*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2), 192-200* ISSN 1311-0489 (Print)
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan* ISSN 2367-8364 (Online)

# Гъбни патогени при генотипове фий в Сърбия

Таня Васич*, Ясмина Миленкович, Снежана Анджелкович, Драган Терзич, Йордан Маркович, Драгослав Джокич, Деян Соколович

*Институт по фуражни култури, 37251 Крушевац, Сърбия*
**E-mail: tanja.vasic@ikbks.com*

# Fungal pathogens of vetch genotypes in Serbia

Tanja Vasić*, Jasmina Milenković, Snežana Andjelković, Dragan Terzić, Jordan Marković, Dragoslav Djokić, Dejan Sokolović

*Institute for Forage Crops, 37251 Kruševac, Serbia*

## РЕЗЮМЕ

Фият (*Vicia sativa* L.) е едногодишно растение от семейство бобови (*Fabaceae*), което произлиза от умерения климатичен пояс на Европа и Азия. Той има специално място в осигуряването на фураж за животни в зоната на умерен климат. Той принадлежи към фуражните култури с висококачествен протеин.

Всяка година, заболяванията причинени от гъбни фитопатогени оказват, в по-голяма или по-малка степен, значително въздействие върху добивите и качеството на крайния продукт. Те също могат да повлияят търговията с растителен материал и да предизвикат разпространение на заболяването в нови области, в които се отглеждат бобови растения.

В Сърбия не е провеждано систематично проучване на микофлората на фия. Настоящето изследване има за цел да представи резултати от предварително проучване на микопулацията на 20 различни генотипове фий. Общо са изследвани 800 растения и 400 семена и са изолирани 8 рода гъби: *Fusarium, Phythophthora, Rhizoctonia, Phoma, Verticillium, Alternaria, Sclerotinia и Penicillium*. При растенията, от които са изолирани гъбичките, имаше ясно видими макроскопски симптоми на инфекция.

**Ключови думи:** патогени, фий

## SUMMARY

Vetch (*Vicia sativa* L.) is annual plant from the legume family (Fabaceae) and originates from the temperate zone of Europe and Asia. It has a special place in the provision of animal fodder in the zone of moderate climate. It belongs to high-quality protein fodder plants.

Diseases caused by phytopathogenic fungi every year have a significant impact on yields and quality of the final product to a greater or lesser degree. They can also affect trade plant material and cause the expansion of the disease in new areas where legumes are grown.

There has not been a systematic research of vetch mycoflora in Serbia. This research aims to present the results of preliminary research of mycopopulation of 20 different genotypes of vetch. Total of 800 plant parts and 400 seeds have been examined and 8 genera of fungi were isolated: *Fusarium*, *Phythophthora*, *Rhizoctonia*, *Phoma, Verticillium*, *Alternaria*, *Sclerotinia,* and *Penicillium*. On the plants from which the fungi were isolated, there were macroscopically clearly visible symptoms of infection.

**Key words**: pathogens, vetch

## УВОД

Обикновеният фий (*Vicia sativa*) се използва широко като зелен тор, за паша, силаж, сено и за зърнен фураж. *Vicia sativa* е широко разпространена фуражна култура, въпреки че извън култивираното отглеждане, често се смята за плевел. Той принадлежи към семейството на бобовите растения, *Leguminosae* (известен също като *Fabaceae*) и, подобно на много други бобови растения, има способността да фиксира азот от въздуха, дължаща се на симбиотична връзка с бактерии, които се намират в кореновите грудки. В резултат на това, обикновеният фий е с високо съдържание на протеини (Mišković, 1986).

Болестите по бобовите растения, причинени от фитопатогенни гъби, се срещат по-силно или по-слабо, ежегодно, във всички части на света. Те оказват значително въздействие както върху намаляването на потенциалния добив на тези култури, така и върху качеството на крайния продукт, търговията с растителен материал и разширяване отглеждането на бобови растения в нови области (Porta-Puglia and Aragona, 1997). Антракноза по фий и боб се причинява от гъбата *Ascochyta fabae Speg*. (*Teleomorph Didymella fabae* G. J. Jellis & Punith.) (Tivoli et al., 2006). *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) J. Schröt. причинява ръжда при фий и боб, и има широка гама от гостоприемници, които могат да се заразят и това са растителни видове от родовете *Pisum, Lathyrus* and *Lens* (Sillero and Rubiales, 2014). Два вида от род *Fusarium*, *F. verticillioides* и *F. proliferatum* са установени върху семена от фий (Miličević et al., 2013).

Също така, индуктори на заболявания като *Erysiphe pisi, Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani, Cercospora medicaginis, Pseudopezia medicaginis, Sclerotinia trifoliorum, Stemphylium botryosum, Verticillium albo-atrum, Aphanomyces euteiches,* както и видове

## INTRODUCTION

Common vetch (*Vicia sativa*) is widely used as green manure, pasture, silage, hay and for grain for livestock feed. *Vicia sativa* is a widely grown forage crop, although outside cultivation it is often considered to be a weed.

It belongs in the legume family, Leguminosae (also known as Fabaceae), and, like many other legumes, it has the ability to fix nitrogen from the air due to a symbiotic relationship with bacteria housed in root nodules.

As a result, common vetch is high in protein (Mišković, 1986.).

The diseases of legumes caused by phytopathogenic fungi occur, in a stronger or weaker intensity, regularly every year in all areas of the world. They have a significant impact on the reduction of potential yield of these cultures, but also the quality of the final product, trade of plant material and expansion of legumes into new areas (Porta-Puglia and Aragona, 1997).

Vetch and bean anthracnose is caused by the fungus *Ascochyta fabae* Speg. (teleomorph *Didymella fabae* G.J. Jellis & Punith.) (Tivoli et al., 2006). *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) J. Schröt. is the cause of rust in vetch and bean and has a wide range of hosts, which it can infect, and those are plant species from the genera *Pisum*, *Lathyrus* and *Lens* (Sillero and Rubiales, 2014). Two species of the genus *Fusarium, F. verticillioides* and *F. proliferatum* were determined on the vetch seeds (Miličević et al., 2013).

Similarly, inducers of diseases such as *Erysiphe pisi*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Stemphylium botryosum*, *Verticillium albo-atrum, Aphanomyces euteiches* as well as

от рода *Phytium, Leptosphaerulina, Phoma, Phythophthora* и *Alternaria* са значителни болестотворни агенти при фия, разпространени във всички области на неговото производство (Morgan and Johnson, 1965; Stovold and Walker, 1980; Hughes and Grau, 2007; Villegas-Fernández and Rubiales, 2011; Salam et al., 2011; Sillero et al., 2014).

Като се има предвид значението на фия като фуражна култура в Сърбия, целта на тази статия е определянето на фитопатогенни гъби, които причиняват заболявания при фий, за по-ясно възприемане на проблемите (загиване на растения, намаляване на добивите, влошаване качеството на храната и други), произлизащи в резултат на присъствието на тези гъби.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За изследване на микопопулациите са взети проби от шестнадесет експериментални растителни генотипа на фий (*Vicia sativa* L.), произхождащи от Австралия, два диви генотипа (*Vicia sativa* L.) с произход от Сърбия, от района на Расина и два диви генотипа (*Vicia villosa* Roth.) с произход от Австралия. Пробите са събрани между май и юни 2015 г., в района на Институт за фуражни култури в Глободер. Части от растения, както и семена от неузрели шушулки са измити внимателно под течаща вода. След измиване части от стъбло и корени са нарязани на парчета с размер 0,5-1 cm. Приготвените проби от корени, стъбла и семена са дезинфекцирани с 96% етанол в продължение на 10 секунди, след това с 1% натриев хипохлорит (NaOCl) в продължение на 1 минута, след което са промити три пъти в стерилна дестилирана вода. След това са изсушени върху стерилна филтърна хартия и са поставени върху картофено-декстрозен агар (PDA) със стрептомицин. Пет късчета от растение (корен и стъбло) и пет семена са поставени във всяко петриево блюдо, в четири повторения. Те са

species of genus *Phytium*, *Leptosphaerulina*, *Phoma*, *Phythophthora* and *Alternaria* are significant disease agents in vetch, spread in all the areas of its production (Morgan and Johnson, 1965; Stovold and Walker, 1980; Hughes and Grau**,** 2007; Villegas-Fernández and Rubiales, 2011; Salam et. al., 2011; Sillero et al., 2014).

Given the importance of vetch as a fodder crop in Serbia, the aim of this paper is the determination of phytopathogenic fungi that cause diseases in vetch for a clearer perception of problems (the extinction of plants, reducing yields, deterioration of the quality of feed and other) arising as a result of the presence those fungi.

## MATERIAL AND METHODS

For the study of mycopopulations, samples were collected from the sixteen experimental plant genotypes of vetch (*Vicia sativa* L.) originating from Australia, two wild-genotype (*Vicia sativa* L.) originating from Serbia, from the Rasina region, and two wild genotypes (*Vicia villosa* Roth.) originating from Australia. The samples were collected between May and June 2015 at the location of the Institute for forage crops in Globoder. Parts of plants as well as seeds from immature pods are carefully washed under running water. After washing, the parts of stem and roots are cut to piece of 0.5-1 cm in size. Prepared samples of roots, stems, and seeds were disinfected with 96% ethanol for 10 seconds and with 1% sodium hypochlorite (NaOCl) for 1 min. and then washed three times in sterile distilled water.

They were then dried on sterile filter paper and placed on potato dextrose agar (PDA) with streptomycin. Five pieces of the plant parts (roots and tree) and five seeds were placed in each Petri dish in four replications. They were kept in a thermostat at 25 °C in 12 h light / 12 h

държани в термостат при 25 °C, в режим 12 часа светлина / 12 часа нощ. Наблюденията са извършени на всеки 3 дни и повечето от мицеловите проби са развити до 14 дни. Развитите мицели са проверени върху нов PDA субстрат и след началния растеж на мицела, върховите му части са върнати отново в PDA.

Микроскопското изследване беше извършено с микроскопи Olympus CX31. Морфологична идентификация на рода гъби беше извършена с помощта на стандартен метод. Изчислена беше честотата на изолиране в% съгласно формулата Vrandečić i sar., (2011):

night regime. The observations were performed every 3 days, and the majority of mycelium samples were developed up to 14 days. Developed mycelia were screened to a new PDA substrate and, after an initial grow, the peak part of the mycelium was reseeded on PDA again.

Microscopic examination was performed using microscopes Olympus CX31. Morphological identification of fungi to the genus was carried out using a standard key. Calculated by the frequency of isolation in % according to the formula Vrandečić i sar., (2011):

$$\text{Процент на изолиране / The isolation percentage} = \frac{\text{Брой сегменти, съдържащи гъбичните видове / Number of segments containing the fungal species}}{\text{Общ брой използвани сегменти в изолация / Total number of segments used in the isolation}} \times 100$$

## РЕЗУЛТАТИ

В настоящето проучване на микопопулациите на генотипове фий са наблюдавани общо 800 части от растението и 400 семена. При всички растения, от които са изолирани гъбички, имаше ясни симптоми по стъблата, под формата на петна и некротични поражения. От тези растения са изолирани гъби от вида *Fusarium, Phytophthora* и *Alternaria*. Също така, при голям брой растения има некрози с бял въздушен мицел в долната трета от стъблото и са изолирани гъби от род *Sclerotinia*. В някои растения са наблюдавани черни пикнидии върху стъблата, за които е установено, че принадлежат към род *Phoma* (Таблица 1).

Има симптоми на светло-тъмнокафяви некрози върху кореновата система на растенията и от тях са изолирани гъби от рода *Fusarium, Phythophthora*, *Phoma* и *Rhizoctonia*. Също така, при голям брой растения се наблюдава обезцветяване на проводящите тъкани върху кореновата система и от тях е изолирана гъба от вида *Verticillium*.

Само при осем генотипа на фий, гъби от рода *Fusarium, Sclerotinia* и *Penicillium* са изолирани от семената. (Таблица 1).

## RESULTS

In this study of mycopopulations of vetch genotypes, total of 800 parts of the plant and 400 seeds were observed. On all plants from which fungi were isolated, there were clear symptoms on stems in the form of spots and necrotic lesions. From these plants, fungi from genus *Fusarium, Phytophthora* and *Alternaria* were isolated. Also, in large number of plants, there were necroses with white airy mycelium in the lower third of stems and fungi from the genus *Sclerotinia* were isolated from those plants. In some plants, black fruiting bodies (pycnidia) were observed on stems, which have been found to belong to the genus *Phoma* (Table 1).

There were symptoms as a light to dark brown necroses on the root system of the plants and from these plants fungi of the genera *Fusarium*, *Phythophthora*, *Phoma* and *Rhizoctonia* were isolated. Also in a large number of plants decolorisation of the conduction tissues on root system was observed and from these plants fungus of the genus *Verticillium* was isolated.

Only at eight genotypes of vetch, fungi of the genus *Fusarium*, *Sclerotinia* and *Penicillium* have been isolated from seeds. (Table 1).

**Таблица 1. Честота на гъбична изолация на фий**
**Table 1. Frequency of fungal isolation on vetch**

| Вид/Species | Брой проби/Number of samples | | | Видове гъби - стъбло/Fungi species-stem | (%) Честота на изолация/Isolation Frequency | Видове гъби-корени/Fungi species-root | (%) Честота на изолация/Isolation Frequency | Видове гъби-семенаFungi species-seed | (%) Честота на изолация/Isolation Frequency |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Част на растение-стъбло/Plant part-stem | Част на растение-коренPlant part-root | Част на растение-семеPlant part-seed | | | | | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 15 | *Fusarium* sp. | 10 | - | - |
| | | | | *Fusarium* sp. | 10 | *Verticillium* sp. | 15 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 15 | *Phythophthora* sp. | 20 | *Fusarium* sp. | 5 |
| | | | | *Fusarium* sp. | 10 | *Fusarium* sp. | 15 | *Sclerotinia* sp. | 10 |
| | | | | | | *Verticillium* sp. | 15 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 15 | *Phythophthora* sp. | 40 | *Sclerotinia* sp. | 5 |
| | | | | *Phoma* sp. | 15 | *Phoma* sp. | 5 | | |
| | | | | | | *Alternaria* sp. | 5 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 25 | *Alternaria* sp. | 15 | *Fusarium* sp. | 35 |
| | | | | | | *Rhizoctonia* sp. | 35 | *Sclerotinia* sp. | 15 |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Sclerotinia* sp. | 15 | *Phythophthora* sp. | 15 | *Penicillium* sp. | 10 |
| | | | | *Phythophthora* sp. | 20 | *Fusarium* sp. | 10 | | |
| | | | | | | *Alternaria* sp. | 5 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Rhizoctonia* sp. | 25 | *Phythophthora* sp. | 20 | - | - |
| | | | | | | *Phoma* sp. | 5 | | |
| | | | | | | *Fusarium* sp. | 25 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phoma* sp. | 10 | *Phythophthora* sp. | 25 | - | - |
| | | | | *Fusarium* sp. | 15 | | | | |
| | | | | *Alternaria* sp. | 5 | | | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Sclerotinia* sp. | 10 | *Phythophthora* sp. | 10 | - | - |
| | | | | *Phythophthora* sp | 15 | *Phoma* sp. | 5 | | |
| | | | | *Alternaria* sp. | 5 | *Rhizoctonia* sp. | 35 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Rhizoctonia* sp. | 25 | *Rhizoctonia* sp. | 15 | - | - |
| | | | | | | *Fusarium* sp. | 20 | | |
| | | | | | | *Alternaria* sp. | 15 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp | 15 | *Phythophthora* sp. | 10 | *Fusarium* sp. | 10 |
| | | | | *Rhizoctonia* sp. | 10 | *Phoma* sp. | 25 | | |
| | | | | | | *Fusarium* sp. | 15 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Fusarium* sp. | 15 | *Verticillium* sp. | 10 | *Sclerotinia* sp. | 15 |
| | | | | *Alternaria* sp. | 10 | *Phythophthora* sp. | 20 | | |
| | | | | | | *Rhizoctonia* sp. | 30 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 5 | *Phythophthora* sp. | 15 | - | - |
| | | | | *Rhizoctonia* sp. | 20 | *Rhizoctonia* sp. | 10 | | |
| | | | | | | *Phoma* sp. | 25 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 20 | *Rhizoctonia* sp. | 25 | *Fusarium* sp. | 15 |
| | | | | *Phoma* sp. | 5 | *Phythophthora* sp. | 5 | | |
| | | | | | | *Alternaria* sp. | 10 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Phythophthora* sp. | 20 | *Phythophthora* sp. | 15 | - | - |
| | | | | | | *Phoma* sp. | 5 | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Fusarium* sp. | 15 | *Phythophthora* sp. | 10 | - | - |
| | | | | *Alternaria* sp. | 10 | *Fusarium* sp. | 10 | | |
| | | | | | | *Phoma* sp. | 5 | | |
| *Vicia sativa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Fusarium* sp. | 15 | *Fusarium* sp. | 10 | - | - |
| | | | | | | *Rhizoctonia* sp. | 15 | | |
| *Vicia sativa* (SR) | 20 | 20 | 20 | *Verticillium* sp. | 25 | *Phythophthora* sp. | 10 | - | - |
| | | | | | | *Verticillium* sp. | 30 | | |
| *Vicia sativa* (SR) | 20 | 20 | 20 | *Verticillium* sp. | 15 | *Fusarium* sp. | 5 | - | - |
| | | | | *Fusarium* sp. | 10 | *Verticillium* sp. | 20 | | |
| | | | | | | *Phythophthora* sp. | 25 | | |
| *Vicia villosa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Rhizoctonia* sp. | 15 | *Fusarium* sp. | 15 | - | - |
| | | | | *Fusarium* sp. | 10 | *Phythophthora* sp | 30 | | |
| *Vicia villosa* (A) | 20 | 20 | 20 | *Fusarium* sp. | 15 | *Rhizoctonia* sp. | 20 | *Sclerotinia* sp. | 10 |

Резултатите показват, че фият е уязвим на атаката на голям брой фитопатогенни гъби, които могат да окажат значително влияние върху понижаване на добива и качеството му. Също така от получените резултати можем да заключим, че семената от фий се заразяват в складовете, а не на полето.

The results indicate that vetch is vulnerable to the attack of a large number of phytopathogenic fungi that can have a significant impact on reducing its yield and quality. Also from the obtained results we can conclude that seed of vetch becomes infected in warehouses and not on the field.

## ОБСЪЖДАНЕ

При всички растения, с които са проведени изолации, имаше ясно видими симптоми на наличното заболяване. В тези проучвания има разлика в честотата на изолиране на някои родове от фитопатогенни гъбички, както в австралийската, така и в сръбската популация. Наблюдавано е, че гъби от рода *Verticillium, Fusarium* и *Phythophthora* в генотипите, произхождащи от Сърбия, са често изолирани. Също така родовете *Alternaria*, *Rhizoctonia, Phoma* и *Sclerotinia* са често изолирани от австралийски генотипове.

Родове *Fusarium*, *Phytophthora, Rhizoctonia, Phoma, Verticillium, Alternaria*, *Sclerotinia, Botrytis* и *Ascochyta* доминират при годишни и многогодишни бобови култури по света (Tivoli et al., 2006; Villegas-Fernández and Rubiales, 2011; Salam et al. Sillero et al., 2014, Vasić et al., 2015). Миличевић et al. (2013 г.) отчитат два вида *Fusarium F. verticillioides* и *F. proliferatum* върху семена на фий в Хърватия. Докато Salam et. Ал. (2011) цитира родовете *Ascochyta* и *Botrytis*, особено видове *Ascochyta fabae* Speg. (Teleomorph: Didymella fabae) и *Botrytis fabae, Botrytis cinerea* като значими патогени по фасула в Австралия.

Важно е да се отбележи, че паразити от род *Botrytis* преживяват под формата на склероции или мицел в растителни остатъци в почвата (Davidson et al., 2004). Поради тези причини се препоръчва използването на ротация на култури на четири години, когато става въпрос за сеитбата на фий след фасул и грах (Salam et al., 2011). Salam et. Ал. (2011) също цитира *Phoma medicaginis* var. *pinodella* и *Ascochyta pisi* като значими патогени в граховото зърно. *Phytophthora medicaginis* е отчетена при нахут в Австралия и също така е установено, че този паразит може да

## DISCUSSION

In all the plants from which isolations were conducted there were clearly visible symptoms of the disease present. In these studies, there was difference in frequency of isolation of some genera of phytopatgenic fungi in both Australian and Serbian populations. It was observed that in the genotypes that originated in Serbia fungi of genus *Verticillium, Fusarium and Phythophthora* were frequently isolated. Also genera *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Phoma and Sclerotinia* were frequently isolated from Australian genotypes.

Genera *Fusarium*, *Phythophthora*, *Rhizoctonia*, *Phoma, Verticillium*, *Alternaria*, *Sclerotinia, Botrytis* and *Ascochyta* were dominant in annual and perennial legumes worldwide (Tivoli et al., 2006; Villegas-Fernández and Rubiales, 2011; Salam et. al., 2011; Sillero et al., 2014, Vasić et al., 2015). Miličević et al. (2013) determined two *Fusarium* species *F. verticillioides* and *F. proliferatum* on vetch seed in Croatia. While Salam et. al. (2011) cited genera *Ascochyta* and *Botrytis*, especially species *Ascochyta fabae* Speg. (teleomorph: *Didymella fabae*) and *Botrytis fabae, Botrytis cinerea* as significant pathogens on faba bean in Australia.

