je pronaći zbilja razne savjete i teorije o tome kada sijati ovu kulturu.

Horvat (2017) u svom doktorskom radu prema različitim autorima i izvorima navodi idealne uvijete za sjetvu crnog kima. Ističe kako se u mediteranskom dijelu Jordana, prema radu Khaled i sur. (2007), gdje prevladava klima koju karakteriziraju hladne zime i toplo do vruće ljeto, sjetva obavlja početkom prosinca. Kao mjesto uzgoja spomenut je dakako i Pakistan, u kojemu se prema Rabbani i sur. (2011), sjetva obavlja u listopadu i studenom. Nadalje, spomenuti su primjeri sjetve iz Irana koja se provodi u rano proljeće, odnosno, travanj i svibanj. Zatim se spominje kraj listopada kao idealan termin sjetve u Egiptu, sredina i kraj travnja u Turskoj te početak ožujka u sjevernoj Italiji.

Samoj sjetvi sjemena prethodi priprema tla na kojem će se odvijati uzgoj ove biljne vrste (Datta i sur., 2012). Datta i sur. (2012) u svom radu pripremu tla opisuju u tri koraka, odnosno spominju tri radnje koje je potrebno obaviti prije sjetve. Kao i za svaki usjev tlo je potrebno izorati plugom. Nakon oranja, prema literaturi, slijedi drljanje u dva do tri navrata, a potom se tlo izravna kako bi se sjetva mogla što pogodnije obaviti.

Uzgoj crnog kima provodi se najčešće direktnom sjetvom sjemena, može se pronaći i proizvodnja presadnica iako je manje uobičajena (Datta i sur., 2012). Prema radu Ghoushdi (2010), sije se 20 do 30 kg sjemena crnog kima po hektaru. Samo određivanje količine sjemena za sjetvu, naravno, ovisi o klijavosti samog sjemena koju doznajemo s deklaracije istog sjemena.

Sjetva se može obavljati u redove, u gredice, u brazde. Razmak između redova, prema Ghoushdi (2010) trebao bi iznositi između 25 i 40 cm, dok bi razmak unutar redova trebao biti 15 cm. U raznim drugim istraživanjima preporučeni su drugačiji omjeri razmaka. Tako na primjer Abdolrahimi i sur. (2012), u svom radu kao razmak preporučuje 20 cm između redova te 2 cm unutar samog reda, jer je takvom sjetvom u istom istraživanju dobiven najbolji urod. Prema Mollafilabi i sur. (2010) crni kim je biljna vrsta koja samostalno formira sklop, pa moguća rijetka sjetva nije problem, jer se biljka sama pobrine za taj nedostatak (Slika 8.).



Slika 8. Nasad crnog kima

(Izvor: https://www.pharmasaat.de/onlineshop/images/product_images/info_images/129_0.JPG)

Iako je biljka, zbog svog korijenovog sustava i klorofila uz pomoć kojeg vrši proces fotosinteze, u stanju prikupljati hranjiva iz svoje okoline ljudi već stoljećima biljkama nadodaju hranjiva u obliku umjetnih ili prirodnih gnojiva kako bi poboljšali njihov rast i razvoj. Uzgoj crnog kima, također ne prkosi ovim pravilima te je gnojidba tog usjeva uobičajena pojava. Osim sveprisutnog dušika za crni kim od izuzetne je važnosti i fosfor (Rana, 2012). Datta i sur. (2012) u svom radu ističu kako se prilikom gnojidbe usjeva crnog kima upotrebljava NPK gnojivo koncentracije 5:3:2. Gnojivo se aplicira jednom godišnje direktno uz mladu biljčicu. Svakako u obzir, prilikom određivanja količine i vrste gnojiva, treba uzeti stanje tla utvrđeno kemijskom analizom, klimatske uvjete te sam način uzgoja vrste.

Navodnjavanje ima pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljke. Datta i sur. (2012) kao preporuku za navodnjavanje navode jedan ili dva ponavljanja, i to u fazi cvatnje i u fazi dozrijevanja sjemena, a time se postiže veće sjeme te samim time i više ulja.

Borba protiv korova provodi se ručno ili kopanjem (Datta i sur, 2012; D'Antuono i sur., 2002), kako bi se smanjila njihova pojavnost i time se pospješili uvjeti za uspijevanje crnog kima. Prema istraživanjima ova bi se mjera trebala provoditi od 20 do 15 dana unutar kojih će biti provedeno tri do pet ponavljanja uklanjanja korova jednom od mogućih metoda.

3.6. Predsjetveni tretmani u pospješivanju klijavosti sjemena

Provođena su mnoga ispitivanja i postavljani su razni pokusi kako bi se utvrdio utjecaj predsjetvenih tretmana na pospješivanje klijavosti. Osobito su zanimljiva i vrijedna takva ispitivanja kod sušnih uvjeta gdje sjeme u trenutku kada treba proklijati pati od deficita vode. Deficit vode, odnosno vodni stres važan je poljoprivredni problem diljem svijeta, a koji značajno utječe ne samo na klijanje već i na samo osnivanje usjeva. Upravo u ovu priču idealno se uklapa upotreba predsjetvenih tretmana sjemena pomoću kojih se poboljšava životna moć sjemena, odnosno povećava mu se postotak i stopa klijanja. Tim se procesom biljkama otvaraju mogućnosti stvaranja rezistentnosti na stresne uvjete te dolazi do smanjivanja vremena od same sjetve do klijanja i sjeme je zaštićeno od abiotičkih i biotičkih čimbenika u ranim fazama rasta. Samo klijanje i pojava mlade biljčice iznad površine tla jedne su od najosjetljivijih faza u razvoju i o njima ovise prinosi koji će se kasnije ostvariti. Poželjno je da je biljka u tom periodu što manje izložena negativnim utjecajima. Sve ove prednosti kasnije dovode do ujednačenije klijanja i razvoja samog usjeva. Upravo istraživanja na temu predsjetvenih tretmana svojim rezultatima pokazuju pozitivne karakteristike upotrebe istih. Također, provedbom mnogih istraživanja utvrđene su i neki tehnički elementi u smislu koje tretmane koristiti, u kojoj količini i kojem vremenskom periodu kako bi samo predtretiranje sjemena bilo što uspješnije. Nadalje, dokazana je velika uspješnost primjene predtretmana kod klijanja sjemena različitog povrća i trava, odnosno kultura s vrlo sitnim sjemenom. Pozitivni rezultati također su dobiveni i kod primjene na žitaricama (pr. pšenica), mahunarkama kao što je soja te kod suncokreta (Kaya i sur., 2006; Balouchi i sur., 2015; Fallah i sur., 2018).

Prema Fallah i sur. (2018) cit. Kaya i sur. (2006) predsjetveni tretmani poboljšavaju fiziološke reakcije samog sjemena koje se nalazi pod stresnim uvjetima, a to će dovesti do povećane otpornosti na sam stres. Crni kim kako je već ranije spomenuto, berbom sjemena datira u ljeto. Upravo u tom periodu godine se sve češće susreće problem nedostatka vode te se biljka razvija u sušnim, za nju nedovoljno optimalnim uvjetima.

Tijekom vremena razvijen je niz metoda koje se koriste u svrhu predtretiranja sjemena. Sve te metode imaju isti cilj, a to je vraćanje životnosti sjemena i lakše prilagođavanje stresnim uvjetima. Ono što je glavna značajka ovih metoda je provođenje predhidracije sjemena koja će aktivirati prekursore klijanja u samom sjemeni. Uspješnost samog tretiranja nije uvijek jednaka ili zagarantirana, jer ovisi kako o biljnoj vrsti, tako i o tretmanu. Pažnju treba posvetiti i fizikalnim i kemijskim čimbenicima prilikom tretiranja, jer i oni imaju utjecaj na krajnji rezultat tretmana. U fizikalne čimbenike spadaju osmotski tlak, vodni potencijal, temperatura, vrijeme trajanja tretmana, svjetlost, stanje sjemena, dok se u kemijske čimbenike ubrajaju različita sredstva koja se koriste u pripremi i samom tretiranju (Lutts i sur., 2016). Tretiranje sjemena vodom najjednostavniji je način koji koristi čistu vodu. Sjeme se potapa u vodi određeno vrijeme, a zatim se ostavlja da se posuši do početne vlage sjemena. S obzirom na to da ova metoda ne koristi nikakve kemikalije ili bilo kakva sredstva osim čiste vode, ekološki je prihvatljiva. Nadalje, metoda ima i svoj nedostatak, a to je nemogućnost kontroliranja količine vode koje će sjeme upiti. Taj nedostatak relativno je moguće nadzirati i to osiguravanjem točno određene količine vode pri određenim temperaturama uz pažljivo praćenje vremena samog tretiranja. Predsjetveni tretmani vodom provedeni na kulturama kao

što su pšenica, riža, grah, slanutak, kukuruz, suncokret imali su pozitivan utjecaj na klijavost sjemena i rast radnice u optimalnim i u stresnim uvjetima. Najčešći oblik predtretiranja vodom je tretiranje, odnosno premazivanje, u bubnju. Prilikom ove tehnike sjeme koje se nalazi u bubnju koji se polagano okreće postupno se hidrira vodenom parom (Lutts i sur., 2016).

