

## Wpływ nawozów i fungicydów na kiełkowanie nasion oraz początkową fazę rozwoju siewek olszy czarnej *Alnus glutinosa* (Gaertn.)

The impact of fertilisers and fungicides on seed germination and the initial phase of seedling growth in black alder *Alnus glutinosa* (Gaertn.)

Mateusz Będkowski\* , Włodzimierz Buraczyk 

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk Leśnych, Katedra Hodowli Lasu, ul. Nowoursynowska 159;  
02–776 Warszawa, Polska

\*Tel. +48 601099400, e-mail: mateusz\_bedkowski@sggw.edu.pl

**Abstract.** To test the influence of selected fertilisers and fungicides on the germination of black alder seeds and the initial phase of seedling growth, we conducted a laboratory experiment outlined in this paper. Six treatments were applied on petri dishes each containing 30 seeds. The substrate for germination was sterile filter paper wetted with an aqueous solution of either one of two fungicides, two organic fertilisers, a mineral fertiliser or distilled water (control). Fungicides and fertilisers were applied according to the manufacturers' recommendations. In order to keep genetic variability to a minimum, seeds originated from a single tree in a seed stand located in the Chotyłów Forest District, eastern Poland. Germination and growth took place at a temperature of  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  with a 14 h/10 h day/night cycle. Seeds began to germinate as early as the second day after sowing, except for the mineral fertiliser treatment, in which the first sprouting was observed on day 3. Seedling length was measured daily from the day of germination of a given seed through to day 15. Germination was found to proceed most rapidly in the control, while the largest increments in length and dry mass occurred in the control and fertiliser treatment with the so-called N1 fertiliser (solely comprising growth stimulators in the form of humic acids, chitosan and silicon). The most limited growth was observed under the influence of the F1 fungicide (active compound *Thiram*) as well as the organic fertiliser N2 (a mixture of mineral components and organic growth stimulators). Roots were found to develop most rapidly in the control and in the treatment with N1 (no mineral components). These are also the only two treatments in which the roots were longer than the stems after 15 days.

Fertiliser N2 was found to have the most unfavourable influence on both, germination and the first phase of seedling development. The fact that selected fertilizers and fungicides affected black alder seeds and seedlings under laboratory conditions does not mean that they will have an impact under field conditions or on other forest tree species. Therefore, this type of research will need to be conducted individually for each forest tree species.

**Keywords:** organic fertilisers, fungicides, germination, dynamics of seedling growth, dry mass of seedlings, *Alnus glutinosa*

**Słowa kluczowe:** bionawozy, fungicydy, kiełkowanie nasion, dynamika wzrostu sadzonek, sucha masa siewek, *Alnus glutinosa*

### 1. Wstęp

Większość gatunków leśnych wykazuje dużą wrażliwość na patogeny żyjące w środowisku glebowym, do których należy zaliczyć przede wszystkim grzyby zgorzelowe, masowo uśmiercające siewki od momentu rozpoczęcia procesu kiełkowania nasion do kilku pierwszych tygodni życia roślin. Jest to okres, gdy siewki korzystają tylko z substancji zapasowych zgromadzonych w tkankach nasion i nie występuje jeszcze symbioza z grzybami mykoryzowymi. W szkółkach leśnych do bezpośredniego zabezpieczenia przed zgorzelą

grzybową stosuje się zaprawianie nasion przed siewem oraz opryski siewek fungicydami. Stosowanie częstych oprysków pestycydami zabezpiecza siewki przed zgorzelami, ale niekorzystnie wpływa na glebę, potęgując tzw. efekt „zmęczenia gleby” (Prusinkiewicz et al. 1983).

Obecnie pojawiła się formalna bariera ograniczająca stosowanie substancji chemicznych w leśnictwie, w tym fungicydów w szkółkach leśnych. Do naturalnych substancji organicznych, hamujących zgorzel grzybową w szkółkach leśnych, należy zaliczyć wyciągi wodne z cebuli i czosnku, których przygotowanie we własnym zakresie

Wpłynęło: 28.05.2020 r., recenzowano: 2.07.2020 r., zaakceptowano: 15.07.2020 r.

jest pracochłonne i kłopotliwe. Wymusza to poszukiwanie nowych preparatów ograniczających rozwój patogenów nasion i siewek drzew leśnych. Wzorumując się na produkcji rolniczej, coraz częściej testuje się i produkuje różne biopreparaty lub inne substancje niebędące typowymi pestycydami do stymulacji wzrostu i zabezpieczania sadzonek przed patogenami grzybowymi. Na rynku pojawił się preparat, zawierający między innymi chitozan, który powstaje z chityny skorupiaków morskich w wyniku jej częściowej deacetylacji (Borkowski, Dyki 2004; Placek et al. 2009). Chitozan jest nietoksyczny, biokompatybilny, biodegradowalny i charakteryzuje go wysoka sorpcyjność (Raafat, Sahl 2009). Wpływ chitozanu na rozwój roślin ogrodniczych badano wielokrotnie (Wojdyła, Orlikowski 1997; Borkowski, Kowalczyk 1999; Placek et al. 2009, Borkowski, Uliński 2012), natomiast rzadko – na rozwój drzew leśnych, głównie w szkółkach leśnych (Duda et al. 2003; Stocka 2008; Aleksandrowicz-Trzecińska 2013). Brak jest takich badań nad olszą czarną *Alnus glutinosa* (Gaertn.), prowadzonych w warunkach laboratoryjnych. Wyniki analizy wpływu chitozanu wskazują, że zwiększa on odporność roślin na różne choroby grzybowe nalistne i glebowe (Wojdyła, Orlikowski 1997; Pięta et al. 1998; Solarska et al. 1998; Borkowski, Kowalczyk 1999; Pięta, Pastucha 2002; Ben-Shalom et al. 2003; Placek et al. 2009) oraz hamuje rozwój grzybów i bakterii (Borkowski, Dyki 2003).

Oprócz chitozanu w biopreparatach występują również kwasy humusowe. Są one specyficznymi, bezpostaciowymi substancjami, naturalnie występującymi w środowisku wodnym i lądowym. W glebie powstają wskutek procesu humifikacji, któremu podlega martwa materia organiczna (Dziadowiec 2003). Kwasy humusowe posiadają bezpośredni lub pośredni wpływ na rośliny uprawne. Wpływ pośredni dotyczy poprawy właściwości środowiska glebowego, natomiast bezpośredni związany jest z pobieraniem substancji huminowych przez rośliny i indukowaniem procesów biochemicznych (Katkat et al. 2009). Właściwości biostymulujące biopreparatów wynikają z obecności kwasów huminowych i fulwowych, chitozanu oraz krzemu (Gawrońska, Przybysz 2011).

W niniejszej pracy oceniono wpływ wybranych preparatów chemicznych na kiełkowanie nasion i rozwój siewek olszy czarnej w warunkach laboratoryjnych. Wybrano ten gatunek drzewa, gdyż ma on znaczenie gospodarcze w Polsce oraz ze względu na znaczne zagrożenie fytoftorą (chorobą powodowaną przez grzyby pierwotne z rodzaju *Phytophthora* spp.), która jest niezwykle groźna dla nasion i siewek olszy czarnej (Haque, Diez 2012), ale też i innych gatunków lasotwórczych (Oszako 2005).

## 2. Materiał i metody

Badania przeprowadzono w 2017 roku w laboratorium Katedry Hodowli Lasu Instytutu Nauk Leśnych SGGW w Warszawie. W eksperymencie wykorzystano nasiona zebrane w listopadzie 2014 r. w 100-letnim gospodarzynie

drzewostanie nasiennym (GDN) w Nadleśnictwie Chotyłów, w Leśnictwie Wólka Dobryńska (oddział 125i). Po zbiorze nasiona podszuszono do wilgotności 8–9% i do czasu wysiania przechowywano w szczelnie zamkniętym pojemniku w temperaturze -3°C. W celu wyeliminowania wpływu zmienności genetycznej, nasiona pochodziły z jednego drzewa i charakteryzowały się wysoką zdolnością kiełkowania.

Doświadczenie składało się z sześciu wariantów. Podłoża do kiełkowania nasion stanowiły sterylne bibuły, które były nawilżane podsiąkowo następującymi roztworami wodnymi:

- F1 – fungicyd 1 (zaprawa nasienna) z substancją czynną Tiuram 75% (związek z grupy ditiokarbaminianów) stosowany do ograniczania chorób powodowanych przez patogeny grzybowe bytujące w glebie i na okrywach nasion;
- F2 – fungicyd 2 z substancją czynną Tiofanat metylowy 41,7% (związek z grupy benzimidiazoli) stosowany do zaprawiania nasion i odkażania gleby;
- N1 – bionawóz (stymulator wzrostu) zawierający kwasy humusowe, chitozan i krzem, przeznaczony do nawożenia roślin oraz poprawy jakości gleby, zaś obecność chitozanu wpływa stymulująco na wzrost roślin (pęd i korzeń). Bionawóz nie zawiera mikro- i makroelementów;
- N2 – bionawóz zawierający mikroelementy takie jak: bor–1,7%, żelazo–0,4%, miedź–0,1%, cynk–0,1%, mangan–0,1% i kobalt–0,022% rozpuszczone w kwasach humusowych z chitozaniem, poprawia właściwości gleby, stymuluje wzrost roślin i dostarcza im składniki pokarmowe;
- N3 – wieloskładnikowy nawóz mineralny, zawierający mikro- i makroelementy takie jak: azot–3%, potas–2%, żelazo–400 mg/l, mangan–170 mg/l, cynk–150 mg/l, miedź–70 mg/l, molibden–20 mg/l oraz siarkę, wapń i magnez;
- K – wariant kontrolny stanowiła woda destylowana pozbawiona jakichkolwiek związków organicznych i mineralnych.