It is important to mention that the parasites of the genus *Botrytis* overwinter in the form of sclerotia or mycelium into plant residues in the soil (Davidson et al., 2004). So, for these reasons, it is recommended to utilize crop rotation of four years, when it comes to the sowing of vetch after the faba bean and pea (Salam et. al., 2011). Salam et. al. (2011) also cited *Phoma medicaginis* var. *pinodella* and *Ascochyta pisi* as significant pathogens in pea.

*Phytophthora medicaginis* was recorded on chickpea in Australia and it was also found that this parasite can infect other

зарази други видове бобови растения (Salam et al., 2011). *Sclerotinia trifoliorums* Eriks. често причинява сериозни проблеми в много бобови растения в Гърция (Lithourgidis, 2005). *Rhizoctonia solani* Kühn е почвен паразит, който може да причини сериозни проблеми в много бобови растения, особено при фасул (Assunção, 2011). В Канада 304 генотипове фасул са изследвани за устойчивост към *R*. *solani* и само пет от тях са идентифицирани с висока устойчивост (*Rashid* and *Bernier*, 1993). Ligoxigakis et al. (2002) определи V. *dahliae* като паразит по фия и други бобови растения в Гърция.

В тази статия са представени предварителни резултати от микопулациите на 20 експериментални генотипове фий. Фият е много важна фуражна култура и нейното значение като храна за животните се разраства в нашата страна. Това проучване е начало на по-задълбочено изследване на фитопатогенните гъби по фия. Досега в Сърбия няма значителни изследвания в тази посока, така че бъдещите изследвания, свързани с фия, ще отидат в посоката на подбор на генотипове с повишена толерантност към болести.

types of legumes (Salam et. al., 2011). *Sclerotinia trifoliorums* Eriks. often causes serious problems in many legumes in Greece (Lithourgidis, 2005). *Rhizoctonia solani* Kühn is soil parasite that can cause serious problems in many legumes, especially on faba bean (Assunção, 2011).

In Canada, 304 faba bean genotypes were tested on the resistance to *R. solani* and only five of them were identified with high resistance (Rashid and Bernier, 1993). Ligoxigakis et al. (2002) determined the *V. dahliae* as a parasite on vetch and other legumes in Greece.

This paper presents the preliminary results of mycopopulations of 20 experimental vetch genotypes. Vetch is very important forage crop and its importance as animal feed is growing within our country. This work is the beginning of a more comprehensive study of phytopatogenic fungi on vetch. So far, there were no significant researches in this direction in Serbia, so the future researches related to vetch will go in the direction of selection of genotypes with increased tolerance to diseases.


## БЛАГОДАРНОСТИ

Този труд е финансиран от Министерство на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, проект TR 31057

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development Republic of Serbia, project TR 31057.


## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES


1. **Assunção, I. P., L.D. Nascimento, M.F. Ferreira, F.J. Oolivira, S.J. Michereff, G.S.A. Lima**, 2011. Reaction of faba bean genotypes to *Rhizoctonia solani* and resistance stability. *Horticultura Brasileira,* 29: 492-497.
2. **Davidson, J.A., S. Pande, T.W. Bretag, K.D. Lindbeck, G**. **Krishna-Kishore**, 2004. Biology and Management of Botrytis spp. in legume crops. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds) Botrytis: biology, pathology and control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 295-318.
3. **Erić, P., V. Mihajlovič, B. Ćupina, A. Mikić**, 2007. Jednogodišnje krmne mahunarke. Graf Style, Novi Sad (Sr).

4. **Hughes, T. J. and C. R. Grau**, 2007. Aphanomyces root rot or common root rot of legumes. *The Plant Health Instructor.* DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0418-01.
5. **Karagić, Đ., V. Mihailović, S. Katić, B. Milošević, I**. **Pataki**, 2011. Prinos i kvalitet semena NS sorti krmnih biljaka u periodu 2007-2010. Zbornik referata sa 45. Savetovanja agronoma Srbije, Zlatibor, 30.januar-05. februar, pp. 143-153 (Sr).
6. **Kushwaha C., R. Chand, C. Srivastava**, 2006. Role of aeciospores in outbreaks of pea (*Pisum sativum*) rust (*Uromyces fabae*). *European Journal of Plant Pathology*, 115: 323-330.
7. **Ligoxigakis, E. K., D. J. Vakalounakis, C. C. Thanassoulopoulos**, 2002. Host Range of *Verticillium dahliae* in cultivated species in Crete. *Phytoparasitica,* 30(2), 141-146.
8. **Lithourgidis, A. S., D. G. Roupakias, C. A. Damalas**, 2005. Inheritance of resistance to sclerotinia stem rot (*Sclerotinia trifoliorum*) in faba beans (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*, 91(2-3), 125-130.
9. **Miličević, T., J. Kaliterna, D. Ivić, A. Stričak**, 2013. Identifikacija i zastupljenost *Fusarium* vrsta na sjemnenu grahorice, Bijele Vučike te nekih samoniklih mahunarki. *Poljoprivreda*, 19 (1), 25-32.
10. **Mišković, B.**, 1986. Krmno bilje. Naučna knjig, Beograd. pp 23-48. (1-503).
11. **Morgan, F. L. and Johnson**, 1965. Phytophthora root and crown rot of Vetch. *Plant Disease Reporter,* 49(1), 84-88.
12. **Nash, P. and A. Verrell**, 2011. Advances in winter pulse pathology research in Australia. *Australasian Plant Pathol*, 40: 549-567.
13. **Porta-Puglia, A. and M. Aragona**, 1997. Improvement of grain legumes - General part: diseases. *Field Crops Research,* 53: 17-30.
14. **Rashid, K. Y. and C. C. Bernier**, 1993. Genetic diversity among isolates of *Rhizoctonia solani* and sources of resistance in Vicia faba. *Canadian Journal of Plant Pathology,* 15: 23-28. SALT GA. 1982.
15. **Salam, M. U., J. A. Davidson, G. J. Thomas, R. Ford, R. A. C. Jones,K. D. Lindbeck, W. J. MacLeod, R. B. E. Kimber, J. Galloway, N. Mantri, J. A. G. van Leur, B. A. Coutts, A. J. Freeman, H. Richardson, M. Aftab, K. J. Moore, E. Knights, J., J. C. Sillero, M. M. Rojas-Molina, A. A. Emeran, D. Rubiales**, 2011. Rust resistance in faba bean. *Grain Legumes*, 56: 27-28.
16. **Sillero, J.C. and D. Rubiales**, 2014. Response of Vicia species to Ascochyta fabae and *Uromyces viciae-fabae*. *Czech J. Genet. Plant Breed*., 50: 109-115.
17. **Stovold, G. and J. Walker**, 1980. A preliminary note on *Botrytis* spp. affecting *Vicia* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 9(2), 10.
18. **Tivoli, B., A. Baranger, C.M. Avila, S. Banniza, M. Barbetti, W.D. Chen, J. Davidson, K. Lindeck, M. Kharrat, D. Rubiales, M. Sadiki, J.C. Sillero, M. Sweetingham, F.J. Muehlbauer**, 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica*, 147: 223-253.
19. **Villegas-Fernández, A. M. and D. Rubiales**, 2011. Chocolate spot resistance in faba bean. *Grain Legumes*, 56: 29-30.
20. **Vasić T., J. Milenković, Z. Lugić, D. Terzić, R. Stanisavljević, M. Blagojević, D. Đokić**, 2015. Mikopopulacija različitih genotipova grahorice u Srbiji. *Zaštita bilja*. vol. 66 (1), No. 291, 45-50, Beograd (Sr).
21. **Vrandečić, K., J. Ćosić, D. Jurković, J. Poštić**, 2011. Mikopopulacija ljekovitog bilja u Hrvatskoj. *Poljoprivreda*, 17 (2), 18-21.

*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2), 201-210* ISSN 1311-0489 (Print)
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan* ISSN 2367-8364 (Online)

# Изменчивост при някои показатели на генотипове фий произхождащ от различни райони

Ясмина Миленкович[1*], Раде Станисавлевич[2], Йордан Маркович[1], Миряна Петрович[1],Таня Васич[1], Снежана Анджелкович[1], Зоран Лугич[1]

*[1]Институт по фуражни култури, 37251 Крушевац, Сърбия*
*[2]Институт по растителна защита и опазване на околната среда, 11000 Белград, Сърбия*
**E-mail: jasmina.milenkovic@ikbks.com*

# Variability of some traits of vetch genotypes originating from different regions

Jasmina Milenković[1]*, Rade Stanisavljević[2], Jordan Marković[1], Mirjana Petrović[1], Tanja Vasić[1], Snežana Andjelković[1], Zoran Lugić[1]

*[1]Institute for Forage Crops, 37251 Kruševac, Serbia*
*[2]Institute for plant protection and the environment, 11000 Belgrade, Serbia*

## РЕЗЮМЕ

Цел на настоящето изследване са 10 генотипа от пролетен фий: пет генотипа обикновен фий (*Vicia sativa* L.) и пет генотипа на вълнеста глушина (*Vicia villosa* Rooth.). Новият генетичен материал в селекционния процес ще допринесе за за получаване на нови сортове с по-добри качествени и количествени характеристики. Изследваните генотипове са взети от колекцията на Института по фуражни култури, като имат различен географски произход. Проучвания на малки парцели са провеждани в продължение на три години (2013, 2014 и 2015 г.) в опитното поле на Института по фуражни култури в Крушевац. Проучени са следните количествени показатели: брой шушулки на растение, брой семена на шушулка, тегло на 1000 семена. Определени са общо съдържание на протеин, неразтворими протеини и разтворими протеини на фуража (цяло растение) във фаза пълнене на шушулка. Всички

## SUMMARY

The objective of this research was ten genotypes of spring vetch: five genotypes of common vetch (*Vicia sativa* L.) and five genotypes of hairy vetch (*Vicia villosa* Rooth.). New genetic material in the selection process would contribute to the obtaining of new varieties with better qualitative and quantitative characteristics. The tested genotypes were taken from the collection of Institute for forage crops, and they have different geographic origin. The small plot trials, was conducted in three years (2013, 2014, and 2015) at the experimental field of the Institute for forage crops Krusevac.

The following quantitative traits were investigated: number of pods per plant, seed number per pod, 1000 seed weight.

Total protein content, insoluble proteins and soluble proteins were determined from the forage (whole plant) in the phase of pod filling. All studied chemical

изследвани химични параметри показаха значителна разлика между генотиповете и годините (P≤0.01). Количествените параметри (брой шушулки на растение, брой семена на шушулка, тегло на 1000 семена) варират между генотиповете, но няма статистически значими разлики между годините.

**Ключови думи:** качество, *Vicia sativa* L., *Vicia vilosa* Roth., общо съдържание на протеин, неразтворим протеин

parameters revealed significant difference between the genotypes, and years (P≤0.01). Quantitative parameters (number of pods per plant, seed number per pod and 1000 seed weight) varied between genotypes, but there were no statistically significant differences between years.

**Key words**: quality, *Vicia sativa* L., *Vicia vilosa* Roth., total protein content, insoluble protein

## УВОД

Фий се отглежда за целите на фуражо и зърнопроизводството за храна на животните. Понеже е азотофиксиращо бобово растение, той може да се използва като растителен тор. Само семената могат да се използват за животинска храна поради високото си качество. Фият се отглежда за фураж, производство на зърно и като зелена торна растителност (Tenopala et al., 2012). В много видове от рода *Vicia* има много подвидове и сортове (Maxted, 1995). В литературата има много изследвания на обикновен фий, по-често, отколкото на вълнеста глушина. В агрономичните практики в Сърбия по-често се използва обикновен фий, отколкото вълнеста глушина. Също така, в "Списък на признатите сортове земеделски растения" на Република Сърбия съществуват пет сорта от обикновен фий (*V. sativa* L.), две разновидности вълнеста глушина (*V.vilosa* Roth.) и един сорт Панонски фий (*V. pannonica*).

Цялото растение може да се използва за производство на качествен фураж. Семената са с високо съдържание на протеини и могат да се използват и като храна за животни (Buykkartal et al, 2013).

Семената от едногодишни бобови растения, използвани като фураж, съставляват съществена част от биомасата (Hintz et al., 1992; Caballero et al., 1996). Ако вземем предвид, че поголямата част от протеина, като един

## INTRODUCTION

Vetch is widely used for forage and grain production for animal feeding. As a nitrogen fixing legume, it can be used as plant fertilizer. Due to the high quality of seeds, and only seeds can be used as animal feed. Vetch is cultivated for forage, grain production and as a green fertilizer plant (Tenopala et al., 2012). Within many species of the genus *Vicia* there are many subspecies and varieties (Maxted, 1995). In the literature there are numerous references to studies on a common vetch, more often than on hairy vetch. In the agronomic practices in Serbia is commonly used common vetch, while hairy vetch is used to a lesser extent. Also, on the “List of recognized varieties of agricultural plants” of the Republic of Serbia, there are five varieties of common vetches (*V. sativa* L.), two varieties of hairy vetch (*V.vilosa* Roth.) and one variety of Pannonian vetch (*V. pannonica*).

Whole plant is high quality feed for use in forage production. The seeds are with high protein content and may be used as animal feed, too (Buykkartal et al, 2013).

Seeds of annual legumes, used as forage, contribute to an essential proportion of the biomass (Hintz et al., 1992; Caballero et al., 1996). If we consider that most of the protein, as the one of the main quality indicators,

от основните показатели за качество, се съдържа в семената, то някои важни качества (броят на семената в една шушулка, броя на шушулките в едно растение и масата на 1000 семена) допринасят за по-високия дял протеин в биомасата. Много е важно да се намери баланс между увеличаващото се съдържание на протеини в пълнежа на шушулката и понижаване качеството на вегетативните части от растенията (Alzueta et al., 2001). Резултатите от Samarah и Ereifej (2009) показват, че по-голямата част от химическия състав на семената се натрупва по време на етап зеленикаво-жълта шушулка, което е оптималното време за прибиране на реколтата от семена на фия, без да се намалява масата на семена и загубата хранителни вещества.

Освен суровия протеин, важен показател за качеството е съотношението на разтворимия и неразтворимия протеин. Разтворимият протеин се дефинира като истински протеин, който е разтворим в киселинната среда на търбуха (Licitra et al., 1996). Същият автор заявява, че повечето разтворими азотни компоненти бързо се разграждат в търбуха и следователно намаляват белтъка, който може да бъде пренесен в долната част на хранителния тракт. По-ранни процедури (Wohlt et al., 1973; Crooker et al., 1978; Waldo and Goering, 1979) се прилагат от биологична гледна точка, което намалява влиянието на средата на търбуха. По-добър показател за качеството на фуража е съдържанието на неразтворим протеин, тъй като тази част най-често преминава в долната част на хранителния тракт и може да се използва за физиологични процеси. Количественото определяне на суровата протеинова фракция на фуражния фий не е изследвано в по-голяма степен (Alzueta et al., 2001).

Генетичната изменчивост в тестваните генотипове и знанията за него дават основа за подобряване и развитие на нови сортове (Mikić et al., 2013).

contained in the seed, that the some important properties (the number of seed per pod, number of pods per plant, and the mass of 1000 seeds) contributes to a higher proportion of protein in the biomass. It is very important to find the balance between increasing protein content in pod filling and decreasing the quality of vegetative plant parts (Alzueta et al., 2001).

Results of Samarah and Ereifej (2009) suggest that the majority of seed chemical composition was accumulated by the greenish-yellow pods stage which is optimal time for harvest of common vetch seed without reducing seed mass and nutrient loss.

Besides crude protein, an important indicator of quality is the ratio of soluble and insoluble protein.

Soluble protein is defined as true protein that is soluble in buffer at rumen pH (Licitra et al., 1996). Same author stated that most soluble nitrogen components were rapidly degraded in the rumen, and therefore reduced protein that could be passed to the lower tract.

Earlier procedures (Wohlt et al., 1973; Crooker et al., 1978; Waldo and Goering, 1979) were applied from a biological point of view, which reduces the impact of rumen environment. A better indicator of the feed quality is the content of insoluble protein, because that fraction mostly passed to the lower tract and can be used for physiological processes.

Quantification of crude protein fraction on vetch forage was not investigated to a greater extent (Alzueta et al., 2001).

Genetic variability within tested genotypes and knowledge about it offer a basis for improvement and developing new cultivars (Mikić et al., 2013). The ten

Десет генотипа от колекцията на Института за фуражни култури Крушевац бяха избрани за тестване.

Целта на настоящото изследване е да се проучи съдържанието на протеин (по-специално неразтворими протеини) на генотипове фий от различни географски райони. На основата на това да се селектират най-добрите генотипове за по-нататъшна селекция за да се произвежда висококачествена храна на животните.

genotypes from the collection of the Institute for forage crops Kruševac were selected for testing.

The aim of this study was to investigate protein content (especially insoluble proteins) of vetch genotypes from different geographical areas. Based on this, select the best genotypes for further selection in order to produce high-value animal feed.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Материалът за това изследване са 10 генотипа пролетен фий от видовете *V. sativa* и *V. Vilosa*. Тестваните генотипове са взети от местната колекцията на Института за фуражни култури и имат различен географски произход (Таблица 1).

## MATERIAL AND METHODS

The material for this study was ten spring vetch genotypes of species *V. sativa* and *V. Vilosa*. The tested genotypes were taken from the landrace collection of Institute for forage crops, and they have different geographic origin (Table 1).

**Таблица 1. Изследвани генотипове и техния произход**
**Table 1. Investigated genotypes and their origin**

| Генотип/Genotype | *Вид/Species* | Произход/Origin |
|---|---|---|
| VSA1 | *V. sativa* | Australia/Австралия |
| VSA2 | *V. sativa* | Australia/Австралия |
| VST2 | *V. sativa* | Eastern Serbia/Източна Сърбия |
| VSA4 | *V. sativa* | Australia/Австралия |
| VSAC3 | *V. sativa* | Central Serbia/Централна Сърбия |
| VVA1 | *V. vilosa* | Australia/Австралия |
| VVA2 | *V. vilosa* | Australia/Австралия |
| VVT3 | *V. vilosa* | Eastern Serbia/Източна Сърбия |
| VVAC1 | *V. vilosa* | Central Serbia/Централна Сърбия |
| VVAC2 | *V. vilosa* | Central Serbia/Централна Сърбия |

Опитите върху малки парцели са провеждани в продължение на три години (2013, 2014 и 2015 г.) в експерименталното поле на Института за фуражни култури Крушевац. Експерименталната зона е разположена на височина 137 m; 43° 34’ 60" N и 21° 19’ 36" E. Почвата на експерименталното поле е алувиална. Използвана е стандартна селскостопанска технология.

Изследвани са следните показатели: брой шушулки на растение, брой семена в шушулка, тегло на семена, общо съдържание на протеини, раз-

The small plot trials, was conducted in three years (2013, 2014, and 2015) at the experimental field of the Institute for forage crops Kruševac. Experimental area was located at 137m elevation; 43° 34′ 60" N and 21° 19′ 36" E. Soil type of the experimental field was relegated alluvium. Standard agricultural technology was applied.

The following traits were investigated: number of pods per plant, seed number per pod, 1000 seed weight, total protein content, soluble proteins and

творими протеини и неразтворими протеини. Експериментът е заложен по блоков метод с рандомизирано разпределение в три повторения за три години. Преброяването на броя шушулки на растение, броя на семената в шушулка и теглото на 1000 семена беше извършено в стадий на пълна зрялост. Взети са проби от пет растения от всяко повторение, на които се преброиха броя на шушулките на растение и броя на семената в шушулка. Теглото на 1000 семена е отчетено от уникалните образци на семената от всяко повторение.

Определянето на протеиновото съдържание се извърши при пет растения от всяко повторение във физиологичен стадий пълнене на шушулката. Покосяването се извърши в един и същи ден за всички генотипове. Целите растения бяха наситнени изсушени и беше създаден уникален модел за химическия анализ. Общото съдържание на суров протеин беше определено съгласно AOAC 2011.11. Разтворимото протеиново съдържание (истински разтворим протеин) се определя от Licitra et al. (1996). Стойностите на разтворимия протеин са дадени в проценти суров протеин. Неразтворимият протеин се изчислява като разликата между общия суров протеин и стойността на разтворимия протеин.

Средните месечни температури ($^{o}$C) и общите данни за утаяване (mm), записани по време на периода на изследване, са представени в Таблица 2.

insoluble proteins. The experiment was planted in a randomized complete block design with three replications.

Counting of number of pods per plant, number of seeds per pod, and 1000 seed weight was done in full maturity stage.

Samples were obtained at five plants from each replication on which number of pods per plant and number of seeds per pod were counted. The 1000 seed weight was counted from the unique pattern of seed for each replication.

Determination of the protein content was done at the five plants from each replication in a physiological stage of pod filling. Cutting was done in the same day for all genotypes. Whole plants are chopped, dried and a unique pattern for the chemical analysis was made. Total crude protein content was determinate according to AOAC 2011.11. Soluble protein content (true soluble protein) was determined by Licitra et al. (1996). Values of soluble protein are given in percent of crude protein. Insoluble protein was calculated as the difference between the total crude protein and the value of soluble protein.

Average monthly temperatures ($^{o}$C) and total precipitations (mm) data recorded during study period are presented in Table 2.

