

Влияние на предсеитбено третиране на семена със Siliplant върху първоначално развитие на сортове люцерна (*Medicago sativa* L.)

Пламен Маринов-Серафимов^{1*}, Ирена Голубинова¹, Галя Цветанова², Весна Левков³, Наташа Гьорговска³

¹Институт по фуражните култури, 5800 Плевен, Република България, Селскостопанска академия, 1373, София, България

²Опитна станция по зърнени, технически и фуражни култури, 3600 Лом, Република България

³Св. Кирил и Методий, Институт по животновъдни науки, Скопие, Република Северна Македония

Influence of Pre-Sowing Treatment of Seeds with Siliplant on Initial Growth of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars

Plamen Marinov-Serafimov^{1*}, Irena Golubanova¹, Galja Cvetanova², Vesna Levkov³, Natasha Gjorgovska³

¹Institute of Forage Crops, Pleven, Republic of Bulgaria, Agricultural Academy of Bulgaria, 1373 Sofia, Bulgaria

²Experimental station for grain, technical and forage crops, Lom, Republic of Bulgaria

³Ss. Cyril and Methodius University, Institute of Animal Science, Skopje, Republic North Macedonia

*E-mail: plserafimov@abv.bg

Original scientific article

РЕЗЮМЕ

През периода 2021–2022 година в Институтът по фуражните култури - Плевен е установено влиянието на предсеитбено третиране (грундиране) на семена със Siliplant при лабораторни условия върху първоначалното развитие на три сорта люцерна отглеждани по конвенционален („Дара“ и „Плевен 6“) и BSP5A001 биологичен метод. Проследени са лабораторна кълняемост на семената и растежни прояви на културата при *in vitro*

SUMMARY

During the period 2021–2022 in the Institute of Forage Crops - Pleven was established the influence of pre-sowing treatment (priming) of seeds with Siliplant under laboratory conditions on the initial development of three varieties of alfalfa grown by conventional ("Dara" and "Pleven 6") and BSP5A001 biological method.

Laboratory seed germination and primary plant development *in vitro* conditions and their response were evaluated using the

условия и е оценена реакцията им, чрез използване на комплексния индекс на развитие на растенията (GI) на включените в изследването сортове. Установено е, че препоръчителната работна концентрация за предсеитбено третиране на семена от люцерна със Siliplant за полски условия е в диапазона 0.5÷0.6%, определяща комплексен стимулиращ ефект върху нарастването на корена епикотила и кълна, респективно и върху първоначалното развитие на люцерна в периода „сеитба-поникуване“. Чрез полиномен регресионен анализ е установена еквивалентност между стимулиращ и/или депресиращ ефект върху нарастването на кълна в следствие на предсеитбеното третиране на семената от люцерна със Siliplant, изразено чрез индекса на развитие на растенията (GI).

Ключови думи: pre-sowing treatment, alfalfa, Siliplant

УВОД

Многогодишните бобови култури определят производството на фураж с високо качество и хранителна стойност в световен мащаб (Russelle, M. P. 2001; Marinova, 2017; Kulkarni et al, 2018; Marinova, 2020). Сред тях най-позната и широко разпространена в световното земеделие е люцерна (*Medicago sativa* L.), която се отглежда в повече от 80 страни на всички континенти на площ над 35 милиона хектара (Radović et al., 2009). Въпреки, че културата е с доказан висок адаптивен потенциал и продуктивност (формира стабилни добиви през периода на експлоатация на тревостоя), изисква ниски вложения на пестициди, отличава се с бързо възстановяване след коситба, дълготрайност на използване на тревостоите, доказана толерантност

complex plant growth index (GI) of the cultivars included in the study.

It was established that the recommended working concentration for pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant for field conditions is in the range of 0.5÷0.6%, determining a complex stimulating effect on the growth of the root, epicotyl, and seedling, respectively and on the initial development of alfalfa in the "sowing-emergence" period.

By means of polynomial regression analysis, equivalence was established between stimulating and/or depressing effect on seedling growth as a result of the pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant, expressed by the plant development index (GI).

Keywords: pre-sowing treatment, alfalfa, Siliplant

INTRODUCTION

Perennial legumes determine the production of high quality and nutritional forage worldwide (Russelle, M. P. 2001; Marinova, 2017; Kulkarni et al, 2018; Marinova, 2020).

Among them, the most familiar and widespread in world agriculture is alfalfa (*Medicago sativa* L.), which is grown in more than 80 countries on all continents on an area of more than 35 million hectares (Radović et al., 2009).

Although the culture has a proven high adaptive potential and productivity (forms stable yields during the period of exploitation of the grassland), it requires low inputs of pesticides, it is distinguished by quick recovery after mowing, long-term use of grasslands, proven tolerance to changes in the dynamics of the abiotic

към промени в динамиката на абиотичните фактори на средата, подобрява почвеното плодородие и биота, чрез симбиотичната азотфиксация, предпазва почвата от водна и ветрова ерозия, осигурява местообитания за диви животни и др., е силно чувствителна на абиотичен стрес (Putnam et al., 2001; Radović et al., 2009; Kulkarni et al., 2018; Marinova et al., 2021).

Стресът от засушаване в началните етапи от онтогенетичното развитие на люцерната е един от основните фактори, ограничаващ поникването, растежа и първоначалното развитие на люцерната в годината на създаване на тревостоя, който оказва влияние върху продуктивността на люцерната (Arshad et al., 2017; Gudeva et al., 2019; Hanly, 2020; Hou et al., 2022). Въпреки, че се разработват и внедряват в практиката нови сортове с висока толерантност към неблагоприятно изменящите се климатични условия на средата и независимо от доказаните постижения в селекционен аспект, предсеитбеното третиране на семената е обещаващ подход за минимизиране на неблагоприятните агрометеорологични условия в критичните фенофази от онтогенетичното развитие на селскостопанските култури, включително и при люцерната (Marinova et al., 2019; Cwintal et al., 2010; Ullah et al., 2019). Използвания в практиката технологичен прием спомога за частично хидратиране на семената, което от своя страна оказва влияние върху активиране на физиологичните и биохимични метаболитни процеси в тях, преди поникването им (Akmal et al., 2011; Qadir et al., 2018; Ullah et al., 2019).

В редица проучвания (Aladjadjian, 2007; Bogatsevskaya et al., 2008; Khadeev and Lapina, 2012; Ivanova and Druzhechkova, 2017; Adhikari and Missaoui, 2017; Kokonov et

factors of the environment, improves soil fertility and biota, through symbiotic nitrogen fixation, protects the soil from water and wind erosion, provides habitats for wild animals, etc. is highly sensitive to abiotic stress (Putnam et al., 2001; Radović et al., 2009; Kulkarni et al., 2018; Marinova et al., 2021).

Drought stress in the initial stages of alfalfa ontogenetic development is one of the main factors limiting emergence, growth and initial development of alfalfa in the year of establishment, affecting alfalfa productivity (Arshad et al., 2017; Gudeva et al., 2019; Hanly, 2020; Hou et al., 2022).

Although new cultivars with high tolerance to the unfavorable changing climatic conditions of the environment are being developed and put into practice and regardless of the proven achievements in selection aspect, pre-sowing seed treatment is a promising approach to minimize adverse agrometeorological conditions in critical phenophases of ontogenetic development of agricultural crops, including alfalfa (Marinova et al., 2019; Cwintal et al., 2010; Ullah et al., 2019).

The technological method used in practice helps to partially hydrate the seeds, which in turn affects the activation of physiological and biochemical metabolic processes in them, before their germination (Akmal et al., 2011; Qadir et al., 2018; Ullah et al., 2019).