Roztwory wodne preparatów zostały przygotowane według zaleceń producentów. W poszczególnych wariantach na 0,5 litra wody destylowanej zastosowano następujące dawki preparatów: F1 – 1,5 g, F2 – 1 ml, N1 – 2 ml, N2 – 2 ml, N3 – 2 ml.

Przed siewem każde nasiono zostało zważone przy wykorzystaniu precyzyjnej wagi laboratoryjnej (Sartorius), co pozwoliło na wyselekcjonowanie nasion zdrowych i w pełni wykształconych. Kolejnym wyznacznikiem jakości nasion była ocena wzrokowa stanu nasion z użyciem szkła powiększającego. W trakcie kiełkowania siewki zaczęły zrzucać okrywy nasienne. Delikatnie je oddzielano od liścieni siewek i suszono przez 48 godzin w temperaturze 40°C. Na podstawie masy suchej okrywy nasiennej obliczano masę zarodka poszczególnych nasion.

Pęseta używana do układania nasion i wyjmowania siewek była dezynfekowana środkiem odkażającym na bazie spirytusu, zaś szalki i bibuły przed założeniem doświadczenia były wyparzone w wysokiej temperaturze. Woda destylowana użyta w doświadczeniu pochodziła z jednego źródła, a nasiona układane na bibułach nie były odkażane.

Wybrane losowo i zważone nasiona w liczbie po 30 w każdym wariacie umieszczano za pomocą pęsety na bibułach, którymi były owinięte szalki Petriego. Nasiona układano w wyznaczonych miejscach na okrągłej tarczy w odległości około 3 cm od wyznaczonego poziomu roztworu. Odległość między poszczególnymi nasionami ułożonymi na okręgu wynosiła 2 cm. Nasiona układano tak, żeby kielki korzeniowe kierowały się ku roztworowi (w kierunku obwodu szalki), zaś pędy rosły w kierunku centralnej części szalki. Takie ułożenie kiełkujących nasion ułatwiało pomiar długości siewek. Kiełkowanie nasion i wzrost siewek odbywały się w komorze vegetacyjnej w temperaturze 23°C (± 2°C) i przy 14-godzinnym sztucznym oświetleniu o natężeniu 20 000 lux i barwie światła 2000 K.

Pomiar każdej siewki prowadzono przez 15 kolejnych dni od momentu wykiełkowania nasiona na bibule. Codziennie wykonywano pomiary całkowitej długości siewek i uzupełniano roztwory wodne testowanych preparatów do poziomu wyznaczonego na szalkach. Po 15 dniach wzrostu siewki delikatnie zdjęto z bibuł, oddzielono część pędową od korzeniowej i wykonano pomiar długości pędów oraz korzeni. Następnie po suszeniu przez 48 godzin w temperaturze 40°C obie części każdej siewki zważono.

Ze względu na stabilność czynników warunkujących wzrost siewek w laboratorium, w analizach danych przyjęto, że w każdym wariacie powtórzeniem będą pojedyncze nasiona i siewki.

W programie Statgraphics Plus wykonano testy statystyczne ANOVA, sprawdzono istotność statystyczną poszczególnych parametrów siewek i wyznaczono grupy jednorodne za pomocą testu post hoc Duncana. Następnie utworzono grupy pochodzeń charakteryzujące się wielocechowym podobieństwem siewek na podstawie tempa kiełkowania nasion oraz parametrów siewek. W tym celu zastosowano grupowanie metodą Warda, a jako miarę podobieństwa wykorzystano kwadrat odległości Euklidesa (Jędrzejczak 1998).

### 3. Wyniki

#### 3.1. Parametry nasion

Średnio najlżejsze nasiona (1,75 mg) i zarodki nasion (0,75 mg) były w wariacie kontrolnym (K), a średnio najcięższe nasiona (1,98 mg) i zarodki nasion (0,89 mg) – w wariacie z bionawozem N2 z kwasami humusowymi i składnikami mineralnymi, jednak nie stwierdzono różnic statystycznych pomiędzy wariantami ( $p < 0,05$ ) (tab. 1).

#### 3.2. Przeżywalność nasion

W trzech wariantach doświadczenia (F2, N1 i N3) stwierdzono minimalny udział nasion nieskiełkowanych, a w dwóch (F1 i K) nasiona skiełkowały w 100%. W wariacie N2 nasiona skiełkowały również w 100%, lecz po kilku dniach pojawiła się pleśń, która spowodowała zamieranie większości siewek. Procent skiełkowanych nasion nie różnił się statystycznie pomiędzy wariantami (ryc. 1).

#### 3.3. Tempo kiełkowania nasion

Użyte preparaty miały istotny wpływ na tempo kiełkowania nasion olszy czarnej, które rozpoczęło się już drugiego dnia po wysiewie nasion. Kulminacja kiełkowania nastąpiła w trzecim dniu, kiedy większość nasion miała już widoczny kiełek. Wyjątkiem był wariant z nawozem mineralnym (N3), w którym nastąpiło przesunięcie czasowe tego procesu i nasiona zaczęły kiełkować w trzecim dniu, z kulminacją w czwartym dniu. Różnice między liczbą kiełkujących nasion w kolejnych dniach były istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) (ryc. 2).

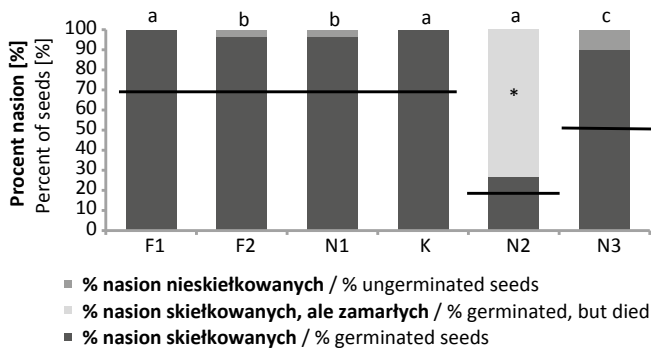
#### 3.4. Przebieg wzrostu siewek

Ze względu na szybkość rozwoju siewek w badaniu zaobserwowano trzy fazy przyrostu ich długości. Pierwsza faza

**Tabela 1. Masa nasion i zarodków użytych w doświadczeniu**

Table 1. Mass of seeds and embryos used in the experiment

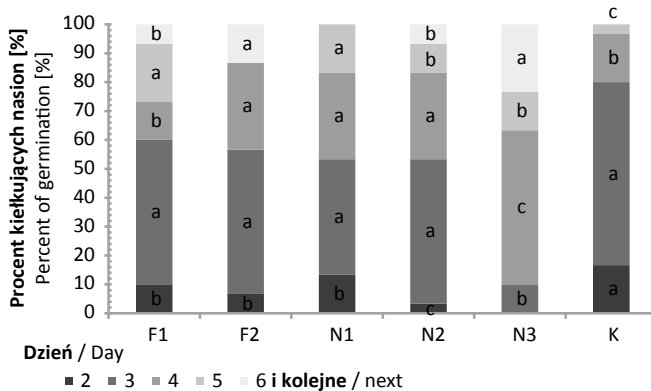
Wariant Variant	Liczba nasion [szt.] Number of seeds [pcs.]	Średnia masa nasion [mg] Average weight of seeds [mg]	Liczba zarodków [szt.] Number of embryos [pcs.]	Średnia masa zarodków [mg] Average weight of embryos [mg]
F1	30	1,96	30	0,85
F2	30	1,85	29	0,77
N1	30	1,91	29	0,84
N2	30	1,98	8	0,89
N3	30	1,97	30	0,86
K	30	1,75	26	0,75
p-value		0,0008		0,0020



**Rycina 1. Procent skielkowanych nasion potraktowanych fungycydami i bionawozami; liniami oznaczono grupy jednorodnie wariantów, w których nasiona skielkowały, a literami określono grupy wariantów, w których nasiona nie skielkowały**

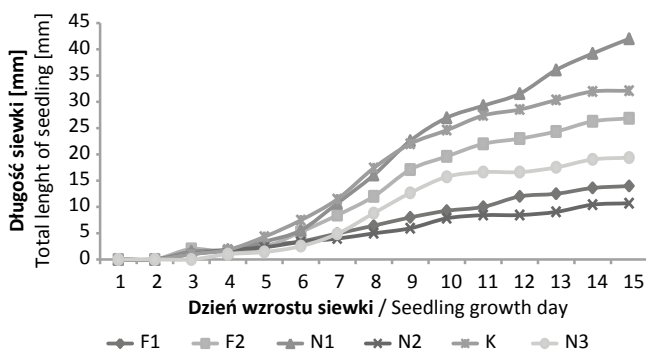
Figure 1. Germination of seeds treated with fungicides and biofertilisers the groups of homogeneous connections in which the seeds are selected are indicated by lines, and the letters indicate the groups of connections in which the seeds are not selected,

\* pojawienie się grzybów pleśniowych / the appearance of mold fungi



**Rycina 2. Udział kielkujących nasion w kolejnych dniach po wysiewie (2/3/4/5/6 i kolejne); literami określono jednorodnie statystycznie grupy wariantów, w kolejnych dniach kielkowania nasion**

Figure 2. Share of seeds germinating after sowing on days 2, 3, 4, 5, 6 and next; letters indicate statistically homogeneous groups of variants in the following days of seed germination



**Rycina 3. Przebieg przyrostu całkowitej długości siewek olszy czarnej**

Figure 3. Course of the increase in total length of black alder seedlings

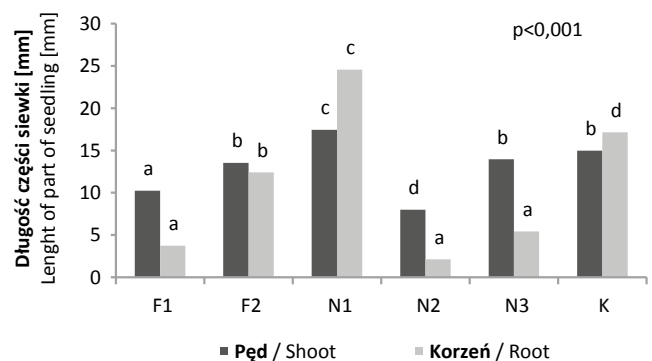
przyrostu (kiełkowanie nasion) trwała od założenia doświadczenia do czwartego dnia. Druga, najdłuższa faza wzrostu, trwająca od piątego do trzynastego dnia doświadczenia, charakteryzowała się dużym różnicowaniem całkowitej długości siewek, w zależności od wariantu doświadczalnego. W trzeciej fazie nastąpiło zahamowanie przyrostu siewek. Wyjątkiem był wariant N1 z biostymulatorem, który zawierał kwasy humusowe z chitozanem, bez obecności składników mineralnych, w którym siewki dalej zwiększały wymiary (ryc. 3). Siewki w wariacie kontrolnym (woda destylowana) były o wiele większe niż w wariantach N2 i N3z nawozami zawierającymi składniki mineralne, o właściwościach stymulujących wzrost roślin.