**Таблица 2. Средни месечни температури ($^{o}$C) и общи валежи (mm) през изследваните години**
**Table 2. Average monthly temperatures ($^{o}$C) and total precipitations (mm) in investigated years**

| | | Март<br>March | Април<br>April | Май<br>May | Юни<br>June | Юли<br>July | Август<br>Aug. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2013 | T ($^{o}$C) | 6.4 | 13.5 | 18.1 | 20.0 | 22.2 | 23.9 |
| | Валежи/Precip. (mm) | 78.4 | 54.5 | 96.8 | 44.0 | 6.1 | 14.4 |
| 2014 | T ($^{o}$C) | 9.4 | 11.4 | 14.9 | 19.4 | 21.3 | 21.0 |
| | Валежи/Precip. (mm) | 80.1 | 169.9 | 111.0 | 138.5 | 75.3 | 61.7 |
| 2015 | T ($^{o}$C) | 6.3 | 11.4 | 17.7 | 19.7 | 24.2 | 23.7 |
| | Валежи/Precip. (mm) | 105.8 | 55.2 | 62.6 | 101.7 | 2.8 | 22.4 |

Резултатите са обработени чрез анализ на вариация (ANOVA). Използван е Fisher тест при ниво на вероятност 0.01. За статистическия анализ е използван софтуерът STATISTICA.

The results were processed by the analysis of variance (ANOVA). Fisher test at the 0.01 probability level was used. For the statistical analysis, the STATISTICA software was used.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Високото общо количество на валежи (от март до юни 499.5 mm) с по-ниски средни месечни температури на въздуха (Таблица 2), доведоха до удължаване на вегетационния период и закъсняване фазата на цъфтеж през 2014 г. Първата година от изследването (2013 г.) има най-ниско количество валежи, с най-високи средни месечни температури през разглеждания период. Третата година от проучването има благоприятни условия за развитието на фий.

Резултатите от изследването са представени в Таблица 3. При обикновените генотипове фий, най-малък брой шушулки на растение има VSAC3 (9.31), а най-голям е при VSA4 (16.71). Минималният брой на шушулките при вълнеста глушина беше на VVA1 (43,90), а максималният беше на VVA2 (46,32 шушулки на растение). Броят на семена в шушулка е в интервала 3.72 (VVA1 – вълнеста глушина) до 5.52 (VSAC3 – обикновен фий). Най-много семена в шушулка от вълнестата глушина има генотип VVA1 (26.37g) и най-малко – генотип VVAC1 (23.59g). Най-високото тегло на 1000 семена в експеримента има обикновен фий генотип VST2 (66.43g). Тези резултати показват, че генотиповете, произхождащи от Австралия, имат по-голям брой шушулки на растение и увеличаващ се брой семена в шушулка. Най-високото тегло от 1000 семена е имал генотип от Източна Сърбия (VST2). Получените резултати от тези характеристики са малко по-високи от тези от Georgieva et al. (2016 г.), и за двата вида фий.

## RESULTS AND DISCUSSION

Very high total precipitation (from March to June 499.5 mm) with lower average monthly air temperatures (Table 2) have caused the extension of vegetation and late of flowering phase during 2014. First year of investigation (2013) had the lowest amount of rainfall with the highest average monthly temperatures in the examined period. Third year of investigation had favourable conditions for the development of the vetch.

Results of investigating are presented in the Table 3. Between common vetches, the smallest number of pods per plant had VSAC3 (9.31), and the highest number was at VSA4 (16,71). The minimum number of pods in hairy vetch was at VVA1 (43,90) and the maximum was at VVA2 (46.32 pods per plant). Seed number per pod was in the interval 3.72 (VVA1 – hairy vetch) to 5.52 (VSAC3 – common vetch). The largest seed of hairy vetch had genotype VVA1 (26.37g), and the smallest genotype VVAC1 (23.59g). The highest 1000 seed weight in experiment had common vetch genotype VST2 (66.43g). These results indicate that genotypes originating from Australia have a greater number of pods per plant and increasing number of seeds per pod. The highest 1000-seed weight had genotype from eastern Serbia (VST2). Obtained results of these features were slightly higher than those from Georgieva et al. (2016), for both types of vetch.

**Таблица 3. Изменчивост на десетте генотипа фий за средни стойности на броя шушулки на растение, брой семена на шушулка, тегло на 1000 семена (g), сурови протеини (%), разтворими протеини (%) и неразтворими протеини**
**Table 3. Variability of ten vetch genotypes for average values of number of pods per plant, seed number per pod, 1000 seed weight (g), crude proteins (%), soluble proteins (%), and insoluble proteins (%)**

| | Years Години | VSA1 | VSA2 | VST2 | VSA4 | VSAC3 | VVA1 | VVA2 | VVT3 | VVAC1 | VVAC2 | $\overline{X}_B$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Брой шушулки на растение<br>Number of pods per plant | 2013 | $10.81^{f}$ | $12.83^{def}$ | $11.30^{f}$ | $18.2^{c}$ | $9.47^{f}$ | $43.3^{b}$ | $45.00^{ab}$ | $44.73^{ab}$ | $45.60^{ab}$ | $44.60^{ab}$ | $28.59^{ns}$ |
| | 2014 | $10.93^{f}$ | $12.63^{ef}$ | $10.73^{f}$ | $16.37^{cd}$ | $9.30^{f}$ | $44.43^{ab}$ | $47.73^{a}$ | $46.73^{ab}$ | $44.07^{ab}$ | $44.60^{ab}$ | $28.75^{ns}$ |
| | 2015 | $10.93^{f}$ | $11.77^{f}$ | $10.20^{f}$ | $15.57^{cde}$ | $9.17^{f}$ | $44.20^{ab}$ | $46.23^{ab}$ | $44.70^{ab}$ | $46.27^{ab}$ | $45.47^{ab}$ | $28.45^{ns}$ |
| | $\overline{X}_A$ | $10.89^{bc}$ | $12.41^{b}$ | $10.74^{bc}$ | $16.71^{a}$ | $9.31^{c}$ | $43.90^{ge}$ | $46.32^{d}$ | $45.40^{de}$ | $45.31^{de}$ | $44.89^{de}$ | |
| Брой семена на шушулка<br>Seed number per pod | 2013 | $5.17^{b}$ | $5.24^{ab}$ | $5.27^{ab}$ | $5.33^{ab}$ | $5.78^{a}$ | $3.67^{c}$ | $3.93^{c}$ | $3.96^{c}$ | $3.61^{c}$ | $4.14^{c}$ | $4.6^{ns}$ |
| | 2014 | $5.40^{ab}$ | $5.30^{ab}$ | $5.23^{ab}$ | $5.31^{ab}$ | $5.53^{ab}$ | $3.73^{c}$ | $3.97^{c}$ | $3.70^{c}$ | $3.84^{c}$ | $3.92^{c}$ | $4.59^{ns}$ |
| | 2015 | $5.33^{ab}$ | $5.32^{ab}$ | $5.12^{b}$ | $5.40^{ab}$ | $5.27^{ab}$ | $3.77^{c}$ | $4.07^{c}$ | $3.77^{c}$ | $3.82^{c}$ | $3.72^{c}$ | $4.57^{ns}$ |
| | $\overline{X}_A$ | $5.30^{a}$ | 5.29a | $5.23^{a}$ | $5.35^{a}$ | $5.52^{a}$ | $3.72^{b}$ | $3.99^{b}$ | $3.81^{b}$ | $3.76^{b}$ | $3.94^{b}$ | |
| Тегло на 1000 семена<br>1000 seed weight (g) | 2013 | $55.53^{b}$ | $63.77^{a}$ | $66.77^{a}$ | $66.40^{a}$ | $65.10^{a}$ | $25.33^{cde}$ | $25.03^{cde}$ | $27.00^{cd}$ | $23.53^{cde}$ | $23.60^{cde}$ | $44.19^{ns}$ |
| | 2014 | $58.27^{b}$ | $65.33^{a}$ | $66.60^{a}$ | $65.97^{a}$ | $66.60^{a}$ | $27.07^{cd}$ | $25.00^{cde}$ | $27.40^{c}$ | $23.87^{cde}$ | $23.43^{cde}$ | $44.95^{ns}$ |
| | 2015 | $55.97^{b}$ | $65.70^{a}$ | 65.93a | $66.73^{a}$ | $65.23^{a}$ | $26.70^{cd}$ | $21.70^{e}$ | $23.30^{de}$ | $23.37^{de}$ | $23.67^{cde}$ | $43.83^{ns}$ |
| | $\overline{X}_A$ | $56.52^{a}$ | $64.93^{e}$ | $66.43^{e}$ | 66.37e | $65.64^{e}$ | $26.37^{b}$ | $23.91^{cd}$ | $25.90^{bc}$ | $23.59^{d}$ | $23.57^{d}$ | |
| Сурови протеини<br>Crude proteins (%) | 2013 | $21.67^{cd}$ | $15.09^{m}$ | $21.88^{bcd}$ | $18.33^{ghij}$ | $19.00^{fgh}$ | $22.77^{abc}$ | $16.53^{kl}$ | $19.31^{fg}$ | $14.43^{jkl}$ | $23.53^{a}$ | $19.55^{b}$ |
| | 2014 | $22.37^{abcd}$ | $16.20^{lm}$ | $22.00^{bcd}$ | $19.61^{fg}$ | $18.73^{ghi}$ | $23.17^{ab}$ | $17.67^{hijk}$ | $20.20^{ef}$ | $18.83^{fghi}$ | $22.10^{bcd}$ | $20.09^{a}$ |
| | 2015 | $22.20^{abcd}$ | $16.03^{lm}$ | $21.17^{de}$ | $18.83^{fghi}$ | $18.20^{ghij}$ | $21.70^{cd}$ | $17.07^{jk}$l | $19.60^{fg}$ | $17.87^{hijk}$ | $21.67^{cd}$ | $19.43^{b}$ |
| | $\overline{X}_A$ | $22.08^{fg}$ | $15.77^{b}$ | $21.68^{g}$ | $18.92^{cd}$ | $18.64^{de}$ | $22.54^{f}$ | $17.09^{a}$ | $19.70^{c}$ | $18.04^{e}$ | $22.43^{fg}$ | |
| Разтворими протеини<br>Soluble proteins (%) | 2013 | $43.86^{gh}$ | $46.90^{def}$ | $34.71^{m}$ | $51.27^{bc}$ | $40.23^{ijk}$ | $34.09^{m}$ | $47.80^{de}$ | $35.87^{lm}$ | $46.30^{efg}$ | $38.17^{kl}$ | $41.92^{a}$ |
| | 2014 | $46.13^{efg}$ | $49.33^{cd}$ | $34.53^{m}$ | $52.40^{ab}$ | $41.23^{ij}$ | $35.40^{m}$ | $48.47^{de}$ | $36.30^{lm}$ | $46.17^{efg}$ | $39.60^{ijk}$ | $42.96^{b}$ |
| | 2015 | $44.03^{gh}$ | $47.77^{de}$ | $35.43^{m}$ | $54.20^{a}$ | $42.03^{hi}$ | $35.63^{m}$ | $51.33^{bc}$ | $35.57^{m}$ | $45.27^{fg}$ | $38.87^{jk}$ | $43.01^{b}$ |
| | $\overline{X}_A$ | $44.67^{e}$ | $48.00^{d}$ | $34.89^{f}$ | $52.62^{a}$ | $41.16^{b}$ | $35.04^{f}$ | $49.20^{d}$ | $35.91^{f}$ | $45.91^{e}$ | $38.88^{c}$ | |
| Неразтворими протеини<br>Insoluble proteins (%) | 2013 | $56.14^{fg}$ | $52.80^{hij}$ | $65.29^{a}$ | $48.73^{kl}$ | $59.77^{cde}$ | $65.91^{a}$ | $52.20^{ij}$ | $64.13^{ab}$ | $53.70^{ghi}$ | $61.83^{bc}$ | $58.05^{a}$ |
| | 2014 | $53.87^{ghi}$ | $50.67^{jk}$ | $65.47^{a}$ | $47.60^{m}$ | $58.77^{de}$ | $64.6^{a}$ | $51.53^{ij}$ | $63.70^{ab}$ | $53.83^{ghi}$ | $60.40^{cde}$ | $57.04^{b}$ |
| | 2015 | $55.97^{fg}$ | $52.23^{ij}$ | $64.56^{a}$ | $45.80^{m}$ | $57.97^{ef}$ | $64.37^{a}$ | $48.67^{kl}$ | $64.43^{a}$ | $54.73^{gh}$ | $61.13^{cd}$ | $56.99^{b}$ |
| | $\overline{X}_A$ | $55.32^{d}$ | $51.90^{e}$ | $65.11^{f}$ | $47.37^{c}$ | $58.83^{b}$ | $64.96^{f}$ | $50.80^{e}$ | $64.09^{f}$ | $54.09^{d}$ | $61.12^{a}$ | |

*Еднаквите букви показват липсата на статистически значими разлики според Fisher LSD теста (p≤0.01). Фактор A - генотип, фактор B - година
*The same letters indicate the absence of statistically significant differences according Fisher LSD test (p≤0.01). Factor A - genotype, factor B - year

Въз основа на изследванията на Alzueta et al. (2001), добивът на суров протеин от обикновен фий е повлиян от сезона на растеж, но не и от растителната зрялост. В нашето изследване имаше променливост през годините и за тази характеристика. По-високите температури по време на първия сезон на растеж предизвикаха напреднал стадий на цъфтеж на растенията. Високото количество валежи през 2014 г. доведе до удължаване на вегетационния период. Суровото съдържание на протеини беше по-високо през втората година (2014 г.), отколкото в първата и третата. Съдържанието на протеини беше по-високо от 22% при трите изследвани генотипове. При един от обикновените генотипове фий (VSA1 – 22,08%) и при два от генотиповете на вълнеста глушина (VVA1 – 22,54% и VVAC2 – 22,43%). Минималното съдържание на протеини имаше обикновен фий VSA2 (15,77%) и вълнеста глушина VVA2 (17,09%).

Тези резултати за съдържание на суров протеин са по-високи от резултатите, получени при изследване на суровите протеинови фракции на обикновен фий в три етапа на събиране на реколтата в продължение на две години (Alzueta et al., 2001). Но и в нашето изследване имаме генотипове с малко по-ниско съдържание на суров протеин.

Важно е да се избере правилното време за косене, за да се използва максималния генетичен потенциал за желаните характеристики. Съществуват различия в химичния състав, свързани с етапа на развитие. Samarah и Ereifej (2009) са установили, че съдържанието на пепел, мазнини, влакнини, протеини и въглехидрати се увеличава между етапа на ПР (семена в пълен размер) и зеленикаво-жълта шушулка (ЗЖ). Същият автор заявява, че по време на фазата на изсушаване е имало увеличение на въглехидратите и редуциращите захари и намаляването на протеините.

Разтворимата протеинова фракция се различава значително през изследваните години (Таблица 2). Най-високото съдържание на разтворими

Based on the research of Alzueta et al. (2001), crude protein yield of common vetch were affected by growing season but not by plant maturity. In our investigation there was variability between years for this feature, too. Higher temperatures during first growing season caused advanced flowering stage of plants. High amount of precipitations during 2014 caused extension of the growing season. The crude protein content was higher in the second year (2014), than in the first and the third.

Protein content was higher than 22% in three investigated genotypes. One of common vetch (VSA1 – 22,08%), and two of hairy vetch genotypes (VVA1 – 22,54%, and VVAC2 – 22,43%). The minimum protein content had common vetch VSA2 (15,77%) and hairy vetch VVA2 (17,09%).

These results of crude protein content was higher than results obtained in investigation of crude protein fractions of common vetch forage at three harvesting stages during two years (Alzueta et al., 2001). But, also in our investigation, we have genotypes with slightly lower crude protein content.

It is important to choose the right time of cutting to utilize the maximum genetic potential for desirable traits. There are differences in the chemical composition in relation to the developmental stage. Samarah and Ereifej (2009) founded that ash, fat, fiber, protein, and carbohydrate content increased between the FS (full-size seed) and greenish-yellow pods (GY) stage. Same author stated that during the desiccation phase, there was an increase in carbohydrate and reducing sugars and a decrease in proteins.

Soluble protein fraction differs significantly in investigated years (Table 2). The highest content of soluble proteins was at genotype VSA4

протеини е при генотип VSA4 (52.62%), а най-ниското при VST2 (34.89%). Тези резултати са в съответствие със сумата от фракции А и В1, получени при изследване на сурови протеинови фракции в изследване на Alzueta et al. (2001).

Средните стойности на неразтворимите протеини също се променят през годините (Таблица 3). Дори четири генотипа имат съдържание на неразтворими протеини по-голямо от 60%, което би било много интересно за по-нататъшни изследвания. Това са един генотип на обикновен фий VST2 (65.11%) и три генотипа на влакнеста глушина: VVA1 (64.96%), VVT3 (64.09%) и VVAC2 (61.12%). Неразтворимите протеини се усвояват по-добре в храносмилателния тракт на животните и тази част е значително по-интересна за по-нататъшни изследвания.

## ИЗВОДИ

Броят шушулки на растение, броят семена на шушулка и тегло на 1000 семена не се променя по години, но значително се различава по генотип. Съдържанието на суров протеин, разтворими протеини и неразтворими протеини са повлияни от годината и генотипа. Четири от изследваните генотипове имат съдържание на неразтворим протеин по-високо от 60%. От тях три са генотипове на влакнеста глушина и един е генотип на обикновен фий. Също така, съдържанието на суров протеин е по-високо в два от тези три генотипа на влакнеста глушина (VVA1 и VVAC2). Тези резултати показват, че влакнестата глушина, поради тези качествени характеристики, може да има значителен дял във фуражното производство. Също така, въвеждането на нов генетичен материал от други области в селекцията би допринесло за подобряване на качеството и генетичната променливост.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Това проучване се подкрепя от Министерството на образованието и науката на Република Сърбия (TR-31057, 2011-2014).

(52.62%), and the lowest was at VST2 (34.89%). These results are in accordance with the sum of fractions A and $B_1$ obtained in investigation of crude protein fractions in investigation of Alzueta et al. (2001).

Average values of insoluble proteins also varied by years (Table 3). Even four genotypes had insoluble protein content greater than 60% which could be very interesting for further research. These were one common vetch genotype VST2 (65.11%), and three hairy vetch genotypes: VVA1 (64.96%), VVT3 (64.09%), and VVAC2 (61.12%). The insoluble proteins are better exploited in the digestive tract of animals, and this fraction is significantly more interesting for further investigations.

## CONCLUSIONS

Number of pods per plant, seed number per pod and 1000 seed weight did not varied by year, but significantly varied by genotype. Crude protein content, soluble proteins and insoluble proteins were affected by year and by genotype. Four of the studied genotypes had the insoluble protein content higher than 60%.

Of these, three were hairy vetch genotypes and one was common vetch genotype. Also, crude protein content was higher in two of these three hairy vetch genotypes (VVA1 and VVAC2). These results indicate that hairy vetch, due to its quality features, could have more significant share in forage production. Also, the introduction of new genetic material from other areas in the selection would contribute to improving the quality and genetic variability.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by Ministry of education and science of the Republic of Serbia (TR-31057, 2011-2014).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES


1. **Alzueta, C., R. Caballero, A. Rebole, J. Trevino, A. Gill**, 2001. Crude protein fractions in common vetch (Vicia sativa L.) fresh forage during pod filling. *J. Anim. Sci*., 79: 2449-2455.
2. AOAC Official Method 2011.11. Protein (crude) in animal feed, forage (plant tissue), grain and oil seed.
http://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285190.pdf
3. **Buyukartal, H.N., H. Colgecen, N.M. Pinar, N. Erdogan**, 2013. Seed coat ultrastructure of hard-seeded and soft-seeded varieties of Vicia sativa. *Turk J. Bot.,* 37: 270-275.
4. **Caballero, R.C., A. Barro, A. Rebolé, M. Arauzo, P.J. Hernaiz**, 1996. Yield components and forage quality of common vetch during pod filling. *Agron. J.,* 88: 797-800.
5. **Crooker, B.A., C.J. Sniffen, W.H. Hoover, L.L. Johnson**, 1978. Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs. *J. Dairy Sci*., 61: 437-447.
6. **Georgieva, N., I. Nikolova, V. Kosev, N. Tahsin**, 2016. Evaluation of genetic differences in vetch cultivars. *Romanian agricultural research*, 33: 2-9.
7. **Hintz, R.W., K.A. Albretch and E.S. Oplinger**, 1992. Yield and quality of soybean forage as affected by cultivar and management practices. *Agron. J*., 84: 796-798.
8. **Licitra, G., T. M. Hernandez and P.J. Van Soest**, 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology*, 57: 347-358.
9. List of recognized varieties of agricultural plants, 2017.
http://www.sorte.minpolj.gov.rs/sites/default/files/rsprilogom_3.pdf
10. **Maxted, N.**, 1995. An Ecogeographical Study of Vicia subgenus Vicia. International Plant Genetic Institute, Rome (It).
11. **Mikić, A., V. Mihailović, B. Ćupina, D. Milić, S. Katić, Đ. Karagić, I. Pataki, P. D'Otavio, M. Kraljević-Balalić**, 2014. Forage yield components and classification of common vetch (Vicia sativa L.) cultivars of diverse geographic origin. *Grass Forage Sci.*, 69: 315-322.
12. **Samarah, N.K and K. Ereifej**, 2009. Chemical composition and mineral content of common vetch seeds during maturation. *Journal of plant nutrition*, 32: 177-186.
13. **Tenopala, J., F.J. Gonzalez and E. Barrera**, 2012. Physiological responses of the green manure Vicia sativa to drought*. Bot. Sci.,* 90: 305-311.
14. **Waldo, D.R. and H.K. Goering**, 1979. Insolubility of proteins in ruminant feeds by four methods. *J. Anim. Sci.*, 49: 1560-1568.
15. **Wohlt, J.E., C.J. Sniffen and W.H. Hoover**, 1973. Measurement of protein solubility in common feedstuffs. *J. Dairy Sci.*, 56: 1052-1057.