- Namakanje sjemena u osmotskoj otopini s niskim potencijalom vode je sljedeća tehnika predtretmana. Otopina ima već spomenuti niski potencijal vode što omogućuje polagani ulazak vode u sjeme, postepeno sazrijevanje i aktivacija početnih faza klijanja. Vodni potencijal otopine iznosi između -1.0 i 1.0 Mpa. Za ovu vrstu tretmana koriste se razni spojevi kao što su polietilen glikol (PEG), manitol, sorbitol, glicerol, anorganske soli. Najčešće se ipak koristi PEG. U kombinaciji sa solnim otopinama ova tehnika često se naziva i „halopriming“. Ova metoda dokazano poboljšava klijavost sjemena, pojavu sadnica i povećava toleranciju na stres u nepovoljnim uvjetima (Lutts i sur., 2016).

- Zbog visokih troškova za potrebna sredstva prethodne metode razvijena je metoda krutog matriksa. Zasniva se na korištenju krutog matriksa gdje se sjemenke miješaju i inkubiraju s vlažnim nosačem krute vode. Proces traje točno određeno vrijeme nakon čega nastupa odvajanje, ispiranje i sušenje. Ovim načinom tretiranja sjeme se polagano hidratizira. Kao materijal za matrice koriste se materijali specifičnih fizikalnih i kemijskih karakteristika, a najčešće su to vermikulit, treset, pijesak, drveni ugljen ili neki tvornički supstrati. Korištenje ove tehnike pokazalo se uspješnom pri predtretiranju mrkve, soje i luka (Lutts i sur., 2016).

- Predtretman hormonima gdje se koriste giberelini, auksini, abscizinska kiselina, kinetin. Primjenom giberelinske kiseline (GA3) došlo je do povećanja prinosa zrna, povećanja tolerancije na sol kod pšenice. Nadalje, primjena poliamina uzrokovala je povećanu toleranciju na sušu kod riže, a askrobinska kiselina i salicilna kiselina pomažu pšenici da se odupre salinitetu (Lutts i sur., 2016).

- Kao tehnika predtretiranja sjemena koristi se i inokulacija sjemena bakterijama. Ova tehnika povećava brzinu i uniformnost klijanja, a simultano pruža zaštitu od patogena iz tla. Moguća je upotreba bakterija koje potiču rast biljaka (PGPB), *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* sp. (Lutts i sur., 2016).

Mnogobrojna istraživanja potvrđuju pozitivno djelovanje predstjetvenih tretmana na klijavost sjemena u uvjetima osmotskog stresa. Jedno od takvih istraživanja je ono Balouchi i sur. (2015) koji su istraživali utjecaj 1%-tnog i 3%-tnog kalijevog nitrata (KNO_3), salicilne kiseline (0,2 i 0,5 mM) i destilirane vode na klijavost sjemena crnog kima u uvjetima osmotskog stresa (0, -3 i -6 bara). Sjeme je tretirano sa šest različitih tretmana. 1%-tnim kalijevim nitratom, 0,5 mM salicilnom kiselinom u trajanju od šest sati, 3%-tnim kalijevim nitratom u trajanju od 24 sata i 0,2 mM salicilnom kiselinom te destiliranom vodom u trajanju od 12 sati. U pokus je, također, bila uključena i kontrola (netretirano sjeme). Prema danim rezultatima istraživanja vidljivo je da su predstjetveni tretmani imali značajan učinak na postotak klijavosti za različite razine osmotskog stresa. Tako, primjera radi, najveći postotak klijavosti kod osmotskog potencijala 0 iznosio je 92%, a postignut je kod primjene 3%-tnog kalijevog nitrata i 0,2 mM salicilne kiseline. Postignuti rezultati postotka klijavosti ovih dvaju tretmana signifikantno se razlikuju od rezultata netretiranog sjemena i sjemena tretiranog destiliranom vodom. Kod razine osmotskog stresa od -3 bara, najveći postotak klijavosti od 85% postignut je tretmanom 0,2 mM salicilne kiseline, a rezultat se signifikantno razlikuje od onih postignutih primjenom destilirane vode i od netretiranog sjemena. Kod najvećeg

osmotskog stresa (-6 bara) upotreba 0,2 mM salicilne kiseline ponovno je rezultirala najvećim postotkom klijanja (58%). Kod ove razine stresa rezultat upotrebe 0,2 mM salicilne kiseline signifikantno se razlikuje od ostalih tretmana. Autori ovakav rezultat pripisuju upravo tome što salicilna kiselina dovodi do sprečavanja redukcije auksina i citokinina, a upravo prisutnost ovih hormona u biljci pridonosi boljem suočavanju sa stresnim uvjetima.

Istraživanje Majd Nassiry i sur. (2016) pokazalo je kako se povećanjem razine osmotskog stresa smanjivao postotak klijavosti i povećavalo se prosječno vrijeme klijanja. Autori su testirali tolerantnost bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) na uvjete osmotskog stresa. Sjeme je tretirano s PEG-om, kalijevim nitratom (KNO_3) i natrijevim kloridom (NaCl) u koncentracijama od 0,2, 0,4, 0,8 Mpa i trajanju od 8 i 16 sati na $15\pm^{\circ}\text{C}$. Nakon isteklog vremena tretiranja sjeme je isprano destiliranom vodom u dva ponavljanja i zatim ostavljeno na $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ da se prosuši do početne vlage sjemena. Sukladno navodu da se povećanjem razine osmotskog stresa smanjivao postotak klijavosti i raslo je prosječno vrijeme klijanja govore i rezultati. Pri razini osmotskog stresa 0 Mpa postotak klijanja iznosio 93,33%, a pri -0,8 Mpa tek 32%. Također, vidljiv je rast prosječnog vremena klijanja, koje je pri 0 Mpa iznosilo 3,95, a pri -0,8 Mpa 7,74. Razlog ovomu je, kako navode autori, to što se povećanjem osmotskog stresa smanjuje mogućnost sjemena da upija vodu iz okoline i time je vrijeme do početka klijanja povećano. Iako u našem istraživanju, klijanje u uvjetima -3 i -5 bara nije zabilježeno, u uvjetima 0 bara najmanje prosječno vrijeme klijanja zabilježeno je kod T4, odnosno tretmana sa dH_2O . MGT u tom tretmanu iznosio je 11,79 i signifikantno se razlikovao samo od tretmana T1. Pretpostavka je da je sjeme tijekom pripreme u tretmanu sa dH_2O upilo određenu količinu vode koju je kasnije upotrijebio za početak klijanja.