### 3.5. Długość siewek

Po 15 dniach najdłuższe pędy (17 mm) miały siewki w wariacie N1, a najkrótsze (8 mm) w wariacie N2. Długość pędów siewek w trzech wariantach (F2, N3 i K) była jednorodna, a długość pędu wahała się między 14 a 15 mm. Różnice między średnimi długościami pędów we wszystkich wariantach doświadczenia były istotne statystycznie. Najkrótsze korzenie (4 mm) miały siewki rosnące w wariacie z bionawozem (N2), a najdłuższe (25 mm) te potraktowane biostymulatorem (N1). Warianty F1, N2 i N3 tworzyły grupę jednorodną, w której długości korzeni nie różniły się statystycznie między sobą. Natomiast różnice między wszystkimi średnimi długościami korzeni były istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ) (ryc. 4).

### 3.6. Sucha masa siewek

Najcięższe pędy (1,1 mg) miały siewki potraktowane nawozem (N3), a najlżejsze (0,65 mg) były w wariacie z bionawozem (N2). Warianty z fungycydami oraz z bionawozem (N2) tworzyły grupę jednorodną, gdzie średnie wartości nie różniły się statystycznie między sobą (ryc. 5).

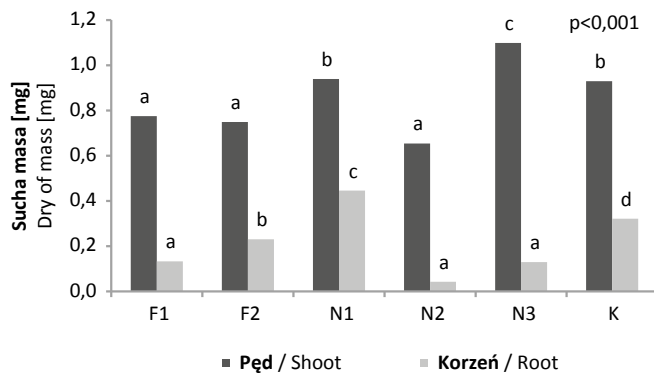


**Rycina 4. Długość siewek po 15 dniach od wykiełkowania z podziałem na pęd i korzeń; literami określono jednorodnie statystycznie grupy wariantów oddzielnie dla pędów i korzeni**

Figure 4. Length of seedlings as divided into shoot and root 15 days on from germination; letters indicate statistically homogeneous groups of variants separately for shoots and roots

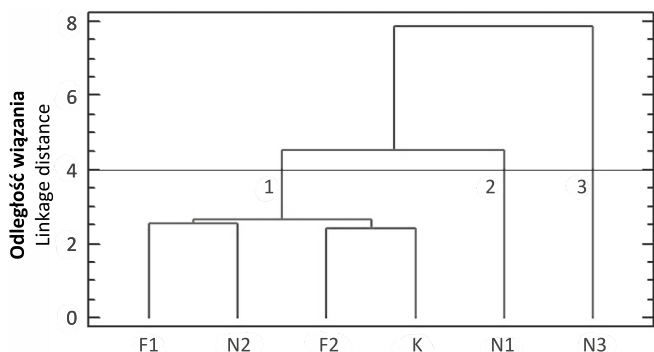
Kolejną grupę jednorodną tworzyły warianty z bionawozem (N1) oraz z wodą destylowaną (K). Natomiast różnice między wszystkimi wariantami były istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ). Z kolei najcięższe korzenie (0,45 mg) miały siewki potraktowane bionawozem (N1), a najlżejsze (0,06 mg) w wariantcie z bionawozem (N2). Grupę jednorodną z najlżejszymi korzeniami tworzyły siewki z wariantów: F1, N2 i N3. Pomiędzy wszystkimi średnimi różnice były tak samo istotne statystycznie jak w przypadku masy pędu ( $p < 0,001$ ).

Analiza skupień wykonana na podstawie tempa kiełkowania nasion oraz parametrów siewek pozwoliła wyróżnić 3 grupy wariantów (ryc. 6). Pierwsza grupa, składająca się z 4 wariantów: fungicydy (F1, F2), biostymulator (N2) i woda destylowana (K), charakteryzowała się szybko kiełkującymi nasionami, ale siewki miały niskie parametry pędu. Korzenie siewek w tej grupie były przeciętnej długości i miały przeciętną masę. Biostymulator (N1) różnił się od pozostałych tym, że nasiona kiełkowały słabiej niż w grupie 1, lecz siewki miały dłuższe i cięższe pędy. Korzenie tych siewek



**Rycina 5. Sucha masa pędów i korzeni siewek po 15 dniach od ich wykiełkowania; literami określono jednorodne statystycznie grupy wariantów oddzielnie dla pędów i korzeni**

Figure 5. Dry weight of seedling shoots and roots 15 days on from germination letters indicate statistically homogeneous groups of variants separately for shoots and roots



**Rycina 6. Grupowanie (1–3) wariantów na podstawie szybkości kiełkowania nasion oraz parametrów siewek**

Figure 6. Clustering (1–3) of variants based on seed germination rate and seedling parameters

były przeciętnej długości, ale miały największą suchą masę spośród pozostałych wariantów. Nawóz wieloskładnikowy (N3) wpłynął negatywnie na tempo kiełkowania nasion, pędy miały przeciętną długość, ale były najcięższe w stosunku do pozostałych grup. Z kolei korzenie były najkrótsze i najlżejsze.

## 4. Dyskusja

Aby ograniczyć wpływ zróżnicowania genetycznego poszczególnych nasion na wzrost siewek, do badań wybrano materiał siewny pochodzący z jednego drzewa. Jest to zgodne z badaniami Bodyła (2007), który wykazał istotność różnic pod względem energii i zdolności kiełkowania nasion pochodzących z różnych krain przyrodniczo-leśnych Polski. O dużym zróżnicowaniu właściwości nasion pochodzących z różnych drzew i będących w różnym wieku donoszą też Kaliniewicz i Trojanowski (2011).

Tylkowski (2014) w swoich badaniach wykazał, że przechowywanie przez 6 zim nasion olszy czarnej podsuchzonych do 8–9% nie wpłynęło na obniżenie ich początkowej zdolności kiełkowania. Nasiona użyte w doświadczeniu również były przechowywane w tych warunkach, lecz krócej, bo tylko przez 3 lata. Także ten czynnik nie powinien mieć negatywnego wpływu na proces kiełkowania nasion olszy czarnej. Z kolei Gosling i in. (2009) zauważyli, że nasiona olszy czarnej chłodzone w temperaturze +4°C przez 3 tygodnie wykazują: wcześniejsze kiełkowanie, bardziej równomierne wschody i tolerancję na szerszy zakres temperatur (10–30°C) w trakcie kiełkowania nasion. W tej pracy również zauważono brak negatywnego wpływu chłodzenia nasion przechowywanych przez 3 lata na ich właściwości. W większości wariantów ponad połowa nasion (w kontroli nawet 80% nasion) skiełkowała do trzeciego dnia doświadczenia. Wyjątkiem był wariant N3 (wieloskładnikowy nawóz mineralny), w którym proces kiełkowania był wydłużony o 1 dzień. Kaliniewicz i in. (2018) stwierdzili, że na proces kiełkowania nasion olszy czarnej istotny wpływ ma ich masa. Jednak należy pamiętać, że średnia masa nasion użytych w doświadczeniu nie różniła się statystycznie między poszczególnymi wariantami. Dodatkowo warunki panujące w trakcie przechowywania i kiełkowania nasion oraz wzrostu siewek były jednakowe, więc czynniki te nie wpłynęły na zróżnicowanie procesu kiełkowania.

Badania wykazały, że roztwory wodne zastosowanych fungicydów i nawozów spowolniły proces kiełkowania nasion olszy czarnej, ale nie obniżyły zdolności kiełkowania. Zamorski i Mileczarek (1977) stwierdzili, że środki grzybobójcze mają różny wpływ (negatywny lub pozytywny) na kiełkowanie nasion roślin ozdobnych i wykazali, że fungicyd ze środkiem czynnym tiuram w stężeniu 75% miał korzystny wpływ na kiełkowanie. Zauważono podobny wpływ na kiełkowanie nasion olszy, które w wariantcie z fungicydem F1 zawierającym tiuram skiełkowały w stu procentach.