*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2), 211-219*
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan*
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

# Наличие на плевели в посеви с люцерна и смески на люцерна при азотно торене

Зорица Биелич*, Весна Крњаја, Виолета Мандич, Драгана Ружич-Муслич, Ненад Мичич, Владимир Живкович, Марина Лазаревич

*Институт по животновъдство, "Автопът" 16, 11080 Земун, Сърбия*
**E-mail: zonesh@gmail.com*

# Weed abundance in alfalfa crop and alfalfa mixtures under nitrogen fertilization

Zorica Bijelić[1]*, Vesna Krnjaja, Violeta Mandić, Dragana Ružić-Muslić, Nenad Mićić, Vladimir Živković, Marina Lazarević

*[1]Institute for Animal Husbandry, Autoput 16, 11080 Zemun, Serbia*

## РЕЗЮМЕ

Цел на изследването е да се определи разпространението на плевели както в посев от люцерна, така и с нейни смески, дали отглеждането ѝ в смески може значително да намали съотношението на плевелите. Освен това, трябва да се определи как азотното торене влияе върху разпространението на плевелни видове. Експериментът включва два бобови (люцерна и еспарзета) и два житни вида (ежова главица и тръстиковидна власатка). Люцерната е посята в чист посев и в смеска с житни треви и еспарзета: люцерна+ежова главица (50:50), люцерна+ежова главица+тръстиковидна власатка (33.3:33.3:33.3) и люцерна+ежова гаавица+тръстиковидна власатка+еспарзета (25:25:25:25). Парцелите са торени с 0, 70, 140 и 210 kgN $ha^{-1}$ на година. Делът на плевели в смеските, в сравнение с посев само с люцерната е намален с 46.8 до 55.6%. Няма значителна разлика измежду смеските в съотношението на плевелите. Азотното торене значително увеличава плевелния натиск в структурата на растителната покривка. Азотното торене

## SUMMARY

The aim of the research was to determine the incidence of weeds in pure alfalfa crop and its mixtures, whether growing in mixtures can significantly reduce the proportion of weeds. Also, it should be determined how N fertilization affects the expansion of weed species.

The experiment included two legume (alfalfa and sainfoin) and two grass species (orchardgrass and tall fescue). Alfalfa was sawn in pure crop and in mixtures with grasses and sainfoin: alfalfa+orchardgrass (50:50), alfalfa + orchardgrass + tall fescue (33.3:33.3:33.3) and alfalfa + orchardgrass + tall fescue + sainfoin (25:25:25:25).

The plots were fertilized with 0, 70, 140 and 210 kgN $ha^{-1}$ per year. Weed proportion in the mixtures, compared to pure alfalfa, was reduced by 46.8 to 55.6%. There was no significant variation among mixtures in the proportion of weeds. Nitrogen fertilization significantly increased weed pressure in canopy structure. N fertilization increased weed

увеличава съотношението на плевелите повече в посева с чиста люцерна, след което в нейните смески с житни треви и еспарзета.

**Ключови думи:** разпространение на плевели, бобово-ливадни смески, азотно торене

## УВОД

Плевелите, като много агресивни растителни видове, са големи конкуренти за светлина, хранителни вещества и вода и присъствието им намалява добива на фураж, качеството на фуража и устойчивостта на културата. Производството на люцерна, особено в периода след посяване, е почти невъзможно без хербициди, в противен случай процентът на плевелите в биомасата при първи откос може да бъде много висок (Spandl et al., 1999) и оцеляването на люцерната е несигурно. Според Hoy et al. (2002), високият дял на плевели в полетата с люцерна намалява гъстотата на растенията на люцерна дори с > 50%. Като се има предвид, че поради голямото замърсяване на почвата и водата, основната задача на селското стопанство днес е успешното производство, като в същото време се намали употребата на хербициди, много учени се опитват да заместят сеитбата на посеви само с житни и бобови растения с техни смески, създаващи конкурентна среда, която ефективно ще намали дела на плевелите. Многокомпонентните асоциации могат да доведат до по-голямо допълване на екологичните ниши и до по-добро използване на почвите, водата и светлинните ресурси, като по този начин намаляват възможностите за появяване на плевели (Wilsey and Polley, 2002). В проучването на Surault et al. (2014), съотношението на плевели в смеските от люцерна и житни треви се намалява с 75-90%, в сравнение с люцерна без примеси. При съставянето на смески е много важно да се изберат подходящи видове, в зависимост от

proportion more in pure alfalfa then in their mixtures with grasses and sainfoin.

**Key words:** weed abundance, grass-legume mixtures, nitrogen fertilization

## INTRODUCTION

Weeds, as a very aggressive plant species, are great competitors for light, nutrients and water and their presence reduces forage yield, forage quality and persistence of the crop.

Alfalfa production, particularly in the period after planting, is almost impossible without herbicides otherwise proportion of weeds in the biomass of first cut can be very high (Spandl et al., 1999) and survival of alfalfa is uncertain.

According to Hoy et al. (2002), high proportion of weeds in alfalfa fields reduces alfalfa plant densities even by > 50%. Considering that due to the high pollution of soil and water, the main task of agriculture today is successful production while reducing the use of herbicides, many scientists were trying to substitute sowing of pure crops of grass and legume with their mixtures and therefore create a highly competitive environment that will effectively reduce the proportion of weeds.

Multispecies communities may express greater niche complementarity and make better use of soil, water, and light resources, thus reducing the opportunity for weeds to establish (Wilsey and Polley, 2002).

In the study of Surault et al. (2014) the proportion of weeds in grass-legume mixtures is reduced by 75-90% compared to pure alfalfa. When compiling mixtures it is very important to choose right species depending on the sward purpose.

целта на тревостоя. Въпреки това характеристиките на видовете могат да повлияят на инвазивността на плевелите. Някои учени твърдят, че идентичността на вида е по-важна от броя на видовете в сместа (Emery and Gross, 2007; Sanderson et al., 2012). Sanderson et al. (2013) твърдят, че ежовата главица има много отрицателно въздействие върху разпространението на плевелите. Също така, Surault et al. (2014) заключиха, че многогодишен райграс и фестулолиум в смеските са двата вида житни треви, които най-много ограничават растежа на плевелите, докато най-висок процент плевели се наблюдава в смески с овсига и тимотейка. От гледна точка на функционалните групи Roscher et al. (2009) установяват, че наличието на фуражни треви има отрицателно въздействие, докато наличието на бобови култури има положително въздействие върху броя и плътността на плевелите. В проучвания на Picasso et al. (2008), смеските без най-много видове, потискащи плевелите имат 6.4 пъти повече плевелна биомаса, отколкото смеските с най-много видове, потискащи плевелите.

Целта на изследването е да се определи честотата на разпространение на плевелите в самостоятелни посеви люцерна и в смеските ѝ с житни и бобови фуражни треви, и дали отглеждането в смески може значително да намали количеството плевели. Тъй като азотното торене води до промени в структурата на смеските, е необходимо да се определи как то влияе върху разпространението на плевелите.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитът е проведен в експерименталното поле в Института за животновъдство Земун, Белград (44°49'N, 20°17'E, кота 96 masl). Изследваната почва е дълбока глинеста с pH 7,08. Средната годишна температура е 12.8 °C, а средните годишни валежи са 640.9 mm. Преди залагането на опита площта е използвана като обработваема земя. Опитът е заложен по блоко-

However, species characteristics can influence weeds invasiveness. Some scientists state that identity of the species is more important than the number of species in the mixture (Emery and Gross, 2007; Sanderson et al., 2012). Sanderson et al. (2013) claim that orchardgrass has a very negative impact on the spread of weeds.

Also, Surault et al. (2014) have concluded that perennial ryegrass and festulolium in mixtures are the two grass species that most limit the growth of weeds, while the highest proportion of weeds is observed in mixtures with brome and timothy. From the perspective of functional groups, Roscher et al. (2009) have concluded that the presence of grass has a negative impact, whereas the presence of legumes has a positive impact on the number and density of weed plants. In studies of Picasso et al. (2008), mixtures without the most weed suppressive species had by 6.4 times more weed biomass than the mixtures with the most weed suppressive species.

The aim of the research was to determine the incidence of weeds in pure alfalfa crop and its mixtures with grasses and legumes, whether growing in mixtures can significantly reduce the proportion of weeds. Since nitrogen fertilization leads to changes in the mixture structure, it is necessary to determine how it affects the expansion of weed species.

## MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed at the experimental field in Institute for Animal Husbandry, Zemun, Belgrade (44°49′N, 20°17′E, elevation 96 masl). The study soil was deep silty clay loam of pH of 7.08. Mean annual temperature was 12.8°C and mean annual precipitation 640.9 mm. Prior to the establishment of trial, the site had been used as arable land. The experimental design was a

вия метод, в четири повторения с големина на опитната парцела 10 $m^2$. Опитът включва два вида бобови растения (люцерна и еспарзета) и два вида житни треви (ежова главица и тръстиковидна власатка). Люцерната е посята самостоятелно и в смески с житни треви и еспарзета. Процентът на всички видове в смеските е следният: люцерна + ежова главица (50:50), люцерна + ежова главица + тръстиковидна власатка (33,3: 33,3: 33,3) и люцерна + ежова главица + тръстиковидна власатка + еспарзета (25:25:25:25), За съществуващите условия е препоръчана следната гъстотата на засяване на люцерна, ежова главица, тръстиковидна власатка и еспарзета: 25 kg $ha^{-1}$ за люцерна, 35 kg $ha^{-1}$ за житни треви и 180 kg $ha^{-1}$ за еспарзета. Парцелите са наторени с 0, 70, 140 и 210 kgN $ha^{-1}$ на година като $NH_4N0_3$. Една половина от N дозите са приложени в начало на вегетация и втората половина след първи откос.

Парцелите са окосявани всеки път, когато зрелостта на тревната покривка достигне фаза 1/3 цъфтеж, за да се определи производството на растителна маса. Преди всяко косене са вземани ръчно проби от биомасата, от площ 1 $m^2$. Пробите са разделени по растителни видове, в лаборатория, сушени са при $60^o$, в продължение на 72 часа и са претегляни. За отчитане процентът на плевелите, са изчислени относителните дялове на всеки вид.

Анализът на отклоненията е извършен чрез използване на общ линеен модел в статистическия програмен пакет SPSS (SPSS 20.0). Тест Shapiro-Wilk е използван за да се установи, дали наблюденията са правилно разпределени, а тестът на Levene - за тестване хомогенността на вариациите. Сравненията по двойки са проведени с LSD тест при вероятностно ниво 0.05.

randomized block with four replications and plot size of 10 $m^2$. The experiment included two legume (alfalfa and sainfoin) and two grass species (orchardgrass and tall fescue). Alfalfa was sown in pure crop and in mixtures with grasses and sainfoin.

Proportion of all species in the mixtures were even: alfalfa+orchardgrass (50:50), alfalfa+orchardgrass+tall fescue (33.3:33.3:33.3) and alfalfa+orchardgrass+tall fescue+sainfoin (25:25:25:25). Sowing density for alfalfa, orchardgrass, tall fescue and sainfoin were recomended for existing conditions: 25kg $ha^{-1}$ for alfalfa, 35 kg $ha^{-1}$ for grasses and 180 kg $ha^{-1}$ for sainfoin.

The plots were fertilized with 0, 70, 140 and 210 kgN $ha^{-1}$ per year as $NH_4$ $N0_3$. One half of N doses were applied at the beginning of vegetation and second half after the first cut.

Plots were cut each time the canopy maturity reached one third inflorescence of alfalfa plants to determine herbage production. Prior to each cut, biomass was sampled by hand – cutting from the surface of 1$m^2$. Samples were separated into different plant species in the laboratory, dried at 60° for 72 hours, and weighed. To assess the weed proportion, relative proportions of each species were calculated.

Analyses of variance were performed using General linear model in the SPSS statistical software package (SPSS 20.0). Shapiro-Wilk test was used to determine wether or not the observations were normally distributed and Levene's test for testing homogeneity of variances. Pairwise comparisons were conducted using LSD test at the probability level 0.05.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Средните съотношения на плевелите в чистата люцерна и нейните смески с житни треви и

## RESULTS AND DISCUSSION

The average weed proportions in pure alfalfa and their mixtures with grasses and sainfoin under different lavel

еспарзета при различни нива на N торене са представени в Таблица 1. Съотношението на плевелите в събраната биомаса е средно от 1.9 до 8.0%. Смеските значително намаляват наличието на плевели, в сравнение с чистата люцерна от 46.8 до 55.6%. В изследванията на Surault et al. (2014), честотата на плевелите, в двукомпонентни тревни смески на люцерна с фуражни треви, също са намалени, но с по-голям процент, в Somme-Vesle 44 до 90% и в Lusignan от 79 до 98%. Също така, други проучвания показват подобни резултати (Kirwan et al., 2007; Sanderson et al., 2012). Няма значителни разлики между смеските в съотношението на плевелите. В някои резултати може да се установи, че изобилието и равновесието на видовете, като много важен компонент на видовото разнообразие, може да намали плевелната инвазия (Emery and Gross, 2007). В нашите открития този факт е очевиден само между монокултурата и смеските, независимо от броя на видовете и добива.

of N fertilization are presented in Table 1. The proportion of weeds in the harvested biomass averaged from 1.9 to 8.0 %.

Mixtures significantly reduced presence of weeds in comparison with pure alfalfa by 46.8 to 55.6%. In research of Surault et al. (2014), frequencies of weeds, in binary alfalfa grass mixtures, were also reduced but in greater percentage, in Somme-Vesle 44 to 90% and in Lusignan 79 to 98%.

Also, other studies have shown similar results (Kirwan et al., 2007; Sanderson et al., 2012). There was no significant variation among mixtures in the proportion of weeds. In some results, it can be found that species richness and eveness as a very important component of species diversity could reduce the weed invasion (Emery and Gross, 2007).

In our findings this fact is evident only between monoculture and mixtures, regardless of the species number and contribution.

**Таблица 1. Процент на плевелите при монокултури от люцерна и смески от люцерна с и без азотно торене (средно за пет години)**
**Table 1. Weed proportion in alfalfa monoculture and alfalfa mixtures with and without nitrogen fertilization (average over five years)**

| Варианти / Variants | N торене / N fertilization | | | | Средно Average canopy |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 70 | 140 | 210 | |
| Л/A | 3.93 | 4.87 | 6.80 | 8.00 | 5.90[a] |
| Л+Е / A+O | 2.33 | 2.60 | 3.62 | 3.71 | 3.10[b] |
| Л+Е+ТВ / A+O+TF | 2.11 | 2.54 | 3.77 | 4.14 | 3.14[b] |
| Л+ Е + ТВ + Е / A+O+TF+S | 1.90 | 2.48 | 2.62 | 3.50 | 2.62[b] |
| Средно торене/Average fertilization | 2.56[b] | 3.12[b] | 4.20[a] | 4.83[a] | |
| Ниво на значимост/Level of significance | | | | | |
| Смески/Mixture | | | | ** | |
| Торене/Fertilization | | | | ** | |
| Взаимодействие/Interaction | | | | ns | |

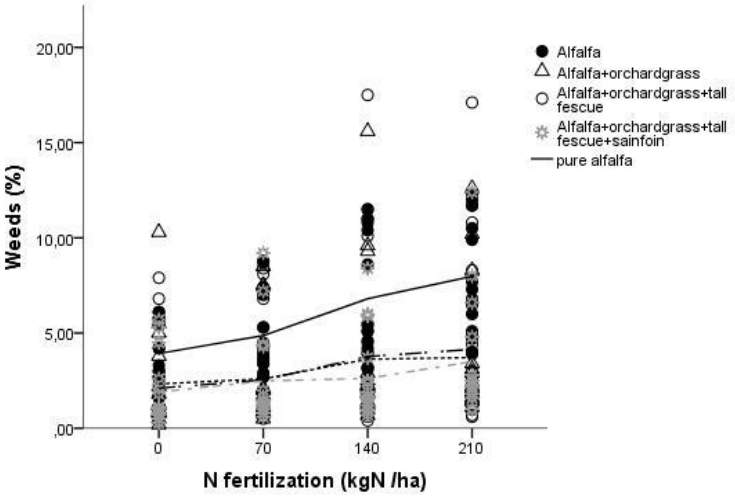
Л-люцерна/A-alfalfa; Е-ежова главица/O-orchardgrass; ТВ-тръстиковидна власатка/TF-tall fescue; Е-еспарзета/S-sainfoin; без значимост/ns- non significant; **значими при $p \leq 0.01$/**-significant at $p \leq 0.01$

N торенето значително увеличи процента на плевелите в чистата люцерна и нейните смески. При отглеждане без азот има най-малко плевели в

N fertilization significantly increased proportion of weeds in pure alfalfa and their mixtures. Treatment without nitrogen had the least weeds in

биомасата. Повишеното торене с N показва значително увеличение на плевелите в структурата на тревната покривка. Също така, Blackshaw et al. (2003) е установил, че добавянето на азот стимулира растежа на плевелите, също както и растежа на културите. N торенето увеличава съотношението на плевелите в чистата люцерна, както и в смеските ѝ с житни треви и еспарзета (Фигура 1).

biomass. The high N fertilization showed significant increase of weed abundance in canopy structure. Likewise, Blackshaw et al. (2003) have shown that added nitrogen promotes weed growth same as crop growth. N fertilization increases weed proportion more in pure alfalfa then in its mixtures with grasses and sainfoin (Figure 1).




**Фиг. 1. Съотношение на плевелите при чиста люцерна и нейни смески спрямо азотно торене**
**Fig. 1. Weeds proportion in pure alfalfa and their mixtures vs. nitrogen fertilization**

Това може да се обясни с факта, че N торенето, в смески, благоприятства растежа на житните треви, които са големи конкуренти за светлина, вода и почва, и предотвратяват нахлуването на плевелите, заемайки техния обхват. Comakli et al. (2005) посочват подобни открития в изследванията си.

През годините, количеството плевели в посевите се променя. През първата година след засяването, съотношението на плевелите е по-високо в смесите, отколкото в чистата култура. През втората година съотношението на плевелите в смеските е намаляло значително под процента в чистата люцерна и е останало ниско през годините. При чистата люцерна, съотношението на плевелите е било най-ниско през втората

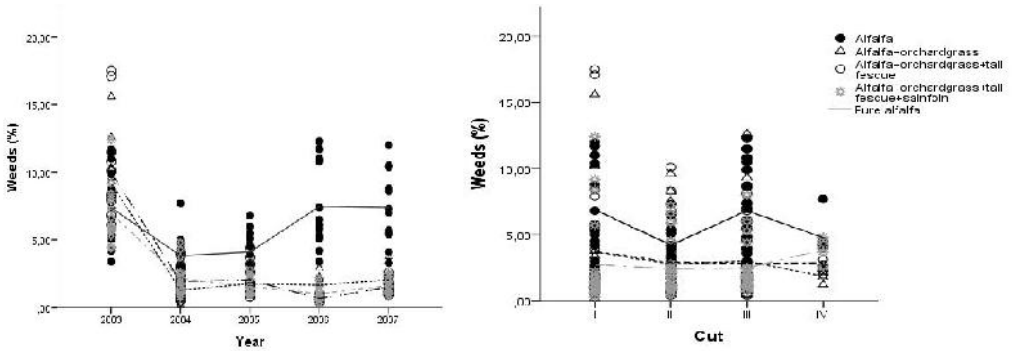
This could be explained by the fact that N fertilization, in mixtures, favours the growth of grasses that are great competitors for light, water and soil and they occupy scope preventing weeds to invade. Comakli et al. (2005) state similar findings in their research.

During the years, weed abundance changed between crops. In the first year after sowing, weed proportion was higher in mixtures than in pure crop. In the second year, weed proportion in mixtures decreased significantly under proportion in pure alfalfa and remained low throughout the years. In pure alfalfa crop, weed proportion was the least in second production year. In each subsequent year

година на производство. Във всяка следваща година е било по-високо (Фигура 2). Противно на нашите открития, Ergon et al. (2016) твърди, че плевелите през първата година съставляват много малка част от добива на DM (сухо вещество), докато през втората и третата година те увеличават своя принос за сметка на всички засети видове. Делът на плевелите в биомасата от смески е постоянен при всяка коситба. В чистата люцерна той показва значи-телни разлики, при първа и трета косит-би плевелите имат по-голям дял, в сравнение с втората и четвъртата коситба. Подобно на нашите резултати, Surault et al. (2014) доказва, че няма разлика в изобилието на плевели в биомасата при смеските между коситбите. При чистата люцерна има значително по-висок дял на плевели в биомасата и в зависимост от годината, той се променя при коситбите.

it was higher (Figure 2). Contrary to our findings, Ergon et al. (2016) claim that weeds in the first year made up very small proportion of the DM yield, while in the second and third year they increased their contribution at the expense of all the sown species.

Share of weeds in mixtures' biomass had been constant per cuts. In pure alfalfa it showed significant differences, the first and third cut had higher proportion of weeds in comparison with the second and fourth cut. Similar as in our results, Surault et al. (2014) have concluded that there is no difference in weed abundance in mixture biomass between cuts. Pure alfalfa had significantly higher share of weed in biomass and depending on the year it fluctuated per cuts.