U istraživanju Kaya i sur. (2006) provedenom na sjemenu suncokreta sorte Sanbro ispitivana je klijavost i rast sadnice u uvjetima povećanog saliniteta i suše. Suša je inducirana pomoću PEG-6000. Uspoređivana su tri tretmana sjemena, kako u uvjetima povećanog saliniteta, tako i u uvjetima suše. Sjeme je podijeljeno u kontrolu (sjeme koje nije tretirano), KNO_3 (sjeme tretirano otopinom KNO_3) i dH_2O (sjeme tretirano destiliranom vodom). Pokusi su postavljeni u različitim vodnim potencijalima (0,0, -0,3, -0,6, -0,9 i -1,2 Mpa). Istraživanje je postavljeno kako bi se dokazali koji su to čimbenici odgovorni za sam rast i klijanje sjemena u nepovoljnim uvjetima i kako bi se odredili količinski normativi prilikom predstjetvenog tretmana. I u uvjetima povećanog saliniteta i u sušnim uvjetima kod svih tretmana dokazano je usporeno klijanje. Kod NaCl je postotak klijanja i prosječno vrijeme klijanja bilo niže, a klijanje, duljina korijena i klijanca veća nego kod PEG pri istom vodnom potencijalu. U svim uvjetima, osim PEG na vodnom potencijalu -1,2 Mpa, zabilježeno je klijanje. NaCl pokazao je manje inhibitoran učinak na rast sadnica u usporedbi s klijanjem. Inhibiranje klijanja kod istog vodnog potencijala događala se zbog osmotskog učinka, a ne zbog toksičnosti prisutne soli. Zaključno, dokazan je pozitivan učinak predstjetvenih tretmana, jer je zbog tretmana porasla klijavost i rast samih sadnica u uvjetima povećanog saliniteta i suše.

Fallah i sur. (2018) su istraživali utjecaj predstjetvenih tretmana sjemena crnog kima. u različitim uvjetima nedostatka vode. U istraživanje su bili uključeni sljedeći tretmani: kontrola, tretiranje destiliranom vodom u trajanju od 48 sati, tretiranje kalijevim nitratom (KNO_3) u trajanju od 72 sata, tretiranje 0, 5%-tnim cinkovim sulfatom (ZnSO_4) u trajanju od 36 sata, tretiranje polietilen glikolom u trajanju od 72 sata i tretiranje giberelinskom kiselinom (GA_3) koncentracije 100 ppm-a u trajanju od 36 sata. U blago stresnim uvjetima nedostatka vode

tretiranje sjemena rezultiralo je povećanjem koncentracije prolina, a najveći postotak pojavnosti u danim uvjetima bio je kod upotrebe $ZnSO_4$. Povećanje enzima katalaze zabilježen je u svim tretmanima (osim kod polietilen glikola), dok je koncentracija topljivih enzima bila najveća kod tretmana KNO_3 . KNO_3 je, također, u srednje stresnim uvjetima nedostatka vode postigao najveću brzinu i postotak pojave i duljine samih sadnica. Nasuprot srednje stresnim uvjetima, kod teško stresnih uvjeta najveći postotak pojave imale su sjemenke tretirane giberelinskom kiselinom i $ZnSO_4$. Tretiranje vodom i giberelinskom kiselinom pokazalo se najbolje u pogledu sadržaja prolina i težine sadnica. Aktivnost katalaze bila je najveća prilikom korištenja $ZnSO_4$ i tretiranja vodom i to u teškim i umjerenim stresnim uvjetima. $ZnSO_4$ i GA_3 pokazali su se najviše pogodnima za borbu protiv vodnog stresa u ranim fazama rasta, jer uzrokuju rast sadržaja antioksidansa u sadnicama.

4. Materijali i metode

Dvofaktorijski pokus u svrhu ispitivanja utjecaja predsjetvenih tretmana na klijavost sjemena crnog kima u uvjetima osmotskog stresa postavljen je na Zavodu za sjemenarstvo, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 05. travnja 2018. do 30. travnja 2018.

Pokus je postavljen po slučajnom bloknom rasporedu u četiri ponavljanja. Svako ponavljanje bilo je predstavljeno s jednom Petrijevom zdjelicom s 20 sjemenki crnog kima (Slika 11.). Prvi faktor pokusa uključivao je tretmane sjemena giberelinskom kiselinom (GA₃), destiliranom vodom (dH₂O i kontrolu, odnosno netretirano sjeme. Drugi faktor uključivao je tri razine osmotskog stresa (0, -3, -5 bara) primjenom različitih koncentracija PEG 6000. Ova u vodi topljiva molekula, formule HO [CH₂ CH₂ O]_n, vrlo je često primjenjivana u istraživanjima koja ispituju ponašanje biljaka u uvjetima nedostatne vlage (Špoljarević i sur., 2014). Molekula se dobiva, kako opisuju Špoljarević i sur. (2014), kemijskom procesom polimerizacije etilen oksida s vodom, monoetilnim glikolom ili dietilen glikolom uz alkalnu katalazu. Osmotski potencijal vodene otopine PEG-a usko je povezan s koncentracijom. Dokazano je kako se pri određenim koncentracijama povećanjem osmotskog potencijala otopine linearno povećavala i temperatura iste (Michel i sur., 1973).

Za pravilno korištenje PEG-a potrebno je veliko znanje o njegovu učinku. U istraživanjima u kojima su uključene biljke, uglavnom se koriste PEG 6000 i PEG 8000.

Prije postavljanja pokusa sjeme je dezinficirano u 3%-tnom izosanu, kroz period od tri minute, nakon čega su sjemenke tri puta ispirane u destiliranoj vodi. Tretman s GA₃ uključivao je močenje sjemena u GA₃ koncentracije 100 mg/L kroz 24 sata. Tretman sjemena s destiliranom vodom trajao je također 24 h. Kontrola je predstavljala netretirano, sterilizirano sjeme. U tablici 3. prikazani su primijenjeni tretmani.

Tablica 3. Popis primijenjenih tretmana

Oznaka tretmana	Opis tretmana
T1	GA ₃ (100mg/l, kroz 24 sata) + razina osmotskog stresa 0 bara
T2	GA ₃ (100 mg/l, kroz 2 4 sata) + razina osmotskog stresa -3 bara
T3	GA ₃ (100 mg/l, kroz 24 sata) + razina osmotskog stresa -5 bara
T4	dH ₂ O (kroz 24 sata) + razina osmotskog stresa 0 bara
T5	dH ₂ O (kroz 24 sata) + razina osmotskog stresa -3 bara
T6	dH ₂ O (kroz 24 sata) + razina osmotskog stresa -5 bara
T7	Kontrola + razina osmotskog stresa 0 bara
T8	Kontrola + razina osmotskog stresa -3 bara
T9	Kontrola + razina osmotskog stresa -5 bara

Nakon predsjetvenih tretmana sjeme je izvađeno iz otopina i ostavljeno 24 sata da se posuši na početnu vlagu sjemena te je pincetom poslagano u staklene Petrijeve zdjelice promjera 85 mm, na čije dno je postavljena vata i filter papir (Slika 9., Slika 10.).

Inkubacija sjemena provedena je u komori za naklijavanje kroz period od 27 dana na temperaturi od 25°C i vlazi zraka 70% i svjetlosnom režimu noć: dan 16:8 (Slika 13.). Broj proklijalih sjemenki utvrđivan je tri puta tjedno kroz period od 27 dana. Vlaga u Petrijevim zdjelicama održavana je dodavanjem destilirane vode (dH₂O) (T1, T4 i T7), a u slučaju simulacije osmotskog stresa dodavanjem -3 (T2, T5 i T8) te -5 (T3, T6 i T9) bara PEG 6000 (Slika 12.).

Pomoću skenera Epson Perfection V700 klijanca fotografirani su klijanci u tretmanu T1, T4 i T7. Dobivene slike analizirane su računalnim programom WinRHIZO Pro (Regent Instruments Inc., Quebec, Qc, Canada). Za svaki klijanac utvrđena je duljina korijena (*L*-*Lenght*; cm), površina korijena (*S* - *Surface Area*; cm²), prosječni promjer korijena (*D* - *Average diameter*; mm) i volumen korijena (*V*- *Root Volume*; mm³).



Slika 9. Procjeđivanje sjemena nakon 24 sata močenja u otopini GA₃ koncentracije 100 mg/L
(Autor: Trubelja, 2018)



Slika 10. Postavljanje sjemena na naklijavanje
(Autor: Trubelja, 2018)



Slika 11. Petrijeve zdjelice s po 20 sjemenki po tretmanu
(Autor: Trubelja, 2018)



Slika 12. Zalijevanje sjemena
(Autor: Trubelja, 2018)



Slika 13. Postavljanje Petrijevih zdjelica u klima komoru
(Autor: Trubelja, 2018)

4.1. Statistička obrada podataka

Na kraju pokusnog razdoblja izračunati su parametri klijavosti sjemena te su analizirana morfološka svojstva klijanaca za tretmane T1, T4 i T7. Za njihovo izračunavanje korištene su formule koje slijede u daljnjem tekstu.