W składzie wykorzystanego w doświadczeniu bionawozu (N1) znajdują się kwasy humusowe, które mogły bezpośrednio przyczynić się do silnego wzrostu korzeni siewek olszy. Stymulujący wpływ związków huminowych na wzrost roślin wykazali Jankiewicz (1997) oraz Katkat i in. (2009), natomiast Schnitzer i Poapst (1991) odnotowali, że związki te pobudzają wzrost korzeni fasoli. Znany jest także wpływ kwasów huminowych i fulwowych na wzrost zielonej masy roślin uprawnych, nawet o 28% więcej w stosunku do kontroli (Sarir et al. 2005). Pozytywne działanie kwasów huminowych na wzrost roślin (winogron deserowych) znajduje również potwierdzenie w pracy Ferrary i in. (2007) oraz w badaniach Xu (1986). Kwasy huminowe ograniczają także niektóre choroby powodowane przez *Fusarium* spp. (Yigit, Dikilitas 2008).

W prezentowanym doświadczeniu stwierdzono, że w porównaniu do wariantu kontrolnego preparaty zawierające kwasy humusowe oraz chitozan wpłynęły pozytywnie na kiełkowanie nasion, a także na wymiary i suchą masę korzeni. Natomiast w wariantcie z bionawozem N2, o bogatym składzie, w którym występują kwasy humusowe, chitozan i składniki mineralne (mikro- i makroelementy), wymiary i sucha masa, zarówno korzeni, jak i pędów, były najniższe. W literaturze można znaleźć informację, że mimo tego, że olsza czarna jest jednym z mniej wymagających gatunków rodzimych, to reaguje dobrze na nawożenie mineralne, szczególnie fosforem i potasem, ale jest wrażliwa na niedobór wapnia (Baule, Fricker 1973). Dlatego ewentualny niedobór tego pierwiastka mógł być jedną z przyczyn uzyskania najgorszych parametrów przez siewki. Zasobny w składniki pokarmowe skład roztworu wodnego w wariantcie N2 mógł też stymulować rozwój mikroorganizmów pleśniowych, które osłabiły i uśmierciły część siewek.

W wariantcie N2 chitozan oraz kwasy humusowe, współdziałając z mikroelementami, nie wykazały silnego działania grzybobójczego – bowiem nie ograniczyły rozwoju grzybów pleśniowych. Natomiast w wariantcie N1, gdzie również zastosowano te substancje, nie doszło do pojawienia się grzybów pleśniowych, a odsetek martwych siewek był zerowy. Oba warianty (N1 i N2) różniły się tym, że biostymulator (N1) nie miał w składzie składników mineralnych, a bionawóz (N2) zawierał mikroelementy. Obecność składników mineralnych raczej nie powinna być główną przyczyną pojawu grzybów pleśniowych, gdyż tylko w wariantcie z wieloskładnikowym nawozem mineralnym (N3) siewki rozwijały się prawidłowo, bez oznak pleśni. Przy zastosowanych sposobach zachowania sterylności, opisanych w metodyce badań, należy podkreślić, że obecność grzybów pleśniowych stwierdzono tylko w jednym wariantcie doświadczenia.

Zamorski i Milczarek (1977) zauważyli, że każdy gatunek rośliny ma różną biologię i trzeba do niego podchodzić indywidualnie. Fakt, że wybrane nawozy i fungicydy tak wpłynęły na nasiona i siewki olszy czarnej w warunkach

laboratoryjnych nie oznacza, że wpływ ten będzie podobny w warunkach terenowych, gdzie wieloczynnikowe oddziaływanie środowiska i pogody może w jeszcze większym stopniu zmodyfikować wyniki podobnych doświadczeń. Także inne gatunki drzew leśnych, np. sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* L. czy buk *Fagus sylvatica* L., mogą wykazać odmienną reakcję na badane fungicydy i bionawozy. Szołtyk i Walendzik (2003) stwierdzili, że rośliny leśne mają mniejsze wymagania pokarmowe niż rośliny rolnicze, ale charakteryzują się bardziej zróżnicowaną indywidualną reakcją na poszczególne składniki pokarmowe. Potwierdza to konieczność prowadzenia osobnych badań dla poszczególnych gatunków drzew leśnych.

Wyniki uzyskane w badaniu laboratoryjnym jednoznacznie wskazują, że użycie biostymulatora (wariant N1), który zawiera kwasy humusowe, pozytywnie wpływał na wzrost pędu i korzeni olszy czarnej w początkowej fazie wzrostu. Korzenie siewek wykształcone przy działaniu tego biostymulatora były najdłuższe i najcięższe, co świadczy o tym, że w krótkim czasie (zaledwie 15 dni) siewki tworzyły dość rozbudowane systemy korzeniowe, dzięki którym będą mogły pobierać więcej wody i substancji pokarmowych z gleby. Informacja ta jest istotna w szkółkarstwie leśnym, którego zadaniem jest produkcja materiału sadzeniowego o dobrej jakości hodowlanej. Rozbudowany na starcie system korzeniowy jest podstawowym gwarantem prawidłowego wzrostu sadzonek, ale też wysokiej udatności upraw leśnych. Chemiczna stymulacja wzrostu i prawidłowego rozwoju siewek ma szczególne znaczenie w produkcji materiału sadzeniowego z zakrytym systemem korzeniowym w szkółkach kontenerowych.

## 5. Wnioski

1. Fungicydy pozytywnie wpłynęły na tempo kiełkowania nasion, ale bez pozytywnego wpływu na parametry wzrostowe siewek.

2. Wpływ bionawozów opartych na chitozanie i kwasach humusowych na siewki olszy czarnej był zależny od udziału komponentów mineralnych. Bionawóz zawierający mikroelementy wyraźnie osłabił wzrost siewek, a szczególnie ich części korzeniowej oraz stymulował rozwój grzybów pleśniowych.

3. Nawóz mineralny bez żadnych bioskładników sprawił, że siewki miały mocno ukształtowane pędy i liścienie, przez co sucha masa pędu była najwyższa, ale przy małej masie części korzeniowej.

4. Dalsze badania należy skoncentrować na poszukiwaniu skutecznych mieszanek wieloskładnikowych z udziałem biostymulatorów, nadających się do zastosowania głównie w produkcji sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym.

## Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

## Źródło finansowania badań

Badania sfinansowano ze środków własnych autorów.

## Literatura

- Aleksandrowicz-Trzcńska M., Hamera-Dzierzanowska A., Żybu-  
ra H., Drozdowski S. 2013. Wpływ mykoryzacji i chitozanu  
na wzrost sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w szkół-  
ce i na uprawie. *Sylwan* 157(12): 899–908. DOI 10.26202/  
sylwan.2012071.
- Baule H., Fricker C. 1973. Nawożenie drzew leśnych. Wydanie  
II. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa,  
314 s.
- Ben-Shalom N., Ardi R., Pento R., Arkil C., Fallik E. 2003. Control-  
ling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants  
by means of chitosan. *Crop Protection* 22(2): 285–290. DOI  
10.1016/S0261-2194(02)00149-7.
- Borkowski J., Kowalczyk W. 1999. Influence of tytanit and chito-  
san sprays and other treatments on the tomato plant growth and  
the development of powdery mildew (*Oidium lycopersicum*).  
*Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological Sciences*  
47(2–4): 129–132.
- Borkowski J., Dyki B. 2003. Wpływ chitozanu i tytanitu i innych  
preparatów na ograniczenie rozwoju mączniaka prawdziwego  
na pomidorach w szklarni. *Folia Horticulturae* 1: 559–561.
- Borkowski J., Dyki B. 2004. Kilka uwag o chitozanie. *Wiadomości  
Botaniczne* 48(1/2): 66–67.
- Borkowski J., Uliński Z. 2012. Wpływ odpadów z pieczarek i chito-  
zanu na plon i zdrowotność pomidorów uprawianych w szklarni.  
*Nowości Warzywnicze* 54–55: 45–51.
- Bodył M. 2007. Masa oraz żywotność nasion olszy czarnej (*Alnus  
glutinosa* Gaertn.) na terenie Polski w latach 1995–2004. *Syl-  
wan* 5: 17–22. DOI 10.26202/sylwan.2006028.
- Buraczyk W. 2010. Właściwości nasiona a cechy morfologiczne sie-  
wek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Leśne Prace Ba-  
dawcze* 71(1): 13–20. DOI 10.2478/v10111-009-0044-8.
- Duda B., Oszako T., Piwnicki J. 2003. Possibilities of chitosan use  
in forestry. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biologi-  
cal Sciences* 51(3): 213–220.
- Dziadowiec H. 2003. Wybrane problemy badań próchnicy gleb  
leśnych, w: Dębska B., Gonet S.S. Substancje humusowe  
w glebach i nawozach. Polskie Towarzystwo Substancji Humu-  
sowych, Wrocław, 141–166. ISBN 8390640384.
- Ferrara G., Pacifico A., Simone P., Ferrara E. 2007. Preliminary  
study on the effects of foliar applications of humic acids on 'Ita-  
lia' table grape. *Journal International des Sciences de la Vigne  
et du Vin* 42(2): 87–79. DOI 10.20870/oeno-one.2008.42.2.822.
- Gawrońska H., Przybysz A. 2011. Biostymulatory: mechanizmy  
zastosowania i przykłady zastosowań, w: Targi Sadownictwa i  
Warzywnictwa. Materiały konferencyjne, 5–6 stycznia 2011  
(red. M. Sroczyński, J. Miecznik). TSW, Warszawa, 7–13. ISBN  
978-83-929987-7-8.
- Gosling P., McCartan S., Peace A. 2009. Seed dormancy and ger-  
mination characteristics of common alder (*Alnus glutinosa* L.)  
indicate some potential to adapt to climate change in Britain.  
*Forestry* 82(5): 573–582. DOI 10.1093/forestry/cpp024.
- Haque M.M., Diez J.J. 2012. Susceptibility of common alder (*Alnus  
glutinosa*) seeds and seedlings to *Phytophthora alni* and other *Phytophthora* species. *For-  
est Systems* 21(2): 313–322. DOI 10.5424/fs/2012212-02267.
- Jankiewicz L. 1997. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwo-  
ści i działanie. PWN, Warszawa, 281 s. ISBN 83-01-12141-6.
- Jędrzejczak E. 1998. Zastosowanie metody analizy skupień w po-  
równawczych badaniach wpływu czynników na różne cechy  
roślin. *Postępy Nauk Rolniczych* 45(4): 67–75.
- Kaliniewicz Z., Trojanowski A. 2011. Analiza zmienności i korela-  
cji wybranych cech fizycznych nasion olszy czarnej. *Inżynieria  
Rolnicza* 8(133): 167–171.
- Kaliniewicz Z., Markowski P., Anders A., Jadwisieńczyk B., Po-  
znański A. 2018. Correlations between Germination Capacity  
and Selected Properties of black alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.)  
Achenes. *Baltic Forestry* 24(1): 68–76.
- Katkat A.V., Celik H., Turan M.A., Asik B. 2009. Effects of soil  
and foliar applications of humic substances on dry weight and  
mineral nutrients uptake of wheat under calcareous soil condi-  
tions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2):  
1266–1273.
- Oszako T. 2005. Zagrożenie szkółek i drzewostanów, ze szczegól-  
nym uwzględnieniem olszy przez gatunki rodzaju *Phytophtho-  
ra*. *Sylwan* 149(6): 55–61. DOI 10.26202/sylwan.9200501.
- Pięta D., Pastucha A., Patkowska E. 1998. Wpływ chitozanu na  
grzyby chorobotwórcze przeżywające w glebie. *Zeszyty Nauko-  
we Akademii Rolniczej w Krakowie* 333: 825–828.
- Pięta D., Pastucha A. 2002. Efektywność ochronnego działania chi-  
tozanu w ograniczaniu chorób grzybowych soi. *Acta Scientia-  
rum Polonorum, Hortorum Cultus* 1(1): 31–43.
- Placek M., Dobrowolska A., Wraga K., Zawadzińska K., Żurawik P.  
2009. Wykorzystanie chitozanu w uprawie, przechowywaniu  
i ochronie roślin ogrodniczych. *Postępy Nauk Rolniczych* 3–4:  
101–110.
- Prusinkiewicz Z., Kowalkowski A., Królikowski L. 1983. Ochro-  
na i rekultywacja gleb leśnych. *Roczniki Gleboznawcze* 34(3):  
185–201.
- Raafat D., Sahl H.-G. 2009. Chitosan and its antimicrobial poten-  
tial – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology* 2(2):  
186–201. DOI 10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x.
- Sarir M.S., Sharif M., Ahmed Z., Akhlaq M. 2005. Influence of dif-  
ferent levels of humic acid application by various methods on  
the field and field components of maize. *Sarhad Journal of Agri-  
culture* 21(1): 75–81.
- Schnitzer M., Poapst P.A. 1991. Effect of soil humic compound on  
root initiation. *Nature* 213: 598–599. DOI 10.1038/213598a0.
- Solarska S., Struszczyk H., Pospieszny H. 1998. Chitosan in the  
control of *Pseudoperonospora humulion* hops. Biological  
agents and their effectiveness in the control of plant patho-  
gens. IX Conference of the section for biological control  
of plant diseases of the Polish Phythopathological Society,  
Skierniewice, 183–185.
- Stocka T. 2008. Biologiczne metody ochrony przed chorobami grzy-  
bowymi w szkółkach leśnych. *Postępy Techniki w Leśnictwie*  
104: 28–38.
- Szołtyk G., Walendzik R. 2003. Nawozy wieloskładnikowe – nowe  
możliwości dla leśnictwa. Notatnik Naukowy 5(59)/2003/XI.  
Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa.
- Tylkowski T. 2014. Wpływ luszczenia i czasu przechowywania na-  
sion olszy czarnej (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertner) na kiełkowa-  
nie, wschody i wzrost siewek. *Sylwan* 158(11): 821–828. DOI  
10.26202/sylwan.2014031.