In a number of studies (Aladjadjian, 2007; Bogatsevskaya et al., 2008; Khadeev and Lapina, 2012; Ivanova and Druzhechkova, 2017; Adhikari and Missaoui, 2017; Kokonov et

al., 2022) е установено, че предсеитбеното третиране на семена от люцерна с молибден (Mo), микроелементи и/или физични методи успешно демонстрират подобреното и масово покълване на семената, което е предпоставка за повишаване жизнеността на люцерновите растения в началните етапи от онтогенетичното им развитие.

Според обобщените проучвания на Guntzer et al. (2012) въз основа на изведени множество лабораторни, оранжерийни и полски експерименти през последните две десетилетия е установено, че приложението на силиций (Si) в технологичните решения при отглеждане на редица селскостопански култури е в състояние да възпрепятства биотичния натиск, причинен от болести и неприятели, и минимализира абиотичния стрес (от засушаване, преовлажняване, въздействие на високи и ниски температури, UV радиация), химичния натиск (засоляване), недостига на хранителни вещества, както и акумулирането на тежки метали в орницата.

В редица проучвания е установено, че предсеитбеното третиране на семената с търговски формулировки съдържащи силиций (Si) повишават устойчивостта на редица селскостопански култури (ориз, сорго, царевица, пшеница, нахут, соя и др.) към неблагоприятните климатични изменения (Gunes et al., 2007; Hattori et al., 2007; Pei et al., 2010; Shen et al., 2010; Chen et al., 2011; Sayed and Gadallah, 2014). Проучванията при люцерната обаче, са насочени основно върху едновременното добавяне на силиций в култивационния разтвор (pH от 6.0 до 6.5) за установяване физиологичната модулация на силиция (Si) и влиянието му върху адаптирането на люцерната към алкален стрес (Liu et al., 2018). Според авторът, предсеитбеното третиране на

al., 2022) it was found that pre-sowing treatment of alfalfa seeds with molybdenum (Mo), trace elements and/or physical methods have successfully demonstrated the improved and mass germination of seeds, which is a prerequisite for increasing the vitality of alfalfa plants in the initial stages of their ontogenetic development.

According to the summarized studies of Guntzer et al. (2012) based on numerous laboratory, greenhouse and field experiments carried out over the last two decades, it has been found that the application of silicon (Si) in technological solutions in the cultivation of a number of agricultural crops is able to inhibit biotic pressure caused by diseases and enemies and minimizes abiotic stress (from drought, waterlogging, exposure to high and low temperatures, UV radiation, chemical pressure (salinization), lack of nutrients, as well as accumulation of heavy metals in the soil.

In a number of studies, it has been found that pre-sowing treatment of seeds with commercial formulations containing silicon (Si) increases the resistance of a number of agricultural crops rice, sorghum, corn, wheat, chickpea, soybean, etc. to adverse climate changes (Gunes et al., 2007; Hattori et al., 2007; Pei et al., 2010; Shen et al., 2010; Chen et al., 2011; Sayed and Gadallah, 2014).

Studies in alfalfa, however, have mainly focused on the simultaneous addition of silicon to the culture solution (pH 6.0 to 6.5) to establish the physiological modulation of silicon (Si) and its effect on the adaptation of alfalfa to alkaline stress (Liu et al., 2018).

According to the author, however, pre-sowing treatment of alfalfa seeds with

семената от люцерна със силиций (Si) оказва от индиферентен до стимулиращ ефект. Следователно, основен агротехнически проблем при предсеитбеното третиране на семената е определяне на оптималната концентрация на грундиращия разтвор с която да се предизвика комплексен стимулиращ ефект върху покълването и първоначалното развитие на растенията в критичната фаза от развитието на люцерната „сеитба-поникване“ в годината на създаване на посева.

В този аспект целта на проучването е: Да се установи ефектът от предсеитбеното третиране на семена от люцерна със Siliplant с различни концентрации при контролирани *in vitro* условия върху поникването и първоначалното развитие на културата.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проведено през 2022 година в Институт по фуражните култури – Плевен. В експеримента са включени семена от три сорта люцерна (*Medicago sativa* L.) – „Дара“ и „Плевен 6“, отглеждани по конвенционалната технология, създадени в ИФК – Плевен и био семена от люцерна BSP5A001-20012CIN00, закупени от W. Legutka, Полша. За установяване биологичния ефект от предсеитбеното третиране на семена със Siliplant [универсален тор с високо съдържание на биоактивен силиций (Si-7%), калий (K-1%) и 7 микроелемента в хелатна форма: Fe - 300; Mg - 100; Cu - 70-240; Zn - 80; Mn - 150; Co - 15; B – 90 mg/l] на включените в експеримента сортове люцерна е изведен двуфакторен опит при лабораторни условия.

Проучвани са два фактора: Фактор А – сортове люцерна (*Medicago sativa* L.): a₁ – „Дара“; a₂ – „Плевен 6“ и

silicon (Si) has an indifferent to stimulating effect.

Therefore, a major agrotechnical problem in pre-sowing seed treatment is determining the optimal concentration of the priming solution with which to cause a complex stimulating effect on germination and initial plant development in the critical phase of alfalfa "sowing-emergence" development in the year of establishment sowing.

In this aspect, the aim of the study is: To determine the effect of pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant at different concentrations under controlled *in vitro* conditions on germination and initial development of the crop.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in 2022 at the Institute of Forage Crops - Pleven. The experiment included seeds of three varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) - "Dara" and "Pleven 6", grown according to conventional technology, created in IFK - Pleven and organic alfalfa seeds BSP5A001-20012CIN00 from W. Legutka, Poland.

To establish the biological effect of the pre-sowing treatment of seeds with Siliplant [universal fertilizer with a high content of bioactive silicon (Si-7%), potassium (K-1%) and 7 trace elements in chelated form: Fe - 300; Mg - 100; Cu - 70-240; Zn - 80; Mn - 150; Co - 15; B – 90 mg/l] of the alfalfa cultivars included in the experiment, a two-factor experiment was performed under laboratory conditions.

Two factors were studied: Factor A - varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.): a₁ - "Dara"; a₂ – „Pleven 6“ and a₃ -

a_3 – BSP5A001. Фактор В – концентрация на работния разтвор от Siliplant: b_1 – 0.0 (контрола); b_2 – 0.1; b_3 – 0.2; b_4 – 0.3; b_5 – 0.4; b_6 – 0.5; b_7 – 0.6; b_8 – 0.7; b_9 – 0.8; b_{10} – 0.9; b_{11} – 1.0; b_{12} – 1.2; b_{13} – 1.4 и b_{14} – 1.6%. прилаган 2,5 l/100 kg семена.

В петриеви блюда (90 mm) а пипетирани по 20 ml (0.75%) агар-агар с добавен по 1 g/L⁻¹ тимол (C₁₀H₁₄O), като консервант. След желатинизирането на агар-агара са поставени по 25 бр. семена, посредством вакуумна плоча, съгласно проучваните фактори – А и В. Така подготвените петриеви блюда са инкубирани в термостат на тъмно при температура 25°C в продължение на седем дни. Всеки вариант е залаган в осем повторения.