- (1) KLIJAVOST SJEMENA – G (*Germinability*) – izražena u % (Scott i sur., 1984).

$$G = \frac{\text{broj iskljalih sjemenki}}{\text{ukupan broj sjemena}} \times 100$$

Klijavost sjemena je postotak sjemena u kojem proces klijanja dolazi do svog kraja, u eksperimentalnim uvjetima, a koji rezultira pojavom izbočine, odnosno živog zametka.

- (2) PROSJEČNO VRIJEME KLIJANJA – MGT , (*Mean germination time*), izraženo u danima

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

U formuli t_i označava vrijeme od početka pokusa do vremena opservacije (t^{th}). Faktor n_i je broj iskljalih sjemenki u i^{th} vremenu, a k označava zadnji dan klijanja (Ranal i sur. 2009).

- (3) SREDNJA STOPA KLIJAVOSTI – MR (*Mean germination rate*)

$$MR = 1/t$$

Srednja vrijednost klijanja definirana je kao recipročna vrijednost prosječnog vremena klijanja (Ranal i sur., 2009).

- (4) KOEFICIJENT VARIJABILNOSTI VREMENA KLIJANJA – CV_t (*Coefficient of variation of the germination time*) – izražen u %

$$CV_t = \frac{St}{t} \times 100$$

Pri čemu je St standardna devijacija, a t je prosječno vrijeme klijanja (Ranal i sur., 2009).

- (5) POUZDANOST PROCESA KLIJANJA – U (*Uncertainty of the germination process*)

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

, pri čemu:

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

Pri čemu je faktor n_i broj prokljalih sjemenki u vremenu t^{th} . Zadnji dan opservacije označen je s k (Ranal i sur., 2009).

Pouzdanost procesa klijanja služi za mjerenje stupnja nesigurnosti povezanog s raspodjelom relativne učestalosti klijanja. Niske vrijednosti ukazuju na bolju ujednačenost klijanja.

- (6) UJEDNAČENOST PROCESA KLIJANJA – Z (*Synchrony of the germination process*) (Ranal i sur., 2009).

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

Pri čemu Z predstavlja kvocijent između sume parcijalne kombinacije prokljalih sjemenki u vremenu t_i i konačnog broja prokljalih sjemenki na kraju pokusa, pretpostavljajući da se klijanje sjemenki koje su klijale u određenom vremenu događalo simultano.

- (7) INDEKS KLIJAVOSTI – GI (*Germination index*)

Indeks klijavosti izračunat je pomoću formule (AOSA, 1993):

$$GI = \frac{\text{broj prokljalih sjemenki}}{\text{broj dana do prvog prebrojavanja}} + \dots + \frac{\text{broj prokljalih sjemenki}}{\text{broj dana do konačnog prebrojavanja}}$$

Jednosmjerna analiza varijance je provedena u svrhu utvrđivanja signifikantnih razlika između tretmana. Izračun je proveden pomoću naredbe PROC GLM u programu SAS (SAS Institute, 2004). Razlike između prosječnih vrijednosti kvantitativnih svojstava između tretmana utvrđene su pomoću Tukeyjevog testa ($P < 0.05$). Izvorne vrijednosti svojstava G i CVt izraženih u postotku su prije analize transformirane pomoću formule $y = \arcsin(x/100)$ (SAS Institute 2004. SAS SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC, USA).

5. Rezultati i rasprava

Suša je jedan od najznačajnijih osmotskih stresova koji ograničava poljoprivrednu proizvodnju usporavajući ili inhibirajući klijanje sjemena kao i rast i razvoj biljaka što u konačnici rezultira smanjenjem prinosa. U mnogim je istraživanjima utvrđeno da predtretmani sjemena pospješuju klijavosti sjemena i ujednačenost nicanja u uvjetima osmotskog stresa, stoga se kroz ovaj diplomski rad nastojala utvrditi učinkovitost samo nekih od navedenih tretmana, točnije tretmana s giberelinskom kiselinom (GA_3) i destiliranom vodom. Postoji niz istraživanja o primjeni predsjetvenih tretmana u uvjetima vodnog stresa izazvanog PEG-om u svrhu pospješivanja klijavosti, kako crnog kima, tako i nekih drugih kultura u uvjetima vodnog stresa (Li i sur, 2013; Balouchi i sur., 2015; Espanany i sur, 2016; Fallah i sur., 2018.).

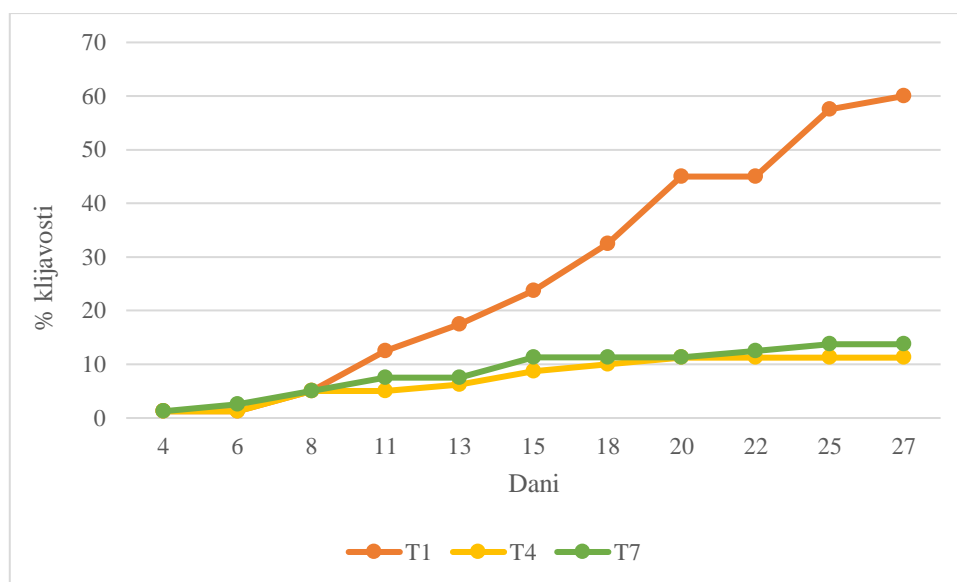
Tretmani pokusa označeni kraticama T2 (GA_3 + -3 bara), T3 (GA_3 + -5 bara), T5 (dH_2O + -3 bara), T6 (dH_2O + -5 bara), T8 (kontrola + -3 bara), T9 (kontrola + -5 bara) kod kojih je simuliran osmotski stres nisu rezultirali klijanjem sjemena, stoga su isključeni iz daljnje statističke analize. Iako u ovom istraživanju predtretiranje sjemena nije pospješilo klijanje sjemena u uvjetima osmotskog stresa (-3 i 5 bara), u literaturi je moguće naći istraživanja na istu tematiku kod kojih je primjena predtretmana sjemena u uvjetima osmotskog stresa imala pozitivan učinak. Utjecaj GA_3 na sjeme crnog kima u uvjetima osmotskog stresa ispitivali su i Fallah i sur. (2018). Osim predtretmana s giberelinskom kiselinom (100 mg/l u trajanju od 36 sati), autori su koristili i tretmane koji su uključivali destiliranu vodu (48 sati), KNO_3 (2%-tni u trajanju od 72 sata), $ZnSO_4$ (0,5% u trajanju od 36 sata), PEG (-4 bara u trajanju od 72 sata). Kod sjemena tretiranog sa $ZnSO_4$, KNO_3 i GA_3 utvrđen je visok postotak klijavosti u različitim uvjetima osmotskog stresa. Kao objašnjene učinkovitosti predtretmana s GA_3 navode činjenicu da ona potpomaže sintezu α -amilaze, a to je jedan od važnih biokemijskih procesa koji stimulira klijanje sjemena.

