

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk Ogrodniczych

Mgr inż. Agnieszka Lenart

**Ocena nawozów z biostymulacją oraz
prekursorów fitohormonów pod kątem
minimalizowania wpływu stresu abiotycznego
na jakość i plonowanie owoców borówki
wysokiej**

**Evaluation of biostimulated fertilisers and phytohormone
precursors to minimise the effects of abiotic stress on quality
and yield of blueberry fruit**

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

Promotor: dr hab. Dariusz Wrona, prof. SGGW
Instytut Nauk Ogrodniczych
Katedra Sadownictwa i Ekonomiki Ogrodnictwa

Promotor pomocniczy: dr inż. Tomasz Krupa
Instytut Nauk Ogrodniczych
Katedra Sadownictwa i Ekonomiki Ogrodnictwa

Warszawa 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 08.02.2024r.

Podpis promotora

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 08.02.2024r.

Podpis autora pracy

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim,
którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy,
a w szczególności:

Panu dr. hab. Dariuszowi Wronie, prof. SGGW
za wszelką pomoc, cierpliwość, empatię, wskazówki
i poświęcony czas.

Panu dr Tomaszowi Krupie

za życzliwość, cierpliwość i ofiarowaną pomoc.

Panu dr Maciejowi Sroczyńskiemu za nieustanne
podtrzymywanie motywacji
w trakcie tworzenia niniejszej pracy.

Pani dr hab. Magdalenie Kapłań za wsparcie
merytoryczne i wspólnie tworzone publikacje.

Pani dr hab. Kamili Klimek za wprowadzenie
do metod analizy statystycznej.

Szczególne podziękowania składam :

**Pani Agacie Stolarskiej – Prezes Zarządu Timac Agro
Polska** za wiarę w naukę, umożliwienie mi udziału
w projekcie Doktorat Wdrożeniowy oraz wsparcie badań
zagranicznych w CMI w Saint Malo

Adamowi, Ani, Mikołajowi, Stasiowi i Rodzicom

Spis treści	
1. STRESZCZENIE	11
2. OPIS PROJEKTU „DOKTORAT WDROŻENIOWY”	13
3. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	14
4. PRZEGLĄD LITERATURY	15
4.1. Informacje na temat borówki wysokiej	15
4.1.1. Systematyka i charakterystyka	15
4.1.2. Informacje o uprawie borówki wysokiej w Polsce i na świecie	15
4.1.3. Właściwości prozdrowotne owoców borówki wysokiej.....	17
4.2. Informacje na temat biostymulatorów	18
4.2.1. Preparaty o działaniu biostymulującym w produkcji sadowniczej	18
4.2.2. Wpływ preparatów biostymulujących na niwelowanie stresu abiotycznego roślin	20
5. CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE	22
Część I	23
Ocena wpływu preparatu wdrożeniowego Kaoris na tle innych preparatów biostymulujących oraz nawożenia bez biostymulacji w uprawie borówki wysokiej	23
I.1. MATERIAŁ I METODY	24
I.2. WYNIKI I DYSKUSJA	27
I.2.1. Ocena wpływu preparatów biostymulujących na budowanie potencjału plonu oraz jakości jagód borówki wysokiej odmiany ‘Bluecrop’ (Publikacja A)	27
I.2.2. Wpływ nawozów z biostymulacją na właściwości prozdrowotne owoców borówki wysokiej (Publikacja B)	29
6 . JEDNOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI I OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	31
Część II.....	39
Ocena efektywności niwelowania stresu suszy w uprawie borówki wysokiej za pomocą preparatu wdrożeniowego Kaoris	39

II.1. MATERIAŁ I METODY – OPRACOWANIE DOTYCZĄCE BADAŃ SZKLARNIOWYCH.....	40
II.1.1. Lokalizacja i układ doświadczenia	40
II.1.2. Metody badawcze	41
II.1.2.1. Pobieranie materiału do badań.....	41
II.1.2.2. Analiza aktywności fotosyntetycznej SPAD	41
II.1.2.3. Aktywność katalazy i peroksydazy	42
II.1.2.4. Pomiar dialdehydu malonowego (MDA).....	42
II.1.2.5. Analiza składników mineralnych w liściach.....	43
II.1.2.6. Analiza statystyczna.....	43
II.2. WYNIKI.....	44
II.3. DYSKUSJA.....	52
7. WNIOSKI	54
8. LITERATURA.....	55

1. STRESZCZENIE

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat Wdrożeniowy” o nr. um. 0060/DW/2018/02. W doświadczeniu skupiono się na ocenie preparatu wdrożeniowego Kaoris na tle innych preparatów biostymulujących firmy Timac Agro. Badano wpływ różnych nawozów z biostymulacją na plonowanie i jakość owoców, ich właściwości prozdrowotne oraz minimalizowanie stresu abiotycznego roślin.

Badania prowadzono w dwóch etapach. Etap I - badania polowe zostały przeprowadzone w latach 2019 – 2020 na krzewach odmiany ‘Bluecrop’, rosnących na Polu Doświadczalnym Borówek Uprawnych, centralna Polska (51°55'42.7"N 20°59'28.7"E). W doświadczeniu oceniano: plon, masę 100 jagód, zawiązywanie owoców, powierzchnię liści oraz parametry jakościowe owoców takie jak: kwasowość, jędrność, zawartość ekstraktu, aktywność przeciwutleniająca, zawartość polifenoli, zawartość antocyjanów.

Etap II- badania szklarniowe (2022) wykonano w kontrolowanych warunkach suszy w Centre Mondial de l’Innovation Roullier (CMI) we Francji. W doświadczeniu wykorzystano trzyletnie krzewy borówki wysokiej odmiany ‘Brigitta Blue’. Rośliny uprawiano w szklarni z fotoperiodem 16h/8h i temperaturą 25°C/20°C dzień/noc. Połowę roślin co tydzień opryskiwano preparatem wdrożeniowym Kaoris (1%), trzykrotna aplikacja co tydzień. W doświadczeniu oceniano: aktywność katalazy, aktywność peroksydazy, zawartość wolnego aldehydu malonowego, oraz zawartość chlorofilu i składników mineralnych w liściach.

Stwierdzono, że nawozy z biostymulacją zwiększają plonowanie i poprawiają jakość owoców borówki wysokiej. Nawozy z wyciągami z alg morskich wpływają na wzrost aktywności przeciwutleniającej owoców, zawartość polifenoli ogółem, a także mają istotny wpływ na zawartość antocyjanów. Preparat wdrożeniowy Kaoris zwiększał w warunkach symulowanego stresu suszy aktywność oksydującą enzymów peroksydazy i katalazy.

Słowa kluczowe: biostymulacja, borówka wysoka, ekstrakt z wodorostów, stres abiotyczny, nawozy.

SUMMARY

This work was carried out within the framework of the Ministry of Science and Higher Education project "Implementation Doctorate" with contract no. 0060/DW/2018/02. The experiment focused on evaluating the Kaoris implementation formulation compared to other biostimulant formulations from Timac Agro. The effects of different fertilisers with biostimulation on minimising plant abiotic stress on fruit quality and yield of highbush blueberries and the effects of applied fertilisers on fruit health-promoting indices were studied.

The research was conducted in two stages. Stage I - field research was conducted in 2019 - 2020 on bushes of the 'Bluecrop' cultivar, growing at the Blueberry Cultivation Experimental Field, central Poland (51°55'42.7 "N 20°59'28.7 "E). The experiment evaluated yield, 100 berry weight, fruit setting, leaf area and fruit quality parameters such as acidity, firmness, extract content, antioxidant activity, polyphenol content and anthocyanin content.

Phase II- greenhouse trials (2022) were conducted under controlled drought conditions at the Centre Mondial de l'Innovation Roullier (CMI) in France. Three-year-old highbush blueberry bushes of the cultivar 'Brigitta Blue' were used in the experiment. The plants were grown in a greenhouse with a photoperiod of 16h/8h and a temperature of 25°C/20°C day/night. Half of the plants were sprayed weekly with Kaoris implementation (1%), three applications every week. The following were evaluated in the experiment: catalase activity, peroxidase activity, free malondialdehyde content, photosynthetic activity and leaf mineral content.

Based on the results obtained in this study, it was concluded that fertilisers with biostimulation have been found to increase yield and improve fruit quality of highbush blueberries. Fertilisers with seaweed extracts increased fruit antioxidant activity, total polyphenol content and had a significant effect on anthocyanin content. The implementation preparation Kaoris increased the oxidative activity of the enzymes peroxidase and catalase under simulated drought stress conditions.

Key words: biostimulation, blueberries, seaweed extract, abiotic stress, fertilisers.

2. OPIS PROJEKTU „DOKTORAT WDROŻENIOWY”

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu „Doktorat Wdrożeniowy” (nr. um. 0060/DW/2018/02) sfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Celem projektu jest tworzenie warunków do rozwoju współpracy między środowiskiem naukowym a środowiskiem społeczno-gospodarczym. Projekt „Doktorat Wdrożeniowy” wprowadza możliwość kształcenia uczestnika studiów doktoranckich we współpracy z zatrudniającym go przedsiębiorcą (lub in. podmiotem). Celem projektu jest wdrożenie opracowanych rozwiązań w rzeczywistych warunkach lub środowiskach przemysłowych.

Opis sekcji badawczej rozprawy doktorskiej składa się z dwóch części.

Część I – Ocena wpływu preparatu wdrożeniowego Kaoris na tle innych preparatów biostymulujących oraz nawożenia bez biostymulacji w uprawie borówki wysokiej. Wyniki opisano w dwóch publikacjach:

A. Lenart, A., Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7).

B. Lenart, A., Wrona, D., Krupa, T. (2022). Health - Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending of Type of Fertilization. Agriculture 12(10), 1741.

W publikacjach A i B omówiono wpływ nawozów z biostymulacją na plonowanie i jakość owoców borówki wysokiej. W publikacji A opisano efekty stosowania preparatów biostymulujących zawierających prekursorzy fitohormonów oraz preparatu wdrożeniowego na budowanie potencjału plonu oraz jakości jagód borówki wysokiej. W publikacji B skupiono się na ocenie wpływu nawożenia z biostymulacją i prekursorami fitohormonów oraz preparatu wdrożeniowego na potencjał przeciwutleniający owoców .

Część II – Ocena efektywności niwelowania stresu suszy w uprawie borówki wysokiej za pomocą preparatu wdrożeniowego Kaoris.

Wyniki opisane w części II są w trakcie procesu publikacji.

3. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lp.	Publikacja	IF ^{a)}	Punktacja MNiSW
A	Lenart, A., Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7).	3,57	100
B	Lenart, A., Wrona, D., Krupa, T. (2022). Health—Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization. Agriculture, 12(10), 1741.	3,60	100

a – sumaryczny Impact Factor według bazy Journal Citation Reports, zgodny z rokiem ukazania się publikacji.

4. PRZEGLĄD LITERATURY

4.1. Informacje na temat borówki wysokiej

4.1.1. Systematyka i charakterystyka

Borówka wysoka (*Vaccinium corymbosum*) pochodzi z Ameryki Północnej, gdzie jest szeroko rozpowszechniona w naturalnych siedliskach, takich jak lasy, torfowiska, tereny bagienne. W stanie dzikim występuje w różnych regionach, od wschodnich obszarów Kanady po południowe części Stanów Zjednoczonych (Luby i in. 1991). Borówka wysoka jest gatunkiem z rodziny wrzosowatych (*Ericaceae*), rodzaju *Vaccinium* (Rejman i Pliszka 1991). Odmiany uprawne borówki wysokiej wywodzą się z dziko rosnących gatunków: *Vaccinium corymbosum*, *V. australe*, *V. angustifolium* i *V. darrowii* (Brevis i in. 2008). Odmiana ‘Bluecrop’ została uzyskana w USA poprzez krzyżowanie odmian (Jersey x Pioneer) x (Stanley x June) i wprowadzona do uprawy w 1953 roku (Fira i in. 2015; Rejman i Pliszka 1991). Jest to odmiana charakteryzująca się silnym wzrostem (do 2 m), wysoką plennością i odpornością na mróz (Wach 2012). Owoce o mocnej skórce odznaczają się małą podatnością na pęknięcie oraz doskonałym lekko kwaskowatym smakiem. Owoce tej odmiany dojrzewają od początku lipca do połowy sierpnia z tendencją do opadania zbyt dojrzałych owoców (Pluta i Seliga 2017).

Odmiana ‘Brigitta Blue’, powstała w wyniku procesu hodowlanego i selekcji w Australii, została oficjalnie wprowadzona do uprawy w roku 1980 (Bal i in. 2006). ‘Brigitta Blue’ to odmiana o pokroju strzelistym, o dobrym rozgałęzieniu a owoce są równomiernie rozmieszczone na całej roślinie (Bal i in. 2006). Dojrzewanie jagód równomierne, 2 tygodnie po odmianie ‘Bluecrop’. Według badań Pluty i Seliga (2017) jest to odmiana o wysokim plonowaniu i dużych owocach. Owoce utrzymują bardzo dobrą jakość przez 6-7 tygodni przechowywania (Bal i in. 2006).

4.1.2. Informacje o uprawie borówki wysokiej w Polsce i na świecie

Stale rosnące zapotrzebowanie konsumentów na owoce borówki sprawia, że powierzchnia upraw tego gatunku z roku na rok rośnie zarówno w Polsce jak i na świecie. Borówka wysoka znajduje się w polskich uprawach od wielu dziesięcioleci. Wprowadzenie tego gatunku do krajowej hodowli nastąpiło po sprowadzeniu z USA interesujących odmian przez doktora K. Pliszkę ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. (Smolarz 2006; Smolarz i Pluta 2014). Według Zmarlickiego i Brzozowskiego (2016) uprawa borówki wysokiej jest najszybciej rozwijającym się segmentem produkcji sadowniczej w Polsce. Borówka

wysoka ma bardzo specyficzne wymagania. Najlepiej rośnie na glebach lekkich, które są dobrze napowietrzone o wysokiej zawartości próchnicy oraz niskim pH (Smolarz i Pluta 2014).

Głównym czynnikiem ograniczającym wzrost i plonowanie borówki wysokiej są błędy agrotechniczne popełnione przy przygotowaniu stanowiska glebowego (Wach 2004). Ponieważ borówka wysoka wytwarza płytki system korzeniowy z licznymi cienkimi korzeniami, warto zaplanować nasadzenia wraz z systemem nawadniania (Wach 2004). Omawiany gatunek nie toleruje zbyt wysokiej wilgotności gleby i wysokiego podsiąku wód gruntowych. Na plantacji borówki wysokiej woda gruntowa powinna znajdować się na wysokości 60-70 cm (Kawecki i in. 2007). Do prawidłowego wzrostu i plonowania wymaga gleb, o kwaśnym odczynie: 3,5-4,0 KCl (Kościński 2021). Do uprawy tego gatunku polecane są gleby torfowe, gleby przepuszczalne, o uregulowanym stosunku powietrzno – wodnym (Starast i in. 2010). Ponieważ większość gleb w Polsce spełnia te kryteria jedynie w części, to gleba pod nowe nasadzania borówki wysokiej wymaga odpowiedniego przygotowania (Kościński 2021). Koniecznymi zabiegami agrotechnicznymi do przygotowania podłoża są:

- uzupełnienie składników odżywczych w glebie na podstawie badań chemicznych gleby,
- zakwaszanie podłoża,
- odchwaszczanie stanowiska,
- wzbogacenie podłoża w materię organiczną,
- ściółkowanie.

Borówka wysoka ma stosunkowo małe zapotrzebowanie na składniki pokarmowe, szczególnie w porównaniu do innych upraw owocowych (Hanson i Hancock 1996). Wymaga jednak regularnego stosowania nawozów w celu maksymalizacji wzrostu i produkcji owoców (Bañados i in. 2012). Zalecenia dotyczące zastosowania nawozów w uprawie borówki wysokiej należy dostosować do wydajności, wieku i wigoru roślin, rodzaju i zasobności gleby, składu mineralnego wody oraz rodzaju stosowanej ściółki (Hart i in. 2006). Dawki azotu wahają się od 20 do 100 kg-ha⁻¹ na sezon (Hart i in. 2006). Nawożenie potasem zalecane jest w dawce 50-75 kg-ha⁻¹ K₂O a dawka fosforu powinna mieścić się w granicach 30-60 kg-ha⁻¹ P₂O₅ (Krupa 2021).

4.1.3. Właściwości prozdrowotne owoców borówki wysokiej

Wysoki popyt na owoce borówki wysokiej wynika z jej walorów prozdrowotnych i smakowych, a także szeroko zakrojonej kampanii promującej borówkę jako prozdrowotną żywność (Brazelton 2021). Borówki są uważane za naturalnie zdrowe i wartościowe owoce, zawierające szereg różnorodnych związków bioaktywnych, które wykazują pozytywny wpływ na zdrowie człowieka (Strik 2005). Owoce te są cennym źródłem związków takich jak błonnik, składniki mineralne (potas, mangan, żelazo, cynk, wapń, magnez i fosfor), witaminy (C, K, A, E, i witaminy z grupy B), i związki fenolowe o właściwościach antyoksydacyjnych (antocyjany, flawanole, kwas elagowy) (Brazelton 2011). Ze względu na prozdrowotne właściwości są powszechnie spożywane jako owoc deserowy, ale mają również szerokie zastosowanie w przetwórstwie jako surowiec suszony i mrożony, do produkcji soków, przecierów, dżemów a nawet wina (Behrends i Weber 2017; Mendes-Ferreira i in. 2019). Kehkönen i in. (1999) donoszą, że to właśnie owoce jagodowe są jednym z najbogatszych źródeł przeciwutleniaczy w naszej diecie. przeciwutleniacze w owocach są głównie reprezentowane przez witaminę C i polifenole, takie jak: antocyjany, kwasy fenolowe, flawinowe i garbniki (Szajdek i Borowska 2008; Prior i in. 1998). Rashidinejad (2020) opisuje korzystne działanie owoców borówki wysokiej w przypadku zapobiegania chorobom przewlekłym, w tym nowotworom, zaburzeniom sercowo-naczyniowym, cukrzycy i chorobom neurodegeneracyjnym. Häkkinen i Törrönen (2000) oraz Rimando i in. (2004) donoszą o przeciwrakowym działaniu związków fenolowych zawartych w owocach jagodowych. Ekstrakty z owoców borówki wysokiej zmniejszają związany z wiekiem spadek liczby neuronów i funkcji poznawczych, powszechnych w zaburzeniach takich jak choroba Alzheimera (Häkkinen i Törrönen 2000). Substancje bioaktywne o właściwościach prozdrowotnych, pełnią także ważną funkcję fizjologiczną w roślinach. Wiadomo, że chronią one rośliny przed szkodnikami, patogenami i promieniowaniem ultrafioletowym, regulują szlaki metaboliczne oraz nadają owocom kolor i smak (Steward 2004). Zgodnie z doniesieniami Piątkowskiej i in. (2011) oraz Khoo i in. (2017), kluczową grupą związków fenolowych o znaczącym potencjale prozdrowotnym są antocyjany. Badania przeprowadzone przez Lee i in. (2016) wskazują, że w owocach borówki wysokiej znajdują się następujące antocyjany: cyjanidyny, delfinydyny, malwinidyny, peonidyny, petunidyny. Według Khoo i innych (2017), antocyjany są wykorzystywane jako fitofarmaceutyk pobudzający apetyt, środek żółciopędny, a antocyjanina o wysokiej przyswajalności skutecznie zmniejsza komórkową peroksydację lipidów. Antocyjany i kwasy antocyjaninowo-pirogronowe wykazują właściwości przeciwnowotworowe poprzez hamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz działają

jako czynniki antyinwazyjne komórek i chemoinhibitory (Faria i in., 2010). Badania przeprowadzone przez Bunea i in. (2013) potwierdzają, że frakcja bogata w antocyjany uzyskana z odmiany 'Toro', charakteryzowała się najwyższą zawartością antocyjanów i aktywnością antyoksydacyjną oraz hamowała proliferację komórek czerniaka u myszy. Wyniki badań Bunea i in. (2013) wskazują, że antocyjany z owoców borówki wysokiej mogłyby być stosowane jako środek chemoprewencyjny lub adiuwantowy w kontroli rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych. Miyake i in. (2011) potwierdzają, że jagody borówki wysokiej są bogate w przeciwutleniacze mające korzystny wpływ w leczeniu chorób oczu.

4.2. Informacje na temat biostymulatorów

4.2.1. Preparaty o działaniu biostymulującym w produkcji sadowniczej

W dzisiejszych czasach sektor rolniczy napotyka trudności, dążąc do zaspokojenia rosnących potrzeb światowej populacji i efektywnego wykorzystania zasobów, przy jednoczesnym ograniczaniu wpływu produkcji rolnej na ekosystemy i zdrowie ludzi. Uzyskanie plonów o wysokiej jakości handlowej jest trudne bez zabiegów agrotechnicznych, w tym bez ochrony roślin czy nawożenia (Posmyk 2016). Obecnie sadownicy chcą produkować żywność nie tylko w odpowiedniej jakości i ilości, ale także zdrową, wybierając rozwiązania bezpieczne zarówno dla konsumentów jak i dla środowiska (Filipczak i in. 2016). Nawozy odgrywają kluczową rolę w rolnictwie, stanowiąc dla plantatorów narzędzie do zwiększania ilości i jakości plonów, zarówno w warunkach optymalnych, jak i stresowych (Rouphael i in. 2020). W obliczu coraz większych wymagań sieci handlowych i konsumentów, w obliczu zmian klimatycznych ciekawym rozwiązaniem może być użycie biostymulatorów roślin (Colla i in. 2015). Du Jardin w 2015 r. zaproponował następującą definicję biostymulatora: "Biostymulator roślin to dowolna substancja lub mikroorganizm stosowany w uprawie roślin w celu zwiększenia efektywności odżywiania, tolerancji na stres abiotyczny i/lub cech jakościowych upraw, niezależnie od zawartości składników odżywczych". Prawna definicja biostymulatora została ustanowiona Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/1009, które zostało ustanowione dnia 5 czerwca 2019 roku, dotyczy udostępniania na rynku produktów nawozowych w Unii Europejskiej. Wprowadza ono nowe przepisy oraz wprowadza zmiany do istniejących rozporządzeń (WE) nr 1069/2009 i (WE) nr 1107/2009. Ponadto, rozporządzenie to uchyla wcześniejsze rozporządzenie (WE) nr 2003/2003. Nowe przepisy definiujące produkt jako biostymulator obowiązują od 16 lipca 2022 roku. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się nawozy z biostymulacją wykorzystujące ekstrakty z alg morskich (Du Jardin 2015). Złożony

skład chemiczny ekstraktów z wodorostów, który obejmuje cenne składniki odżywcze i biostymulujące, takie jak makro- i mikroelementy, aminokwasy, witaminy, cytokininy, auksyny, kwas abscysynowy (ABA) czy prekursory fitohormonów, wpływa na sposób interakcji tych substancji w roślinach. (Khan i in. 2009; Durand i in. 2003). Substancje zawarte w wodorostach zwiększają tolerancję na stres abiotyczny oraz poprawiają wydajność produkcji roślinnej i trwałość owoców (Battacharyya i in. 2015; Zodope i in. 2010). Charakterystyczne cechy alg morskich wynikają z ich dostosowania do specyficznego środowiska, w którym występują. Pomimo, że rosną w środowisku ekstremalnie niesprzyjającym (słona woda, niskie temperatury, brak światła, okresowe odpływy i wysuszenie) to posiadają ogromny potencjał plonotwórczy przeliczany na suchą masę z hektara (Lenart 2021). W przypadku alg *Laminaria digitata* plon wynosi 250 t suchej masy z hektara i jest aż dziesięciokrotnie większy niż w przypadku kukurydzy – 22 t suchej masy z hektara (Durand i in. 2003). To właśnie algi morskie zostały wskazane przez naukowców jako najważniejsza grupa organizmów żywych jakie mogą zostać wykorzystane na szeroką skalę w rolnictwie zrównoważonym (Tuhy i in. 2013). Algi morskie wykorzystuje się w produkcji rolnej od dziesięcioleci a pierwsze zapisy o ich użyciu jako nawozu pochodzą z XVI wieku (Blunden i Gordon 1986; Metting i in. 1988; Temple i Bomke 1988).

Zastosowanie naturalnych biostymulatorów roślin jest przyjaznym dla środowiska rozwiązaniem, które wspomaga kwitnienie, wzrost roślin, zawiązywanie owoców, plonowanie i efektywność wykorzystania składników pokarmowych, a także wpływa na większą tolerancję na szeroki zakres stresorów abiotycznych (Colla i in. 2015; Du Jardin 2015; Roupael i Colla 2018). Związki zawarte w algach morskich wpływają korzystnie na strukturę gleby oraz jej pojemność wodną (Moore 2004), jak również stymulują rozwój pożytecznych mikroorganizmów glebowych (Khan i in. 2009). Rośliny opryskiwane wyciągami z alg morskich szybciej pobierają i przyswajają składniki pokarmowe w porównaniu do nietraktowanych (Manusco i in. 2006), charakteryzują się silniejszym wzrostem oraz posiadają dobrze rozbudowany system korzeniowy z licznymi drobnymi korzeniami bocznymi (Atzmon 1994; Slavik 2012). Substancje pozyskiwane z alg korzystnie wpływają na skuteczność ochrony roślin przed chorobami i szkodnikami, jak potwierdzają badania przeprowadzone przez Allen i in. (2001) oraz Cluzet i in. (2004). Ponadto, wykazują zdolność do zwiększania tolerancji roślin na warunki suszy i wysoką temperaturę, zgodnie z ustaleniami Zhanga (2004).