**Фиг. 2. Съотношение на плевелите при чистата люцерна и нейни смески за години и за коситби**
**Fig. 2. Weeds proportion in pure alfalfa and their mixture per years and per cuts**

## ИЗВОДИ

Според анализираните данни можем да заключим, че смеските на люцерна с житни треви значително намалява наличието на плевели, в сравнение с чистата люцерна от 46.8 до 55.6%. Няма разлика между смеските в количеството плевели, независимо от характеристиките на видовете, броя и добива. Азотното торене увеличава плевелите, повече в монокултурата от люцерна, отколкото в нейните смески, което може да се обясни с факта, че N

## CONCLUSIONS

According to analysed data we can conclude that alfalfa-grass mixtures significantly reduced presence of weeds in comparison with pure alfalfa by 46.8 to 55.6%. There was no difference between mixtures in weed abundance regardless the species characteristics, number and contribution.

Nitrogen fertilization increased weeds preasure more in alfalfa monoculture then in their mixtures, what could be explained

торене благоприятства конкурентната способност на житните треви за фураж. Нашето проучване показва, че използването на житно-бобови смески е полезен начин за преодоляване на инвазията на плевелите и поддържане на структурата на смеските.

by the fact that N fertilization favours competitive ability of grasses for resources. Our study shows that use of grass-legume mixtures is useful way to overcome weed invasion and maintain mixture structure.


## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите благодарят на Министерство на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, което финансира това изследване като част от проект TR 31053.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia who funded this research as part of the project TR 31053.


## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES


1. **Blackshaw, R.E., R. N. Brandt, H.H. Janzen, T. Entz, C.A. Grant, D.A. Derksen**, 2003. Differential response of weed species to added nitrogen. *Weed Science*, 51(4), 532-539.
2. **Comakli, B., O. Mentese and A. Koc**, 2005. Nitrogen fertilizing and pre-anthesis cutting stage improve dry matter production, protein content and botanical composition in meadows. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Scienc,* 55, 125-130.
3. **Emery, S.M. and K.L. Gross**, 2007. Dominant species identity, not community evenness, regulates invasion in experimental grassland plant communities. *Ecology*, 88(4), 954-964.
4. **Ergon, A., L. Kirwan, M. A. Bleken, A.O. Skjelvag, R.P. Collins, O.A. Rognli,** 2016. Species interactions in a grassland mixture under low nitrogen fertilization and two cutting frequencies: 1. dry-matter yield and dynamics of species composition. *Grass and Forage Science*, 71, 667-682.
5. **Hoy, M.D., K.J. Moore, J.R. George, E.C. Brummer**, 2002. Alfalfa yield and quality as influenced by establishment method. Agronomy Journal, 94, 65-71.
6. **Kirwan, L., A. Lluscher, M. T. Sebastia, J. A. Finn, R. P. Collins, C. Porqueddu, A. Helgadottir, Baadshaug O. H., Brophy C., Coran C., Dalmannsdottir S., Delgado I., Elgersma A., Fothergill M., B. E. Frankow-Lindberg, P. Golinski, P. Grieu, A. M. Gustavsson M. Hoglind, O. Huguenin-Elie, C. Iliadis, M. Jorgensen, T. Kadziuliene Zkaryotis., T. Lunnan, M. Malengier, S. Maltoni, V. Meyer, D. Nyfeler, P. Nykanen-Kurki, J. Parente, H. J. Smit, U. Thumm, J. Connolly**, 2007. Evenness drives consistent diversity effects in intensive grassland systems across 28 European sites. *Journal of Ecology*, 95, 530-539.
7. **Picasso, V., E.C. Brummer, M. Liebman, P.M., Dixon, B.J. Wilsey,** 2008. Crop species diversity affects productivity and weed suppression in perennial polycultures under two management strategies. *Crop Science*, 48, 331-342.
8. **Roscher, C., H. Bessler, Y.Oelmann, C. Engels, W. Wilcke E.D. Schulze,** 2009. Resources, recruitment limitation, and invader species identity determine pattern of spontaneous invasion in experimental grasslands. *J. Ecol.*, 97:32-47.
9. **Sanderson, M.A., G.Brink, L. Ruth, R. Stout**, 2012. Grass–legume mixtures suppress weeds during establishment better than monocultures. *Agronomy Journal*, 104(1), 36-42.

10. **Sanderson, M.A., R. Brink, R. G., Stout, L. Ruth**, 2013. Grass–legume proportions in forage seed mixtures and effects on herbage yield and weed abundance. *Agronomy Journal*, 105(5), 1289-1297.
11. **Spandl E., J.J., Kells, O.B. Hesterman**, 1999. Weed invasion in new stands of alfalfa with perennial forage grasses and an oat companion crop. *Agronomy Journal*, 39, 1120-1124.
12. **Surault, F., B. Julier, C. Huyghe**, 2014. Mixed cropping of grasses and alfalfa to rduce weed growth. *Grassland Science in Europe*, 19, 330-332.
*13.* **Wilsey, B. J. and H. W. Polley**, 2002. Reductions in grassland species evenness increase dicot seedling invasion and spittle bug infestation. *Ecology Letter,* 5, 676-684.

*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2), 220-239*
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan*
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

# Възможност за подобряване на плодородието на почвата: култивиране на смеска от зърнено-бобови култури в комбинация с *Triticum aestivum* и *Pisum sativum* var. *Speciosum*

Антонин Кинтъл[1]*, Джейкъб Елбл[2], Ян Неделник[1]

[1]*Селскостопански изследвания ООД Трубско, Република Чехия*
[2]*Катедра по геология и почвознание, Факултет по горско стопанство и лесовъдство, Университет Мендел, Бърно, Република Чехия*
**E-mail: kintl@vupt.cz*

# The potential for improvement of soil fertility: Cultivation of mixed legume-cereal cropping system in combination of *Triticum aestivum* and *Pisum sativum* var. speciosum

Antonín Kintl[1]*, Jakub Elbl[2], Jan Nedělník[1]

[1]*Agriculture Research, LtD. Troubsko, The Czech Republic*
[2] *Department of Geology and Pedology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, The Czech Republic*

## РЕЗЮМЕ

Цел на настоящото изследване е да се опишат възможните разлики в концентрацията на въглерод, азот, количеството микробна биомаса и микробната активност в почвена проба, взета от кореновата зона на зимна пшеница – *Triticum aestivum* (самостоятелна култура, SC-WW), зимна пшеница (смесено отглеждане на култури; IC-WW) със зимен грах – *Pisum sativum* var. Speciosum (IC-WP). Пробите от ризосферата са взети във фаза на цъфтеж на зимна пшеница (GS 61-69) и зимен грах (GS 61-69). Най-високо съдържание на TC е открито в почвените проби с IC, около 200% в сравнение с пробите от почва при SC-WW. Култивирането на смесни култури (IC) също подпомага микробната активност и развитието на микробните съобщества в зоната на ризосферата, което се доказва от най-голямата аерация на

## SUMMARY

The aim of this study is to describe potential differences in concentration of TC, TN, amount of microbial biomass and microbial activity in soil sample taken from root zone of Winter Wheat – *Triticum aestivum* (Sole crops; SC-WW), Winter Wheat (Intercrops; IC-WW) with Winter Pea – *Pisum sativum* var*. Speciosum* (IC-WP).

The samples of rhizosphere soil were taken during flowering growth stages of Winter Wheat (GS 61-69) and Winter Pea (GS 61-69). The significant highest content of TC was found in soil samples from IC, about 200 % in comparison with the soil samples from SC-WW.

Cultivation of IC also supported microbial activity and development of microbial communities in rhizosphere zone documented by the highest soil respiration

почвата и количество на микробна маса във вариантите с ІС. Измерените стойности показват положителното въздействие на смесената култура върху отлагането на ТС в ризосферата и състоянието на микробните съобщества в ризосферата.

**Ключови думи:** зимна пшеница, зимен грах, смесени култури, коренови ексудати, ризосфера, микробните съобщества

and amount of microbial biomass in IC variants. Measured values indicate a positive effect of mixed culture on deposition of TC in rhizosphere soil and state of microbial communities in rhizosphere.

**Key words:** winter wheat, winter pea, mixed culture, roots exudates, rhizosphere, microbial communities

## УВОД

Смесеното отглеждане може да бъде определено като система, в която два или повече вида култури се отглеждат на едно и също място в сезона на вегетация (Hauggaard-Nielsen et al., 2008; Ofori and Stern, 1987; Brooker et al., 2015). Смесването на видове в системите за култивиране може да доведе до редица ползи, изразени в различни пространствени и времеви мащаби, от краткосрочно нарастване на добива и качеството на културата до дългосрочна устойчивост на агроекосистемата (Malezieux et al., 2009). За да могат земеделските системи да останат продуктивни, ще е необходимо да се попълват резервите от хранителни вещества, които се премахват или биват изгубени в почвата. В случая на азота (N), внасянето му в селскостопански системи може да се получи от атмосферния $N_2$ чрез биологична $N_2$ фиксация (Peoples et al., 1995). Биологичната азотфиксация е важен аспект на устойчивото и екологосъобразно производство на храни и дългосрочната производителност на културите (Kessel and Hartley, 2000). Зърнено-бобовите култури могат да покрият нуждите си от азот чрез биологична фиксация на атмосферния $N_2$ (Hauggaard-Nielsen et al., 2001; Trenbath, 1976) и следователно се конкурират по-малко за почвен $N_{min}$ при смесеното отглеждане със житни култури (Jensen, 1996). Успехът на система за смесено отглеждане на култури зависи първоначално от ефективната

## INTRODUCTION

Intercropping can be broadly defined as a system where two or more crop species are grown in the same field at the same time during a growing season (Hauggaard-Nielsen et al., 2008; Ofori and Stern, 1987; Brooker et al., 2015). Mixing species in cropping systems may lead to a range of benefits that are expressed on various space and time scales from a short-term increase in crop yield and quality to longer-term agroecosystem sustainability (Malezieux et al., 2009).

For farming systems to remain productive, it will be necessary to replenish the reserves of nutrients which are removed or lost from the soil. In the case of nitrogen (N), inputs into agricultural systems may be derived from atmospheric $N_2$ via biological $N_2$ fixation (Peoples et al., 1995). Biological nitrogen fixation is an important aspect of sustainable and environmentally friendly food production and long-term crop productivity (Kessel and Hartley, 2000).

Grain leguminous can cover their nitrogen demand from biological fixation of atmospheric $N_2$ (Hauggaard-Nielsen et al., 2001; Trenbath, 1976) and therefore, they compete less for soil $N_{min}$ in intercropping with cereals (Jensen, 1996).

The success of intercrop farming systems depends initially on effective nitrogen fixation and more importantly, on

азотфиксация и най-вече от последващия пренос на азот към други култури, различни от бобови (Stern, 1993). Преносът на азот се извършва от растения с по-високо съдържание на N съединения, като например бобовите растения, към растения с по-ниско съдържание на N, и следователно с по-голяма нужда от него. (Carlsson and Huss-Dannell, 2014). Ризосферата обхваща милиметрите на почвата, обграждаща корените на растението, където възникват сложни биологични и екологични процеси (Bais, 2006).

Коренови ексудати се отделят от активни корени по време на растежа, като оказват многобройни въздействия върху растителната и почвена система (Gregory, 2006). Въпреки че количествата органични съединения, които се отделят от корените, не са големи, рядко надвишаващи 0.4% от фотосинтезирания въглерод (Fornara, 2013), тъй като кореновите ексудати са комплексни смеси въглеродосъдържащи съединения, включително въглехидрати, аминокиселини, органични киселини, фенолни съединения, мастни киселини, стероли, витамини, ензими, пурини/нуклеозиди, както и неорганични молекули, като например $HCO_3$, OH- и H + (Dakora and Phillips, 2002). Те оказват много силно влияние върху почвените микроорганизми и могат да имат значително влияние върху наличието на хранителни вещества в растенията (Fornara, 2013). Съединенията, отделяни от корените на растенията по време на растежа, могат да съставляват висок процент въглерод и азот в подземната част на растението (BGP) и следователно те влияят върху оборота на органичните вещества в почвата и наличието на хранителни вещества чрез стимулиране на почвените микроорганизми (Wichern, 2007). Кореновите ексудати, които се отделят в зоната на ризосферата от корените на растенията, влияят върху съдържанието на въглерод (TC) и азот (TN) в почвата.

subsequent transfer of nitrogen to the non-legume (Stern, 1993).

Nitrogen transfer is carried out from plants with higher content of N compounds such as leguminous plants into plants with a lower N content and thus with increased demand for it. (Carlsson and Huss-Dannell, 2014). The rhizosphere encompasses the millimetres of soil surrounding plants roots where complex biological and ecological processes occur (Bais, 2006).

Root exudates are secreted by active roots during plant growth, and they have multiple effects in the plant-soil system (Gregory, 2006). Although the quantities of organic compounds exuding from roots are not large, seldom exceeding 0.4% of the photosynthesized carbon (Fornara, 2013), because root exudates are complex mixtures of carbon-containing compounds including carbohydrates, amino acids, organic acids, phenolic compounds, fatty acids, sterols, vitamins, enzymes, purines/nucleosides as well as inorganic molecules, such as $HCO_3$, $OH^-$, and $H^+$ (Dakora and Phillips, 2002).

They do exert a very strong influence on the soil microorganisms and may be significant in affecting plant nutrient availability (Fornara, 2013).

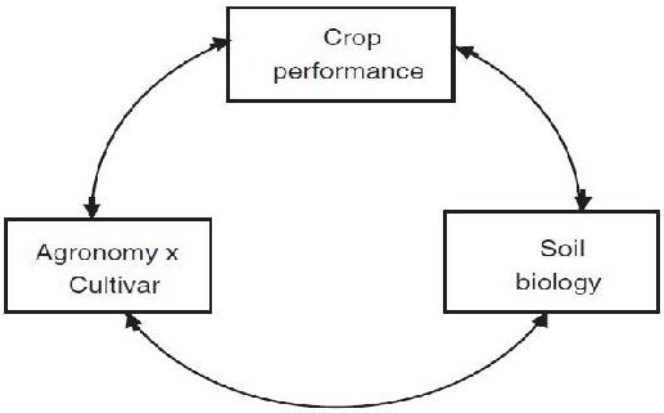
Compounds released by plant roots during growth can make up a high proportion of below-ground plant (BGP) carbon and nitrogen, and therefore they influence soil organic matter turnover and plant nutrient availability by stimulating the soil microorganisms (Wichern, 2007).

Root exudes, which are released in to rhizosphere zone by plant roots, affect content of TC and TN in soil.

Тези хранителни вещества са необходими за почвените микроорганизми, защото представляват източник на енергия и основна съставна част за тяхната биомаса. Съставът на кореновия ексудат е променлив (сложна смес от захари, витамини, аминокиселини и т.н.) в зависимост от видовете растения. Следователно, различни видове растения имат различно влияние върху микробните съобщества в ризосферата, а така и върху почвеното плодородие (Hauggaard-Nielsen et al., 2008; Ofori and Stern, 1987 and Brooker et al., 2015). Разнообразието от микроби, свързани с корените на растенията, е огромно, от порядъка на десетки хиляди видове (Berendsen, 2012). Известно е, че наличието на въглерод в ризосферата е много по-високо, отколкото в основната почва (Cheng, 1996). Кореновите ексудати играят важна роля в мобилизирането на ограничените разтворими хранителни вещества в ризосферата (Carvalhais, 2011). Добивът на културите зависи от извличането на достатъчно хранителни вещества и вода от почвата (Bengough, 2009). Важно в селското стопанство, е как взаимодействията между управлението и почвената биология влияят върху производителността на културите (Фигура 1). Корените са неразделна част от почвената биология (Watt, 2006).

These nutrients are necessary for soil microbes because they represent source of energy and basic compound of their biomass. The root exudate composition is variable (complex mixture of sugars, vitamins, amino acids etc.) depending on the plant species.

Therefore, different species of plants have different influence on microbial communities in rhizosphere soil and thus on soil fertility (Hauggaard-Nielsen et al., 2008; Ofori and Stern, 1987 and Brooker et al., 2015). The diversity of microbes associated with plant roots is enormous, in the order of tens of thousands of species (Berendsen, 2012). It is widely known that the carbon availability in the rhizosphere is much higher than in the bulk soil (Cheng, 1996). Root exudates play a major role in the mobilization of sparingly soluble nutrients in the rhizosphere (Carvalhais, 2011). Crop yield depends on extracting sufficient nutrients and water from the soil (Bengough, 2009). What is important agriculturally is how the interactions between management and soil biology affect the performance of crops (Figure 1). Roots are thus an integral component of the soil biology (Watt, 2006).




**Фиг. 1. Взаимодействията между управление, производителност на културите и почвената биология могат да се използват за подобряване на земеделските системи (Watt, 2006)**

**Fig. 1. Interactions among management, crop performance, and soil biology can be used to improve farming systems (Watt, 2006)**

Микробната биомаса на почвата съдържа малка част от общото органично вещество в почвата, но е по-динамична от общото органично вещество в почвата (Lupwayi, 1998). Микроорганизмите, свързани с растения, изпълняват важни функции за растежа и здравето на растенията. Различни механизми участват в потискането на растителните патогени, което често е непряко свързано с растежа на растенията (Berg, 2009). Използването на продуктите за локално окисляване предизвиква най-малко преходно увеличение на почвената биомаса, но устойчивото увеличение зависи от състоянието на естествената почвена биомаса, потока на други метаболити от почвата в ризосферата и от водните връзки в почвата (Lynch, 1991). Корените също са отговорни за смекчаване на парниковите газове, като съхраняват голямо количество C в почвите (Fageria, 2013). Почвеният C се получава предимно от растения, пряко или непряко. Въпреки че атмосферните влияния могат да се дължат на физически и химически влияния, повечето процеси на атмосферни влияния включват растения, предимно корени или микробни активности, които зависят от коренния C (Raven, 2001). Oelbermann и Echarte (2010) потвърждават, че култивирането на смесени култура има положителен ефект върху биологичните и химичните свойства на почвата след една година на употреба.

Основната цел на това изследване е да се намерят и количествено определят потенциалното въздействие от смесено култивиране върху съдържанието на основните хранителни вещества в почвата (C и N), количеството микробна биомаса и микробната активност в почвата.

Soil microbial biomass comprises a small proportion of total soil organic matter but it is more dynamic than total soil organic matter (Lupwayi, 1998). Plant-associated microorganisms fulfil important functions for plant growth and health. Diverse mechanisms are involved in the suppression of plant pathogens which is often indirectly connected with plant growth (Berg, 2009). Utilization of rhizodeposition products induces at least a transient increase in soil biomass but a sustained increase depends on the state of the native soil biomass, the flow of other metabolites from the soil to the rhizosphere and on the water relations in the soil (Lynch, 1991). Roots are also responsible for mitigation of greenhouse Gases by storing a large amount of C in the soils (Fageria, 2013).

Soil C is predominantly derived from plants, directly or indirectly. Whilst weathering may be due to physical and chemical influences, most weathering processes involve plants, primarily roots, or microbial activities that depend on root-derived C (Raven, 2001). Oelbermann and Echarte (2010) confirmed that the cultivation of mixed culture had positive effect on biological and chemical properties of soil after the one year of use.

The main objective of this study was to find and quantify the potential effects of inter (mixed) crop cultivation on content of basic soil nutrients (C and N), the amount of microbial biomass and on microbial activity in soil.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

*Полеви опит*

Изследваната площ се намира в района на Оломоуц, в източната част на Република Чехия, на 8 км северно от град Простейов, в рамките на селскостопанския регион. Експерименталните обекти са

## MATERIAL AND METHODS

*Field Experiment*

The studied area is located in the Olomouc region, in the east of Czech Republic, 8 km north from the city Prostějov, within agricultural region. Experimental sites are situated in the protective zone of drinking water source

разположени в защитната зона на водоизточник "Kvartér řeky Moravy". Според Quitt (1975) това е климатичен регион T2, където годишните климатични средни валежи са 350-400 mm през сезона на вегетация, 200-300 mm валежи през зимата и 8-9 градуса средна годишна температура на въздуха. Експериментът е направен върху чернозем, умерен, льос без скелет.

Полевият експеримент е проведен през 2012 г. с четири повторения (2 x 10 m) на обработка. Експерименталните площи бяха подредени по блоковия модел. Подготвени са следните варианти:

- WW (SC): зимна пшеница (*Triticum aestivum*) – самостоятелен посев (SC), приложен е 140 kg of N $ha^{-1}yr^{-1}$. (100 % от препоръчителната доза). Семената са посети в два реда на същата дълбочина от 2 cm на 10-и октомври 2012.
- WW (IC): зимна пшеница (*Triticum aestivum*) – (смесени култури (IC) в комбинация (1:1) със зимен грах (*Pisum sativum* var*. speciosum*: без торене. Семената са посети смесено в два реда на същата дълбочина от 2 cm на 10-и октомври 2012. Първият ред е засят с *Pisum sativum*var. *speciosum* а дълбочина от 5 cm. Вторият ред е засят с *Triticum aestivum* на дълбочина от 2 cm.
- WW (IC – N50): зимна пшеница (*Triticum aestivum*) – (смесени култури (IC) в комбинация (1:1) със зимен грах (*Pisum sativum* var. *speciosum*): 70 kg $N \cdot ha^{-1}.yr^{-1}$ 50% от препоръчаните дози от N за зимна пшеница.
- WW (IC – N80): зимна пшеница (*Triticum aestivum*) – (смесени култури (IC) в комбинация (1:1) със зимен грах (*Pisum sativum*var. *speciosum*): 112 kg $N \cdot ha^{-1}.yr^{-1}$ 80% от препоръчаните дози от N за зимна пшеница.

Семената при IC и SC са засети смесено в редовете на различна дълбочина на $10^{-и}$ октомври 2012 (първата година от опита), 5-и октомври 2013 (втора година от експеримента) и $14^{-ти}$ октомври 2014 (третата година от

"Kvartér řeky Moravy". According Quitt (1975), this is, the climatic region T2 where annual climatic averages are 350-400 mm of precipitation in growing season, 200-300 mm of precipitation in winter, and 8-9 °C of mean annual air temperature. The experiment was based on the black earth, moderate, loess without skeleton.