- Wojdyła A.T., Orlikowski L.B. 1997. Chitozan w zwalczaniu grzybów odglebowych i nalistnych. *Progress Plant Protection* 37(1): 301–305.
- Xu X. 1986. The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and field in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 37: 343–350. DOI 10.1071/AR9860343.
- Yigit F., Dikilitas M. 2008. Effect of humic acid applications on the root-rot diseases caused by *Fusarium* spp. on tomato plants. *Plant Pathology Journal* 7(2): 179–182. DOI 10.3923/ppj.2008.179.182.

- Zamorski Cz., Milczarek K. 1977. Wpływ zapraw na kiełkowanie nasion roślin ozdobnych. *Acta Agrobotanica* 30(2): 335–340. DOI 10.5586/aa.1977.025.

### **Wkład autorów**

- M.B. – koncepcja pracy, analiza statystyczna, przygotowanie rycin i tabel, przegląd literatury, napisanie pracy,  
W.B. – konsultacja naukowa, analiza statystyczna, korekta pracy.

## The impact of fertilisers and fungicides on seed germination and the initial phase of seedling growth in black alder *Alnus glutinosa* (Gaertn.)

Mateusz Będkowski\* , Włodzimierz Buraczyk 

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk Leśnych, Katedra Hodowli Lasu, ul. Nowoursynowska  
159; 02–776 Warszawa, Polska

\*Tel. +48 601099400, e-mail: mateusz\_bedkowski@sggw.edu.pl

**Abstract.** To test the influence of selected fertilisers and fungicides on the germination of black alder seeds and the initial phase of seedling growth, we conducted a laboratory experiment outlined in this paper. Six treatments were applied on petri dishes each containing 30 seeds. The substrate for germination was sterile filter paper wetted with an aqueous solution of either one of two fungicides, two organic fertilisers, a mineral fertiliser or distilled water (control). Fungicides and fertilisers were applied according to the manufacturers' recommendations. In order to keep genetic variability to a minimum, seeds originated from a single tree in a seed stand located in the Chotyłów Forest District, eastern Poland. Germination and growth took place at a temperature of  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  with a 14 h/10 h day/night cycle. Seeds began to germinate as early as the second day after sowing, except for the mineral fertiliser treatment, in which the first sprouting was observed on day 3. Seedling length was measured daily from the day of germination of a given seed through to day 15. Germination was found to proceed most rapidly in the control, while the largest increments in length and dry mass occurred in the control and fertiliser treatment with the so-called N1 fertiliser (solely comprising growth stimulators in the form of humic acids, chitosan and silicon). The most limited growth was observed under the influence of the F1 fungicide (active compound Thiram) as well as the organic fertiliser N2 (a mixture of mineral components and organic growth stimulators). Roots were found to develop most rapidly in the control and in the treatment with N1 (no mineral components).

These are also the only two treatments in which the roots were longer than the stems after 15 days.

Fertiliser N2 was found to have the most unfavourable influence on both, germination and the first phase of seedling development. The fact that selected fertilizers and fungicides affected black alder seeds and seedlings under laboratory conditions does not mean that they will have an impact under field conditions or on other forest tree species. Therefore, this type of research will need to be conducted individually for each forest tree species.

**Keywords:** organic fertilisers, fungicides, germination, dynamics of seedling growth, dry mass of seedlings, *Alnus glutinosa*

### 1. Introduction

The majority of forest species are highly sensitive to pathogens living in the soil environment, which include mainly fungi that massively kill seedlings from the start of seed germination until the first few weeks of plant life. This is a period when seedlings use only the reserves accumulated in seed tissues and there is no symbiosis with mycorrhizal fungi yet. In forest nurseries, for direct protection against damping off, seedlings are treated before sowing, and seedlings are sprayed with fungicides. The use of frequent

spraying of pesticides protects the seedlings from damping off but has a negative effect on the soil, increasing the 'soil fatigue' effect. (Prusinkiewicz et al. 1983).

A formal barrier to the use of chemicals in forestry, including fungicides in forest nurseries, has now emerged. The natural organic substances inhibiting fungal damping off in forest nurseries include aqueous extracts from onion and garlic, which are laborious and troublesome to prepare on their own. This has forced a search for new preparations limiting the development of pathogens of forest seeds and seedlings. Based on agricultural production, various organic prepara-

Received: 28.05.2020 r., accepted after revision: 15.07.2020 r.

tions or other substances that are not typical pesticides are increasingly being tested and produced to stimulate growth and protect seedlings against fungal pathogens. A preparation containing, among other things, chitosan has appeared on the market, which is formed from marine crustacean chitin as a result of its partial deacetylation (Borkowski, Dyki 2004; Piek et al. 2009). Chitosan is non-toxic, biocompatible, biodegradable and has high sorption (Raafat, Sahl 2009). The influence of chitosan on the development of horticultural plants has been studied many times (Wojdyła, Orlikowski 1997; Borkowski, Kowalczyk 1999; Placek et al. 2009, Borkowski, Uliński 2012), but rarely in relation to the development of forest trees, mainly in forest nurseries (Duda et al. 2003; Stocka 2008; Aleksandrowicz-Trzczińska 2013). There are no such studies on black alder *Alnus glutinosa* (Gaertn.) conducted under laboratory conditions. The results of the analysis of the effect of chitosan indicate that it increases the resistance of plants to various foliar and soil fungal diseases (Wojdyła, Orlikowski 1997; Pięta et al. 1998; Solarska et al. 1998; Borkowski, Kowalczyk 1999; Pięta, Pastucha 2002; Ben-Shalom et al. 2003; Piek et al. 2009) and inhibits the development of fungi and bacteria (Borkowski, Dyki 2003).

In addition to chitosan, humic acids are also present in organic preparations. These are specific, amorphous substances, naturally occurring in aquatic and terrestrial environments. They are formed in the soil by the humification process, to which dead organic matter is subjected (Grandfather 2003). Humic acids have a direct or indirect effect on cultivated plants. The indirect influence is related to the improvement of the soil environment, whereas the direct influence is related to the uptake of humic substances by plants and the induction of biochemical processes (Katkat et al. 2009). The biostimulating properties of organic preparations result from the presence of humic and fulvic acids, chitosan and silicon (Gawrońska, Przybysz 2011).

