Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (6), 37-43 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Взаимовръзка между сорта, междуредовото разстояние и възрастта на люцерновите посеви и повредата от ларвата на люцерновия сечко (*Plagionotus floralis* Pall.) (Coleoptera: Cerambycidae)

Евгения Жекова

Институт по земеделие и семезнание „Образцов чифлик”, 7007 Русе, България

Interrelationship between the variety, distance between rows and age of alfalfa plants and the damage from the larvae of alfalfa longhorn beetle (*Plagionotus floralis* Pall.) (Coleoptera: Cerambycidae)

Evgeniya Zhekova

Institute of Agriculture and Seed Science "Obraztsov chiflik", 7007, Rousse, Bulgaria
E-mail: e.d.zhekova@abv.bg

Received: 07.08.2018 *Accepted:* 18.12.2018 *Published:* 27.12.2018

РЕЗЮМЕ

Люцерната (*Medicago sativa* L.) е основна тревно-фуражна култура в България. Кореновата ú система е гостоприемник на голям брой насекомни неприятели, сред които с важно икономическо значение е люцерновият сечко *Plagionotus floralis* (Pallas 1776) (Coleoptera: Cerambycidae). През периода 2010-2015 г. в опитното поле на ИЗС „Образцов чифлик” - Русе са изведени полски опити с люцерна, които включват три сорта: „Плевен 6”, „Приста 3” и „Многолистна 1” на възраст от една до четири години при междуредово разстояние 12,5 и 70 cm. Броят на растенията със здрави и повредени корени е определен в лабораторни условия след разрязването им. Целта на изследването е да се определи количеството (%) на повредените растения в зависимост от сорта люцерна, възрастта на растенията и между-

SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a major grass-fodder crop in Bulgaria. Its root system is the host of a large number of insect pests, among which economically important is the alfalfa longhorn beetle *Plagionotus floralis* (Pallas 1776) (Coleoptera: Cerambycidae). During the period 2010-2015, field experiments with alfalfa were carried out in the experimental field of the IASS "Obrazcov Chiflik" - Rousse, which included three varieties: „Pleven 6”, „Prista 3” and „Mnogolistna 1” at ages one to four years at distance between rows of 12,5 and 70 cm. The number of plants with healthy and damaged roots is determined in the laboratory after their cutting.

The aim of the study is to determine the amount (%) of the damaged plants depending on the alfalfa variety, the plant age and the distance between rows. It

редовото разстояние. Установено е, че факторите сорт люцерна („Плевен 6", „Приста 3" и „Многолистна 1") и междуредово разстояние (12,5 cm и 70 cm), не оказват значимо влияние върху относителното количество на повредените растения от ларвите на люцерновия сечко. Количеството на повредените растения и при трите сорта нараства с повишаване на тяхната възраст.

Ключови думи: люцерна, *Plagionotus floralis*, повреда, сорт, възраст, междуредово разстояние

was found that alfalfa variety („Pleven 6", „Prista 3" and „Mnogolistna 1") and distance between rows (12,5 cm and 70 cm) factors did not have a significant effect on the relative amount of the damaged plants from the alfalfa longhorn beetle larvae. The amount of damaged plants in all three varieties increases with increasing their age.

Key words: alfalfa, *Plagionotus floralis*, damage, variety, age, distance between rows

УВОД

Plagionotus floralis е сред по-важните насекомни неприятели по люцерната в районите на Саратов и Краснодар в Русия (Sakharov, 1923; Koval et al., 1998) и в голяма степен е отговорен за разреждането на старите люцернови посеви в Румъния (Mitrjuskin, 1940) и Сърбия (Đukić and Erić, 1995).

Подобно е мнението и на други автори, според които по-старите и заплевелени люцернови посеви се предпочитат, защото цъфтящите растения в тях са източник на храна за възрастните насекоми. В Дулово (област Силистра) в две-тригодишна люцерна Popova (1968) наблюдава 20-30% повреда от люцерновия сечко, а след третата година – 60-80%. За повреда до 100% от ларвите на *Pl. floralis* в по-старите люцерни в селата Марково и Опълченец (Чирпанска околия) и за средни загуби в нападнатите райони между 10 и 30% съобщава и Chorbadjiev (1930, 1932). Информация за 70-80% повредени растения в 6-7 - годишна люцерна в Кубрат дава и Makarov (1968).

Nikolova and Kertikova (2008) установяват, че с нисък процент на повреда от ларвата на люцерновия сечко са сортовете „Дара" (17,4%) и „Приста 2" (28,6%). По-силно нападнати са индивидуалните растения, отглеждани на по-голяма хранителна площ, при които нападението е средно 62,0%,

INTRODUCTION

Plagionotus floralis is one of the most important insect pests in alfalfa in the areas of Saratov and Krasnodar in Russia (Sakharov, 1923; Koval et al., 1998) and is largely responsible for the dilution of the old alfalfa crops in Romania (Mitrjuskin, 1940) and Serbia (Đukić and Erić, 1995).

Similar is the opinion of other authors, according to which older and weedy alfalfa crops are preferred because the flowering plants in them are a source of food for adult insects. In the village of Dulovo (Silistra region) in two-three years old alfalfa Popova (1968) observed 20-30% damage from the alfalfa longhorn beetle, and after the third year – 60-80%. For damage up to 100% of the larvae of *Pl. floralis* in the older alfalfa in the villages of Markovo and Opalchenets (Chirpan district) and for average losses in the attacked areas between 10 and 30% reported also Chorbadjiev (1930, 1932). Information about 70-80% damaged plants in 6-7 - years of alfalfa in Kubrat also gives Makarov (1968).

Nikolova and Kertikova (2008) found that with a low percentage of damage from the larvae of the alfalfa longhorn beetle were the varieties Dara (17,4%) and Prista 2 (28,6%). More strongly attacked are the individual plants grown in the larger food area, in which the attack is on average 62.0%, while the докато при посевите е значително по-ниско – 27,3%. Сортовете „Дара” и „Приста 2” са с установена ниска степен на смесена повреда от почвени неприятели и могат да бъдат подходяща зародишна плазма за толерантност към *Pl. floralis*.

Целта на настоящото изследване е определяне количеството на повредените растения от ларвата на люцерновия сечко (*Plagionotus floralis* Pall.) при три сорта люцерна в зависимост от междуредовото разстояние и възрастта на посевите.

crop is significantly lower – 27.3%. The "Dara" and "Prista 2" varieties have a low degree of mixed damage from soil pests and may be suitable for plasma tolerance to *Pl. floralis.*

The aim of this study is to determine the quantity of plants damaged from the larvae of alfalfa longhorn beetle (*Plagionotus floralis* Pall.) in three alfalfa varieties depending on the age and distance between rows of crops.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталната работа е извършена през периода 2010-2015 г. в опитното поле и лабораторията по ентомология на ИЗС „Образцов чифлик” - Русе. Полските парцелни опити са проведени с три сорта люцерна: „Плевен 6” (стандарт), „Приста 3” (един от най-разпространените сортове в производството) и „Многолистна 1” (сорт люцерна с многоделен тип листа) на възраст от една до четири години (Таблица 1).

MATERIAL AND METHODS

The experimental work was carried out during the period 2010-2015 in the experimental field and laboratory of entomology of IASS "Obraztsov Chiflik" - Rousse. The field parcel trials were conducted with three alfalfa varieties: „Pleven 6” (standard), „Prista 3” (one of the most common varieties in production) and „Mnogolistna 1” (multifoliolate type of alfalfa variety) aged one to four years (Table 1).

Таблица 1. Схема на полските опити за изследване влиянието на междуредовото разстояние и възрастта на люцернови сортове върху вредната дейност на *Plagionotus floralis* Pall.
Table 1. Scheme of the field trials to study the effect of the distance between rows and the age of alfalfa varieties on the harmful activity of *Plagionotus floralis* Pall.

Година Year	Междуредово разстояние/Distance between rows Възраст на люцерната/Age of alfalfa			
	12,5 cm			70 cm
	1 вариант/1 variant	2 вариант/2 variant	3 вариант/3 variant	
2010	сеитба/sowing			
2011	2-годишна/2-year old	сеитба/sowing		сеитба/sowing
2012	3-годишна/3-year old	2-годишна/2-year old	сеитба/sowing	2-годишна/2-year old
2013	4-годишна/4-year old	3-годишна/3-year old	2-годишна/2-year old	3-годишна/3-year old
2014		4-годишна/4-year old	3-годишна/3-year old	4-годишна/4-year old
2015			4-годишна/4-year old	

При опита със слят посев (12,5 cm междуредово разстояние) всеки вариант включва сеитба на трите сорта в 4 повторения. Една опитна парцела е с площ 2 m^2 (1,25 m x 1,6 m). Отделните парцели са разположени по перпендикулярния метод с рандомиза-

In a trial with thick sowing (12.5 cm distance between rows), each variant involves sowing the three varieties in 4 replications. An experimental plot has an area of 2 m2 (1,25 m x 1,6 m). The plots are situated in the perpendicular method with randomization (Shanin, 1977;

ция (Shanin, 1977; Dimova and Marinkov, 1999) и са отделени един от друг с охрани широки 1 m (Фигура 1).

Dimova and Marinkov, 1999) and are separated from each other by security strip of 1 m wide (Figure 1).

III повторение/III replication			IV повторение/IV replication		
„Приста 3” „Prista 3”	„Много-листна 1” “Mnogo-listna 1”	„Плевен 6” „Pleven 6”	„Много-листна 1” „Mnogo-listna 1”	„Приста 3” „Prista 3”	„Плевен 6” „Pleven 6”
„Плевен 6” „Pleven 6”	„Приста 3” „Prista 3”	„Много-листна 1” „Mnogo-listna 1”	„Приста 3” „Prista 3”	„Плевен 6” „Pleven 6”	„Много-листна 1” „Mnogo-listna 1”
I повторение/I replication			II повторение/II replication		

Фиг. 1. Схема на опит с междуредие 12,5 cm (2010-2015)
Fig. 1. Scheme of field trial with 12,5 cm distance between rows (2010-2015)

През октомври-ноември, от 4-те повторения на всеки сорт през периода на изследването, са извадени растенията от 0,25 m^2 на дълбочина 15-20 cm, корените на всички растения са разряни в лабораторна обстановка и е отчетен броят растения със здрави и повредени корени.

Опитът с широкоредов посев (70 cm междуредово разстояние) е с обща площ 23,8 m^2 (11,9 m x 2 m) и включва 18 реда (по 6 реда от трите изследвани сорта, наредени по тройки), всеки с дължина 2 линейни m. През октомври-ноември от всеки сорт са извадени растенията от 1 линеен m на дълбочина 15-20 cm в три повторения и са разрязани в лабораторна обстановка. Отчетен е броят растения със здрави и повредени корени.

Статистическата обработка на данните е извършена с програмата SPSS 16.0 for Windows при ниво на достоверност P≤0,05.

In October-November, of the four replications of each variety during the study period, the plants of 0.25 m^2 were removed at a depth of 15-20 cm, the roots of all plants were dissected in a laboratory conditions, and the number of plants with healthy and damaged roots was counted.

The trial with wide sowing (70 cm distance between rows) have a total area of 23,8 m^2 (11,9 m x 2 m) and include 18 rows (6 rows of the three tested varieties arranged in triples) each with a length of 2 linear m. In October-November of each variety were removed plants from 1 linear m at a depth of 15-20 cm in triplicate and dissected in a laboratory conditions. The number of plants with healthy and damaged roots was counted.

Statistical processing of the results was performed using the program SPSS 16.0 for Windows (www.spss.com) at a level of confidence P≤0,05.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати показват, че при слята сеитба няма доказана разлика в количеството на повредените растения в зависимост от сорта. Степента на повреда нараства от едного-

RESULTS AND DISCUSSION

The obtained results show that there is no proven difference in the quantity of the damaged plants depending on the variety. The degree of damage is increasing from one-year old to four-year дишните до четиригодишните посеви, в които е установен и най-високият процент повредени растения (Таблица 2).

old crops, where the highest percentage of damaged plants is detected (Table 2).

Таблица 2. Процент повредени растения от ларвите на *Plagionotus floralis* Pall. при три сорта люцерна в зависимост от междуредовото разстояние (2010-2015)
Table 2. Percentage of damaged plants of the larvae of *Plagionotus floralis* Pall. for three alfalfa varieties depending on distance between rows of crops (2010-2015)

Възраст на посевите Age of crops	N	Повредени растения/Damaged plants, %						
		„Плевен 6” „Pleven 6”		„Приста 3” „Prista 3”		„Многолистна 1” „Mnogolistna 1”		
		m±SE	**RSE %**	**m±SE**	**RSE %**	**m±SE**	**RSE %**	
		междуредие 12,5 cm/distance between rows 12,5 cm						
1-год./1-year	12	0,28±0,11	39,28	0,56±0,25	44,64	0,90±0,37	41,11	P=0,27*
2-год./2-year	12	4,18±1,30	31,10	4,16±0,93	22,35	5,19±1,44	27,74	P=0,79*
3-год./3-year	12	7,63±1,08	14,15	10,56±2,08	19,70	7,79±1,30	20,54	P=0,37*
4-год./4-year	12	18,64±3,54	18,99	13,77±2,05	14,89	19,15±3,88	20,26	P=0,44*
		междуредие 70 cm/distance between rows 70 cm						
1-год./1-year	3	0,88^{a}±0,45	51,13	2,95^{a}±1,11	37,63	7,53^{b}±1,19	15,80	P=0,03*
2-год./2-year	3	5,50±2,77	50,36	1,81±1,07	59,12	2,80±1,16	41,43	P=0,40*
3-год./3-year	3	25,07±5,17	20,62	30,39±3,3	10,96	32,29±11,3	34,93	P=0,78*
4-год./4-year	3	20,50±4,01	19,56	8,86±1,17	13,20	16,79±4,47	28,41	P=0,15*

N **–** брой повторения/number of replications; * -Тест за същественост на разликите между средните аритметични величини/Significance test of differences between mean arithmetic values: One way ANOVA: LSD Post Hoc test; RSE% - относителна стандартна грешка/relative standard error; $^{a,\ b}$- разликите доказани при P<0.05/the differences proved at P <0.05.

В две-, три- и четиригодишните варианти на широкоредовия посев (Таблица 2) не са установени съществени разлики в количеството на повредените растения, което потвърждава, че изследваните три сорта люцерна не влияят върху степента на повреда от ларвите. Следва да се отбележи, че за разлика от посевите със слята сеитба, в широкоредовия посев люцерновият сечко е най-опасен за тригодишните растения, при които е отбелязано и най-голямо количество повреди – от 25,07% („Плевен 6”) до 32,29% („Многолистна 1”).

Доказано по-силно влияние върху вредоносността на ларвите оказва възрастта на люцерновите посеви (Таблица 3). При междуредово разстояние 12,5 cm количеството на повредените растение и при трите сорта нараства с тяхната възраст и е най-голямо при три- (9,76%) и четиригодишните (12,87%) посеви на сорт „Приста 3”, и четиригодишните на сорт „Плевен 6” (17,84%) и сорт „Многолистна 1” (14,24%).

In the two-, three- and four-year old variants of the wide sowing crop (Table 2) no significant differences were found in the quantity of the damaged plants, which confirms that the three alfalfa tested varieties did not affect the degree of damage of the larvae.

It should be noted that, unlike thick sowing, in the wide sowing crop the alfalfa longhorn beetle is the most dangerous for the three-year plants, with the highest number of damages – from 25.07% („Pleven 6") to 32.29% („Mnogolistna 1").

A proven effect on larval damage is the age of alfalfa crops (Tabl. 3). At a distance between rows of 12.5 cm, the quantity of the damaged plants in all three varieties increases with their age and is highest for the three- (9.76%) and the four-year old (12.87%) crops of „Prista 3” variety; the four-year old of „Pleven 6” variety (17.84%) and the „Mnogolistna 1” variety (14.24%).

Таблица 3. Процент повредени растения от ларвите на *Plagionotus floralis* Pall. при три сорта люцерна в зависимост от възрастта на посева (2010-2015)
Table 3. Percentage of damaged plants of the larvae of *Plagionotus floralis* Pall. for three alfalfa varieties depending on the age of the crop (2010-2015)

Възраст на посевите Age of crops	N	Повредени растения/Damaged plants, %					
		„Плевен 6" „Pleven 6"		„Приста 3" „Prista 3"		„Многолистна 1" „Mnogolistna 1"	
		mediana	Q_{25}-Q_{75}	mediana	Q_{25}-Q_{75}	mediana	Q_{25}-Q_{75}
		междуредие 12,5 cm/distance between rows 12,5 cm					
1-год./1-year	12	0,00[a]	0,00-0,79	0,00[a]	0,00-1,17	0,27[a]	0,00-1,31
2-год./2-year	12	2,58[b]	1,56-6,49	4,40[b]	0,65-6,53	4,60[b]	0,32-9,88
3-год./3-year	12	8,11[b]	6,37-9,68	9,76[c]	5,56-14,70	6,86[b]	3,69-9,29
4-год./4-year	12	17,84[c]	8,31-28,46	12,87[c]	8,93-16,41	14,24[c]	9,64-30,86
		a, b, c - разликите доказани при P<0.03**/ a, b, c - the differences proved at P <0.03**		a, b, c - разликите доказани при P<0.01**/ a,b,c - the differences proved at P <0.01**		a, b, c - разликите доказани при P<0.03**/ a,b,c - the differences proved at P <0.03**	
		междуредие 70 cm/distance between rows 70 cm					
		m±SE	RSE %	m±SE	RSE %	mediana	Q_{25}-Q_{75}
1-год./1-year	3	0,88[a]±0,45	51,13	2,95[a]±1,11	37,63	8,57[a]	5,15-8,86
2-год./2-year	3	5,50[a]±2,77	50,36	1,81[b]±1,07	59,12	1,67[b]	1,59-5,13
3-год./3-year	3	25,07[b]±5,17	20,62	30,39[c]±3,3	10,96	21,67[c]	20,41-54,84
4-год./4-year	3	20,50[b]±4,01	19,56	8,86[a]±1,17	13,20	12,50[c]	11,54-26,32
		a, b - разликите доказани при P<0.05*/ a, b - the differences proved at P <0.05*		a, b, c - разликите доказани при P<0.05*/ a,b, c - the differences proved at P <0.05*		a, b, c - разликите доказани при P=0.05**/ a,b, c - the differences proved at P <0.05*	

N – брой повторения/number of replications; Тест за същественост на разликите между средните величини/Significance test of differences between mean values: *One way ANOVA test: LSD Post Hoc test; ** - Kruskal-Wallis test: Mann-Whitney U test; RSE% - относителна стандартна грешка//relative standard error; Q_{25} -Q_{75} – първо (25%) и трето (75%) нива на квантилите/ first (25%) and third (75%) quantile levels

Широкоредовият посев се отличава с по-голямо вариране на изследвания показател по отношение възрастта на растенията при отделните сортове. С доказано най-голям процент на повреда са три- и четиригодишните растения от сорт „Плевен 6" и „Многолистна 1", и тригодишните от сорт „Приста 3". Характерно за вариантите с широкоредова сеитба е и по-голямата относителна стандартна грешка при едно- и двегодишните растения на сорт „Плевен 6" и „Приста 3", и при две-, три- и четиригодишните растения на сорт „Многолистна 1", надвишаваща значително допустимата ú максимална стойност за полски изследвания от 25% (Dytham, 2003). Причина за това са малкият брой изследвани проби и по-голямото им вариране около средната оценка.

The wide sowing crop is distinguished by a greater variation on the indicator for the age of plants of the different varieties. The three- and four-year old plants of „Pleven 6" and „Mnogolistna 1" varieties and the three-year old plants of „Prista 3" variety have proven the highest rate of damage.

Characteristic of wide sowing variants is also the larger relative standard error for one- and two-year old plants of „Pleven 6" and „Prista 3" varieties and for two-, three- and four-year old plants of „Mnogolistna 1" variety, its exceed maximum value for field studies of 25% (Dytham, 2003). This is due to the small number of samples tested and their greater variation around the average score.

ИЗВОДИ

1. Факторите сорт люцерна („Плевен 6", „Приста 3" и „Многолистна 1") и междуредово разстояние (12,5 cm и 70 cm) за периода на изследването не оказват значимо влияние върху относителното количество на повредените растения от ларвите на люцерновия сечко.

2. Факторът възраст на растенията за периода на изследването оказва доказано влияние върху вредоносността на ларвите. Количеството на повредените растения и при трите сорта нараства с тяхната възраст.

CONCLUSIONS

1. The factors alfalfa variety („Pleven 6", „Prista 3" and „Mnogolistna 1") and distance between rows (12,5 cm and 70 cm) during the study period did not have a significant influence on the relative amount of the damaged plants from the larvae of the alfalfa longhorn beetle.

2. The plant age factor during the study period has a proven effect on the larval damage. The quantity of the damaged plants in all three varieties increases with their age.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторът изказва своите най-сърдечни благодарности на доц. д-р Христина Кръстева за помощта при интерпретацията на получените резултати.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author expresses her most sincere thanks to Assoc. Prof. Dr. Hristina Krusteva for the help in interpreting the obtained results.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Chorbadjiev, P.**, 1930. Notes on some harmful insects on crop plants in Bulgaria in 1928 and 1929. *Izvestiya na bulgarskoto entomologichno druzhestvo*, book V, 63-106 (Bg).
2. **Chorbadjiev, P.**, 1932. Pests on cultivated plants in Bulgaria in 1928 and 1929 years, *Svedeniya po zemedelieto*, XIII(1-2), 3-63 (Bg).
3. **Dimova, D. and E. Marinkov**, 2005. Experimental design and biometrics. Academic Publishing House of the Agrarian University, Plovdiv (Bg).
4. **Đukić, D. and P. Erić**, 1995. Lucerka, Novi Sad, 150 (Sr).
5. **Dytham, C.**, 2003. Choosing and Using Statistics. A Biologist'Guide, Second Edition. Blackwell Publishing company, London, pp. 248.
6. **Koval, A., S. Russkih, A. Sinitsina and A. Devyatkin**, 1998. Features of ecological protection against phytophagous and use of pollinator insects in the production of alfalfa seeds [in the Krasnodar territory][Agrotechnical and chemical methods for controlling insect pests]. *Production of environmentally safe crop products*, 4, 141-150 (Ru).
7. **Makarov, M.**, 1968. Alfalfa longhorn beetle. *Rastitelna zashtita*. 2, 13-18 (Bg).
8. **Mitrjuskin K.,** 1940. *Plagionotus floralis* Pall. and the protection of Lucerne sowings. *Sotsialisticheskoe Zernovoe Khozyaistvo*, 5, 117-120 (Ru).
9. **Nikolova, I. and D. Kertikova**, 2000. Comparative evaluation of Lucerne accessions according to degree of attack by some soil insect pests. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 11(1), 48-59.
10. **Popova, V.**, 1968. Entomofauna of alfalfa. BAN, Sofia (Bg)
11. **Sakharov, N.**, 1923. Report of the Entomological Department for the Years 1916-1923. *Trans. Saratov Agric. Expt. Sia*., 2 (Ru).
12. **Shanin, Y.**, 1977. Methodology of field trial. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, pp. 96-97 (Bg).

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (6), 44-56
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Сравнително изпитване на сортове и популации звездан (*Lotus corniculatus* L.)

Ирена Голубинова

Институт по фуражните култури, бул.“Генерал Владимир Вазов“ 89, 5800 Плевен, България

Comparative testing of varieties and local populations birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.)

Irena Golubinova

Institute of Forage Crops, 89 General Vladimir Vazov, 5800 Pleven, Bulgaria
E-mail: golubinova@abv.bg

Received: 14.11.2018 *Accepted:* 18.12.2018 *Published:* 27.12.2018

РЕЗЮМЕ

Проучването е проведено в периода 2016-2017 г. в Институт по фуражните култури - Плевен. Оценена е фенотипната изменчивост по продуктивност на свежа биомаса и обуславящите компонети при 16 генотипа звездан (*Lotus corniculatus* L.), произхождащи от различни еколого-географски райони на Европа и България с цел отбор на елитни растения и включването им в селекционни програми. Установено е недостоверно превишаване по количествени параметри обуславящи продуктивността от свежа биомаса при сорт Leo, но с отчетена по-малка преживяемост.

С най-голяма продуктивност на свежа биомаса и преживяемост при изследваните сортове звездан е българският сорт използван за стандарт Търговище 1, а при популациите австрийските Stamm GH01 и Stamm GH02, както и българските Локални популации 1 и 2, елитни растения от които ще бъдат включени като родителски компоненти на синтетична популация. Най-голямо влияние при формиране на добива при генотипове-

SUMMARY

The study was conducted in the period 2016-2017 at the Institute for Forage Crops - Pleven. The phenotypic variability in productivity of fresh biomass and the determinant components of 16 genotypes of Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.), originating from different ecological geographic regions of Europe and Bulgaria are evaluated for the purpose of selection of elite plants and their inclusion in selection programs. They are established unproven differences in quantitative parameters determining the productivity of fresh biomass in variety Leo, but reported lower survival.

The greatest yield of fresh biomass and survival of the tested varieties birdsfoot trefoil is Bulgarian variety used for standard Targovishte 1, and in Austrian populations Stamm GH01 and Stamm GH02, as well as the Bulgarian Local populations 1 and 2 elite plants of which will be included as parental components of synthetic population.

The greatest influence in the formation of yield in genotypes birdsfoot trefoil,

те звездан, независимо от годината на проучване оказва височината на стъблата, отколкото техният брой.

Ключови думи: *Lotus corniculatus*, селекция, сортове, популации

УВОД

Бобовите растения играят важна роля като компоненти на смесите и тревните съобщества за устойчиво земеделие (Naydenova et al., 2013; Vasileva, 2011; Vasileva and Vasilev, 2012; Bozhanska et al., 2016; Vasileva, 2017a). Звезданът (*Lotus corniculatus* L.) е многогодишна бобова фуражна култура с балансиран химичен състав, която е ценен компонент при създаването на изкуствени пасища и производство на фураж (Churkova, 2006b, 2008, 2009, 2012, 2013; Valkov and Chiurazzi, 2016; Vasileva, 2017b). Продуктивността, качеството и устойчивостта на тревостоите зависят от избора на вид и сорт (Naydenova and Mitev, 2015).