Field experiment was conducted in 2012 with four replicates (2 x 10 m) per treatment. Experimental sites were arrayed in blocked design. These variants were prepared:

- WW (SC): Winter Wheat (*Triticum aestivum*) – Sole crops (SC), application of 140 kg of $N \cdot ha^{-1} \cdot yr^{-1}$. (100 % of recommended dose). Seeds were sown in the rows into the same depth of 2 cm on the $10^{th}$ of October 2012.
- WW (IC): Winter Wheat (*Triticum aestivum*) – (Inter crops (IC) in combination (1:1) with Winter Pea (*Pisum sativum* var*. speciosum*): without fertilizers. Seeds were sown mixed in the rows in the different depth on the $10^{th}$ October 2012. The first one was *Pisum sativum* var. *speciosum* into depth of 5 cm. The second one was *Triticum aestivum* into depth of 2 cm.
- WW (IC – N50): Winter Wheat (*Triticum aestivum*) – (Inter crops (IC) in combination (1:1) with Winter Pea (*Pisum sativum* var. *speciosum*): 70 kg of $N \cdot ha^{-1}.yr^{-1}$ 50 % of recommended doses of N for Winter Wheat.
- WW (IC – N80): Winter Wheat (*Triticum aestivum*) – (Inter crops (IC) in combination (1:1) with Winter Pea (*Pisum sativum* var. *speciosum*): 112 kg of $N \cdot ha^{-1}.yr^{-1}$ 80 % of recommended doses of N for Winter Wheat.

Seeds of IC and SC were sown mixed in the rows into the different depth on the $10^{th}$ October 2012 (the first year of experiment), $5^{th}$ October 2013 (the second year of experiment) and $14^{th}$ October 2014 (the third year of

експеримента). Първият ред е засят с *Pisum sativum*var. *speciosum* на дълбочина от 5 cm. Вторият ред е засят с *Triticum aestivum* на дълбочина от 2 cm. Представени са само резултатите от WW (SC) и WW (IC) от първата година на експеримента. Пробите от ризосферата са взети във фаза на цъфтеж на зимна пшеница (GS 61-69) и зимен грах (GS 61-69).

*Определяне на оновно и субстратно-индуцирано дишане*

Основното дишане (BR) се извършва чрез измерване на производството на $CO_2$ от почва инкубирана в серумни бутилки за 24 h. Влажността на почвата (15 ) е претеглена във всяка една от трите 120-ml серумни бутилки. Бутилките са запечатани с бутил каучукова запушалка и инкубирани при 25 ° C. След 3 и 24 часа 0.5 ml е анализирана проба от вътрешната атмосфера от всяка бутилка чрез газова хроматография (Agilent Technologies 7890A GC System, оборудвана с детектор за топлинна проводимост). Дишането се изчислява чрез увеличението на $CO_2$ през 21-часовия период на инкубация (24-3 h). В края на измерванията, обемът на общото пространство за всяка репликатна бутилка се определя чрез измерване на обема вода, необходим за напълване на бутилката. Измерените количества $CO_2$ се регулират според разтворения в течна фаза газ. Резултатите се изразяват на грам суха почва и час (Šimek, 2011).

Субстратно-индуцираното дишане (SIR) се извършва чрез измерване на производството на $CO_2$ от почва инкубирана в серумни бутилки за 24 h след прибавяне на глюкоза. Добавена е влажна почва (5 g) към трите серумни бутилки за да се определи BR от предишния параграф, като е добавен разтвор на глюкоза от 2 ml към всяка бутилка (4 mg C $^{g-1}$ суха почва). Бутилките са запечатани с бутил каучукови запушалки и инкубирани при 25 °C. След 2 и 4 часа е анализирана проба от 0.5 ml от вътрешната атмосфера от всяка бутилка чрез газова

experiment). The first one was *Pisum sativum* var. *speciosum* in 5 cm depth. The second one was *Triticum aestivum* into depth of 2 cm. The only results from WW (SC) and WW (IC) from first year of experiment are presented. The samples of rhizosphere soil were taken during flowering growth stages of Winter Wheat (GS 61-69) and Winter Pea (GS 61- 69).

*Determination of basal and substrate induced respiration*

Basal respiration (BR) was determined by measuring the $CO_2$ production from soils incubated in serum bottles for 24 h. Field moist soil (15 g) was weighed into each of three 120-ml serum bottles. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and incubated at 25 °C. After 3 and 24 h, a 0.5 ml sample of the internal atmosphere from each bottle was analysed by gas chromatography (Agilent Technologies 7890A GC System equipped with a thermal conductivity detector). Respiration was calculated from the increase in $CO_2$ during the 21 h incubation period (24–3 h). At the end of measurements, the total headspace volume for each replicate bottle was determined by measuring the volume of water required to fill the bottle. The measured amounts of $CO_2$ were corrected for the gas dissolved in the liquid phase. The results are expressed per gram of dry soil and hour (Šimek, 2011).

Substrate induced respiration (SIR) was determined by measuring the $CO_2$ production from soils incubated in serum bottles for 4 h after the addition of glucose. Field-moist soil (5 g) was added to three replicate serum bottles as described for the determination of BR in the previous paragraph, and 2 ml of a glucose solution was added to each bottle (4 mg C $g^{-1}$ of dry soil). Bottles were sealed with butyl rubber stoppers, and soils were incubated at 25 °C. After 2 and 4 h, a 0.5 ml sample of the internal atmosphere was analysed by gas chromatography (see the previous

хроматография (вижте предишния параграф). SIR е изчислено според увеличаването на $CO_2$ през инкубационен период от 4 h (4-2 h). Бутилките са обработени допълнително както е описано при измерването на BR. Количеството на изменението на глюкозата, необходимо за максимален респираторен отговор и линейност на развитието на $CO_2$ през първите 4 часа, се проверява в пилотни експерименти (данни не са показани), (Šimek 2011). BR и SIR са измерени в почвена проба, която е събрана от ризосферната зона на WW (SC, IC) и WP (IC).

*Определяне на общ азот и общ въглерод в микробиална биомаса и почвени проби*

Процес на определяне на общ азот и общ въглерод в микробна биомаса и почва е описан от Elbl et al. (2013). Микробиалната биомаса е определена като част от органичното вещество в почвата, което представлява живи микроорганизми, по-малки от 5-10 $\mu m^3$. Почвената микробна биомаса се счита за находище за последваща доставка на хранителни вещества – азот, фосфор и др. (Rustad, 2000). Затова ние считаме съдържанието на азот и въглерод в микробната биомаса ($N_{mic}$ и $C_{mic}$) за важен показател за микробната активност в почвата (Elbl et al., 2013). Съдържанието на $C_{mic}$ и $N_{mic}$ се измерва, като се използва метод за фумигация-екстракция (Friedel, 2002), $N_{mic}$ се измерен от (Turner, 2003) и $C_{mic}$ е измерен от (Brookes, 1985).

*Статистически анализ*

Потенциалните разлики в стойностите на концентрацията на азот и въглерод (в почвата и микробиалната биомаса) и дишането на почвата се анализират чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA, $P < 0.05$) в комбинация с LSD тест на Фишер. Всички анализи са извършени с помощта на софтуер Statistica 10 CZ. Графичната обработка на измерените данни е извършена с Microsoft Excel 2010.

paragraph). SIR was calculated from the $CO_2$ increase during the 4 h incubation period (4–2 h). The bottles were further processed as described for BR measurement. The amount of glucose amendment necessary for maximal respiratory response and linearity of $CO_2$ development during first 4 h were both checked in pilot experiments (data not shown), (Šimek 2011). BR and SIR were measured in soil sample which was collected from rhizosphere zone of WW (SC, IC) and WP (IC).

*Determination of total nitrogen and total carbon in microbial biomass and soil samples*

Process of determining total nitrogen and total carbon in microbial biomass and soil was described in Elbl et al. (2013). Microbial biomass has been defined as the part of the organic matter in soil that constitutes living micro-organisms smaller than 5-10 $\mu m^3$. Soil microbial biomass is considered to be a pool for subsequent delivery of nutrients – nitrogen, phosphorus etc. (Rustad, 2000). Therefore, we consider the content of nitrogen and carbon in microbial biomass ($N_{mic}$ and $C_{mic}$) to be an important indicator of microbial activity in the soil (Elbl et al. 2013). Content of $C_{mic}$ and $N_{mic}$ was measured using fumigation-extraction method (Friedel, 2002), $N_{mic}$ was measured by (Turner, 2003) and $C_{mic}$ was measured by (Brookes, 1985).

*Statistical Analysis*

Potential differences in values of nitrogen and carbon concentration (in soil and microbial biomass) and soil respiration were analysed by the one-way analysis of variance (ANOVA, $P<0.05$) in combination with the Fischer´s LSD test. All analyses were performed using Statistica 10 CZ software. Graphic processing of measured data was performed in Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Тази статия представя първите резултати от полеви експеримент, който е съсредоточен върху различни количества азот и въглерод в ризосферата на Зимна пшеница (*Triticum aestivum*), отглеждана като самостоятелна култура (СЦ) и смесено отглеждане на култури (ІС) със зимен грах (*Pisum sativum* var. *Speciosum*) в съотношение на семената (1:1). Използва се методът за извличане с хлороформ чрез фумигация-екстракция за определяне на $C_{mic}$ и $N_{mic}$ в почвените проби, които са взети от ризосферата и микробната активност в тези проби се изразява чрез основно и субстратно-индуцирано дишане.

Ризосферата е почвена област, която е повлияна от корените на растенията и се характеризира с висока микробна активност (Hiltner, 1904). Установено е, че N трансформациите в ризосфе-рата са свързани с динамиката на С и освобождаването на наличния С от корените. Например, при наличието на царевични корени, 67% повече почвен минерален N е фиксиран в органичен N, отколкото без растения, въпреки по-голямата конкуренция на растенията за минерален N (Qian et al., 1997). Корените на растението могат да бъдат ефективни конкуренти с микроорганизми за хранителните вещества, освободени от разлагането на органични остатъци, които се намират в почвата (Hodge, 2000). Бактериите, свързани с корените на растенията, са от съществено значение за хранението на растенията (разграждане и образуване на органични вещества в почвата (SOM), вижте Фигура 2), насърчаване на растежа и взаимодействия с болести (Marschner, 2001).

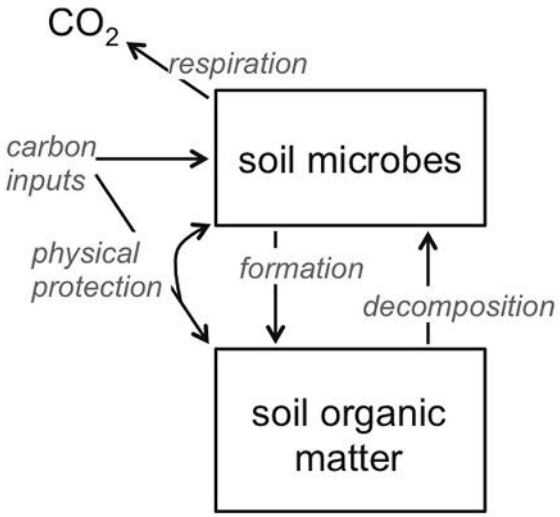
## RESULTS AND DISCUSSION

This work presents the first results from the field experiment which is focused on different quantity of nitrogen and carbon in rhizosphere of Winter Wheat (*Triticum aestivum*) grown as sole crops (SC) and inter crops (IC) with Winter Pea (*Pisum sativum* var. *speciosum*) in seed ratio (1:1).

The chloroform fumigation-extraction method was used to estimate $C_{mic}$ and $N_{mic}$ in soil samples, which were removed from rhizosphere zone, and the microbial activity in these samples was expressed by basal and substrate induced respiration.

The rhizosphere is the soil region that is influenced by plant roots and is characterized by a high microbial activity (Hiltner, 1904). It is well established that N transformations in the rhizosphere soil are related to C dynamics and release of available C from roots. For example, in the presence of maize roots, 67% more soil mineral N was immobilized into organic N than without plants, despite higher competition by plants for mineral N (Qian et al., 1997). Plant roots may be effective competitors with micro-organisms for the nutrients released from decomposing organic patches buried in soil (Hodge, 2000).

Bacteria associated with plant roots are fundamentally important in plant nutrition (decomposition and formation of SOM, see the Figure 2), growth promotion, and disease interactions (Marschner, 2001).




**Фиг. 2. Теоретична рамка за динамиката на почвената органична материя (SOM), подчертаваща централната роля, която почвените микроорганизми играят както при разлагането, така и при формирането на органичните вещества – Връзка между активността на микробните съобщества в почвата, производството на $CO_2$ и качеството и количеството на SOM в почвата (Bradford, 2013** )

**Fig. 2. Theoretical framework for soil organic matter (SOM) dynamics emphasizing the central role that soil microbes play in both SOM decomposition and formation – Relationship between activity of microbial community in soil, production of $CO_2$ and quality and quantity of SOM in soil (Bradford, 2013)**

*Съдържание на общия въглерод и азот в ризосферата*

Почвеният въглерод и азот представляват важни резервоари на въглерод и азот в сухите и полусухите райони (приблизително 30% от територията на Република Чехия), поради което те са важни за всеобщия кръговрат на въглерод и азот и изменението на климата (Sutton, 2011; Zhang, 2015). Общият въглерод (TC) и общият азот (TN) в почвата играят важна роля за здравето на почвата и динамиката на екосистемите. TC може да подобри почвеното плодородие, качеството и задържането на водата и в крайна сметка да поддържа и увеличава производството на култури. TN е необходим за почвеното плодородие (Wang et al., 2006; Muñoz and Kravchenko, 2011). При площите изградени на основата на бобови култури е важна информацията за находищата на N под почвената повърхност за правил-

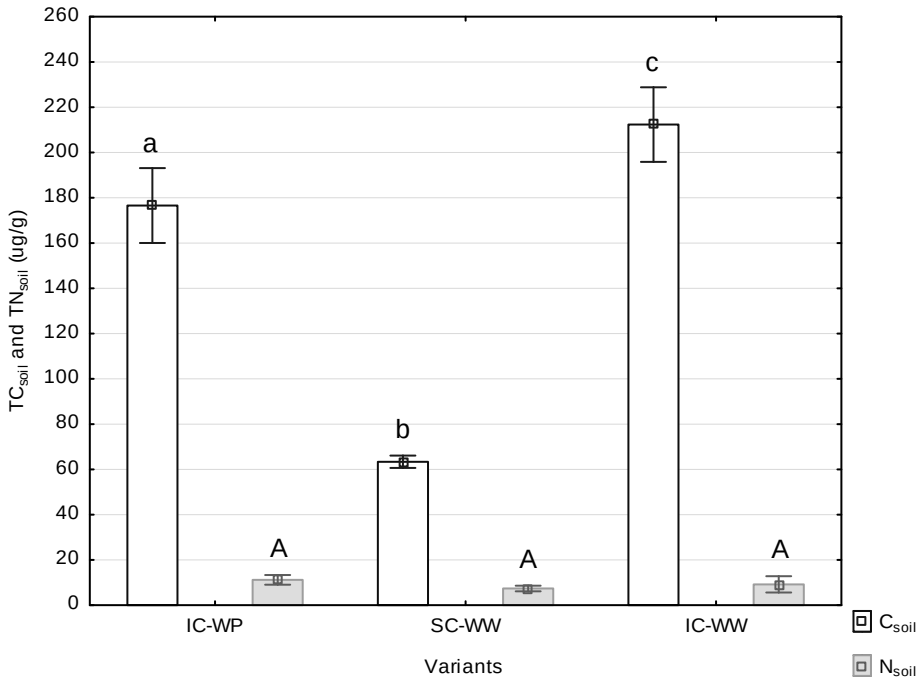
*Content of total carbon and nitrogen in rhizosphere soil*

Soil carbon and nitrogen represent important reservoirs of carbon and nitrogen in arid and semi-arid regions (approximately 30% of the territory of the Czech Republic), thus they are important in the global carbon and nitrogen cycle, and climate change (Sutton, 2011; Zhang, 2015). Soil total carbon (TC) and total nitrogen (TN) both play critical roles in soil health and ecosystem dynamics. TC can improve soil fertility, quality, and water retention, and ultimately maintain and increase crop production. TN is necessary for soil fertility (Wang et al., 2006; Muñoz and Kravchenko, 2011).

In legume-based leys knowledge about the below-ground N, pools are important for correct estimates of the total biological $N_2$-fixation as well as for the potential N

ната преценка на биологичната фиксация на $N_2$ ,както и за потенциалната доставка на N на следващите култури. Отлаганията в ризосферата може да съдържа множество различни органични съединения, включително водоразтворими ексудати, изкоренена коренна тъкан и мъртви корени. Утаяването в ризосферата на въглерод може да бъде много съществено, надхвърлящо наличието на влакнести корени в края на вегетативния сезон с повече от 20 ± 50% Освен това, значителни количества от N могат да бъдат утаени заедно с въглерода (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001).

supply to the succeeding crops. Rhizodeposition may contain many different organic compounds including water-soluble exudates, sloughed-off root tissue and dead roots. The rhizodeposition of carbon can be very substantial, exceeding that present as fibrous roots at the end of the growing season by more than 20±50%. Additionally, substantial amounts of N can be deposited together with the carbon (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001).




**Фиг. 3. Влияние на култивирането на IC върху TC и TN в почвените проби (средни стойности ± стандартна грешка, n = 4, различните букви показват значителни разлики при ниво 0.05 - ANOVA, LSD тест на Фишер, P <0.05)**

**Fig. 3. Effect of IC cultivation on TC and TN in soil samples (mean values ± standard error, *n* = 4, different letters indicate significant differences at the level 0.05 – ANOVA, LSD Fischer test, P<0.05)**

Горната Фигура 3 показва значителна разлика (P <0.05) между отделните варианти само в съдържанието на TC. Значително най-голямо количество TC е намерено в IC вариантите

The above Figure 3 shows a significant difference (P<0.05) between individual variants only in content of TC. The significant highest amount of TC was found in IC variants (IC-WW), conversely

(IC-WW), и обратно най-ниското съдържание е открито в SC варианта. Различни научни разработки (Høgh-Jensen и Schjoerring, 2001; Wichern et al., 2007a и 2007b, Song et al., 2007; Fustec et al., 2010) потвърждават, че култивирането на IC (бобови растения) има положително влияние върху хранителните вещества в зоната на ризосфера, тъй като тези култури произвеждат големи количества съединения (с C, N, P), т.е. коренови ексудати. Освен това, включването на тази култура в сеитбообращението има положително влияние върху увеличаването на съдържанието на SOM в почвата, което в последствие може да бъде минерализирано – разпределено на елементарните хранителни вещества (C и N). Освен това Mohsenabadi (2008) потвърждава, че култивирането на МК има положителен ефект върху ефективността на използване на водата. Fustec et al. (2010) посочват, че бобовите образуват симбиоза с Rhizobium, но освобождават съществена част от биологично фиксирания N в ризосферата. Екологичните функции на тези отлагания в ризосферата все още не са известни, но те могат да представляват бързо съединяващ се източник на C и N за почвените микроорганизми и съседните растения. Затова, ние предполагаме, че дългосрочното култивиране на IC ще доведе до подобряване на почвеното плодородие (съдържание на основни хранителни вещества) и здравето на почвата (възстановяване на естествените функции на почвата).

*Съдържание на въглерод и азот в бактериалната биомаса*

Въпреки че количествата органични съединения, изпускани от корените, не са големи, рядко надхвърлящи 0,4% от фотосинтезирания въглерод, те оказват много силно влияние върху почвените микроорганизми и могат да имат значително влияние върху наличието на хранителни вещества в растенията (Rovira, 1969). Lupwayi (1998), според неговите резултати, показва, че сеитбооборота въз основа на бобови култури представлява по-устойчива система за управление на културите. Бобовите растения са способни да натрупват значителни

the lowest content was detected in SC variant. Various scientific works (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001; Wichern et al., 2007a and 2007b; Song et al., 2007; Fustec et al., 2010) confirm that cultivation of IC (legumes) has a positive effect on content of nutrients in rhizosphere zone because these crops produce large amounts of compounds (with C, N, P), i.e. root exudates. Moreover, inclusion of this crop into crop rotation has a positive influence on increasing the content of SOM in soil, which may be subsequently mineralized – distributed to elementary nutrients (C and N).

Moreover, Mohsenabadi (2008) confirmed the cultivation of IC has positive effect on water use efficiency. Fustec et al. (2010) state legumes form a symbiosis with Rhizobium but release a substantial part of the biologically fixed N into the rhizosphere. Ecological functions of these rhizodeposits are still unknown but they may constitute a rapidly incorporating source of C and N for soil microorganisms and neighbouring plants.

Therefore, we assume long-term cultivation of IC will result in improvement of soil fertility (content of essential nutrients) and soil health (restoration of the natural functions of the soil).

*Content of carbon and nitrogen in bacterial biomass*

Although the quantities of organic compounds exuding from roots are not large, seldom exceeding 0.4% of the photosynthesized carbon, they do exert a very strong influence on the soil microorganisms and may be significant in affecting plant nutrient availability (Rovira, 1969). Lupwayi (1998), according to his results, indicates that legume-based crop rotations present more sustainable crop management systems.