Iako u ovom istraživanju tretman sa dH_2O isto tako nije rezultirao klijavošću sjemena u uvjetima osmotskog stresa, istraživanje Gahtyari i sur. (2017) pokazalo je upravo prednost njene primjene, iako kod druge biljne vrste, pri znatno većim razinama osmotskog stresa (-9 i -15 bara). Istraživanje je provedeno na sjemenu pšenice pri četiri razine osmotskog stresa (0, -3, -9, -15 bara). Sjeme je tretirano destiliranom vodom i giberelinskom kiselinom (50 ppm). U rezultatima je vidljivo kako je pri većim razinama osmotskog stresa (-9 i -15 bara) predtretman s destiliranom vodom imao bolji učinak. Na svih pet istraživanih genotipa pšenice pri -9 i -15 bara tretman s destiliranom vodom rezultirao je višim postotkom klijavosti. Kod nekih genotipova postignuta je klijavost za 10% veći od klijavosti koja je postignutog upotrebom GA_3 (primjer: genotip PBW 175 postotak klijavosti kod tretmana destiliranom vodom iznosio je 57,5%, a kod tretmana GA_3 iznosio je 47,5%). Ovakav pozitivan učinak primjene destilirane vode kao predtretmana sjemena može se objasniti iz istraživanja kojeg su proveli Ken-Ichi i sur. (2013). Autori su ispitivali utjecaj predtretiranja sjemena vodom na klijanje i vigor sjemena riže tijekom klijanja u različitim uvjetima vlažnosti tla. Utvrdili su pozitivan učinak primjene vode na sjeme, a isti su pripisali aktivaciji metaboličkog procesa koji je povezan s aktivnošću α -amilaze. Odnosno, zabilježena je pozitivna korelacija između aktivnosti α -amilaze i sadržaja šećera u sjemenki prije samog klijanja. Šećeri osiguravaju hranjiva stanici za njezino

produljenje i početak rasta. Promijene u samom metabolizmu događaju se u periodu sušenja sjemena, vraćanja na početnu vlagu kada dolazi do ubrzanja metaboličkih procesa.

Kao pozitivan rezultat ovog istraživanja valja istaknuti djelovanje predtretmana GA_3 na povećanje klijavosti sjemena u uvjetima bez osmotskog stresa u odnosu na kontrolno sjeme, stoga će u daljnjem tekstu biti prikazani rezultati tretmana T1 ($GA_3 + 0$ bara), T4 ($dH_2O + 0$ bara) i T7 (netretirano sjeme; kontrola + 0 bara) (Slika 14., Slika 15., Slika 16.), kod kojih je zabilježeno klijanje sjemena. Dinamika klijanja sjemena crnog kima u tretmanima T1, T4 i kontrole (T7) prikazana je u grafikonu 1.

Klijanje sjemena kod svih tretmana započelo je četvrtog dana od stavljanja na naklijavanje, kada je kod svih tretmana zabilježena klijavost od 1,25%. U početku je zamijećeno brže klijanje kod tretmana T7 (2,5% šestog dana), ali već osmog dana postotak klijavosti kod tretmana T1 i T4 raste na 5%. Tretman T1 jedanaestog dana pokazuje veću klijavost (12,5%) od preostala dva tretmana (T4=5%, T7=7,5%). Dvadesetog dana postotak klijavosti tretmana T1 raste na 45%, a zadnjeg, dvadeset sedmog dana, klijavost je na 60%. Tretman T7 uglavnom je imao bolju dinamiku klijanja od tretmana T4 i petnaestog dana prelazi 10%. Dvadesetog dana ispitivanja, klijavost kod tretmana T4 i T7 je jednaka, a iznosi 11,25%. Zadnjeg dana ispitivanja, postotak klijavosti kod tretmana T7 iznosio je konačnih 13,75%, dok je kod tretmana T4 iznosio 11,25%.



*T1 ($GA_3 + 0$ bara); T4 (destilirana voda + 0 bara); T7 (kontrola)

Grafikon 1. Dinamika klijanja sjemena crnog kima

U tablici 4. i 4a. prikazana su svojstva klijavosti sjemena crnog kima kod tretmana GA_3 (T1), dH_2O (T4) i kontrole (T7). Kao što je već i spomenuto, značajno najveća ukupna klijavost od 60% utvrđena je kod tretmana T1. Tretman s destiliranom vodom (T2) i kontrola (T7) imali su manju ukupnu klijavost, odnosno 13,75% i 11,25%, a između njih nije utvrđena značajna razlika. Prosječno vrijeme klijanja, koje ukazuje na brzinu klijanja, kretalo se od 11,79 (T4) do 17,75 (T7) dana, pri čemu su značajno najveće vrijednosti utvrđene kod tretmana s T1 (17,75).

Značajne razlike nisu utvrđene kod koeficijent varijacije vremena klijanja (CV_t), čije su se vrijednosti kretale od 33,23 do 46,16, kao ni kod pouzdanosti procesa klijanja (U ; 0,90 – 2,28). Parametar ujednačenosti procesa klijanja (Z) kretao se od 0 – 0,11, međutim, ni u ovom slučaju nisu utvrđene značajne razlike između tretmana. Niske vrijednosti ovog parametra upućuju na slabu ujednačenost klijanja sjemena. Indeks klijavosti (GI), koji opisuje odnos između postotka klijavosti i brzine klijanja (Kader, 2005), kretao se od 0,24 kod T4 do 0,68 kod tretmana T1, pri čemu su utvrđene značajne razlike između tretmana T1, u odnosu na tretmane T4 i T7, a između njih nisu utvrđene značajne razlike. Više vrijednosti indeksa klijavosti ukazuje na viši postotak klijavosti i stopu klijanja (Bench i sur., 1991).

Tablica 4. Svojstva klijavosti sjemena crnog kima (*Nigella sativa* L.) prilikom različitih tretmana (srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Tretman	G (%)		MGT (dan)		CV_t (%)	U
T1	60,00 \pm 9,13	a	17,75 \pm 0,83	a	33,23 \pm 6,49	2,28 \pm 0,46
T4	11,25 \pm 7,50	b	11,79 \pm 3,10	b	54,60 \pm 33,18	0,90 \pm 1,05
(T7) Kontrola	13,75 \pm 6,29	b	12,85 \pm 1,49	b	46,16 \pm 24,08	1,13 \pm 0,87
$P(F)$	***		**		ns	ns

* G (Germinability) – ukupna klijavost sjemena; MGT (Mean germination time) – prosječno vrijeme klijanja; CV_t (Coefficient of variation of the germination time) - koeficijent varijacije vremena klijanja; U (Uncertainty of the germination process) – Pouzdanost procesa klijanja

$P(F)$ - signifikantnost F-testa: ^{ns} $P > 0.05$, * $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.001$, *** $P < 0.001$

Vrijednosti u retku označene istim slovom se signifikantno ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa

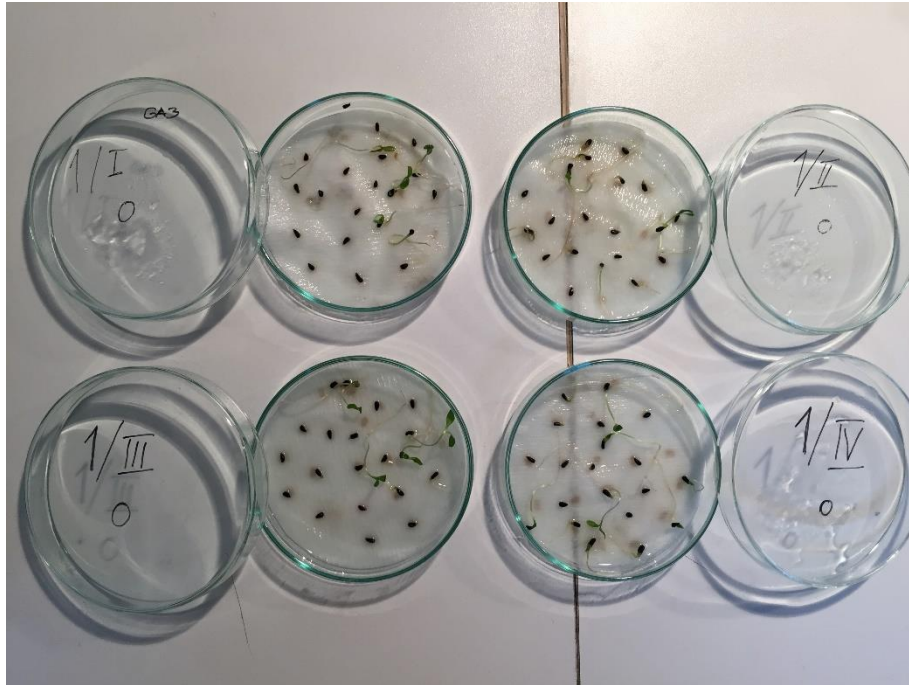
Tablica 4a. Svojstva klijavosti sjemena crnog kima (*Nigella sativa* L.) prilikom različitih tretmana (srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Tretman	Z	GI	MR
T1	0,11 \pm 0,04	0,68 \pm 0,20 a	0,06 \pm 0,00 b
T4	0,00 \pm 0,00	0,24 \pm 0,17 b	0,09 \pm 0,03 a
(T7) Kontrola	0,11 \pm 0,19	0,26 \pm 0,13 b	0,08 \pm 0,01 ab
$P(F)$	ns	**	*