Z perspektywy rosnących wymagań konsumentów, przy zmieniającej się dostępności środków ochrony rośliny i zmiennych warunkach klimatycznych, stymulowanie naturalnej odporności oraz wydajności roślin poprzez zastosowanie naturalnych substancji bioaktywnych może być

ważną metodą budowy zarówno ilości jak i jakości plonu (Pruszyński 2008). Oprócz właściwego odżywiania mineralnego, biostymulatory mogą zwiększać skuteczność konwencjonalnych nawozów, zwiększają pobieranie oraz zawartość makroskładników w liściach (Manusco i in. 2006). W badaniach Mancuso i in. (2006) ekstrakt IzoPentylu Adeniny (IPA) skutecznie wpłynął na akumulację azotu, fosforu i potasu u roślin winorośli. Rola biostymulatorów w akumulacji składników odżywczych na poziomie tkanek jest wciąż badana. Jak podaje Salat (2004) biostymulatory mogą zawierać związki chelatujące (np.: mannitol z wodorostów), które mogą zwiększać dostępność składników pokarmowych oraz lepsze wchłanianie związków chelatowych z powierzchni liści.

4.2.2. Wpływ preparatów biostymulujących na niwelowanie stresu abiotycznego roślin

Stres abiotyczny jest przyczyną ogromnych strat w rolnictwie (Maillard i in. 2018; Godfray i in. 2010). Postępujące zmiany klimatyczne powodują występowanie długich okresów suszy bądź okresowe anomalie temperatur przyczyniające się do znacznych strat w produkcji roślinnej (Seiler i in. 2011). Negatywny wpływ stresu abiotycznego może generować nawet do 70% strat w plonie (Kumar i in. 2010; H. Abd El Baky i in. 2016). Racjonalne gospodarowanie wodą w rolnictwie czy poszukiwanie odmian o większej tolerancji na suszę stanowi ważny czynnik zapobiegający stratom plonu (Sivritepe i in. 2008). Hodowla odmian genetycznie tolerancyjnych na stres suszy jest trudna i czasochłonna, dlatego wciąż poszukuje się alternatywnych rozwiązań zwiększających tolerancje roślin na niekorzystne warunki środowiskowe (Bulgari i in. 2019; Drobek i in. 2019). System korzeniowy borówki wysokiej penetruje glebę do głębokości 40 cm, nawet krótki okres braku wody powoduje reakcję stresową w roślinie ograniczając fotosyntezę i hamując wzrost krzewu (Bryla 2011; Molnar 2022). Jednym ze sposobów podnoszenia tolerancji roślin borówki wysokiej na stres suszy może być zastosowanie biostymulatorów (Irani i in. 2021; Bechtold i Field 2018). Związki biostymulujące na poziomie komórkowym wpływają na syntezę związków osmoregulujących, aktywację enzymów antyoksydacyjnych, zdolność do kumulacji wody w tkankach roślin czy stymulację podziałów komórkowych (Bulgari i in. 2014; Yakhin i in. 2017; Ördög i in. 2004). Według Van Oosten i in. (2017) biostymulatory wpływają na lepsze wykorzystanie wody i substancji mineralnych przez rośliny, wspomagają ich rozwój oraz niwelują wpływ stresu abiotycznego. Kluczową odpowiedzią roślin na stres suszy jest wytwarzanie substancji takich jak osmolity, osmoprotektanty czy antyoksydanty (Chan i in. 2013). Stwierdzono, że podczas ekspozycji roślin na stres abiotyczny występuje w komórkach roślin wzrost produkcji H_2O_2

(Sharma i in. 2012; Chan i in. 2013). Reaktywne formy tlenu (RFT), stanowią element sieci szlaków sygnałowych i odgrywają znaczącą rolę w metabolizmie i starzeniu się komórek roślinnych (Bhattacharjee 2012). Istotnym elementem odpowiedzi rośliny na kumulację RFT wywołanej sytuacją stresową jest aktywność enzymów oksydujących takich jak katalazy lub peroksydazy (Bauwe i in. 2012; Voss i in. 2013). Według licznych opracowań, biostymulatory oparte na wyciągach z alg morskich indukują aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Molnar i in. 2022; Mansori i in. 2019; Chan i in. 2013).

5. CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu preparatu wdrożeniowego Kaoris oraz nawozów z biostymulacją na plonowanie i parametry jakościowe owoców borówki wysokiej. Analizowano dodatkowo, czy preparat wdrożeniowy Kaoris zawierający wyciągi z alg morskich redukuje stres abiotyczny roślin powodowany przez niedobór wody. Równoległym celem badań było przygotowanie argumentacji popartej wynikami doświadczeń z zamiarem wdrożenia preparatu Kaoris do obrotu.

Hipotezy badawcze

1. Potencjał plonowania krzewów borówki wysokiej i właściwości fizykochemiczne owoców są warunkowane przez nawożenie z biostymulacją zawierającą prekursorów fitohormonów.
2. Zawartość związków bioaktywnych i właściwości przeciwutleniające owoców są modyfikowane przez związki aktywne zawarte w preparatach biostymulujących.
3. Tolerancja roślin borówki wysokiej na stres suszy wzrasta po zastosowaniu związków biostymulujących i prekursorów fitohormonów .

Część I

Ocena wpływu preparatu wdrożeniowego Kaoris na tle innych preparatów biostymulujących oraz nawożenia bez biostymulacji w uprawie borówki wysokiej

I.1. MATERIAŁ I METODY

Pełny opis użytych materiałów i metod badawczych w części I niniejszej pracy doktorskiej został szczegółowo opisany w publikacjach A i B stanowiących część rozprawy. W niniejszym rozdziale zarysowano strukturę realizacji poszczególnych etapów badań oraz sprecyzowano ich zakres. W dalszej części dostarczono krótki opis zastosowanych metod w ramach przeprowadzonych badań.

Wykaz publikacji:

Lenart, A., Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7).

Lenart, A., Wrona, D., Krupa, T. (2022). Health - Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization. Agriculture, 12(10),1741.

Opis warunków doświadczalnych

Doświadczenie przeprowadzono w latach 2019 - 2020 na Polu Doświadczalnym Borówek Uprawnych, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Błoniu koło Prażmowa, (51°55'42.7"N 20°59'28.7"E).

Krzewy odmiany 'Bluecrop' uprawiane na V klasie gleby w rozstawie 3 x 1 m. Na plantacji wykonano zabiegi cięcia odmładzającego oraz ochrony roślin zgodnie z praktykami IPO. Poletko doświadczalne było nawadniane kropłowo. Zakres pH podłoża w trakcie doświadczenia mieścił się w przedziale 4,5 – 4,8 w H₂O. W doświadczeniu wykonywano badanie gleby w certyfikowanym laboratorium Okręgowej Stacji Chemiczno – Rolniczej w Łodzi (tabela 1). Na podstawie wyników uzupełniano składniki pokarmowe do wartości zalecanych (Sadowski i in. 1990), zgodnie z układem doświadczenia (tabela 2).

Tabela 1. Sprawozdanie z badań gleby.

Zasolenie pH		Zawartość w mg/l						
g NaCl/l	w H ₂ O	Azot	Azot	Fosfor	Potas	Wapń	Magnez	Chlorki
		azota- nowy	amo- nowy	P	K	Ca	Mg	Cl
		N-NO ₃	N-NH ₄					
0,08	4,9	<10,0*	<10,0*	<20,0*	<20,0*	245	20	<10,0*

*/- wynik poniżej dolnego zakresu metody

Tabela 2. Suma składników pokarmowych zastosowana w doświadczeniu [kg · ha⁻¹].

N	P ₂ O ₅	K ₂ O	SO ₃	CaCO ₃
100	30	93	142	64

Materiał badawczy stanowiły krzewy oraz jagody borówki wysokiej odmiany ‘Bluecrop’. Doświadczenie przeprowadzono w układzie bloków losowych. Układ doświadczenia obejmował 4 kombinacje nawozowe, po 5 powtórzeń w kombinacji. Powtórzenie stanowiło 6 krzewów. W roku 2019 zbiory prowadzono od 01.07. do 10.08. a w 2020 od 05.07. do 05.08. Zebrane owoce stanowiły próbę zbiorczą, która została uśredniona ze wszystkich zbiorów. Następnie wykorzystano je do oceny parametrów jakościowych owoców. W doświadczeniu oceniano wpływ biostymulacji na:

Publikacja A

- Plon [kg · krzew⁻¹] i [t · ha⁻¹]
- Masa 100 jagód [g]
- Zawiązywanie owoców [%]
- Powierzchnię liści [cm²]
- Kwasowość [% kwasu cytrynowego]
- Zawartość ekstraktu [°Brix]
- Jędrność [N]

Publikacja B

- Aktywność przeciwutleniająca DPPH⁺ [$\mu\text{M Trolox} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
- Zawartość polifenoli ogółem [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ś.m.]
- Zawartość antocyjanów [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ś.m.]

W doświadczeniu skupiono się na ocenie preparatu wdrożeniowego Kaoris na tle innych preparatów biostymulujących firmy Timac Agro. Układ doświadczenia obejmował 4 kombinacje:

Kombinacja T1 - obejmowała nawożenie posypowe oraz dolistne bez substancji bioaktywnych (kombinacja kontrolna).

Kombinacja T2 - obejmowała nawożenie posypowe oraz dolistne rozszerzone o preparat Maxifruit zawierający prekursory fitohormonów oraz substancje biostymulujące.

Kombinacja T3 - obejmowała nawożenie posypowe oraz dolistne rozszerzone o preparat wdrożeniowy Kaoris zawierający substancje bioaktywne.

Kombinacja T4- obejmowała nawożenie posypowe i dolistne wyłącznie preparatami Timac Agro zawierającymi biostymulację oraz prekursory fitohormonów.

W przeprowadzonym doświadczeniu, w każdej kombinacji, suma dostarczanych roślinom składników pokarmowych (N, K, P, Mg oraz mikroelementy) była zbliżona. Do nawożenia posypowego i dolistnego wykorzystano preparaty: Rosafert 5-12-24, Rosahumus, Siarczan amonu, Cynkobor, Bolero Mo, Fostar, Kristalon zielony, Wapnovit (T1). W Kombinacji T2 zastosowano te same nawozy co w kombinacji T1 oraz dodatkowo preparat Maxifruit zawierający prekursory fitohormonów i biostymulację. W kombinacji T3 zastosowano te same nawozy co w kombinacji T1 oraz dodatkowo preparat wdrożeniowy Kaoris zawierający wyciągi z alg morskich. W kombinacji T4 zastosowano tylko nawozy z biostymulacją zalecane przez producenta Timac Agro: Top Horti 5-10-15, Sulfammo 23 Nprocess, Fertiactyl Starter, Fertileader Leos, Fertileader Gold, Fertileader Axis, Fertileader Vital, Fertileader Elite.

I.2. WYNIKI I DYSKUSJA

I.2.1. Ocena wpływu preparatów biostymulujących na budowanie potencjału plonu oraz jakości jagód borówki wysokiej odmiany 'Bluecrop' (Publikacja A)

Czynnikiem ocenianym w badaniach był preparat wdrożeniowy Kaoris oraz biostymulatory z prekursorami fitohormonów. Oceniano czy wpływają tak samo na jakość owoców i plonowanie borówki wysokiej co zwykle nawozy bez biostymulacji. W doświadczeniu oceniano wpływ nawożenia z biostymulacją oraz prekursorami fitohormonów na: plonowanie, masę jagód, zawiązywanie owoców, powierzchnię liści oraz parametry fizykochemiczne owoców. Niniejsze badanie ma na celu udzielenie producentom informacji dotyczących potencjalnego wpływu produktów biostymulujących na efektywność plonowania oraz jakość uzyskiwanych owoców borówki wysokiej. W danych literaturowych można znaleźć wiele prac wskazujących na pozytywny wpływ preparatów z biostymulacją na ogólną wydajność biologiczną roślin (Basak i Bielak 2008; Du Jardin 2015; Mansori i in. 2019; Kapłan i in. 2013; Nagy i in. 2019; Khan i in. 2009). Powyższa zależność została potwierdzona w niniejszych badaniach, gdzie nawozy z biostymulacją (T4) wpłynęły korzystnie na wielkość plonu i stopień zawiązania owoców w porównaniu do pozostałych kombinacji. Zależność ta może wynikać z faktu, iż rośliny opryskiwane wyciągami z alg morskich szybciej pobierają i przyswajają składniki pokarmowe w porównaniu do nieopryskiwanych, charakteryzują się mocniejszym i silniejszym wzrostem oraz posiadają dobrze rozbudowany system korzeniowy z licznymi drobnymi korzeniami bocznymi zdolny do szerokiego pobierania składników pokarmowych. Ohta i in. (2004) wykazali, że fitoregulatory zastosowane w okresie około kwitnienia, wpływają na poprawę wydajności kwitnienia, żywotność kwiatów, żywotność i jakość pyłku, efektywność procesu zapylenia i zapłodnienia, co bezpośrednio przekłada się na poprawę jakości i ilości owoców. Abetz i Young (1983), Featonby-Smith i Van Staden (1987 a, b), Arthur i in. (2003) podają, że aplikacja preparatów opartych na wyciągach z alg morskich przyczynia się do wcześniejszego kwitnienia, lepszego zawiązania i wyrastania owoców wielu roślin uprawnych. Również w badaniach przedstawianych w niniejszej pracy, udowodniono pozytywny wpływ preparatów biostymulujących z prekursorami fitohormonów na zawiązywanie oraz masę badanych owoców. Stopień zawiązania owoców u krzewów traktowanych nawozami z biostymulacją (T4) był największy spośród wszystkich ocenianych kombinacji. Masa owoców, była największa w kombinacji w której zastosowano nawozy z biostymulacją T4. Crouch i Van Staden (1992) wykazali, że rośliny pomidora opryskiwane wyciągami

z wodorostów produkowały średnio o 30% większe i lepszej jakości owoce niż rośliny z kombinacji kontrolnej. Analogiczne relacje zostały potwierdzone w badaniach Zadopy i in. (2011), gdzie zastosowanie dolistnych aplikacji nawozów zawierających wyciągi z alg morskich przyczyniło się do zwiększenia plonu pomidora o 5% w porównaniu do kombinacji kontrolnej.

W niniejszej pracy, w trakcie badań wykazano korzystny wpływ nawozów z biostymulacją opartych na wyciągach z alg morskich na poprawę plonu ogólnego. Plon owoców borówki wysokiej w kolejnych latach badań wynosił się od 12,7 do 23,5 t · ha⁻¹. W pierwszym roku krzewy opryskiwane preparatem wdrożeniowym (T3) plonowały najslabiej osiągając 12,7 t · ha⁻¹, zaś najlepiej opryskiwane nawozami z biostymulacją i prekursorami fitohormonów (T4) 15,7 t · ha⁻¹, w przypadku kontroli (T1) i po zastosowaniu preparatu Maxifruit z biostymulacją i prekursorami fitohormonów (T2) plon wyniósł 13,0 t · ha⁻¹. W 2020 roku krzewy plonowały istotniej lepiej niż w 2019 roku. W drugim roku badań zaobserwowano podobną do 2019 roku zależność w rozkładzie wielkości plonu krzewów borówki. Rośliny opryskiwane preparatami z biostymulacją i prekursorami fitohormonów (T4) plonowały najlepiej osiągając 23,5 t · ha⁻¹, zaś najslabiej opryskiwane preparatem wdrożeniowym (T3) osiągając poziom 15,4 t · ha⁻¹. Wpływ ekstraktów z alg morskich na wielkość plonu i jakość owoców związany jest z obecnością substancji bioaktywnych, w tym również o charakterze hormonalnym takich jak cytokiny, które są odpowiedzialne za podziały komórkowe (Featonby-Smith and Van Staden 1983 a, b). W poniższej pracy nie wykazano istotnego wpływu zastosowanych nawozów z biostymulacją na pole powierzchni liści borówki wysokiej. W badaniach Kapłań i in. (2013) stwierdzono korzystny wpływ biostymulatorów na pole powierzchni liści jabłoni odmiany ‘Szampion’ w drugim i trzecim roku badań. Jak podają Ferrini i Niceise (2002) zastosowanie biostymulatorów na sadzonkach *Quercus robur* miało korzystny wpływ na pole powierzchni i suchą masę liści. Zastosowane w niniejszej pracy nawozy z biostymulacją nie miały istotnego wpływu na poziom ekstraktu z owoców borówki wysokiej odmiany ‘Bluecrop’. Podobnie Kapłań i in. (2013), po zastosowaniu nawozów z wyciągami z alg morskich w uprawie jabłoni odmiany ‘Szampion’ nie wykazali istotnego wpływu nawozów z algami morskimi na zawartość ekstraktu w owocach. W badaniach własnych wykazano natomiast istotny wpływ roku badań na oceniany parametr jakości. W pierwszym roku badań (2019) owoce borówki charakteryzowały się istotnie większym poziomem ekstraktu, niż w 2020 roku. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Yvin i Dufils (2010) wykazano, że zastosowanie nawozów z biostymulacją nie miało korzystnego wpływu na jędrność owoców jabłoni w trakcie zbioru, w porównaniu

z zastosowaniem chlorku wapnia. W pracy Yvin i Dufils (2010) stwierdzono, że owoce opryskiwane preparatem wapniowym z biostymulacją po trzech miesiącach przechowywania charakteryzowały się mniejszą utratą jędrności niż kontrolne. Analiza jędrności owoców borówki w badaniach własnych wykazała, że oceniany parametr zależał od zastosowanych nawozów. Według analizy owoców z krzewów opryskiwanych nawozami z biostymulacją i prekursorami fitohormonów (T4) jagody były jędrniejsze niż te z kombinacji kontrolnej (T1).

I.2.2. Wpływ nawozów z biostymulacją na właściwości prozdrowotne owoców borówki wysokiej (Publikacja B)

W niniejszej pracy oceniono wpływ preparatu wdrożeniowego na tle innych nawozów z biostymulacją na wskaźniki prozdrowotne borówki wysokiej. W doświadczeniu zastosowano podobny poziom nawożenia mineralnego we wszystkich zabiegach. Badano czy nawozy z wyciągiem z alg morskich wpływają tak samo na właściwości prozdrowotne owoców borówki wysokiej co zwykle nawozy bez biostymulacji. W badanych owocach oznaczono aktywność przeciwutleniającą, zawartość polifenoli oraz przeprowadzono analizę ilościową i jakościową antocyjanów. Celem niniejszego badania jest dostarczenie producentom i konsumentom informacji odnośnie potencjalnego wpływu produktów biostymulujących na właściwości prozdrowotne owoców borówki wysokiej. Jak donoszą Mooney i Van Staden (1986) preparaty oparte na wyciągach z alg morskich wpływają korzystnie na metabolizm roślin, wspierają wzrost, odporność na patogeny oraz zwiększają aktywność przeciwutleniającą owoców. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wskazują na pozytywny wpływ związków aktywnych pozyskiwanych z alg morskich na prozdrowotność owoców borówki wysokiej. Należy podkreślić, że wysoka aktywność przeciwutleniająca owoców borówki wysokiej potwierdzona w kombinacji T4, może wynikać z użycia kilku nawozów z biostymulacją zawierających związki aktywne pozyskane z alg morskich oraz roślin tropikalnych i pustynnych. Interesujące wyniki badań prezentują Graziani i in. (2022). Autorzy podkreślają znaczenie zastosowania biostymulatorów w uprawie *Olea europaea* w celu łagodzenia skutków stresów abiotycznych (wysokiej temperatury i suszy). W badaniach Graziani i in. (2022) stwierdzono, że zastosowanie preparatów opartych na wyciągach z alg morskich wywołało zwiększenie pola powierzchni liści, a równocześnie obserwowano istotne statystycznie zmiany w kontekście aktywności przeciwutleniającej oraz zawartości polifenoli. Podobne wyniki dotyczące owoców jabłoni 'Gala Must' uzyskali Nagy i in. (2019) wskazując, że preparat

nawozowy z biostymulacją, zawierający wyciągi z alg morskich znacząco polepszał właściwości antyoksydacyjne w jabłkach badanej odmiany. Ambroszczyk i in. (2016) udowodnili, że owoce pomidora opryskiwane preparatami z biostymulacją posiadały istotnie wyższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu do owoców nie traktowanych preparatami zawierającymi wyciągi z alg morskich. W doświadczeniu własnym stwierdzono wyższą zawartość polifenoli ogółem w owocach borówki wysokiej po zastosowaniu preparatów zawierających substancje biostymulujące z prekursorami fitohormonów (T4). Podobną zależność potwierdziła Mikos-Bielak (2004). Autorzy wykazali, że zastosowany w uprawie malin nawóz z ekstraktem z alg morskich, wpłynął na 30% wzrost zawartości polifenoli w owocach w stosunku do owoców z kontroli. Zgodnie z doniesieniami DeBoer (2005) polifenole zawarte w roślinach nie tylko wpływają prozdrowotnie na organizm ludzki, ale pełnią także ważne funkcje obronne w organizmach roślinnych. W pracy badawczej Paradiković i in. (2011) autorzy oceniali wpływ ekstraktów z alg morskich na aktywność przeciwutleniającą oraz zawartość polifenoli w owocach. Najbardziej efektywne okazały się nawozy z biostymulacją zawierające połączenie kilku substancji biostymulujących. Podobne obserwacje uzyskano również w niniejszej pracy

6 . JEDNOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI I OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW

RESEARCH ARTICLE

Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry

Agnieszka Lenart^{1*}, Dariusz Wrona¹, Kamila Klimek², Magdalena Kapłan³, Tomasz Krupa¹

1 Department of Pomology and Horticultural Economics, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Belsk Duży, Poland, **2** Department of Applied Mathematics and Computer Science, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland, **3** Department of Pomology, Nursery and Enology, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland

* agnieszka_lenart@sggw.edu.pl



Abstract

The aim of the research was to evaluate fertilization technologies for the indicators of the quality and quantity of highbush blueberry yield. In the experiment, a similar level of mineral fertilization was used in all treatments. The experiment was to show the differences between fertilization with biostimulation and without biostimulation. The research was carried out in two seasons (2019–2020) on ‘Bluecrop’ shrubs growing in the Blueberry Experimental Field in central Poland (51° 55'42.7 "N 20° 59'28.7" E). Shrubs grow at a distance of 1 x 3 m. Plants are rejuvenated every year in spring and irrigated by drip. The experiment was carried out in a random block design (4 fertilizer treatments x 5 replications x 6 bushes). The experiment assessed the effect of fertilization on yield, berry mass, fruit setting, leaf surface and physicochemical parameters of fruit. Based on the conducted research, it was proved that the applied fertilization technologies had a significant impact on the size and quality of the yield of “Bluecrop” highbush blueberry. Particularly noteworthy is the fertilization technology with biostimulation (treatment T4), which has a positive effect on the yield, fruit mass, percentage of setting and firmness of the berries. Analysis of the issue in the light of the results of the conducted research shows that the use of biostimulated products has an important impact on the intensification of production while maintaining good quality of fruits. Through research, the positive effect of fertilization programs with biostimulation (treatment T4) on the most important production parameters of blueberry fruit from the producer’s point of view has been proven.

OPEN ACCESS

Citation: Lenart A, Wrona D, Klimek K, Kapłan M, Krupa T (2022) Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLoS ONE 17(7): e0271383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383>

Editor: Sajid Ali, Bahauddin Zakariya University, PAKISTAN

Received: January 16, 2022

Accepted: June 30, 2022

Published: July 20, 2022

Copyright: © 2022 Lenart et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Constantly growing consumer demand for blueberry fruit makes the cultivation of this species expand, year by year, in Poland and around the world. The high demand for highbush

blueberry fruit is driven by its pro-health and taste values, as well as a wide-ranging campaign promoting blueberry as superfoods. According to the International Blueberry Organization, the production of blueberries in 2020 exceeded 1 million tons worldwide [1]. In recent years, the agricultural sector has faced the challenges of increasing production in order to feed a growing world population and use resources efficiently, while reducing the impact of agricultural production on ecosystems and human health. Fertilizers and pesticides play a key role in agriculture, providing growers with a tool to increase and ensure high-quality yield, both under optimal and stressful conditions [2]. An innovative and environmentally friendly solution is the use of natural plant biostimulants, which support flowering, plant growth, fruit setting, yielding and nutrient use efficiency, as well as increasing tolerance to a wide range of abiotic stressors [3]. Substances containing seaweed increase the tolerance to abiotic stress, and improve plant performance and durability of the fruit, so unique chemical composition of marine algae is associated with the environment in which they live (salt water, low temperatures, lack of light, the periodic ebb and drying) [4, 5].