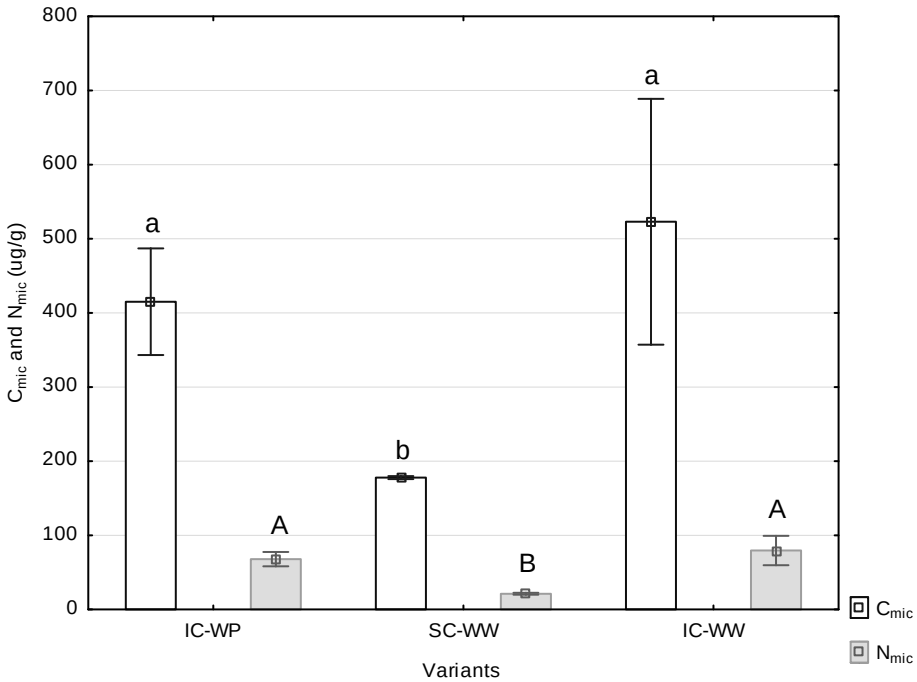
Legumes are able to accumulate substantial quantities of nitrogen, and the

количества азот, а популацията на микроби в почвата има голямата способност да насочи този N в правилните условия (Jarvis et al., 1996). Тъй като растенията възприемат само неорганичен N от почвата, нашите резултати показват, че микробите първоначално се конкурират с растенията за добавения N, но с времето растенията улавят повече от първоначално добавения N, тъй като те представляват по-бавен оборот (Hodge, 2000). С фумигантите е необходимо внимание по отношение на сложните взаимодействия с хранителните вещества, отделяни от убитите клетки. Подобни обработки представляват грубо смущение на почвените организми, но са по-добри от пълна стерилизация, въпреки това те остават най-добрият ни метод за оценка на всепроникващата роля на почвените организми в системите за отглеждане (Watt, 2006).

soil population of microbes has an enormous capacity to cycle this N in the right conditions (Jarvis et al., 1996).

As plants only take up inorganic N from the patch, our results indicate that microbes initially out-compete plants for the added N, but with time, plants capture more of the N originally added as they represent a slower turnover pool (Hodge, 2000).

With fumigants, caution is needed regarding confounding interactions with nutrients released from killed cells. Such treatments present gross disturbances of the soil organisms at best rather than complete sterilisation, nevertheless they remain our best method for assessing pervasive roles for soil organisms in cropping systems (Watt, 2006).




**Фиг. 4. Съдържание на C и N в микробната биомаса (средни стойности ± стандартна грешка, n = 4, различните букви показват значителни разлики при ниво 0.05 - ANOVA, LSD тест на Фишер, P <0.05)**

**Fig. 4. Content of C and N in microbial biomass (mean values ± standard error, n = 4, different letters indicate significant differences at the level 0.05 – ANOVA, LSD Fischer test, P<0.05)**

Данните, представени във Фигура 4, показват, че култивирането на смесена култура (виж варианти IC-WP и IC-WW) има положително влияние върху развитието на микроорганизми в почвата. Значителна разлика между IC-WP (WW) и SC-WW е причинена от коренови ексудати, които имат пряко въздействие върху почвените микробни съобщества. Положителното въздействие на кореновите ексудати върху развитието на микробните съобщества в ризосферата въз основа на нейния състав е потвърдено от Maul et al. (2014), Bloem et al. (2006) и Wenhao (2013). Кореновите ексудати се състоят главно от органичен въглерод ($C_{org}$), който е полезен като източник на хранителни вещества за почвените микроорганизми Следователно, микроорганизмите имат достатъчно енергия да използват азот и въглерод (вижте Фигура 3) във варианти с IC.

*Микробна активност – основно и субстратно-индуцирано дишане*

Микробните съобщества в почвата се състоят от голямо разнообразие от видове, изследващи техните местообитания, като регулират изобилието на популацията и степента на активност спрямо факторите на околната среда. Почвените микробни активности водят до освобождаване на наличните хранителни вещества за растенията и са от решаващо значение за биогеохимическия кръговрат (Bloem et al., 2006). Аерация на почвата е основният път, в който $CO_2$, фиксиран от земните растения, се връща в атмосферата (Schlesinger, 2000). Преминаването на $CO_2$ от аерация на почвата е основен фактор за нетния обмен на въглерод в сухоземните екосистеми, второ само по мащаб на фотосинтезата от растенията (Rustad et al., 2000).

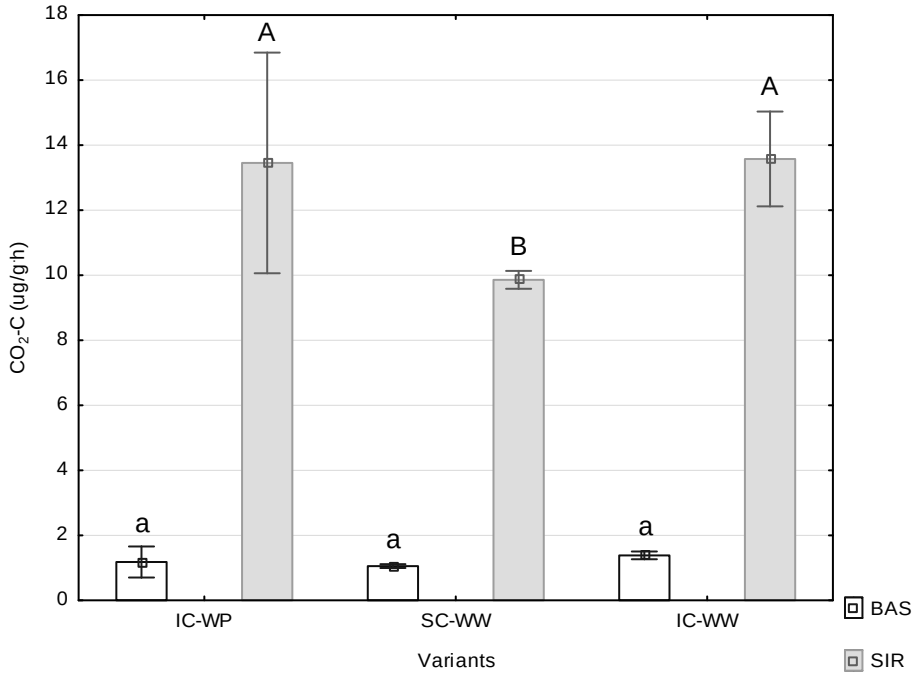
The data presented in Figure 4 indicated the cultivation of mixed culture (see variants IC-WP and IC-WW) had positive effect on development of microorganisms in soil. Significant difference between IC-WP (WW) and SC-WW was caused by root exudates having direct impact on soil microbial communities. Positive effect of root exudates on development of microbial community in rhizosphere soil based on its composition was confirmed by Maul et al. (2014), Bloem et al. (2006) and Wenhao (2013). The root exudates consist mainly of organic carbon ($C_{org}$), which is useful as a source of nutrients for soil microorganisms. Therefore, microorganisms had enough energy to utilize nitrogen and carbon (see Figure 3) in variants with IC.

*Microbial activity – basal and substrate induced respiration*

Microbial communities in soil consist of a great diversity of species exploring their habitats by adjusting population abundance and activity rates to environmental factors.

Soil microbial activities lead to the release of nutrients available for plants, and are of crucial importance in biogeochemical cycling (Bloem et al., 2006). Soil respiration is the primary path where $CO_2$ fixed by land plants returns to the atmosphere (Schlesinger, 2000).

Efflux of $CO_2$ from soil respiration is a major contributor to net carbon exchange in terrestrial ecosystems, second only in magnitude to photosynthesis by plants (Rustad et al., 2000).




**Фиг. 5. Основно и субстратно-индуцирано дишане (средни стойности ± стандартна грешка, n = 4, различните букви показват значителни разлики при ниво 0.05 - ANOVA, LSD тест на Фишер, P <0.05)**

**Fig. 5. Basal and substrate induced respiration (mean values ± standard error, n = 4, different letters indicate significant differences at the level 0.05 – ANOVA, LSD Fischer test, P <0.05)**

Основното дишане (BAS) е постоянната норма за дишане на почвата, която произхожда от кръговрата на органичната материя (Bloem et al., 2006). Субстратно-индуцираният респираторен (SIR) метод се основава на откриването на респираторен отговор на почвените микроорганизми при доставянето на глюкоза (органични въглеродни съединения). По този начин се измерват само организми, които реагират на глюкозата и са активни. Въз основа на този принцип субстратно-индуцираният респираторен метод открива предимно бактериална биомаса (Bloem et al., 2006). Имайки предвид данните представени във Фигура 5, най-високите стойности на SIR са установени при варианти на IC. Тези стойности, в съответствие с Bloem et al. (2006) показват, че по-голямо количество микробна биомаса присъства в зоната на ризосферата на междуредовите култури.

Basal respiration (BAS) is the steady rate of respiration in soil which originates from the turnover of organic matter (Bloem et al., 2006). The substrate-induced respiration (SIR) method is based on the detection of a respiratory response of soil microorganisms on supply of glucose (organic carbon compounds). Thus, only glucose-responsive and active organisms are measured. Based on this principle, the substrate-induced respiration method detects predominantly bacterial biomass (Bloem et al., 2006). Consider data presented in the Figure 5, the highest values of SIR were found in variants IC.

These values, in accordance with Bloem et al. (2006), show that larger amount of microbial biomass was present in rhizosphere zone of intercrops. Moreover,

Освен това, Фигура 3 показва, че във варианти с IC е установено по-голямо съдържание на органичен въглерод. Следователно, отглеждането на смесени култури допринася за развитието на микробната активност (C представлява енергията за почвените микроби) и по този начин и за развитието на почвения органично-минерален комплекс. Този комплекс е от съществено значение за усвояването и използването на почвената вода – за почвеното плодородие.

Най-висока микробна активност (SIR) е установена във варианти, при които се култивира IC. Според Høgh-Jensen и Schjoerring (2001), съединенията (C и N), внесени чрез отлаганията в ризосферата, имат голямо въздействие върху плътността и активността на микроорганизмите в ризосферата и оттам върху кръговратът и наличието на хранителни вещества в кореновата зона. След минерализация, хранителните вещества, съдържащи се в състава на съединенията утаени в ризосферата, ще бъдат усвоени от растенията или микробите, всмукани от почвата или изгубени от почвената система на растенията.

the Figure 3 shows that higher content of organic carbon was found in variants IC.

Therefore, the cultivation of mixed culture contributes to the development of microbial activity (C represents energy for soil microbes) and thus to the development of soil organic-mineral complex. This complex is essential for uptake and utilization of soil water – for soil fertility.

The highest microbial activity (SIR) was found in variants where IC was cultivated. According Høgh-Jensen and Schjoerring (2001), the compounds (C and N) deposited by rhizodeposition have major effects on the density and activity of microorganisms in the rhizosphere and, hence, on the turnover and plant availability of nutrients in the root zone. After mineralisation, the nutrients contained in the rhizodeposited compounds will be subjected to plant or microbial uptake, adsorbed on soil particles, or lost from the plant soil system.

## ИЗВОДИ

Настоящата статия представя първите резултати от дългосрочен полеви опит. Следователно, резултатите трябва да се тълкуват внимателно. Нашата цел бе да характеризираме въздействието на смесеното отглеждане на култури върху микробната активност в зоната на ризосферата на отделни култури. Съвременното селско стопанство се сблъсква с нови предизвикателства и проблеми. Една от най-големите заплахи е изтощаването на почвата. Ризосферата е жизнено пространство за почвени микроорганизми, които са необходими за здравето на почвата и плодородието. Горните резултати показват, че бобовите растения произвеждат коренови ексудати с голямо количество $C_{org}$, които имат пряко въздействие върху почвените микроорганизми Предполагаме, че културите при IC имат предимството, тъй като те могат да си сътрудничат взаимно.

## CONCLUSIONS

This contribution presents the first results of a long-term field experiment. Therefore, these results must be interpreted with caution. Our objective was to characterize potential effect of intercrop cultivation on microbial activity in rhizosphere zone of individual crops. Modern agriculture faces to new challenges and problems. One of the greatest threats is depletion in soil fertility.

The rhizosphere is a living space for soil microorganisms which are necessary for soil health and fertility.

The above results indicate the legumes produce root exudates with a large amount of $C_{org}$ which have direct impact on soil microorganisms. We assume the crops in IC have the advantage as they can cooperate with each other.

Нашето изследване показа възможността на междуредовите култури за задържане и оползотворяване на минералния азот в почвата. Култивирането на междуредови култури представлява нова възможност за смекчаване на отрицателните влияния на екстензивното земеделие– изчерпване на почвеното плодородие, тъй като култивирането на IC поддържа микробния живот в зоната на ризосферата.

Our research showed the potential of intercrops for retention and utilization of mineral nitrogen in soil. Cultivation of intercrops represents new opportunity to mitigate the negative influences of extensive agriculture – depletion in soil fertility, because cultivation of IC supports microbial life in rhizosphere zone.


## БЛАГОДАРНОСТИ

Статията е (частично) създадена с институционалната подкрепа на дългосрочна концептуална разработка на изследователската организация "Селскостопански изследвания" ООД.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The paper was (partly) created with institutional support of long-term conceptual development of the research organization Agricultural Research, Ltd.


## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES


1. **Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, J. M. Vivanco**, 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
2. **Bengough, A. G., A. V.Tracy, B. M. McKenzie, P. D. Hallett, R. Dietrich, P. J. White, H. G. Jones**, 2009. Physical limitations to root growth: screening, scaling and reality. In: International Symposium “Root Research and Applications” RootRAP, 2-4 September 2009, Boku – Vienna, Austria, pp. 1-4.
3. **Berendsen, R. L., C. M. J. Pieterse and P. A. H. M. Bakker**, 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 478-486.
4. **Berg, G**., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11-18.
5. **Bloem, J., D. W. Hopkins and A. Benedetti**, 2006. Microbiological methods for assessing soil quality. CABI Publishing – division of CAB International.
6. **Bradford, M. A.,** 2013. Thermal adaptation of decomposer communities in warming soils. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-16.
7. **Brookes, P. C., A. Landman, G. Pruden, D. S. Jenkinson**, 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 837-842.
8. **Carlsson, G. and K. Huss-Danell**, 2014. Does nitrogen transfer between plants confound 15N-based quantifications of N2 fixation? *Plant Soil*, 374, 345-358.
9. **Carvalhais, L. C., P. G. Dennis, D. Fedoseyenko, M. R. Hajirezaei, R. Borriss, N. Wirén**, 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174, 3-11.
10. **Dakora, F. D. and D. A. Phillips**, 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245, 35-47.
11. **Daotaniya, M. L. and V. D. Meena**, 2015. Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 85, 1-12.

12. **Elbl, J., J. K. Friedel, J. Záhora, L. Plošek, A. Kintl, J. Přichystalová, J. Hynšt, L. Dostálová, K. Zákoutská**, 2013. Leaching of Mineral Nitrogen and Phosphate from Rhizosphere Soil Stressed by Drought and Intensive rainfall. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 7, 324-330.
**13. Fageria, N.**, 2013. The role of plant roots in crop production. Boca Raton: CRC Press.
14. **Fornara, D. A., L. Banin, M. J. Crawley, S. Gilroy, J. M. Vivanco**, 2013. Multi-nutrient vs. nitrogen-only effects on carbon sequestration in grassland soils. *Global Change Biology*, 19, 3848-3857.
**15. Friedel, J. K., S. Fiedler and A. Kretzschmar**, 2002. Limitations when quantifying microbial carbon and nitrogen by fumigation-extraction in rooted soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165, 589-593.
*16.* **Fustec, J. B., F. Lesuffleur, S. Mahieu, J. B. Cliquet**, 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 57-66.
17. **Gregory, P. J.,** 2006. Plant root. Growth, Activity and Interaction with Soil. Oxford: Blackwell Publishing, UK, pp. 216-222.
18. **Hauggaard-Nielsen, H. and J. K. Schjoerring**, 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biol. Biochem,* 33, 439-448.
19. **Hauggaard-Nielsen, H., B. Jørnsgaard, J. Kinane, E. S. Jensen**, 2008: Grain legume–cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 23, 3-12.
20. **Hauggaard-Nielsen, H., P. Ambus and E. S. Jensen**, 2001. Interspecific competition, N use and interference with weeds in pea-barley intercropping. *Field Crops Research*, 70, 101-109.
21. **Hiltner, L.**, 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft. Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft*, 98, 59-78.
22. **Hodge, A., J. Stewart, D. Robinson, B. S. Griffiths, A. H. Fitter**, 2000. Plant N capture and microfaunal dynamics from decomposing grass and earthworm residues in soil. *Biology and Biochemistry*, 32, 11-12.
23. **Cheng, W., Z. Qiangli, D. C. Coleman, C. Ronald, C. A. Hoffman**, 1996. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 1283-1288.
24. **Jarvis, S. C., E. A. Stockdale, M. A. Shepherd, D. S. Powlson**, 1996. Nitrogen Mineralization in Temperate Agricultural Soils: Processes and Measurement. *Advances in Agronomy*, 57, 187-235.
25. **Jensen, E. S.**, 1996: Grain yield, symbiotic $N_2$ fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant and Soil*, 182, 25-38.
26. **Kessel, V. C. and C. Hartley**, 2000. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation. *Field Crops Research*, 65, 2-3.
27. **Lynch, J. M. and J. M. Whipps**, 1991. Substrate flow in the rhizosphere. *The Rhizosphere and Plant Growth*, 15, 15-24.
28. **Lupwayi, N. Z., W. A. Rice and G. W. Clayton**, 1999. Soil microbial biomass and carbon dioxide flux under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Canadian Journal of Soil Science*, 79, 273-280.
29. **Maleezieux, E., Y. Crozat, C. Dupraz, M. Laurans, D. Makowski, H. Ozier-Lafontaine, B. Rapidel, S. Touronnet, M. Valantin-Morison**, 2009. Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agron. Sustain.*

*Dev*., 29, 43-62.
30. **Maul, J. E., J. S. Buyer, R. M. Lehman, S. Culman, Ch. B. Blackwood, D. P. Roberts, I. A. Zasada, J. R. Teasdale**, 2014. Microbial community structure and abundance in the rhizosphere and bulk soil of a tomato cropping system that includes cover crops. *Applied Soil Ecology*, 77, 42-50.
31. **Marschner, P. C., H. Yang, R. Lieberei and D. E. Crowley**, 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1437-1445.
32. **Mohsenabadi Gh. R., M. R. Jahansooz, M. R. Chaichi, H. Rahimian Mashhadi, A. M. Liaghat, G. R. Savaghebi**, 2008. Evaluation of Barley–Vetch Intercrop at Different Nitrogen Rates. *J. Agric. Sci. Technol.*, 10, 23-31.
33. **Muñoz, J. D. and A. Kravchenko,** 2011. Soil carbon mapping using on-the-go near infrared spectroscopy, topography and aerial photographs. *Geoderma*, 166, 102-110.
34. **Oelbermann, M. and L. Echarte**, 2010. Evaluating soil carbon and nitrogen dynamics in recently established maize-soyabean inter-cropping systems. *European journal of Soil Science*, 62, 35-41
35. **Ofory, F. and W. R. Stern**, 1987. Cereal-legumes intercropping system. California: Academic Press, USA, pp. 41-85.
36. **Peoples, M. B., D. F. Herridge and J. K. Ladha**, 1995: Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, 174, 3-28.
**37.** **Qian, J. H., J. W. Doran and D. T. Walters**, 1997. Maize plant contributions to root zone available carbon and microbial transformations of nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 9-10.
38. **Quitt, E.**, 1971. Climatic regions of Czechoslovakia (In Czech). Academia - Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
39. **Raven, J. A. and D. Edwards**, 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Exp. Bot*., 52, 381-401.
40. **Rovira, A. D.,** 1969 Plant root exudates. *The Botanical Review,* 35, 35-57.
41. **Rustad, L. E., T. G. Huntington and R. D. Boone**, 2000. Controls on soil respiration: implications for climate change. *Biochemistry*, 48, 1-6.
42. **Schlesinger, W. H. and J. A. Andrews**, 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*, 48, 7-20.
43. **Šimek, M., S. Virtanen, V. Krištůfek, A. Simojoki, M. Yli-Halla**, 2011. Evidence of rich microbial communities in the subsoil of a boreal acid sulphate soil conducive to greenhouse gas emissions. *Agriculture, Ecosystems*, 140, 113-122.
44. **Song, Y. N., F. S. Zhang, P. Marschner, F. L. Fan, H. M. Gao, X. G. Bao, J. H. Sun, L. Li**, 2007. Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (Triticum aestivum L.), maize (Zea mays L.), and faba bean (Vicia faba L.). *Biology and Fertility of Soils*, 43, 565-574.
45. **Stern, W. R.**, 1993. Nitrogen fixation and transfer in intercrop systems. *Field Crops Research*, 34, 335-356.
46. **Sutton, M. A.**, 2011. The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives. New York: Cambridge University press, UK.
**47.** **Trenbath, B. R.**, 1976. Plant interactions in mixed crop communities. *ASA Special Publication*, 27, 129-169.
**48.** **Turner, B. L., R. Baxter and B. A. Whitton**, 2003. Nitrogen and phosphorus in soil solutions and drainage streams in Upper Teesdale, northern England: implications of organic compounds for biological nutrient limitation. *The Science of the Total Environment*, 314-316, 153-170.