This paper presents an assessment of the influence of selected chemical preparations on seed germination and the development of black alder seedlings under laboratory conditions. This tree species was selected because it is of economic importance in Poland and due to the significant threat of phytophthorosis (a disease caused by *Phytophthora* spp. fungi), which is extremely dangerous to the seeds and seedlings of black alder (Haque, Diez 2012), but also to other forest-forming species (Oszako 2005).

## 2. Materials and methods

The research was conducted in 2017 in the laboratory of the Department of Silviculture, Institute of Forest Sciences at the Warsaw University of Life Sciences. The experiment used seeds collected in November 2014 from a 100-year-old commercial seed stand in the Chotyłów Forest District, in the

Wólka Dobryńska Forest Unit (division 125i). After harvesting, the seeds were dried to 8–9% humidity and stored in a tightly closed container at -3°C until sowing. In order to eliminate the influence of genetic variability, the seeds came from one tree and were characterised by high germination capacity.

The experiment consisted of six variants. The seed germination substrate was sterile filter paper, which was moistened with the following aqueous solutions:

- F1 – fungicide 1 (seed treatment) with 75% Thiram as the active substance (a compound from the dithiocarbamate group) used to reduce diseases caused by fungal pathogens in soil and seed coverings;
- F2 – fungicide 2 with 41.7% thiophanate-methyl as the active substance (compound from the benzimidazole group) used for seed treatment and soil decontamination;
- N1 – organic fertiliser (growth stimulator) containing humic acids, chitosan and silicon, intended for fertilising plants and improving soil quality, while the presence of chitosan stimulates plant growth (shoot and root). This organic fertiliser does not contain micro- and macro-elements;
- N2 – organic fertiliser with microelements such as: boron – 1.7%, iron – 0.4%, copper – 0.1%, zinc – 0.1%, manganese – 0.1% and cobalt – 0.022% dissolved in humic acids with chitosan, improves soil properties, stimulates plant growth and provides them with nutrients;
- N3 – multi component mineral fertiliser, containing micro- and macro-elements such as: nitrogen – 3%, potassium – 2%, iron – 400 mg/l., manganese – 170 mg/l., zinc – 150 mg/l., copper – 70 mg/l., molybdenum – 20 mg/l. and sulphur, calcium and magnesium;
- K – control, consisting of distilled water free of any organic or mineral compounds.

The aqueous solutions of the treatments were prepared according to manufacturers' recommendations. The following doses of the preparations for the individual variants were used with 0.5 litres of distilled water: F1 – 1.5 g, F2 – 1 ml, N1 – 2 ml, N2 – 2 ml, N3 – 2 ml.

Before sowing, each seed was weighed using a precision laboratory scale (Sartorius), which allowed healthy and fully developed seeds to be selected. Another indicator of seed quality was the visual assessment of seed condition using a magnifying glass. During germination, the seedlings started to shed their seed coats. These were gently separated from the seedling cotyledons and dried for 48 h at 40°C. The embryo mass of individual seeds was calculated on the basis of the dry mass of the seed coats.

The tweezers used for seedling placement and seedling removal were disinfected with alcohol-based disinfectant, while the scales and filterpaper were scalded at a high temperature before setting up the experiment. The distilled water used in the experiment came from one source, and the seeds placed on the filter paper were not disinfected.

Thirty randomly selected and weighed seeds in each variant were placed with tweezers on the filter paper, which were wrapped around Petri dishes. The seeds were placed in designated locations on the round disc at a distance of about 3 cm from the level of the designated solution. The distance between individual seeds placed on the disc was 2 cm. The seeds were arranged in such a way that the root sprouts were directed towards the solution (towards the perimeter of the dish) and the shoots grew towards the central part of the dish. This arrangement of germinating seeds made it easier to measure seedling length. Seed germination and seedling growth took place in a vegetation chamber at a temperature of 23°C ( $\pm$  2°C) and with 14h of artificial lighting at an intensity of 20,000 lux and 2,000 K light colour.

Each seedling was measured for 15 consecutive days after the seed germinated on the filter paper. Each day, the total length of the seedlings was measured and the aqueous solutions of the tested preparations were filled to keep them at the level indicated on the dishes. After 15 days of growth, the seedlings were gently removed from the paper, the shoot was separated from the root and the length of the shoots and roots was measured. After drying for 48 h at 40°C, both parts of each seedling were weighed.

Due to the stability of the factors determining the growth of seedlings in the laboratory, the data analyses assumed that the repetition for each variant will be individual seeds and seedlings.

Statgraphics Plus was used to conduct the ANOVA statistical tests, the statistical significance of individual seedling parameters was checked, and homogeneous groups were determined using Duncan's post hoc test. Then, origin clusters characterised by multi-characteristic seedling similarity were created on the basis of seed germination rate and seedling parameters. For this purpose, the Ward method was applied to determine the cluster and the squared Euclidean distance was used as a measure of similarity (Jędrzejczak 1998).

### 3. Results

#### 3.1. Parameters of the seeds

The average lightest seeds (1.75 mg) and embryos (0.75 mg) were in the control variant (K), and the average heaviest seeds (1.98 mg) and embryos (0.89 mg) were in the N2 variant of the organic fertiliser with humic acids and mineral components. However, no statistical differences were found between the variants ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

#### 3.2. Survival rate of seeds

A minimal share of non-germinated seeds was found in three variants of the experiment (F2, N1 and N3), while 100% of the seeds germinated in two variants (F1 and K). 100% of the seeds also germinated in variant N2, but mould appeared after a few days, causing most seedlings to die. The percentage of germinated seeds did not differ statistically between the variants (Fig. 1).

#### 3.3. Germination rate of seeds

The treatments used had a significant impact on the germination rate of black alder seeds, which already started germinating on the second day after sowing. Germination culminated on the third day, when most of the seeds exhibited visible germination. The exception was the variant with mineral fertiliser (N3), which had a time shift in this process. Its seeds began germinating on the third day, culminating on day 4. The differences between the number of seeds germinating on successive days were statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

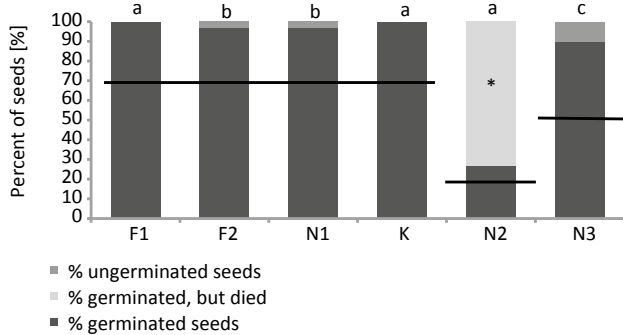
#### 3.4. Course of seedling growth

Due to the speed of the seedlings' development, three phases of the increase in seedling length were observed. The

**Table 1.** Mass of seeds and embryos used in the experiment

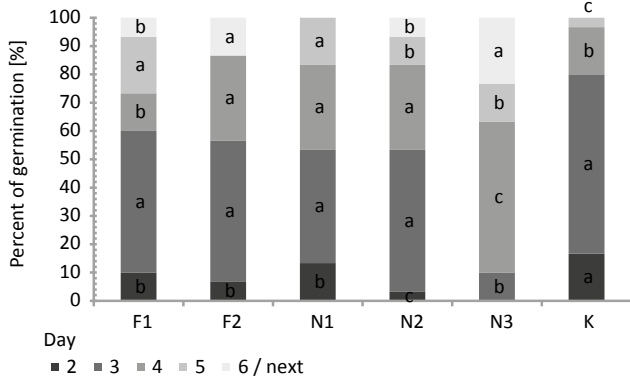
Variant	Number of seeds [pcs.]	Average weight of seeds [mg]	Number of embryos [pcs.]	Average weight of embryos [mg]
F1	30	1.96	30	0.85
F2	30	1.85	29	0.77
N1	30	1.91	29	0.84
N2	30	1.98	8	0.89
N3	30	1.97	30	0.86
K	30	1.75	26	0.75
p-value		0.0008		0.0020

first phase of increment (seed germination) lasted from the start of the experiment to the fourth day. The second, the

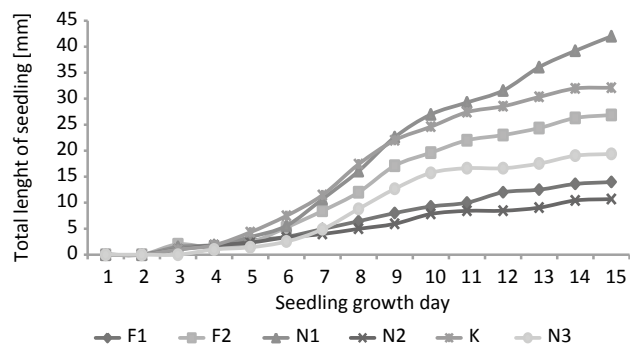


**Figure 1.** Germination of seeds treated with fungicides and bio-fertilisers the groups of homogeneous connections in which the seeds are selected are indicated by lines, and the letters indicate the groups of connections in which the seeds are not selected,

\* the appearance of mold fungi



**Figure 2.** Share of seeds germinating after sowing on days 2, 3, 4, 5, 6 and next; letters indicate statistically homogeneous groups of variants in the following days of seed germination



**Figure 3.** Course of the increase in total length of black alder seedlings

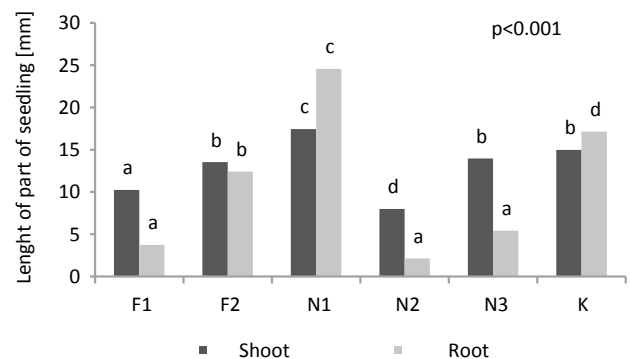
longest growth phase lasting from the fifth to the thirteenth day of the experiment, was characterised by a large differentiation in the total length of seedlings depending on the experimental variant. In the third phase, the seedling growth stopped. The exception was variant N1 with the biostimulator containing humic acids with chitosan but lacking mineral components, in which the seedlings further increased in size (Fig. 3). Seedlings in the control variant (distilled water) were much larger than in the N2 and N3 variants having fertilisers containing mineral components, with properties stimulating plant growth.