Of particular interest are fertilizers with biostimulation that are using extracts of marine algae. The complex chemical composition of seaweed extracts containing valuable nutrients and biostimulants, i.e. macro and microelements, amino acids, vitamins, cytokinins, auxins, abscisic acid (ABA) [6–9], determines their way of interaction in plants. The great advantage of marine algae is their growth power, which is ten times greater than that of maize. About 250 tons of *Laminaria Digitata* algae are obtained from one hectare of the sea surface, while about 22 tons of dry matter of maize from one hectare of land [10]. Although marine algae have been used in agricultural production for decades and the first records of their use as a fertilizer are dated as late as 16th century, [11–13] there is still no legal definition of biostimulation or biostimulant. Defining the biological basis of biostimulants as a class of compounds complicates the variety of biostimulants available on the market. These include bacteria, fungi, sea algae extracts, telomic plant extracts, raw materials of animal origin. The same is true for the variety of industrial processes implemented for the preparation of biostimulant products [14]. Du Jardin (2015) [15] proposed the following definition: "A plant biostimulant is any substance or microorganism applied to plants with the aim to enhance nutrition efficiency, abiotic stress tolerance and / or crop quality traits, regardless of its nutrients content. By extension, plant biostimulants also designate commercial products containing mixtures of such substances and / or microorganisms". Based on this definition, we assume that biostimulants have a beneficial effect on crop productivity by interacting with plant physiological processes, increasing plant resistance to stress [16]. Biostimulation in agriculture has been the subject of many recent studies showing that plants' stress response is regulated by signaling molecules produced by the plant or related microorganisms [17–19]. Biostimulants can either directly interact with signaling molecules generated by plants or stimulate plant-related and beneficial microorganisms [16]. From the perspective of growing consumer demands, with the changing availability of plant protection products and changing climatic conditions, stimulating the natural resistance and yield of plants using natural bioactive substances [20] is the most effective method of building both the quantity and quality of the crop. Compounds contained in marine algae, not only have a positive effect on the soil structure and its water capacity [21], but also stimulate the development of beneficial soil microorganisms [13]. Plants treated with sea algae extracts take up and assimilate nutrients faster than untreated plants [22], are characterized by stronger growth [13, 22] and have a well-developed root system with numerous fine side roots [23, 24]. Calvo et al., 2014; Rose et al., 2014 [25, 26] provide evidence that biostimulants can increase macronutrient uptake and have been attributed to an effect on the absorption activity or stimulation of nitrogen metabolism. Also, Saa et al., (2015) [27] report that in the experiment with almonds grown in conditions of high nutrient supply, sea algae extracts or products

of microbial fermentation of cereal grains clearly had a positive effect on shoot growth and leaf surface. Algae extracts have a positive effect on the effectiveness of plant protection against diseases and pests [28, 29], increase tolerance to drought [30] and high temperature [31–33].

In addition to proper mineral fertilization, biostimulants can increase the effectiveness of conventional fertilizers [34], absorb and accumulate greater amounts of macronutrients at the leaf level [22]. In the studies of Mancuso et al [22], the IPA extract (Adenine Isopentyl) had an effective impact on the accumulation of nitrogen, phosphorus and potassium in grapevine plants. The role of biostimulants in the accumulation of nutrients at the tissue level is still under investigation. According to Salat, [35] biostimulators may contain chelating agents (e.g. mannitol in seaweed), which can enhance the availability of nutrients and a better absorption of the chelate from the surface of the leaves. In this manuscript, the authors assessed the impact of fertilization technology on the quality and yield of blueberries. The aim of the study was to show the differences between fertilization with and without biostimulation. The purpose of the research is new, and the products used for the research are innovative. The conducted research provides knowledge on the use of fertilization with biostimulation in blueberry cultivation.

Research methodology

This work was carried out under the program of the Ministry of Science and Higher Education "Doktorat Wdrożeniowy" no. um. 0060 / DW / 2018/02. The aim of the program is to create conditions for the development of cooperation between the scientific community and the socio-economic community conducted as part of doctoral studies, introducing the possibility of educating a participant of doctoral studies in cooperation with the entrepreneur (or other entity) employing him/her. The research was carried out in 2019–2020 at the Experimental Blueberry Field, Warsaw University of Life Sciences in Błonie near Prażmów, central Poland (51° 55'42.7 "N 20° 59'28.7" E). More than 30-year-old shrubs of the 'Bluecrop' cultivar grow at a spacing of 1 x 3 m. In accordance with IPO practices, plant protection treatment like rejuvenating pruning is carried out in the quarters, and in addition to that, the quarters are irrigated by drip. The pH range of the substrate during the experiment was between 4,5 and 4,8. In the experiment, the soil was tested in a certified laboratory of the Regional Chemical and Agricultural Station in Łódź (Table 1) and, on account of the results, nutrients were supplemented to optimal values (Table 2). Permission was obtained from Warsaw University of Life Science to collect plant materials and all study/experimental protocols involving plant materials were conducted in accordance with institutional, national, and international guidelines and legislation.

The research material consisted of shrubs and blueberries of 'Bluecrop' highbush cultivar. The experiment was carried out in a random block system. Four fertilizer treatments were tested, with five repetitions in each treatment. Each replicate contained six plants. In 2019, the

Table 1. Test report no. GO / 502/18.

Code letter-digit sample	Customer's sample labelling	Salinity	pH	Content in mg / l						
		g NaCl / l	in H ₂ O	N-NO ₃	N-NH ₄	P	K	Ca	Mg	Cl
GO / 502/4/18	4	0.08	4.9	<10.0 *	<10.0 *	<20.0 *	<20.0 *	245	20	<10.0 *
Research Procedure / Standard		PB 02 ed. 3 from March 1, 2018	PB 01 ed.2 from March 1 2018	PB 06 ed.1 from May 28, 2004	PB 69 ed.1 from April 3 2017	PB 03 ed.2 from March 19, 2007	PB 04 ed.1 from May 21, 2004	PB 04 ed.1 from May 21, 2004	PB 05 ed.1 from May 28, 2004	PB 07 ed.1 from May 28, 2004

* /—result below the lower range of the method.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.t001>

Table 2. Sum of nutrients used in the experiment in all assessed treatment (K,T,M,W).

N [kg / ha ⁻¹]	P ₂ O ₅ [kg / ha ⁻¹]	K ₂ O [kg / ha ⁻¹]	SO ₃ [kg / ha ⁻¹]	CaCO ₃ [kg / ha ⁻¹]
100	30	92.5	142	64

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.t002>

harvest was carried out from 01.07.2019 to 10.08.2019 and in 2020 from 05.07.2020 to 05.08.2020. Harvested fruit was a collective sample, averaged from all harvests. The experiment assessed the effect of biostimulation on yield, mass of 100 berries, fruit setting, leaf surface and quality parameters of fruit.

- 'Treatment T1'—included traditional sprinkling and foliar fertilization without bioactive substances (control treatment).
- 'Treatment T2'—included traditional sprinkling and foliar fertilization extended with a preparation containing phytohormone precursors and biostimulants.
- 'Treatment T3'—included traditional sprinkling and foliar fertilization extended with an implementation preparation (currently ongoing registration studies) containing bioactive substances.
- 'Treatment T4'—soil and foliar fertilization with preparations containing biostimulation was applied in treatment.

In the performed experiment, in each treatment, the amount of nutrients supplied to the plants (N, K, P, Mg etc.) was equal or very close. The assessed factor was the method of fertilization and active compounds (biostimulants) occurring in various forms and concentrations.

In treatment T1 traditional sprinkled and foliar mineral fertilizers available on the market were used (Table 2), containing no additional bioactive or anti-stress substances. Combination T1 is a control where only mineral fertilization was used, without biostimulation.

Treatment T2 used a biostimulating product (N 3%, P 7%, K 7%, Mn 0,05%, Zn 0,1%) with complex NMX[®] (Patent No. EP 01500090.4) It is a growth stimulating composition for plants characterized by one or several of the following components: a precursor compound of cyclic AMP (cyclic adenosine monophosphate) for its transformation in the latter compound in the interior of the cells, a compound with the capacity to inhibit the activity of the enzymes of the phosphodiesterases family, a compound with the capacity to stimulate the activity of the enzymes of the Adenyl- Cyclase family, an agonist compound of the β-adrenergic receptors, a chosen compound between arachidonic acid or a prostaglandin. According to the producer, this product is a natural enhancement of all plants' processes involved in fruit setting, complete and sustainable action to support the plant from fruit setting to fruit ripening, reinforcement of the development of the fruits coming from the parthenocarpic.

In treatment T4, the full biostimulation program recommended by the manufacturer of fertilizers based on marine algae extracts was used. The complex NMX[®] was used as in treatment M, and biostimulating complex Fertiactyl[®] (patent number 945000107) combining 3 active substances (humic and fulvic acids, glycine-betaine, zeatine) and mineral elements (N 13%, P 5%, K 8%) that work in synergy. According to the producer, it improves abiotic stress resistance to external pressures (heat stress and drought stress). When the stress occurs, glycine-betaine complex stabilizes the balance of water / mineral salts in the leaves, enabling them to keep working. Biostimulation complex improves photosynthesis by protecting the chloroplasts from aging, naturally stimulates the development of new organs rooting and tillering. Additionally, the Seactiv[®] complex (Patent No. EP98400150.3)—contains seaweed extracts and mineral nutrients, whereas the main components are a hormonal precursor like isopentyl of adenine, natural osmolytes (glycine

—betaine) and amino-acids. According to the producer, the complex of phytohormones, increases plant's tolerance to stresses whilst boosting its physiological processes. It also enhances root development, nutrient absorption and nutrient movement within the plant, as well as increases the homogeneity (evenness) of crops through delayed senescence "Stay Green Effect". What is more, leaf photosynthesis is optimized, while also ensuring homogenous fertilization, flowering and quality of fruit / grain yield. Also, soil fertilization was based on a preparation with biostimulation. Nprocess[®] complex (NPK 8-8-17, MgO 3%, SO₃ 29%, CaCO₃ 14%, B 0,15%, Zn 0,1%)—allows a constant flow of nitrate with increased absorption ("pump effect"), improves nitrogen transformation within the plant, therefore generating more protein and Dry Matter (DM). N-PRO is an Indolic hormone which enhances the action of nitrate reductase and stimulates crop demand for nitrogen, which is essential for fast and effective conversion of nitrates into useable plant proteins. The Top-Phos[®] complex (NPK 5-10-15, CaO 10%, MgO 3%, SO₃ 37%, B 0,15%, Zn 0,1%) used, is a new molecule of phosphorus that contains an organic matrix being immediately available for plant uptake throughout the growing season. Phosphate availability is combined with a root system stimulator and a biological activity booster.

In treatment T3, a new type of biostimulation was used, based on extracts from the Kaori tree and sea algae, with bioactive properties, aimed at improving the physiological processes in crops (preparation under registration studies).

Both the yield of the experiment and the mass of 100 fruits were assessed based on the unit mass of the fruit harvested within the replication. Measurements were made using a precise digital scale Elegance (Höffman, Braunschweig, Germany). Assessment of setting was performed for each treatment on 15 representative perennial shoots (100 flowers were counted in 12 replications for each treatment). Flowers were counted at the beginning of flowering, then fruit buds were counted 21 days after flowering. Based on the number of flowers in relation to the number of fruits, the degree of fruit set was calculated. Leaf area was assessed on the grounds of 1.200 representative leaves within each treatment using the 3100 Area Meter (PG Debrunner Ing, Bad Homburg, Germany).

Fruit acidity was determined by titration according to PN-EN 12147: 2000 [36] standard. To determine the acidity, 20 fresh fruits from each replication were used. The juice for the test was obtained by crushing the fruit with a DI 25 Basic mill (Kika-Werke GMBH and CO, Stauf, Germany) and then the obtained homogenate was centrifuged for 10 minutes at 2° C. The juice was mixed with distilled water in a ratio of 1:10 (v:v) and titrated with 0,1 M NaOH to pH 8.1 using TitroLine 5000 (Si Analytics, Mainz, Germany). The amount of NaOH consumed was then converted to the percentage of citric acid.

Fruit firmness was measured according to the method described by Szpadzik et al [37] on 20 freshly picked fruits from each repetition. The INSTRON 5542 firmness gauge was used for the analyzes (Instron Corporation, Norwood, Massachusetts USA). A 4.5 mm diameter pin was used to measure fruit firmness by inserting the pin 5 mm into the fruit pulp. Measurements were made once on each fruit in the vertical part. The results are given in Newtons.

The content of the extract was determined in accordance with the PN-EN 12143: 2000 [38] standard in the fruit juice of each repetition. The analysis of the extract content was performed using a PR-32 ALPHA digital refractometer (Atago, Tokyo, Japan). Clear juice for the test was obtained the same way as in the measurement of titratable acidity.

Statistical analysis

Test results were analyzed statistically using the one-way analysis of variance method. The inference was based on the significance level <0.05. All statistical analyzes were performed in the SAS Enterprise Guide 5.1 program (Sas Institute Sp. z o.o., Warsaw, Poland).

Results

The yield of 'Bluecrop' blueberry fluctuated from 4.2 to 5.9 kg/shrub⁻¹ i.e. from 14.1 to 19.5 t ha⁻¹ and significantly depended on the fertilization technology used and the year of research (Table 3). Shrubs from treatment W yielded significantly lower than those with technology with biostimulation from treatment T. Regardless of the treatment used, in 2020, the plants yielded significantly better than in 2019. Statistical analysis showed a significant impact of the applied fertilization technologies on the mass of highbush blueberries (Table 3). It was found that the bushes fertilized with the biostimulation technology (T4) had a significantly higher mass of 100 berries than the control bushes (T1). There was no significant influence of the study year on the trait studied. The setting degree of "Bluecrop" highbush blueberry was significantly modified by the fertilization technology (Table 3). The bushes treated with biostimulation preparations (T4) were characterized by a significantly higher level of fruit setting than those sprayed with the implementation preparation (T3). There was no significant influence of the study year on the trait studied. The leaf area of highbush blueberry shrubs ranged from 21.5 to 22.7 cm² and did not differ significantly between the treatments used and the years of research (Table 3). The level of acidity of blueberry fruits was significantly influenced by the fertilization technology, the fruits from the shrubs sprayed with the implementation preparation (T3) were characterized by a significantly lower level of acidity than the control ones and treated with the biostimulation technology (T4) (Table 3). There was no significant influence of the study year on the trait studied. The interaction of the fertilization technology and the research year was significant for the analyzed parameter. Blueberry fruit extract ranged from 11.6 to 12.1% and did not differ significantly between the assessed treatments (Table 3). A substantial influence of the study year on the assessed fruit quality parameter was demonstrated. In the first year of the study, blueberries were characterized by a significantly higher level of extract than in 2020. The fruit firmness significantly depended on the fertilization technology used, the shrubs treated with the biostimulation technology (T4) had significantly firmer berries than the control berries (T1) (Table 3). A major impact of the study year on the assessed fruit quality parameter was demonstrated, in 2019 blueberries were notably less firm than in 2020 (Table 3).

The yield of highbush blueberries in the subsequent years of research ranged from 12.7 to 23.5 t ha⁻¹. In the first year, the bushes treated with the implementation preparation (T3)

Table 3. Influence of fertilization technology on the yield and quality of 'Bluecrop' highbush blueberry.

	Average yield per bush [kg / bush ⁻¹]	Average yield per hectare [t / ha ⁻¹]	Mass of 100 berries [g]	Average fruit setting, [%]	Leaf area [cm ²]	Acidity [% citric acid]	Soluble solids [Brix °]	Firmness [N]
T1 -Control	5.1 ± 1.5 AB	16.9 ± 5.1 AB	200.1 ± 13.9 B	83.7 ± 11 AB	21.5 ± 5.2 A	0.63 ± 0.05 B	11.8 ± 1.2 A	3.5 ± 0.3 B
T4—Technology with biostimulation	5.9 ± 2.5 A	19.5 ± 8.2 A	224.7 ± 13.9 A	93.8 ± 7 A	22.7 ± 0.8 A	0.59 ± 0.12 B	12.1 ± 1.1 A	3.8 ± 0.3 A
T2- Preparation with hormone precursors	4.8 ± 1.2 AB	15.85 ± 3.8 AB	209.5 ± 9.9 AB	88.7 ± 4 AB	21.7 ± 1, 4 A	0.65 ± 0.07 AB	12.1 ± 1.3 A	3.7 ± 0.3 AB
T3—Implementation preparation	4.2 ± 0.6 B	14.1 ± 2.1 B	210.23 ± 16.3 AB	83.3 ± 11 B	21.9 ± 1.5 A	0.73 ± 0.11 A	11.6 ± 1.5 A	3.7 ± 0.3 AB
<i>p-value</i>	0.0574	0, 0574	0.0047	0.0308	0.8227	0.0005	0.0773	0.0485
2019	4.2 ± 1.5 B	13.6 ± 4.1 B	210.1 ± 13.4 A	89 ± 8 A	22, 2 ± 2.9 A	0.66 ± 0.01 A	13.1 ± 0.3 A	3.4 ± 0.1 B
2020	5.9 ± 1.5 A	19.5 ± 5.1 A	212.2 ± 18.4 A	86 ± 10 A	21.7 ± 2.7 A	0.64 ± 0.12 A	10.7 ± 0.5 B	3.9 ± 0.2 A
<i>p-value</i>	0.0002	0.0002	0.6521	0.3207	0.6316	0.4562	<0.0001	<0.0001
Treatment * YEAR	0.5266	0.5266	0.5076	0.9043	0.9926	0.0001	0.1593	0.9559
<i>p-value</i>								

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.t003>

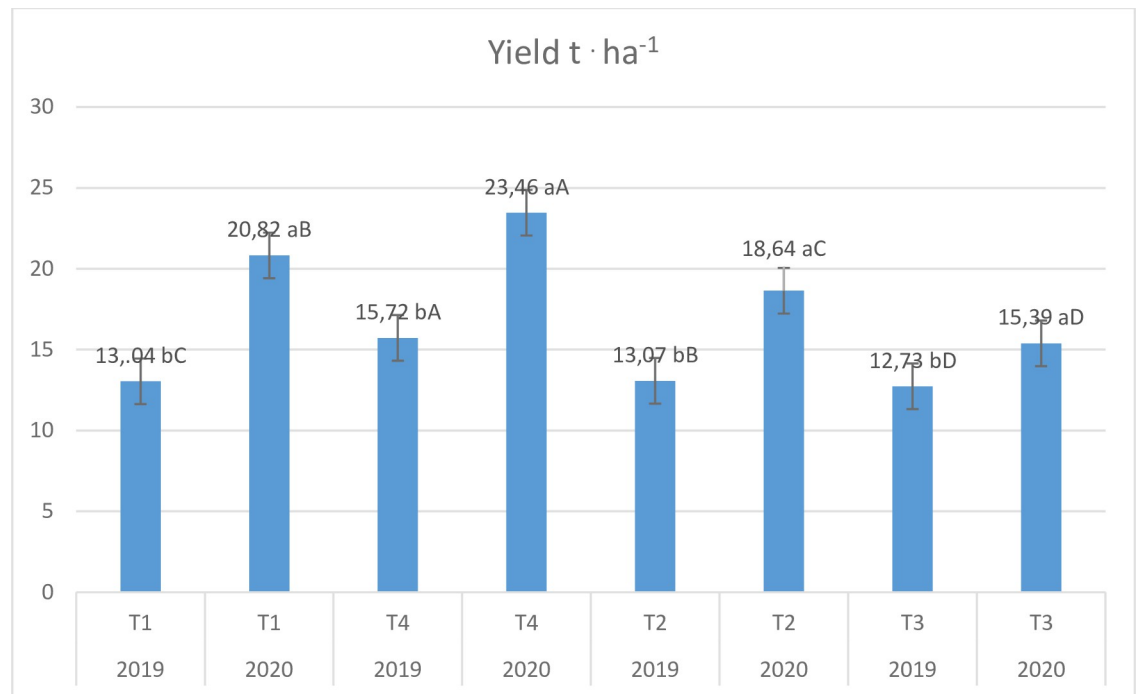


Fig 1. Yield of 'Bluecrop' highbush blueberry in the subsequent years of research depending on the fertilization technologies used. Error bars indicate standard error.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.g001>

yielded the lowest, reaching 12.7 t ha^{-1} , while the best treated with the technology with biostimulation (T4) 15.7 t ha^{-1} , in the case of control (T1) and after the application of the preparation with hormone precursors, the yield was 13.0 t ha^{-1} (Fig 1). In 2020, the shrubs yielded significantly better than in 2019 (Table 3). In the second year of the study, a similar relation to 2019 was observed in the distribution of the yield of blueberry shrubs (Fig 1). Plants treated with preparations with biostimulation (T4) yielded the best, reaching 23.5 t ha^{-1} , while the least treated with the implementation preparation (T3), reaching the level of 15.4 t ha^{-1} .

The Pearson correlation coefficient of the multivariate analysis was performed for individual treatments, regardless of the year of the study (Table 4). It was shown that in all analyzed treatments, the level of extract in blueberry fruit decreased with the increase in yield, which was confirmed by a significant negative correlation. A substantially positive correlation of firmness with an increase in the yield was demonstrated for the control treatment (T1), with the preparation with hormone precursors (T2) and the implementation preparation (T3). Fruit acidity negatively correlated with the yield, with the increase in the yield, the acidity parameter decreased in the control (T1) and with the use of biostimulation technology (T4). The last crucial correlation in the analyzed parameters is the degree of fruit set. It was found that in the case of the technology with biostimulation (T4) and the implementation preparation (T3), it strikingly negatively correlated with the fruit yield.

Analyzed irrespective of the treatments used and the year of the study, Pearson correlation coefficient showed a substantial correlation between acidity, extract and firmness in relation to the fruit yield, and showed a strong negative correlation between the extract and firmness (Table 5).

Cluster analysis (Fig 2) showed a division into three main clusters, with each cluster relating to individual fruit quality parameters. The first cluster consisting of individual treatments of

Table 4. Pearson’s correlation coefficients for multivariate analysis of the impact of fruit yield, t ha⁻¹ for blueberry fruit parameters.

Treatments	Mass of 100 berries [g]	Average fruit setting, [%]	Leaf area [cm ²]	Acidity [% citric acid]	Soluble solids [Brix°]	Firmness [N]
Control-T1	0.18171	-0.23407	-0.29665	-0.61421	-0.79708	0.57718
	0.6154	0.5151	0.4052	0.0589	0.0058	0.0806
Technology with biostimulation-T4	0.26522	-0.47290	-0.07315	-0.41364	-0.51991	0.13284
	0.4589	0.1675	0.8408	0.2347	0.1235	0.7145
Preparation with the precursors of the hormones-T2	-0.30462	0.25847	0.09849	-0.22662	-0.49771	0.64642
	0.3921	0.4709	0.7866	0.5289	0.1432	0.0434
Implementation preparation-T3	-0.25648	-0.49720	-0.33165	0.30559	-0.71724	0.69862
	0.4744	0.1437	0.3492	0.3905	0.0195	0.0246

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.t004>

the firmness parameter showed a division into two subsequent clusters, of which the first group is the technology with biostimulation (T4) and the preparation with hormone precursors (T2), whereas the second group is the implementation preparation (T3) and control (T1). In the case of firmness, similarities were demonstrated between the technology with biostimulation (T4), the preparation with hormone precursors (T2) and the implementation preparation (T3), while the deviating object is the control (T1). The acidity parameter showed similarity between the control (T1), the preparation with hormone precursors (T2) and the biostimulating technology (T4), whereas the deviating object was the implementation preparation (T3) (Fig 2).

The sum of PC (PC1 and PC2) of the total variable of traits for the fruit of “Bluecrop” highbush blueberry was 48.96% (for PC1 31.63% and for PC2 17.33%, respectively) (Fig 3). When considering the analysis of the parameters of the yield size and quality in 2019, a similarity between specific parameters that formed four groups was observed. The first group is the relationship between the yield and the leaf area, the second is the relationship between the acidity and the mass of 100 berries. The third group is the degree of fruit set and firmness, and the fourth is the extract, which is independent of other parameters (Fig 3).

The sum of the PC of the total variable for the analyzed traits for “Bluecrop” highbush blueberry fruit was 57.05% (36.69% for PC1 and 20.36% for PC2, respectively) (Fig 4). When

Table 5. Pearson’s correlation coefficient for the parameters of yield size and quality.