Определяни са следните показатели за всички варианти на опита: лабораторна кълняемост на семената, % (SG); дължина на корена, епикотила и кълна (SL), cm. За установяване биологичния ефект на предсеитбеното третиране на семена, съгласно проучваните фактори – А и В в експеримента са използвани следните индекси:

Степен на инхибиране (IR) е определена по формулата

$$IR = \left(\frac{a-b}{a}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

където a – покълнали семена контролния нетрениран вариант, приет за стандарт (%), b – покълнали семена третираните варианти със Siliplant, съгласно проучваните фактори (%) („-“ стимулиращ, „+“ инхибиращ ефект);

Индекс на развитие (GI) по Gariglio et al., (2002):

$$GI = \left[\left(\frac{G}{G_0}\right) \cdot \left(\frac{L}{L_0}\right)\right] \cdot 100 \quad (2)$$

където: G и G_0 – покълнали семена съответно третираните G и контролния вариант G_0 (%); L – дължина на кълна в третираните варианти представен в процент; L_0 –

BSP5A001. Factor B – concentration of the working solution from Siliplant: b_1 – 0.0 (control); b_2 – 0.1; b_3 – 0.2; b_4 – 0.3; b_5 – 0.4; b_6 – 0.5; b_7 – 0.6; b_8 – 0.7; b_9 – 0.8; b_{10} – 0.9; b_{11} – 1.0; b_{12} – 1.2; b_{13} – 1.4 and b_{14} – 1.6%. applied 2.5 l/100 kg of seeds.

In Petri dishes (90 mm) were pipetted 20 ml (0.75%) agar-agar with 1 g/L⁻¹ thymol (C₁₀H₁₄O) was added as a chemical preservative. After gelatinization the agar-agar was placed 25 number seeds, using a vacuum plate for seeds, according to the studied factors - A and B. The Petri dishes prepared in this way were incubated in a thermostat in the dark at a temperature of 25 °C for seven days. Each variant was run in eight replicates.

The following indicators were determined for all variants of the experiment: laboratory seed germination, % (SG); root, epicotyl and seedling length (SL), cm. To establish the biological effect of the pre-sowing treatment of seeds, according to the studied factors - A and B, the following indices were used in the experiment:

The inhibition rate (IR) was determined by the formula

$$IR = \left(\frac{a-b}{a}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

where a - germinated seeds of the control untrained variant, accepted as a standard (%), b - germinated seeds of the variants treated with Siliplant, according to the studied factors (%) („-“ stimulating, „+“ inhibitory effect);

Germination index (GI) according to Gariglio et al. (2002):

$$GI = \left[\left(\frac{G}{G_0}\right) \cdot \left(\frac{L}{L_0}\right)\right] \cdot 100 \quad (2)$$

where: G and G_0 – germinated seeds of the treated G and the control variant G_0 (%); L – Seedling length in the treated variants presented as a percentage; L_0 – Seedling length in the

дължина на кълна в контролния вариант, приет за 100%;

Статистическата обработка на данните е извършена по метода на дисперсионния анализ. Значимостта на разликата между средните стойности беше анализирана с помощта на най-малката значимата разлика, която беше определена като значима при 5% (LSD) ниво на значимост в експеримента с помощта на специализиран софтуер Statistica Software Package версия 10 (StatSoft, Inc., 2011).

Силата на влияние на факторите при достоверен факторен вариант е определена чрез η^2 (процент на дисперсията) (Plochinsky, 1967; Lidansky, 1988).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Лабораторната кълняемост на семената на включените в изследването сортове люцерна в контролните (нетретирани) варианти варира в относително тесен диапазон – от 81.7 до 93.3%, съгласно биологичните особености на културата (Таблица 1).

Предсеитбеното третиране на семената със Siliplant на включените в изследването сортове люцерна оказва от индеферентен (при приложение от 0.1 до 0.9% разтвор) до инхибиращ ефект (при използване на концентрация над 1.2%) върху лабораторната кълняемост на семената, непропорционално на повишаване коцентрацията на работния разтвор в сравнение с контролните варианти. От анализа на експерименталните резултати беше установено, че независимо от промените в лабораторната кълняемост на семената, разликите спрямо контролните варианти са статистически недоказани при по-ниските приложени концентрации (в диапазона 0.1-1.0%), докато при по-

control variant, taken as 100%;

Statistical data processing was performed using the variance analysis method. The significance of the difference between the means was analyzed using the least significant difference, which was recognized as significant at a 5% (LSD05) level of significance in this experiment using specialized software Statistica Software Package version 10 (StatSoft, Inc., 2011).

The power of influencing factors in reliable factorial variance is defined by η^2 (percentage of variance) (Plochinsky, 1967; Lidansky, 1988).

RESULTS AND DISCUSSION

The laboratory seed germination of the alfalfa varieties included in the study in the control (untreated) variants varies in a relatively narrow range - from 81.7 to 93.3%, according to the biological characteristics of the culture (Table 1).

Pre-sowing seed treatment with Siliplant of the alfalfa cultivars included in the study had an indifferent (when using a 0.1 to 0.9% solution) to an inhibitory effect (when using a concentration above 1.2%) on laboratory seed germination, disproportionately of increasing the concentration of the working solution compared to the control variants.

From the analysis of the experimental results, it was found that regardless of the changes in the laboratory germination of the seeds, the differences compared to the control variants were statistically unproven at the lower applied concentrations (in the range of 0.1-1.0%), while at the higher concentrations \geq of 1.2% a statistically proven inhibitory

високите концентрации \geq от 1.2% се установява статистически доказан инхибиращ ефект ($P < 0.05$).
 effect is established ($P < 0.05$).

Таблица 1. Влияние на предсеитбеното третиране на семена от сортове люцерна със Siliplant върху лабораторната кълняемост на семената
Table 1. Effect of pre-sowing seed treatment of alfalfa varieties with Siliplant on laboratory seed germination

Третира ния Treatmen ts	Сортове люцерна / Alfalfa varieties						Влияние на факторите Influence of factors	
	Дара / Dara		Плевен 6 / Pleven 6		BSP5A001			
$C_{W/V\%}$	SG, %	IR	SG, %	IR	SG, %	IR	Сортове Varieties (A)	Концентрации Concentrations (B)
0.0	81.7e	0.0	91.7d	0.0	93.3 e	0.0	68.1a	88.9f
0.1	85.0e	- 4.0	86.7cd	5.5	93.3 e	0.0	84.8b	88.3ef
0.2	83.3e	- 2.0	90.0d	1.9	90.0 de	3.5	83.7b	87.8ef
0.3	83.3e	- 2.0	90.0d	1.9	90.0 de	3.5		87.8ef
0.4	86.7e	- 6.1	90.0d	1.9	86.7 de	7.1		87.8ef
0.5	83.3e	- 2.0	90.0d	1.9	90.0 de	3.5		87.8ef
0.6	80.0e	2.1	90.0d	1.9	91.7 de	1.7		87.2ef
0.7	80.0e	2.1	91.7d	0.0	90.0 de	3.5		87.2ef
0.8	70.0e	14. 3	90.0d	1.9	90.0 de	3.5		83.3e
0.9	53.3d	34. 8	90.0d	1.9	86.7 de	7.1		76.7d
1.0	50.0c d	38. 8	83.3cd	9.2	83.3 cd	10. 7		72.2d
1.2	43.3b c	47. 0	76.7bc	16.4	76.7 c	17. 8		65.6c
1.4	40.0a b	51. 0	70.0b	23.7	60.0 b	35. 7		56.7b
1.6	33.3a	59. 2	56.7a	38.2	50.0 a	46. 4	46.7a	
Фактори Factors	MS	η^2	MS	η^2	MS	η^2	MS	η^2
A	-	-	-	-	-	-	3655.0 ^{ss}	20.4
B	1143. 4 ^{ss}	-	315.2 ^{ss}	-	510. 5 ^{ss}	-	1677.5 ^{ss}	61.0
AxB	-	-	-	-	-	-	145.8 ^{ss}	10.6

Легенда: $C_{W/V\%}$ – концентрации; SG – лабораторна кълняемост на семената, %; IR – степен на инхибиране, % („-“ стимулирущ, „+“ инхибиращ ефект); MS – средна квадратична; η^2 – процент на депресията; LSD a, b, c, d, e, f и ss – статистически доказани разлики при $P < 0.05$;

Legend: $C_{W/V\%}$ – concentrations; SG – laboratory seed germination, %; IR – inhibition rate, % („-“ stimulatory, „+“ inhibitory effect); MS – mean squares; η^2 – percentage of the variance; LSD a, b, c, d, e, f and ss – statistically proven differences at $P < 0.05$.