Звезданът (*Lotus corniculatus* L.) е широко разпространен в средиземноморския регион (Grant and Niizeki, 1999). Местните популации са с множество важни стопански признаци, които са добре приспособени към местните екологични условия. Факт е, че аклиматизираните екотипове осигуряват по-добри добиви от интродуцираните популации и сортове (Churkova, 2006a; Radić et al., 2013).

Вариабилността на големия брой стопански признаци е много важна за идентифициране на най-продуктивните генотипове и използването им в понататъшни селекционни програми (Gatarić et al., 2013). Разбирането на връзките между морфологичните, екогеографските и химичните характеристики на звездана, може да бъде полезно за ефективното използване на различни генетични плазми (Vuckovic et al., 2007). Изборът и характеристиката на генетичната плазма и първоначалната генетична вариация представляват основата на селекционните програми (Prosperi et

regardless of year of study proves the height of the stems rather than their number.

Key words: *Lotus corniculatus*, breeding, variety, populations

INTRODUCTION

The legumes have important role such as components of mixtures and grassland ecosystem for sustainable agriculture (Naydenova et al., 2013; Vasileva, 2011; Vasileva and Vasilev, 2012; Bozhanska et al., 2016; Vasileva, 2017a). The birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) is a perennial legume grass species, which which is a valuable component in the establishment of artificial pastures and for forage production (Churkova, 2006b, 2008, 2009, 2012, 2013; Valkov and Chiurazzi, 2016; Vasileva, 2017b). Productivity, quality and resilience of the weeds depend on the choice of species and variety (Naydenova and Mitev, 2015).

The birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) is widespread in the Mediterranean region (Grant and Niizeki, 1999). The local populations are with great number of agronomically important traits that are well adapted to local ecological conditions. The fact is that acclimated ecotypes provide better production results than the introduced populations and cultivars (Churkova, 2006a; Radić et al., 2013).

Variability for the great number of agronomically traits is very important in order to identify the most productive genotypes, and to introduce them into the further breeding process (Gatarić et al., 2013). Understanding the relationships among birdsfoot trefoil morphological, ecogeographic and chemical characteristics may be useful for effective utilizing of different germplasms (Vuckovic et al., 2007). Collection and characterization of germplasm and the original genetic variation represent the basis of plant breeding programs (Prosperi et al., 1999). Therefore, the al, 1999). Ето защо, подбора на зародишна плазма, която ще бъде включена в селекционните програми, е важен етап от селекционния процес (Rumbaugh et al., 1988).

Целта на изследването е проучване потенциала на сортове и популации звездан с различен произход и отбор на елитни растения по продуктивност на фураж и дълготрайност и включването им в селекционни програми.

selection of germplasm that will be included in the breeding program is a very sensitive stage of breeding process (Rumbaugh et al., 1988).

The aim of the investigation was to study the potential of varieties and local populations of different origins and selection of elite plants based on feeding productivity and durability and inclusion in future breeding programs.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В Институт по фуражните култури - Плевен през 2016-2017 година при полски условия са изследвани 16 сорта и популации звездан (*Lotus corniculatus*) с различен произход (Таблица 1).

MATERIAL AND METHODS

At the Institute of Forage Crops - Pleven in 2016-2017, under field conditions, a 16 variety and populations of birdsfoot trefoil *(Lotus corniculatus L.)* of different origins were investigated (Table 1).

Таблица 1. Наименование и произход на сортове и популации звездан (*Lotus corniculatus* L.)
Table 1. Name and origin of variety and population from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.)

№	Наименование Name	Сорт/Популация Variety/Population	Произход Origin
1	Търговище 1/Targovishte 1	Сорт/Variety	България/Bulgaria
2	Leo	Сорт/Variety	Канада/Canada
3	Taborac	Сорт/Variety	Унгария/Hungary
4	Gran San Gabriele	Сорт/Variety	Италия/Italy
5	Bosna Lotus	Сорт/Variety	Босна и Херцеговина Bosnia and Herzegovina
6	Natural population	Локална популация Local population	Босна и Херцеговина Bosnia and Herzegovina
7	Stamm GH01	Локална популация Local population	Австрия Austria
8	Stamm GH02	Локална популация Local population	Австрия Austria
9	Локална популация 1 Local population 1	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
10	Локална популация 2 Local population 2	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
11	Локална популация 3 Local population 3	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
12	Локална популация 4 Local population 4	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
13	Локална популация 5 Local population 5	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
14	Локална популация 8 Local population 8	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
15	Локална популация 9 Local population 9	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria
16	Локална популация 10 Local population 10	Локална популация Local population	Централна Северна България Central Northern Bulgaria

Сеитбата на изпитваните сортове и популации звездан е извършена през 2015 година в съдове (диаметър 0.12 m и височина 0.17 m) с обем от 1 L^{-1}. През есента растенията с подчертана продуктивност от всеки генотип са засадени при полски условия. За контрола е използван единствения признат сорт звездан у нас Търговище 1. Всеки вариант е залаган в пет повторения.

В началото на вегетацията е отчетена преживяемостта на растенията след презимуване. През вегетацията са извършени три покосявания във фенофаза начало на цъфтеж през интервал 20-25 дни. За всеки от формираните откоси при всички варианти на опита са отчетени следните показатели: Височина и ширина на туфата, cm; Височина средно за едно стъбло, cm; Свежа и суха биомаса, g; Брой стъбла средно за едно растение; Съотношение листа:стъбла:цветове при свежата и суха биомаса; Отношение на сухото вещество в свежата биомаса, %.

Получените резултати са обработени математико – статистически с програмните продукти STATGRAPHICS Plus for Windows Version 2.1 и Statistica 10.

The varieties and populations of birdsfoot trefoil were sown in pots (0,12 m in diameter and 0,17 m in height) with a volume of 1 L^{-1} in 2015. In autumn, plants with pronounced productivity of each genotype were planted under field conditions. The only registered variety in Bulgaria, Targovishte 1, is used for control. Each variant consists of five replications.

At the beginning of the growing season, the survival of the plants after the wintering was taken into account. During the vegetation, three cuts were carried out in growth stage beginning of flowering at interval of 20-25 days. In all variants of the experiment for each cutting, the following indicators were taken into account: Height and width of the tuft, cm; Mean height per stem, cm; Fresh and dry biomass, g; Number of stems; Ratio of leaves:stems:flowers in fresh and dry biomass; Relative dry matter ratio in fresh biomass, %.

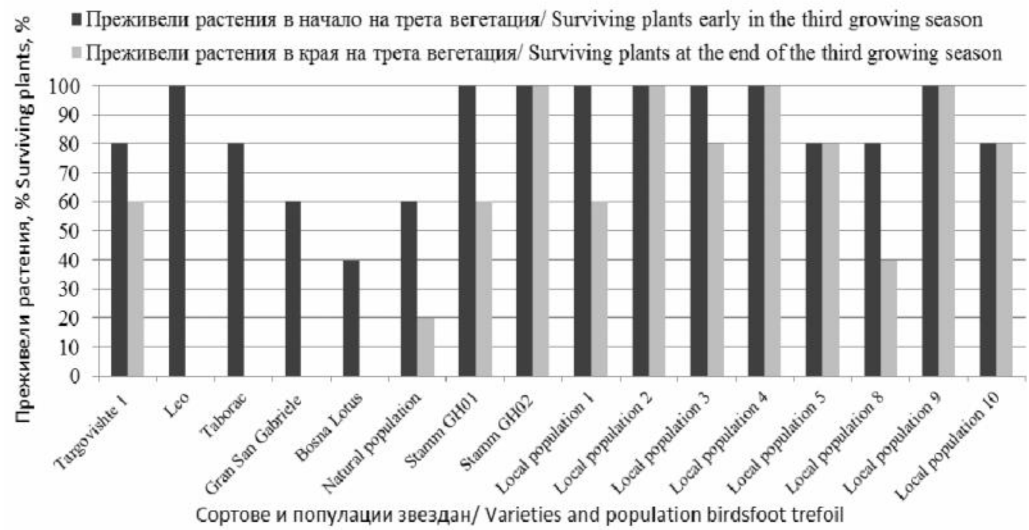
All experimental data were statistically processed using the STATGRAPHICS Plus for Windows Version 2.1 software and Statistica Ver. 10.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В началото на втора вегетацията е установена 100% преживяемост на растенията при всички генотипове звездан. В началото на трета вегетация при подрастване на първи откос преживяемостта при отделните генотипове звездан варира от 0 до 100 % (Фигура 1). Растенията при сортовете за интензивно използване Leo, Taborac, Gran San Gabriele и Bosna Lotus загинаха на 100% след първото косене. С добра устойчивост и преживяемост до края на третата вегетация са почти всички популации, които се изравняват или са с по-висока преживяемост от сорт Търговище 1.

RESULTS AND DISCUSSION

At the beginning of the second vegetation period, 100% survival of the plants was detected in all birdsfoot trefoil genotypes. At the beginning of a third progeny, the survival rate of individual star genotypes varies from 0 to 100% (Figure 1). Plants in intensive varieties Leo, Taborac, Gran San Gabriele and Bosna Lotus died 100% after the first cut. With good resistance and survival by the end of the third growing season there are almost all the populations that are equalizing or have a higher survival rate than the Targovishte 1 variety.



Фиг. 1. Преживяемост на сортове и популации звездан в началото и края на трета вегетация
Fig. 1. Survival of varieties and populations birdsfoot trefoil at the beginning and end of third vegetation period

Фенотипната изменчивост на изходните популации по продуктивност на свежа биомаса по откоси и средно за вегетацията от растение е ясно изразена (Таблица 2). При изследваните генотипове звездан са направени 4 откоса през 2016 година, а през 2017 година по 3 откоса през интервал от 20-25 дни.

През 2016 г. при повечето от вариантите на опита интензивността на натрупване на биомаса е с максимум във втори откос. С най-голямо количество свежа биомаса сумарно за вегетационния период на 2016 г. се откроява сорт Taborac, което надвишава с 28,0% това при контролата. При този сорт количеството на формираната биомаса е с максимум във втори откос (48,8 % от общото количество формирано за вегетация). В края на вегетацията от популациите с изправен хабитус – Локална популация 2 надвишава с 8,8% контролата, а при тези със стелещ тип (Локални популации 8, 9 и 10) е формирано доказано по-малко количество свежа биомаса за вегетационния период, което е от 32,7 до 59,4 % по-ниско в сравнение със сорт Търговище 1.

The phenotypic variability of the yields of fresh biomass on slopes and on average for plant vegetation is clearly expressed (Table 2). In the tested genotypes birdsfoot trefoil, 4 cuts were made in 2016 and 3 cuts in 2017 at an interval of 20-25 days.

In 2016, in most of the variants of the trial, the intensity of biomass accumulation is maximum in a second cutting. The highest amount of fresh biomass for the vegetation period in 2016 is Taborac variety, which exceeds 28.0% of the control. In this variety, the biomass formed with a maximum in the second cutting (48.8% of the total for vegetation period).

At the end of vegetation, the population of erected habitus - Local population 2 exceeds the control by 8.8%, and in the case of the straining type (Local populations 8, 9 and 10), a lesser amount of fresh biomass for the vegetation period is from 32.7 to 59.4% lower than Targovishte 1 variety.

Таблица 2. Свежа биомаса при сортове и популации звездан по откоси и общо за вегетацията (за 2016-2017 г.)
Table 2. Fresh biomass in varieties and populations birdsfoot trefoil, by cuts and average for vegetation (for 2016-2017)

Генотипове Genotypes	I откос I cutting	II откос II cutting	III откос III cuting	IV откос IV cutting	Средно за вегетация Average for vegetation
2016					
Targovishte 1	0,221abc	0,373bcd	0,159def	0,055bcde	0,807bcd
Leo	0,198abc	0,376bcd	0,194fg	0,064cde	0,823bcd
Taborac	0,257bcde	0,505cd	0,223g	0,043abc	1,033d
Gran San Gabriele	0,261bcde	0,358bcd	0,133bcde	0,031ab	0,783bcd
Bosna Lotus	0,354def	0,261abc	0,126bcde	0,022a	0,692bc
Natural population	0,258bcde	0,378cd	0,180efg	0,041abc	0,866cd
Stamm GH01	0,346bcde	0,461d	0,140cdef	0,054bcde	0,901cd
Stamm GH02	0,238abcd	0,442d	0,147cdef	0,036	0,863cd
Local population 1	0,256bcde	0,308bcd	0,134bcde	0,072e	0,771bcd
Local population 2	0,367ef	0,357bcd	0,108bcd	0,041abc	0,878cd
Local population 3	0,357def	0,314bcd	0,123bcde	0,043abc	0,765bcd
Local population 4	0,386f	0,272abc	0,096abc	0,038ab	0,792bcd
Local population 5	0,297cdef	0,317bcd	0,122bcde	0,070de	0,646bc
Local population 8	0,112a	0,211ab	0,044a	0,043abc	0,328a
Local population 9	0,148ab	0,285abc	0,078ab	0,032ab	0,543ab
Local population 10	0,112a	0,138a	0,040a	0,037ab	0,261a
Средно / Average	*0,261*	*0,335*	*0,128*	*0,045*	
2017					
Targovishte 1	0,487i	0,261e	0,101def		0,849e
Leo	0,141ab	0,000a	0,000a		0,141a
Taborac	0,128ab	0,000a	0,000a		0,128a
Gran San Gabriele	0,102a	0,000a	0,000a		0,102a
Bosna Lotus	0,217bc	0,000a	0,000a		0,217a
Natural population	0,306cde	0,161cd	0,086cde		0,553cd
Stamm GH01	0,294cde	0,349g	0,169h		0,812ef
Stamm GH02	0,320def	0,355g	0,126fg		0,800de
Local population 1	0,343efg	0,140bc	0,060bc		0,543c
Local population 2	0,425hi	0,308f	0,139g		0,872ef
Local population 3	0,641j	0,272e	0,075cd		0,987f
Local population 4	0,581j	0,202d	0,039b		0,823de
Local population 5	0,390fgh	0,290ef	0,117efg		0,796de
Local population 8	0,310de	0,123bc	0,032b		0,464bc
Local population 9	0,391gh	0,101b	0,085cd		0,577c
Local population 10	0,249cd	0,106b	0,041b		0,396b
Средно / Average	*0,333*	*0,167*	*0,067*		

За разлика от втора вегетация, през третата година при генотиповете най-голям дял от формираната биомаса за вегетацията се пада на първи откос. Изключение правят австрийските популации Stamm GH01 и Stamm GH02 с ясно изразена лятна продуктивност и по-голям дял на втори откос от общото количество биомаса за вегетация. При тях интензивността на натрупване на биомаса е с максимум във

Unlike the second vegetation period, in the third year the largest proportion of the formed biomass for vegetation period is in the first cut. The exception is the Austrian populations Stamm GH01 and Stamm GH02 with pronounced summer productivity and a larger share of the second cutting of the total biomass for vegetation. In these, the biomass accumulation intensity is maximum in second cutting (respectively втори откос (съставляващи съответно 43,0 и 44,3% от общото количество свежа биомаса за вегетацията), а сумарното количество за вегетацията не се различава съществено от контролния вариант. От българските популации с изразена лятна продуктивност през 2017 година са № 2 и 5, с дял на втори откос съответно 35,3 и 36,4%. При българските популации 3 и 4 подчертано най-голям е дяла на първи откос (съответно с 64,9 и 70,7%). С най-голямо количество свежа биомаса сумарно за вегетационния период се открояват българските популации 2 и 3 надвишаващи съответно с 2,8 и 16,3% сорт Търговище 1.

Средната дължина на стъблата при сортове и популации звездан варира по откоси и по генотип (Таблица 3). В зависимост от броя на направените откоси, се наблюдава тенденция за формиране на стъбла с най-голяма дължина при втори откос, следвана от първи, трети и четвърти откос. Изключение са наблюдава при Bosna Lotus, където стъблата формирани в първи откос надвишават с 21,8% дължината достигната при втори откос.

При първи откос сортове Gran San Gabriele, Bosna Lotus и локални популации № 1, 2, 3, 4, 5, Natural population и Stamm GH02 формират доказано по дълги стъбла, спрямо сорт Търговище 1. При втори откос тенденцията се запазва при популации № 1, 2, Stamm GH01 и Stamm GH02, а в трети единствено при Stamm GH02.

Средно за вегетацията при сортове Leo и популации Stamm GH01, Stamm GH02 и № 1 дължината на стъблата доказано надвишава установената при сорт Търговище 1 от 2,7 до 11,5% (P=0.05). Популации № 2, 3, 4, 5 и тези със стелещ хабитус (популации 8, 9 и 10) са формирали статистически доказано по-къси стебла в сравнение със сорт Търговище 1.

При сорт Търговище 1 дължината на стъблата в първи откос е най-

43.0 and 44.3% of the total biomass for the vegetation) and the total biomass for vegetation does not differ significantly from the control variant.

Of the Bulgarian populations with pronounced summer productivity in 2017 are Local population 2 and 5 with a share of second cutting, respectively 35,3 and 36,4%. In the Bulgarian populations 3 and 4 there is the largest share of the first cutting (64.9 and 70.7% respectively). With the greatest amount of fresh biomass aggregated for the vegetation period, the Bulgarian local populations 2 and 3 exceed respectively 2,8 and 16,3% Targovishte 1 variety.

The average length of the stems in the varieties and populations birdsfoot trefoil by cuts and by genotype (Table 3). Depending on the number of cuts, there is a tendency for the formation of the longest stems in the second cut, followed by the first, third and fourth cuts. An exception was observed with Bosna Lotus, where the stems formed in the first cutting exceeded by 21.8% the length reached in a second cut.

In the first cutting, Gran San Gabriele, Bosna Lotus and Local populations 1, 2, 3, 4, 5, Natural populations and Stamm GH02 form long stems compared to Targovishte 1 variety. In the second cutting, the trend is maintained for Local population № 1, 2, Stamm GH01 and Stamm GH02, and in a third cutting only at Stamm GH02.

On average for the vegetation in Leo varieties and Stamm GH01, Stamm GH02 and № 1 stems, the length of the stems proved to exceed the established in Targovishte variety 1 of 2.7 to 11.5% (P = 0.05). Local population 2, 3, 4, 5 and those with semi-prostrate habitus (populations 8, 9 and 10) have statistically proven shorter stems compared to Targovishte 1 variety.

In Targovishte 1 variety the length of the stems in the first cutting is highest висока и намалява във втори с 12,8 и 23,2% в трети откос. За разлика от контролния вариант при популации Bosna Lotus, Natural population, Stamm GH01 и № 2 и 3 е отчетена по-голяма дължина на стъблата във втори откос (от 8,8 до 28,1 %) в сравнение с тази от първи откос. В трети откос всички популациите формират най-къси стъбла в сравнение с предходните откоси.

and decreases in the second with 12,8 and 23,2% in the third cutting. Unlike the control variant, for the populations of Bosna Lotus, Natural population, Stamm GH01 and No 2 and 3, a greater length of the stems in a second cutting (from 8.8 to 28.1%) was reported compared to the first cutting. In the third cutting, all populations form the shortest stems compared to the previous cuttings.

Таблица 3. Височина на стъблото при сортове и популации звездан по откоси и средно за вегетация (за 2016-2017 г.)
Table 3. Height of the stem in varieties and populations of birdsfoot trefoil, by cuts and average for vegetation (for 2016-2017)

Генотипове Genotypes	I откос I cut	II откос II cut	III откос III cut	IV откос IV cut	Средно за вегетация Average for vegetation
2016					
Targovishte 1	37,05cd	44,12bcd	31,80fgh	17,97ef	32,73d
Leo	38,38def	49,55f	33,00h	15,53c	34,13ef
Taborac	34,83bc	49,13f	32,10gh	15,93cd	33,00de
Gran San Gabriele	40,63fgi	42,30bc	28,20e	13,20b	31,08c
Bosna Lotus	50,71g	41,63b	30,37f	13,70b	34,10ef
Natural population	41,90gh	45,60de	31,00fg	17,80ef	34,08ef
Stamm GH01	34,98bc	52,67g	32,40gh	17,43de	34,37f
Stamm GH02	39,58efg	54,52g	35,37i	16,53cde	36,50g
Local population 1	44,45i	46,43ef	31,60fgh	13,03b	33,88def
Local population 2	42,70hi	47,20ef	22,97cd	12,63b	31,38c
Local population 3	42,40hi	41,22b	21,27c	13,07b	29,49b
Local population 4	39,60efg	37,07a	19,25b	10,67a	26,65a
Local population 5	41,83gh	41,18b	21,37cd	17,20de	30,40bc
Local population 8	25,83a	43,68bcd	16,63a	20,05g	26,55a
Local population 9	38,20de	45,00cde	20,17bc	16,27cd	29,91b
Local population 10	32,82b	36,87a	15,97a	19,07fg	26,18a
Средно / Average	*39,12*	*44,89*	*26,47*	*15,63*	
2017					
Targovishte 1	37,63 fgh	32,83 bc	28,90 f		33,12 de
Leo	29,97 c	0,00 a	0,00 a		9,99 b
Taborac	18,53 a	0,00 a	0,00 a		6,18 a
Gran San Gabriele	24,87 b	0,00 a	0,00 a		8,29 ab
Bosna Lotus	33,57 cdef	0,00 a	0,00 a		11,19 b
Natural population	32,87 cde	40,28 f	28,70 f		33,95 efg
Stamm GH01	35,13 defg	45,00 g	30,90 f		37,01 fgh
Stamm GH02	38,63 ghi	47,53 g	30,53 f		38,90 h
Local population 1	32,17 cde	33,68 bcd	21,43 e		29,09 cde
Local population 2	46,83 j	38,67 ef	30,00 f		38,50 gh
Local population 3	51,57 k	38,93 ef	18,53 cd		36,34 fg
Local population 4	48,90 jk	36,77 def	16,10 c		33,92 ef
Local population 5	32,57 cde	35,43 cde	19,40 de		29,13 c
Local population 8	36,70 efgh	31,50 b	12,65 b		26,95 c
Local population 9	40,5 hi	31,63 b	18,20 cd		30,11 cd
Local population 10	32,27 cd	35,40 cde	20,63 e		29,43 c
Средно / Average	*35,79*	*27,98*	*17,25*		

Средно за вегетацияонните периоди на 2016 и 2017 година, дължината на стъблата при популациите Stamm GH01, Stamm GH02 и № 2 и 3 доказано превишават дължината при сорт Търговище 1.

На практика генерирания за вегетация добив е сумарна величина от образуваните стъбла от едно растение през отделните подрасти (Таблица 4). Установеният брой на стъблата формиращи добива от свежа биомаса за едно растение, показва ясно разграничаване между проучваните сортове и локални популации звездан и направените откоси през вегетацията. През 2016 г. с най-голям брой стъбла за вегетация се откроява Локална популация 2, при която в първи и втори откос статистически доказано превишават контралата съответно с 80,5 и 65,0%, а средно за вегетацията с 26,9% повече стъбла. Сорт Leo се откроява с формирани с 14,4% повече стъбла спрямо Търговище 1. Съответно при популации 8, 9 и 10 (стелещ тип) е най-малък броят на стъблата формиращи добива средно за вегетация.

За разлика от втората вегетация и липсата на преживяемост при сортовете звездан определя ниския брой на стъблата при първото покосяване. При австрийските популации се запазва сравнително високият брой събла средно за вегетацията, както и при българските популации 2 и 3. При локална популация 5 е отчетен с 29,4% по-висок брой стъбла спрямо Търговище 1. При популациите 8, 9 и 10 от стелещ тип, се потвърждава тенденцията за редуциране броя на стъблата в следващите откоси, а сумарно за вегетацията са от 22,3 до 28,4% от контролния вариант.

Average for vegetation period in 2016 and 2017, stem lengths in the Stamm GH01, Stamm GH02, and 2 and 3 populations proved to exceed the length at variety Targovishte 1.

The yield generated for vegetation is a sum of the stems formed from one plant through the individual cuttings (Table 4). The number of stems that produce the yield of fresh biomass per plant shows a distinction between studied varieties and local populations starved and the cuttings made during vegetation.

In 2016, with the highest number of stems for vegetation, there is a Local population 2, where in the first and second cuttings statistically proved exceed the control by 80,5 and 65,0% respectively and the average for the vegetation with 26,9% more stems. Leo variety stands out with 14.4% more stems than Targovishte 1. Accordingly, in Local populations 8, 9 and 10 (straining type) the number of stems forming the average yield for the vegetation is the smallest.

Unlike the second vegetation and the lack of survival in varieties, the star determines the low number of stems at the first decay. In the Austrian populations the relatively high number of supernatants averaged for vegetation, as well as for Bulgarian populations 2 and 3. In the local population 5, 29,4% higher number of stems was observed compared to Targovishte 1. In populations 8, 9 and 10 from the tendency to reduce the number of stems in the subsequent slopes is confirmed, and the total for the vegetation is from 22.3 to 28.4% of the control variant.