Fertilizer treatments	Average yield per hectare [t / ha ⁻¹]	Mass of 100 berries [g]	Average fruit setting, [%]	Leaf area [cm ²]	Acidity [% citric acid]	Soluble solids [Brix °]	Firmness [N]
Average yield per hectare t / ha	1	0.1787	-0.0672	-0.0954	-0.4103	-0.4530	0.3585
		0.2699	0.6805	0.5580	0.0085	0.0033	0.0231
Mass of 100 berries g	0.1787	1	0.0778	0.0047	-0.2420	-0.0089	0.1272
	0.2699		0.6333	0.9770	0.1325	0.9568	0.4343
Average fruit setting,%	-0.0672	0.0778	1	0.1859	-0.2245	0.2583	-0.0860
	0.6805	0.6333		0.2509	0.1638	0.1076	0.5979
Leaf area cm ²	-0.0954	0.0047	0.1859	1	0.0517	0.0892	-0.1378
	0.5580	0.9770	0.2509		0.7515	0.5843	0.3965
Acidity% citric acid	-0.4103	-0.2420	-0.2245	0.0517	1	-0.1523	-0.1221
	0.0085	0.1325	0.1638	0.7515		0.3482	0.4528
Soluble solids Brix	-0.4530	-0.0089	0.2583	0.0892	-0.1523	1	-0.7298
	0.0033	0.9568	0.1076	0.5843	0.3482		<0.0001
Firmness N	0.3585	0.1272	-0.0860	-0.1378	-0.1221	-0.7298	1
	0.0231	0, 4343	0.5979	0.3965	0.4528	<0.0001	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.t005>

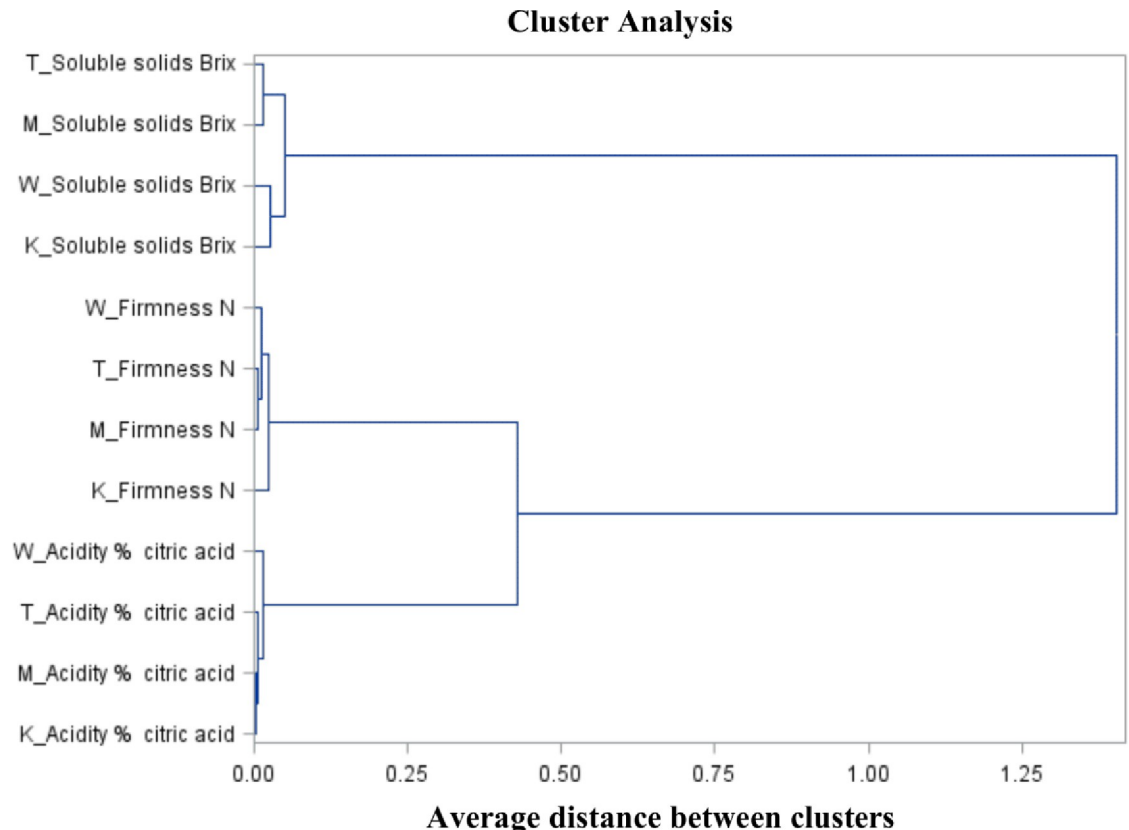


Fig 2. Branching-tree diagram for the extract, firmness and acidity of 'Bluecrop' highbush blueberry fruit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.g002>

analyzing the assessed parameters in 2020, three groups of clusters were found. The first and second are independent parameters: acidity and yield. The third and largest group of dependent features are firmness, leaf surface, degree of fruit set, mass of 100 berries and extract (Fig 4).

Discussion

Bioactive substances influence several physiological processes taking place in the plant at the cellular level. This improves the efficiency and functioning of the entire plant organism [39]. There are many studies in the literature showing the positive effect of biostimulation preparations on the overall biological performance of plants [40, 41]. The above dependence was confirmed in the present study, where the biostimulating program had a positive effect on the yield and the degree of fruit set in comparison to the other treatments, in the case of the implementation preparation (T3) this effect was significant. This dependence may result from the fact that plants treated with sea algae extracts not only take up and assimilate nutrients faster compared to untreated ones [22], they are also characterized by more robust and stronger growth [9, 21] and finally, have a well-developed root system with numerous small side roots [23, 24] capable of wider nutrient uptake. Ohta et al. (2004) [42] showed that phyto regulators used around flowering, improve flowering efficiency, flowers vitality, pollen vitality and quality, and the efficiency of the pollination and fertilization process, which directly translates into improved fruit quality and quantity. Abetz and Young (1983) [43], Featonby-Smith and Van Staden (1987 a, b) [44, 45], Arthur et al. (2003) [46] report that applications of preparations

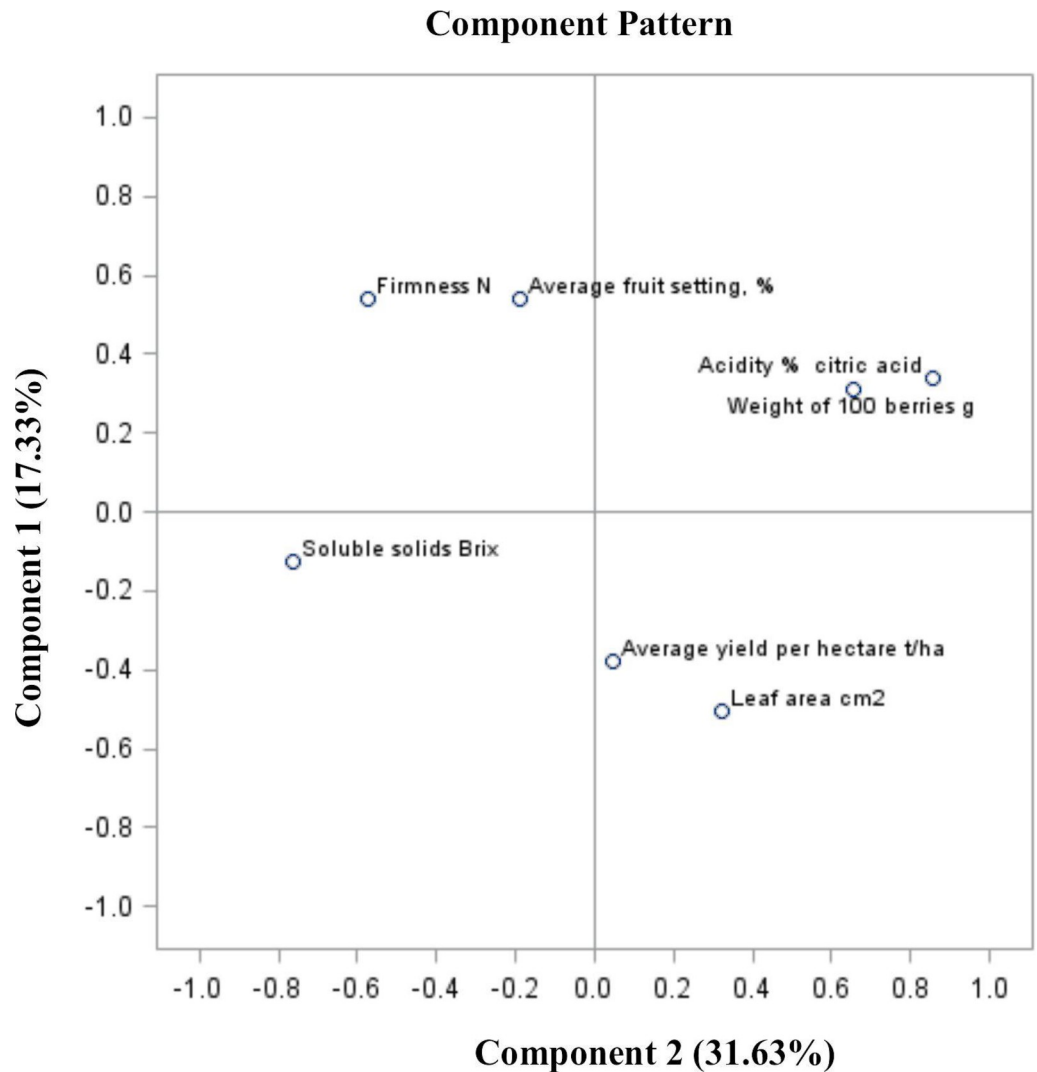


Fig 3. PCA analysis of blueberry fruit in terms of yield size and quality parameters in 2019.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.g003>

based on sea algae extracts contribute to earlier flowering, better setting and fruit development of many crops. Also, in the research presented in this paper, the positive effect of biostimulating preparations on the setting and mass of the tested fruit was proved. The degree of fruit set in shrubs treated with the biostimulating program (T4) was the highest among all the assessed treatments, compared to the implementation preparation (T3), this effect was significant. A substantially better degree of fruit setting in treatment T4 is associated with the beneficial effect of sea algae extracts on reducing biotic and abiotic stresses—on the effectiveness of plant protection against diseases and pests [28, 29], drought tolerance [30] and high temperature [31–33]. The size of the fruit determined by the mass of 100 berries in the treatment with the biostimulating program was the highest among all the assessed treatments, these differences were significant compared to the control. Crouch and Van Staden (1992) [47] showed that tomato plants treated with seaweed extracts produced on average 30% larger and better-quality fruit than the control. Similar dependencies were proved in the work of Zadope et al. (2011) [48], foliar fertilizer application with sea algae extracts improved the tomato yield by 5% in relation to the control treatment. The beneficial effect of *Ascophyllum nodosum* (L.) algae on the size

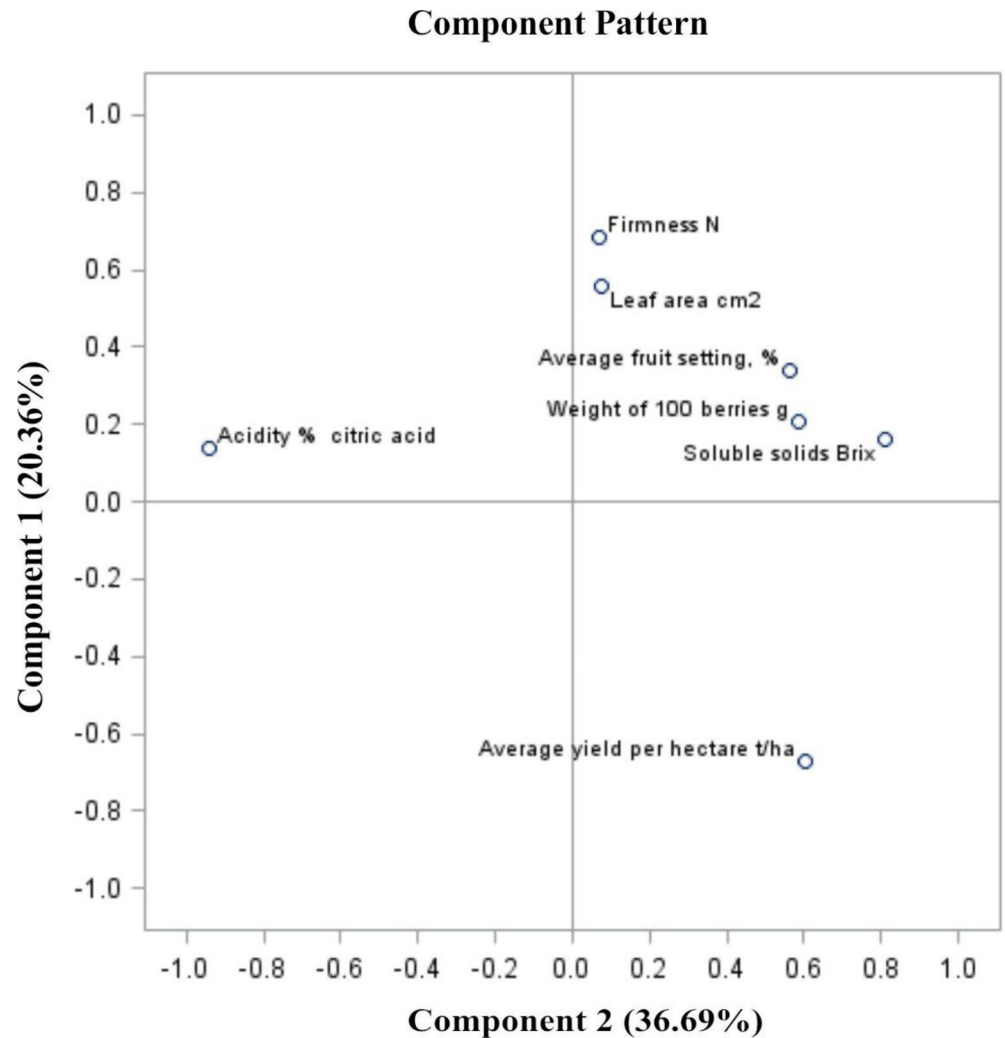


Fig 4. PCA analysis of blueberry fruit in relation to the parameters of the size and quality of the crop in 2020. [component 1, 2].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271383.g004>

and quality of the grapevine yield of 'Thompson Seedless' was demonstrated by Norrie and Keathley (2006) [49]. In the course of the three-year study, plants sprayed with sea algae extracts yielded an average of 60,4% better, producing larger fruit and with a greater number of clusters on the bush than the control shrubs. A highly favorable effect of algae on the size and quality of the yield was also shown by: Crouch et al. (1992) [50], Aldworth and Van Staden (1987) [51], Abetz and Young (1983) [43], Featonby-Smith and Van Staden (1983) [45] and Arthur et al. (2003) [46]. The above dependencies were confirmed in this study, and during the research, the beneficial effect of fertilization technology based on sea algae extracts on the total yield was shown, compared to the implementation preparation, this effect was statically significant.

The effect of sea algae extracts on the yield and quality of the crop is related to the presence of bioactive substances, including those of a hormonal nature, such as cytokinins, which are responsible for cell division (Featonby-Smith and Van Staden 1983 a, b) [44, 45]. Nooden and Leopold (1978) [52] report that in plants treated with marine algae extracts, a number of substances responsible for growth and development are shifted from the vegetative organs, i.e.

roots, shoots and young growths, to the fruit and used for their development. In studies by Featonby-Smith and van Staden (1983) [45] it was proved that the fruits of tomatoes from the combination treated with preparations based on sea algae have a higher content of cytokinins than tomatoes from the control treatment. The positive effect of the technology with biostimulation, based on seaweed extracts, on the percentage of large fruits, i.e. those with a diameter of more than 7,5 cm, and on the commercial yield in individual years of research, was demonstrated by Kaplan et al. (2013) [53]. Apple trees of the 'Szampion' variety were assessed. A similar effect of biostimulation was demonstrated in the studies conducted on the 'Golden Delicious' cultivar. Kaplan (2018) [54] showed in the above experiment the highest share of apples above 7,5 cm in a treatment, where the trees were sprayed four times with the preparation with the Maxifruit phytohormone precursors and the gibberellin program. In addition, the preparation with Maxifruit phytohormone precursors in treatment with the 'gibberellin' program, similarly to the experiments from previous years, had a very positive effect on the quality and shape of fruit, socket cavities, and the number and size of apple seeds of the assessed apple variety.

The study did not show any significant influence of the applied fertilization programs on the leaf surface of the highbush blueberry. In the studies, Kaplan et al. (2013) [53] found a highly beneficial effect of biostimulants on the leaf surface area of apple trees of the 'Szampion' cultivar in the second and third years of the study. According to Ferrini and Niceise (2002) [55] the use of biostimulants in *Quercus robur* seedlings had a favorable impact on the surface and dry mass of leaves but did not affect the fresh / dry leaf mass ratio.

The applied fertilization programs did not have a notable effect on the level of blueberry fruit extract of the "Bluecrop" variety. Similarly, Kaplan et al. (2013) [53], after using the technology based on sea algae extracts in the cultivation of apple trees of the 'Szampion' variety, they did not show a considerable impact of the above-mentioned technology on the content of the extract. A significant influence of the research year on the assessed quality parameter was demonstrated, and in the first year blueberries had a much higher level of extract than in 2020. The analysis of the blueberry fruit firmness level in this study showed that the assessed parameter highly depended on the applied fertilization technology, the bushes treated with the biostimulation technology (T4) had notably firmer berries than the control ones (T1). The study year also showed a remarkable impact on the assessed fruit quality parameter, and in the first year of the study blueberries were characterized by a strikingly higher level of extract than in 2020. An experiment carried out by Yvin and Dufils (2010) [56] showed that the use of Seactiv technology in the form of three Fertileader Elite applications had no beneficial effect on apple fruit firmness during the harvest of the Pink Lady® Cripps Pink Cov. variety compared with three times the use of calcium chloride. It was found that the fruits treated with Fertileader Elite after three months of storage showed less loss of firmness than the controls. In the experiment of Kaplan et al. (2013) [53], it was presented that the use of the technology with biostimulation had a slight effect on the firmness of apple fruit of the 'Szampion' variety. The fruit treated with the above-mentioned technology were firmer than the control, but these differences were insignificant. On the basis of this work and published reports, the hypothesis that sea algae extracts have a positive effect on vigor, growth and yielding of plants can be confirmed. This is not only due to a better plant nutrition, but also to a positive physiological reaction to the applied biostimulation. It is worth noticing that the effect obtained in this study indicates the best parameters obtained in the T4 combination, where a full biostimulating program was applied. In combinations where only single biostimulation complexes were used, such spectacular increases were not observed, e.g. for the yield (T2, T3). This allows the conclusion that the various sea algae extracts work synergistically with each other.

Conclusion

Based on the conducted research, it was proved that the applied fertilization technologies had a significant impact on the size and quality of the yield of “Bluecrop” highbush blueberry. Particularly noteworthy is the fertilization technology based on biostimulating products, which has shown a beneficial, but not always considerable effect on the yield, fruit mass, degree of setting and firmness of the berries. The applied fertilization technologies had no serious effect on the leaf surface and the level of blueberry fruit extract. The performed statistical analysis showed a major influence of the year of the research on the yield, extract level and fruit firmness, in the case of other parameters, the above relationship was not observed.

Author Contributions

Conceptualization: Agnieszka Lenart, Dariusz Wrona.

Data curation: Agnieszka Lenart.

Formal analysis: Agnieszka Lenart, Tomasz Krupa.

Investigation: Agnieszka Lenart.

Methodology: Agnieszka Lenart, Magdalena Kapłan.

Project administration: Agnieszka Lenart.

Resources: Agnieszka Lenart.

Software: Agnieszka Lenart, Kamila Klimek.

Supervision: Agnieszka Lenart, Dariusz Wrona.

Validation: Agnieszka Lenart, Dariusz Wrona, Magdalena Kapłan.

Visualization: Agnieszka Lenart.

Writing – original draft: Agnieszka Lenart.

Writing – review & editing: Agnieszka Lenart.

References

1. Brazelton C., 2021. Aktualne dane o światowej produkcji borówki. Jaka będzie przyszłość w czasach covid -19? Nowoczesna uprawa borówki (strony 174–180). Kraków: Hortus Media Sp. z oo Krawków: 174–180
2. Roupael Y., Colla G. Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Front Plant Sci.* 2020; 11:40. Published 2020 Feb 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040> PMID: 32117379
3. Colla G., Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Canaguier R., et al. 2015. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38
4. Battacharyya D., Babgohari M.Z., Rathor P., Prithiviraj B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 39–48
5. Zodape S.T., Mukhopadhyay S., Eswaran K., Reddy M.P., Chikara J., (2010) Enhanced yield and nutritional quality in green gram (*Phaseolus radiata* L.) treated with seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. *J Sci Ind Res* 69:468–471
6. Durand N., Briand X., Meyer C., 2003. The effect of marine bioactive substances (N Pro) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 119, 489–493.
7. Stirk W.A., Novak M.S., Van Staden J., 2003. Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Reg.* 41, 13–24.
8. Ordog V., Stirk W.A., Van Staden J., Novak O., Strand M., 2004. Endogenous cytokinins in the three genera of microalgae from the Chlorophyta. *J. Phycol.* 40, 88–95.
9. Khan W., Rayirath U.P., Subramanian S., Jithesh M.N., Rayorath P., Hodges D.M., et al. 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Plant Growth Reg.* 28, 386–399.

10. Lenart A., Wrona D., 2021. Biostymulacja a intensyfikacja wydajności biologicznej roślin. Czynniki wpływające na plonowanie i jakość owoców roślin sadowniczych, 29. Wydawnictwo SGGW. Warszawa: 59–66
11. Blunden G., Gordon S.M., 1986. Betaines and their sulphono analogues in marine algae. In: Progress in phycological research, Round FE, Chapman DJ (eds), vol. 4. Biopress Ltd, Bristol, 39–80.
12. Metting B., Rayburn W.R., Reynaud P.A., 1988. Algae and agriculture. In: Algae and human affairs, Lembi CA, Waaland (eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 335–370.
13. Temple W.D., Bomke AA, 1988. Effects of kelp (*Macrocystis integrifolia*) on soil chemical properties and crop responses. *Plant Soil* 105, 213–222.
14. Yakhin O., Lubyantsev A., Brown P., 2017. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. www.frontiersin.org. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049> PMID: 28184225
15. du Jardin P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
16. Brown P., and Saa S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Front. Plant Sci.* 6:671. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671> PMID: 26379695
17. Marasco R., Rolli E., Ettoumi B., Vigani G., Mapelli F., Borin S., et al., 2012. A Drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS ONE* 7:48479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479> PMID: 23119032
18. Bakker M. G., Schlatter D. C., Otto-Hanson L., and Kinkel L. L., 2014. Diffuse symbioses: roles of plant-plant, plant-microbe and microbe-microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Mol. Ecol.* 23, 1571–1583. <https://doi.org/10.1111/mec.12571> PMID: 24148029
19. Vandenkoornhuysen P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., and Dufresne A., 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206, 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312> PMID: 25655016
20. Pruszyński S. 2008. Biostimulators in plant protection. W: Gawrońska H. (red.), *Biostimulators in Modern Agriculture, General Aspects*. Wieś Jutra, Warszawa: 18–23
21. Moore K.K. 2004. Using seaweed compost to grow bedding plants. *Bio Cycle* 45: 43–44.
22. Mancuso S., Azzarello E., Mugnai S., Briand X. 2006. Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *ADV. Hort. Sci.*, 20 (2): 156–161.
23. Atzmon N., Van Staden J. 1994. The effect of seaweed concentrate on the growth of *Pinus pinea* seedlings. *New For* 8: 279–288.
24. Slavik M. 2005. Production of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings on substrate mixes using growth stimulants. *J. For Sci.* 51:15–23.
25. Calvo P., Nelson L., and Kloepper J. W. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
26. Rose M. T., Patti A. F., Little K. R., Brown A. L., Jackson W. R., and Cavagnaro T. R. 2014. “A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture,” in *Advances in Agronomy*, Vol. 124, ed Sparks D. L. (New York, NY: Academic Press), 37–89.
27. Saa S., Olivos-Del Rio A., Castro S., and Brown P. H. 2015. Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* Mill. D. A. Webb). *Front. Plant Sci.* 6:87. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00087> PMID: 25755660
28. Allen V.G., Pond K.R., Saker K.E., Fontenot J.P., Bagley C.P., Ivy R.L., et al. 2001. Tasco: influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock—a review. *J Anim Sci.* 79: 21–31.
29. Cluzet S., Torregrosa C., Jacquet C., Lafitte C., Fournier J., Mercier L., et al. 2004. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from the green alga *Ulva* spp. *Plant Cell Environ* 27: 917–928.
30. Zhang X., Ervin E.H., 2004. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop. Sci.* 44: 1731–1745.
31. Joliet E., de Langlais-Jeannin I., Morot-Gaudry J.F., 1991. Les extraits d’algues marines: propriétés phytoactives et intérêt agronomique. *Annales Biologiques*, Paris, France: 109–126.
32. Durand N., Briand X., Meyer C.H., 2003. The effect of marine bioactive substances (N Pro) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 119: 489–493.
33. Zhang X., Ervin E.H., 2008. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bent grass heat tolerance. *Crop Sci.*, 48: 364–370.
34. Frannkenberger W.T., Arshad M. 1995. *Phytohormones In Soils*. Marcel Dekker. New York (USA).
35. Salat A., 2004. Les Biostimulants. *PHM. Revue Horticole* 454: 22–24.