Анализът на вариациите за определяне на влиянието на изследваните фактори (η^2) върху покълването на семената показва, че най-големият дял от общото вариране се дължи на фактор В (приложени концентрации на Siliplant) $\eta^2=61.0\%$, докато влиянието на Фактор А (сортове люцерна) е относително по-ниско $\eta^2=20.4\%$. Вариантите, дължащи се на взаимовръзката „сортове люцерна – приложена концентрация“ са незначителни и заемат относително малък дял от общото вариране - $\eta^2=10.6\%$.

При проследяване процентът на инхибиране (IR) на лабораторната кълняемост на семената, в следствие на предсеитбеното им третиране със Siliplant се установява специфична сортова реакция и биологична диференциация. Запазва се установената тенденция, с тази разлика, че при сортовете „Плевен 6“ и BSP5A001 независимо от широкия диапазон на приложените концентрации се установява инхибиращ ефект, докато при сорт „Дара“ по-ниските концентрации (0.1÷0.5%) оказват слаб незначителен стимулиращ ефект – от 2.0 до 6.1%.

Оценявайки интегралното въздействие на Siliplant върху лабораторната кълняемост на семената, средно за включените в експеримента сортове люцерна е видно, че предсеитбеното третиране на семената със Siliplant (над 0.7%) инхибира проучвания показател, а процентът на инхибиране нараства от 3.3 до 24.8 пъти непропорционално на увеличаване на приложената концентрация (Фигура 1).

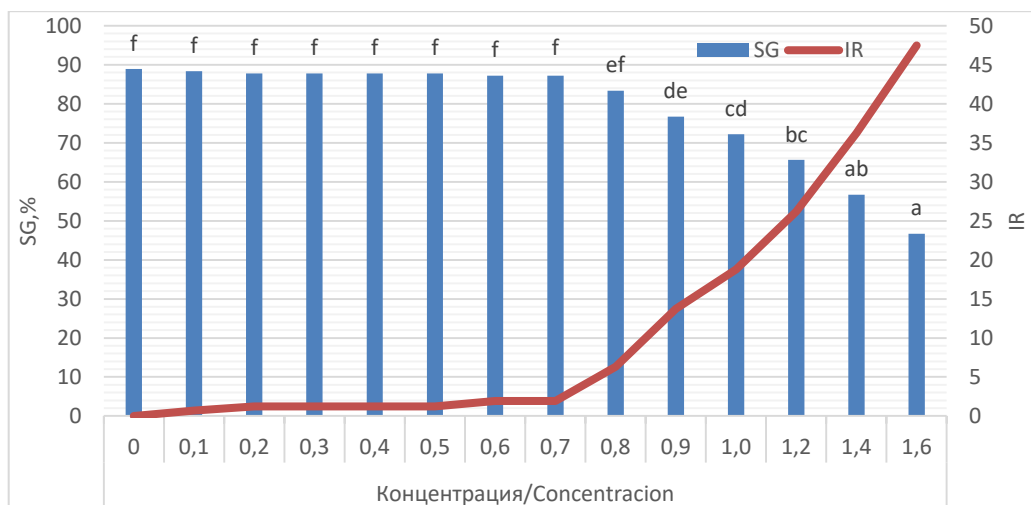
The analysis of variance to determine the influence of the studied factors (η^2) on seed germination shows that the largest share of the total variation is due to factor B (the applied concentrations of Siliplant) η^2 is 61.0%, while the influence of Factor A (varieties alfalfa) is relatively lower η^2 – 20.4%.

The variations due to the relationship "alfalfa varieties - applied concentration" are insignificant and occupy a relatively small share of the total variation - η^2 10.6%.

When monitoring the percentage of inhibition (IR) of the laboratory germination of the seeds, as a result of their pre-sowing treatment with Siliplant, a specific varietal response and biological differentiation is established.

The established trend is preserved, with the difference that in the varieties "Pleven 6" and BSP5A001, regardless of the wide range of applied concentrations, an inhibitory effect is established, while in the variety "Dara" the lower concentrations (0.1÷0.5%) have a weak insignificant stimulating effect - from 2.0 to 6.1%.

Evaluating the integral effect of Siliplant on laboratory seed germination, on average for the alfalfa cultivars included in the experiment, it was found that pre-sowing treatment of seeds with Siliplant (above 0.7%) inhibited the studied parameter, and the percentage of inhibition increased from 3.3 to 24.8 times disproportionate to the increase in applied concentration (Figure 1).



Легенда: SG – лабораторна кълняемост на семената, %; IR – степен на инхибиране, % („-“ стимулиращ, „+“ инхибиращ ефект); LSD a, b, c, d, e и f – статистически доказани разлики при $P < 0.05$;

Legend: SG – laboratory seed germination, %; IR – inhibition rate, % („-“ stimulatory, „+“ inhibitory effect); MS – mean squares; η^2 – percentage of the variance, LSD a, b, c, d, e and f – statistically proven differences at $P < 0.05$.

Фиг. 1. Интегралното въздействие на Siliplant върху лабораторната кълняемост (SG) и процент на инхибиране (IR), средно за включените в експеримента сортове люцерна

Fig. 1. The integral effect of Siliplant on laboratory germination (SG) and inhibition rate (IR) averaged for the alfalfa varieties included in the experiment

Аналогични са получените резултати в експерименталната работа на Janmohammadi and Sabaghnia (2015) и Roohizadeh et al. (2015), според които предсеитбеното третиране на семена от *Helianthus annuus* L. и *Vicia faba* L. с разтвори съдържащи натриев силикат, силициев диоксид приложени в по-ниски концентрации оказват незначителен стимулиращ ефект върху лабораторната кълняемост на тест-растанията, докато с увеличаване концентрацията на силиция в работните разтвори, значително се редуцира проучвания показател.

Предсеитбеното третиране на семена от люцерна със Siliplant оказва влияние върху нарастването на дължината на корена, епикотила и кълна (Таблица 2). Прилаганите по-ниски дози (от 0.1 до 0.4%) на

Analogous are the results obtained in the experimental work of Janmohammadi and Sabaghnia (2015) and Roohizadeh et al. (2015), according to which the pre-sowing treatment of *Helianthus annuus* L. and *Vicia faba* L. seeds with solutions containing sodium silicate, silicon dioxide applied in lower concentrations had a minor stimulating effect on the laboratory germination of the test plants, while as the concentration increased of silicon in the working solutions, the research indicator is significantly reduced.

Pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant affected root, epicotyl and seedling length growth (Table 2).

Applied lower doses (from 0.1 to 0.4%) of the working solution for seed priming

работния разтвор за грундиране на семената предизвикват стимулиращ ефект върху проучваните показатели, докато концентрациите в диапазона 0.7÷1.6% оказват инхибиращ ефект върху нарастването на корена, епикотила и кълна на включените в изследването сортове люцерна. Най-висок и статистически доказан стимулиращ ефект ($P < 0.05$) върху нарастването на кълновете предизвиква предсеитбеното третиране на семената от люцерна със Siliplant в концентрация от 0.5 до 0.6%.