Таблица 4. Брой стъбла на едно растение при сортове и популации звездан по откоси и средно за вегетация 2-ра година (за 2016 г.)
Table 4. Number of stems per plant in varieties and populations starved in slopes and average for vegetation Year 2 (for 2016)

Генотипове/ Genotipes	I откос I cut	II откос II cut	III откос III cut	IV откос IV cut	Средно за вегетация/ Average for vegetation
			2016		
Targovishte 1	62,8bc	118,8abc	181,2bcde	117,2bcd	120,0bcdef
Leo	66,2bcd	139,0bcd	191,4cde	152,6d	137,3def
Taborac	95,75de	119,0abc	227,75e	112,8abcd	121,9bcdef
Gran San Gabriele	63,2bc	150,4cde	136,4abc	90,6abc	110,2abcde
Bosna Lotus	56,75abc	99,4ab	130,2ab	72,4ab	86,9ab
Natural population	76,4bcd	144,6bcd	163,8bcd	111,4abcd	124,1bcdef
Stamm GH01	76,0bcd	173,2de	146,6abcd	111,4abcd	126,8cdef
Stamm GH02	63,4bc	135,2bcd	132,2ab	84,4abc	103,8abcd
Local population 1	78,4bcd	146,8bcd	161,8bcd	100,8abc	122,0bcdef
Local population 2	113,4e	196,0e	169,0bcde	130,6cd	152,3f
Local population 3	70,25bcd	116,2abc	165,2bcd	92,4abc	107,5abcd
Local population 4	71,8bcd	133,4bcd	182,2bcde	105,8abcd	123,3bcdef
Local population 5	85,75cde	179,0de	199,5de	135,8cd	150,0ef
Local population 8	24,5a	77,75 a	98,0a	100,3abc	75,1a
Local population 9	53,6ab	139,0bcd	135,0abc	84,2abc	91,6abc
Local population 10	61,0bc	145,5bcd	88,75a	64,5a	89,9abc
Средно/ Average	*70,0*	*136,0*	*156,8*	*104,2*	
			2017		
Targovishte 1	150,3 def	173,3 ef	142 bcd		155,1 e
Leo	79,8 ab	0,0 a	0,0 a		26,6 a
Taborac	76,8 ab	0,0 a	0,0 a		25,6 a
Gran San Gabriele	63,3 a	0,0 a	0,0 a		21,1 a
Bosna Lotus	94,0 abcd	0,0 a	0,0 a		31,3 a
Natural population	109,3 abcde	112,5 bc	106,0 bcd		109,3 bc
Stamm GH01	141,6 def	144,8 cde	158,0 cd		148,1 cde
Stamm GH02	85,8 abc	103,0 b	108,0 bcd		98,8 b
Local population 1	97,4 abcde	121,0 bcde	80,7 b		99,7 b
Local population 2	145,4 def	138,4 bcde	161,0 d		148,1 de
Local population 3	151,4 ef	143,4 bcde	135,0 bcd		143,1 cde
Local population 4	144,0 def	160,2 de	87,6 b		130,6 bcd
Local population 5	168,0 f	208,5 f	225,0 e		200,5 f
Local population 8	140,8 cdef	133,3 bcde	69,5 ab		114,5 bcd
Local population 9	166,8 f	114,5 bc	80,2 b		120,5 bcd
Local population 10	122,5 bcdef	118,3 bcd	92,3 bc		111,0 bc
Средно/ Average	*121,1*	*104,5*	*90,3*		

Установени са корелационни зависимости между биомаса от едно растение и височината и броят на стъблата от едно растение (Таблица 5). Най-голямо влияние при формиране на добива оказва височината на стъблата отколкото техният брой независимо от годината на проучване (*r*=0.703).

Correlations between the biomass of a plant and the height and number of stems from one plant are established (Table 5). The greatest influence in the formation of the yield is the height of the stems than the number of stems regardless of the year of study (*r*=0.703).

Таблица 5. Корелационни зависимости между параметрите на продуктивността от свежа биомаса при сортове и популации звездан (2016-2017 г.)
Table 5. Correlation between the parameters determining the productivity of fresh biomass in varieties and and populations of birdsfoot trefoil (2016-2017)

Параметри Parameters	Свежа биомаса, g Fresh biomass, g	Височина стъбла, cm Height stems, cm	Стъбла, брой Stem, count
		2016	
Свежа биомаса, g Fresh biomass, g	0		
Височина стъбла, cm Height stems, cm	0,703	0	
Стъбла, брой Stem, count	0,627	0,311	0
		2017	
Свежа биомаса, g Fresh biomass, g	0		
Височина стъбла, cm Height stems, cm	0,918	0	
Стъбла, брой Stem, count	0,887	0,844	0

ИЗВОДИ

Установено е 100% загиване на растенията след първото покосяване на третата година при сортовете за интензивно използване Leo, Taborac, Gran San Gabriele и Bosna Lotus.

Най-голямо влияние при формиране на добива оказва височината на стъблата отколкото техният брой независимо от годината на проучване (*r*=0.703 и *r*=0,918). При Локални популации 8, 9 и 10 (стелещ хабитус) се формират доказано по-къси стъбла в сравнение с контролния вариант сорт Търговище 1, а по-дълги стъбла средно за периода на изследване са Natural population, Stamm GH01, Stamm GH02, № 2 и 3.

Установена е положителна корелационна зависимост между биомаса от едно растение и броят на стъблата от едно растение и през двете години на проучване (съответно *r*=0.311 и *r*=0,844). При локална популация 5 е отчетен по-висок брой стъбла спрямо Търговище 1 съответно с 25,00% (2016 година) и 29,27% (през 2017 година).

С най-голяма продуктивност на свежа биомаса и преживяемост при изследваните сортове звездан е бъл-

CONCLUSIONS

In the third year after the first crop of varieties Leo, Taborac, Gran San Gabriele and Bosna Lotus 100% plant death was detected.

The greatest influence of the yield has the height of the stems than their number regardless of the year of study (*r* = 0.703 and *r* = 0.918). In local populations 8, 9 and 10 (straining type), stems are proven shorter than the control variant variety Targovishte 1, and longer stems on average for period of study are Natural population, Stamm GH01, Stamm GH02, Bulgarian Local populations 1 and 2.

A positive correlation between biomass from one plant and the number of stems from one plant was established in both study years (*r* = 0.311 and *r* = 0.844 respectively). In the case of local population 5, a higher number of stems compared to Targovishte 1 was recorded with 25,00% (2016 years) and 29,27% (in 2017).

The greatest yield of fresh biomass and survival of the tested varieties trefoil is Bulgarian variety used for standard гарският сорт използван за стандарт Търговище 1, а при популациите австрийските Stamm GH01 и Stamm GH02, както и българските Локални популации 1 и 2, елитни растения от които ще бъдат включени като родителски компоненти на синтетична популация.

Targovishte 1, and in Austrian populations Stamm GH01 and Stamm GH02, as well as the Bulgarian Local populations 1 and 2 elite plants of which will be included as parental components of synthetic population.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bozhanska, T., Ts. Mihovski, G. Naydenova, D. Knotová and J. Pelikán**, 2016. Comparative studies of annual legumes. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 32(3), 311-320.
2. **Churkova, B.**, 2006a. Investigation of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) populations and varieties grown in Central Northern Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12(3), 455-460.
3. **Churkova, B.**, 2006b. Evaluation test on local population of birdsfoot trefoil in mixtures with meadow grass. In: Proceeding of the 21st General Meeting of the European Grassland Federation, Badajoz, Spain, pp. 62-63.
4. **Churkova, B.**, 2008. Productive abilities, botanical composition and biological characteristics of varieties of birdsfoot trefoil. *Journal of Mountain Agricultural on the Balkans*, 11(5), 829-838.
5. **Churkova, B.**, 2009. Main productive characteristics of varieties and populations of birdsfoot trefoil and relations. *Journal of Balkan Ecology*, 12(2), 177-181.
6. **Churkova, B.**, 2012. Biochemical characterization of species and populations birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* l.) grown in the region of Troyan. *Banat's Journal of Biotechnology*, 3(5), 51-57.
7. **Churkova, B.**, 2013. Content of crude protein, crude fiber and crude ash in dry mass of birdsfoot trefoil varieties and populations. *American Journal of Agricultural Science and Technology*, 1(3), 77-83.
8. **Gatarić, D, V. Radić, B. Durić, M. Šarić, Z. Čolović and B. Petković**, 2013. Morphometric characteristics of *Lotus corniculatus* L. genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 12(35), 5423-5426.
9. **Grant, W. F. and M. Niizeki**, 1999. Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.), in R. J. Singh, Ed., Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. *Forage Crops* 5:153-204.
10. **Ilieva, A., V. Vasileva and A. Katova**, 2015. The effect of mixed planting of birdsfoot trefoil, sainfoin, subterranean clover, and tall fescue on nodulation, and nitrate reductase activity in shoots. *Journal of Global Agriculture and Ecology,* 3(4), 222-228.
11. **Naydenova, G. and D. Mitev,** 2015. Study of breeding populations of birdsfood trefoil and red clover in mixtures. *Plant science*, 52(5), 30-36 (Bg).
12. **Naydenova, G., V. Vasileva and D. Mitev**, 2013. Objectives and approaches in the breeding of perennial legumes for use in temporary pasturelands. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans,* 18(6), 972-982.
13. **Prosperi, J. M., J. Ronfort and G. Genier**, 1999. Constraints to the introduction of Medics in French Mediterranean farming's systems. In: Proceedings of the XIII EUCARPIA Medicago spp. Group Meeting, Istituto di Miglioramento Genetico Vegetale. Perugia, Italy. Pp. 154-161.

14. **Radić, V., S. Vučković, Đ. Gatarić, S. Prodanovic, M. Drinić, A. Kralj and D. Pajčin**, 2014. Characterization of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) genotypes from the local population in Bosnia and Herzegovina. *African Biodiversity and Conservation,* 44(6), 98-105.
15. **Rumbaugh, M. D., J. L. Caddel and D. E. Rowe**, 1988. Breeding and Quantitative Genetics. In: Hanson A.A., Barnes D.K., and Hill R.R. (1988). Alfalfa and alfalfa improvement. *Agronomy Monograph,* 29: 777-808.
16. **Valkov, V. T. and M. Chiurazzi,** 2016. An In Vitro Procedure for Phenotypic Screening of Growth Parameters and Symbiotic Performances in *Lotus corniculatus* cultivars Maintained in Different Nutritional Conditions. Plants (Basel), ISSN 2223-7747; CODEN: PLANCD, 5 (4), 40.
17. **Vasileva, V.**, 2011. Study on productivity of perennial legume crops in mixtures. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 14 (2), 296-307.
18. **Vasileva, V. and E. Vasilev**, 2012. Study on Productivity of some Legume Crops in Pure Cultivation and Mixtures. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 77 (2), 91-94.
19. **Vasileva, V.**, 2017a. Parameters Related to Nodulating Ability of Some Legumes. *International Journal of Agriculture Food Science & Technology,* 3(1), 005-008.
20. **Vasileva, V.**, 2017b. Quality Characteristics of Forage Biomass from Birdsfoot trefoil and Mixtures with Subterranean clover. In: Proceedings of Scientific Conference with International Participation "Animal Science – Challenges and Innovations", 1-3 November, 2017, Sofia, pp. 92-103 (Bg).
21. **Vuckovic, S., I. Stojanovic, S. Prodanovic, B. Cupina, T. Zivanovic, S. Vojin and S. Jelacic**, 2007. Morphological and Nutritional Properties of Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.) Autochthonous Populations in Serbia and Bosnia and Herzegovina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(2), 421-428.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (6), 57-67 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Антихранителни компоненти във фуража от многогодишни бобови треви, отглеждани в България

Галина Найденова[1]*, Цветомира Банчева[2], Татяна Божанска[2]

[1]*Опитна станция по соята, 5200 Павликени, България*
[2]*Институт по планинско животновъдство и земеделие, 5600 Троян, България*

Antinutritional components in the forage of perennial legumes in Bulgaria

Galina Naydenova[1]*, Tsvetomira Bancheva[2], Tatyana Bozhanska[2]

[1]*Experimental Station on Soybean, 5200 Pavlikeni, Bulgaria*
[2]*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 5600 Troyan, Bulgaria*
**E-mail: gmvg@abv.bg*

Received: 01.06.2018 *Accepted:* 06.12.2018 *Published:* 27.12.2018

РЕЗЮМЕ

Включването на многогодишните бобови треви в състава на сенокосните и пасищни тревостои допринася за съществено повишаване на качеството им. Известно е, че тези растителни видове синтезират и съдържат вторични метаболити, които могат да повлияят върху вкусовите качества, нивото на консумация, смилаемостта и хранителната стойност на фуража, както и да предизвикат метаболитни нарушения и токсикози при селскостопанските животни. В статията е направен обзор на наши и чужди проучванията относно съдържанието на сапонини, цианогликозиди, танини и фитоестрогени в тревния фураж от люцерна, червена детелина, бяла детелина и звездан. Според публикуваните данни, концентрациите на тези вещества кореспондират силно с видовата и генотипна принадлежност на тревите, фазата на реколтиране и абиотичните фактори на средата. Това потвърждава необходимостта от предварителна оценка на ефекта от изхранването на тези фуражни видове под

SUMMARY

The inclusion of perennial legumes in the composition of hay and pasture grasslands contributes to a significant increase in their quality. It is well known that these plant species synthesize and contain secondary metabolites that may affect the palatability, consumption, digestibility and nutritional value of forage as well as causing metabolic disturbances and toxicosis in farm animals.

The paper reviews Bulgarian and foreign studies on content of saponins, cyanoglycosides, tannins and phyto-estrogens in forage from alfalfa, red clover, white clover and bird's-foot-trefoil.

According to published data, the concentrations of these substances correspond strongly with the species and genotype affinities of the legumes, the harvesting phase and the abiotic factors of the environment. This confirms the need for a preliminary assessment of the effect of feeding with these forage species in the form of grazing or freshly cut green

формата на паша или прясно окосена зелена маса.

Ключови думи: многогодишни бобони треви, вторични метаболити

Включването на многогодишните бобови треви в състава на сенокосните и пасищни тревостои допринася за съществено повишаване качеството им. Известно е, че тези растителни видове синтезират и съдържат вторични метаболити, които могат да повлияят върху вкусовите качества, нивото на консумация, смилаемостта и хранителната стойност на фуража, както и да предизвикат метаболитни нарушения и токсикози при селскостпанските животни. Такива са вещества са сапонини, цианогликозиди, танини, фитоестрогени (Ilieva et al., 2001), чийто синтез може да се приеме за адаптивен механизъм, а концентрацията им кореспондира с видовата и генотипна реакция към факторите на средата.

Сапонини

Люцерната, която е бобовата фуражна култура с най-голямо значение и разпространение в България, се характеризира с относително високи нива на съдържание на сапонини (Kertikova et al., 2000). Като сапонини при този вид са описани 12 типа безазотни гликозиди, които са открити в различните части на растението (листа, корени, семена) и които се различават по своята биологична активност (Voutquenne et al., 2002). Част от люцерновите сапонини са детеренти, които инхибират храненето, копулацията и яйцеснасянето на фитофагите (Golawska, 2012). Някои имат и алелопатична (Oleszek et al., 1992), антимикробиална (Zehavi and Polacheck, 1996), фунгистатична (Czaban et al., 2013) и естрогенна активност. Синтезът на сапонини в люцерновото растение варира оновно под влияние на генетичните фактори (Vetesi, 1986; Rotili, 1989; Small et al., 1990; Macuha, 1991), като зависи също и от сезона на

mass.

Key words: perennial legumes, secondary plant metabolites

The share of perennial legumes in the composition of hay and pasture grasses contributes to a significant increase in their quality. It is well known that these plant species synthesize and contain secondary metabolites that can affect the palatability, consumption, digestibility and nutritional value of the feed, and cause metabolic disturbances and toxicosis in farm animals.

These substances are saponins, cyanoglycosides, tannins, phytoestrogens (Ilieva et al., 2001) whose synthesis can be considered for an adaptive mechanism and their concentration corresponds to the species and genotypic reaction to the environmental factors.

Saponins

Alfalfa is the legume forage crop with the highest significance and distribution in Bulgaria. It is characterized by relatively high levels of saponin content (Kertikova et al., 2000).

12 types of nitrogen free glycosides are considered as saponins, which are found in different parts of the plant (leaves, roots, seeds) and differ in their biological activity (Voutquenne et al., 2002). Some of the alfalfa saponins are detritus, which inhibits nutrition, copulation and egg production of phytophags (Golawska, 2012).

Some of them have also an allelopathic (Oleszek et al., 1992), antimicrobial (Zehavi and Polacheck, 1996), fungistatic (Czaban et al., 2013) and estrogenic activity. The synthesis of saponins in alfalfa plant varies under the influence of genetic factors (Vetesi, 1986; Rotili, 1989; Small et al., 1990; Macuha, 1991), and also depends on the growing season отрастване (съответно от температури и слънчева радиация), възраст на тревостоя (Pecetti et al., 2006) и степен на нападение от болести (Ilieva and Blazhev, 1991).

Антихранителните и токсични ефекти на люцерновите сапонини върху селскостопанските животни са установени в редица изследвания (Plhak, 1983; Price et al., 1987; Oleszek, 1996; Timbekova et al., 1996). При птиците и моногастритните животни, хранени с люцерново брашно, листните люцерновите сапони неблагоприятно повлияват темповете на растеж. Те подтискат консумацията на фураж (Ueda et al., 1996), тъй като му придават горчив вкус. Според Gee et al. (1997) посоченият ефект се дължи главно на сапонина *Zanhic acid tridesmoside*, който предизвиква дразнене на лигавицата на устата и храносмилателния тракт. За преживните животни, люцерновите сапонини нямат отблъскващ вкус, но инхибират микробната ферментация и синтез в търбуха и променят местата на храносмилането (Lu and Jorgensen, 1987; Klita et al., 1996). Тази биологична активност на люцерновите сапонини в най-нови изследвания се проучва като възможност за въздействие върху ферментационните процеси в търбуха на едрите преживни животни и съответно като потенциален начин за намаляване на метановите емисии от тях (Malik and Singhal, 2009; Morgavi et al., 2011). Люцерновите сапонини могат да предизвикат интравазална хемолиза на еритроцитите със съответните клинични и параклинични изменения (Jurzysta and Waller, 1996; Tava and Pecetti, 1998; Simeonov et al., 1999; Munro, 2009). Хемолитичната активност на сапонините варира в зависимост от тяхната структура (Oleszek, 1990; Massiot et al., 1991; Tava et al., 2000; Voutquenne et al., 2002), както и от вида и категорията на приемащите ги животни. Свине, коне и зайци се отличават със значително по-висока чувствителност, в сравнение

(respectively on temperatures and solar radiation), age of grassland (Pecetti et al., 2006) and degree of disease attack (Ilieva and Blazhev, 1991).

The anti-nutritional and toxic effects of alfalfa saponins on farm animals have been identified in a number of studies (Plhak, 1983, Price et al., 1987, Oleszek, 1996, Timbekova et al., 1996). In poultry and monogastric animals fed on alfalfa flour, leaf alfalfa saponins adversely affect growth rates.

They suppress forage consumption (Ueda et al., 1996) as they give it a bitter taste. According to Gee et al. (1997), the effect is mainly due to *Zanhic acid tridesmoside*, saponin that causes irritation of mucous membrane of the mouth and the digestive tract.

For ruminants, alfalfa saponins don’t have a repulsive taste but inhibit microbial fermentation and synthesis in the rumen, thus changing digestive sites (Lu and Jorgensen, 1987; Klita et al., 1996).

This biological activity of alfalfa saponins in the latest studies is investigated as an opportunity to influence fermentation processes in the rumen of ruminants and as a potential way to reduce their methane emissions (Malik and Singhal, 2009; Morgavi et al., 2011).

Alfalfa saponins can cause intravascular haemolysis of erythrocytes with appropriate clinical and paraclinical changes (Jurzysta and Waller, 1996; Tava and Pecetti 1998; Simeonov et al., 1999; Munro, 2009). The haemolytic activity of saponins varies both according to their structure (Oleszek, 1990; Massiot et al., 1991; Tava et al., 2000; Voutquenne et al., 2002) and the species and category of host animals.

Pigs, horses and rabbits are significantly more sensitive than ruminants – sheep с преживните животни – овце и говеда (Cheeke, 1971). От значение е и здравословният статус на животните – при възпалителни състояния на стомашно – чревна лигавица и опаразитявания, сапонините се резорбират по-лесно, като оказват бързо токсично действие. Установено е, че люцерновите сапонините могат да повлияят нивата на липидния метаболизъм и биосинтеза на холестерол (Ueda et al., 1996).

Червената и бяла детелина са бобовите фуражни треви, които следват по разпространение люцерната в България. Според проведените у нас изследвания, червената детелина, отглеждана в предпланинските райони на страната не съдържа биологично активни сапонини (Ilieva et al., 2001). В чужди проучвания са установени няколко сапонина във фуража от едролистни форми бяла детелина (Fievez et al., 2001), които се свързват с процеса на подуване при едрите преживни животни (Sakamoto et al., 1992; Lane et al., 2000).

Цианогликозиди

Широко разпространените в пасищните тревостои у нас бяла детелина и звездан (Churkova, 2012; 2014) съдържат цианогликозиди (Wilson, 2008), при хидролизата на които се освобождават циановодород – *HCN* (Hart, 1987). Това става при смачкване и късане на растителните тъкани по време на паша и косене. И при двата вида цианогенезата е генетично обусловена (Collinge and Hughes, 1982; Paplauskienë and Sprainaitis, 2003; Annicchiarico, 2012) и кореспондира с преживяемостта и устойчивостта на популациите (Caradus, 1997). Установено е, че при звездана съществува ендогенен механизъм за детоксикацията на цианида (Smit and Urbanska, 1986). При бялата детелина популациите показват адаптивна диференциация по отношение способността да произвеждат водороден цианид след увреждане на тъканите (Kooyers et al., 2014). В наши изследвания е

and cattle (Cheeke, 1971). The animal health status is also important – in inflammatory conditions of the gastrointestinal mucosa and verminousness, saponins are more readily absorbed and have a rapid toxic effect. It has been established that alfalfa saponins can influence lipid metabolism and cholesterol biosynthesis (Ueda et al., 1996).

Red and white clover is legumes that come after alfalfa distribution in Bulgaria. According to research conducted in Bulgaria, red clover cultivated in the foothills of the country does not contain biologically active saponins (Ilieva et al., 2001).

In other studies, several saponins have been identified in the forage of large-leaf white clover (Fievez et al., 2001) that relate to the swelling process in the ruminants (Sakamoto et al., 1992; Lane et al., 2000).

Cyanoglycosides

The widespread white clover and bird's-foot-trefoil (Churkova, 2012; 2014) in pasture grasslands in Bulgaria contain cyanoglycosides (Wilson, 2008), during their hydrolysis is released hydrogen cyanide – HCN (Hart, 1987). This occurs when crushing and tearing plant tissues during grazing and mowing. In both species, the cyanogenesis is genetically determined (Collinge and Hughes, 1982; Paplauskienë and Sprainaitis, 2003; Annicchiarico, 2012) and corresponds to the survival and sustainability of the populations (Caradus, 1997). It has been found that bird's-foot-trefoil has an endogenous mechanism for detoxification of cyanide (Smit and Urbanska, 1986).

In white clover, populations show adaptive differentiation in the ability to produce hydrogen cyanide after tissue damage (Kooyers et al., 2014). It has been found in our studies that white clover species of установено, че сортовете бяла детелина от дребнолистният морфотип са по-ниско цианогенни (със съдържание на *HCN* – 19.4 mg/100g DM) в сравнение със сортовете от средно и едролистните форми (респективно 28.4 и 29.2 mg/100g DM), както и това, че едролистната генплазма от предпланинските райони на България е с много ниско съдържание на цианогликозиди (Michovski and Goranova, 2006) – 7mg *HCN*/100g DM.

Циановодородът има пряк токсичен ефект върху животните, когато е в концентрация над 50-75 mg/100g DM. Отравянето на животните протича бързо, със спазми, трудно дишане, ускорен пулс и парализа на дишането. Поемането на свеж фураж от бяла детелина и звездан рядко може да предизвика такова директно отряване, поради това, че съдържанието на цианогликозиди е под посочваните критични нива и поради това, че тези треви обикновено не се отглеждат самостоятелно, а в тревни смески (Churkova, 2000; 2008). Според някои проучвания, силният абиотичен стрес по време на вегетацията, както и при високо дози на минерално торене може да доведе до нарастване концентрацията на цианогликозиди в посочените видове. В повечето изследвания се съобщава за токсичен ефект на метаболитите от разграждането на циановодорода (Majak and Cheng, 1984; Carlsen and Fomsgaard, 2008). Детоксикация на циановодорода става в търбуха или черния дроб, в зависимост от вида на поемащите го животни, като се образува тиоцианат (*thiocyanate - SCN-*) (Crush and Caradus, 1995; Majak et al., 1987; 1990). Тиоцианатът е потенциален инхибитор на свързването на йода в щитовидната жлеза и приемането на тези бобови треви с пашата може да предизвика увеличаване на размера й при овце (Crush and Caradus, 1995). Освен това, цианидните метаболити могат да окажат ефект и върху селеновия метаболизъм при животните.

small-sized leaf morphotype is less cyanogenic (with *HCN* content – 19.4 mg/100g DM) compared to medium and large-sized leaf varieties (respectively 28.4 and 29.2 mg/100g DM) as well as the fact that the large-sized leaf gene plasm of foot-hill mountain regions of Bulgaria is very low in cyanoglycosides (Michovski and Goranova, 2006) - 7mg HCN/100g DM.

Hydrogen cyanide has a direct toxic effect on animals when it is in a concentration above 50-75 mg/100g of DM. Poisoning of the animals is fast, with cramps, difficulty breathing, rapid heartbeat and paralysis of breathing. Taking fresh forage of white clover and bird's-foot-trefoil rarely can cause such direct poisoning because the cyanoglycoside content is below critical levels and because these grasses are not normally grown independently, but in grass mixtures (Churkova, 2000; 2008).

According to some studies, strong abiotic stress during vegetation as well as high doses of mineral fertilization can lead to an increase in the concentration of cyanoglycosides in these species. Most studies have reported a toxic effect of metabolites of hydrogen cyanid dissolution (Majak and Cheng, 1984; Carlsen and Fomsgaard, 2008).

Detoxification of hydrogen cyanid occurs in the rumen or liver, depending on the animal species that take it, forming thiocyanate (SCN) (Crush and Caradus, 1995; Majak et al., 1987; 1990). Thiocyanate is a potential inhibitor of iodine binding in the thyroid gland, and when these legumes are taken during grazing they can cause an increase in sheep size (Crush and Caradus, 1995). In addition, cyanide metabolites may also have an effect on selenium metabolism in animals.