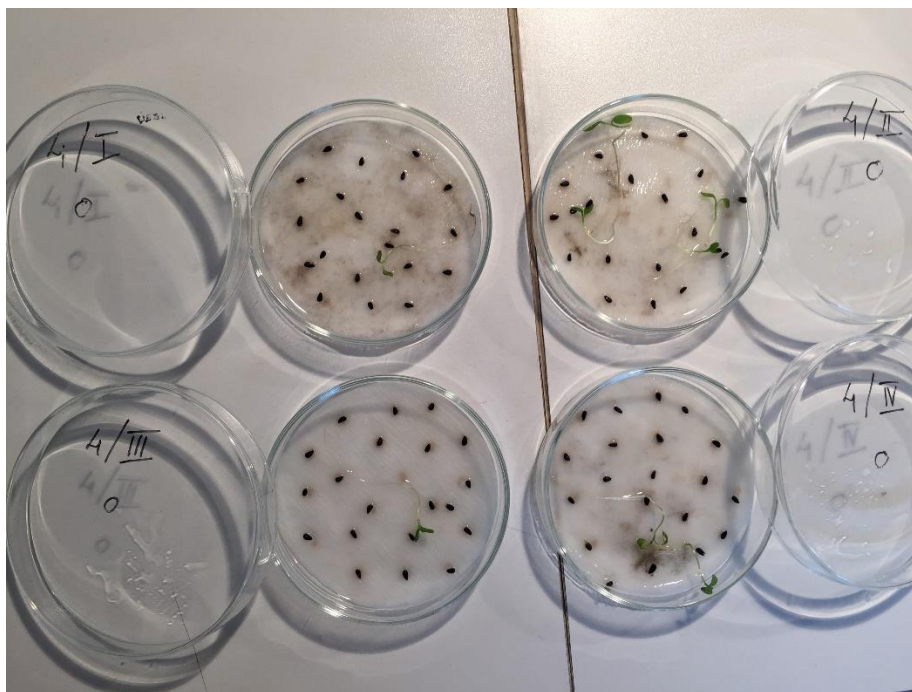
Z (Synchrony of the germination process) – ujednačenost procesa klijanja ; G (Germination index)- indeks klijavosti; MR (Mean Germination Rate)- prosječna stopa klijanja

$P(F)$ - signifikantnost F-testa: ^{ns} $P > 0.05$, * $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.001$, *** $P < 0.001$

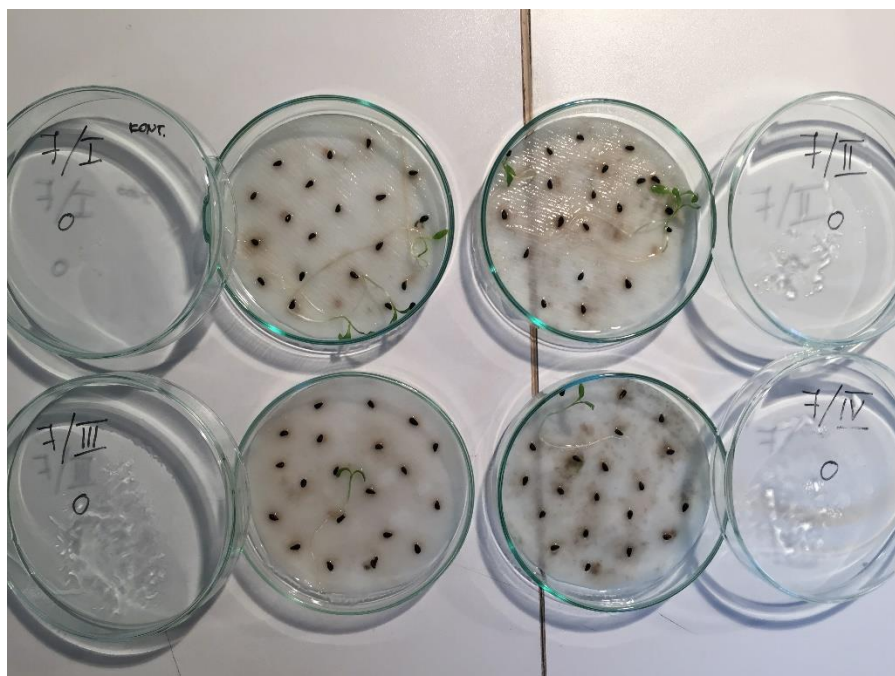
Vrijednosti u retku označene istim slovom se signifikantno ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa



Slika 14. Klijanci tretmana T1
(Autor: Trubelja, 2018.)



Slika 15. Klijanci tretmana T4
(Autor: Trubelja, 2018.)



Slika 16. Kljanci tretmana T7

(Autor: Trubelja, 2018.)

U tablici 5. prikazana su svojstva korijena klijanaca crnog kima (*Nigella sativa* L.) kod tretmana T1, T4 i T7 (kontrola). Prosječna duljina korijena klijanaca kod tretmana T4 iznosila je 2,64 cm, kod tretmana T1 3,80 cm a kod T7 6,26 cm. Značajne razlike utvrđene su između tretmana T4 i T7 (Slika 18.). Najveća površina (*S*), također je utvrđena kod T7 (0,82 cm²), dok je kod T1 ona uznosila 0,57 cm², a kod tretmana T4 0,46 cm². Iako je površina korijena kod tretmana T1 bila veća od one utvrđene kod tretmana T4, ona se nije značajno razlikovala od kontrolnog tretmana. Između tretmana nisu utvrđene značajne razlike u prosječnom promjeru (*D*) i volumenu (*V*) korijena. Najveći prosječni promjer klijanca (*D*) izmjeren je kod T1 (0,49 mm) (Slika 17.) Kod T4 i T7 promjer klijanaca iznosio je 0,43 mm. Najveći volumen korijena utvrđen je kod klijanaca tretmana T1, a on je iznosio 5,04 mm³. Nešto manji volumen, odnosno 5,00 mm³, zabilježen je kod kontrole (T7), a 2,50 mm³ kod tretmana T4. Iz svega navedenog može se zaključiti da predtretmani sjemena nisu pozitivno utjecali na svojstva korijena klijanaca.