Аналогични са и получените резултати при проследяване процентът на инхибиране (IR) в нарастването на първичния кълн при люцерната, както и по отношение на вегетативните му части (корен и епикотил), с тази разлика че включените в изследването сортове се отличават с биологичната си реакция. От анализа на данните е видно, че в следствие на предсеитбеното третиране на семената на люцерна сорт „Дара“ се установява по-висока чувствителност на сорта в сравнение с „Плевен 6“ и „BSP5A001“.

При грундирането на семена в концентрация от 0.1 до 0,6% на Siliplant се установява стимулиращ ефект върху нарастването на корена, епикотила и респективно върху кълна при люцерната от приложените концентрации - IR е в диапазона от -13.3 до -100% в сравнение с контролния (нетретиран) вариант. Сорт Плевен 6 и „BSP5A001“ могат условно да се определят, като по-нечувствителни по отношение на извършеното предсеитбеното третиране, тъй като при прилагане на Siliplant в концентрация 0.6% се установява комплексен стимулиращ ефект върху проучваните показатели.

cause a stimulating effect on the studied parameters, while concentrations in the range of 0.7÷1.6% have an inhibitory effect on the growth of the root, epicotyl and sprouts of the alfalfa cultivars included in the study.

The highest and statistically proven stimulatory effect ($P < 0.05$) on sprout growth was caused by the pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant at a concentration of 0.5 to 0.6%.

Similar were the results obtained when monitoring the inhibition rate (IR) in the growth of the primary sprout in alfalfa, as well as in relation to its vegetative parts (root and epicotyl), with the difference that the varieties included in the study are distinguished by their biological response.

From the analysis of the data it is clear that as a result of the pre-sowing treatment of the seeds of the alfalfa variety "Dara" a higher sensitivity of the variety is established compared to "Pleven 6" and "BSP5A001".

When priming seeds in a concentration of 0.1 to 0.6% of Siliplant, a stimulatory effect on the growth of the root, epicotyl and respectively on the sprout in alfalfa was found from the applied concentrations - IR was in the range of -13.3 to -100% compared to the control (untreated) variant.

Variety Pleven 6 and "BSP5A001" can conditionally be defined as less sensitive in relation to the pre-sowing treatment, since when Siliplant is applied at a concentration of 0.6%, a complex stimulating effect on the studied indicators is established.

Таблица 2. Влияние на предсеитбеното третиране на семена от сортове люцерна със Siliplant върху нарастването на корена, епикотила и кълна
Table 2. Effect of pre-sowing seed treatment of alfalfa cultivars with Siliplant on root, epicotyl and seedling growth, cm

Третираня/Treatments		Сортове люцерна / Alfalfa varieties					
		Дара / Dara		Плевен 6 / Pleven 6		BSP5A001	
$C_{W/V}$ %	Показатели Indicators	Дължина / Length, cm	IR	Дължина / Length, cm	IR	Дължина / Length, cm	IR
0.0	Корен / Root	1.4ab	0.0	3.4cd	0.0	2.9bc	0.0
	Епикотил / Epicotyl	3b-d	0.0	4.6a-c	0.0	4.5de	0.0
	Кълн / Seedling	4.4bc	0.0	8.0cd	0.0	7.4cd	0.0
0.1	Корен / Root	2.7cd	-92.9	2.6bc	23.5	2.9bc	0.0
	Епикотил / Epicotyl	3.6d	-20.0	4.1ab	10.9	3.4c	24.4
	Кълн / Seedling	6.3d	-43.2	6.7a-c	16.3	6.3c	14.9
0.2	Корен / Root	2.3cd	-64.3	3.2cd	5.9	4.0de	-37.9
	Епикотил / Epicotyl	3.4de	-13.3	4.7a-c	-2.2	3.3bc	26.7
	Кълн / Seedling	5.7cd	-29.5	7.9b-d	1.3	7.3c-e	1.4
0.3	Корен / Root	2.3a-d	-64.3	3.3cd	2.9	3.3c-e	-13.8
	Епикотил / Epicotyl	4.4c-e	-46.7	4.1ab	10.9	3.9cd	13.3
	Кълн / Seedling	6.7d	-52.3	7.4a-d	7.5	7.2c-e	2.7
0.4	Корен / Root	2.3b-d	-64.3	4.0de	-17.6	2.9bc	0.0
	Епикотил / Epicotyl	3.9e	-30.0	4.6a-c	0.0	3.3bc	26.7
	Кълн / Seedling	6.2d	-40.9	8.6de	-7.5	6.2bc	16.2
0.5	Корен / Root	2.7cd	-92.9	3.5cd	-2.9	3.0b-d	-3.4
	Епикотил / Epicotyl	3.5de	-16.7	5.0bc	-8.7	4.2c-e	6.7
	Кълн / Seedling	6.2d	-40.9	8.5c-e	-6.3	7.2c-e	2.7
0.6	Корен / Root	2.8d	-100.0	4.6e	-35.3	4.2e	-44.8
	Епикотил / Epicotyl	3.5c-e	-16.7	5.2c	-13.0	4.4de	2.2
	Кълн / Seedling	6.3d	-43.2	9.8e	-22.5	8.6e	-16.2
0.7	Корен / Root	2.0a-d	-42.9	2.7bc	20.6	3.1b-d	-6.9
	Епикотил / Epicotyl	3c-e	0.0	3.7a	19.6	5.1e	-13.3
	Кълн / Seedling	5.0b-d	-13.6	6.4ab	20.0	8.2de	-10.8
0.8	Корен / Root	2.0a-d	-42.9	1.9ab	44.1	2.2ab	24.1
	Епикотил / Epicotyl	3c-e	0.0	4.4a-c	4.3	4.7de	-4.4
	Кълн / Seedling	5.0b-d	-13.6	6.3ab	21.3	6.9cd	6.8
0.9	Корен / Root	1.7a-d	-21.4	2.0ab	41.2	2.5a-c	13.8
	Епикотил / Epicotyl	3.2b-e	-6.7	4.2a-c	8.7	4.3c-e	4.4
	Кълн / Seedling	4.9b-d	-11.4	6.2a	22.5	6.8cd	8.1
1.0	Корен / Root	1.7a-d	-21.4	2.0ab	41.2	1.4a	51.7
	Епикотил / Epicotyl	2.9b-e	3.3	4.0ab	13.0	2.3ab	48.9
	Кълн / Seedling	4.6a-d	-4.5	6.0a	25.0	3.7a	50.0
1.2	Корен / Root	1.7a-c	-21.4	1.8ab	47.1	2.3a-c	20.7
	Епикотил / Epicotyl	2.4bc	20.0	3.9ab	15.2	2.2a	51.1
	Кълн / Seedling	4.1b-c	6.8	5.7a	28.8	4.5ab	39.2
1.4	Корен / Root	1.0a	28.6	1.9ab	44.1	2.0ab	31.0
	Епикотил / Epicotyl	1.8ab	40.0	4.3a-c	6.5	1.9a	57.8
	Кълн / Seedling	2.8ab	36.4	6.2ab	22.5	3.9a	47.3
1.6	Корен / Root	1.2a	14.3	1.6a	52.9	1.4a	51.7
	Епикотил / Epicotyl	0.9a	70.0	4.2ab	8.7	1.9a	57.8
	Кълн / Seedling	2.1a	52.3	5.8a	27.5	3.3a	55.4
Фактор / Factor		MS	η^2	MS	η^2	MS	η^2
B	Корен / Root	2.294 ^{ss}	-	7.560 ^{ss}	-	4.951 ^{ss}	-
B	Епикотил / Epicotyl	5.696 ^{ss}	-	1.529 ^{ns}	-	8.342 ^{ss}	-
B	Кълн / Seedling	13.487 ^{ss}	-	13.880 ^{ss}	-	20.250 ^{ss}	-

Легенда: $C_{W/V}$ % – концентрация; IR – степен на инхибиране; %; MS – средна квадратична; LSD a, b, c, d, e, f и ss – статистически доказани разлики при $P < 0,05$;
 Legend: $C_{W/V}$ % – concentrations; IR – inhibition rate, %; MS – mean squares; LSD a, b, c, d, e, f and ss – statistically proven differences at $P < 0.05$.