### 3.5. Length of seedlings

After 15 days, seedlings in the N1 variant had the longest shoots (17 mm) and the N2 variant had the shortest ones (8 mm). The length of seedling shoots in three variants (F2, N3 and K) was uniform, with lengths varying between 14 and 15 mm. The differences between average stem lengths in all variants of the experiment were statistically significant. Seedlings growing in the N2 organic fertiliser variant had the shortest roots (4 mm), while those treated with the N1 organic fertiliser had the longest roots (25 mm). Variants F1, N2 and N3 formed a homogeneous group, in which the root lengths did not differ statistically. However, the differences between all average root lengths were statistically significant ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4).

### 3.6. Dry mass of shoots

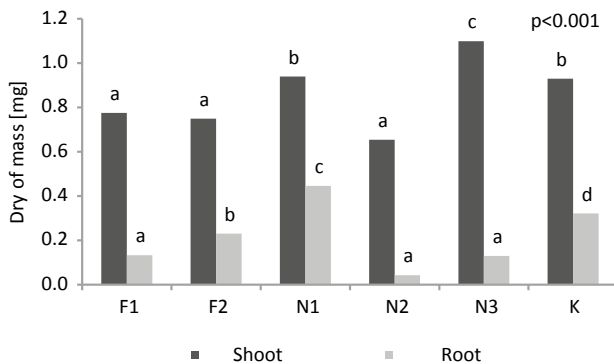
Seedlings treated with mineral fertiliser (N3) had the heaviest shoots (1.1 mg), while the lightest shoots (0.65 mg) were found in the variant with the N2 organic fertiliser. The variants with fungicides and the organic fertiliser with microelements (N2) formed a homogeneous group with no statistical difference between their mean values (Fig. 5).



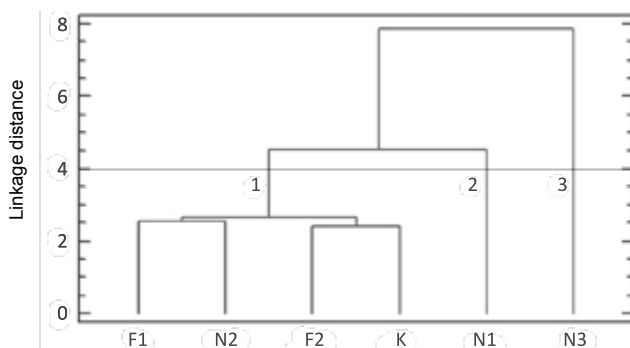
**Figure 4.** Length of seedlings as divided into shoot and root 15 days on from germination; letters indicate statistically homogeneous groups of variants separately for shoots and roots

Another homogeneous group was formed by the N1 organic fertiliser variant with humic acids, chitosan and silicon and distilled water variant (K). The differences between all variants were statistically significant ( $p < 0.001$ ). On the other hand, the heaviest roots (0.45 mg) were found for seedlings treated with the N1 organic fertiliser and the lightest (0.06 mg) in the N2 organic fertiliser variant. A homogenous group with the lightest roots was formed by seedlings from variants F1, N2 and N3. The differences between all averages were as statistically significant as in the case of shoot mass ( $p < 0.001$ ).

The cluster analysis performed on the basis of seed germination rate and seedling parameters allowed three groups of variants to be distinguished (Fig. 6). The first group consisted of four variants: F1 and F2 fungicides, N2 organic fertiliser and K distilled water, characterised by fast seed germination but low shoot parameters. The seedling roots in this group were of average length and weight. The N1 organic fertiliser variant differed from the others in its weaker seed germination than in Group 1, but its seedlings had



**Figure 5.** Dry weight of seedling shoots and roots 15 days on from germination letters indicate statistically homogeneous groups of variants separately for shoots and roots



**Figure 6.** Clustering (1–3) of variants based on seed germination rate and seedling parameters

longer and heavier shoots. The roots of these seedlings were of average length, but had the highest dry mass among the variants. The N3 multi component fertiliser variant had a negative effect on seed germination rate, its shoots were of average length, but the heaviest in relation to the other groups. In turn, the roots were the shortest and the lightest.

## 4. Discussion

In order to limit the influence of the genetic diversity of individual seeds on seedling growth, seeds from a single tree were chosen for testing. This is in line with the study by Bodył (2007), which demonstrated the significance of differences in energy and germination capacity of seeds from different natural and forest regions of Poland. The large differences in the properties of seeds originating from different trees and of different ages are also reported by Kaliniewicz and Trojanowski (2011).

The research of Tylkowski (2014) showed that storing black alder seeds, dried to 8–9%, for six winters did not reduce their initial germination capacity. The seeds used in this experiment were also stored under these conditions, but shorter, because only for 3 years. Thus, this factor should not negatively impact the germination process of black alder seeds. In turn, Gosling et al. (2009) noted that black alder seeds cooled at +4°C for 3 weeks showed earlier germination, more even emergence and tolerance to a wider temperature range (10–30°C) during germination. This study also noted the lack of a negative influence on seed properties after having been cooled and stored for 3 years. In most variants, over half of the seeds (even 80% in the control) germinated by the third day of the experiment. The exception was variant N3 (multi component mineral fertiliser), in which the germination process was extended by 1 day. Kaliniewicz et al. (2018) found that the germination process of black alder seeds is significantly influenced by their weight. However, it should be remembered that the average weight of the seeds used in the experiment did not differ statistically between the individual variants. In addition, the conditions during storage, seed germination and seedling growth were the same, so these factors did not affect the differentiation of the germination process.

The research showed that the fungicide and fertiliser aqueous solutions used slowed down the germination process of black alder seeds, but did not reduce germination capacity. Zamorski and Milczarek (1977) confirmed that fungicides had different effects (negative or positive) on the germination of ornamental plant seeds and showed that the fungicide with thiram as the active agent at a concentration of 75% beneficially affected germination. A similar effect was observed on the germination of alder seeds, of which 100% sprouted in the F1 fungicide variant containing thiram.

The components of the N1 organic fertiliser variant used in the experiment contained humic acids, which could directly contribute to the strong growth of alder seedling roots. The stimulating effect of humic compounds on plant growth was demonstrated by Jankiewicz (1997) and Katkat et al. (2009), while Schnitzer and Poapst (1991) noted that these compounds stimulated the growth of bean roots. The influence of humic and fulvic acids on the growth of the green mass of cultivated plants is also known, at a rate of even 28% more than the control (Sarir et al. 2005). The positive effect of humic acids on plant growth (dessert grapes) is also confirmed in the work of Ferrara et al. (2007) and the Xu study (1986). Humic acids also reduce the occurrence of certain diseases caused by *Fusarium* spp. (Yigit, Dikilitas 2008).

The presented experiment found that in comparison with the control variant, treatments containing humic acids and chitosan positively affected seed germination, as well as the dimensions and dry mass of roots. On the other hand, the N2 organic fertiliser variant with a rich composition containing humic acids, chitosan and mineral components (micro- and macro-elements) showed the lowest dimensions and dry mass of both roots and shoots. The literature has information stating that although black alder is one of the less demanding native species, it reacts well to mineral fertilisation, especially phosphorus and potassium, but is sensitive to calcium deficiency (Baule, Fricker 1973). Therefore, a possible deficiency of this element may have been one of the reasons why these seedlings had the worst parameters. The nutrient-rich composition of the N2 aqueous solution variant could also stimulate the development of mould microorganisms, which weakened and killed part of the seedlings.

The N2 variant with chitosan and humic acids interacting with microelements did not exhibit a strong fungicidal effect – because the development of moulds was not limited. On the other hand, no mould fungi appeared and the percentage of dead seedlings was zero in the N1 variant, where these substances were also used. Both variants (N1 and N2) differed in the fact that the N1 organic fertiliser had no mineral components in its composition, while the N2 organic fertiliser contained microelements. The presence of mineral components should not necessarily be the main cause of the appearance of moulds, because seedlings developed properly without signs of mould in the N3 variant that had a multicomponent mineral fertiliser. It should be stressed that the presence of mould was found in only one variant of the experiment, which was conducted with the applied methods of maintaining sterility described in the materials and methods section.

Zamorski and Milczarek (1977) noticed that each plant species has a different biology and must be approached individually. The fact that selected fertilisers and fungicides affected black alder seeds and seedlings in particular ways

under laboratory conditions does not mean that the impact will be similar in field conditions, where multifactorial influences of the environment and weather can further modify the results of similar experiments. Other forest tree species, such as *Pinus sylvestris* L. or *Fagus sylvatica* L. beech, may also react differently to the fungicides and organic fertilisers tested. Szołtyk and Walendzik (2003) found that forest plants have lower nutritional requirements than agricultural ones, but have a more varied individual response to particular nutrients. This confirms the need to conduct separate studies on individual forest tree species.