36. PN-EN 12147. Soki owocowe i warzywne—Oznaczenie kwasowości miareczkowej; Polish Committee of Standardization: Warsaw, Poland, 2000.
37. Szpadzik E., Zaraś-Januszkiewicz E., Krupa T. (2021). Storage Quality Characteristic of Two Minikiwi Fruit (*Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.) Cultivars: 'Ananasnaya' and 'Bingo'—A New One Selected in Poland. *Agronomy* 11(1), 134. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010134>
38. PN-EN 12143. Soki owocowe i Warzywne—Oznaczenie Zawartości Substancji Rozpuszczalnych Metoda Refraktometryczną.; Polish Committee of Standardization: Warsaw, Poland, 2000.
39. Jankowski K., Dubis B. 2008. Biostymulatory w polowej produkcji roślinnej, Materiały Konferencyjne Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin. SGGW, Warszawa 7–8 lutego 2008: 24
40. Basak A., Mikos-Bielak M., 2008. The use of some biostimulators on apple and pear trees. W: Sadowski A. (red.), *Biostimulators in Modern Agriculture, Fruit Crops*. *Więś Jutra*, Warszawa: 7–17
41. Ochmian I., Grajkowski J., Skupień K., 2008. Influence of three biostimulators on growth, yield and fruit chemical composition of 'Polka' raspberry. W: Sadowski A (red.), *Biostimulators in Modern Agriculture, Fruit Crops*. *Więś Jutra*, Warszawa: 68–75
42. Ohta K., Morishita S., Suda K., 2004. Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73: 66–68
43. Abetz P., Young C.L., 1983. The effect of seaweed extract sprays derived from *Ascophyllum nodosum* on lettuce and cauliflower crops. *Bot. Mar.* 26, 487–492
44. Featonby-Smith B.C., Van Staden J., 1983a. The effect of seaweed concentrate on the growth of tomato plants in nematode-infested soil. *Sci. Hortic.* 20, 137–146
45. Featonby-Smith B.C., Van Staden J., 1983b. The effect of seaweed concentrate and fertilizer on the growth of *Beta vulgaris*. *Z. Pflanzenphysiol.* 112, 155–162
46. Arthur GD, Stirk W.A., Van Staden J., 2003. Effect of a seaweed concentrate on the growth and yield of three varieties of *Capsicum annuum*. *S. Afr. J. Bot.* 69, 207–211
47. Van Staden J., Upfold J., Dewes F.E., 1994. Effect of seaweed concentrate on growth and development of the marigold *Tagetes patula*. *J. Appl. Phycol.* 6, 427–428
48. Zodape S.T., Gupta A., Bhandari S.C., 2011 Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato. *J Sci Ind Res* 67:215–219.
49. Norrie J., Keathley J.P., 2006. Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to 'Thompson seedless' grape production. *Proceedings of the Xth International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production, 2005*. *Acta Hort.* 727, 243–247
50. Crouch I.J., Van Staden J., 1992. Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. *J Appl. Phycol.* 4, 291–296
51. Aldworth S.J., Van Staden J., 1987. The effect of seaweed concentrate on seedling transplants. *S. Afr. J. Bot.* 53, 187–189
52. Nooden L.D., Leopold A.C., 1978. Phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission. In: *Phytohormones and related compounds: a comprehensive treatise* letham, DS Goodwin PB, Higgins (eds). Elsevier/ Holland, Amsterdam, 329–369
53. Kaplan M., Baryła P., Krawiec M., Kiczorowski P., 20213. Effect of N Pro Technology and seactiv complex on growth, yield, quantity and quality of 'Szampion' apple trees. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 12 (6) 2013, 45–56
54. Kaplan M., 2018. VIII Targi Sadownictwa i Warzywnictwa TSW 2018, materiały konferencyjne, 10–11 stycznia 2018: 30
55. Ferrini F., Nicese F.P., 2002. Response of English oak (*Quercus robur* L.) trees to biostimulants application in the urban environment. *J. Arboricult.* 28, 70–75
56. Yvin J.C., Dufils A., 2010. Incidences of Fertileader Elite® foliar spray applications on the improvement of Fruits quality and their conservation. *Trials realized on Pink Lady® Cripps Pink Cov.* *J. Hort. Forest. Biotech.* 14(3), 1–4.

Article

Health—Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization

Agnieszka Lenart *, Dariusz Wrona  and Tomasz Krupa 

Department of Pomology and Horticultural Economics, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 02-787 Warsaw, Poland

* Correspondence: agnieszka_lenart@sggw.edu.pl

Abstract: The purpose of the experiment was to demonstrate a comparison of fertilization with and without biostimulation. A study was carried out in an experimental blueberry field in central Poland (51°55′42.7″ N 20°59′28.7″ E) during the three growing seasons of 2019, 2020 and 2021, on ‘Bluecrop’ shrubs growing at a distance of 1 × 3 m. The plants were re-planted in the spring of each year and irrigated using drip irrigation. The experiment was conducted using a random block design (four fertilizer treatments × five replications × six bushes). The fruits were tested for antioxidant activity and amount of total polyphenols. Additionally, anthocyanin quantitative and qualitative analysis was performed. The results indicated a significant effect of fertilizer combinations on the values of the evaluated parameters. The positive effect of biostimulants on the content of antioxidant compounds in highbush blueberry fruit was significant. In most of the combinations in which additional biostimulants were used, higher values of the analyzed indicators (antioxidant activity and polyphenol content) were observed. The most noteworthy was the T4 fertilization program, where during treatment, soil and foliar fertilization were carried out with preparations that contained biostimulants.

Keywords: biostimulation; seaweed extract; blueberries; polyphenols; antioxidants; anthocyanins; fertilization



Citation: Lenart, A.; Wrona, D.; Krupa, T. Health—Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization. *Agriculture* **2022**, *12*, 1741. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101741>

Academic Editor: Grzegorz Lysiak

Received: 23 September 2022

Accepted: 17 October 2022

Published: 21 October 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The ever-increasing consumer demand for blueberries means that the cultivation of this species in Poland, and around the world, rapidly rises each year. In addition to its health-promoting and flavorsome qualities, blueberry fruit is highly sought after due to the widespread marketing campaign promoting blueberries as superfoods [1–6]. Blueberries are considered a natural source of health-promoting substances, containing a diverse group of bioactive compounds that show positive effects on human health [7]. Beneficial elements such as fiber, minerals, vitamins, and phenolic compounds with antioxidant characteristics can be found in abundance in these fruits [8,9]. Blueberry fruits are widely consumed as a dessert fruit, but they are also commonly used in processing as a dried or frozen raw material, for juices, purees, jams, and even wine [10–12]. Berry fruits, distinguished by their antioxidant richness, also include blueberry (*Vaccinium myrtillus*), blackberry (*Rubus fruticosus*), chokeberry (*Aronia melanocarpa*), black currant (*Ribes nigrum*), cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), raspberry (*Rubus idaeus*), grape (*Vitis vinifera*), and strawberry (*Fragaria × ananassa*) [13]. Antioxidants in the fruit are mainly represented by vitamin C and polyphenols such as anthocyanins, phenolic acids, flavanols and tannins [13]. Kęhkönen et al. [14] reported that berries are one of the richest sources of antioxidants in our diet. According to Prior et al. [15], in particular, the fruits of highbush blueberries deserve attention due to the high level of plant phenolic compounds which determines the high antioxidant activity.

Rashidinejad [7] described the beneficial effects of highbush blueberry fruit for the prevention of chronic diseases, including cancer, cardiovascular disorders, diabetes, and

neurodegenerative diseases. Häkkinen and Törrönen [16] and Rimando et al. [17] reported on the antioxidant and anti-cancer effects of phenolic compounds contained in berries. Blueberry extracts reduce age-related decline in neurons and cognitive function, common in disorders such as Alzheimer's disease [18]. Bioactive substances with antioxidant properties have hydroxyl groups (-OH) on aromatic rings. These are components produced by secondary metabolism in plants. In addition to their health-promoting properties, they have an important physiological function in plants. They are known to protect plants from pests, pathogens and ultraviolet radiation, to regulate metabolic pathways and impart to color and flavor to the plant [19]. According to Piątkowska et al. [20] and Khoo et al. [21], anthocyanins are a group of phenolic compounds of very high health-promoting importance. A study by Lee et al. [22] indicated that the following anthocyanins are found in highbush blueberry fruit: cyanidins, delphinidins, malvinidins, peonidins, and petunidins. According to Khoo et al. [21], anthocyanins are used as an appetite-stimulating phytopharmaceutical, a cholagogue, and the highly bioavailable anthocyanin effectively reduces cellular lipid peroxidation. Tsuda et al. [23] indicated that anthocyanins extracted from beans (*Phaseolus vulgaris*) have antioxidant properties. The authors showed that a 'purple corn color' (PCC) diet rich in cyanidin 3-O- β -D-glucoside significantly inhibited the development of obesity and alleviated hyperglycemia in mice induced by a high fat (HF) diet. The PCC diet reduced mRNA levels of enzymes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis. The decrease in enzyme levels as a result of the PCC diet may contribute to a decrease in triacylglycerol accumulation in WAT (white adipose tissue). Tsuda et al. [23] also pointed to the use of anthocyanins as a functional food factor, which may have important implications in the prevention of obesity and diabetes. Numerous scientific studies have proved the anticancer effects of anthocyanins [24]. Anthocyanins and anthocyanin-pyruvic acids exhibit anticancer properties by inhibiting tumor cell proliferation and act as anti-cell invasion agents and chemo-inhibitors [25]. A study by Buena et al. [26] confirmed that the anthocyanin-rich fraction obtained from the Toro variety had the highest anthocyanin content and antioxidant activity, and inhibited melanoma cell proliferation in mice. The results of [26] indicated that anthocyanins from highbush blueberry fruit could be used as a chemopreventive or adjuvant agent in controlling the spread of cancer cells. Miyake et al. [27] confirmed that berries of the *Vaccinium* genus are rich in anthocyanins that have beneficial effects in the treatment of eye diseases. They showed that oral administration of blueberry extract to six-week-old mice prevented photoreceptor cell dysfunction during retinitis pigmentosa.

The purpose of this study was to evaluate the effect of different fertilizer and biostimulant combinations on the level of antioxidant activity, and polyphenol and anthocyanin content in highbush blueberry fruit.

2. Materials and Methods

2.1. Location and Layout of the Study

This work was completed as part of a Ministry of Science and Higher Education program "Doktorat Wdrożeniowy" no. um. 0060/DW/2018/02. The program's goal is to introduce, as part of doctoral studies, the possibility of developing cooperation between the scientific and socioeconomic communities by introducing the possibility of educating a doctoral student in collaboration with the entrepreneur (or other entity) employing them. The experiment was conducted at the Warsaw University of Life Sciences' Experimental Blueberry Field in Bonie, central Poland (51°55'42.7'' N 20°59'28.7'' E), over a three-year period from 2019 to 2021.

In the experimental field, the 'Bluecrop' shrub cultivar was spread out in a 1 × 3 m spacing, and the quarters were drip-irrigated. The highest average monthly air temperatures and total rainfall, throughout the three-year field experiment, were noted in 2019 and 2021, respectively (Table 1).

Table 1. Average air temperature and total rainfall recorded during the described experiment.

Month	2019		2020		2021	
	Total Rainfall (mm·m ⁻²)	Average Temp. (°C)	Total Rainfall (mm·m ⁻²)	Average Temp. (°C)	Total Rainfall (mm·m ⁻²)	Average Temp. (°C)
March	25.1	6.8	13.2	5	18.3	4
April	2.2	10.7	7.4	9	55.3	6.5
May	77.8	14.1	65.2	11.9	62.3	12.4
June	16	22.7	140.9	19.6	69.2	19.7
July	34.8	19.5	45.9	19.1	118.8	21.7
August	34.4	21.1	83.1	20.7	140.1	17.2

A Davis Vantage Pro weather station was used at the experimental field to conduct the measurements. The substrate's pH during the experiment ranged from 4.5 to 4.8. In order to conduct the experiment, the soil was examined in a licensed laboratory of the Regional Chemical and Agricultural Station in Łódź (Table 2), and based on the findings, nutrients were added to the soil at the proper levels (Table 3).

Table 2. Soil testing report no. GO/502/18.

Salinity g NaCl/L	pH in H ₂ O	Content in mg/L						
		N-NO ₃	N-NH ₄	P	K	Ca	Mg	Cl
0.08	4.9	<10.0 *	<10.0 *	<20.0 *	<20.0 *	245	20	<10.0 *
PB 02 ed.3 from 1 March 2018 **	PB 01 ed.2 from 1 March 2018 **	PB 06 ed.1 from 28 May 2004 **	PB 69 ed.1 from 3 April 2017 **	PB 03 ed.2 from 19 March 2007 **	PB 04 ed.1 from 21 May 2004 **	PB 04 ed.1 from 21 May 2004 **	PB 05 ed.1 from 28 May 2004 **	PB 07 ed.1 from 28 May 2004 **

* /—result below the lower range of the method. ** /—Research standard.

Table 3. Sum of nutrients used in the experiment in all assessed treatments (T1,T2,T3,T4).

N (kg/ha ⁻¹)	P ₂ O ₅ (kg/ha ⁻¹)	K ₂ O (kg/ha ⁻¹)	SO ₃ (kg/ha ⁻¹)	CaCO ₃ (kg/ha ⁻¹)
100	30	92.5	142	64

All study/experimental protocols involving plant materials were carried out in accordance with institutional, national, and international rules and regulations, and with permission from the Warsaw University of Life Sciences.

The research subject was 'Bluecrop' highbush cultivar blueberries, using a random block mechanism to conduct the experiment. Five repetitions of each of the four fertilizer treatments were examined. Six plants were present in each replicate. The harvest was conducted in 2019 from 1 July to 10 August; in 2020 from 5 July to 5 August; and in 2021 from 10 July to 10 August, respectively. Harvested fruit samples were averaged-out. The experiment evaluated how biostimulation affected antioxidant activity, polyphenol content, and quantitative and qualitative anthocyanin analyses. The following treatment scenarios were used:

- 'Treatment T1'—consisted of standard fertilization and foliar sprinkling without the use of bioactive components (control treatment);
- 'Treatment T2'—included foliar fertilization and typical sprinkling in addition to a solution containing phytohormone precursors and biostimulants;

- ‘Treatment T3’—comprised traditional foliar fertilizing and sprinkling, with a new method of biostimulation based on extracts from various plants and sea algae, with bioactive qualities intended to improve the physiological processes in crops;
- ‘Treatment T4’—biostimulant-containing formulations were used to fertilize the soil and the leaves.

In their study, Lenart et al. [28] provided a thorough explanation of the combination of nutrients provided in each treatment option used in their study; the amount of nutrients (N, K, P, Mg, etc.) given to plants in each treatment of our experiment was equal or very close to it. Our study evaluated the impact of several fertilization methods on plants’ capacity to promote health and how the bioactive substances employed in biostimulant formulations affected the nutritive value of the plants.

2.2. Research Methods

All reagents used for HPLC were of HPLC grade and purchased at Sigma-Aldrich (Poznan, Poland) and Merck (Warsaw, Poland). Other chemicals were of analytical purity grade and purchased at Alchem (Warsaw, Poland).

The phenolics were isolated by solid-phase extraction as described by Latocha et al. [29]. The total phenols content (TPC) was determined by the spectrophotometric method described by Singleton et al. [30] by applying Folin & Ciocalteu’s reagent. The absorbance of the solution was measured using a Marcel 330S PRO spectrophotometer (Marcel, Zielonka, Poland) at the wavelength $\lambda = 700$ nm. The result was expressed in milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of fresh weight (FW). The antioxidant activity (AA) was determined according to Saint Crieg de Gaulejac et al. [31] using DPPH free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). The AA was calculated on the basis of absorbance measurements for the sample (0.75 mL diluted fruit extract + 0.75 mL DPPH) performed after 10 min at $\lambda = 517$ nm in relation to the control sample (0.75 mL H₂O + 0.75 mL DPPH). The results were expressed in milligrams of ascorbic acid equivalent (AAE) per gram of FW. The identification and quantitative analysis of anthocyanins were conducted separately using the HPLC technique described by Szpadzik et al. [32], performed by means of a PerkinElmer series 200 HPLC with a diode array detector (Perkin Elmer, Krakow, Poland), using a LiChroCART® 125-3 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) column with a 1.0 mL/min flow rate, detected at 520 nm. The mobile phase was a mixture of water (A), 20% formic acid (B), and acetonitrile (C), with variable parameters of the gradient (A) and (C). The anthocyanin content was given as milligrams per 100 g of fresh weight of fruit as cyanidin-3-glucoside equivalent.

2.3. Statistical Analysis

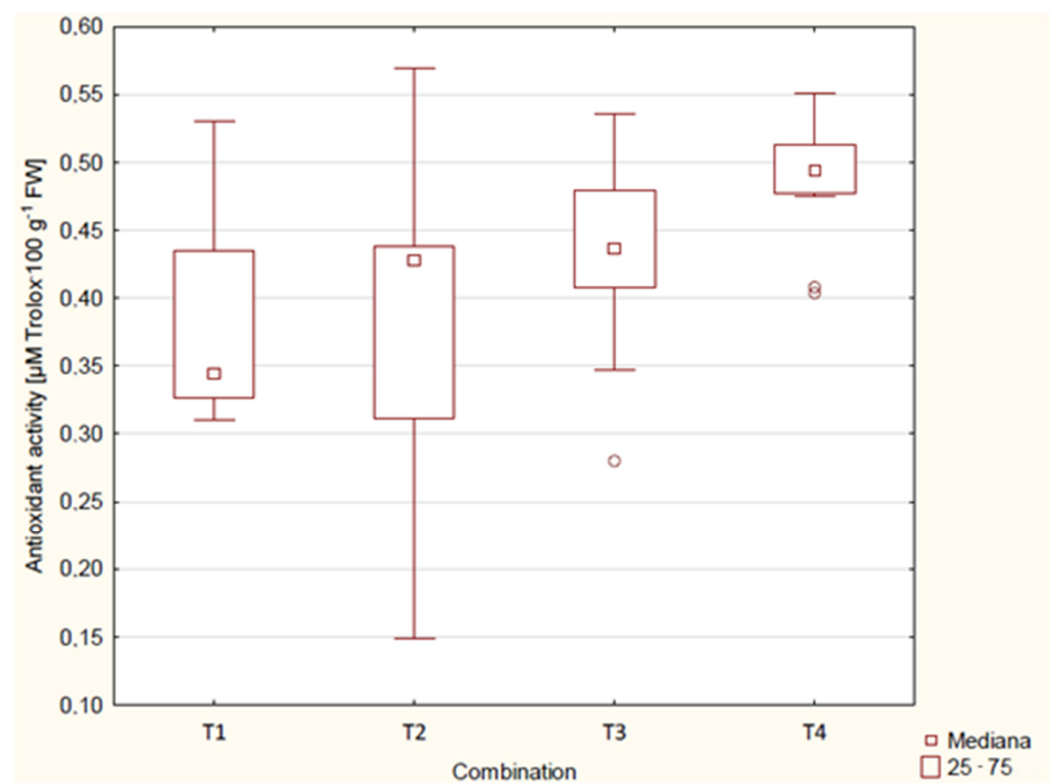
The results were analyzed statistically in Statistica 13.3 (StatSoft Polska, Krakow, Poland), using the two-way analysis of variance. Tukey test was used for evaluation of the significance of differences between the means, accepting the significance level as 5%.

3. Results

The fertilizer combinations used in the experiment influenced the level of antioxidant activity (DPPH) in the fruits studied. Fruits from the control combination, where fertilizers with bioactive substances were not applied, showed significantly lower levels of antioxidant activity (Table 4). In the combinations in which additional biostimulants were applied, a higher value of the analyzed index was observed, and the T4 and T3 fertilization programs deserve special mention (Figure 1).

Table 4. Influence of fertilization technology on antioxidant activity—data averaged over the years of the study. * Data followed by the same letter are not significantly different.

Combination	Year	Antioxidant Activity [$\mu\text{M Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]	3 Years Average Antioxidant Activity [$\mu\text{M Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
T1	2019	0.356 ab *	0.375 a
	2020	0.356 ab	
	2021	0.414 bc	
T2	2019	0.241 a	0.381 a
	2020	0.430 bc	
	2021	0.472 c	
T3	2019	0.481 c	0.437 ab
	2020	0.413 bc	
	2021	0.416 bc	
T4	2019	0.517 c	0.489 b
	2020	0.487 c	
	2021	0.463 bc	
<i>p</i> -value		<0.01	<0.01

**Figure 1.** Influence of fertilization technology on antioxidant activity—average per harvest year, and three year average.

The antioxidant capacity in each year of the study ranged from the lowest in the T1 combination in 2019 and 2020 at $0.356\ \mu\text{M Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}\text{ FW}$, to the highest at $0.517\ \mu\text{M Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}\text{ FW}$ in the T4 combination in 2019 (Table 1).

The fertilizer combinations used in the experiment influenced the polyphenol content of the fruits studied (Table 5). Fruits from the control combination, where products with biostimulants were not used, had a significantly lower content of total polyphenols. In most of the combinations in which additional biostimulants were applied, a higher value

of the analyzed index was observed, and the most noteworthy was the T4 fertilization program (Figure 2). Fertilization with the several biostimulants used in the T4 combination caused a significantly higher content of total polyphenols in the fruit. The application of biostimulation increased the content of total polyphenols by 13% in blueberry fruit, on average, for the year of the study.

Table 5. Influence of fertilization technology on amount of polyphenols—data averaged over the years of the study. * Data followed by the same letter are not significantly different.

Combination	Year	Amount of Polyphenols [mg 100 g ⁻¹ FW]	3-Year Average [mg 100 g ⁻¹ FW]
T1	2019	659 a *	742 a
	2020	766 ab	
	2021	801 bc	
T2	2019	759 ab	802 ab
	2020	845 bc	
	2021	802 bc	
T3	2019	859 bc	820 ab
	2020	752 ab	
	2021	848 bc	
T4	2019	759 ab	837 b
	2020	878 c	
	2021	875 c	
<i>p</i> -value		<0.01	<0.01

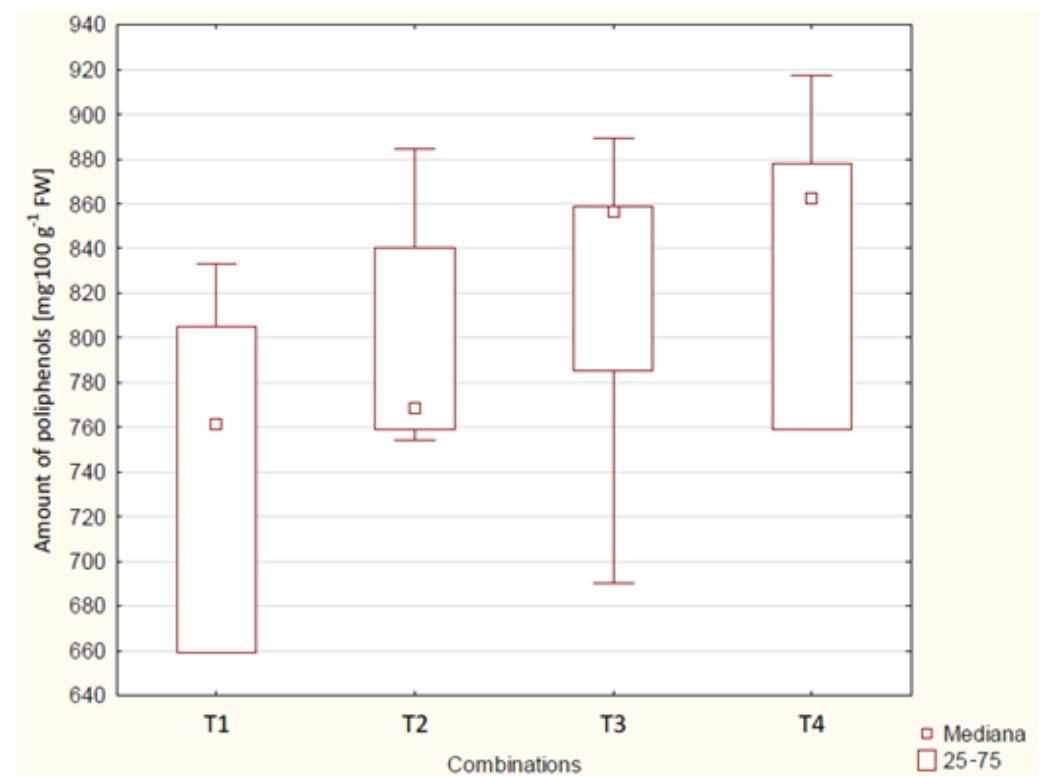


Figure 2. Influence of fertilization technology on amount of polyphenols, expressed as mg 100·g⁻¹ FW; average per year and over three years of research.

As a result of qualitative studies, ten compounds from the anthocyanin group were determined in highbush blueberry fruit, including compounds from the delphinidin, petunidin, peonidin and malvinidin groups. The applied fertilization combinations had a significant

effect on the content of individual compounds isolated during the study (Table 6). In the delphinidin group, delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glu), delphinidin-3-galactoside (Dp-3-gal) and delphinidin-3-arabidoside (Dp-3-ara) were identified. Of the three delphinidins mentioned, only Dp-3-ara was not determined by the biostimulants used in the fertilization programs. Fruit from the T4 combination, in which fertilization with a range of different complementary biostimulants was applied, recorded higher contents of Dp-3-glu and Dp-3-gal than the other combinations. For the other combinations, the effect of the applied preparations was similar, and there were no significant differences between the evaluated fertilization programs on the content of anthocyanins of the group in question (Table 6).