Следователно, наблюдаваните разлики по отношение влиянието на предсеитбеното третиране със Siliplant на включените в изследването семена от сортове люцерна могат да бъдат обяснени с генотипни различия, тъй като сравненията между тях са направени при еднакви лабораторни условия.

Therefore, the observed differences regarding the influence of the pre-sowing treatment with Siliplant on the seeds of the alfalfa cultivars included in the study can be explained by genotypic differences, since the comparisons between them were made under the same laboratory conditions.

Таблица 3. Влияние на предсеитбеното третиране със Siliplant на семена средно за включените в експеримента сортове люцерна върху нарастването на корена, епикотила и кълна, cm

Table 3. Effect of pre-sowing treatment with Siliplant on root., epicotyl and seedling growth on average for alfalfa cultivars included in the experiment, cm

Третирания Treatments	Показатели/Indicators					
	Корен / Root		Епикотил / Epicotyl		Кълн / Seedling	
	Влияние на факторите / Influence of factors					
$C_{w/v}\%$	A	B	A	B	A	B
0.0	1.9a	2.5cd	3.0a	4.1de	4.9a	6.7b-d
0.1	2.7b	2.7 de	3.5a	3.7cd	6.2b	6.4b-d
0.2	2.8b	2.9de	4.3a	3.8de	7.1b	7.0cd
0.3		3.1e		4.1de		7.2b-d
0.4		3.1e		4.0de		7.0de
0.5		3.9f		4.2de		7.3b-d
0.6		2.6c-e		4.4e		8.4e
0.7		2.0bc		3.9de		6.6b-d
0.8		2.0bc		4.2de		6.2c
0.9		2.1bc		4.0de		6.1b
1.0		1.7ab		3.2bc		5.0a
1.2		2.0ab		2.7ab		4.7a
1.4		1.7ab		2.9ab		4.7a
1.6		1.4a		2.4a		3.8a
Фактори/Factors	MS	η^2	MS	η^2	MS	η^2
A	17.080 ^{ss}	6.2	45.128 ^{ss}	13.7	105.57 ^{ss}	11.6
B	10.833 ^{ss}	25.7	8.689 ^{ss}	17.2	35.12 ^{ss}	25.1
AxB	1.466 ^{ns}	7.0	3.451 ^{ss}	13.7	5.52 ^{ss}	7.9

Легенда: $C_{w/v}\%$ – концентрация; MS – средна квадратична; η^2 – процент на депресията; LSD a, b, c, d, e, f и ss – статистически доказани разлики при $P < 0,05$;

Legend: $C_{w/v}\%$ – concentrations; MS – mean squares; η^2 – percentage of the variance; LSD a, b, c, d, e, f and ss – statistically proven differences at $P < 0.05$.

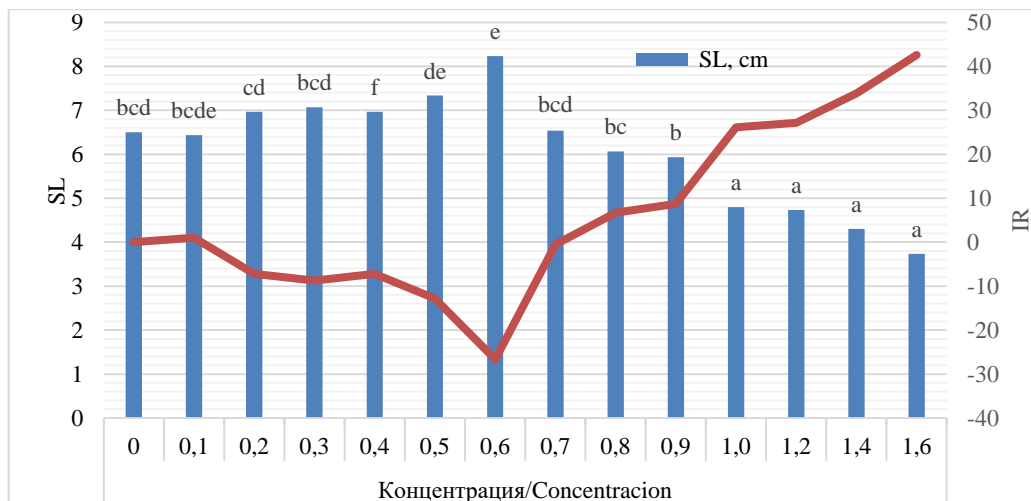
Оценявайки комплексното въздействие на предсеитбеното третиране на семената при сортове люцерна по отношение на проучваните фактори, фактор А (сорт) и фактор В (концентрация на работния разтвор от Siliplant) е видно, че концентрации в диапазона $0.3 \div 0.5\%$ оказват статистически доказан стимулиращ

Evaluating the complex impact of pre-sowing seed treatment in alfalfa varieties in terms of the studied factors, factor A (variety) and factor B (concentration of the working solution from Siliplant) it is evident that concentrations in the range $0.3 \div 0.5\%$ have a statistically significant effect proven stimulating effect on root growth,

ефект върху нарастването на корена, като максимален ефект се отчита при концентрация 0.5% на работния разтвор. По отношение нарастването на епикотила, респективно и при кълна на люцерната, статистически доказан стимулиращ ефект се установява само при концентрация 0.6% на работния разтвор (Таблица 3 и Фигура 2).

with the maximum effect being reported at a concentration of 0.5% of the working solution.

Regarding the growth of the epicotyl, respectively and in the alfalfa sprout, a statistically proven stimulating effect was found only at a concentration of 0.6% of the working solution (Table 3 and Figure 2).



Легенда: SL – дължина на кълна, cm; IR – степен на инхибиране. % („-“ стимулиращ, „+“ инхибиращ ефект); LSD a, b, c, d, e – статистически доказани разлики при $P < 0.05$;

Legend: SL – seedling length, cm; IR – inhibition rate. % (“-“ stimulatory, “+“ inhibitory effect); MS – mean squares; η^2 – percentage of the variance, LSD a, b, c, d, e, f – statistically proven differences at $P < 0.05$.

Фиг. 2. Интегралното въздействие на Siliplant върху нарастването на кълна (корен+епикотил) (SL), cm и процент на инхибиране (IR) средно за включените в експеримента сортове люцерна

Fig. 2. The integral effect of Siliplant on seedling (root + epicotyl) (SL), cm and inhibition rate (IR) averaged for the alfalfa varieties included in the experiment

От извършения дисперсионен анализ е видно, че най-голям дял от общото вариране върху проучваните показатели дължина на корена, епикотила и респективно кълна се дължи на фактор В - η^2 варира в диапазона от 17.2 до 25.7%, следван от фактор А при η^2 от 6.2 до 13.7%. Вариансът дължащ се на взаимовръзката АxВ „сорт – концентрация на работния разтвор от

From the variance analysis, it was established that the largest share of the total variation on the investigated indicators of root length, epicotyl and sprout, respectively, is due to factor B - η^2 varies in the range from 17.2 to 25.7%, followed by factor A at η^2 from 6.2 to 13.7%.