Танини

Кондензираните танини - CT (*proanthocyanidins*) са клас флавоноид-ни полимери, които се съдържат в звездана, еспарзетата (Berard et al, 2011) и в по-ниски концентрации в съ-цветията на червена и бяла детелина (Burggraaf, 2003; 2008). Биологичния ефект на кондензираните танини зависи от концентрацията им в свежия фураж. Когато съдържанието им е над 50-60 g/kg DM, те се явяват антихрани-телен фактор, тъй като редуцират кон-сумацията и смилаемост-та на фуража и понижават прираста на телесна маса и депресират растежа на вълната при овцете (Aerts et al., 1999; Wen et al., 2003; Min et al., 2003). Когато съдържа-нието им е в границите 20-40 g/kg DM, кондензираните тнини редуцират раз-граждането на протеина в търбуха на преживните и предотвратяват подува-нето и опаразитяването на животните (Athanasiadou и Kyriazakis, 2004; Arrigo et al, 2009; Escaray et al, 2011). Обик-новения звездан, който се култивира в България е с оптимални нива на съдър-жание на танини (25 g CT/kg DM). По високи концентрации са характерни за еспарзетата (45 g CT/kg DM) и то във фазите преди цъфтежа на растенията (Berard et al, 2011).

Фитоестрогени

Многогодишните бобовите треви съдържат и изофлавонови съединения, които имат естрогенна активност в животинския организъм и могат значи-телно да разстроят репродуктивните му функции. Такива съединения са *coumestrol, apigenin, luteolin and quercetin* в люцерната (Seguin et al., 2004); *daidzein, genistein, formononetin* и *biochanin* А в червена детелина (Steinshamn, 2010). Съдържанието на фитоестрогени в люцерната е различно в различните части на растението, като най-високи концентрации на *apigenin, luteolin* и *quercetin* са открити в цвето-вете. То варира също и според фазите на развитие, като най-ниско е във

Tannins

Condensed tannins - CT (*proanthocyanidins*) are a class of flavonoid polymers contained in bird's-foot-trefoil, sainfoin (Berard et al., 2011) and in lower concentrations in red and white clover racemes (Burggraaf, 2003; 2008). The biological effect of condensed tannins depends on their concentration in fresh forage. When their content is above 50-60 g/kg DM, they are antinutritional factors because they reduce the consumption and digestibility of forage and reduce the growth of body mass and depress wool growth in sheep (Aerts et al., 1999; Wen et al. et al., 2003; Min et al., 2003).

When their content is in the range of 20-40 g/kg DM, condensed tannins reduce protein absorption in ruminants' rumen and prevent swelling and verminousness of animals (Athanasiadou and Kyriazakis, 2004, Arrigo et al, 2009, Escaray et al, 2011). The ordinary bird's-foot-trefoil cultivated in Bulgaria has optimal levels of tannin content (25 g CT/kg DM). Higher concentrations are characteristic for sainfoin (45 g CT/kg DM) and in the pre-flowering phases of plants (Berard et al, 2011).

Phytoestrogens

Perennial legumes also contain isoflavone compounds that have estrogenic activity in the animal organism and can significantly disrupt its reproductive functions. Such compounds are *coumestrol, apigenin, luteolin and quercetin* in alfalfa (Seguin et al., 2004); *daidzein, genistein, formononetin* and *biochanin* A in red clover (Steinshamn, 2010). The content of phytoestrogens in alfalfa differs in different parts of the plant, with the highest concentrations of *apigenin, luteolin* and *quercetin* being found in the flowers.

It varies also according to developmental phases, as the lowest is in the beginning фенофаза начало на цъфтеж (Seguin et al., 2004). Формонетинът, който се среща в най-високи концентрации при червената детелина има висока наследяемост, като не се влияе от екологичните условия и стадия на развитие. Въз основа на това са създадени сортове червена детелина с ниска концентрация на формоненитн (Boller, 1994). Установено е, че люцерновите и детелинови изофлавони нарушават функцията на яйчниците при крави и овце, намаляват процента на заплодяемост и увеличават ембрионалната смъртност (Adams, 1995), като могат да преминат и в млякото на лактиращите крави (Mustonen et al., 2009). Детелиновите фитоестрогени могат да предизвикат повишаване честотата на образуване на уратни камъни при овцете (Hall, 2007).

of flowering phenophase (Seguin et al., 2004). Formononetin, which occurs at the highest concentrations in red clover, has a high inheritance and is not affected by environmental conditions and developmental stages. Based on this, red clover cultivars were created with low concentration of formonetin (Boller, 1994).

Alfalfa and clover isoflavones have been shown to impair ovarian function in cows and sheep, reduce fertility rates and increase fetal mortality (Adams, 1995), and may also pass into milk of lactating cows (Mustonen et al., 2009).

Clover phytoestrogens can cause an increase in the frequency of urate stones in sheep (Hall, 2007).

ИЗВОДИ

Направения обзор на проучванията относно съдържанието на сапонини, цианогликозиди, танини и фитоестрогени в тревния фураж от многогодишни бобови треви, показва, че концентрациите на тези вещества кореспондира силно с видовата и генотипна принадлежност на тревите, фазата на реколтиране и абиотичните фактори на средата. Това потвърждава необходимостта от предварителна оценка на ефекта от изхранването на тези фуражни видове под формата на паша или прясно окосена зелена маса.

CONCLUSIONS

The survey of studies on the content of saponins, cyanoglycosides, tannins and phytoestrogens in grass forage from perennial legumes shows that the concentrations of these substances are strongly correlated with the species and genotypic affinities of the grasses, the harvesting phase and the abiotic factors of the environment. This confirms the need for a preliminary assessment of the effect of feeding with these forage species in the form of grazing or freshly cut green mass.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Abberton, M. T., J. H. MacDuff, A. H. Marshall and M. W. Humphreys**, 2007. The genetic improvement of forage grasses and legumes to reduce greenhouse gas emissions. Plant Breeding and Genetics Programme, Institute of Grassland and Environmental Research, Aberystwyth, United Kingdom in collaboration with the Plant Production and Protection Division, Crop and Grassland Service, of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.

2. **Adams, N. R.**, 1983. Sexual behaviour of ewes with clover disease treated repeatedly with oestradiol benzoate or testosterone propionate after ovariectomy. *Journal of Reproduction and Fertility*, *68*(1), 113-117.

3. **Adams, N. R.**, 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*, *73*(5), 1509-1515.

4. **Adams, N. R. and B. Y. Tang**, 1986. Changed control of cervical secretion from infertile ewes previously exposed to oestrogenic clover pasture. *Journal of Reproduction and Fertility*, *76*(1), 147-152.
5. **Aerts, R. J., T. N. Barry and W. C. McNabb**, 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *75*(1), 1-12.
6. **Applebaum, S. and Y. Birk**, 1979. Saponins. In Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, pp. 539–566 (GA Rosental and TH Janzen, editors). London: Academic Press.
7. **Arrigo, Y. and F. Dohme**, 2009. Sainfoin versus alfalfa as supplements for grazing dairy cows. *Revue suisse d'agriculturev*, 41(5), 283-288.
8. **Athanasiadou, S. and I. Kyriazakis**, 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, *63*(04), 631-639.
9. **Berard, N. C., Y. Wang, K. M. Wittenberg, D. O. Krause, B. E. Coulman, T. A. McAllister and K. H. Ominski**, 2011. Condensed tannin concentrations found in vegetative and mature forage legumes grown in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, *91*(4), 669-675.
10. **Burggraaf, V. T., P. D. Kemp, E. R. Thom, G. C. Waghorn, D. R. Woodfield and S. L. Woodward**, 2003. Agronomic evaluation of white clover selected for increased floral condensed tannin. In: Proceedings of the New Zealand Grassland Association, 65, 139-145.
11. **Burggraaf, V. T., P. D. Kemp, E. R. Thom, G. C. Waghorn, D. R. Woodfield and S. L. Woodward**, 2004. Performance of dairy cows grazing white clover with increased condensed tannin. In: Proc. NZ Grassl. Assoc, 66, 221-226.
12. **Burggraaf, V., G. Waghorn, S. Woodward and E. Thom**, 2008. Effects of condensed tannins in white clover flowers on their digestion in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 142(1), 44-58.
13. **Caradus, J. R., W. McNabb, D. R. Woodfield, G. C. Waghorn and R. Keogh**, 1995. Improving quality characteristics of white clover. In Proc. Agron. Soc. NZ, 25, 7-12.
14. **Carlsen, S. C. and I. S. Fomsgaard,** 2008. Biologically active secondary metabolites in white clover (Trifolium repens L.)–a review focusing on contents in the plant, plant–pest interactions and transformation. *Chemoecology*, 18(3), 129-170.
15. **Cheeke, P. R.,** 1971. Nutritional and physiological implications of saponins: a review. *Canadian Journal of Animal Science*, 51(3), 621-632.
16. **Cheeke, P. R.,** 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. In *Saponins used in Food and Agriculture*, 377-385. Springer US.
17. **Churkova, B.,** 2000. A comparative study of varieties trefoil (Lotus corniculatus L.) in the foothill at North Central Bulgaria. *Plant Science*, (4), 234-237 (Bg).
18. **Churkova, B.,** 2008. Productive abilities, botanical composition and biological characteristics of varieties of birdsfoot trefoil. *Journal of Mountain Agricultural on the Balkans*, 11(5), 829-838.
19. **Churkova, B.**, 2012. Biochemical characterization of species and populations birdsfoot trefoil (Lotus corniculatus L.) grown in the region of Troyan. *Banat's Journal of Biotechnology*, 3(5), 51-57.
20. **Churkova, B.**, 2014. Productivity and Botanical Composition of a Mixed Sward of Birdsfoot Trefoil and Red Fescue Depending on the Term of Sowing and Proportion

of Components. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(1), 276-280.
21. **Dewhurst, R. J., L. Delaby, A. Moloney, T. Boland and E. Lewis**, 2009. Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 167-187.
22. **Escaray, F. J., A. B. Menendez, A. Gárriz, F. L. Pieckenstain, M. J. Estrella, L. N. Castagno and O. A. Ruiz**, 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus Lotus. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science*, 182, 121-133.
23. **Fievez, V., C. Dragomir, L. Mbanzamihigo and D. Demeyer**, 2001. Clover saponins as methane inhibitors and their effect on rumen N utilisation effficiency as studied in vitro and in vivo. *Mededelingen Van De Faculteit Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent*, 66(4), 299-304.
24. **Gee, J. M., J. M. Wal, K. Miller, H. Atkinson, F. Grigoriadou, M. V. W. Wijnands and I. T. Johnson**, 1997. Effect of saponin on the transmucosal passage of β-lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and β-lactoglobulin-sensitised rats. *Toxicology*, 117(2), 219-228.
25. **Goławska, S., I. Łukasik, A. Wójcicka and H. Sytykiewicz**, 2012. Relationship between saponin content in alfalfa and aphid development. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 54(2), 39-46.
26. **Hall, E.**, 2007. Red Clover. Pastures Australia, a collaboration between AWI, GRDC, MLA, RIRDS.
27. **Ilieva, A. and V. Blazhev**, 1991. Changes in the content of total phenols and saponins in case of alfalfa fusarium wilt. *Fiziologiya na rasteniyata*, 17(1), 49-54.
28. **Jurzysta, M., and G. R. Waller**, 1996. Antifungal and hemolytic activity of aerial parts of alfalfa (Medicago) species in relation to saponin composition. In Saponins Used in Traditional and Modern Medicine, pp. 565-574. Springer US.
29. **Kertikova, D. V., M. G. Vlahova, A. V. Ilieva and A. I. Atanassov**, 2000. Increase of yield and quality in lucerne by applying classical methods and biotechnological approaches. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 6(5), 507-512.
30. **Kooyers, N. J., L. R. Gage, A. Al Lozi and K. M. Olsen**, 2014. Aridity shapes cyanogenesis cline evolution in white clover (Trifolium repens L.). *Molecular ecology*, 23(5), 1053-1070.
31. **Lane, L. A., J. F. Ayres and J. V. Lovett**, 2000. The pastoral significance, adaptive characteristics, and grazing value of white clover (Trifolium repens L.) in dryland environments in Australia: a review. *Animal Production Science*, 40(7), 1033-1046.
32. **Lu, C. D. and N. A. Jorgensen**, 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *The Journal of nutrition*, 117(5), 919-927.
33. **Macuha, P.,** 1991. Contents of saponins in various lucerne genotypes. *Vedecke Prace Vyskumneho Ustavu Rastlinnej Vyroby v Piestanoch. Krmoviny (CSFR),* 23, 59-69.
34. **Majak, W. and K. J. Cheng**, 1984. Cyanogenesis in bovine rumen fluid and pure cultures of rumen bacteria. *Journal of Animal Science*, 59(3), 784-790.
35. **Majak, W., R. E. McDiarmid, J. W. Hall and K. J. Cheng**, 1990. Factors that determine rates of cyanogenesis in bovine ruminal fluid in vitro. *Journal of Animal Science*, 68(6), 1648-1655.
36. **Majak, W., R. E. McDiarmid, K. Jakober and K. J. Cheng**, 1989. Diurnal changes in rates of degradation of cyanogenic glycosides in bovine rumen fluid. *Toxicon* (UK).

37. **Malik, P. K. and K. K. Singhal**, 2009. Effect of lucerne (Medicago sativa) fodder supplementation on nutrient utilization and enteric methane emission in male buffalo calves fed on wheat straw based total mixed ration. *Indian Journal of Animal Sciences*, 79(4), 416-421.
38. **Massiot, G., C. Lavaud, V. Besson, L. Le Men-Olivier and G. Van Binst**, 1991. Saponins from aerial parts of alfalfa (Medicago sativa). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(1), 78-82.
39. **Min, B. R., T. N. Barry, G. T. Attwood and W. C. McNabb**, 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1), 3-19.
40. **Morgavi, D.P., M. Eugène, C. Martin and M. Doreau**, 2011. Reducing methane emissions in ruminants: is it an achievable goal? In: Ranilla M.J. (ed.), Carro M.D. (ed.), Ben Salem H. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.). Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context. Zaragoza: CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO, 2011. p. 65-73. (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 99). 13. International Seminar of the Sub-Network on Nutrition of the FAO-CIHEAM Inter-Regional Cooperative Research and Development Network on Sheep and Goats, 2009/10/14-16, León (Spain). http://om.ciheam.org/om/pdf/a99/00801537.pdf
41. **Mustonen, E. A., , M. Tuori, I. Saastamoinen, J. Taponen, K. Wahala, H. Saloniemi and A. Vanhatalo**, 2009. Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *Br. J. Nutr.,* 102(11), 1552-1556.
42. **Oleszek, W.**, 1990. Structural specificity of alfalfa (Medicago sativa) Saponin Haemolysis and Its Impact on Two Haemolysis based Quantification Methods. *J. Sci. Food Agric.,* 53, 477-485.
43. **Oleszek, W.**, 1993. Allelopathic potentials of alfalfa (Medicago sativa) saponins: Their relation to antifungal and hemolytic activities. *Journal of Chemical Ecology* 19(*6*), *1063-1074*,
44. **Oleszek, W.**, 1996. Alfalfa saponins: structure, biological activity and chemotaxonomy. In Saponins Used in Food and Agriculture; Waller, G. R., Yamasaki, K., Eds.; Plenum Press: New York, pp 155-170.
45. **Pecetti, L., A. Tava, M. Romani, M.G. De Benedetto and P. Corsi**, 2006. Variety and environment effects on the dynamics of saponins in lucerne (Medicago sativa L.). *European Journal of Agronomy*, 25(3), 187-192.
46. **Plhak, F.**, 1983. Determination of content of Haemolytic saponins in lucerne and its changes during growth and cuts. Sb. Ved. Pr. Vyzk. Slechtitelsky Ustav Picninarsky Troubku Brna, pp. 5-13.
47. **Price K., I. Johnson and G. Fenwick**, 1987. The chemistry and biological significance of saponins food and feedingstuffs. CRC Crit. *Rev.Food Sci. Nutr*., 26, 127-135.
48. **Price, K. R. and G. R. Fenwick**, 1992. Zanhic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (Medicago sativa L.) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.,* 40, 191-196.
49. **Price, K. R., I. T. Johnson and G. R. Fenwick**, 1987. The chemistry and bilogical significance of saponins in food and feedstuffs. CRC Crit. Rev. *Food Sci. Nutr.*, 26, 27-135.
50. **Retana-Márquez, S., H. Hernández, J. Flores, M. Muñoz-Gutiérrez, G. Duarte, J. Vielma, G. Fitz-Rodríguez, I. Fernández, M. Keller and J. Delgadillo**, 2012. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(1), 129-145.

51. **Rotili, P.**, 1989. Methodological and technical aspects of the constitution of lucerne. Varieties adapted to drying and to protein extraction. In: Proceedings of Dry Crops 89, Fourth International Green Crop Drying Congress, held at Churchill College, University of Cambridge, UK, 3-5 April 1989, pp. 22-29.
52. **Sakamoto,S., S. Kofuji, M. Kuroyanagi, A. Ueno and S. Sekita**, 1992. Saponins from Trifolium Repens. *Phytochemistry*, 31, 1773-1777.
53. **Saviranta, N. M. M., M. J. Anttonen, A. Von Wrightand and R. O. Karjalainen**, 2008. Red clover (Trifolium pratense L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *J. Sci. Food Agric.,* 88(1), 125-132.
54. **Seguin, P., W. Zheng and A. Souleimanov**, 2004. Alfalfa Phytoestrogen Content: Impact of Plant Maturity and Herbage Components. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190(3), 211-217.
55. **Sen, S., H. Makkar, and K. Becker**, 1998. Alfalfa Saponins and Their Implication in Animal Nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 131-140.
56. **Simeonov, S. and Y. Nikolov**, 1999. Clinical veterinary toxicology. Stara Zagora, pp. 3-354 (Bg).
57. **Small, E., M. Jurzysta and C. Nozzolillo**, 1990. The evolution of hemolytic saponin content in wild and cultivated alfalfa (Medicago sativa, Fabaceae). *Econ. Bot.*, 44(2), 226-235.
58. **Smit, J. and K. Urbanska**, 1986. Rhodanese activity in Lotus corniculatus s.l. *Journal of Natural History*, 20(6), 1467-1476.
59. **Steinshamn, H.**, 2010. Effect of forage legumes on feed intake, milk production and milk quality - a review. *Anim. Sci. Pap. Rep*., 28(3), 195-206.
60. **Tava A, M. Chiari and W. Oleszek**, 2000. Separation of alfalfa (Medicago sativa L.) saponins as their borate complexes by capillary electrophoresis. In: Oleszek W, Marston A (eds) Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. In: Proceedings of the phytochemical society of Europe, Kluwer, 45, 40-45
61. **Tava, A. and L. Pecetti**, 1998. Hemolytic activity and saponin content in lucerne Medicago sativa complex genotypes. *Journal of Genetics and Breeding*, 52(1), 33-37.
62. **Timbekova, A. E., M. I. Isaev and N. K. Abubakirov**, 1996. Chemistry and biological activity of triterpenoid glycosides from Medicagosativa. In Saponins Used in Food and Agriculture;Waller, G. R., Yamasaki, Y., Eds.; Plenum Press: New York, pp. 171-182.
63. **Ueda, H., Y. Kakutov and M. Chshima,** 1996. Grwth-depresing effect of alfalfa saponinin chicks. *Anim. Sci. Technol.* 67(9), 772-779.
64. **Vetesi, M.,** 1986. Breeding of a low saponin lucerne variety for replacing the protein requirement of monogastric animals. Enytermeles, 287-292.
65. **Voutquenne, L., C. Lavaud, G. Massiot and L. Le Men-Olivier**, 2002. Structure-Activity Relationships of Hemolytic Saponins. *Pharmaceutical Biology*, 40, 253.
66. **Wen, L., C. Roberts, J. Williams, R. Kallenbach, P. Beuselinck and R. McGraw**, 2003. Condensed Tannin Concentration of Rhizomatous and Nonrhizomatous Birdsfoot Trefoil in Grazed Mixtures and Monocultures. *Crop Science*, 43, 302-306.
67. **Wilson, K.**, 2008. Cyanogenesis: A Chemical Defense in Plants. Chemical Ecology.
68. **Zehavi, U. and I. Polacheck**, 1996. Saponins as Antimycotic Agents: *Glycosides of Medicagenic Acid.,* 404, 535-546.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (6), 68-80 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Оптимизиране на метод за екстракция на биологично-активни вещества от свежа растителна суровина чрез ензимен хидролиз и криогенно концентриране

Николай Солаков

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх" № 53, 1407 София, България

Optimization of the method for the extraction of biologically active substances from fresh vegetable raw materials by enzymatic hydrolysis and cryogenic concentration

Nikolay Solakov

Institute of Cryobiology and Food Technologies, 53, Cherni Vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria
E-mail: nikolay.solakov@ikht.bg

Received: 09.05.2018 *Accepted:* 14.11.2018 *Published:* 27.12.2018

РЕЗЮМЕ

Оптимизиран е метод за екстракция, чрез включване в технологичния ред на етапи на ензимно смилане на клетъчните стени, ултрафилтрация на отделената натанта и криогенно концентриране за получаване на течен или сух екстракт с високо съдържание на биологично-активни вещества. Разработен е оптимален алгоритъм за прилагане на различните подходи за ензимно смилане, ултрафилтрация, криогенно концентриране и сушене в температурен диапазон -50ºC до 30ºC. Крайната цел за прилагане на този алгоритъм е запазване на термолабилните съединения за постигане на максимална биологична активност и чистота без остатъци от органични разтворители в крайния екстракт. Като изходна суровина е използвана лабораторно отгледана мицелна култура на висши медицински гъби от вид *Ganoderma lucidum*, отгледани в среда от Potato Dextrose Agar (PDA) с добавка на дрождев екстракт. Мицелната култура е подложена

SUMMARY

An extraction method has been optimized by incorporating in the technological order steps of cell wall enzyme grinding, ultrafiltration of the separated supernatant fluid and cryogenic concentration to obtain a liquid or dry extract with a high content of biologically active substances. An optimal algorithm has been developed to implement the different approaches for enzymatic grinding, ultrafiltration, cryogenic concentration and drying at the temperature range -50°C to 30°C. The ultimate goal of applying this algorithm is to keep thermolabile compounds to achieve maximum biological activity, and a frequency with no residual organic solvents in the final extract.

Laboratory-grown micelle culture of higher medical mushrooms of the species Ganoderma lucidum grown in Potato Dextrose Agar (PDA) medium supplemented with yeast extract was used as a starting material. The mycelial

на обработка свежа (жива) без предварително изсушаване суровина, като е стартиран технологичния ред с шоково замразяване за максимално запазване функционалната стабилност на биологично-активните вещества. Доказано разграждането на клетъчната стена чрез провеждане на микроскопско наблюдение и е направен HPLC анализ за детектиране на продуктите получени след хидролиза на хитиновия слой (Krishnendu Acharya et al., 2015).

Ключови думи: медицински гъби, ензим, лиофилизация, Ганодерма луцидум, Рейши, екстракт, клетъчна стена, глюкозамин, ензимен хидролиз, хроматографски анализ, микроскопско наблюдение

culture is subjected to fresh (live) processing without prior drying, by running the shock freezing process line to maximally preserve the functional stability of the biologically active substances.

Proven degradation of the cell wall by microscopic observation and HPLC analysis to detect the products obtained after hydrolysis of the chitin layer (Krishnendu Acharya et al., 2015).

Key words: medicinal mushroom, enzymes, lyophilization, Ganoderma lucidum, Reishi, extract, cell wall, glucosamine, enzymatic hydrolysis, chromatographic analysis, microscopic observation

УВОД

В производството на биологично активни продукти предназначени за използване в медицината, функционалното хранене и козметиката, един от основните проблеми за решение е осигуряване на веществата изолирани от изходната суровина с максимало запазена биологична активност. При различните методи на екстракция, се наблюдава различно ниво на този показател. При масово използваните методи използващи разтворители ралични от вода (алкохоли, гликоли, етери, бензин, хексан, масла, парафини и т.н.) се констатират замърсявания от останали количества от разтворителя. За отстраняването на разтворителя обикновено се използва повишаване на температурата, при който процес се отчита разрушаване на някои термолабилни биологично активни вещества. Решаването на този проблем изисква процесите, участващи в метода на обработка да се осъществяват при по-ниска температура от тази, която би разрушила целевите биологично активни вещества намиращи се в изходната суровина.

G. lucidum е медицинска гъба, масово използвана за производство на различни продукти за профилактика и

INTRODUCTION

One of the main problems in the production of biologically active products for use in medicine, functional nutrition and cosmetics, is to provide the substances isolated from the raw material with maximum biological activity.

In the different extraction methods, a different level of this indicator is observed. In the commonly used methods using solvents other than water (alcohols, glycols, ethers, gasoline, hexane, oils, paraffins, etc.) contaminations of residual amounts of solvent are observed.

Removal of the solvent usually involves raising the temperature at which a process is reported to destroy some thermally labile biologically active substances.

Solving this problem requires processes involved in the processing method to be carried out at a lower temperature than would destroy the target biologically active substances present in the feedstock.

G. lucidum is a widely used medical mushroom for the production of various products for prophylaxis and functional функционално хранене. Това е най-прилаганата гъба за медицински цели с различни терапевтични свойства: противоракова активност, антиоксидантни, противовъзпалителни, антиалергични и невропротективни свойства, има благоприятен ефект върху черния дроб и бъбреците, показва антивирусна и антибактериална активност. Екстракти с високо съдържание на биологично активни вещества се използват за укрепване на имунната система, за профилактика при сърдечно-съдовите заболявания, хипертония, диабет, респираторни и стомашно-чревни нарушения, имунодефицитни състояния и др. (Solomon P. Wasser, 2014).

За освобождаване на биологично активните вещества от клетката и клетъчната стена, без да е необходимо използване на органични разтворители е приложен ензимен метод за разграждане структурите на клетката, който протича в температурен диапазон 18-20°C (Johanna Rytioja, 2016). При този метод разтворителя е вода, необходимата киселинност на разтвора е постигната чрез натурална киселина и условията на обработка запазват непроменени биологично активните вещества, така както протичат естествено процесите в природните системи. Отстраняването на разтворителя при този подход се извършва в условия на вакуум и ниска температура чрез процес на лиофилизация, при който е гарантирано запазване на летливите и термолабилните молекули. При лиофилизацията водата преминава в твърдо агрегатно състояние по време на замръзването, след което в условия на вакуум сублимира преминавайки директно в газообразно състояние без да преминава през течно състояние, като по този начин не може да повлече със себе си разтворени вещества, които остават в сухата фракция. Получената изсушена субстанция остава с 2-3 % влажност, което условие спира развитието на патогенни процеси и ако получения продукт е опакован с материал спиращ преминаването на вода, газ и йонизи-

nutrition. This is the most commonly used mushroom for medical purposes with different therapeutic properties: anticancer activity, antioxidant, anti-inflammatory, antiallergic and neuroprotective properties, has a beneficial effect on the liver and kidneys, shows antiviral and antibacterial activity.