Tablica 5. Svojstva korijena klijanca crnog kima (*Nigella sativa* L.) prilikom različitih tretmana (srednja vrijednost ± standarda devijacija)

Tretman	<i>L</i> (cm)		<i>S</i> (cm ²)		<i>D</i> (mm)	<i>V</i> (mm ³)
T1	3,80 ± 0,27	ab	0,57 ± 0,05	ab	0,49 ± 0,03	5,04 ± 2,56
T4	2,64 ± 1,71	b	0,46 ± 0,16	b	0,43 ± 0,07	2,50 ± 1,29
T7	6,23 ± 1,86	a	0,82 ± 0,16	a	0,43 ± 0,05	5,00 ± 4,24
P(F)	*		**		ns	ns

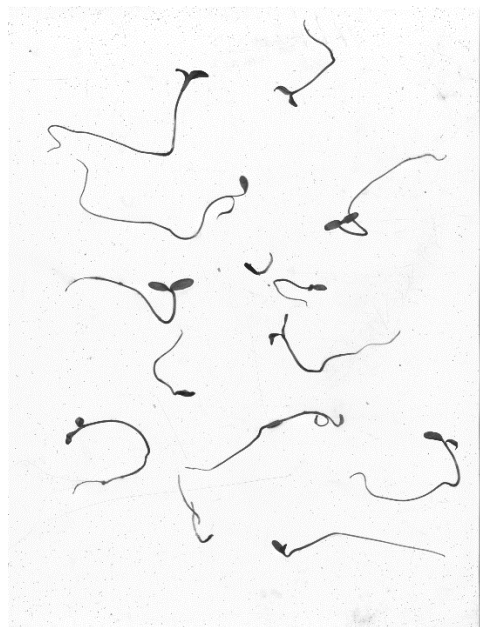
L- duljina korijena klijanaca; *S*- površina korijena klijanaca; *D*- promjer korijena klijanaca; *V* – volumen korijena

P(F) - signifikantnost F-testa: ^{ns}*P* > 0.05, *0.05 > *P* > 0.01, **0.01 > *P* > 0.001, ****P* < 0.001

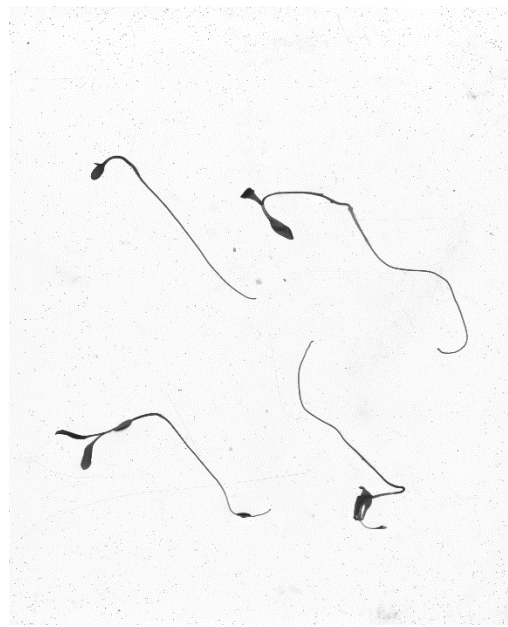
Vrijednosti u retku označene istim slovom se signifikantno ne razlikuju na temelju Tukeyjevog testa

Za razliku od rezultata ovog istraživanja u znanstvenoj literaturi je moguće naći dokaze o pozitivnom djelovanju predstjetvenih tretmana na morfološke karakteristike klijanaca. Moradi i sur. (2012) su istraživali utjecaj predstjetvenih tretmana na klijavost i razvoj klijanaca kod pšenice u uvjetima osmotskog stresa. Pokus je uključivao četiri faktora, uključujući tri razine temperature (10, 15 i 25°C), trajanje tretmana (12, 24, 36, 48 i 60 sati), vrstu predstjetvenog tretmana (destilirana voda, urea i PEG) i dvije razine osmotskog stresa (-4 i -8 bara). Autori naglašavaju da je duljina korijena jedan od važnih pokazatelja nužnih za procjenu otpornosti biljke na osmotski stres. Utvrdili su produživanje korijena u uvjetima stresa, a njegova dužina bila je tri puta veća kod sjemena predtretiranog destiliranom vodom u odnosu na dužinu korijena klijanaca kod kontrolnog tretmana. Nadalje, utvrdili su i veću duljinu hipokotila kod tretmana sa ureom i destiliranom vodom u odnosu na ostale tretmane.

Riazi i sur. (2008) ističu kako predtretiranje sjemena pozitivno utječe na svojstva korijenčića i sam vegetacijski vrh iz kojega se razvija stabljika, na način da utječe na apsorpciju vode sjemena. Razina do koje predtretman utječe na usvajanje vode ovisi o vrsti koja se tretira i o uvjetima tretmana. Memar i sur. (2006) navode kako PEG sprječava rast hipokotila te tako dovodi do smanjene apsorpcije vode kroz korijen i biljka se na kraju suši.



Slika 17. Skenirani klijanci tretmana T1
(Autor: Trubelja, 2018)



Slika 18. Skenirani klijanci tretmana T7
(Autor: Trubelja, 2018)

6. Zaključak

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj predsjetvenih tretmana na klijavost sjemena i morfologiju klijanaca crnog kima u uvjetima osmotskog stresa. Za potrebe istraživanja kao predtretmani korišteni su: GA₃ (100mg/l u trajanju od 24 sata) i dH₂O u trajanju od 24 sata.

Temeljem dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- Predtretmani sjemena nisu potaknuli klijanje sjemena u uvjetima osmotskog stresa (-3 i -5 bara), dok je kod osmotskog potencijala od 0 bara klijanje zabilježeno u svim tretmanima
- Kod predtretmana s GA₃ (bez osmotskog stresa) utvrđen je značajno najveći postotak klijavosti (60%), kod kojeg je utvrđen i značajno najveći indeks klijavosti od 0,68.
- Primjena dH₂O nije utjecala na povećanje klijavosti sjemena, u tom je tretmanu zabilježen najmanji postotak klijavosti (11,25%), u odnosu na tretman s GA₃ i kontrolu
- Predsjetveni tretmani nisu utjecali na poboljšanje morfoloških svojstava korijena klijanaca.

Za daljnja istraživanja predlaže se ispitivanje nekih drugih kemijskih agensa dokumentiranih u znanstvenoj literaturi kao i njihovih kombinacija u pospješivanju klijavosti sjemena crnog kima u uvjetima osmotskog stresa.

7. Popis literature

1. Abdolrahimi B., Mehdikhani P., Hasanzadeh Gort Tappe A. (2012). The effect of harvest index, yield and yield components of three varieties of black seed (*Nigella sativa*) in different planting densities. *International Journal of AgriScience* 2(1): 93 – 10.
2. Abu- Hammour (2008). Polination od Medical Plants (*Nigella sativa* and *Coriandrum sativum*) and *Cucurbita pepo* in Jordan. Institut fur Nutzpflanzenwissenschaften und Ressoucenschutz.
3. Ahmad A., A. Husain, M. Mujeeb, S. A. Khan, A. K. Najmi, N. A. Siddique, Z. A. Damanhour, F. Anwar (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(5): 337 – 352.
4. Anderson S. (2005). Floral costs in *Nigella sativa* (*Ranunculaceae*): Compensatory responses to perianth removal. *American Journal of Botany* 92(2): 279 – 283.
5. Assefa E., Alemayehu A., Mamo T. (2015). Adaptability Study of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Varieties in the Mid and High Land Areas of Kaffa Zone, South West Ethiopia. *Agriculture, Forestry and Fisheries* 4(1):14 – 17. doi: 10.11648/j.aff.20150401.13.
6. Association of Official Seed Analysts (AOSA) (1983). Seed vigor testing handbook. East Lansing, AOSA, 88.
7. Balouchi H., Movahhedi-Dehnavi M., Behzadi B. (2015). Effect of priming types on germination of *Nigella sativa* under osmotic stress. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment* 6(1): 1 – 20.
8. Bench A., Fenner M., Edwards P. (1991). Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* L. Moench induced by water stress during grain filling. *New Phytol* 118: 339 – 347.
9. D'Antuono F. L., Moretti A., Lovato A. (2002). Seed yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Industrial crops and products* 15: 59 – 69.
10. Datta A.K., Saha A., Bhattacharya A., Mandal A., Paul R., Sengupta S. (2012). Black cumin (*Nigella sativa* L.) – A review. *Journal of Plant Development Sciences* 4(1): 1 – 43.
11. Dönmez A., Mutlu B. (2004). A new species of *Nigella* (*Ranunculaceae*) from Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 251 – 255.
12. Espanany A., Fallah S., Tadayyon A. (2016). Seed priming improves germination and reduces oxidative stress in black cumin (*Nigella sativa*) in persence of cadmium. *Industrial Crops and Products* 79: 195 – 204.
13. 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, doi: 10.1080/01904167.2017.1381719.
14. Forouzanfar F., Fazly Bazzaz B. S., Hosseinzadeh H. (2014). Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. *Iran J Basic Med Sci.* 17(12): 929 – 938.