Table 6. Content of anthocyanin group active compounds in relation to fertilizer combination (mg·100 g⁻¹ FW). * Data followed by the same letter are not significantly different.

		Dp-3-glu	Dp-3-gal	Dp-3-ara	Pt-3-glu	Pt-3-gal	Pt-3-ara	Pn-3-glu	Mv-3-glu	Mv-3-gal	Mv-3-ara
Combinations	T1	19.83 ab *	10.58 a	18.53 a	10.76 a	7.36 a	6.42 a	1.88 b	26.5 a	26.08 a	19.00 a
	T2	18.88 ab	11.18 a	20.22 a	10.98 a	7.56 a	6.50 a	2.0 ab	36.73 b	26.40 a	19.09 a
	T3	17.19 a	10.38 a	21.10 a	11.36 a	7.90 a	7.51 a	2.36 b	28.62 a	27.52 a	22.79 a
	T4	21.78 b	12.96 b	22.88 a	12.74 a	10.31 a	8.04 a	1.38 a	26.16 a	28.84 a	23.43 a
	<i>p</i> -value	<0.0001	<0.0001	0.0816	0.0816	0.0816	0.0816	<0.0001	<0.0001	0.0816	0.0816

The preparations and biostimulants used in the study had no significant effect on the content of anthocyanins from the petunidin group. The study isolated petunidin-3-glucoside (Pt-3-glu), petunidin-3-galactoside (Pt-3-gal) and petunidin-3-arabidoside (Pt-3-ara). Although no significant correlations were shown when evaluating petunidins, it was notable that, as in the case of delphinidins, the content of individual petunidins was higher in fruit from the T4 fertilization combination (in which the full range of products with biostimulation was applied), compared with T1, T2 or T3. The control combination in which no biostimulants were applied (T1) had a slightly lower petunidin content in the fruit. The study highlighted the significant effect of the tested fertilizer combinations on peonidin-3-glucoside (Pn-3-glu) content. Its content ranged from 1.38 mg cy-3-gl -100 g⁻¹ FW in the T4 combination, to 1.88 mg cy-3-gl-100 g⁻¹ FW in the T1 control combination, and significantly depended on the type of fertilization used. Unexpectedly, statistical evaluation proved a significantly higher content of Pn-3-glu in fruit from the control combination, where only conventional fertilization was applied, compared to T2, T3 or T4. In the fruits studied, malvinidins were the largest group and also the least active, and the fertilization combinations used slightly determined the content of these anthocyanins. Malvinidin-3-glucoside (Mv-3-glu), malvinidin-3-galactoside (Mv-3-gal) and malvinidin-3-arabidoside (Mv-3-ara) were identified; the Mv-3-glu content in blueberry fruits was highest using the T2 combination, while the other combinations showed no significant effect. The other two anthocyanins, Mv-3-gal and Mv-3-ara, also showed no significant effect of the treatment combinations.

4. Discussion

Growing consumer demand for highbush blueberry fruit causes producers to look for modern agrotechnical solutions to ensure high yields and high quality of the obtained fruits [33,34]. Information campaigns promoting the health-promoting qualities of berries determine not only an increased awareness of consumers on this topic, but also the decisions of producers to cultivate in a sustainable manner. Seaweed-based products are of particular interest to growers [28,35]. Seaweed extracts often form the basis of fertilization programs with biostimulation [36,37]. According to Du Jardin [38], a biostimulant can be defined in the following manner: “A plant biostimulant is any substance or microorganism applied to plants with the aim to enhance nutrition efficiency, abiotic stress tolerance and/or crop quality traits, regardless of its nutrients content. By extension, plant biostimulants also designate commercial products containing mixtures of such substances and/or microorganisms.” Numerous scientific studies have reported positive effects of seaweed extracts on

plants, including improved yield and yield quality, and increased resistance to biotic and abiotic stresses [39]. As reported by Mooney and Van Staden [40], formulations based on seaweed extracts have beneficial effects on plant metabolism, promote growth, resistance to pathogens and increase antioxidant activity. Additionally, the studies conducted in this paper indicated the positive effect of active compounds extracted from marine algae. It should be noted that the high antioxidant activity of highbush blueberry fruit confirmed in the T4 combination may be due to the use of several active compounds obtained from marine algae and tropical and desert plants in the fertilization program. Interesting research results were presented by Grazani et al. [41], where the authors stressed the importance of using biostimulants in the cultivation of *Olea europaea* to mitigate the effects of abiotic stresses (high temperature and drought). The effect of preparations with seaweed extracts was confirmed by higher values in leaf number growth and leaf area, as well as the same treatments showing positively significant values for antioxidant activity and polyphenol content. Similar results for 'Gala Must' apple fruit were obtained by Nagy et al. [42] indicating that a biostimulant fertilizer formulation containing seaweed extracts significantly improved antioxidant properties in the studied variety of apples. Ambroszczyk et al. [43] proved that tomato fruits treated with biostimulation preparations had significantly higher antioxidant activity compared with fruits not treated with preparations containing marine algae extracts. In our own experiment, we found a higher content of total polyphenols in highbush blueberry fruits after application of preparations containing biostimulants (T4). A similar relationship was confirmed by Mikos-Bielak [44]. The author showed that a biostimulant obtained from seaweed extracts, when applied to raspberry crops, resulted in a 30% increase in the polyphenol content of fruits, compared with the control group. As reported by DeBoer [19], polyphenols in plants not only have a health-promoting effect on the human body but also perform important defined functions in plant organisms. Many authors have reported that the use of programs based on seaweed extracts increases the biological performance of plants, has an anti-stress effect on plants, and strengthens the defined functions of plant organisms [28,45,46]. In a research paper by Sylvia et al. [47], the authors evaluated the effects of seaweed extracts on the antioxidant activity and polyphenol content of fruit, and found a program containing a combination of several biostimulants to be the most effective. Similar observations were also obtained in the present study. Mukherjee [48] reported that seaweed is a source of elicitors due to the presence of several different polysaccharide compounds they take a direct part in the activation of plant secondary metabolism pathways and the mobilization of signaling molecules to trigger a defined response in the plant to a stress factor (biotic or abiotic). Higher concentrations of health-promoting components and nutrients in agri-horticultural crops following use of products containing seaweed extracts were found in maize [49], broccoli [50], Arabidopsis [51], strawberry [52], grape [53], and spinach [54]. Fan et al. [54] reported that the total content of phenols, flavonoids and antioxidant compounds in spinach was significantly higher after treatment with a marine algae extract, as a result of increased activity of, among other things, chalcone isomerase, which is a key enzyme in the biosynthesis of flavanone precursors and triggers activation of plant defined compounds. The effect of biostimulant extracts on the antioxidant properties of highbush blueberry fruit, proven in the present study, was also confirmed by Bi et al. [55] and Vera et al. [56]. The authors indicated that the use of brown algae extracts in agricultural crops influenced better assimilation and concentration of nutrients, increased plant metabolism, the rate of cell division and the photosynthetic index, which ultimately increased the physiological performance of plants.

5. Conclusions

The experiment showed that fertilizers with biostimulation have a significant effect on increasing the antioxidant activity of highbush blueberry fruit and the content of total polyphenols, and also have a significant effect on the content of anthocyanins. A notable result of the study was the fertilizer program in which various bioactive substances derived from marine algae and desert plants were used. Therefore, it can be concluded that

the synergistic effect of the interaction of several biostimulants more effectively affects the mechanisms regulating plant metabolism, supports physiological functions and, in particular, activates defined mechanisms. Based on the present study, it can be concluded that the use of biostimulated products in horticulture has a significant positive impact on the health-promoting properties of fruits. The mechanisms affecting the concentration of antioxidants in plant fruits treated with seaweed extracts or bioactive substances still require further research.

Author Contributions: Conceptualization, A.L., D.W. and T.K.; Data curation, A.L.; Formal analysis, A.L.; Investigation, A.L.; Methodology, A.L., D.W. and T.K.; Project administration, A.L.; Software, A.L. and T.K.; Supervision, D.W. and T.K.; Validation, D.W. and T.K.; Visualization, A.L.; Writing—original draft, A.L.; Writing—review & editing, D.W. and T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kruczek, A.; Krupa-Mańkiewicz, M.; Lachowicz, S.; Oszmiański, J.; Ochmian, I. Health-Promoting Capacities of In Vitro and Cultivated Goji (*Lycium chinense* Mill.) Fruit and Leaves; Polyphenols, Antimicrobial Activity, Macro- and Microelements and Heavy Metals. *Molecules* **2020**, *25*, 5314. [\[CrossRef\]](#)
- Bieniasz, M.; Dziedzic, E.; Kaczmarczyk, E. The effect of storage and processing on vitamin C content in Japanese quince fruit. *Folia Hort.* **2017**, *29*, 83–93. [\[CrossRef\]](#)
- Dziedzic, E.; Błaszczak, J.; Bieniasz, M.; Dziadek, K.; Kopeć, A. Effect of modified (MAP) and controlled atmosphere (CA) storage on the quality and bioactive compounds of blue honeysuckle fruits (*Lonicera caerulea* L.). *Sci. Hort.* **2020**, *265*, 109226. [\[CrossRef\]](#)
- Bieniek, A.; Lachowicz-Wiśniewska, S.; Bojarska, J. The Bioactive Profile, Nutritional Value, Health Benefits and Agronomic Requirements of Cherry Silverberry (*Elaeagnus multiflora* Thunb.): A Review. *Molecules* **2022**, *27*, 2719. [\[CrossRef\]](#)
- Bieniek, A.; Draganska, E.; Pranckietis, V. Assessment of climatic conditions for Actinidia argute cultivation in north-eastern Poland. *Zemdirb. Agric.* **2016**, *103*, 311–318. [\[CrossRef\]](#)
- Szot, I.; Łysiak, G.P. Effect of the Climatic Conditions in Central Europe on the Growth and Yield of Cornelian Cherry Cultivars. *Agriculture* **2022**, *12*, 1295. [\[CrossRef\]](#)
- Rashidinejad, A.; Jaiswal, A.K. (Eds.) *Nutritional Composition and antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 695–708. [\[CrossRef\]](#)
- Michalska, A.; Łysiak, G. Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18642–18663. [\[CrossRef\]](#)
- Pertuzatti, P.B.; Barcia, M.T.; Gómez-Alonso, S.; Godoy, H.T.; Hermosin-Gutierrez, I. Phenolics profiling by HPLC-DAD-ESI-MSn aided by principal component analysis to classify Rabbiteye and Highbush blueberries. *Food Chem.* **2021**, *340*, 127958. [\[CrossRef\]](#)
- Varo, M.A.; Martin-Gomez, J.; Serratos, M.P.; Merida, J. Effect of potassium metabisulphite and potassium bicarbonate on color, phenolic compounds, vitamin C and antioxidant activity of blueberry wine. *LWT* **2022**, *163*, 113585. [\[CrossRef\]](#)
- Behrends, A.; Weber, F. Influence of Different Fermentation Strategies on the Phenolic Profile of Bilberry Wine (*Vaccinium myrtillus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7483–7490. [\[CrossRef\]](#)
- Mendes-Ferreira, A.; Coelho, E.; Barbosa, C.; Oliveira, J.M.; Mendes-Faia, A. Production of blueberry wine and volatile characterization of young and bottle-aging beverages. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 617–627. [\[CrossRef\]](#)
- Szajdek, A.; Borowska, E.J. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Mater. Veg.* **2008**, *63*, 147–156. [\[CrossRef\]](#)
- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954–3962. [\[CrossRef\]](#)
- Prior, R.L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, A.G.; et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2686–2693. [\[CrossRef\]](#)
- Häkkinen, S.H.; Törrönen, A.R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 517–524. [\[CrossRef\]](#)

17. Rimando, A.M.; Kalt, W.; Magee, J.B.; Dewey, A.J.; Ballington, J.R. Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4713–4719. [[CrossRef](#)]
18. Youdim, K.A.; Shukitt-Hale, B.; Martin, A.; Wang, H.; Denisova, N.; Bickford, P.C.; Joseph, J.A. Short-Term Dietary Supplementation of Blueberry Polyphenolics: Beneficial Effects on Aging Brain Performance and Peripheral Tissue Function. *Nutr. Neurosci.* **2000**, *3*, 383–397. [[CrossRef](#)]
19. DeBoer, J.D. Berries and their role in human health. In *A Survey of Research into the Health Benefits of Berries*; DeBoer Consulting: Victoria, BC, Canada, 2005; pp. 1–103.
20. Piątkowska, E.; Kopeć, A.; Leszczyńska, T. Antocyjany—Charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. *ŻNTJ* **2011**, *4*, 24–35.
21. Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61*, 1361779. [[CrossRef](#)]
22. Gil Lee, S.; Vance, T.M.; Nam, T.-G.; Kim, D.-O.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Evaluation of pH differential and HPLC methods expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent for measuring the total anthocyanin contents of berries. *J. Food Meas. Charact.* **2016**, *10*, 562–568. [[CrossRef](#)]
23. Tsuda, T.; Horio, F.; Uchida, K.; Aoki, H.; Osawa, T. Dietary Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2125–2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Łysiak, G.P. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods* **2022**, *11*, 948. [[CrossRef](#)]
25. Faria, A.; Pestana, D.; Teixeira, D.; de Freitas, V.; Mateus, N.; Calhau, C. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: Anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytotherapy Res.* **2010**, *24*, 1862–1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bunea, A.; Rugiņa, D.; Sconța, Z.; Pop, R.M.; Pinteau, A.; Socaciu, C.; Tăbăran, F.; Grootaert, C.; Struijs, K.; VanCamp, J. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 436–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Miyake, S.; Takahashi, N.; Sasaki, M.; Kobayashi, S.; Tsubota, K.; Ozawa, Y. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: Cellular and molecular mechanism. *Lab. Investig.* **2011**, *92*, 102–109. [[CrossRef](#)]
28. Lenart, A.; Wrona, D.; Klimek, K.; Kapłan, M.; Krupa, T. Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0271383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Latocha, P.; Krupa, T.; Wołosiak, R.; Worobiej, E.; Wilczak, J. Antioxidant activity and chemical difference in fruit of different *Actinidia* sp. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, *61*, 381–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1999; Volume 299, pp. 152–178.
31. Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Provost, C.; Vivas, N. Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 425–431. [[CrossRef](#)]
32. Szpadzik, E.; Krupa, T.; Niemiec, W.; Jadczyk-Tobjasz, E. Yielding and fruit quality of selected sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars in the conditions of central Poland. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2019**, *18*, 117–126. [[CrossRef](#)]
33. Lenart, A.; Wrona, D. Biostymulacja a intensyfikacja wydajności biologicznej roślin. Czynniki wpływające na plonowanie i jakość owoców roślin sadowniczych, 29. Wydawnictwo SGGW. *Warszawa* **2019**, *29*, 59–66.
34. Bulgari, R.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Vernieri, P.; Ferrante, A. Biostimulants and crop responses: A review. *Biol. Agric. Hortic.* **2014**, *31*, 1–17. [[CrossRef](#)]
35. Benhamou, N.; Rey, P. Stimulators of natural plant defenses: A new phytosanitary strategy in the context of sustainable ecoproduction: II. Interest of the SND in crop protection. *Phytoprotection* **2012**, *92*, 24–35. [[CrossRef](#)]
36. Durand, N.; Briand, X.; Meyer, C. The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **2003**, *119*, 489–493. [[CrossRef](#)]
37. Du Jardin, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 3–14. [[CrossRef](#)]
38. Battacharyya, D.; Babgohari, M.Z.; Rathor, P.; Prithiviraj, B. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 39–48. [[CrossRef](#)]
39. Norrie, J.; Keathley, J.P. Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to ‘thompson seedless’ grape production. *Acta Hortic.* **2006**, *727*, 243–248. [[CrossRef](#)]
40. Crouch, I.J.; van Staden, J. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regul.* **1993**, *13*, 21–29. [[CrossRef](#)]
41. Graziani, G.; Cirillo, A.; Giannini, P.; Conti, S.; El-Nakhel, C.; Roupheal, Y.; Ritieni, A.; Di Vaio, C. Biostimulants Improve Plant Growth and Bioactive Compounds of Young Olive Trees under Abiotic Stress Conditions. *Agriculture* **2022**, *12*, 227. [[CrossRef](#)]
42. Tamás, N.P.; Ádám, C.; Anita, S. Effects of algae products on nutrient uptake and fruit quality of apple. *Nat. Resour. Sustain. Dev.* **2019**, *9*, 80–91. [[CrossRef](#)]
43. Ambroszczyk, A.M.; Liwińska, E.; Bieżanowska Kopeć, R. Rola procesów technologicznych w kształtowaniu jakości żywności: Zróżnicowanie wartości odżywczej oraz prozdrowotnej owoców pomidora w zależności od zastosowanych biostymulatorów wzrostu. *Rola Procesów Technol. W Kształtowaniu Jakości Żywności* **2016**, *173*, 173–182. [[CrossRef](#)]

44. Mikos-Bielak, M. Bioregulacja plonowania i chemicznej jakości plonu malin jako efekt zastosowania Asahi. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sect. E. Agric.* **2004**, *59*, 1471–1479.
45. Kapłan, M.; Lenart, A.; Klimek, K.; Borowy, A.; Wrona, D.; Lipa, T. Assessment of the Possibilities of Using Cross-Linked Polyacrylamide (Agro Hydrogel) and Preparations with Biostimulation in Building the Quality Potential of Newly Planted Apple Trees. *Agronomy* **2021**, *11*, 125. [[CrossRef](#)]
46. Campobenedetto, C.; Mannino, G.; Agliassa, C.; Acquadro, A.; Contartese, V.; Garabello, C.; Berteà, C.M. Transcriptome Analyses and Antioxidant Activity Profiling Reveal the Role of a Lignin-Derived Biostimulant Seed Treatment in Enhancing Heat Stress Tolerance in Soybean. *Plants* **2020**, *9*, 1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Parađiković, N.; Vinković, T.; Vinković Vrček, I.; Žuntar, I.; Bojić, M.; Medić-Šarić, M. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: An example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 2146–2152. [[CrossRef](#)]
48. Mukherjee, A.; Patel, J.S. Seaweed extract: Biostimulator of plant defense and plant productivity. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *17*, 553–558. [[CrossRef](#)]
49. Jeannin, I.; Lescure, J.-C.; Morot-Gaudry, J.-F. The Effects of Aqueous Seaweed Sprays on the Growth of Maize. *Bot. Mar.* **1991**, *34*, 469–474. [[CrossRef](#)]
50. Mattner, S.W.; Wite, D.; Riches, D.A.; Porter, I.J.; Arioli, T. The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria, Australia. *Biol. Agric. Hort.* **2013**, *29*, 258–270. [[CrossRef](#)]
51. Rayirath, P.; Benkel, B.; Hodges, D.M.; Allan-Wojtas, P.; MacKinnon, S.; Critchley, A.T.; Prithiviraj, B. Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **2009**, *230*, 135–147. [[CrossRef](#)]
52. Alam, M.Z.; Braun, G.; Norrie, J.; Hodges, D.M. Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. *Can. J. Plant Sci.* **2013**, *93*, 23–36. [[CrossRef](#)]
53. Mugnai, S.; Azzarello, E.; Pandolfi, C.; Salamagne, S.; Briand, X.; Mancuso, S. Enhancement of ammonium and potassium root influxes by the application of marine bioactive substances positively affects *Vitis vinifera* plant growth. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *20*, 177–182. [[CrossRef](#)]
54. Fan, D.; Hodges, D.M.; Critchley, A.T.; Prithiviraj, B. A Commercial Extract of Brown Macroalga (*Ascophyllum nodosum*) Affects Yield and the Nutritional Quality of Spinach In Vitro. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2013**, *44*, 1873–1884. [[CrossRef](#)]
55. Bi, F.; Iqbal, S.; Arman, M.; Ali, A.; Hassan, M.-U. Carrageenan as an elicitor of induced secondary metabolites and its effects on various growth characters of chickpea and maize plants. *J. Saudi Chem. Soc.* **2011**, *15*, 269–273. [[CrossRef](#)]
56. Vera, J.; Castro, J.; Contreras, R.A.; González, A.; Moenne, A. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2012**, *79*, 31–39. [[CrossRef](#)]

Mgr inż. Agnieszka Lenart

Warszawa, 08.02.2024r.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Katedra Sadownictwa i Ekonomiki Ogrodnictwa

ul. Nowoursynowska 166

02-787 Warszawa

tel.: (+22) 59 32 109

mail: agnieszkalenart1@wp.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pt.:

A) **Lenart, A.**, Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7)

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: współtworzeniu koncepcji, wyborze metodyki badań, przeprowadzeniu doświadczeń, opracowaniu badań, opracowaniu analizy statystycznej, przygotowaniu monografii oraz wykonaniu ostatecznej korekty pracy.

Mój udział wynosi 60%

B) **Lenart, A.**, Wrona, D., Krupa, T. (2022). Health - Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization. Agriculture, 12(10)

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: współtworzeniu koncepcji, wyborze metodyki badań, przeprowadzeniu doświadczeń, opracowaniu badań, opracowaniu analizy statystycznej, przygotowaniu monografii oraz wykonaniu ostatecznej korekty pracy.

Mój udział wynosi 70%


.....

podpis

Dr hab. Dariusz Wrona, prof. SGGW
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Katedra Sadownictwa i Ekonomiki Ogrodnictwa
ul. Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa
tel.: (+22) 59 32 109
mail: dariusz_wrona@sggw.edu.pl

Warszawa, 08.02.2024r.

**Rada Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pt.:

A) **Lenart, A.**, Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7)

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: współtworzeniu koncepcji, wyborze metodyki badań oraz wykonaniu ostatecznej korekty pracy.

Mój udział wynosi 20%

B) **Lenart, A.**, Wrona, D., Krupa, T. (2022). Health - Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization. Agriculture, 12(10)

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: współtworzeniu koncepcji, wyborze metodyki badań oraz wykonaniu ostatecznej korekty pracy.

Mój udział wynosi 20%



.....
podpis

Dr Tomasz Krupa

Warszawa, 08.02.2024r.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Katedra Sadownictwa i Ekonomiki Ogrodnictwa

ul. Nowoursynowska 166

02-787 Warszawa

tel.: (+22) 59 32 109

mail: tomasz_krupa@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pt.:

A) **Lenart, A.,** Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7)


mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: współtworzeniu koncepcji, wykonaniu korekty pracy.

Mój udział wynosi 10%

B) **Lenart, A.,** Wrona, D., Krupa, T. (2022). Health - Promoting Properties of Highbush Blueberries Depending on Type of Fertilization. Agriculture, 12(10)

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: współtworzeniu koncepcji, wykonaniu korekty pracy.

Mój udział wynosi 10%


.....
podpis

Dr hab. Kamila Klimek

Lublin, 08.02.2024r.

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Katedra Matematyki Stosowanej i Informatyki

mail: kamila.klimek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**

w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pt.:

A. Lenart, A., Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., & Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7), Artykuł e0271383.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: częściowym opracowaniu analizy statystycznej danych.

Mój udział wynosi 5%.



podpis

Dr hab. Magdalena Kapłan

Lublin, 08.02.2024r.

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Katedra Sadownictwa, Szkółkarstwa i Enologii

mail: magdalena.kaplan@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pt.:

A. Lenart, A., Wrona, D., Klimek, K., Kapłan, M., & Krupa, T. (2022). Assessment of the impact of innovative fertilization methods compared to traditional fertilization in the cultivation of highbush blueberry. PLOS ONE, 17(7), Artykuł e0271383.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: częściowym opracowaniu wyników badań

Mój udział wynosi 5%.

Magdalena Kapłan

podpis

Część II

Ocena efektywności niwelowania stresu suszy w uprawie borówki wysokiej za pomocą preparatu wdrożeniowego Kaoris

II.1. MATERIAŁ I METODY – OPRACOWANIE DOTYCZĄCE BADAŃ SZKLARNIOWYCH

II.1.1. Lokalizacja i układ doświadczenia

Doświadczenie przeprowadzono w 2022 roku w warunkach kontrolowanych (szklarniowych) w Centre Mondial de l'Innovation Roullier we Francji w Saint Malo.

W doświadczeniu wykorzystano trzyletnie krzewy borówki wysokiej 'Brigitta Blue'. Rośliny posadzono w plastikowych doniczkach o pojemności 10 dm³ zawierających kwaśne podłoże (torfowiec Sphagnum bez nawozów, pH (H₂O) 3,5-4,5, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Niemcy), umieszczonych w szklarni z fotoperiodem 16h/8h (dzień/noc), kontrolowanym przez dodatkowe oświetlenie z wysokoprężnych lamp sodowych i temperaturą 25°C/20°C dzień/noc. Podłoże w doniczkach utrzymywano na poziomie 80% wodnej pojemności polowej poprzez ręczne podlewanie i cotygodniowe dostarczanie pożywki (Tabela 3) przez 5 tygodni do momentu wprowadzenia deficytu wody.