Extracts with a high content of biologically active substances are used to strengthen the immune system, to prevent cardiovascular diseases, hypertension, diabetes, respiratory and gastrointestinal disorders, immunodeficiency states, etc. (Solomon P. Wasser, 2014).

For the release of biologically active substances from the cell and the cell wall without the need of organic solvents, an enzymatic method for degradation of the cell structures is applied which runs in the temperature range of 18-20°C (Johanna Rytioja, 2016).

In this method the solvent is water, the necessary acidity of the solution is achieved by natural acid and the processing conditions retain the unchanged biologically active substances as naturally occurring processes in the natural systems. Removal of the solvent in this approach is carried out under vacuum and low temperature by a lyophilization process in which the conservation of volatile and thermolabile molecules is guaranteed.

During lyophilization, the water passes to a solid state during freezing, then sublimates in vacuum conditions by passing directly to the gaseous state without passing through a liquid state, thus not being able to drag with it dissolved substances that remain in the dry state fraction. The resulting dried substance remains with 2-3% humidity, which prevents the development of pathogenic processes and if the resulting product is packed with material that stops passing of water, gas and ionizing ращо лъчение се постига много дълъг срок на съхранение (Pál, 2017).

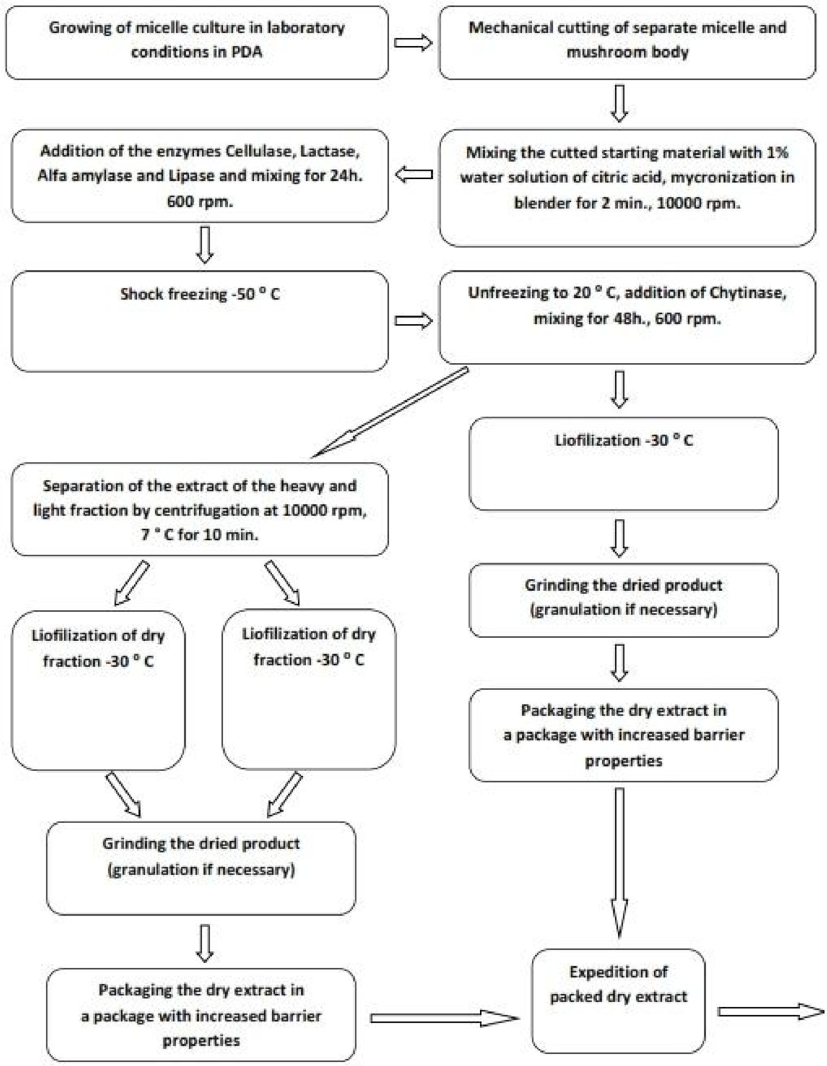
radiation, a very long shelf life is achieved (Pál, 2017).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В настоящата работа е разработен метод за получаване на биологично активен екстракт, при който алгоритъма на изпълнение включва процеси отговарящи на температурния режим съгласно зададените условия за запазване на термолабилните съединения, така както е показано на Фигура 1.

MATERIAL AND METHODS

In the present work, a method for producing a biologically active extract is provided wherein the process algorithm includes processes responsive to the temperature regime according to the preset conditions for the thermally-labile compounds as shown in Figure 1.



Фиг. 1. Блокова схема на етапите на обработка за получаване на сух ензимно третиран екстракт
Fig. 1. Block scheme of the stages of treatment to obtain dry enzyme treated substance

Изходна суровина в настоящата работа е използван жив мицел и плодно тяло от *Ganoderma lucidum*. Избрана е тази суровина защото тя е с много богата биологично активна наличност съдържаща над 400 вида такива вещества. Другия показател по който е избрана тази суровина е наличието на плътна и трудна за разграждане клетъчна стена съдържаща хитин. За разграждането на клетъчната стена са използвани следните ензими: DeniLight (Лаказа), Lipopan (Липаза), Fungamyl 4000 SG (Алфа амилаза), Celluclast 1,5 L (Целулаза), Chitinase в количества по 0,5 g всеки. Суровината от живия мицел и плодното тяло от *G. Lucidum* беше отгледана за период от шест месеца в лабораторни условия в ИКХТ-София. Беше използвана хранителна среда от картофено декстрозен агар (PDA) с добавка от екстракт, получен от автолизирани дрожди *Saccharomyces cerevisiae*. Суровината за експеримента беше отделена в етапа на първоначално образуване на плодно тяло. Първоначално отделената гъбна маса беше механично нарязана и поставена в 1% р-р на лимонена киселина в H_2O. Така получения разтвор беше микронизиран чрез механично смилане в блендер снабден с режещи резци при 20000 об./мин. за 2 минути. Към получения микронизиран разтвор бяха добавени ензимите DeniLight (Лаказа), Lipopan (Липаза), Fungamyl 4000 SG (Алфа амилаза), Celluclast 1,5 L (Целулаза) в количества 0,5 g всеки и в продължение на 24 часа беше разбъркван с магнитна бъркалка с 600 об./мин. при температура 20^{o}C. На следващия етап разтвора беше шоково замразен до температура -50^{o}C, след което беше размразен и при достигане на температура 20^{o}C беше добавен ензима Chitinase в количество 0,5 g. и миксиран с магнитна бъркалка за 48 ч. при 600 об./мин. След изтичане на процесното време

The starting material used in this work is a live mycelium and a body from *Ganoderma lucidum*. It is selected because it is very rich in biologically active substances, containing over 400 kinds of them. The other indicator for selecting this starting material is the presence of a dense and difficult to degrade chitin-containing cell wall. The following enzymes were used to break down the cell wall: DeniLight (Lipase), Lipopan (Lipase), Fungamyl 4000 SG (Celiac Amylase), Celluclast 1.5 L (Cellulose), Chitinase in 0.5 g quantities each.

The raw mycelia and body of *G. lucidum* was grown for six months in laboratory conditions at ICFT in Sofia. Potato Dextrose Agar (PDA) broth was used with the addition of extract from autoclaved yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The starting material for the experiment was separated in the initial stage of the development of the body.

The initially released mushroom was mechanically cut and placed in 1% citric acid in H_2O. The solution thus obtained was micronized by mechanical grinding in a blender equipped with cutting bits at 20 000 rpm. in 2 minutes.

The enzymes DeniLight (Lipase), Lipopan (Lipase), Fungamyl 4000 SG (Alpha amylase), Celluclast 1.5 L (Cellulose) were added to the resulting micronised solution in amounts of 0.5 g each and for 24 hours was stirred with a magnetic stirrer at 600 rpm. at a temperature of 20 ° C. In the next step, the solution was shock-freezed to -50°C, then unfreezed, and at the temperature of 20°C was added the Chitinase enzyme at 0.5 g and stirred with a magnetic stirrer for 48 h at 600 rpm.

Upon expiration of the process time, a sample was separated for microscope беше отделена мостра за наблюдение под микроскоп. Получения екстракт беше разделен на две части. Комплексния екстракт от първата част беше директно изсушена чрез процес на лиофилизация, като така получения прахообразен продукт е готов за опаковане и експедиция. Втората част от разтвора беше сепариран на тежка и лека фракция чрез центруфугиране при 10000 об./мин. и температура 7^{o}C за 10 мин. От получената супернатанта беше отделена мостра за хроматографско изследване. Леката и тежката фракция от получения комплексен екстракт бяха изсушени чрез процес на лиофилизация. Така получените сухи продукти са готови за опаковане и експедиция.

Направени бяха две изследвания за установяване разграждането на клетъчната стена. Първото изследване беше направено чрез микроскопско наблюдение на проби взети от разтвора в началото на технологичния ред и от проба отделена от получения комплексен екстракт преди сепариране на тежка и лека фракция. Хроматографското изследване беше направено като за целта е използвана проба отделена от получената супернатанта след сепариране на комплексния екстракт. Пробата беше разредена с MeOH в съотношение 1:5, след което обработена с ултразвукова вана за пълно разтваряне. Получения р-р беше пречистен чрез многостепенна филтрация като за целта бяха използвани поетапно филтърна хартия с големина на пората 100 µm, стъклен филтър с големина на пората 40 µm, стъклен филтър с големина на пората 1 µm,, картридж за спринцовка с големина на пората 0,45 µm и картридж за спринцовка с големина на пората 0,2 µm.

Хроматографския анализ беше направен при следните условия: апарат HP Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, DAD [λ=270 nm], RP-C18 [250 mm], изократен режим и течна фаза със

observation. The resulting extract was divided into two parts. The complex extract of the first part was directly dried by a lyophilization process, the powder product thus obtained being ready for packing and dispatching.

The second part of the solution was separated into a heavy and light fraction by centrifugation at 10000 rpm. and a temperature of 7°C for 10 minutes. A sample for chromatographic analysis was removed from the obtained supernatant. The light and heavy fraction of the resulting complex extract was dried by a lyophilization process. The dried products thus obtained are ready for packing and shipping.

Two studies were carried out to determine cell wall degradation. The first study was done by microscopic observation of samples taken from the solution at the beginning of the technological order and from a sample separated from the resulting complex extract prior to separation of the heavy and light fraction. Chromatography was done using a sample separated from the supernatant obtained after separation of the complex extract.

The sample was diluted with MeOH in a ratio of 1:5 then treated with an ultrasonic bath for complete dissolution.

The resulting pH was purified by multi-stage filtration using a 100 µm pore size filter paper, a 40 µm pore size glass filter, a 1 µm pore size glass filter, a pore size syringe cartridge 0.45 µm and a syringe cartridge with a pore size of 0.2 µm.

Chromatographic analysis was performed under the following conditions: HP Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, DAD [λ = 270 nm], RP-C18 [250 mm], isocratic mode and liquid phase with composition: (A) 1% : ACN [70:30], (B) състав: (A) 1% Оцетна киселина (H_2O) : ACN [70:30], (B) MeOH, A:B (90:10). За стандарт е направен разтвор съдържащ, Caffein (1000 mg/ml) Glucosamin HCL (100 mg/ml), N-Acetil-D-Glucosamin (200 mg./ml) разтворени в подвижна фаза (А) и филтруван с картридж с големина на порите 0,2 µm. За провеждане на анализа е направено разреждане с MeOH в съотношение 1:10.

Микроскопското наблюдение на проба оделена от микронизирания разтвор в началния етап и от комплексния екстракт в крайния етап на метода е направено с микроскоп Accu-scope 3012 с монтирана на него камера за заснемане Micrometrics 5MP.

MeOH, A: B (90:10). A solution containing Caffein (1000 mg/ml) Glucosamine HCL (100 mg/ml), N-Acetyl-D-Glucosamine (200 mg/ml) dissolved in the mobile phase (A) of pores of 0,2 µm. An 1:10 dilution of MeOH was performed to perform the assay.

Microscopic observation of a sample separated from the micronised solution in the initial step and of the complex extract in the final step of the method was done with an Accu-scope 3012 microscope with a Micrometrics 5MP capture camera mounted thereon.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

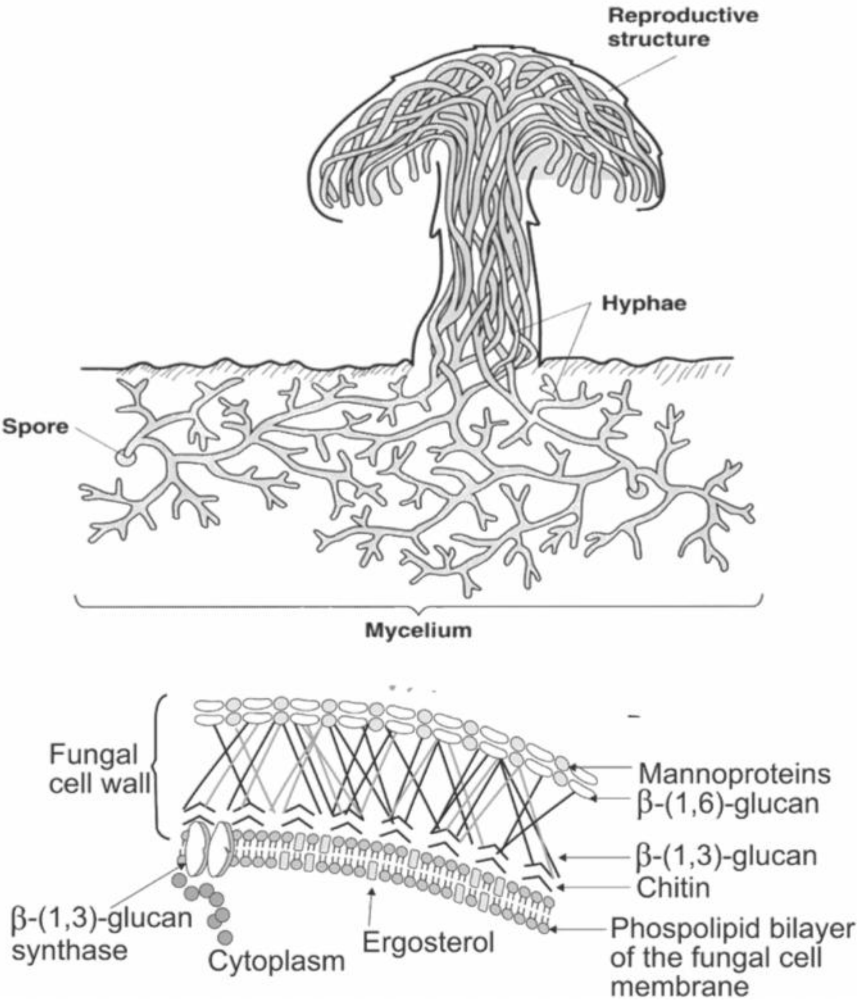
Приложената методика доказа възможността гъбната клетъчна стена да бъде разрушена без използване на органични разтворители и висока температура. Това става благодарение на използваните ензими DeniLight (Лаказа), Lipopan (Липаза), Fungamyl 4000 SG (Алфа амилаза), Celluclast 1,5 L (Целулаза) и Chitinase в комбинация с използване на механична микронизация и шоково замразяване.

На Фигура 2 е показана структурата на гъбен организъм и клетъчната стена на гъбната клетка. На изображението се вижда, че цялата структура е обхваната от влакнести образувания, наречени хифи (Carmen Sanchez, 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

The applied methodology proved the possibility of the fungal cell wall being destroyed without the use of organic solvents and high temperature. This is due to the enzymes DeniLight (Lipase), Lipopan (Lipase), Fungamyl 4000 SG (Cellulase), Celluclast 1.5 L (Cellulose) and Chitinase in combination with mechanical micronization and shock freeze.

Figure 2 shows the structure of the fungus and the cell wall of the fungal cell. The image shows that the whole structure is covered by filamentary formations, called the hyphi (Carmen Sanchez, 2017).



Фиг. 2. Структура на гъбно тяло, гъбен мицел и гъбна клетъчна стена
Fig. 2. Structure of mushroom body, micelle and cell wall

Ясно се вижда и стабилния хитинов слой намиращ се непосредствено върху дилепидния слой. Виждат се и допълнителни структури над хитиновия слой защитавайки допълнително клетъчната стена. За да се разградят всичките слоеве на клетъчната стена в разработвания метод е избран подход при който на няколко етапа се разграждат отделните слоеве при което са изпълнени етапите:

- Механично микронизиране при който етап имаме частично накъсване на влакнестата структура.

The stable chitin layer directly on the dyslipidic layer is clearly visible. Additional structures over the chitin layer are also seen, further protecting the cell wall. In order to decompose all the layers of the cell wall in the process developed, an approach is chosen in which the individual layers are broken down in several stages, in which the following steps are performed:

- Mechanical micronization – at that stage partial tear of the fibrous structure was observed.

• Първоначално ензимно смилане при който етап имаме освобождаване от горните слоеве намиращи се над хитиновия слой, като по този начин хитиновия слой става достъпен за ензима *Chitinase*.

• Разкъсване на останалата клетъчна цялост чрез шоково замразяване. При този процес намиращата се вътре в клетката вода рязко преминава в твърдо състояние образувайки кристали с остри ръбове. Острите ръбове на образуваните кристали разкъсват останалата част от клетъчната стена, като при размразяване се получава разтвор съдържащ вътреклетъчни елементи и фрагменти от останалата клетъчна стена.

• Крайно ензимно смилане с включения в състава на разтвора на ензима *Chitinase*. При този процес намиращият се във фрагментите от клетъчната стена хитин се разгражда на хитиназа, след което хитиназата се разгражда на N-Acetil-D-Glucosamin и допълнителни глюкозаминови фракции. Тези получени вещества от ензимния хидролиз на хитина бяха отчетени чрез хроматографското изследване.

На Фигура 3 е показано заснета отделена проба от проведеното микроскопско наблюдение на изходната суровина след етапа на първоначалното механично микронизиране. На изображението ясно се виждат клетъчни структури във вид на влакнести хифи от гъбната материя. От микроскопското наблюдение става ясно, че клетките в началния етап след микронизиране са в своята цялост без разрушени клетъчни стени.

• Initial enzyme grinding – at that stage release from the upper layers located above the chitin layer, thus making the chitin layer available to the *Chitinase* enzyme was performed.

• Breaking the remaining cellular integrity by application of shock freezing. In this process, the water inside the cell sharply passes into a solid state forming sharp-edged crystals.

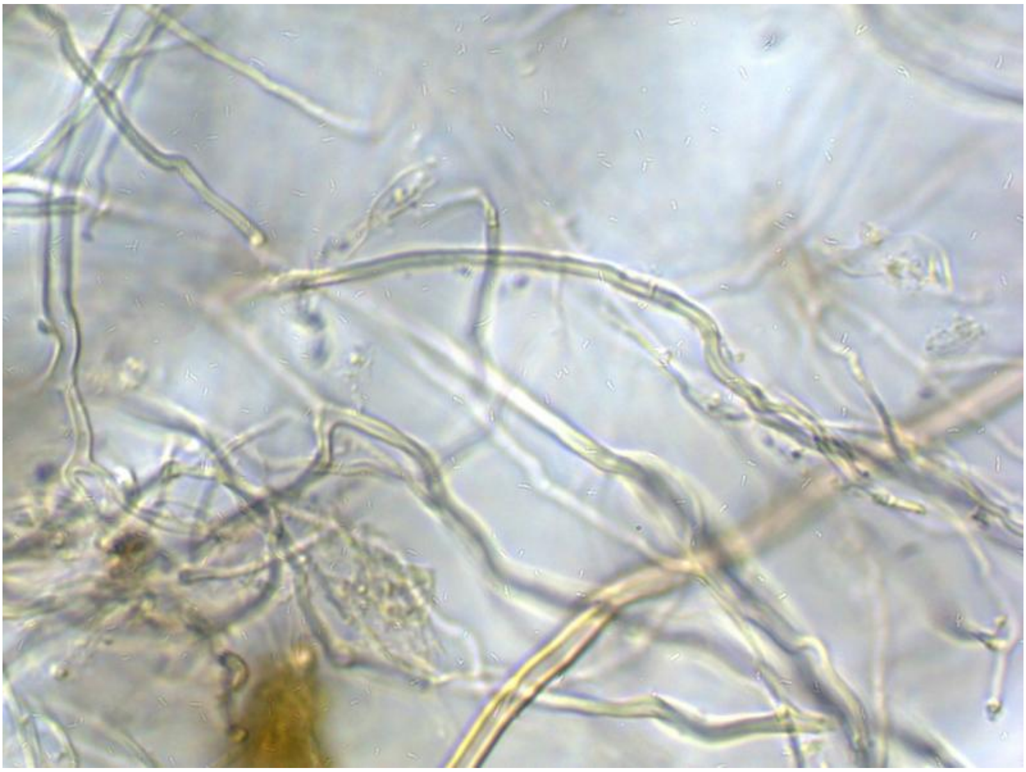
The sharp edges of the crystals tear the rest of the cell wall. Thus, when unfreezing a solution is formed, containing parts of the cell wall.

• Ultimate enzyme digestion with the *Chitinase* enzyme inclusion. In this process, the chitin found in the cell wall fragments is broken down into chitinase, after which the chitinase is degraded to N-acetyl-D-glucosamine and further glucosamine fractions.

The obtained substances from the enzymatic hydrolysis of chitin were recorded by the chromatographic assay.

Figure 3 shows a captured sample of the microscopic observation of the feedstock after the initial mechanical micronization step. The image clearly shows cellular structures in the form of fibrous hyphae from mushroom matter.

From microscopic observation it is clear that the cells in the initial stage after micronization are in their entirety without destroyed cell walls.



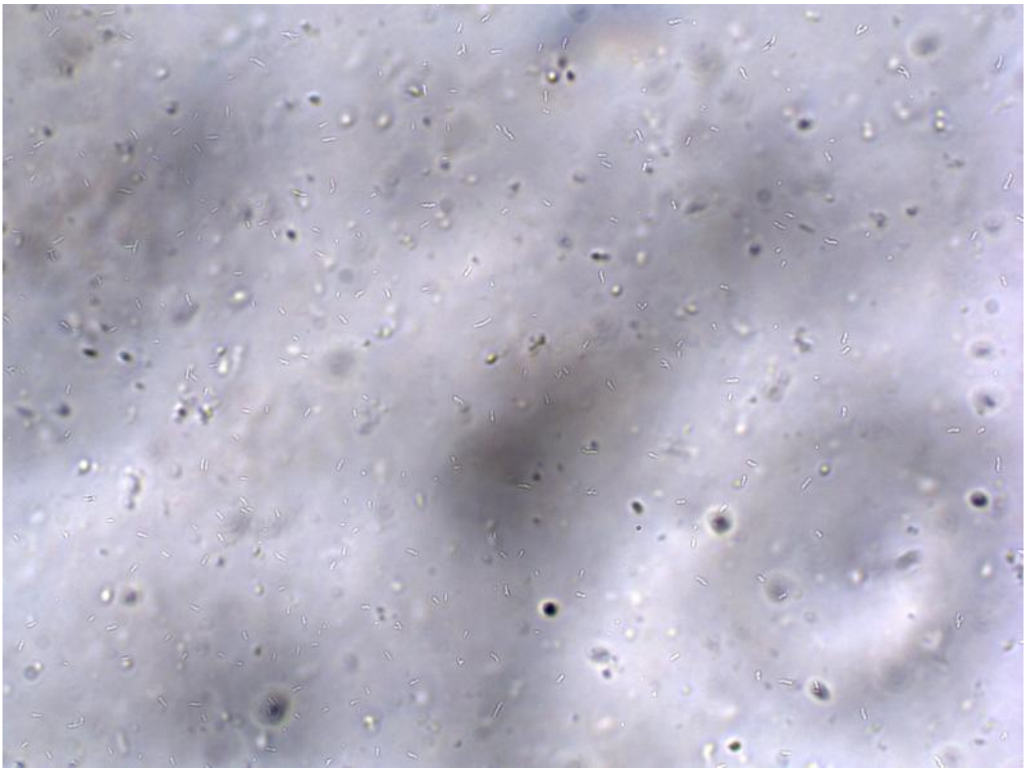
Фиг. 3. Заснето зрително поле от микроскопско наблюдение на препарат от изходната суровена след етапа на механично микронизиране
Fig 3. Coined field of view from a microscopic observation of a preparation from the raw material after the mechanical micronization step

На Фигура 4 е показано заснета отделена проба от проведеното микроскопско наблюдение на получения комплексен екстракт в крайния етап след ензимното разграждане на клетъчната стена. На изображението ясно се вижда отсъствието на цели структури от клетки с неразградена клетъчна стена. Това показва, че клетъчните стени са разградени и вътреклетъчните вещества са преминали в разтвора, като по този начин се е получил биологично активен екстракт със запазени биологично активни вещества каквато е крайната цел на метода. Активноста е налична благодарение на нискотемпературния режим при който е проведен експеримента.

Figure 4 shows a captured sample of the microscopic observation of the resulting complex extract in the final step after the enzymatic cell wall degradation.

The image clearly shows the absence of whole cell structures with a non-degraded cell wall. This indicates that the cell walls are degraded and the intracellular substances have passed into the solution, thereby obtaining a biologically active extract with preserved biologically active substances as the ultimate target of the method.