The variance due to the interaction АxВ "variety - concentration of the working solution from Siliplant is in the range η^2

Siliplant е в границите η^2 от 7,0 до 13,7%. Независимо от широкия диапазон на вариансите η^2 от 6,2 до 25,7% определящи относителния дял и тежестта на проучваните фактори, разликите са статистически доказани при $P < 0.05$.

Резултатите от определяне индекса на развитие (GI) (Фигура 3) на всички включени в изследването сортове люцерна по средни стойности на лабораторната кълняемост на семената и дължината на кълна, характеризират биологичното въздействие от предсеитбеното третиране на семената със Siliplant в зависимост от приложените концентрации показват, че максимален стимулиращ ефект върху първоначалното развитие на люцерната оказва предсеитбеното третиране на семената с концентрация на работния разтвор от 0.6 до 0.7% (GI - от 110.2 до 115.5).

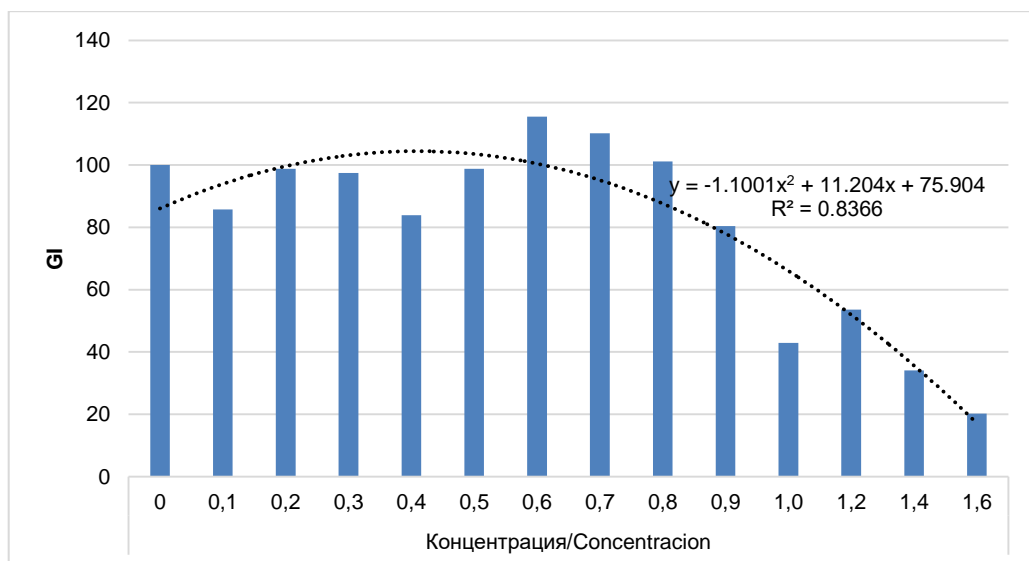
Прилагането на по-високи концентрации от 0.9 до 1.6% оказват инхибиращ ефект върху първоначалното развитие на кълновете – GI от 79.6 до 20.2. Установено е наличието на добре изразена полиномна регресия с добре доказан отрицателен коефициент на детерминация $R^2 = 0.836$ ($P < 0.01$). Този факт показва, че е установена еквивалентност между индексът на развитие на растенията (GI) в зависимост от извършеното предсеитбено третиране на семена от люцерна със Siliplant в широк диапазон от концентрации.

from 7.0 to 13.7%. Regardless of the wide range of η^2 variances from 6.2 to 25.7% determining the relative share and weight of the studied factors, the differences are statistically proven at $P < 0.05$.

The results of determining the development index (GI) (Figure 3) of all alfalfa cultivars included in the study by average values of laboratory seed germination and sprout length characterize the biological impact of the pre-sowing seed treatment with Siliplant depending on the applied concentrations that the maximum stimulating effect on the initial development of alfalfa is exerted by the pre-sowing treatment of the seeds with a concentration of the working solution from 0.6 to 0.7% (GI - from 110.2 to 115.5).

The application of higher concentrations from 0.9 to 1.6% had an inhibitory effect on the initial development of sprouts - GI from 79.6 to 20.2.

The presence of a well-expressed polynomial regression with a well-proven negative coefficient of determination $R^2 = 0.836$ ($P < 0.01$) was established. This fact shows that equivalence was established between the plant growth index (GI) depending on the pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant in a wide range of concentrations.



Фиг. 3. Интегралното въздействие на Siliplant върху нарастването на кълна (корен+епикотил) (SL), cm и процент на инхибиране (IR) средно за включените в експеримента сортове люцерна

Fig. 3. The integral effect of Siliplant on seedling (root + epicotyl) (SL), cm and inhibition rate (IR) averaged for the alfalfa varieties included in the experiment

ИЗВОДИ

Установена биологичната реакция от предсеитбеното третиране на семената със Siliplant при три сорта люцерна отглеждани по конвенционален („Дара“ и „Плевен 6“) и BSP5A001 по биологичен метод върху лабораторната кълняемост на семената и първоначалното развитие на растенията.

Използването на агар-агар, като среда за развитие на люцерновите растения определя изравненост в развитието на растенията, формиране на положителен и отрицателен геотропизъм на първичния кълн, съгласно проучваните фактори, което е предпоставка за достоверни статистически експериментални резултати.

Предсеитбеното третиране на семена от люцерна със Siliplant е препоръчително да се прилага в работна концентрация за полски условия в диапазона 0.5÷0.6%, която определя комплексен стимулиращ

CONCLUSIONS

The biological response of pre-sowing seed treatment with Siliplant was determined in three alfalfa cultivars grown conventionally ("Dara" and "Pleven 6") and BSP5A001 by biological method on laboratory seed germination and initial plant development.

The use of agar-agar as a medium for the development of alfalfa plants determines the evenness of plant development and the formation of positive and negative geotropism of the primary seedling, according to the studied factors, which is a prerequisite for reliable statistical experimental results.

The pre-sowing treatment of alfalfa seeds with Siliplant is recommended to be applied in a working concentration for field conditions in the range of 0.5÷0.6% determining a complex stimulating effect on the growth of the root, epicotyl, and

ефект върху нарастването на корена епикотила и кълна, респективно и върху първоначалното развитие на люцерната в периода „сеитба-пониране“.

Установена е силно изразена биологична реакция на сорт „Дара“ по отношение на извършеното предсеитбеното третиране на семената със Siliplant, при който комплексен стимулиращ ефект върху нарастването на кълна се установява в широк диапазон от приложените концентрации от 0.1 до 0.6%, докато „Плевен 6“ и „BSP5A001“ комплексен стимулиращ ефект върху проучваните показатели се установява при прилагане на Siliplant в концентрация от 0.6%.

seedling, respectively on the initial development of the culture in the year of establishment of the crop in the "sowing-emergence" period.