Tabela 3. Skład mineralny pożywki

Skład mineralny pożywki używanej do nawadniania

Składnik	Produkt	Składnik/doniczka/użycie (g)
N	Siarczan amonu	0,307
P ₂ O ₅	Fosforan potasu	0,231
K ₂ O	Siarczan potasu	0,538
Mg	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,153
Mn	MnSO ₄ , H ₂ O	0,006
Zn	ZnSO ₄ , 5H ₂ O	0,009
B	H ₃ BO ₃	0,001
Cu	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,000
Fe	EDTA, 2NaFe, H ₂ O	0,011

Połowa roślin była co tydzień opryskiwana preparatem wdrożeniowym Kaoris w stężeniu 1%, trzy razy w odstępie 1 tygodnia (1 aplikacja tygodniowo). Biostymulator był równomiernie наносzony na całą roślinę. Siedem dni po trzeciej aplikacji produktu, połowa nieopryskiwanych i opryskiwanych roślin została poddana stresowi deficytu wody poprzez zatrzymanie podlewania do osiągnięcia 40% wodnej pojemności polowej (WPP). Układ doświadczenia obejmował 4 kombinacje:

C - Kontrola - bez biostymulacji, bez deficytu wody;

CS - Stres kontrola - deficyt wody do 40% WPP , bez biostymulacji;

B – Biostymulator, preparat wdrożeniowy Kaoris - bez deficytu wody, biostymulacja;

BS – Stres plus biostymulator, preparat wdrożeniowy Kaoris - deficyt wody do 40% WPP , biostymulacja.

II.1.2. Metody badawcze

II.1.2.1. Pobieranie materiału do badań

Analizę aktywności katalazy i peroksydazy, zawartości dialdehydu malonowego, wykonano w mrożonym materiale roślinnym. Przed wprowadzeniem roślin w deficyt wody (dzień 0), pobrano 10 liści z każdej rośliny, zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. Tę procedurę powtórzono po 2, 8, 12 i 15 dniach od wprowadzenia deficytu wody (dzień 0).

II.1.2.2. Analiza aktywności fotosyntetycznej SPAD

Ocenę przeprowadzono na materiale świeżym.

Przed pobraniem materiału do analiz laboratoryjnych przeprowadzono pomiary losowe aktywności fotosyntetycznej SPAD (ang. Soil-Plant Analysis Development, MC-100 Chlorophyll Meter, Apogee Instruments, Inc.). Pomiar wykonano na 10 liściach z jednej rośliny. Pomiar SPAD wykonano w dniu 0 oraz po 2, 8, 12 i 15 dniach od wprowadzenia deficytu wody.

II.1.2.3. Aktywność katalazy i peroksydazy

Ekstrakcja: W celu oznaczenia aktywności enzymatycznej, 200 mg sproszkowanej tkanki liścia ekstrahowano w 100 mM buforze fosforanowym - pH 7 uzupełnionym PVP. Ekstrakt homogenizowano, a następnie wirowano przy 12 000 obrotów przez 20 minut w temperaturze 4°C. Supernatant zebrano do nowej probówki i wykorzystano do kolorymetrycznego oznaczenia aktywności katalazy i peroksydazy.

Test katalazy: 50 μL ekstraktu enzymatycznego i 100 μL 10 mM nadtlenu wodoru dodano do 96-dołkowej płytki. Płytkę mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 minuty, a następnie dodano roztwór roboczy składający się z kobaltu (II), heksametafosforanu sodu i węglanu sodu. Płytkę ponownie mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut w ciemności, aż do uzyskania zielonego koloru. Zmiany absorbancji rejestrowano przy 440 nm względem próby ślepej. Dysocjacja nadtlenu wodoru jest proporcjonalna do aktywności enzymu katalazy w użytej próbce. Wyniki podano w $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^{-1}$ ś.m.

Test peroksydazy: 10 μL ekstraktu i 100 μL roztworu roboczego (50 mM bufor fosforanowy, 20 mM nadtlenek wodoru i 0,05% gwajakol) dodano do 96-dołkowej płytki. Zmiany absorbancji rejestrowano przy długości fali 470 nm przez 2 minuty (jeden odczyt co 15 sekund). Aktywność peroksydazy mierzono jako utlenianie gwajakolu ($\epsilon = 26,6 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) w obecności nadtlenu wodoru w ciągu 2 minut. Wyniki podano w $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^{-1}$ ś.m.

II.1.2.4. Pomiar dialdehydu malonowego (MDA)

100 mg świeżo zmielonej tkanki liścia ekstrahowano 0,1% rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym TCA i mieszano przez 20 minut w niskiej temperaturze (chroniąc przed światłem). Ekstrakt odwirowano przy 10000 obrotów przez 15 minut w temperaturze 4°C, a supernatant oddzielono i przefiltrowano przy użyciu filtra 0,2 μm . Przesącz przeniesiono do nowej probówki i dodano 1 ml odczynnika TBA (kwas tiobarbiturowy), wymieszano i inkubowano przez 15 minut w łaźni wodnej w temperaturze 95°C, a następnie przez 5 minut w lodzie. Po odwirowaniu przy 10 000 obrotów przez 10 minut w temperaturze 4°C, supernatant przeniesiono na 96-dołkową płytkę i zarejestrowano zmiany absorbancji przy 440 nm, 532 nm i 600 nm. Ilość kompleksu MDA-TBA obliczono przy użyciu współczynnika ekstynkcyjnego 155 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}$. Wyniki podano w mg/g^{-1} ś.m.

II.1.2.5. Analiza składników mineralnych w liściach

Zwartość C, N i S oceniano przy użyciu analizatora elementarnego FLASH 2000 CHNS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcjami producenta z 2,5 mg homogenizowanego i liofilizowanego materiału roślinnego.

W przypadku pozostałych pierwiastków analizę przeprowadzono przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-OES, 5110 VDV, Agilent, CA, Stany Zjednoczone) z uprzednim trawieniem mikrofalowym próbki kwasem (Multiwave Pro, Anton Paar, Les Ulis, Francja) [8 ml stężonego HNO₃, 2 ml H₂O₂ i 15 ml wody Milli-Q na 100 mg suchej masy (SM)]. Oznaczenie ilościowe każdego pierwiastka przeprowadzono za pomocą zewnętrznej standardowej krzywej kalibracyjnej. Wyniki podano w mg/g⁻¹ s.m..

II.1.2.6. Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem metody jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji. Wnioskowanie oparto na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wszystkie analizy statystyczne wykonano w programie SAS Enterprise Guide 5.1 (Sas Institute Sp. z o.o., Warszawa, Polska).

II.2. WYNIKI

Wpływ zastosowanych kombinacji nawozowych na aktywność enzymów katalazy i peroksydazy oraz poziom dialdehydu malonowego (MDA) bez czynnika suszy przedstawiono w tabeli 5. Poziom aktywności katalazy w przeprowadzonym badaniu był wyższy po zastosowaniu preparatu wdrożeniowego Kaoris (kombinacja B) w porównaniu do kontroli (kombinacja C), w większości terminów badania, z wyjątkiem terminu 0. Aktywność katalazy w roślinach kontrolnych wzrosła jedynie w 8 dniu pomiarów. Natomiast zastosowanie preparatu Kaoris spowodowało wzrost aktywności katalazy w 2, 8 i 12 dniu badań (tabela 5).

Zastosowany w doświadczeniu preparat wdrożeniowy Kaoris nie wpłynął na poziom dialdehydu malonowego (MDA) w badanym materiale roślinnym (tabela 5). Porównując terminy analiz zanotowano spadek poziomu MDA w 12 dniu badań w roślinach kontrolnych. Natomiast zawartość MDA w liściach roślin opryskiwanych preparatem wdrożeniowym Kaoris zmieniała się w czasie trwania analiz. Najniższą wartością badanego wskaźnika oznaczono w 12 dniu pomiarów, zaś najwyższą w terminie 0. Ponadto pomiary w dniu 2, 8 i 15 charakteryzowały się wartościami pośrednimi dla badanego wskaźnika.

Aktywność peroksydazy nie zmieniała się istotnie po wykonaniu zabiegu preparatem wdrożeniowym Kaoris (tabela 5). Stwierdzono natomiast różnice zarówno u roślin kontrolnych jak i w kombinacji z preparatem wdrożeniowym Kaoris w zależności od terminu pomiaru. Analizując poszczególne terminy badań, najniższą wartość aktywności peroksydazy zanotowano w 15 dniu testów zaś najwyższą w 12 dniu badań u roślin kontrolnych. Aktywność peroksydazy w liściach roślin opryskiwanych preparatem wdrożeniowym Kaoris była niższa w 2 i 15 dniu zaś wyższe wartości stwierdzono w pozostałych terminach badań.

Wpływ zastosowanego preparatu wdrożeniowego Kaoris na aktywność enzymów katalazy i peroksydazy oraz poziom dialdehydu malonowego (MDA) z czynnikiem suszy przedstawiono w tabeli 6. Poziom aktywności katalazy był wyższy w liściach roślin opryskiwanych preparatem wdrożeniowym Kaoris (kombinacja BS) w porównaniu do roślin kontrolnych (kombinacja CS), we wszystkich terminach badania. Oceniając aktywność katalazy w roślinach kontrolnych stwierdzono niższe wartości badanego wskaźnika w 15 dniu testów, niż w pozostałych terminach. Aktywność katalazy w roślinach traktowanych preparatem wdrożeniowym Kaoris w okresie trwania doświadczenia była zmienna. Najwyższą wartość aktywności katalazy zanotowano w 12 dniu badania a najniższą w 15.

Zastosowane w doświadczeniu zabiegi preparatem Kaoris wpłynęły na poziom MDA w badanym materiale roślinnym (tabela 6). Wartość MDA w liściach, była wyższa po zastosowaniu preparatu wdrożeniowego Kaoris w 2 i 8 dniu pomiaru niż w liściach kontrolnych. Natomiast w 15 dniu pomiaru poziom MDA był o 37% większy w roślinach kontrolnych w stosunku do krzewów opryskiwanych preparatem Kaoris. Porównując poziom MDA w roślinach nie traktowanych preparatem Kaoris najwyższą wartość wskaźnika stwierdzono w 15 dniu pomiarów zaś najniższą w terminie 0. W roślinach opryskiwanych preparatem wdrożeniowym Kaoris zawartość MDA zmieniała się w trakcie badań. Wyższą koncentrację MDA zanotowano w 8 i 15 dniu badania, zaś niższą w 2 i 12 dniu.

Aktywność peroksydazy w roślinach traktowanych i nie traktowanych preparatem Kaoris była zbliżona do 12 dnia badań. Różnice między kombinacjami doświadczenia odnotowano jedynie w 15 dniu badań, stwierdzając wyższą aktywność peroksydazy w roślinach z kombinacji kontrolnej w porównaniu do roślin traktowanych preparatem wdrożeniowym. Aktywności peroksydazy w poszczególnych terminach badań nie zmieniała się za wyjątkiem terminu 0, w którym to stwierdzono wyższą wartość wskaźnika niż w pozostałych terminach. W trakcie prowadzonych badań stwierdzono obniżenie się aktywności peroksydazy w roślinach traktowanych Kaoris.

Tabela 5. Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na aktywność enzymów oksydujących oraz na poziom markera stresu oksydacyjnego dialdehydu malonowego (MDA). Kombinacje bez czynnika suszy.

	Kombi- nacja	Terminy testów					p-value
		0	2	8	12	15	
Aktywność katalazy ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^{-1}$ ś.m.)	C	176,6 ^{Aa}	201,8 ^{Aa}	282,7 ^{Ab}	163,6 ^{Aa}	162,8 ^{Aa}	0.0001
	B	182,4 ^{Aa}	352,6 ^{Bb}	347,4 ^{Bb}	325,5 ^{Bb}	219,5 ^{Ba}	0.0001
	p-value	0,9733	0,0332	0,0155	0,01048	0,0461	
MDA (mg/g^{-1} ś.m.)	C	0,051 ^{Ab}	0,057 ^{Ab}	0,046 ^{Ab}	0,033 ^{Aa}	0,048 ^{Ab}	0.0430
	B	0,048 ^{Ab}	0,045 ^{Aab}	0,042 ^{Aab}	0,034 ^{Aa}	0,037 ^{Aab}	0.0767
	p-value	0,9581	0,2407	0,5517	0,5011	0,1344	
Aktywność per- oksydazy ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^{-1}$ ś.m.)	C	0,043 ^{Ab}	0,047 ^{Ab}	0,047 ^{Ab}	0,067 ^{Ac}	0,029 ^{Aa}	0.0001
	B	0,036 ^{Aa}	0,063 ^{Ab}	0,032 ^{Aa}	0,055 ^{Ab}	0,021 ^{Aa}	0.0013
	p-value	0,1641	0,8611	0,0671	0,0719	0,8391	

Objaśnienie: duże litery w kolumnie oznaczają porównanie kombinacji, małe litery w wierszu oznaczają porównanie poszczególnych dni doświadczenia.

Tabela 6. Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na aktywność enzymów oksydujących oraz na poziom markera stresu oksydacyjnego dialdehydu malonowego (MDA). Kombinacje z czynnikiem suszy.

	Kombi- nacja	Terminy testów					p-value
		0	2	8	12	15	
	CS	250,4 ^{Ab}	317,2 ^{Ab}	298,9 ^{Ab}	252,3 ^{Ab}	199,9 ^{Aa}	0,0004
Aktywność katalazy ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^{-1}$ ś.m.)	BS	292,1 ^{Bb}	357,0 ^{Bcd}	324,8 ^{Bc}	374,2 ^{Bd}	234,0 ^{Ba}	0,0001
	p-value	0,0087	0,0419	0,0428	0,0267	0,0366	
	CS	0,032 ^{Aa}	0,053 ^{Ac}	0,043 ^{Ab}	0,042 ^{Ab}	0,097 ^{Bd}	0,0001
MDA (mg/g^{-1} ś.m.)	BS	0,055 ^{Bab}	0,053 ^{Aa}	0,056 ^{Bb}	0,048 ^{Aa}	0,061 ^{Ab}	0,1365
	p-value	0,0289	0,4611	0,0709	0,9436	<0,001	
Aktywność per- oksydazy ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^{-1}$ ś.m.)	CS	0,035 ^{Ab}	0,028 ^{Aa}	0,019 ^{Aa}	0,026 ^{Aa}	0,024 ^{Ba}	0,0030
	BS	0,045 ^{Ac}	0,022 ^{Ab}	0,035 ^{Abc}	0,024 ^{Ab}	0,015 ^{Aa}	0,0164
	p-value	0,8783	0,8102	0,1436	0,3451	0,0164	

Objaśnienie: duże litery w kolumnie oznaczają porównanie kombinacji, małe litery w wierszu oznaczają porównanie poszczególnych dni doświadczenia.

Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris (w kombinacji z czynnikiem suszy i bez) na zawartość azotu i węgla w liściach badanych roślin przedstawiono w tabeli 7. Zastosowany w doświadczeniu preparat Kaoris nie wpłynął na zawartość azotu i węgla. Również w trakcie badań nie stwierdzono zmian w zawartości omawianych składników w czasie.

Tabela 7. Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość azotu i węgla w liściach badanych roślin.

		Terminy testów					
	Kombinacja	0	2	8	12	15	p-value
Azot (mg/g ⁻¹ s.m.)	C	21,9 ^{Aa}	22,5 ^{Aa}	24,1 ^{Aa}	22,6 ^{Aa}	24,1 ^{Aa}	0,4234
	B	21,6 ^{Aa}	24,2 ^{Aa}	23,9 ^{Aa}	24,4 ^{Aa}	24,6 ^{Aa}	0,6353
	p-value	0,8858	0,3645	0,9833	0,2769	0,8027	
Węgiel (mg/g ⁻¹ s.m.)	C	492,1 ^{Aa}	499,5 ^{Aa}	491,2 ^{Aa}	489,7 ^{Aa}	492,9 ^{Aa}	0,2983
	B	492,6 ^{Aa}	495,5 ^{Aa}	490,4 ^{Aa}	488,5 ^{Aa}	498,0 ^{Aa}	0,1150
	p-value	0,9292	0,1943	0,8462	0,7902	0,1179	
Azot (mg/g ⁻¹ s.m.)	CS	22,9 ^{Aa}	24,2 ^{Aa}	23,3 ^{Aa}	25,2 ^{Aa}	23,4 ^{Aa}	0,4315
	BS	23,2 ^{Aa}	24,3 ^{Aa}	24,9 ^{Aa}	26,7 ^{Aa}	27,5 ^{Aa}	0,3346
	p-value	0,9284	0,9747	0,4348	0,2761	0,225	
Węgiel (mg/g ⁻¹ s.m.)	CS	496,2 ^{Aa}	495,9 ^{Aa}	492,9 ^{Aa}	497,2 ^{Aa}	490,5 ^{Aa}	0,7723
	BS	489,7 ^{Aa}	486,3 ^{Aa}	495,1 ^{Aa}	489,1 ^{Aa}	491,9 ^{Aa}	0,2152
	p-value	0,101	0,304	0,6861	0,361	0,8703	

Objaśnienie: duże litery w kolumnie oznaczają porównanie kombinacji, małe litery w wierszu oznaczają porównanie poszczególnych dni doświadczenia.

W przeprowadzonych badaniach nad wpływem preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość chlorofilu w liściach borówki wysokiej nie wykazano istotnych różnic pomiędzy badanymi kombinacjami (tabela 8). W liściach roślin traktowanych preparatem Kaoris (bez czynnika suszy) poziom chlorofilu istotnie wzrósł w 12 i 15 dniu pomiarów. Podobne relacje obserwowano w roślinach poddanych stresowi suszy i nietraktowanych preparatem Kaoris. Natomiast w pozostałych kombinacjach doświadczenia nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi terminami badań.

Tabela 8. Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość chlorofilu w liściach badanych roślin wyrażony indeksem intensywności zabarwienia liści SPAD (Soil Plant Analysis Development).

	Kombinacja	Terminy testów					p-value
		0	2	8	12	15	
SPAD	C	27,3 ^{Aa}	21,3 ^{Aa}	30,6 ^{Aa}	30,1 ^{Aa}	30,6 ^{Aa}	0,0550
	B	17,8 ^{Aa}	24,3 ^{Aa}	23,8 ^{Aa}	31,0 ^{Ab}	36,7 ^{Ab}	0,0198
	p-value	0,8315	0,0532	0,9701	0,5416	0,2461	
	CS	21,9 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	24,4 ^{Aa}	31,6 ^{Ab}	28,2 ^{Ab}	0,0110
	BS	26,2 ^{Aa}	27,9 ^{Aa}	30,4 ^{Aa}	30,5 ^{Aa}	24,2 ^{Aa}	0,8443
	p-value	0,8714	0,7619	0,5779	0,4276	0,5208	

Objaśnienie: duże litery w kolumnie oznaczają porównanie kombinacji, małe litery w wierszu oznaczają porównanie poszczególnych dni doświadczenia.

Wpływ zastosowanego preparatu wdrożeniowego Kaoris na akumulację składników mineralnych w liściach badanych roślin przedstawiono w tabeli 9 i 10.

W przeprowadzonym doświadczeniu nie wykazano wpływu traktowania preparatem Kaoris na akumulację składników pokarmowych w liściach borówki wysokiej niezależnie od wprowadzenia roślin w stres suszy. Jedynie poziom K wzrósł w 12 i 15 dniu pomiarów w liściach roślin poddanych stresowi suszy i opryskiwanych preparatem wdrożeniowym Kaoris.

Tabela 9. Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość składników mineralnych w liściach badanych roślin [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.]. Kombinacje bez wpływu suszy.

	Kombina- cja	Terminy testów					p-value
		0	2	8	12	15	
K	C	5,69 ^{Aa}	5,88 ^{Aa}	6,79 ^{Aa}	7,17 ^{Aa}	6,59 ^{Aa}	0,3399
	B	5,67 ^{Aa}	6,64 ^{Aa}	5,89 ^{Aa}	6,86 ^{Aa}	6,48 ^{Aa}	0,1796
	p-value	0,9751	0,1556	0,3784	0,5651	0,8721	
Ca	C	7,18 ^{Aa}	7,25 ^{Aa}	5,87 ^{Aa}	5,94 ^{Aa}	6,01 ^{Aa}	0,2903
	B	6,72 ^{Aa}	6,06 ^{Aa}	4,31 ^{Aa}	4,27 ^{Aa}	4,65 ^{Aa}	0,126
	p-value	0,3074	0,399	0,2931	0,442	0,0686	
Mg	C	2,16 ^{Aa}	2,19 ^{Aa}	1,80 ^{Aa}	1,85 ^{Aa}	1,93 ^{Aa}	0,2886
	B	1,96 ^{Aa}	1,83 ^{Aa}	1,46 ^{Aa}	1,48 ^{Aa}	1,34 ^{Aa}	0,0504
	p-value	0,0679	0,0791	0,335	0,1296	0,0566	
P	C	1,85 ^{Aa}	1,78 ^{Aa}	1,79 ^{Aa}	1,81 ^{Aa}	1,66 ^{Aa}	0,4641
	B	1,74 ^{Aa}	1,84 ^{Aa}	1,81 ^{Aa}	1,85 ^{Aa}	1,77 ^{Aa}	0,9139
	p-value	0,5641	0,4813	0,8909	0,6675	0,3411	
B	C	0,065 ^{Aa}	0,06 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,06 ^{Aa}	0,06 ^{Aa}	0,8273
	B	0,06 ^{Aa}	0,06 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,04 ^{Aa}	0,2902
	p-value	0,6164	0,3037	0,5974	0,1131	0,0921	
Fe	C	0,27 ^{Aa}	0,32 ^{Aa}	0,35 ^{Aa}	0,36 ^{Aa}	0,34 ^{Aa}	0,8405
	B	0,28 ^{Aa}	0,34 ^{Aa}	0,32 ^{Aa}	0,34 ^{Aa}	0,22 ^{Aa}	0,8387
	p-value	0,9231	0,8946	0,7533	0,7747	0,2071	
Mn	C	0,17 ^{Aa}	0,18 ^{Aa}	0,17 ^{Aa}	0,17 ^{Aa}	0,16 ^{Aa}	0,9893
	B	0,18 ^{Aa}	0,16 ^{Aa}	0,13 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,11 ^{Aa}	0,4733
	p-value	0,8247	0,6663	0,4842	0,2901	0,1567	
S	C	3,04 ^{Aa}	2,94 ^{Aa}	2,84 ^{Aa}	2,99 ^{Aa}	2,85 ^{Aa}	0,9432
	B	2,34 ^{Aa}	2,48 ^{Aa}	2,07 ^{Aa}	2,09 ^{Aa}	1,92 ^{Aa}	0,1373
	p-value	0,368	0,1106	0,172	0,122	0,0655	
Na	C	0,31 ^{Aa}	0,31 ^{Aa}	0,26 ^{Aa}	0,31 ^{Aa}	0,25 ^{Aa}	0,5613
	B	0,25 ^{Aa}	0,25 ^{Aa}	0,21 ^{Aa}	0,19 ^{Aa}	0,16 ^{Aa}	0,3985
	p-value	0,2297	0,1381	0,3321	0,1023	0,2206	

Objaśnienie: duże litery w kolumnie oznaczają porównanie kombinacji, małe litery w wierszu oznaczają porównanie poszczególnych dni doświadczenia.

Tabela 10. Wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość składników mineralnych w liściach badanych roślin [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.]. Kombinacje z czynnikiem suszy.

		Terminy testów					
	Kombinacja	0	2	8	12	15	p-value
K	CS	5,26 ^{Aa}	5,89 ^{Aa}	5,82 ^{Aa}	6,47 ^{Aa}	6,46 ^{Aa}	0,8187
	BS	6,87 ^{Aa}	7,63 ^{Aa}	7,72 ^{Aa}	8,42 ^{Ab}	9,27 ^{Ab}	0,0407
	p-value	0,1543	0,1696	0,0978	0,0712	0,0615	
Ca	CS	5,49 ^{Aa}	4,94 ^{Aa}	3,98 ^{Aa}	4,58 ^{Aa}	5,11 ^{Aa}	0,3572
	BS	5,45 ^{Aa}	5,42 ^{Aa}	3,96 ^{Aa}	3,61 ^{Aa}	3,96 ^{Aa}	0,1519
	p-value	0,9625	0,4933	0,9807	0,2796	0,3033	
Mg	CS	1,72 ^{Aa}	1,55 ^{Aa}	1,41 ^{Aa}	1,51 ^{Aa}	1,59 ^{Aa}	0,7064
	BS	2,04 ^{Aa}	1,96 ^{Aa}	1,62 ^{Aa}	1,54 ^{Aa}	1,57 ^{Aa}	0,2728
	p-value	0,3241	0,0813	0,5153	0,8617	0,9484	
P	CS	1,74 ^{Aa}	1,81 ^{Aa}	1,79 ^{Aa}	1,72 ^{Aa}	1,51 ^{Aa}	0,3007
	BS	1,74 ^{Aa}	1,82 ^{Aa}	1,87 ^{Aa}	1,94 ^{Aa}	1,84 ^{Aa}	0,9016
	p-value	0,9903	0,9703	0,5352	0,4001	0,0562	
B	CS	0,05 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,03 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,1345
	BS	0,04 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,04 ^{Aa}	0,04 ^{Aa}	0,04 ^{Aa}	0,2563
	p-value	0,3534	0,6887	0,5272	0,3878	0,0571	
Fe	CS	0,12 ^{Aa}	0,22 ^{Aa}	0,25 ^{Aa}	0,25 ^{Aa}	0,31 ^{Aa}	0,0034
	BS	0,21 ^{Aa}	0,32 ^{Aa}	0,31 ^{Aa}	0,26 ^{Aa}	0,27 ^{Aa}	0,3411
	p-value	0,0914	0,1217	0,5667	0,8629	0,6917	
Mn	CS	0,16 ^{Aa}	0,16 ^{Aa}	0,13 ^{Aa}	0,16 ^{Aa}	0,17 ^{Aa}	0,7089
	BS	0,19 ^{Aa}	0,18 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,13 ^{Aa}	0,15 ^{Aa}	0,5438
	p-value	0,5892	0,5423	0,7204	0,4077	0,4184	
S	CS	2,04 ^{Aa}	2,12 ^{Aa}	1,83 ^{Aa}	2,02 ^{Aa}	1,97 ^{Aa}	0,6547
	BS	2,49 ^{Aa}	2,60 ^{Aa}	2,19 ^{Aa}	2,18 ^{Aa}	2,16 ^{Aa}	0,7905
	p-value	0,1946	0,1718	0,3684	0,7193	0,6477	
Na	CS	0,22 ^{Aa}	0,25 ^{Aa}	0,18 ^{Aa}	0,23 ^{Aa}	0,27 ^{Aa}	0,8211
	BS	0,32 ^{Aa}	0,34 ^{Aa}	0,24 ^{Aa}	0,24 ^{Aa}	0,29 ^{Aa}	0,3896
	p-value	0,1866	0,3704	0,3571	0,9545	0,7591	

Objaśnienie: duże litery w kolumnie oznaczają porównanie kombinacji, małe litery w wierszu oznaczają porównanie poszczególnych dni doświadczenia.