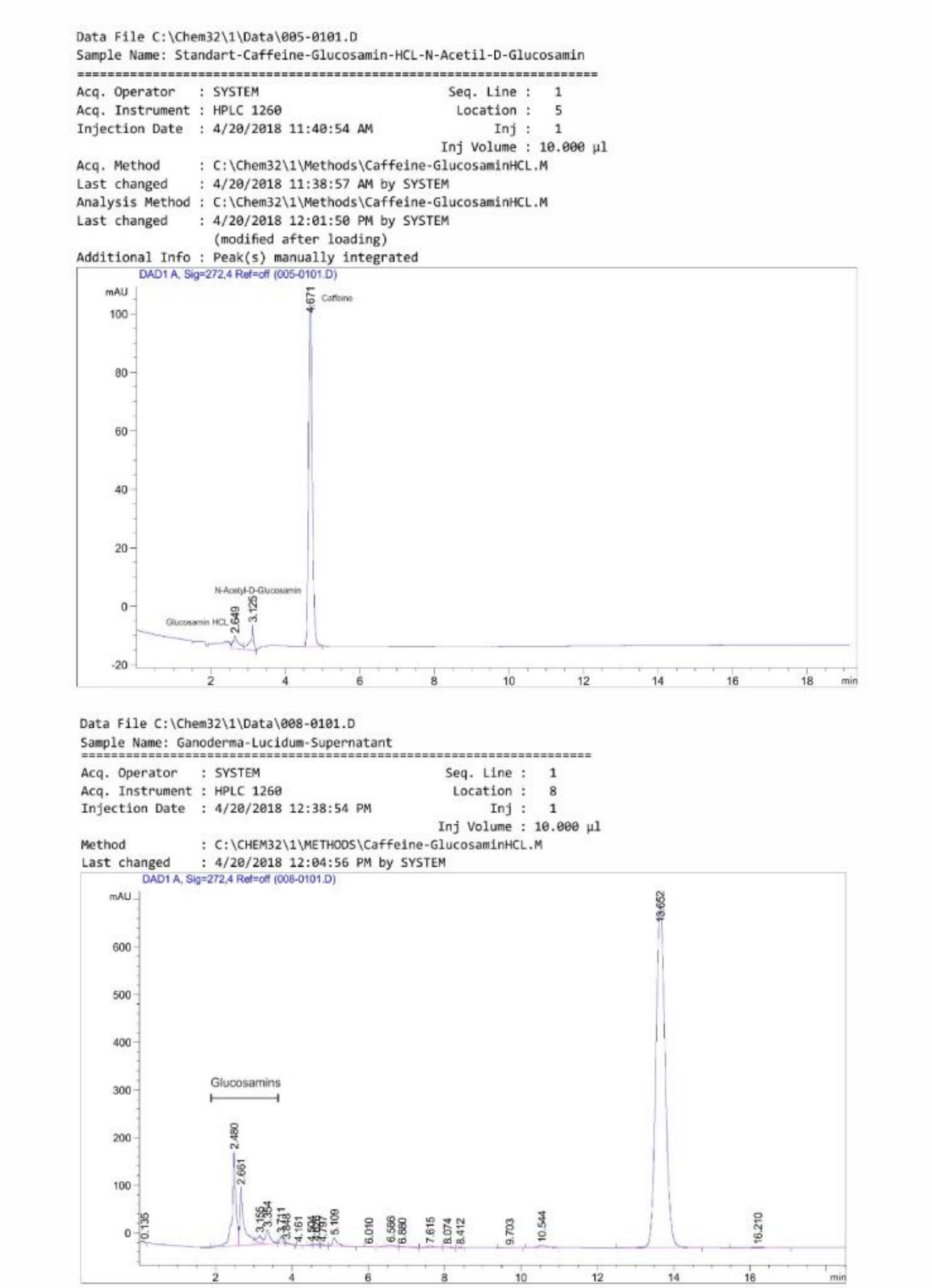
The activity is available due to the low-temperature mode in which the experiment was conducted.



Фиг. 4. Заснето зрително поле от микроскопско наблюдение на препарат от комплексен екстракт в крайния етап след ензимното разграждане на клетъчната стена
Fig. 4. Captured field of view by microscopic observation of a complex extract preparation at the final stage after enzymatic cell wall degradation

На Фигура 5 е са показани хроматограмите на стандарта и отделената проба на супернатантата на етапа след сепариране на комплексния екстракт. На първата хроматограма се отчитат пиковете на стандартите Glucosamin HCL и N-Acetil-D-Glucosamin. На хроматограмата от пробата с леката фракция от екстракта се отчитат отново пикове за фракции на Glucosamin в областа на времената на стандартите, което е допълнително доказателство за разграждане на хитиновия слой от клетъчната стена. Хроматогравфското изследване е проведено с оглед качествено определяне без количественни изчисления, които не са обект на настоящия проект. Целта на това изследване е единствено доказване разграждането на хитиновия слой на гъбните клетки.

Figure 5 shows the chromatograms of the standard and the separated sample of the supernatant at the stage after separation of the complex extract. The peak of the first chromatogram is the Glucosamine HCL and N-Acetyl-D-Glucosamine peaks. On the chromatogram of the sample with the light fraction of the extract, the Glucosamine fractions are again read in the times of the standards, which is further evidence of degradation of the chitin layer from the cell wall. The chromatographic study was conducted with a view to qualitative determination without quantitative calculations not covered by this project. The purpose of this study is the only demonstration of the degradation of the chitin layer of the fungal cells.



Фиг. 5. Хроматограми от проведено изследване с HPLC, Agilent 1260 на отделена проба от супернатанта след сепариране на ензимно третиран екстракт от мицел и плодно тяло на *G. Lucidum*

Fig. 5. Chromatograms from an HPLC assay, Agilent 1260 on a separate supernatant sample after separation of enzyme-treated mycelial and fruit-derived extract of *G. Lucidum.*

ИЗВОДИ

От направения експеримент може да се направи извод, че при използване на този метод се постига получаване на екстракти при които всички активни вещества остават запазени защото изпълнението на процесния алгоритъм протича при ниски температури щадящи биологичната активност на термалабилните съединения. Метода може да бъде регулиран в зависимост от необходимостта за максимално запазване на целеви биологично активни вещества чрез промяна на етапите с включена ензимна реакция, както и използването на различни ензими в зависимост от обработваната растителна матрица на използваната суровина.

CONCLUSIONS

From the experiments made, it can be concluded that using this method produces extracts in which all the active substances remain preserved because the process algorithm performance takes place at low temperatures which suppress the biological activity of the thermolabile compounds. The method can be adjusted depending on the need to maximally preserve target biologically active substances by changing the steps involving an enzymatic reaction as well as the use of different enzymes depending on the vegetable matrix treated of the raw material used.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Carmen Sanchez**, 2017. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 13-22.

2. **Johanna Rytioja**, 2016. Enzymatic plant cell wall degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens.*

3. **Krishnendu, Acharya, M. Bera, E. Tarafder and A. Dasgupta**, 2015. Pharmacognostic standardization of *Ganoderma lucidum*: A commercially explored medicinal mushroom. *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre*, 7(7), 175-181.

4. **Pál, S.**, 2017. Pharmaceutical Excipients of solid dosage forms. Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy.

5. **Solomon P. Wasser**, 2014. Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences, and Challenges. *Biomed J.*, 37(6), 345-356 doi: 10.4103/2319-4170.138318.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (6), 81-90… ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Възстановяване на изоставени пасища в планински район на Словакия

Норберт Британяк*, Любомир Ханзес, Ивета Илавска

Национален център по земеделие и храните, Изследователски институт по пасища и планинско земеделие, Изследователска станция, 033 01 Липтовски Храдок, Словакия

Reinstatement of management on abandoned grassland in a mountainous area of Slovakia

Norbert Britaňák*, Ľubomír Hanzes, Iveta Ilavská

National Agriculture and Food Centre, Grassland and Mountain Agriculture Research Institute, Research Station, 033 01 Liptovský Hrádok, Slovakia
**E-mail: brinor@isternet.sk*

Received: 11.05.2018 *Accepted:* 10.12.2018 *Published:* 27.12.2018

РЕЗЮМЕ

Приблизително една трета от площта на постоянните пасища в Словакия не се използва. Пасища на площ от 350 000 ha (изоставени) са подложени на последователни промени от вторична растителна покривка до първична – гори (особено на иглолистни гори). От гледна точка на земеделието или фуражното производство това не е желателно. Целта на експеримента е да се възстанови фуражното производство върху изоставени пасища в планинските райони на Словакия. Въведоха се отново различни форми на управление на изоставените тревостои. Експериментът се намира в село Липтовска тепличка (1.005 м н.в.) върху алувиална ливада (река Черни вах) с *Picea abies* (L.) H.Karst, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. и навлизане на *Rosa canina* L. Възстановяването на различни (от екстензивни до интензивни) форми на управление незабавно потиска дървесните и храстовидните видове. При използването на някои метрики за

SUMMARY

Approximately one third of permanent grassland area of Slovakia is not utilized. These 350,000 ha (abandoned) grassland are underwent succession changes from this secondary vegetation cover to the primary one – forests (coniferous forest, especially). From agricultural or forage production point of view it is not desirable. So the aim of the experiment is to reinstate forage production on abandoned grassland in mountainous area of Slovakia. We have reintroduced different forms of management on abandoned grassland.

Experiment is located in Liptovská Teplička village (1,005 m a.s.l.) on alluvial meadow (Čierny Váh River) with *Picea abies* (L.) H.Karst, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and *Rosa canina* L. encroachment. Reinstatement of different (from extensive to intensive) forms of management have suppressed tree and shrub species. But, when we used some metrics to characterizes a degree of характеризиране степента на последователност (анализ на времевия промеждутък), тревостоят неочаквано показа стабилен състав. Само най-интензивната обработка (прилагане на NPK торове и резитба три пъти годишно) се пренасочва към по-начална фаза на последователност – желана тревна площ с преобладаващи житни и бобови треви, с малък дял разнотреви. Нашите резултати предполагат, че възстановяването на управлението отнема време за получаване на високоефективни пасища, състоящи се от житни и бобови треви.

Ключови думи: изоставен тревостой, треви, бобови растения, разнотреви, анализ на времевия промеждутък, последователност, управление

succession (Time-lag analysis), we were surprised that grassland has shown stable composition. Only the most intensively treatment (application of NPK fertilizers and cutting three times a year) is shifting to younger phase of succession – desired grassland with dominance of grasses and legumes, with little proportion of herbs.

Our results suggest the reinstatement of management is time-consuming in regard to obtaining high-performing grassland consisting of grasses and legumes.

Key words: abandoned grassland, grasses, legume, herbs, time-lag analyses, succession, management

УВОД

Повечето от полуестествените ливади в Централна Европа са с вторично растително покритие и зависят от човешките дейности в управлението им (Jančovič and Vozár, 2004). В умерената климатична зона, човек е създал и поддържа трвостои, но природата е спазва собствените си закони и правила. Получените тревостои не са естествени, а полу-естествени екосистеми, съставени от диви видове (Ružičková and Kalivoda, 2007). Тук тревостоите представляват най-богатите екосистеми с най-голямо разнообразие от растителни видове върху земеделска земя (Fiala, 2002; Jančovič and Vozár, 2004).

Както интензивността, така и управлението се отразяват върху видовия състав на полуестествените тревостои (Blüthgen et al., 2012). При оптимална интензивност и подходящо управление, мозаечно разположение на земята (по-екстензивни и интензивни методи на косене и паша), се поддържат богати на видове общества с много редки и застрашени видове, уязвими. Когато един район е изоставен или при ниска интензивност на използване, има спонтанна последователност, която се проявява чрез навлизане на дървесни

INTRODUCTION

Most of the Central European semi-natural grassland are secondary vegetation cover and depend on human activities in their management (Jančovič and Vozár, 2004). In temperate climatic zone, man has created and maintains grassland, but the nature has complied with its own laws and rules. Resulting grassland ecosystems are not natural or de-natural, they are semi-natural ecosystems, composed of wild species (Ružičková and Kalivoda, 2007). Here grassland represents the richest terrestrial ecosystems with the highest diversity of plant species on agricultural land (Fiala, 2002; Jančovič and Vozár, 2004).

Both intensity and management are reflected in the species composition of semi-natural grasslands (Blüthgen et al., 2012). At the optimum intensity and appropriate use, mosaic use of land, as well (more extensive and intensive methods of mowing and grazing alternating with), species rich communities with many rare and endangered, vulnerable species are maintained. When abandoned the area or at low intensity of utilization, there is a spontaneous succession, which is manifested by encroachment of woody растителни видове или на някои експанзивни треви в същото време (Sláviková and Krajčovič, 1998).

При присъединяването на Република Словакия към ЕС, се установи наличие на т. нар. изоставени тревостои. Проблем, който е съществувал преди, но неговият мащаб е бил неизвестен. До 2004 г. Статистическата служба на Словашката република използва информация и данни от Службата по геодезия, картография и кадастъра (с информация за разпределението на отделните култури, например гори, тревостои, обработваеми земи, езера и др.) с резолюция от един квадратен метър. Тази информация измести статистическия доклад на Земеделската агенция (чрез различни правила получават информация повече от 0.30 ha). Сега двете организации отчитат разлики на равнище от 41% от общата площ на полуестествените тревостои (кадастър 880 000 ha и земеделска разплащателна агенция 520 000 ha) (Britaňák et al., 2015). Значителна част от тези тревостои (не само защото са изоставени обработваеми земи) се намира в североизточната част на Словакия. Изоставянето на земеделски земи в момента се доказва от отрицателното демографско развитие в тази област. Дялът на неизползвани или временно използвани постоянни тревостои дава възможност за експерименти, въздействията на които могат да бъдат отразени в различни области: икономически, социални, екологични, селскостопански, развлекателни и законодателни.

Прекратяването на управлението на тревостоите или изоставянето на селскостопанска земя напълно създава условия за вторична смяна на растителността. Според Zaplata et al. (2013), смяната на растителността е контролираното развитие на растителните видове на дадена област през определен период от време в отговор на променящите се условия на местообитания и взаимодействията между видовете. В

plant species or time some expansive grasses at the same time (Sláviková and Krajčovič, 1998).

The Slovak Republic joining to the EU has revealed so-called abandoned grassland. A problem that had existed before, but its scale was unknown. Until 2004 Statistical Office of Slovak Republic used information and data from the Office of Geodesy, Cartography and Cadastre (informing about the distribution of individual cultures, e.g. forests, grassland, arable land, lakes, etc.) with the resolution of one square meter.

And this information has been replacing in statistical reporting from Agricultural Paying Agency (and with different rules obtaining information more than 0.30 ha only). Now, the two organizations are reporting difference at level of 41 per cent of total semi-natural grassland area (Office of Cadastre 880,000 ha and Agricultural Paying Agency 520,000 ha) (Britaňák et al., 2015). Considerable part of these grasslands (not only, because abandonment occurs on arable land) are found on North-East of Slovakia.

Abandonment of agricultural land is currently documented by negative demographic developments in this area. The volume of unused or sporadically used permanent grassland thus provides scope for experiments, the impacts of which can be reflected in different areas: economic, social, environmental, agricultural, recreational and legislative.

Cessation of management on grassland or abandonment of agricultural landscape completely has been creating conditions for secondary succession. According to Zaplata et al. (2013) plant succession is the directional development of the vegetation of a given area over a certain time period in response to changing habitat conditions and species interactions. In this respect, a “successional phase” is a floristic and този смисъл, "последователна фаза" е флористична и физиономична част от последователността, характеризираща се със смяна на видовия състав. Развитието на биоценозата завършва с климатична или едафична кулминация, която се изразява в най-голямото биологично разнообразие и най-голямото междувидово взаимодействие (Terek and Vostal, 2009). Последователността се придружава от увеличаване на производителността на екосистемата. След много години (хиляди или милиони) тя може да претърпи значително намаляване на производителността и да се стигне до упадък (Peltzer et al., 2010). Но, на по-ранните фази, нахлуването на нови дървесни видове, като *Picea abies* (L.) H.Karst, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. и *Rosa canina* L., се случва е тревостои, най-вече в планински райони (Maloch, 1952).

За да се обърне негативната тенденция или да се спре процесът и да се върне към фуражното производство, е необходимо да се осигури допълнителна енергия (под формата на рязане, мулчиране или торене) на тревостоя. Тъй като постоянните тревостои имат както производствена, така и непроизводствена функция, е необходимо също така да се извърши първична намеса, която да доведе до бързото им възстановяване.

Целта е да се определи количествено последователността след възстановяване на управлението на изоставени тревостои в планинския район на Словакия. Предполагаме, че възстановяването на управлението ще подпомогне житните и бобови растения за сметка на дървесни и храстовидни видове, а изоставеният тревостой ще възстанови състава си, показвайки признаци за по-ранните етапи на приемственост.

physiognomic section within succession characterized by shifts in species composition.

The development of biocoenosis ends either climatic or edaphic climax, which is represented by the greatest biodiversity and the greatest amount of interspecific relationships (Terek and Vostal, 2009). And succession is accompanied by an increase in productivity of an ecosystem. After many years (thousands or millions) it can undergo substantial declines in productivity and retrogression will happen (Peltzer et al., 2010). But, in the earlier phases, encroachment of pioneer woody species, like *Picea abies* (L.) H.Karst, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and *Rosa canina* L., has occurred on grassland in mountainous areas, especially (Maloch, 1952).

In order to reverse the negative trend, or to stop the process and to bring it back to forage production, it is necessary to provide an extra energy (in form of cutting, mulching, or fertilization) to the grassland. Since permanent grassland are represented by both production and non-production function, it is also necessary to perform pratotechnical intervention that will lead to its rapid restoration.

The aim of the contribution is to quantify succession rate after reinstatement of management on abandoned grassland in mountain area of Slovakia. We hypothesise that reinstatement of management will promote grasses and legumes at the expense of tree and shrub species, and this abandoned grassland will restore its composition showing signs of the younger stages of succession.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Полевият експеримент с възобновяване на различно управление на изоставен тревостой е извършен в пла-

MATERIAL AND METHODS

The field experiment with reinstatement of different management on abandoned grassland was established in нинска област (Словакия) през 2013 г. На територията (1005 m) в землището на с. Липтовска тепличка има постоянна сума на валежите от 925 mm годишно (525 mm за периода на растеж) и постоянна средна температура от 4.5°C (9.5°C в периода на растеж). Върху алувиален тревостой, който не е използван от 15 години, с преобладаващи билки (*Alchemilla xanthochlora* Rothm., *Cruciata leavipes* Opiz, *Hypericum perforatum* L.), са навлезли следните дървесни видове: *Picea abies (L.), H.Karst, Rosa canina* L. *върху сухи местообитания и Salix sp.* L. *и Alnus glutinosa (*L.*) Gaertn. на по-влажни.* През пролетта на 2013 г., тревостоят се състои от 41 вида васкуларни растения (с изключение на дървета и храсти). Таблица 1 представя управление на обработките, така че представлява всички видове използване от екстензивна форма до интензивна форма в тази планинска област (пасищата не са включени).

a mountain area (Low Tatras Mts.) of Slovakia in 2013. At the site (1005 m a.s.l.) in cadastre of Liptovská Teplička village is long-term sum of rainfall 925 mm annually (525 mm over growing period) and long-term average of temperature is 4.5°C (9.5°C in growing period). On previously 15 years non-utilized, alluvial grassland with dominance of herbs (*Alchemilla xanthochlora* Rothm., *Cruciata leavipes* Opiz, *Hypericum perforatum* L.) there was encroachment of woody species: *Picea abies* (L.), H.Karst, *Rosa canina* L. on drier microhabitats and *Salix* sp. L. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. on wetter one. In the springtime of 2013 the grassland consisted by 41 vascular plant species (excluding trees and shrubs).

Table 1 presents management treatments, so it represents all types of utilization from extensive to intensive form in this mountainous area (grazing was not included).

Таблица 1. Описание на първичните обработки на изоставен полуестествен тревостой

Table 1. Description of pratotechnical treatments on abandoned semi-natural grassland

Обработка Treatment	Описание/Description
1	Никаква – изоставен тревостой оставен на постепенна последователност/None – abandoned grassland left to gradual succession
2	Един откос годишно/One cut a year
3	Два откоса с приложение на тор/Two cuts a year with fertilization of P_{30} and K_{60} kg.ha^{-1}
4	Два откоса годишно/Two cuts a year
5	Мулчиране веднъж годишно/Mulching once a year
6	Два откоса годишно с торене /Two cuts a year with fertilization of N_{45} kg.ha^{-1}+ PK
7	Два откоса годишно с торене/Two cuts a year with fertilization of N_{90} kg.ha^{-1}+ PK
8	Три откоса годишно с торене/Three cuts a year with fertilization of N_{90} kg.ha^{-1}+ PK

Забележка: цифрите в индекса представляват дози от хранителни вещества
Note: numbers in subscript represent doses of nutrients

Ние картографирахме растителността преди всяко третиране, за да регистрираме някои промени в ботаническата състав чрез намалено проективно преобладаване (Maloch, 1952). Видовете са обединени в основна растителна група от житни, бобови растения и други разнотреви. Използвахме метода TLA (time-lag analysis – анализ на времевия промеждутък)

We mapped the vegetation before each treatment to record some changes in botanical composition by of reduced projective dominance (Maloch, 1952). Species were aggregated to main botanical group of grasses, legumes and other herbs, subsequently.

We applied TLA method (time-lag analysis) (Collins et al., 2000), it is a

(Collins et al., 2000), който е метричен подход, използван за изследване на времевата динамика на екологичните общества чрез илиминиране на различията в общността и увеличаване на времевия промеждутък (едногодишен промеждутък, двугодишен промеждутък и тригодишен промеждутък – използвани в настоящата статия). Той измерва скоростта и произхода на промяната на растителната общност, популацията или видовата група (Collins et al., 2000, Kampichler et al., 2012). Времевите промеждутъци са трансформирани в квадратни корени. Резултатите, кривата на регресионната линия, имат три състояния: положителна – различието в lag означава, че съобществото претърпява промяна на посоката; отрицателна – съобществото се връща към по-ранното състояние на хронологията; и нула – съобществото е стабилна (Kampichler et al., 2012). Всички данни се преработват чрез трансформация на Hellinger (Euclidean разстояние) N'ij = sqrt (Nij / ΣN + j), където Nij е размерът на популацията на вида i през година j и CN + j е сумата от индивидите във всички видове през година j. (Legendre and Gallagher, 2001). Тя има предимството да съставя база данни директно съпоставими, независимо от видовото богатство и изобилие (Kampichler et al., 2012).

Всички данни са обработени с Statit Custom QC.

distance- based approach used to study temporal dynamics of ecological communities by regressing community dissimilarity over increasing time lags (one-year lags, two-year lags, and three-year lags – used in this paper).

It measures the rate and origin of the change of the plant community, population or species group (Collins et al., 2000, Kampichler et al., 2012).

Time-lags are square-root transformed. Results, the slope of the regression line, have three state: positive – dissimilarity on lag implies that the community is undergoing directional change; negative – the community returns to an earlier state of the time series; and zero – community is stable (Kampichler et al., 2012).

All data were transformed by the Hellinger transformation (Euclidean distance) $N'_{ij} = \mathrm{sqrt}(N_{ij}/\Sigma N_{+j})$, where N_{ij} is the population size of species *i* in year *j*, and ΣN_{+j} is the sum of individuals across all species in year *j*. (Legendre and Gallagher, 2001).

It has the advantage of making assemblages directly comparable independent of their species richness and abundance (Kampichler et al., 2012).

Data was processed by Statit Custom QC.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Тук са представени резултатите от четиригодишния период от 2013 г. до 2016 г. Ботаническият състав на основната флористична група от тревостоя в началото и в края на експерименталния период е даден в Таблица 2. Първата операция чрез рязане или мулчиране потиска появата на дървесни растения (данните не са предоставени). Честотата на използване (включително минералното торене) по-

RESULTS AND DISCUSSION

Here, we present the results of four-year period from 2013 to 2016. Botanical composition of the main floristic group of grassland at the beginning and end of experimental period are given in Table 2. The first usage by cutting or mulching has suppressed the occurrence of woody plants in the grassland (data not shown). Frequency of utilization (including mineral fertilization) has influenced botanical composition. Non-parametric влиява ботаническия състав. Непараметричният метод за анализ Kruskal-Wallis ANOVA разкри статистически незначителни разлики между честотата на изобилието на житни треви (x^2 = 7.02, Df = 3, P = 0.07). Наблюдавано е значително нарастване на присъствието на житни в тревостоя с нарастваща честота на използване (Spearman корелация: ρ = 0.47, P = 0.007). Данните за бобовите растения дават подобни резултати като житните, но с по-голяма статистическа значимост (непараметрична ANOVA: χ^2 = 12.20, Df = 3, P = 0.007 и рангова корелация: ρ = 0.54, P = 0.001). Увеличеният дял на житни и бобови растения при по-висока честота на използване са за сметка на други треви. Различията между честотата на използване са статистически значими (Kruskal-Wallis тест: χ^2 = 17.67, Df = 3, P <0.001). Повишената честота на използване намалява групата на другите трви (Spearman корелация: ρ = -0.54, P <0.001). Развитието в ботаническия състав на тревостоя се очакваше и тази тенденция е известна от литературата (например, Maloch, 1952; Frame, 1992; Hopkins, 2000; Novák, 2008). Но, според Holúbek (2000), оптималното съотношение между тези групи в полуестествени тревостои (житни 50-70%, бобови растения 10-30%, други треви 10-20%) не е удовлетворително.

Kruskal-Wallis ANOVA revealed statistically marginal differences among group of frequency on grasses abundances (χ^2 = 7.02, Df = 3, P = 0.07). There was significant increment of grass presences in grassland with increasing frequency of utilization (Spearman correlation: ρ = 0.47, P = 0.007). Data about legumes have provided similar results as grasses, but with more statistical power (non-parametric ANOVA: χ^2 = 12.20, Df = 3, P = 0.007 and rank correlation: ρ = 0.54, P = 0.001). Increased shares of grasses and legumes under higher frequency of utilization were at expense of other herbs. Differentiations among frequency of utilization were statistically significant (Kruskal-Wallis test: χ^2 = 17.67, Df = 3, P < 0.001). Increased utilization frequency diminished the group of other herbs (Spearman correlation: ρ = -0.54, P < 0.001). Development in botanical composition of grassland was expected and this trend is generally known from literature (e.g. Maloch, 1952; Frame, 1992; Hopkins, 2000; Novák, 2008). But, optimal ratio among these groups on semi-natural grassland (grasses 50-70%, legumes 10-30%, other herbs 10-20%) according to Holúbek (2000) was not satisfied.