49. **Wang, Z., X. Bao, X. Li, X. Jin, J. Zhao, J. Sun, P. Christie, L. Li**, 2006. Intercropping maintains soil fertility in terms of chemical properties and enzyme activities on a timescale of one decade. *Plant and Soil*, 44, 1-18.
50. **Watt, M., J. A. Kirkegaard and J. B. Passioura**, 2006. Rhizosphere biology and crop productivity—a review. *Australian Journal of Soil Research*, 44**,** 299-317.
51. **Wenhao, Y., H. Hong, R. Mei, N. Wuzhong**, 2013. Changes of microbial properties in (near-) rhizosphere soils after phytoextraction by Sedum alfredii H: A rhizobox approach with an artificial Cd-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 72, 14-21.
52. **Wichern, F., J. Mayer, R. G. Joergensen, T. Muller**, 2007a. Rhizodeposition of C and N in peas and oats after 13C–15N double labelling under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2527-2537.
53. **Wichern, F., J. Myer, R. G. Joergensen, T. Muller**, 2007b. Release of C and N from roots of peas and oats and their availability to soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2829-2839.
54. **Zhang, F., X. Wang, T. Guo, P. Zhang, J. Wang**, 2015. Soil organic and inorganic carbon in the loess profiles of Lanzhou area: implications of deep soils. *CATENA*, 126, 68-74.

*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2), 240-246*
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan*
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

# Влияние на бактерия на щам на Bacillus върху количеството захар и общ азот в меласа от ръжено зърно

Олга Иванова

*Красноярски изследователски институт по животновъдство - Клон на "Федерален изследователски център" Красноярски научен център от Сибирския клон на Руска академия на науките, 660049 Красноярск, Русия*
E-mail: o.v.ivanova@bk.ru

# The effect of bacteria strain Bacillus on the amount of sugar and total nitrogen in molasses made of rye grain

Olga Ivanova

*The Director of Krasnoyarsk scientific-research Institute of animal production – a separate subdivision of the Federal state budget scientific institution "Federal research centre" of the Krasnoyarsk scientific center of the Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, 660049 Krasnoyarsk, Russia*

## РЕЗЮМЕ

Изследвано е влиянието на щам Bacillus subtilis № 2-амилолитик върху количеството захар и общ азот във фуражна меласа от ръжено зърно. Установено е, че най-голямото общо съдържание на захар и минимално съдържание на азот е в обеззаразена меласа, като съответно е 85.4 g/kg и 1.9 g/kg. Малко по-малко количество общи захари е установено в нестерилна меласа (85.1 g/kg). При отсъствие в субстрата на бактерии на Bacillus subtilis № 2-амилолитик, биологичното преобразуване на въглехидрати е незначително, дори и в присъствието на нестерилна меласа от "диви" видове микроорганизми.

**Ключови думи:** култура от щам на Bacillus subtilis № 2-амилолитик, меласа, ръж, захар, общ азот

## SUMMARY

The impact of Bacillus subtilis strain No. 2-amylolitic on the amount of sugar and total nitrogen in the feed molasses from the grain of rye was conducted. It has been determined the highest total sugar content and minimum nitrogen content was in the sterile molasses and 85.4 g/kg and 1.9 g/kg, respectively. Less content of the total sugars was in a non-sterile molasses (85.1 g/kg). In the absence of substrate bacteria Bacillus subtilis No. 2-amylolitic bioconversion of carbohydrates is negligible, even in the non-sterile molasses «wild» species of microorganisms.

**Key words:** Culture of Bacillus subtilis strain No. 2-amylolitic, molasses, rye, sugar, total nitrogen

## УВОД

През последните години, във ферми с млекодайни животни с висок добив на мляко, има широко разпро-

## INTRODUCTION

In recent years, in farms with high milk yield animals, have widely spread diseases connected with metabolic

странени заболявания, свързани с метаболитни нарушения. Произходът и развитието им е свързано с недостиг или излишък на енергия, ниска смилаемост на хранителните вещества и биологично активните вещества в диетата на животните, дисбаланс в съотношението захар-протеин в храната (Aksenov, 2014).

Използването на захари в хранението на селскостопански животни има положителен ефект върху процеса на храносмилане и увеличава смилаемостта на храносмилането. От друга страна, усвоимите въглехидрати са изключително необходими за селскостопанските животни като основен източник на енергия. Най-обещаващият начин за преодоляване липсата на захари в диетата на животните, особено в район със сибирски климат, са зърнените меласи, получени при преработка на различни видове зърнени суровини (Motovilov, 2015).

Като основа за развитието на лечебна и профилактична медицина, перспективна за използване във ветеринарната медицина, изследователите обръщат внимание на екологично чистата жива форма на спорообразуващи аеробни бактерии от рода B. Subtilis (Antipov and Ermakova, 1990; Koroljuk, 1996), които са основните видове, открити в изследването на чревната микрофлора и са безвредни за топлокръвните животни. Те упражняват своята антагонистична активност върху широк спектър от патогенни и условно патогенни микроорганизми, резистентни на литичните ензими на храносмилателната система и на антибиотиците – пеницилин, тетрациклин, стрептомицин, които също се считат за технологични в производството, стабилни при съхранение и екологично безопасни (Kuvaeva, 1976; Sattorov, 2012).

Способността да се развива върху обикновена по състав и евтина среда, висок добив на продукта, стабилност при съхранение на щамовете Bacillus, позволява създаването на високоефективни технологии (Brotukhin,

disorders. Their origin and development is associated with a deficiency or excess of energy, low digestibility of nutrients and biologically active substances in the diets of animals, imbalance sugar-protein ratio in the feed (Aksenov, 2014).

Using sugars in feeding farm animals has a positive effect on the process of digestion and increases the digestibility of the roughage. On the other hand, digestible carbohydrates are very necessary to the farm animals as the main source of energy.

The most promising way to overcome the lack of sugars in the diet of animals, especially in Siberian climate region is grains of molasses obtained by processing different types of grain raw materials (Motovilov, 2015).

As a basis for the development treatment-and-prophylactic medicine, perspective for using in veterinary medicine, researchers pay attention to the ecologically clean alive of spore-forming aerobic bacteria of the genus B. Subtilis (Antipov and Ermakova, 1990; Koroljuk, 1996), which are the main species detected in the study of the intestinal microflora and are harmless to warm-blooded animals.

They exert their antagonistic activity to a wide spectrum of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms resistant to lytic enzymes of the digestive system and to antibiotics – penicillin, tetracycline, streptomycin, also considered as technological in production, stable at storage and environmentally safety (Kuvaeva, 1976; Sattorov, 2012).

The ability to grow on a simple in composition and inexpensive environments, high product yield, the storage stability of Bacillus strains allows creating highly efficient technologies (Brotukhin, 1999), and using the enzymes

1999) и използването на ензими за производство или за био лекарства (Antipov and Ermakova, 1990, Koroljuk, 1996; Sattorov, 2012). Заместителите на млякото, витаминните, минералните, ензимните фуражни добавки се обогатяват с тях (Bacillus subtilis) (Ivanova, 2006).

В днешно време не са достатъчни фуражни добавки за селскостопанските животни, произведени чрез метод на биоконверсия на растителен материал, съдържащ нишесте и пробиотични микроорганизми.

Целта на тази работа е да се проучи въздействието на щам *Bacillus*, като се използва Bacillus subtilis № 2-амилолит върху количеството захар и общ азот във фуражната меласа.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Бактериалният щам Bacillus subtilis № 2-амилолитик е изолиран през 2013 г. от S. A Donkov, член на екипа на Изследователския институт по животновъдство Красноярск и прехвърлен в националния патентен депозит във Всерусийската колекция от промишлени микроорганизми (ARCIM), където е доказано, че щамът произвежда амилолитичен ензим.

Изследването е проведено в лабораториите на Красноярския изследователски институт по животновъдство и Института по биофизика на Федералния изследователски център «Красноярски научен център на Руската академия на науките».

Култура на щам Bacillus subtilis № 2-амилиотик е прибавена към меласа от ръжено зърно, произведено в развъдна ферма "Таежни" ООД, в Сухобузимски район, Красноярска област, която се използва за хранене на млекодайни крави. За приготвянето на меласа се използва комплексното въздействие на кавитация, йонизация и ферментация, в съответствие с методически препоръки (Motovilov, 2015).

Развъдна ферма "Таежни" ООД подготви изпитателни и експериментални проби от зърнена меласа, в

for the production or bio medicines (Antipov and Ermakova, 1990; Koroljuk, 1996; Sattorov, 2012). Milk replacers, vitamin, mineral, enzyme feed additives are enriched with them (Bacillus subtilis) (Ivanova, 2006).

Nowadays, it is not enough feed additives for farm animals, produced by a method of bioconversion of starch-containing plant material and containing probiotic microorganisms.

The aim of this work is to study the effect of strain of Bacillus, using Bacillus subtilis No. 2-amylolitic on the amount of sugar and total nitrogen in the feed molasses.

## MATERIAL AND METHODS

Bacterial strain Bacillus subtilis No. 2-amylolitic was secreted in 2013 by S. A. Donkov, a staff member of Krasnoyarsk Research Institute of Animal Husbandry and transferred to national patent deposit in All-Russia collection of industrial microorganisms (ARCIM), where was proved the strain produces an amylolitic enzyme.

The research was held in the laboratories of Krasnoyarsk Research Institute of Animal Husbandry and Biophysics Institute of Federal research center «Krasnoyarsk scientific center of Russian Academy of Sciences».

A culture of strain Bacillus subtilis No. 2-amylolitic was added to molasses of rye grain, produced in Breeding Farm Taezhny, Ltd, Sukhobuzimskiy region, Krasnoyarsk Krai which was used for feeding to milk cows. To prepare molasses was used a complex effect of cavitation, ionization, and fermentation in accordance with the methodical recommendations (Motovilov, 2015).

Breeding Farm Taezhny, Ltd prepared testing and experimental samples from grain molasses in

съответствие със схемата, дадена в Таблица 1.

accordance with the scheme given in Table 1.

**Таблица 1. Схема на опита**
**Table 1. Scheme experience**

| Образец/Example | Меласи / Molasses |
|---|---|
| 1во тестване | Нестерилни меласи |
| 1st testing | Non-sterile molasses |
| 1ви експеримент | Нестерилни меласи + 0,5 m/ml Bacillus subtilis № 2-амилолитик |
| 1st experimental | Non-sterile molasses + 0,5 m/ml Bacillus subtilis №2-amylolitic |
| 2ри опит | Нестерилни меласи+ 0,01 m/ml Bacillus subtilis №2-амилолитик |
| 2nd experimental | Non-sterile molasses + 0,01 m/ml Bacillus subtilis №2-amylolitic |
| 3ти опит | Нестерилни меласи + 0,05 m/ml Bacillus subtilis №2-амилолитик |
| 3rd experimental | Non-sterile molasses + 0,05 m/ml Bacillus subtilis №2-amylolitic |
| 2po тестване | Стерилни меласи |
| 2nd testing | Sterile molasses |
| 4ти опит | Стерилни меласи+ 0,5 m/ml Bacillus subtilis №2- амилолитик |
| 4th experimental | Sterile molasses + 0,5 m/ml Bacillus subtilis №2-amylolitic |
| 5и опит | Стерилни меласи + 0,01 m/ml Bacillus subtilis №2-амилолитик |
| 5th experimental | Sterile molasses + 0,01 m/ml Bacillus subtilis №2-amylolitic |
| 6и опит | Стерилни меласи + 0,05 m/ml Bacillus subtilis №2-амилолитик |
| 6th experimental | Sterile molasses + 0,05 m/ml Bacillus subtilis №2-amylolitic |

Първата тестова проба представлява първоначалната нестерилна меласа, втората – стерилизирана меласа в автоклав при 0,5 atm в рамките на 30 минути. От стерилни и нестерилни проби от меласа са получени опитни проби с добавени инокулати на Bacillus subtilis № 2.-амилолитик с различна концентрация. За тази цел в един литър ерленмайерови колби са добавени 200 ml меласа и съответното количество семенен материал. Всяка проба е подготвяна в три етапа на повторение.

И така първата тестова проба съдържа нестерилни меласи, във втората, третата и четвъртата опитни проби от нестерилни меласи са прибавени Bacillus subtilis № 2-амилолитик в количество от 0,5; 0,01; 0,05 m/ml.

Втората тестова проба съдържа стерилна меласа, а в петата, шестата и седмата опитни проби са прибавени Bacillus subtilis №2-амилолитик в количество съответно 0,5; 0,01; 0,05 m/ml.

First testing sample submitted the original non-sterile molasses, the second one – molasses sterilized in autoclave at 0,5 atm within 30 min. Out of sterile and non-sterile samples of molasses were obtained experimental samples with different concentration added inoculums of Bacillus subtilis No. 2-amylolitic. For this, in one liter Erlenmeyer flasks was poured 200 ml of molasses and the appropriate amount of seed material. Each sample was prepared in three stage repetition.

Thus, First testing sample contained the non-sterile molasses, in the second, third and fourth experimental samples of non-sterile molasses was added Bacillus subtilis № 2-amylolitic in the amount of 0,5; 0,01; 0,05 m/ml.

Second testing sample contained the sterile molasses and in the fifth, sixth and seventh experimental samples was added Bacillus subtilis №2-amylolitic in amount of 0,5; 0,01; 0,05 m/ml correspondingly.

Инкубацията продължи 48 часа при 37 ± 0,5 °C. 48 часа след добавяне на микроорганизмите се определи съдържанието на захар и азот.

Duration of incubation was 48 hours at 37±0,5°C. In 48 hours after adding microorganisms the sugar content and nitrogen were determined.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

След 48-часова инкубация на бактериален щам Bacillus subtilis № 2-амилолитик, използвайки растителна меласа, става частична хидролиза на нишесте, като по този начин се намалява съдържанието на нишесте, и същевременно се увеличава съдържанието на олиго- и монозахариди. Те от своя страна, бидейки субстрат за растеж на бактерията Bacillus subtilis № 2-амилолитик, могат да бъдат разположени заедно с тях и в резултат на това да се увеличи концентрацията на бактерии в биомасата.

Съдържанието на меласа преди и след стерилизация е в границите на грешката при измерването и е почти идентична. След добавяне на инокулуми в различни концентрации и последващ инкубационен период, се определя съдържанието на основните компоненти в пробите от частичните продукти на биоконверсия. В нестерилни меласи, в допълнение към бактериалния щам Bacillus subtilis № 2-амилолитик може също така да се развият "диви" видове микроорганизми.

В Таблица 2 са представени резултатите от изследването на въздействието на Bacillus subtilis № 2-амилолитик чвърху количеството захар и общ азот в меласа, произведени от зърно от ръж.

Съгласно данните в Таблица 2, най-високото съдържание на захар и минималното съдържание на азот е в стерилната меласа (2-$^{po}$ тестване) – съответно 85.4 g/kg и 1,9 g/kg. Малко по-малко от общите захари има в нестерилната меласа. Предполага се, че при отсъствие на субстратни бактерии Bacillus subtilis, № 2-амилолитик биоконверсията на въглехидратите е незначителна, дори и в присъствието на нестерилни меласи от "диви" видове микроорганизми.

## RESULTS AND DISCUSSION

After 48-hour incubation of the bacterial strain Bacillus subtilis No. 2-amylolitic using crop molasses is a partial hydrolysis of starch, thereby reducing starch content, at the same time increasing the content of oligo- and monosaccharides.

The latter, in turn, being a substrate for the growth of bacteria Bacillus subtilis No. 2-amylolitic, they can be disposed with them and as a result increasing biomass concentration of bacteria.

The content of the molasses before and after sterilization was in the limits of measurement error and almost identical. After adding inoculums in a different concentrations and the subsequent incubation period the content of the main components in the samples of the partial products of bioconversion was determined. In non-sterile molasses in addition to the bacterial strain Bacillus subtilis No. 2-amylolitic might also grow «wild» species of microorganisms.

In Table 2 presents the results of research of the effect of Bacillus subtilis No. 2-amylolitic on the amount of sugar and total nitrogen in molasses made from grain of rye.

According to the data in Table 2 the highest total sugar content and minimum nitrogen content was in the sterile molasses (2$^{nd}$ testing sample) – 85.4 g/kg and 1.9 g/kg, correspondingly. A little less of the total sugars was in a non-sterile molasses. It is suggested that in the absence of substrate bacteria Bacillus subtilis No. 2-amylolitic bioconversion of carbohydrates is negligible, even in the presence of non-sterile molasses «wild» species of microorganisms.

**Таблица 2. Количеството захар и общ азот в меласа, произведена от ръжено зърно**

**Table 2. The amount of sugar and total nitrogen in molasses made from grain of rye**

| Проби/Samples | Количество/Amount | |
|---|---|---|
| | захар/sugar g/kg | общ азот/total nitrogen g/kg |
| 1во тестване/1st testing | 85,1 | 1,90 |
| 1ви опит /1st experimental | 54,2 | 2,56 |
| 2ри опит/2nd experimental | 58,5 | 2,81 |
| 3ти опит /3rd experimental | 59,0 | 3,85 |
| 2ро тестване/2nd testing | 85,4 | 1,90 |
| 4ти опит /4th experimental | 57,2 | 2,82 |
| 5ти опит /5th experimental | 57,5 | 2,92 |
| 6и опит /6th experimental | 61,5 | 3,86 |

В същото време най-голямо понижение на съдържанието на общи захари е наблюдавано при добавянето на най-голямото количество инокулум (0,5 милиона/ml). В този случай съдържанието на азот се увеличава до максимално ниво. Това показва, че участието на азот в съдържанието на микробния протеин повишава концентрацията на биомасата. Очевидно е, че увеличаването на концентрацията на биомаса в микробните клетки ще доведе до намаляване съдържанието на остатъчните захари. Като се вземат предвид най-вероятните стойности на икономическия фактор от 0.4-0.5, на 1 g биомаса трябва да се разпределят до 2 или повече грама въглерод.

At the same time, the highest decrease in the content of total sugars was observed in case of adding the largest quantity of inoculum (0.5 million/ml). In this case the content of nitrogen increases at a maximum level. It indicates nitrogen inclusion in content of microbial protein when raising the concentration of biomass. It is obvious that the increase of biomass concentration of the microbial cells, the content of residual sugars will be reduced. Taking into account the most probable values of the economic factor of 0,4-0,5 per 1 g of biomass must be allocated up to 2 or more grams of the carbonaceous

## ИЗВОДИ

Най-високото съдържание на обща захар и минимално съдържание на азот е в стерилната меласа (2-ро тестване) – съответно 85.4 g/kg и 1.9 g/kg. Малко по-малко от общите захари са в нестерилна меласа (85.1 g/kg). Това предполага, че при отсъствието на субстратни бактерии Bacillus subtilis, № 2-амилолитик биоконверсията на въглехидратите е незначителна, дори и в присъствието на нестерилни меласи от "диви" видове микроорганизми.

## CONCLUSIONS

The highest total sugar content and minimum nitrogen content was in the sterile molasses (2-testing sample) – 85.4 g/kg and 1.9 g/kg, respectively. A little less of the total sugars was in a non-sterile molasses (85.1 g/kg). This suggests that in the absence of substrate bacteria Bacillus subtilis No. 2-amylolitic bioconversion of carbohydrates is negligible, even in the presence of non-sterile molasses «wild» species of microorganisms.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Aksenov, V.V.**, 2014. Manufacture and installation of technological complexes for processing of grain molasses for feed. Food. Ecology. Quality: Ekaterinburg, pp. 13-15 (Ru).
2. **Motovilov, O.K.**, 2015. Nanotechology grain production of molasses for livestock breeding: guidelines for implementing in the production, Novosibirsk, pp. 60 (Ru).
3. **Antipov, V.A. and T.I. Ermakova**, 1990. Prophylactic efficiency of probiotics. Prevention and control measures against diseases of young farm animals, Minsk, pp. 80 (Ru).
4. **Koroljuk, A.M.**, 1996. Constructing new medicine and therapeutic products directed for correction of microecological status of the organism. Infectology, achievements and prospects, St. Petersburg, pp. 125 (Ru).
5. **Sattorov, N.R.**, 2012. Production technology of probiotics based on Bacillus subtilis and their therapeutic-prophylactic efficiency in infectious enteritis of calves. Thesis of doctor of veterinary Sciences, Dushanbe, pp. 36 (Ru).
6. **Kuvaeva, I.B.**, 1976. Metabolism and intestinal microflora. Moscow. Medicine, pp. 148-160 (Ru).
7. **Brotukhin, I.I.**, 1999. Correction of meat products of cattle in ontogenesis through the use of probiotics: problems of increasing the production of competitive food products and improve the quality of agricultural raw materials. Volgograd, pp. 191-194 (Ru).
8. **Ivanova, O.V.**, 2006. Hematological parameters of broiler chickens feeding biologically active substances. Achievements of poultry farmers in the implementation of the national project of agricultural development. Kurgan, pp. 64-671 (Ru).