II.3. DYSKUSJA

Obniżenie poziomu MDA, wzrost H_2O_2 wzrost aktywności enzymów oksydujących, związków fenolowych i kwasu abscysynowego (ABA) należą do głównych mechanizmów obronnych roślin podczas ekspozycji na stres suszy (Min i in. 2019; Cramer 2011). Stres suszy w znaczny sposób ogranicza plonowanie roślin uprawnych i jakość owoców a biostymulatory wydają się być skutecznym narzędziem do niwelowania wpływu stresu abiotycznego roślin (Drobek i in. 2019). Użyty w doświadczeniu preparat wdrożeniowy Kaoris zawiera wyciągi z alg morskich. Ekstrakty z wodorostów zawierają składniki odżywcze, stymulują wzrost roślin, fotosyntezę oraz tolerancję na stresory a tym samym poprawiają plonowanie i jakość owoców (Sharma i in. 2013). Katalaza oraz peroksydaza są neutralizatorami reaktywnych form tlenu (RFT) powstałych na skutek stresu suszy (Molassiotis 2006). Nagromadzenie RFT w komórkach roślinnych prowadzi do peroksydacji lipidów i trwałego uszkodzenia ściany komórkowej (Ashraf 2009; Hosseini i in. 2022). W wyniku przeprowadzonego badania stwierdzono znacząca akumulację markera stresu oksydacyjnego (MDA) w komórkach roślin nie opryskiwanych biostymulatorami. W porównaniu do kombinacji, w której czynnika suszy nie zastosowano, wartość tego parametru była o połowę mniejsza. Badanie potwierdza pozytywny wpływ preparatu wdrożeniowego Kaoris na zmniejszenie poziomu zawartości szkodliwego MDA w komórkach roślinnych. W badaniach przeprowadzonych przez Mansori i in. (2019) odnotowano korzystny efekt zastosowania ekstraktów z alg morskich na obniżenie stężenia MDA w liściach roślin poddanych stresowi suszy. Według licznych opracowań, biostymulatory oparte na wyciągach z alg morskich indukują aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Mansori i in. 2019; Molnar i in. 2022). Według wyników badań własnych poziom aktywności katalazy był wyraźnie wyższy w kombinacji, w której wprowadzono czynnik stresu oraz preparat wdrożeniowy Kaoris, w stosunku do kombinacji kontrolnej. Tą samą zależność zaobserwowano w kombinacjach, gdzie nie wprowadzono czynnika suszy. Rośliny opryskiwane biostymulatorem miały wyższy potencjał aktywności oksydującej niż te w których zastosowano jedynie składniki pokarmowe bez biostymulacji. Zależności tej nie potwierdzono w przypadku aktywności peroksydazy, jej poziom wzrastał wraz z okresem trwania eksperymentu choć poziom aktywności tego enzymu był podobny w obu kombinacjach z i bez preparatu wdrożeniowego Kaoris. Zarówno katalaza i peroksydaza są dobrym markerem stresów roślinnych, jednak warto zauważyć, że aktywność zarówno katalazy jak i peroksydazy w roślinach może różnić się w zależności od gatunku, warunków środowiskowych i typu stresu

(Spann i Little 2011). Stres suszy może powodować żółknięcie liści poprzez degradację chlorofilu (Baker 1996). Według Goñi i in. (2018), rośliny uprawne poddane stresowi suszy i opryskiwane wyciągami z alg morskich, odznaczały się wyższym poziomem chlorofilu. Badania wykonane w niniejszej pracy nie wskazują na wpływ zastosowanego preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość chlorofilu w liściach (SPAD). Khan i in. (2009) donoszą, że dolistne zabiegi wyciągami z alg morskich wpływają na wzrost plonowania i jakości owoców w takich gatunkach jak winorośl, truskawka, pomidor czy kukurydza, co autorzy łączą z wyższą zawartością składników pokarmowych w liściach. Mancuso i in. (2006) wykazali, że zastosowanie ekstraktu z wodorostów na winorośli zwiększyło akumulację N, P, K, Zn i Mg. Wpływ zastosowanego w doświadczeniu własnym preparatu wdrożeniowego Kaoris na zawartość składników pokarmowych w liściach borówki wysokiej w warunkach szklarniowych, nie został potwierdzony. Skuteczność działania preparatów biostymulujących jest zależna od warunków środowiskowych, w jakich rośliny rosną (Singh 2014). Pomiędzy warunkami polowymi a warunkami w szklarni mogą występować różnice wpływające na efektywność działania biostymulatorów. Warunki klimatyczne w szklarni są kontrolowane, co ogranicza występowanie stresów środowiskowych. W warunkach polowych rośliny są bardziej narażone na zmienne warunki pogodowe, takie jak nasłonecznienie o różnej intensywności, zmienne i ekstremalne temperatury, brak opadów deszczu. Biostymulujące związki aktywne działają jako wsparcie dla roślin w okresach stresu, dlatego efekty ich działania mogą być bardziej dostrzegalne w uprawie roślin w warunkach polowych.

7. WNIOSKI

W 2022 roku wprowadzono do obrotu handlowego preparat wdrożeniowy Kaoris. Na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników, sformułowano następujące wnioski, będące odpowiedzią na postawione hipotezy badawcze.

1. Zastosowanie preparatów z biostymulacją zwiększa plonowanie i jakość owoców borówki wysokiej.
2. Pojedynczo stosowany w doświadczeniu polowym preparat Kaoris na roślinach wieloletnich, działa na podobnym poziomie jak preparat Maxifruit.
3. Najwyższe plonowanie i jakość owoców uzyskuje się po zastosowaniu pełnego programu nawożenia z biostymulacją.
4. Aktywność przeciwutleniająca i zawartość polifenoli ogółem wykazuje tendencję wzrostową w owocach po zastosowaniu preparatu wdrożeniowego Kaoris.
5. Potencjał przeciwutleniający owoców zwiększa się po zastosowaniu pełnego programu biostymulacji.
6. Preparat wdrożeniowy Kaoris redukuje negatywne skutki stresu, poprzez wzrost aktywności katalazy i peroksydazy w liściach.
7. Zastosowanie preparatu wdrożeniowego Kaoris nie wpływa na zawartość chlorofilu oraz składników mineralnych w liściach.

8. LITERATURA

1. Abetz, P., Young, C.L. (1983). The effect of seaweed extract sprays derived from *Ascophyllum nodosum* on lettuce and cauliflower crops. *Botanica Marina*, 26, 487–492.
2. Allen, V. G., Pond, K. R., Saker, K. E., Fontenot, J. P., Bagley, C. P., Ivy, R. L., Evans, R. R., Schmidt, R. E., Fike, J. H., Zhang, X., Ayad, J. Y., Brown, C. P., Miller, M. F., Montgomery, J. L., Mahan, J., Wester, D. B., Melton, C. (2001). Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock—A review. *Journal of Animal Science*, 79(E-Suppl), E21.
3. Ambroszczyk, A. M., Liwińska, E., Bieżanowska-Kopeć, R. (2016). Zróżnicowanie wartości odżywczej oraz prozdrowotnej owoców pomidora w zależności od zastosowanych stymulatorów wzrostu. Rola procesów technologicznych w kształtowaniu jakości żywności, 173.
4. Arthur G.D., Stirk W.A., Van Staden J. (2003). Effect of a seaweed concentrate on the growth and yield of three varieties of *Capsicum annum*. *South African Journal of Botany*, 69, 207–211.
5. Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27(1), 84–93.
6. Atzmon, N., Van Staden, J. (1994). The effect of seaweed concentrate on the growth of *Pinus pinea* seedlings. *New Forests*, 8(3), 279–288.
7. Baker, N. R. (Red.). (1996). *Photosynthesis and the Environment*. Springer Netherlands. Springer Dordrecht, ISSN 1572-0233, 469-476.
8. Bal, J. J. M., Balkhoven, J., Peppelman, G. (2006). Results of testing highbush blueberry cultivars in the Netherlands. *Acta Horticulturae*, (715), 157–162.
9. Bañados, M.P., Strik, B.C., Bryla, D.R., Righetti, T.L. (2012) Response of highbush blueberry to nitrogen fertilizer during field establishment, I: Accumulation and allocation of fertilizer nitrogen and biomass *HortScience* 47 648 655.
10. Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39–48.

11. Basak A., Mikos-Bielak M. (2008). The use of some biostimulators on apple and pear trees. W: Sadowski A. (red.), *Biostimulators in Modern Agriculture, Fruit Crops*. Wieś Jutra, Warszawa: 7–17.
12. Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R., Timm, S. (2012). Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 269–27.
13. Bechtold, U., Field, B. (2018). Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 69(11), 2753–2758.
14. Behrends, A., Weber, F. (2017). Influence of Different Fermentation Strategies on the Phenolic Profile of Bilberry Wine (*Vaccinium myrtillus*L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7483–7490.
15. Bhattacharjee, S. (2012). The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Journal of Botany*, 2012, 1–22.
16. Blunden G., Gordon S.M. (1986). Betaines and their sulphono analogues in marine algae. In: *Progress in phycological research*, Round F.E., Chapman D.J. (eds), vol. 4. Biopress Ltd, Bristol, 39–80.
17. Brazelton, C. (2011) *World Blueberry Acreage & Production*; USHBC: Folsom, CA, USA; Available online: www.oregonblueberry.com.
18. Brazelton, C. (2021). Nowoczesna uprawa borówki. Aktualne dane o światowej produkcji borówki. Jaka będzie przyszłość w czasach covid -19? Hortus Media. Międzynarodowa Konferencja Borówkowa 2021, 173–180.
19. Brevis P.A., Bassil N.V., Ballington J.R., Hancock J.F. (2008). Impact of wide hybridization on highbush blueberry breeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 427–437.
20. Bryla, D. R. (2011). Crop evapotranspiration and irrigation scheduling in blueberry. *Evapotranspiration—From measurements to agricultural and environmental applications*. Intech, Rijeka, Croatia, 167-186.
21. Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., Ferrante, A. (2014). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1), 1–17.
22. Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 9(6), 306.

23. Bunea, A., Rugină, D., Sconța, Z., Pop, R.M., Pinte, A., Socaciu, C., Tăbăran, F., Grootaert, C., Struijs, K., VanCamp, J. (2013). Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*. Nov;95:436-44. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23890760.
24. Chan, K. X., Wirtz, M., Phua, S. Y., Estavillo, G. M., Pogson, B. J. (2013). Balancing metabolites in drought: the sulfur assimilation conundrum. *Trends in Plant Science*, 18(1), 18–29.
25. Cluzet, S., Torregrossa, C., Jacquet, C., Lafitte, C., Fournier, J., Mercier, L., Salamagne, S., Briand, X., Esquerre-Tugaye, M. T., Dumas, B. (2004). Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant, Cell and Environment*, 27(7), 917–928.
26. Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., Rouphael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28–38.
27. Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11(1), 163.
28. Crouch I.J., Van Staden J. (1992). Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, 4, 291–296.
29. DeBoer J.D. (2005). Berries and their role in human health. In *A Survey of Research into the Health Benefits of Berries*. DeBoer Consulting, Victoria, Canada: 1–103.
30. Drobek, M., Frąc, M., Cybulska, J. (2019). Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—A Review. *Agronomy*, 9(6), 335.
31. Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14.
32. Durand, N., Briand, X., Meyer, C. (2003). The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 489–493.

33. Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., de Freitas, V., Mateus, N., Calhau, C. (2010). Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 24(12), 1862–1869.
34. Featonby-Smith B.C., Van Staden J. (1983a). The effect of seaweed concentrate on the growth of tomato plants in nematode-infested soil. *Scientia Horticulturae*. 20, 137–14.
35. Featonby-Smith B.C., Van Staden J. (1983b). The effect of seaweed concentrate and fertilizer on the growth of *Beta vulgaris*. *Z. Pflanzenphysiol*, 112, 155–162.
36. Ferrini, F., Nicese, F.P. (2002). Response of English oak (*Quercus robur* L.) trees to biostimulants application in the urban environment. *Journal of Arboriculture*, 28, 70–75.
37. Filipczak J., Żurawicz E., Sas Paszt L. (2016). Wpływ wybranych biostymulatorów na wzrost i plonowanie roślin truskawki ‘Elkat’. *Zeszyty Naukowe IO* 24:43-58.
38. Fira, A., Simu, M., Vlaicu, B., Clapa, D. (2015). Aspects Regarding the In vitro Propagation of ‘Royal Gala’ Apple Cultivar. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 72(2).
39. Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818.
40. Goñi, O., Quille, P., O'Connell, S. (2018). *Ascophyllum nodosum* extract biostimulants and their role in enhancing tolerance to drought stress in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 63–73.
41. Graziani, G., Cirillo, A., Giannini, P., Conti, S., El-Nakhel, C., Roupael, Y., Ritieni, A., Di Vaio, C. (2022). Biostimulants Improve Plant Growth and Bioactive Compounds of Young Olive Trees under Abiotic Stress Conditions. *Agriculture*, 12, 227.
42. H. Abd El Baky, H., A. Nofal, O., S. El Baroty, G. (2016). Enhancement of Antioxidant Enzymes Activities, Drought Stress Tolerances and Quality of Potato Plants as Response to Algal Foliar Application. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 8(1), 70–77.
43. Hanson, E.J., Hancock, J.B. (1996). Managing the nutrition of highbush blueberries. Michigan State University Extension, Bulletin Publication, E-2011.

44. Hart, J., Strik, B., White, L. Yang, W. (2006). Nutrient management for blueberries in Oregon. Oregon State University Extension Service Publication, EM 8918.
45. Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33(6), 517–524.
46. Hosseini, E., Majidi, M. M., Saeidnia, F., Ehtemam, M. H. (2022). Genetic analysis and physiological relationships of drought response in fennel: Interaction with mating system. *PLOS ONE*, 17(11).
47. Irani, H., ValizadehKaji, B., Naeini, M. R. (2021). Biostimulant-induced drought tolerance in grapevine is associated with physiological and biochemical changes. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1).
48. Kapłan, M., Baryła, P., Krawiec, M., Kiczorowski, P. (2013). Effect of N Pro Technology and seactiv complex on growth, yield, quantity and quality of ‘Szampion’ apple trees. *Acta Scientiarum Polonorum., Hortorum Cultus* 12(6) 2013, 45-56.
49. Kawecki, Z., Łojko, R., Pilarek, B., (2007). *Mało znane rośliny sadownicze*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińskiego – Mazurskiego. Olsztyn: 58.
50. Kehkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
51. Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386–399.
52. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1): 136-179.
53. Koziński, B. (2021). Przygotowanie stanowiska pod plantację. Borówka, zeszyty uprawowe. Opracowanie zbiorowe pod redakcją Doroty Łabanowskiej - Bury Plantpress, 18-25.

54. Krupa, T. (2021). Nawożenie plantacji towarowej. Borówka, zeszyty uprawowe. Opracowanie zbiorowe pod redakcją Doroty Łabanowskiej - Bury, Plantpress, 52-56.
55. Kumar, S., Malik, J., Thakur, P., Kaistha, S., Sharma, K. D., Upadhyaya, H. D., Berger, J. D., Nayyar, H. (2010). Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 779–787.
56. Lee, S. G., Vance, T. M., Nam, T.-G., Kim, D.-O., Koo, S. I., Chun, O. K. (2016). Evaluation of pH differential and HPLC methods expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent for measuring the total anthocyanin contents of berries. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 562–568.
57. Lenart, A., Wrona, D., (2021). Biostymulacja a intensyfikacja wydajności biologicznej roślin. Czynniki wpływające na plonowanie i jakość owoców roślin sadowniczych, 29. Wydawnictwo SGGW, Warszawa: 59 – 66.
58. Luby, J. J., Ballington, J. R., Draper, A. D., Pliszka, K., & Austin, M. E. (1991). Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Acta Horticulturae*, (290), 393–458.
59. Maillard, A., Ali, N., Schwarzenberg, A., Jamois, F., Yvin, J.-C., & Hosseini, S. A. (2018). Silicon transcriptionally regulates sulfur and ABA metabolism and delays leaf senescence in barley under combined sulfur deficiency and osmotic stress. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 394–410.
60. Mansori, M., Farouk, IA., Hsissou, D., El Kaoua, M. (2019). Seaweed extract treatment enhances vegetative growth and antioxidant parameters in water stressed *Salvia officinalis* L. *J Mater Environ Science*, 10(8):756–66.
61. Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., Briand, X. (2006). Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Advances in Horticultural Science*, 20(2): 156-161.
62. Mendes-Ferreira, A., Coelho, E., Barbosa, C., Oliveira, J. M., Mendes-Faia, A. (2019). Production of blueberry wine and volatile characterization of young and bottle-aging beverages. *Food Science & Nutrition*, 7(2), 617–627.

63. Metting B., Rayburn W.R., Reynaud P.A. (1988). Algae and agriculture. In: Algae and human affairs, Lembi C.A., Waaland J.R. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 335–370.
64. Mikos-Bielak M. (2004). Bioregulacja plonowania i chemicznej jakości plonu malin jako efekt zastosowania Asahi. *Annales UMCS. Secito E.* 59 (3): 1471–1479.
65. Min, Z., Li, R., Chen, L., Zhang, Y., Li, Z., Liu, M., Ju, Y., Fang, Y. (2019). Alleviation of drought stress in grapevine by foliar-applied strigolactones. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 99–110.
66. Miyake, S., Takahashi, N., Sasaki, M., Kobayashi, S., Tsubota, K., Ozawa, Y. (2011). Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Laboratory Investigation*, 92(1), 102–109.
67. Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I. (2006). Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 54–62.
68. Molnar, S., Clapa, D., Mitre, V. (2022). Response of the Five Highbush Blueberry Cultivars to In Vitro Induced Drought Stress by Polyethylene Glycol. *Agronomy*, 12(3), 732.
69. Mooney PA. Van Staden J. (1986). Algae and cytokinins. *Journal of Plant Physiology*, 123: 1-20.
70. Moore, K.K. (2004). Using seaweed compost to grow bedding plants. *Biology Cycle*, 45: 43–44.
71. Nagy P. T., Csihon Á., Szabó A. (2019). Effects of algae products on nutrient uptake and fruit quality of apple. *Natural Resources and Sustainable Development*, 9: 80-91.
72. Ohta K., Morishita S., Suda K. (2004). Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73: 66–68.
73. Ördög, V., Stirk, W. A., Van Staden, J., Novák, O., Strnad, M. (2004). Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta1. *Journal of Phycology*, 40(1), 88–95.

74. Parađiković, N., Vinković, T., Vinković Vrček, I., Žuntar, I., Bojić, M. and Medić-Šarić, M. (2011). Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 2146-2152.
75. Piątkowska, E., Kopeć, A., Leszczyńska, T. (2011). Antocyjany - charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. *ŻNTJ* 4 (77): 24-35.
76. Posmyk, M. M., Szafrńska, K. (2016). Biostimulators: A New Trend towards Solving an Old Problem. *Frontiers in Plant Science*, 7.
77. Pruszyński, S. (2008). Biostimulators in plant protection. W: Gawrońska H. (red.), *Biostimulators in Modern Agriculture, General Aspects*. *Więś Jutra*, Warszawa: 18–23.
78. Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C. M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686–2693.
79. Rashidinejad, A., Jaiswal, A.K. (2020). *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and vegetables*, Academic Press, Cambridge, MA, USA, pp. 695-708.
80. Rejman A., Pliszka K. (1991). *Borówka Wysoka*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze I Leśne, Warszawa: 35-51.
81. Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4713–4719.
82. Rouphael, Y., Colla, G. (2018). Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9.
83. Rouphael, Y., Colla, G. (2020). Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 11.
84. Sadowski A., Nurzyński J., Pacholak E., Smolarz K. (1990). *Określenie potrzeb nawożenia roślin sadowniczych*. SGGW-AR, Warszawa.
85. Salat, A. (2004). Les Biostimulants. *PHM. Revue Horticole*, 454: 22-24.

86. Seiler, C., Harshavardhan, V. T., Rajesh, K., Reddy, P. S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U., Sreenivasulu, N. (2011). ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2615-2632.
87. Seliga, Ł., Pluta, S. (2017). The preliminary assessment of plant growth and yielding of selected highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa*, 25, 105-114.
88. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
89. Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., Martin, T. (2013). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 465–490.
90. Singh, M. (2014). Plant Tolerance Mechanism Against Salt Stress: The Nutrient Management Approach. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 03(05).
91. Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. (2008). Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biologia plantarum*, 52(3), 573–576.
92. Slávik, M. (2012). Production of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings on substrate mixes using growth stimulants. *Journal of Forest Science*, 51(No. 1), 15–23.
93. Smolarz, K. (2006). History of highbush blueberry (*V. corymbosum* L.) growing in Poland. *Acta Horticulturae*, 715: 313–316.
94. Smolarz, K., Pluta, S. (2014). Cultivation of the high-bush blueberry in Poland. *Acta Horticulturae*, 1017: 199–204.
95. Spann, T. M., Little, H. A. (2011). Applications of a Commercial Extract of the Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum* Increases Drought Tolerance in Container-grown ‘Hamlin’ Sweet Orange Nursery Trees. *HortScience*, 46(4), 577–582.
96. Stewart, D. (2004). Role of berries in human health. *Acta Horticulturae*, (649), 35–38.

97. Starast, M., Karp, K., Starast, M., Paal, T. (2010). The effect of mulching and pruning on the vegetative growth and yield of the half-high blueberry. *Agronomy research*, 8(1), 759-769.
98. Strik, B.C. (2005). Blueberry: An expanding world berry crop. *Chronica Horticulturae*. 45, 7-12.
99. Szajdek, A., Borowska, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63: 147-156.
100. Temple W.D., Bomke A.A. (1988). Effects of kelp (*Macrocystis integrifolia*) on soil chemical properties and crop responses. *Plant Soil* 105, 213-222.
101. Tuhy, Ł., Chowańska J., Chojnacka K. (2013). Ekstrakty glonowe jako biostymulatory wzrostu roślin: przegląd piś.m.iennictwa, „CHEMIK”, 7: 636-641.
102. Wach, D. (2004). Rozmieszczenie korzeni borówki wysokiej i zawartość składników pokarmowych w profilu glebowym. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. CCCLVI, Ogrodnictwo*, 37: 217-224.
103. Wach, D. (2012). Estimation of growth and yielding of five highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Folia Horticulturae*, 24(1), 61-65.
104. Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1).
105. Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R., Raghavendra, A. S. (2013). Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology*, 15(4), 713-722.
106. Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., Brown, P. H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7.
107. Yvin J.C., Dufils A. (2010). Incidences of Fertileader Elite® foliar spray applications on the improvement of Fruits quality and their conservation. Trials realized on Pink Lady® Cripps Pink Cov. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 14(3), 1-4.

108. Zmarlicki, K., Brzozowski P. (2016). Uwarunkowania w produkcji agrestu, czarnej porzeczki i borówki wysokiej. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, 11 s. http://www.inhort.pl/files/program_wieloletni/PW_2015_2020_IO/spr_2016/5.1_2016_Raport_owoce.pdf. Dostęp dnia 20.04.2022.
109. Zhang, X., Ervin, E.H. (2004). Cytokinin – containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Science*, 44: 1731-1745.
110. Zodape, ST., Mukhopadhyay, S., Eswaran, K., Reddy MP., Chikara J. (2010). Enhanced yield and nutritional quality in green gram (*Phaseolus radiata* L.) treated with seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 69:468–471.