Таблица 2. Ботанически състав, повлиян от различната честота на използване и минерално торене в началото и в края на експеримента (D%). Данните са средни стойности на честотата на косене или мулчиране

Table 2. Botanical composition influenced by different frequency of utilization and mineral fertilization at the beginning and ending of the experiment (D %). Data are averages of frequency of mowing or mulching

Група/Group	Обработки/Treatments							
2013								
	1 (0)	2 (1)	3 (2)	4 (2)	5 (1)	6 (2)	7 (2)	8 (3)
Житни/Grasses	32.2	53.8	37.8	48.0	47.6	51.4	61.5	58.7
Бобови/Legumes	7.8	4.8	13.3	5.1	7.8	9.1	5.3	5.2
Разнотреви/Herbs	60.0	41.4	45.6	45.6	44.6	38.6	31.2	34.9
2016								
Житни/Grasses	38.3	31.8	33.7	47.5	33.1	47.9	63.3	53.2
Бобови/Legumes	3.3	6.9	45.8	18.3	8.5	29.6	13.3	15.9
Разнотреви/Herbs	55.1	56.4	18.3	30.1	54.8	23.0	22.3	29.9

Note: In the parenthesis are shown frequency of utilization per annum.

Забележка: В скоби се показва годишната честота на използване.

Kampichler et al. (2012) посочват, че амплитудата на наклона на TLA обикновено е между 0,02 и 0,25. Въз основа на резултатите, показани в Таблица 3, обработката с една честота на използване (обработка 2 и 5) стабилизира тревостоя по същия начин, различавайки се само при манипулацията на биомаса. Тези две обработки са първобитни системи според Kampichler et al. (2014). Полуестествен тревостой (най-интензивното третиране 8), който е косен три пъти, показва удивителни признаци на обратната последователност (не ретрогресия според Peltzer et al., 2010). С други думи, тревостоят при тази обработка достига желаната по-начална фаза на последователност. Най-голяма промяна показа обработката с косене два пъти годишно. Други обработки, според Kampichler et al. (2014), показват управлявани или нарушени системи. Авторите използват наклона на линия на регресията b = 0.04 като праг между естествения кръговрат (b <0.04) и съобществата, подложени на антропогенно въздействие (b> 0.04). Тук ботаническата група от житни треви е най-стабилния компонент на алувиалното съобщество на тревостоя с белези от по-начална фаза на приемственост при обработки, повлияни от най-високата доза на азот. Бобовите растения при третиране без използване се подлагат на контролирана промяна. При други обработки, тази функционална растителна група или се стабилизира, или показва по-начална фази на приемственост. Групата от други треви не е елиминирана достатъчно. Тя е представена от най-сериозния кръговрат на видовете, водещ до най-високите наклони на линия на регресията (подлежи на промяна на посоката, особено при обработка 7). Britaňák et al. (2012) откриват по-драстични промени в посоката при три вида тревостои: полуестествени, изоставени и необработени. Всички накло-

Kampichler et al. (2012) mentioned the range of slope of TLA is generally between 0.02 and 0.25. Based on results shown in Table 3, treatment with one frequency of utilization (treatments 2 and 5) stabilized grassland communities by the same way, differing with biomass manipulation only. These two treatments represent a primeval systems *sensu* Kampichler et al. (2014).

Three times mown semi-natural grassland (the most intensive treatment 8) shows unique sings of backward succession (not retrogression *sensu* Peltzer et al., 2010). In other words, grassland under this manipulation gets to the desired younger phase of succession. The most dramatic change displayed treatment with mown twice a year. Other treatments, according to Kampichler et al. (2014), show managed or disturbed systems. The authors use the slope of regression line b = 0.04 as a threshold between natural turnover (b < 0.04) and communities subjected to anthropogenic impact (b > 0.04).

Here, botanical group of grasses are the most stable constituent of alluvial grassland community with marks of younger phase of succession on treatments influenced by the highest dose of nitrogen application. Legumes on treatment without utilization undergo directional change. On other treatments this functional plant group is either stabilized or shows the younger phases of succession.

Group of other herbs is not eliminated enough and it is presented by the most dramatic species turnover resulting in the highest slopes of regression line (it undergoes directional change, especially under management on treatment 7). Britaňák et al. (2012) found more drastic directional changes in three types of grassland: semi-natural, abandoned and ruderal. All slopes of regression line were ни на линия на регресията са b> 0,1.

Като цяло възстановяването на използването на изоставени тревостои показва известна стабилност. Поради това е необходим по-интензивен подход (като по-често използване, по-висока доза минерални торове, използване на органични торове, директно сондиране или оран и презасяване с продуктивни растителни видове) или по-дълъг период на контрол.

В нашия експеримент, недостатъкът на този подход е по-кратките времеви периоди, тъй като много екологични процеси протичат по-дълго, включително редки събития, епизодични явления, процеси с голямо годишно непостоянство, неуловими процеси и сложни явления, оставят сигнали при различни времеви честоти Kampichler et al., 2014). Това означава, че се нуждаем от много по-дълъг период от време.

b > 0.1.

Overall, the reinstatement of utilization on previously abandoned grassland shows some stability. Therefore more intensive approach (like more frequent utilization, higher dose of mineral fertilizers, organic fertilizers use, direct drilling or ploughing and reseeding by productive plant species) or longer-time period of monitoring are needed.

In our experiment a shortage of this approach is a lower time periods because many ecological processes take place over longer one, including rare events, episodic phenomena, processes with high annual variability, subtle processes, and complex phenomena, leave signals at different temporal frequencies (Kampichler et al., 2014). It means that we need much longer time period.

Таблица 3. Резултати от TLA метода. Наклон на линията на регресия (без единица)

Table 3. Results of TLA method. Slope of regression line (unitless)

Група/Обработка Group/Treatment	1	2	3	4	5	6	7	8
Житни/Grasses	0.028	0.010	0.034	0.007	0.017	0.007	-0.024	-0.014
Бобови/Legumes	0.064	-0.015	0.022	0.039	-0.017	0.024	-0.005	0.011
Разнотреви/Herbs	-0.030	0.009	0.032	0.057	0.007	0.052	0.087	0.000
Съобщества/Community	0.062	0.003	0.087	0.103	0.007	0.083	0.058	-0.003

ИЗВОДИ

Възстановяването на различни (от екстензивни до интензивни) форми на управление незабавно потиска дървесните и храстовите видове. Но, когато използвахме анализ на времевия промеждутък, за да характеризираме степента на последователност, бяхме изненадани, че пасищата показват стабилен състав. Само най-интензивната обработка (прилагането на NPK торове и рязане три пъти годишно) се пренасочва към по-начална фаза на последователност – желан тревостой с преобладаващи житни и бобови растения, с малко количество треви. Нашите резултати предполагат, че възстановяването на управлението отнема време за получаване на високоефективен тревостой, съставен от житни и бобови растения.

CONCLUSIONS

Reinstatement of different (from extensive to intensive) forms of management have suppressed tree and shrub species immediately. But, when we used time-lag analysis to characterize a degree of succession, we were surprised that grassland has shown stable composition. Only the most intensively treatment (application of NPK fertilizers and cutting three times a year) is shifting to younger phase of succession – desired grassland with dominance of grasses and legumes, with little proportion of herbs. Our results suggest the reinstatement of management is time-consuming in regard to obtaining high-performing grassland consisting of grasses and legumes.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Blüthgen, N., C.F. Dormann, D. Prati, V.H. Klaus, T. Kleinebecker, N. Hölzel, F. Alt and S. Boch et al**., 2012. A quantitative index of land-use intensity in grasslands: Integrating mowing, grazing and fertilization. *Basic and Applied Ecology*, 13, 207-220.
2. **Britaňák, N., Ľ. Hanzes and I. Ilavská**, 2012. Quantification of succession in three types of grassland. *Acta Universitatis Prešoviensis: Folia Oecologica*, 55(8), 89-97 (Sk).
3. **Britaňák, N., Ľ. Hanzes and I. Ilavská**, 2015. Botanical composition, succession, qualitative and quantitative similarities of not-managed grassland in comparison with one-mown grassland annually. *Lúkarstvo a pasienkarstvo na Slovensku*, 9, 15-20 (Sk).
4. **Collins, S.L., F. Micheli and L. Hartt**, 2000. A method to determine rates and patterns of variability in ecological communities. *OIKOS*, 91, 285-293.
5. **Fiala, J.**, 2002. Current grassland management systems. *Úroda*, 50, 9-11 (Cz).
6. **Frame, J.**, 1992. Improved grassland management. Farming Press Books, Ipswich.
7. **Holúbek, R.**, 2000. Plants of meadows and pastures: Diversity of plants. Slovak University of Agriculture, Nitra (Sk).
8. **Hopkins, A.**, 2000. Grass: its production and utilization. Blackwell Science, Oxford.
9. **Jančovič, J. and Ľ. Vozár**, 2004. What´s about semi-natural grassland that are not use for feed purpose. *Naše Pole*, 8, 24-25 (Sk).
10. **Kamplichler, C., C.A.M. van Turnhout, V. Devictor H.P. van der Jeugh**, 2012. Large-scale changes in community composition: determining land use and climate change signals. *PLoS ONE*, 7, doi.org/10.1371/journal.pone.0035272.
11. **Kampichler, C., D.G. Angeler, R.T. Holmes, A. Leito, S. Svensson, H.P. van der Jeugd and T. Wesołowski**, 2014. Temporal dynamics of bird community composition: an analysis of baseline conditions from long-term data. *Oecologia*, 175, 1301-1313.
12. **Legendre, P. and E.D. Gallagher**, 2001. Ecologically meaningful transformation for ordination of species data. *OIKOS*, 129, 271-280.
13. **Maloch, M.**, 1952. Forage production (Management of meadows and pastures basics of growing meadows and pastures). Oráč, Bratislava (Sk).
14. **Novák, J.**, 2008. Pasture, meadows and lawns. Patria, Prievidza (Sk).
15. **Peltzer, D.A., D.A. Wardle, V.J. Allison, W.T. Baisden, R.D. Bardgett, O.A. Chadwick et al**., 2010. Understanding ecosystem retrogression. *Ecological Monographs*, 80(4), 509-529.
16. **Ružičková, H. and H. Kalivoda**, 2007. Flower meadows: Natural wealth of Slovakia. Veda, Bratislava (Sk).
17. **Slávkiková, D. and V. Krajčovič**, 1998. Biodiversity conservation and management of semi-natural grassland in Poľana – Protected Landscape Area. IUCN, Bratislava (Sk).
18. **Terek, J. and Z. Vostal**, 2009. Basics of ecology and environmental science. Prešov University, Prešov (Sk).
19. **Zaplata, M.K., S. Winter, A. Fischer, J. Kollmann and W. Ulrich**, 2013. Species-driven phases and increasing structure in early-successional plant communities. *American Naturalist*, 181, e17-e27.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (6), 91-104 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на листното третиране с органичен тор върху биопродуктивните показатели на фураж от естествен тревостой от типа *Nardus stricta* L. в района на Средна Стара планина

Минко Илиев

Институт по планинско животновъдство и земеделие, 5600 Троян, България

Impact of foliar application of organic fertilizer on the bioproductive indicators of forage of natural grassland of *Nardus stricta* L. type in the region of the Central Balkan Mountain

Minko Iliev

Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 5600 Troyan, Bulgaria
E-mail: iliev_ved@abv.bg

Received: 23.11.2018 *Accepted:* 19.12.2018 *Published:* 27.12.2018

РЕЗЮМЕ

През периода 2011-2013 г. в района на Средна Стара планина при планинско-ливадни почви и надморска височина 1400 м, върху природно пасище от картълов тип (*Nardus stricta*) е проучено влиянието на органичното листно торене с препарата Биостим.

Установени са добива и ботаничния състав на естествен тревостой от типа *Nardus stricta*. Изпитани бяха следните варианти: 1. Нетретирано с листен тор (Контрола); 2. Биостим 100 ml/da; 3. Биостим 200 ml/da; 4. Биостим 300 ml/da; 5. Биостим 400 ml/da.

При всички варианти на листно третиране е установено повишаване продуктивността на суха маса от тревостоя през третата година. Най-висок ефект средно за опитния период е отчетен при вариант 2 (100ml/da) – превишение спрямо контролата от 28.75%.

SUMMARY

During the period 2011-2013, the impact of organic foliar fertilizing with Biostim was studied on *Nardus stricta* natural pasture in the area of the Central Balkan Mountain in the conditions of mountain meadow soils and 1400 m above sea level.

The yield and botanical composition of natural grassland of *Nardus stricta* type were established. The following variants were studied: 1. Nontreated variant without any application of foliar fertilizing (Control); 2. Biostim 100 ml/da; 3. Biostim 200 ml/da; 4. Biostim 300 ml/da; 5. Biostim 400 ml/da.

In all variants of foliar treatment, an increase in the yield of dry matter was found in the third year. The highest effect average for the experimental period was reported in variant 2 (100ml/da) – an excess over the control with 28.75%.

Листното торене с Биостим влияе върху ботаническия състав на тревостоя, като повишава значимо участието на житните треви и разнотревите, и намалява това на бобовите.

Основни изменения в тревния състав настъпват през третата година, когато определящия тревостоя вид *Nardus stricta* е изместен от видовете *Agrostis alba* , *Agrostis capilaris, Festuca ovina, Festuca rubra.*

Ключови думи: естествен тревостой, листно торене, добиви, ботаничен състав

Foliar fertilizing with Biostim had an impact on the botanical composition of the grassland, as it significantly increased the share of grasses and motley grasses, and decreased legumes.

The major changes in grass composition occur in the third year when *Nardus stricta*, which is specied that determine the grassland, was replaced from *Agrostis alba*, *Aggrostis capilaris*, *Festuca ovina*, *Festuca rubra*.

Key words: natural grassland, foliar fertilizing, yields, botanical composition

УВОД

Типът на торовете и методите на тяхното внасяне са важен фактор, влияещ върху процеса на оптимизация на торенето на естествените тревни площи.

Неколкократното покосяване и изпасване на тревостоя през периода на активна вегетация изисква и съответното подхранване с минерални или органични торове (Yakimova, 1977). Известно е, че с правилно регулирано и балансирано органично и минерално торене, се създават условия за благоприятни изменения във фитоценологичния и качествен профил при естествените тревни съобщества (Stoeva and Vateva, 2008; Tenz et al., 2010; Samuil et al., 2013). В зависимост от използваните торове може да се увеличава или намалява участието на характерните видове които определят ливадните или пасищтните екотипове Maruşca et al. (2014).

Необходимо е прилагането на екологосъобразни торови норми щадящи околната среда от една страна а от друга влияещи положително върху добива и качеството на фураж получен от тези естествени природни ресурси (Totev et al., 1998; Kolczarek et al, 2008), както и намиране на необходимия баланс при прилагането на целия спектър от технологиите за повърхностно подобряване с цел опазване на биологичното

INTRODUCTION

The type of fertilizers and the methods of their introduction are an important factor influencing the process of optimization of the fertilization of natural lawns.

Several decay and grazing of the grass during the period of active vegetation also requires the corresponding feeding with mineral or organic fertilizers (Yakimova, 1977). It is well known that with well-regulated and balanced organic and mineral fertilization conditions are created conditions for favorable changes in the phytocenological and qualitative profile of natural grass communities (Stoeva and Vateva, 2008; Tenz et al., 2010; Samuil et al., 2013). Depending on the fertilizers used, the participation of typical species that define the grassland or grassland eco-types may be increased or decreased by Maruşca et al. (2014).

It is necessary to apply both ecofriendly fertilizing norms that are environmentally friendly and on the other hand that have a positive impact on yield and forage quality obtained from these natural resources (Totev et al., 1998; Kolczarek et al, 2008), as well as to find the necessary balance in the implementation of the whole range of technologies for upgrading in order to preserve biodiversity and ecosystem разнообразие и равновесие в еко-системата.

Освен традиционното органично торене като нова алтернатива за практиката може да се прилагат листни органични торове, чрез третиране директно върху фотосинтитичния апарат на растителните видове, които обитават естествените тревни площи (Jankowski et al., 1999; Jankowska-Huflejt, 2012), като този начин на торене допринася за повишаване на добивите и води до съответните икономически ползи (Bebawi et al., 2011).

Чрез листно третиране на естествените тревостои се създава посока за изменение на флористичния състав в желано направление, като в зависимост от използваните торове може да се подпомогне развитието на ценните видове от групите на житните и бобови треви (Jankowska-Huflejt, 2006), както и да се подтисне определена група от нежеланите нископродуктивни представители в тревостоите.

Според някои автори с внасянето на листни торове, базирани на хуминови киселини се стимулира нарастването на кореновата система на растенията, увеличава се коефициента на използване на хранителните вещества, включително и на по-труднодостъпния фосфор (Armstrong, 1999; Lambers et al., 2006; Magani and Kunchida, 2009; Datta et al., 2011). Според други автори хуминовите киселини, които са основа на листните органични торове, активно подобряват и стимулират дишането и фотосинтезата на растенията , азотния и въглехидратен метаболизъм (Ovcharhenko, 2001; Senn et al., 2003; Sengalevich, 2007).

В проучване с хуминови киселини върху люцерна Vasileva and Kostov (2015a, b), установяват натрупване на по-голямо количество суха коренова маса, по-високо съотношение азот в кореновата маса/азот в надземната маса, по-голямо количество усвоим азот, както и по-високи и по-стабилни

equilibrium.

In addition to traditional organic fertilizing, foliar organic fertilizers can also be applied as a new alternative by treating directly on the photosynthetic apparatus of plant species inhabiting the natural lawns (Jankowski et al., 1999; Jankowska-Huflejt, 2012). This fertilizing method contributes to increased yields and leads to corresponding economic benefits (Bebawi et al., 2011).

Foliar treatment of natural grasslands gives a direction for changing the floristic composition in a desired direction. Depending on the fertilizers used, it is possible to support the development of the valuable species of grass and legumes (Jankowska-Huflejt, 2006), as well as to suppress a certain group of undesirable low-productive representatives in grasslands.

According to some authors, the introduction of foliar fertilizers based on humic acids stimulates the growth of the root system of plants, increasing the consumption rate of nutrients, including phosphorus that is more difficult to reach (Armstrong, 1999; Lambers et al., 2006; Magani and Kunchida, 2009; Datta et al., 2011). According to other authors, the humic acids, which are the basis of leaf organic fertilizers, actively improve and stimulate plant respiration and photosynthesis, nitrogen and carbohydrate metabolism (Ovcharhenko, 2001; Senn et al., 2003; Sengalevich, 2007).

In a humic acid study on alfalfa, Vasileva and Kostov (2015a, b), found a higher dry root mass, a higher ratio of nitrogen in root/nitrogen in above-surface matter, a higher amount of digestible nitrogen, and higher and more stable yields of forage and seeds.

добиви на фураж и семена. Прилагането на листен хуматен тор върху естествен тревостой стимулира образуването на повече протеин и подобрява хранителната стойност на фуража (Klimas and Balezentiene, 2010). С увеличаване на участието на бобовите треви се повишава качеството на тревостоя (Naydenova et al., 2013).

Липсата на подобни изследвания за използване на листни хуматни торове при естествените тревостои в страната ни включително и в региона на Средна Стара планина налага необходимостта от провеждането им.

Целта на проучването беше да се установи влиянието на ежегодното третиране с листен органичен тор върху биопродуктивните показатели на естествено пасище от картълов тип, разположено в района на Средна Стара планина (Троянски регион).

The application of foliar humic fertilizer on natural grassland stimulates the formation of more protein and improves the nutritional value of forage (Klimas and Balezentiene, 2010). The quality of grassland improves with the increasing of share legumes in the grassland (Naydenova et al., 2013).

The lack of studies on the use of leaf humic fertilizers in natural grasslands in Bulgaria, including in the Central Balkan Mountain region, necessitates to conduct them.

The purpose of the study was to determine the impact of the annual treatment with organic fertilizer on the bioproductive indicators of natural pasture of *Nardus stricta* type, located in the region of the Central Balkan Mountain (Troyan region).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитът беше изведен през периода 2011-2013 година. на естествен тревостой – картълово пасище (тип *Nardus stricta*) по блоковия метод в 4 повторения при площ на реколтната парцелка от 5 m^2.

В продължение на 3 години се проучиха следните варианти: 1. Нетретирано с листен тор (Контрола); 2. Листно третиране с Биостим в доза 100ml/da; 3. Листно третиране с Биостим в доза 200ml/da; 4. Листно третиране с Биостим в доза 300ml/da; 5. Листно третиране с Биостим в доза 400 ml/da.

Листното третиране с органичен тор се прилагаше еднократно през годината, като работния разтвор се внасяше с гръбна пръскачка по време на активната вегетация на тревите.

Съставът на листния тор Биостим е следния: реакция(pH) - 6.8, солева концентрация 20.15, азот(N) - 2.1%, фосфор (P) - 1.54%, калий (K) - 11.2%, калций (Ca) - 0.15%, магнезий (Mg) - 0.01%, желязо (Fe) - 0.024%,

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted over the period 2011-2013 on a natural grassland – a pasture (*Nardus stricta* type). The experimental design was block method in 4 replications with 5 m^2 plot size.

For 3 years, the following variants were studied: 1. Nontreated variant without any application of foliar fertilizing (Control); 2. Foliar application with Biostim 100 ml/da; 3. Foliar application with Biostim 200 ml/da; 4. Foliar application with Biostim 300 ml/da; 5. Foliar application with Biostim 400 ml/da.

Foliar treatment with organic fertilizer was applied once a year, and the working solution was introduced with a sprayer during active grass vegetation.

The composition of Biostim foliar fertilizer is as follows: reaction (pH) - 6.8, salt concentration 20.15, nitrogen (N) - 2.1%, phosphorus (P) - 1.54%, potassium (K) - 11.2%, magnesium (Mg) - 0.01%, iron (Fe) - 0.024%, zinc (Zn) - 0.037%.

цинк (Zn) - 0.037%. Органично съдържание - 2.25, хуминови киселини - до 14%, фулво-киселини до 7%.

Реколтирането на опитните площи се извършваше при фаза изкласяване - начало на цъфтеж на картъла.

При провеждането на опита са проследявани следните показатели:

1. Добив на суха маса (kg/da) – определен е чрез окосяване площта на всяка реколтна парцелка по повторения с последващо изсушаване в лабораторни условия при 105°C на растителни проби от 1 kg и преизчисляване за площ от 1 da въз основа на съдържанието на сухо вещество.

2. Ботанически промени в тревостоя (в %) – определени са тегловно чрез анализ на тревни проби, взети непосредствено преди коситбата, установено е процентното участие на основните ботанически групи (житни и бобови треви), на разнотревите (общо), както и участието на отделните видове през годините.

Статистическата обработка на данните за добив е извършвана чрез дисперсионен анализ (Lidanski, 1988)

Organic content - 2.25, humic acids - up to 14%, fulvic acids up to 7%.

The harvesting of the experimental areas was carried out at the stage of ear formation - the beginning of flowering of Nardus stricta.

The following indicators were studied in the experiment:

1. Dry matter yield (kg/da) determined by mowing the area of each harvest plot in replications with subsequent drying under laboratory conditions at 105 °C of plant samples of 1 kg and recalculation for an area of 1 da on the basis of dry matter.

2. Botanical changes in grassland (in %) - determined by weight analysis of grass samples taken just prior to mowing, percentage share of the main botanical groups (grasses and legumes), motley grasses (as a whole) and the participation of separate species over the years.

The statistical processing of yield data was carried out by dispersion analysis (Lindanski, 1988).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните за климатичните условия температура и валежи са посочени в Таблица 1 и Таблица 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Temperature and rainfall data are listed in Table 1 and Table 2.

Таблица 1. Температура на въздуха в °C, метеостанция гр. Троян
Table 1. Air temperature in °C, meteorological station in Troyan

Месец Година Month Year	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I-XII	IV-IX
2011	-0,2	-0,3	4,9	9,7	14,7	18,5	21	20,2	18,2	8,8	1,8	2,6	9,99	17,1
2012	-2,1	-5,4	5,6	12,2	15,1	20,8	24,2	21,7	17,8	13,2	7,6	-0,4	10,86	18,6
2013	1,1	3,8	5,4	12	17,5	18,7	19,4	22,7	15,4	12,1	7,7	0,8	11,38	17,6
Средно Average 2011-2013	-0,4	-0,6	5,3	11,3	15,8	19,3	21,5	21,5	17,1	11,4	5,7	1,0	10,74	17,8

Таблица 2. Месечна и годишна сума на валежите в mm, метеостанция гр. Троян
Table 2. Monthly and annual precipitation rate in mm, meteorological station in Troyan

Месец Година Month Година	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I -XII	IV-IX
2011	22,5	24,8	41,7	68	69,1	98,4	72,9	96,8	6,8	109	2	34,3	646,3	412,0
2012	124,5	45,6	35,5	36	174	51,8	7,2	39,1	30,8	43,6	11,8	79,1	679,0	338,9
2013	43,3	62,6	49,7	92,1	90,3	274,6	61,2	14,9	22,7	53,2	27,7	15	807,3	555,8
Средно Average 2011-2013	63,4	44,3	42,3	65,4	111,1	141,6	47,1	50,3	20,1	68,6	13,8	42,8	710,9	435,6

Получените добиви на суха маса по години и средно за опитния период са отразени в Таблица 3.

Ефектът върху добивът на суха маса при листното торене с Биостим през първите две години е слабо изразен - торените варианти не надвишават по продуктивност неторената контрола (вар. 1, Таблица 3). Причина за слабата продуктивност от картъловия тревостой са климатичните условия. През 2011г., средното количество валежи през вегетационния период (април-септември) е 412,0 mm. През 2012 г. се наблюдава екстремно засушаване особенно през летните месеци, като през юли нивото на влагообезпечаване е критично от 7,2 mm, средното количество валежи през вегетационния период е 338,9 mm което е крайно недостатъчно (Таблица 2). Това засушаване неизбежно повлия отрицателно върху растежа и развитието на тревната растителност, както и върху усвояването на листния тор Биостим. През трета опитна година ефекта от листното торене е висок. С много добри добиви на суха маса се характеризира вар. 2 (386,18 kg/da). С добри добиви са и вариантите 3 и 4 (торене в доза 200ml/da и 300ml/da), съответно отбелязващи превишение от 85,49% (вар. 3) и 50,66% (вар. 4). При най-високата доза на торене от 400 ml/da е отчетено минимално

The dry mass yields per year and average for the experimental period are shown in Table 3.