A pronounced strong biological response of the cultivar "Dara" was found in relation to the pre-sowing treatment of the seeds with Siliplant, in which a complex stimulating effect on the growth of sprouts was established in a wide range of applied concentrations from 0.1 to 0.6%, while "Pleven 6" and "BSP5A001" complex stimulating effect.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. **Adhikari, L. and A. M. Missaoui**, 2017. Nodulation response to molybdenum supplementation in alfalfa and its correlation with root and seedling growth in low pH soil. *Journal of Plant Nutrition*, 40 (16), 2290-2302.
2. **Akmal, M., U. Farid, M. Asim, Farhatullah and Raziuddin**, 2011. Crop growth in early spring and radiation use efficiency in alfalfa. *Pakistan Journal of Botany*, 43 (1), 635-641.
3. **Aladjadjyan, A.**, 2007. The use of physical methods for plant growing stimulation in Bulgaria. *Journal of Central European Agriculture* 8 (3), 369-380.
4. **Arshad, M., B. A. Feyissa, L. Amyot, B. Aung and A. Hannoufa**, 2017. MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13. *Plant Science*, 258, 122-136.
5. **Bogatsevska, N., D. Hristova, S. Simova, E. Staneva, R. Nakova, Tsv. Dimitrova, Iv. Kiryakov and P. Georgieva**, 2008. A Guide to Integrated Pest Management in Cereal and Legume Crops. Ministry of Agriculture and Food, National Plant Protection Service, Sofia. (BG).
6. **Chen, W., X. Yao, K. Cai and J. Chen**, 2011. Silicon alleviates drought stress of rice plants by 843 improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. *Biological Trace Element Research*, 142, 67-76. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8742-x>.
7. **Cwintal, M., A. Dziwulska-Hunek and M. Wilczek**, 2010. Laser stimulation effect of seeds on quality of alfalfa. *International Agrophysics*, 24 (1), 15-19.
8. **Gariglio, N. F., M. Buyatti, R. Pillati, R. D. Gonzales and M. Acosta**, 2002. Use a germination bioassay to test compost maturity of willow (*Salix* sp.) sawdust. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30, 135-139.
9. **Gudeva, L. K., V. B. Gyoroska, F. Trajkova and L. Mihajlov**, 2019. Activity of enzyme catalase in alfalfa (*Medicago sativa* L.) as an indicator for abiotic stress. *Journal of agriculture and plant sciences*, 17 (2), 45-52.
10. **Gunes, A., D. J. Pilbeam, A. Inal, E. G. Bagci, and S. Coban**, 2007. Influence of silicon on antioxidant mechanisms and lipid peroxidation in chickpea

(*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 2, 105–113.

11. **Guntzer, F., C. Keller and J. D. Meunier**, 2012. Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agronomy for sustainable agriculture*, 32, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0039-8>.
12. **Hanly, A. K.**, 2020. Characterization of squamosa promoter binding protein like (SPL), and its role in drought stress tolerance in *Medicago sativa* (alfalfa). *Electronic Thesis and Dissertation Repository*. 7092. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/7092>.
13. **Hattori, T., K. Sonobe, S. Inanaga, P. An, W. Tsuji, H. Araki, A. E. Eneji and S. Morita**, 2007. Short term stomatal responses to light intensity changes and osmotic stress in sorghum seedlings raised with and without silicon. *Environmental and Experimental Botany*, 60 (2), 177–182.
14. **Hou, C., X. Li, D. Tian, B. Xu, C. Zhang, J. Ren and N. Chen**, 2022. Evaluation of the effects of water and salinity stress on the growth and biochemistry of alfalfa (*Medicago sativa* L.) at the branching stage. *Sustainability*, 14, 10262. <https://doi.org/10.3390/su141610262>.
15. **Ivanova E. P. and G. V. Druzhechkova**, 2017. The Efficiency of Alfalfa Seed Treatment by Trace Elements Omsk State Agrarian University named P.A. Stolypin, 2 (9) April-June. <http://ejournal.omgau.ru/images/issues/2017/2/00344.pdf>. - ISSN 2413-4066.
16. **Janmohammadi M. and N. Sabaghnia**, 2015: Effect of pre-sowing seed treatments with silicon nanoparticles on germinability of sunflower (*Helianthus annuus*). *Botanica lithuanica*, 21 (1), 13–21.
17. **Khadeev, T. G. and M. S. Lapina**, 2012. The methods of increasing alfalfa field germination. *Protection and Quarantine of Plants*, 6:26-27.
18. **Kokonov, S. I., T. N. Ryabova, A. I. Votintsev, S. A. Mokeeva, S. L. Vorobyeva and O. V. Esenkulova**, 2021. Influence of presowing seed treatment on the yield of variegated alfalfa and eastern galega. *Plant Science Today*, 8 (2), 250-254.
19. **Kulkarni, K. P., R. Tayade, S. Asekova, J. T. Song, J. G. Shannon and J. D. Lee**, 2018. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. *Frontiers in Plant Science*, 9,1314. doi: 10.3389/fpls.2018.01314.
20. **Lidanski, T.**, 1988. Statistical methods in biology and agriculture. Zemizdat, Sofia. pp. 124-153 (BG).
21. **Liu, D., M. Liu, X-L. Liu, X-G. Cheng and Z-W. Liang**, 2018. Silicon priming created an enhanced tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings in response to high alkaline stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 716. doi: 10.3389/fpls.2018.00716.
22. **Marinova, D.**, 2017. Competitive variety testing on morphological and economic qualities of alfalfa synthetic populations (*Medicago sativa* L.). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 20 (1), 184-193.
23. **Marinova, D.**, 2019. Estimation of Experimental Populations of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) for Breeding Purposes. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22 (5), 95-110.
24. **Marinova, D.**, 2020. Assessment of alfalfa breeding accessions (*Medicago sativa* L.) based on main agronomic indicators. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 23 (5), 47-63.
25. **Marinova, D., I. Ivanova and Sv. Stojanova**, 2021. Application of total care and aminobest foliar fertilizers and their influence on the main quality traits in alfalfa (*Medicago Sativa* L.). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 24 (4), 109-129.

26. **Marinova, D., Sv. Stoyanova and I. Petrova**, 2019. Study of the effect of biostimulants application on green mass and dry matter yield in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Prista 4 variety. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22 (3), 64-80.
27. **Pei, Z. F., D. F. Ming, D. Liu, G. L. Wan, X. X. Geng, H. J. Gong and W. J. Zhou**, 2010. Silicon improves the tolerance to water-deficit stress induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 106-115.
28. **Plohinskii, N.**, 1967. Algorithms of Biometry. Publishing House of the Moscow University. 74-78 (Ru).
29. **Putnam, D., M. Ruselle, S. Orloff, J. Kuhn, L. Fitzhugh, L. Godfrey, A. Kiess and R. Long**, 2001. Alfalfa Wildlife and the Environment. The Importance and Benefits of Alfalfa in the 21st Century, 24 pp. Published by: California Alfalfa and Forage Association 36 Grande Vista, Novato, CA 94947.
30. **Qadir, B., M. Asim and M. Akmal**, 2018. Pre-sowing treatment of alfalfa seeds with bio-extracts for early spring growth performance. *Sarhad Journal of Agriculture*, 34 (4), 850-859.
31. **Radović, J., D. Sokolović and J. Marković**, 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6), 465-475.
32. **Roohizadeh G, A. Majd and S. Arbabian**, 2015. The effect of sodium silicate and silica nanoparticles on seed germination and some of growth indices in the *Vicia faba* L. *Tropical Plant Research* 2 (2), 85-89.
33. **Russelle, M. P.**, 2001. Alfalfa: After an 8 000-year journey, the "Queen of Forages" stands poised to enjoy renewed popularity. *American Scientist*, 89 (3), 252-261.
34. **Sayed, S. A. and M. A. A. Gadallah**, 2014. Effects of Silicon on *Zea mays* plants exposed to water and oxygen deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61, 493-499.
35. **Shen, X., Y. Zhou, L. Duan, Z. Li, A. E. Eneji and J. Li**, 2010. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1248-1252.
36. **StatSoft. Inc**, 2011. STATISTICA (data analysis software system). version 10. Tulsa. OK.
37. **Ullah, A., B. Shahzad, M. Tanveer, F. Nadeem, A. Sharma, D. Jin Lee and A. Rehman**, 2019. Abiotic stress tolerance in plants through pre-sowing seed treatments with mineral elements and growth regulators. In: Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V. (eds) Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_21.