15. Gahtyari N. C., Jaiswal J. P., Talha M., Choudhary R., Unaiyal M., Kumar N. (2017). Effect of osmotic stress and seed priming on wheat seed germination traits. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 6(4): 2799 – 2809.
16. Ghouzhdhi H.G. (2010). Indigenous knowledge in agriculture with particular reference to lack cumin (*Nigella sativa*) production in Iran. *Scientific Research and Essays* 5(25): 107 – 4109.
17. Grdinić V., Kremer D. (2009). Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Hrvatska ljekarnička komora, Zagreb.
18. Haq M.Z., Hossain M.M., Haque M. M., Das M.R., Huda M. S. (2015). Blossoming Characteristics in Black Cumin Genotypes in Relation Seed Yield Influenced by Sowing Time. *American Journal of Plant Sciences* 6: 1167 – 1183.
19. Heiss A.G., Kropf M., Sontag S., Weber A. (2011). Seed Morphology of *Nigella S. L. (Ranunculaceae)*: Identification, Diagnostic Traits, and Their Potential Phylogenetic Relevance. *International Journal of Plant Science* 172(2): 267 – 284.
20. Horvat D. (2017). Ukrasna vrijednost, urod i kakvoća sjemena vrste *Nigella damascena* L. i *Nigella sativa* L. u različitim uvjetima uzgoja, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
21. Hussain N., Abdul Majid S., Altaf Hussain M. A. (2014). Study of Some Agronomic Characteristics of *Nigella sativa* that validates its Yield Potential. *Online International Interdisciplinary Research Journal IV*: 111 – 124.
22. Kader M. A. (2005). A Comparison of Seed Germination Calculation Formulae and the Associated Interpretation of Resulting Data. *J. proc. R. Soc. N.S.W.* 138: pp. 65 – 75.
23. Kara N., Katar D., Baydar H. (2014). Yield and quality of black cumin (*Nigella sativa* L.) populations: The effect of ecological conditions, Suleyman Demirel University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Isparta, Turkey, Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Eskisehir, Turkey 20(1): 9 – 14.
24. Kaya M.D., Okçu G., Atak M., Çıkılı Y., Kolsarıcı Ö. (2006). Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy* 24(4): 291 – 295.
25. Ken-Ichi M., Jun-Ichi S. (2013). Effects of Seed Hydropriming on Germination and Seedling Vigor durin Emergence of Rice under Different Soil Moisture Conditions, *American Journal of Plant Sciences*, 04(08): 1584 – 1593. doi: 10.4236/ajps.2013.48191.
26. Kremer B.P. (2007). Ljekovito bilje: sigurno i lako prepoznavanje uz iscrpan opis i bogate ilustracije, prijevod Dean Blažanović, Begen d.o.o., Zagreb, 24.
27. Li H., Li X., Zhang D., Liu H., Guan K. (2013). Effect od drought stress on the seed germination and early seedling growth of the endemic desert plant *Eremosparton songoricum (Fabaceae)*. *EXCLI Journal* 12: 89 – 101.
28. Lutts S., Benincasa P., Wojtyla L., Kubala 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*. InTech (Ur. Araujo S., Balestrazzi A.) 1 – 46.

29. Majd Nassiry B., Mohammadi N. (2016). Drought stress osmo-priming effects on physiological and biochemical characteristics of *Ocimum basilicum*. *Journal of Advances in Agriculture* 6(1): 905 – 913.
30. Memar S., Nasirzadeh A. A. R. (2006). Effects of negative osmotic potential on germination and some characters of species of *Clover genus (Trifolium)*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 14(2): 55 – 60.
31. Michel B. E., Kaufmann M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000, *Plant Physiol* 51: 914 – 916.
32. Mollafilabi A., Rashed M. H., Moddi H., M. Kafi (2010). Effect of plant density and nitrogen on yield and yield components of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Acta Horticulturae* 853: 115 – 126.
33. Moradi A., Zadeh F.S., Afshari R.T., Amiri R.M. (2012). The effects of priming and drought stress treatments on some physiological characteristics of tall wheat grass (*Agropyron elangatum*) seeds, *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4(10): 596 – 603.
34. Naz H. (2011). *Nigella sativa*: the miraculous herb, *Pakistan Journal of Biochemistry & Molecular Biology* 44(1): 44 – 48.
35. Nikolić T. Ur. (2015): *Flora Croatica baza podataka* (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (pristupljeno:04.09.2018).
36. Padhye S., Banerjee S., Ahmad A., Mohammad R., Sarkar FH. (2008). From here to eternity - the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Therapy* 6: 495 – 510.
37. Rabbani M. A., Ghafoor A., Masood M.S. (2011). Narc – Kalonij: An early maturing and high yielding variety of *Nigella sativa* released for cultivation in Pakistan, *Pakistan Journal of Botany* 43:191 – 195.
38. Rana S., Singh P. P., Naruka I. S., Rathore S. S. (2012). Effect of nitrogen and phosphorus on growth, yield and quality of black cumin (*Nigella sativa* L.), *International Journal of Seed Spices* 2(2): 5 – 8.
39. Ranal M. A., Santana D. G., Ferreira W. R., Mendes-Rodrigues C. (2009). Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Braz J Bot* 32(4): 849 – 455.
40. Riaz M., Syed M., Chaudhary F.M. (1996), *Chemistry of the medical plants of the genus Nigella*, *Hamdard Medicus* 39: 40 – 45.
41. Riazi A.A.S., Sharifadeh F., Ahmadi A. (2008). Effect of osmo-priming on seed germination of forage millet. *Pajouhesh- Va- Sazandegi* 20(4): 72 – 82.
42. SAS Institute 2004. *SAS SAS/STAT® 9.1 User's Guide*. Cary, NC, USA.
43. Scott S. J., Jones R. A., Williams W. A. (1984). Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Sci.* 24: 1192 – 1199.
44. Shuid A.N., Mohamed N., Mohamed I.N., Othman F., Suhaimi F., Mohd Ramli E.S., Muhammad N., Soelaiman I.N. (2012). *Nigella sativa*: A Potential Antiosteoporotic Agent. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 696230 doi: 10.1155/2012/696230.
45. Špoljarević M., Mihaljević A., Štolfa I., Agić D., Vuković R., Lisjak M., Teklić T. (2014). Primjena polietilen glikola 6000 u istraživanju osmotskog stresa kod soje

(*Glycine max* (L.) Merr.), 15th Ružička days "Today science - tomorrow industry " (Ur. Šubarić, D., Jukić, A.), Osijek 314 – 351.

46. Tulukcu E. (2015). The effects of varying nitrogen doses on yield and some yield components of *Nigella sativa* L. Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences 29(2): 67 – 70.
47. Zohary M. (1983.) The genus *Nigella* (*Ranunculaceae*): a taxonomic revision, Plant Systematics Evolution 142: 71 – 107.

Izvori s web stranica

1. Catalogue of Life
<<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/7053338>>. Pristupljeno 03. 09. 2018.
2. Uniport, 2018 <<http://www.uniprot.org/taxonomy/555479>>. Pristupljeno 15. 03. 2018.

8. Životopis

Ana Trubelja rođena je 20. 05. 1994. u Zagrebu. U Zagrebu je završila osnovnu školu „Osnovna škola Sesvete“ i 2009/2010 upisuje Školu za medicinske sestre Mlinarska. Tijekom perioda srednje škole sudjelovala je u projektima E-medica, projektima povezivanja zdravstvenih (i partnerskih) škola korištenjem novih IK tehnologija. Srednjoškolsko obrazovanje završava 2012/2013 uz proglašenje učenice generacije. Iste akademske godine upisuje preddiplomski smjer Agroekologija na Agronomskom fakultetu Sveučilište u Zagrebu. Nakon završenog prvog stupnja sveučilišnog programa 2016/2017 upisuje diplomski studij pod nazivom Biljne znanosti na istoj instituciji.

Poznavanje i korištenje engleskog jezika: razumijevanje - B2 (slušanje i čitanje), govor - B1 (govorna interakcija i govorna produkcija), pisanje B1. Rad u Microsoft Office paketu.

Radovi:

1. Marina Vranić, Krešimir Bošnjak, Josip Leto, Ines Lisjak, Anja Novak, **Ana Trubelja**, Matea Županović (2016), Primjena stajskog gnoja na travnjacima, 42. Simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, str. 86-87