The impact on dry mass in the foliar fertilizing with Biostim in the first two years is slightly expressed - the fertilized variants do not exceed in productivity the nontreated control (var. 1, Table 3). The cause for the low productivity of *Nardus stricta* grassland is climate conditions.

In 2011, the average rainfall during the vegetation season (April to September) was 412.0 mm. Extreme droughts occurred in 2012 especially during the summer months, with a moisture content of 7.2 mm in July, the average rainfall during the vegetation period was 338.9 mm, which was extremely low (Table 2).

This drought inevitably had a negative impact on the growth and development of grass vegetation, as well as on the absorption of Biostim foliar fertilizer. In the third experimental year the impact of leaf fertilization was high. Variant 2 is characterized by very good yields of dry mass (386.18 kg/ da).

Variants 3 and 4 (fertilizing at a dose of 200ml/da and 300ml/da) had also good yields, respectively, exceeding with 85.49% (var. 3) and 50.66% (var. 4). The minimum exceeding of 5.07% (var. 5) was reported for the highest fertilizing превишение от 5,07% (вар. 5). Получените резултати, характеризиращи добивите, могат да се обяснят с положителното въздействие на органичния тор Биостим. Считаме, че това се реализира в съчетание с благоприятните климатични условия през третата година (обилното количество валежи по време на активната вегетация на тревостоя - месеците май, юни и юли, от 90,3 mm 274,6 mm, 61,2 mm и средномесечните температури от 17,5 до 19,4^{o}C). Това показва,че ефекта от третирането с хуминовия препарат Биостим върху картъловия тревостой зависи пряко от факторите на околната среда.

Средно за периода 2011-2013 г. добивът на суха маса е най-висок при торене с листен тор Биостим в доза 100 ml/da (вар. 2) - превишение от 28,75%. Останалите варианти на листно торене не надминават по добив неторената контрола.

dose of 400 ml/da. These results, which characterize the yields, can be explained by the positive impact of Biostim organic fertilizer. We consider this is implemented in combination with the favourable climate conditions in the third year (the abundant rainfall during the active vegetation in May, June and July, from 90.3 mm to 274.6 mm, 61.2 mm and the average monthly temperatures from 17.5 to 19.4°C). This shows that the impact of Biostim humic fertilizer on *Nardus stricta* grassland is directly dependent on environmental factors.

On average, for the period 2011-2013, the highest dry matter yield was obtained in the foliar fertilizing with Biostim at a dose of 100 ml/da (var. 2) - an excess of 28.75%. The other foliar fertilizing variants did not exceed the nontreated control yield.

Таблица 3. Добив на суха маса в kg/da по години и средно за тригодишен период (2011-2013), от естествен тревостой тип *Nardus stricta* при листно торене с Биостим

Table 3. Dry matter yield in kg/da by years and average over a three-year period (2011-2013), from natural grassland of Nardus stricta type with foliar fertilizing with Biostim

Варианти/Variants	2011			2012			2013			Средно/Average 2011-2013		
	кg/da	% спрямо К compared to C	Доказаност Proof	кg/da	% спрямо К compared to C	Доказаност Proof	кg/da	% спрямо К compared to C	Доказаност Proof	кg/da	% спрямо К compared to C	Доказаност Proof
1.Нетретирано - К Non-treated - C	217.94	100.0	-	173.43	100.0	-	140.32	100.0	-	177.23	100.0	-
2. Биостим/Biostim (100 ml/da)	165.07	75.74	-	133.32	76.87	-	386.18	275.21	+++	228.19	128.75	-
3. Биостим/Biostim (200 ml/da)	134.63	61.77	-	142.23	82.01	-	260.28	185.49	+++	179.04	101.02	-
4. Биостим/Biostim (300 ml/da)	129.58	59.45	-	144.37	83.24	-	211.40	150.66	++	161.78	91.28	-
5. Биостим/Biostim (400 ml/da)	176.19	80.84	-	164.85	95.05	-	147.44	105.07	-	162.83	91.87	-
GD 5%	137.08	62.74		133.61	77.01		41.41	29.47		87.22	49.14	
GD 1%	192.41	88.06		187.54	108.09		58.13	41.37		122.43	68.98	
GD 0.1%	271.64	124.32		264.76	152.60		82.06	58.41		172.85	97.38	

Ботаничен състав на тревостоя

В картъловото пасище при листно торене с Биостим най-голям дял средно за тригодишния период заемат житните многогодишни треви – 56,97 % (Фигура 1). Тяхното участие е

Botanical composition of grassland

Perennial grasses took the highest average share in Nardus stricta pasture for the three-year period with foliar fertilizing with Biostim - 56.97% (Figure 1). The highest share was found in the най-голямо през втората година, когато достигат 72,6%. През третата година участието на житните намалява почти наполовина в сравнение с предходната година. Разнотревните видове заемат средно за периода 41,75%. Противоположно на житните видове при тях се наблюдава тенденция към нарастване от първата към третата година. Те заемат най-малък дял през втората година - 25,32%, при силно увеличено присъствие на житните видове. Бобовите растения заемат средно 3,36%. Те са малко повече през втората година. Житните видове заемат най-голям дял в трети вариант при втората доза на торене от 200ml/da (вар.3), разнотревите са най-малко в същия вариант, а най-голям е делът им когато не се третира с Биостим в първи вариант (вар. 1К). Бобовите видове са най-много при третиране с 400 ml/da (вар.5), а най-малко е тяхното участие в първи вариант (неторен).

Присъствието на отделните видове в тревостоя под влияние на листното торене с Биостим е посочено на Таблица 4. От анализа на данните през първа опитна година се вижда, че при всички варианти преобладават житните видове: овча власатка, картъл, полевица. При вар.1 (К) овчата власатка е с 17,2%, а картълът 13,8%. При първата доза на торене от 100 ml/da (вар.2) картълът е 13,0%, полевицата – 13,0%, а овчата власатка достига 26,0%. При третиране на тревостоя с 200 ml/da (вар.3), овчата власатка е с най-висок процент на участие от житните треви – 38,5%, следвана от картъл – 19,2%. След третиране на тревостоя в доза 300 ml/da (вар.4), полевицата и овчата власатка са с равно процентно участие – 25,0%, разнотревите възлизат на 50,0%. Във най високата доза на листно третиране (вар.5), овчата власатка и картъла са съответно 36,8% и 15,8%, а полевицата 6,3% и тимотейката 5,3%. Разно-

second year, when they reached 72.6%. In the third year, the share of grasses decreased by almost a half compared to the previous year. Motley grasses occupied an average of 41.75%.

Contrary to grass species, their tendency was to grow from the first to the third year. They took the smallest share in the second year - 25.32%, with a stronger presence of grass species. Legumes took an average of 3.36%. They were a bit more in the second year.

Grass species occupied the largest share in the third variant at the second fertilizing dose of 200ml/da (var. 3), motley grasses had the lowest share for the first variant, while they had the highest share in the nontreated first variant (var. 1C). Legume species had the highest share in the treatment with 400 ml/d (var. 5), and the lowest share in the first variant (nontreated).

The share of individual species in the grassland under the impact of foliar fertilization with Biostim is shown in Table 4. Data in the first experimental year show that grass species prevail in all variants: sheep fescue, Nardus stricta, bentgrass. In var. 1 (C) sheep fescue is 17.2% and Nardus stricta is 13.8%. At the first fertilizing dose of 100 ml/da (var. 2), Nardus stricta is 13.0%, bent grass is 13.0% and sheep fescue reaches 26.0%. When treating the grassland with 200 ml/da (var. 3), sheep fescue has the highest percentage share of grass species - 38.5%, followed by Nardus stricta - 19.2%. After treatment of the grassland with a dose of 300 ml/da (var. 4), bent grass and sheep fescue have an equal percentage share - 25.0%, motley grasses amounts to 50.0%. At the highest dose of foliar treatment (lime 5), sheep fescue and *Nardus stricta* were 36.8% and 15.8%, respectively, bent grass was 6.3% and timothy grass was 5.3%.

тревите са с най-голямо участие при контролния вариант 58,7%, а присъствие на бобови треви имаше само във вар.2 – звездан 2,6%. Преобладаващите видове от житните треви общо за всички изпитани варианти са: картъл, овча власатка, обикновена полевица. Процента на участие на разнотревите е висок при всички изпитани варианти. Под влияние на торенето с Биостим през втората година се вижда, че при всички варианти на изпитване доминират основно житни видове като: бяла полевица, обикновена полевица и картъл. Най-голямо процентно участие на житни треви беше регистрирано при торене с Биостим в доза 200 ml/da (вар.3), като в тревостоя бялата полевица достига 45,0% участие, а обикновената полевица - 31,5%. Разнотревите достигат най-ниско участие при посочения вариант – 13,6% и най-високо при торене в доза 400 ml/da, (вар.5) – 41,1%. От бобовите растения се установи наличието на звездан в два от вариантите на листно торене, като неговото участие варира от 5,9% до 3,5% (варианти 5 и 4). С най-голямо процентно участие на картъл е вар.1 (К) – 6,7%, а с най-ниско вар.3 – 5,4%, като разликата между най-високото и най-ниското процентно участие от този вид във вариантите беше 1,3%. В сравнение с първата година (2011 г.) се наблюдава видима редукция от популацията на този вид.

Ботаническите промени протичащи във тревния състав през трета опитна година се характеризират със следните особености. Участието на разнотревите е в границите от 65,6% до 56,8% (варианти 5 и 1). Установи се повишено видово участие на житните треви, като доминантът в тревното съобщество *Nardus stricta* L. не беше установен в тревостоя. През тази година обикновената полевица е преобладаващият житен вид във всички варианти. При третиране на тревостоя в доза 100ml/da (вар.2), участието им е

Motley grasses took the highest share of 58.7% in the control variant, while legumes were found only in variant 2 - bird's-foot-trefoil with 2.6%. The predominant types of grasses in total for all tested variants are: *Nardus stricta*, sheep fescue, common bentgrass. Motley grasses had a high percentage share in all tested variants. During the second year, under the impact of Biostim can be seen that in all variants predominate grass species, such as: white bentgrass, common bentgrass and *Nardus stricta*.

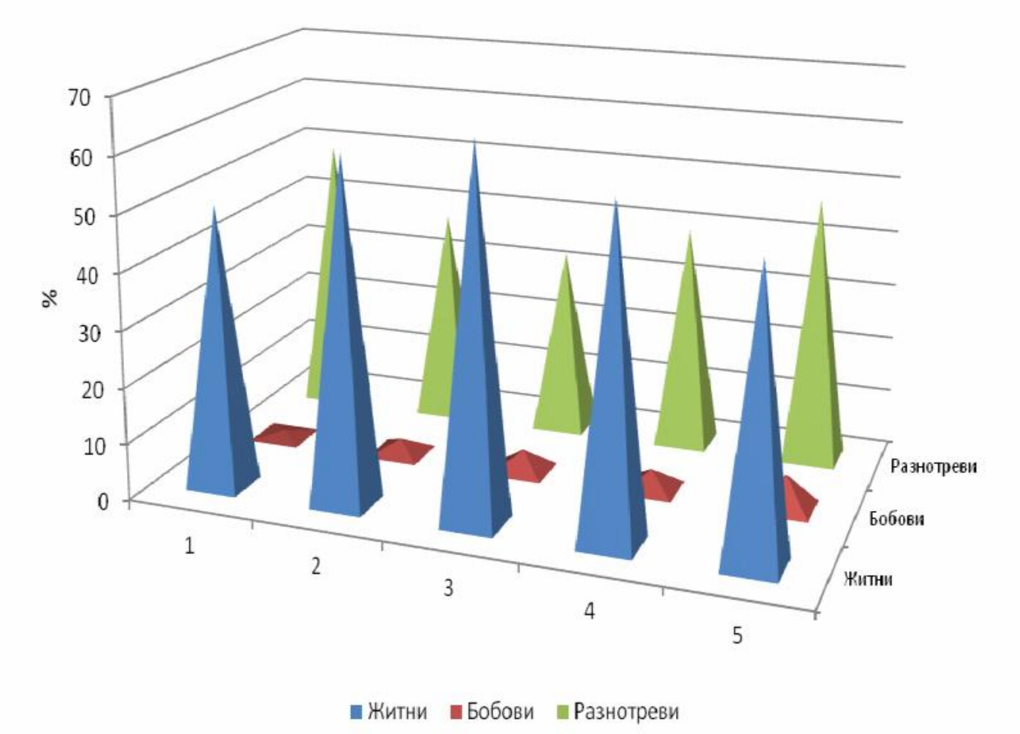
The highest percentage of grasses was recorded in fertilization with Biostim at a dose of 200 ml/d (var. 3), as white bentgrass reached 45.0% and bentgrass - 31.5%. Motley grasses took the lowest share - 13.6% and the highest in fertilization at a dose of 400 ml/da, (var. 5) - 41.1%.

The legumes were presented by bird's-foot-trefoil in two variants with foliar fertilizing, ranging from 5.9% to 3.5% (variants 5 and 4). The highest share of *Nardus stricta* was found in var. 1 (K) - 6.7% and the lowest share in var.3 - 5.4%, as the difference between the highest and the lowest percentage of this type in the variants was 1.3%. Compared to the first year (2011), there was a visible reduction in the population of this species.

The botanical changes occurring in the grass composition during the third experimental year are characterized by the following features. The share of motley grasses ranged from 65.6% to 56.8% (variants 5 and 1). There was an increased share of grasses, as the dominant species of *Nardus stricta* L. was not found in the grassland. This year, common bentgrass was a predominant grass species in all variants. When the grassland was treated at a dose of 100ml/da (var. 2), they had the highest share and reached 42.3%. Cock's foot, най-високо и достига 42,3%. В по-ниска степен са застъпени видовете като ежова главица, овча власатка, алпийска тимотейка. Участието в тревната покривка на алпийската тимотейка е най-високо при най-високата доза на торене с Биостим от 400 ml/da - 1,5%; а червената власатка е с участие от 9,0% в същия вариант (вар.5). При торене в доза 300 ml/da (вар.4) процентът на червената власатка е най-висок - 14,6%. От бобовите растения беше установено участието на планинска детелина, като във (вар. 3) 300 ml/da участието им достигна - 3,8%. През тази година прави впечатление отпадането от тревостоя на основния вид картъл и преобладаването на съпътстващи видове от житните треви като обикновената полевица. През годините в картъловото пасище доминират бялата полевица, обикновената полевица, картъла и овчата власатка (Таблица 4).

sheep fescue and Alpine timothy-grass took a lower share.

The highest share of Alpine timothy-grass was found in the highest fertilization dose with Biostim from 400 ml/da - 1.5%; while red fescue share was 9.0% in the same variant (var. 5). The highest percentage of red fescue of 14.6% was found at a dose of 300 ml/d (var. 4). The legumes were presented by mountain clover as they reached 3.8% share at a dose of 300 ml/da (var. 3). In this year, it is striking that the main species of *Nardus stricta* declined while some grass species were predominant, such as common bentgrass. Over the years, white bentgrass, common wolves, *Nardus stricta* and sheep fescue dominated in *Nardus stricta* pasture (Table 4).



Фиг. 1. Ботаничен състав на естествен тревостой от типа *Nardus stricta* в тегловен процент по групи, години и средно за периода 2011-2013г.
Fig. 1. Botanical composition of natural grassland of *Nardus stricta* type by weight percentage per group, years and average for the period 2011-2013

Таблица 4. Ботаничен състав на естествен тревостой от типа *Nardus stricta* в тегловен процент, по видове, за периода 2011-2013г.

Table 4. Botanical composition of natural grassland of *Nardus stricta* type in weight percentage, by species, for the period 2011-2013

Варианти/Variants	Видов състав/Species	2011	2012	2013
1.Контрола/Control	Nardus stricta	13.8	6.7	-
	Agrostis capilaris	10.3	20.0	30.9
	Dactylis glomerata	-	-	1.0
	Trifolium pratense	-	-	1.0
	Festuca ovina	17.2	6.7	-
	Agrostis alba	-	33.3	-
	Festuca rubra	-	-	10.3
	Weeds participate	58.7	33.3	56.8
2.100ml/da	Nardus stricta	13.0	6.3	-
	Festuca ovina	26.0	12.5	-
	Festuca rubra	-	-	1.9
	Agrostis alba	-	37.5	1.9
	Phleum alpinum	-	-	3.8
	Agrostis capilaris	13.0	25.0	42.3
	Lotus corniculatus	2.6	-	-
	Weeds participate	45.4	18.7	50.1
3.200ml/da	Nardus stricta	19.2	5.4	-
	Agrostis capilaris	3.8	31.5	39.0
	Agrostis alba	-	45.0	-
	Festuca ovina	38.5	4.5	9.5
	Trifolium montanum	-	-	3.8
	Weeds participate	38.5	13.6	47.7
4.300ml/da	Nardus stricta	-	5.6	-
	Agrostis capilaris	25.0	21.0	29.2
	Agrostis alba	-	42.0	-
	Festuca ovina	25.0	7.0	-
	Festuca rubra	-	-	14.6
	Phleum alpinum	-	-	3.8
	Lotus corniculatus	-	3.5	-
	Weeds participate	50.0	19.9	50.1
5.400ml/da	Nardus stricta	15.8	5.9	-
	Agrostis capilaris	6.3	11.8	23.9
	Festuca rubra	-	-	9.0
	Festuca ovina	36.8	5.9	-
	Agrostis alba	-	29.4	-
	Phleum alpinum	5.3	-	1.5
	Lotus corniculatus	-	5.9	-
	Weeds participate	36.8	41.1	65.6

ИЗВОДИ

Торенето с органичния хуминов препарат Биостим е надеждно средство за повърхностно подобряване на картъловите пасища в района на Средна Стара планина. Те реагират положително на листното торене с органичен тор най вече през третата година от изпитването, като добивите от суха маса достигат ниво от 386,18 kg/da при третиране на тревостоя със 100ml/da Биостим при втория изпитван вариант. Средно за периода добивите се увеличават при листно торене с Биостим в доза 100ml/da до 28.75%, останалите варианти/дози на торене не надвишават по добиви неторената контрола. По-високите дози на торене оказват и по-слаб ефект върху добива на суха маса. Продуктивността на тревостоите от тип *Nardus stricta* зависи основно от специфичните характеристики на доминиращите видове и от климатичните условия през годината.

В резултат на листното торене настъпва положително изменение в тревния състав. Увеличава се на първо място делът на многогодишните житни треви и разнотревните видове и намалява делът на бобовият компонент. Това води до съществени изменения във видовия състав на тревостоя, като едификаторът *Nardus stricta* L. отстъпва доминиращата си позиция на *Agrostis capilaris* L и отпада напълно от тревостоя. Повишава се и видовото разнообразие с типични представители от многогодишните житни треви като *Agrostis capilaris* , *Agrostis alba* L., *Festuca rubra* L., *Festuca ovina* L., *Phleum alpinum* L. Препаратът Биостим оказва слабо влияние върху бобовите растения, като тяхното участие във тревостоя се незначително. Основни предтавители са *Trifolium montanum* L., *Lotus corniculatus* L. и др.

CONCLUSIONS

Fertilizing with the organic humic fertilizer Biostim is a reliable means of surface improvement of *Nardus stricta* pastures in the region of the Central Balkan Mountain. They respond positively to foliar fertilization with organic fertilizer during the third experimental year, as dry matter yields reached 386.18 kg/da when the grassland was treated by 100m/da by Biostim in the second experimental variant. Average for the period, the yields increased with foliar fertilizing with Biostim at a dose of 100ml/da to 28.75%, the other fertilization variants/fertilization doses did not exceed the nontreated control yield. Higher fertilizing doses also had a lesser impact on dry matter production. The productivity of grassland of *Nardus stricta* species depends mainly on the specific characteristics of the dominant species and the climate conditions of the year.

Foliar fertilization results in a positive change in the grass composition. The share of perennial grasses and motley grasses increased while the share of legumes decreased. This leads to significant changes in the species composition of grassland, as *Nardus stricta* L. yielded its dominant position to *Agrostis capilaris* L and dropped completely from the grassland. The species variety with typical representatives of perennial grasses such as *Agrostis capilaris*, *Agrostis alba* L., *Festuca rubra* L., *Festuca ovina* L., *Phleum alpinum* L. was also increased. The main representatives were *Trifolium montanum* L., *Lotus corniculatus* L. and others.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Armstrong, D.L.**, 1999. Better crops with plant food. Potash & Phosphate Institute, Norcross, Georgia, 83: 4, 1-30.
2. **Bebawi, F. F., J. S. Vitelli, S. D. Campbell and R. J. Mayer**, 2011. Impact of control strategies on bellyache bush (*Jatropha gossypiifolia* L.) mortality, seedling recruitment, population dynamics, pastures yield and cost analysis. CSIRO Publishing,

Collingwood, Australia, *Rangeland Journal*, 33(3), 277-286.
3. **Datta, S., C.M. Kim, M. Pernas, N. Pires, H. Proust, T. Thomas, P. Vijayakumar and L. Dolan**, 2011. Root hairs: development, growth and evolution at the plant-soil interface. *Plant & Soil*, 346: 1-14.
4. **Jankowska-Huflejt, H.**, 2006. Analysis of yields and botanical composition of meadow sward changes under folareee and soil fertilisation with nitrogen. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, Poland, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio E, Agricultura, 61, 397-404.
5. **Jankowska-Huflejt, H.**, 2012. Effect of fertilization and folareee feeding on the yields, persistence of species and chemical composition of meadow sward in production conditions, Wydawnictwo Universytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, Poland, Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu - Rolnictwo, 103, 589, 115-123.
6. **Jankowski, K., J. Jodelka and R. Kolczarek**, 1999. Effectiveness of permanent meadow folareee fertilisation with nitrogen Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław, Poland, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy*, 2(2), 1-6.
7. **Klimas, E., L. Balezentiene, H. Schnyder, J. Isselstein, F. Taube, K. Auerswald, J. Schellberg, M. Wachendorf, A. Herrmann, M. Gierus, N. Wrage and A. Hopkins**, 2010. Pastures feeding value response to humic fertilizers. In: Proceedings of the 23rd General Meeting of the European Grassland Federation, Kiel, Germany, 29th August - 2nd September , pp 193-195, 2 ref.
8. **Kolczarek, R., G. A. Ciepiela, J. Jankowska, J. Jodełka**, 2008. Influence of different forms of nitrogen fertilization on the content of macrolements (K, Na) in meadow sward: Part I.Polish Society for Magnesium Research, Olsztyn, Poland, *Journal of Elementology*, 13(3), 341-348.
9. **Lambers, H., M.W. Shane, M.D. Cramer, S.J. Pearse and E.J. Veneklaas**, 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.*, 98: 693-713.
10. **Lidanski, T.**, 1988. Statistical methods in biology and agriculture. Zemizdat, Sofia, pp. 150-187 (Bg).
11. **Magani, I.E. and C. Kunchida**, 2009. Effect of phosphorus fertilizer on growth, yield and crude protein content of cowpea. *J. Appl. Biosciences*, 23: 1387-1393.
12. **Maruşca, T., N. Dragomir, V. Mocanu, A. Blaj, F. Tarjoc, C. Dragomir and S. Constantinescu**, 2014. Effect of some improvement works on the floristic composition of the vegetal cover in Nardus stricta grasslands. *Animal Science and Biotechnologies*, 47(1), 144-150.
13. **Naydenova, G., Ts. Hristova and Y. Aleksiev**, 2013. Objectives and approaches in the breeding of perennial legumes for use in temporary pasturelands. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 29(2), 233-250.
14. **Ovcharenko, M.**, 2001. Humates-activators for crop productivity. Agronomical Bulletin, No2, 13-14 (Ru).
15. **Samuil, C., V. Vintu, C. Sirbu and M. Stavarache**, 2013. Influence of fertilizers on the biodiversity of semi-natural grassland in the Eastern Carpathians. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania, Notulae Botanicae, Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca, 41(1), 195-200.
16. **Sengalevich, G.**, 2007. The natural biostimulating organic fertilizer "Humustim" (potassium humate) and its impact on the plant organism. Humustim - a gift from nature, the fertilizer of the future. "DIMI 99" Publishing house, pp. 29-31 (Bg).

17. **Senn, T. L., A. R. Kingman and W. C. Godley**, 2003. A review of humus and humic acids. Research series N 165, South Carolona Agricultural Experimental Station, Cleruson, South Carolina.
18. **Stoeva, K. and V. Vateva**, 2008. Productivity and variation of the grassland of natural pastures in Strandzha mountain, fertilized with organic and mineral fertilizers. Jubilee National Conference - 1-2.10.2008, Kardzhali (Bg).
19. **Tenz, R., R. Elmer, O. Huguenin-Elie and A. Lüscher**, 2010. Effects of fertilisation on a mat-grass grassland. Agroscope FAL Reckenholz, Zürich, Switzerland, Recherche Agronomique Suisse, 5, 176-183.
20. **Totev, T., V. Lingorski, K. Tankov, Ts. Mihovski, B. Churkova, D. Karadocheva, K. Belperchinov and D. Pavlov**, 1998. Changes in productivity and nitrate content of feed under the influence of mineral fertilization in mountain meadows, *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 1(5), 366-373.
21. **Vasileva, V. and O. Kostov**, 2015a. Effect of mineral and organic fertilization on alfalfa forage and soil fertility. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(9), 678-686.
22. **Vasileva, V. and O. Kostov**, 2015b. Effect of mineral and organic fertilization of alfalfa on some seed yield characteristics, root biomass accumulation and soil humus content. *Acta Agriculturae Serbica*, XX(39), 51-64.
23. **Yakimova, Y.**, 1977. Improvement and use of natural meadows and pastures. Zemizdat, Sofia (Bg).