The results obtained in the laboratory study clearly indicate that the use of anorganic fertiliser (variant N1) containing humic acids positively affects the growth of shoots and roots of black alder in the initial growth phase. The seedling roots developed with this organic fertiliser were the longest and the heaviest, which proves that the seedlings formed quite complex root systems in a short time (only 15 days), enabling them to absorb more water and nutrients from the soil. This information is important in forest nurseries, whose task is to produce planting material of good breeding quality. A well-developed root system at the start is a basic guarantee for the proper growth of seedlings, as well as high success in forest cultivation. The chemical stimulation of growth and the proper development of seedlings is of particular importance in the production of planting material for the covered root system of container nurseries.

## 5. Conclusions

1. Fungicides positively affected the germination rate of seeds, but did not positively affect seedling growth parameters.
2. The influence of organic fertilisers based on chitosan and humic acids on black alder seedlings depended on the share of mineral components. The organic fertiliser containing microelements clearly weakened the growth of seedlings, especially their roots, and stimulated the development of mould fungi.
3. Mineral fertiliser without any bio-components provided seedlings with strongly developed shoots and leaves, resulting in the highest dry mass of the shoots, but had a low mass of the roots.
4. Further research should focus on the search for effective multi component mixtures with bio stimulators, especially suitable for use in the production of seedlings in the covered root system.

## Conflicts of interest

The authors declare the lack of potential conflicts of interest.

## Financial sources

The research was financed by the authors' own funds.

## References

- Aleksandrowicz-Trzcńska M., Hamera-Dzierżanowska A., Żybu-  
ra H., Drozdowski S. 2013. Wpływ mykoryzacji i chitozanu  
na wzrost sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w szkół-  
ce i na uprawie. *Sylwan* 157(12): 899–908. DOI 10.26202/  
sylwan.2012071.
- Baule H., Fricker C. 1973. Nawożenie drzew leśnych. Wydanie II.  
Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 314 s.
- Ben-Shalom N., Ardi R., Pento R., Arkil C., Fallik E. 2003. Con-  
trolling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber  
plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22(2): 285–290.  
DOI 10.1016/S0261-2194(02)00149-7.
- Borkowski J., Kowalczyk W. 1999. Influence of tytanit and chi-  
tosan sprays and other treatments on the tomato plant growth  
and the development of powdery mildew (*Oidium lycopersi-  
cum*). *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological  
Sciences* 47(2–4): 129–132.
- Borkowski J., Dyki B. 2003. Wpływ chitozanu i tytanitu i innych  
preparatów na ograniczenie rozwoju mączniaka prawdziwego  
na pomidorach w szklarni. *Folia Horticulturae* 1: 559–561.
- Borkowski J., Dyki B. 2004. Kilka uwag o chitozanie. *Wiadomości  
Botaniczne* 48(1/2): 66–67.
- Borkowski J., Uliński Z. 2012. Wpływ odpadów z pieczarek i  
chitozanu na plon i zdrowotność pomidorów uprawianych w  
szklarni. *Nowości Warzywnicze* 54–55: 45–51.
- Bodył M. 2007. Masa oraz żywotność nasion olszy czarnej (*Alnus  
glutinosa* Gaertn.) na terenie Polski w latach 1995–2004. *Syl-  
wan* 5: 17–22. DOI 10.26202/sylwan.2006028.
- Buraczyk W. 2010. Właściwości nasion a cechy morfologiczne sie-  
wek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Leśne Prace Bad-  
awcze* 71(1): 13–20. DOI 10.2478/v10111-009-0044-8.
- Duda B., Oszako T., Piwnicki J. 2003. Possibilities of chitosan use  
in forestry. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biologi-  
cal Sciences* 51(3): 213–220.
- Dziadowiec H. 2003. Wybrane problemy badań próchnicy gleb  
leśnych, w: Dębska B., Gonet S.S. Substancje humusowe w  
glebach i nawozach. Polskie Towarzystwo Substancji Humu-  
sowych, Wrocław, 141–166. ISBN 8390640384.
- Ferrara G., Pacifico A., Simone P., Ferrara E. 2007. Preliminary  
study on the effects of foliar applications of humic acids on 'Ita-  
lia' table grape. *Journal International des Sciences de la Vigne  
et du Vin* 42(2): 87–79. DOI 10.20870/oeno-one.2008.42.2.822.
- Gawrońska H., Przybysz A. 2011. Biostymulatory: mechanizmy  
zastosowania i przykłady zastosowań, w: Targi Sadownictwa  
i Warzywnictwa. Materiały konferencyjne, 5–6 stycznia 2011  
(red. M. Sroczyński, J. Miecznik). TSW, Warszawa, 7–13.  
ISBN 978-83-929987-7-8.
- Gosling P., McCartan S., Peace A. 2009. Seed dormancy and ger-  
mination characteristics of common alder (*Alnus glutinosa* L.)  
indicate some potential to adapt to climate change in Britain.  
*Forestry* 82(5): 573–582. DOI 10.1093/forestry/cpp024.
- Haque M.M., Diez J.J. 2012. Susceptibility of common alder  
(*Alnus glutinosa*) seeds and seedlings to *Phytophthora alni* and  
other *Phytophthora* species. *Forest Systems* 21(2): 313–322.  
DOI 10.5424/fs/2012212-02267.
- Jankiewicz L. 1997. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin.  
Właściwości i działanie. PWN, Warszawa, 281 s. ISBN  
83-01-12141-6.
- Jędrzejczak E. 1998. Zastosowanie metody analizy skupień w po-  
równawczych badaniach wpływu czynników na różne cechy  
roślin. *Postępy Nauk Rolniczych* 45(4): 67–75.
- Kaliniewicz Z., Trojanowski A. 2011. Analiza zmienności i korela-  
cji wybranych cech fizycznych nasion olszy czarnej. *Inżynieria  
Rolnicza* 8(133): 167–171.
- Kaliniewicz Z., Markowski P., Anders A., Jadwisieńczyk B., Po-  
znański A. 2018. Correlations between Germination Capacity  
and Selected Properties of black alder (*Alnus glutinosa* Gaer-  
trn.) Achenes. *Baltic Forestry* 24(1): 68–76.
- Katkat A.V., Celik H., Turan M.A., Asik B. 2009. Effects of soil  
and foliar applications of humic substances on dry weight and  
mineral nutrients uptake of wheat under calcareous soil condi-  
tions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2):  
1266–1273.
- Oszako T. 2005. Zagrożenie szkółek i drzewostanów, ze szczegól-  
nym uwzględnieniem olszy przez gatunki rodzaju *Phytophtho-  
ra*. *Sylwan* 149(6): 55–61. DOI 10.26202/sylwan.9200501.
- Pięta D., Pastucha A., Patkowska E. 1998. Wpływ chitozanu na  
grzyby chorobotwórcze przeżywające w glebie. *Zeszyty Nauko-  
we Akademii Rolniczej w Krakowie* 333: 825–828.
- Pięta D., Pastucha A. 2002. Efektywność ochronnego działania  
chitozanu w ograniczaniu chorób grzybowych soi. *Acta Scien-  
tiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 1(1): 31–43.
- Placek M., Dobrowolska A., Wraga K., Zawadzka K., Żurawik  
P. 2009. Wykorzystanie chitozanu w uprawie, przechowalnictwie  
i ochronie roślin ogrodnictwa. *Postępy Nauk Rolniczych*  
3–4: 101–110.
- Prusinkiewicz Z., Kowalkowski A., Królikowski L. 1983. Ocho-  
na i rekultywacja gleb leśnych. *Roczniki Gleboznawcze* 34(3):  
185–201.
- Raafat D., Sahl H.-G. 2009. Chitosan and its antimicrobial poten-  
tial – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology* 2(2):  
186–201. DOI 10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x.
- Sarir M.S., Sharif M., Ahmed Z., Akhlaq M. 2005. Influence of  
different levels of humic acid application by various methods  
on the field and field components of maize. *Sarhad Journal of  
Agriculture* 21(1): 75–81.
- Schnitzer M., Poapst P.A. 1991. Effect of soil humic compound on  
root initiation. *Nature* 213: 598–599. DOI 10.1038/213598a0.
- Solarska S., Struszczyk H., Pospieszny H. 1998. Chitosan in the  
control of *Pseudoperonospora humulion* hops. Biological  
agents and their effectiveness in the control of plant pathogens.  
IX Conference of the section for biological control of plant dis-  
eases of the Polish Phytopathological Society, Skierniewice,  
183–185.

- Stocka T. 2008. Biologiczne metody ochrony przed chorobami grzybowymi w szkółkach leśnych. *Postępy Techniki w Leśnictwie* 104: 28–38.
- Szołtyk G., Walendzik R. 2003. Nawozy wieloskładnikowe – nowe możliwości dla leśnictwa. *Notatnik Naukowy* 5(59)/2003/XI. Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa.
- Tylkowski T. 2014. Wpływ luszczzenia i czasu przechowywania nasion olszy czarnej (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertner) na kiełkowanie, wschody i wzrost siewek. *Sylwan* 158(11): 821–828. DOI 10.26202/sylvan.2014031.
- Wojdyła A.T., Orlikowski L.B. 1997. Chitozan w zwalczaniu grzybów odglebowych i nalistnych. *Progress Plant Protection* 37(1): 301–305.
- Xu X. 1986. The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and field in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 37: 343–350. DOI 10.1071/AR9860343.
- Yigit F., Dikilitas M. 2008. Effect of humic acid applications on the root-rot diseases caused by *Fusarium* spp. on tomato plants. *Plant Pathology Journal* 7(2): 179–182. DOI 10.3923/ppj.2008.179.182.
- Zamorski Cz., Milczarek K. 1977. Wpływ zapraw na kiełkowanie nasion roślin ozdobnych. *Acta Agrobotanica* 30(2): 335–340. DOI 10.5586/aa.1977.025.

### Contributions of the authors

M.B. – concept of the work, statistical analysis, preparation of figures and tables, literature review, manuscript writing, W.B. – scientific consultation, statistical analysis, correction of the work.