

Съдържание на някои микроелементи, взаимодействието между тях и с компонентите на клетъчните стени в сухото вещество на червената детелина

Йордан Маркович¹, Неделко Рачич¹, Филип Бекчич¹, Джордже
Лазаревич¹, Ивица Костич¹, Таня Васич², Саня Живкович²

¹Институт по фуражни култури, 37251 Глободер, Крушевац, Република Сърбия
²Нишки университет, Селскостопански факултет, Косанчицева 4, 37000
Крушевац, Република Сърбия

Concentration of Some Microelements, their Mutual Relationship and Association with Cell Wall Components in the Dry Matter of Red Clover

Jordan Marković¹, Nedeljko Racić¹, Filip Bekčić¹, Đorđe Lazarević¹, Ivica
Kostić¹, Tanja Vasić², Sanja Živković²

¹Institute for Forage Crops, 37251 Globoder, Kruševac, R Serbia
²University of Niš, Faculty of agriculture Kruševac, Kosančićeva 4, 37000 Kruševac, R
Serbia

E-mail: jordan.markovic@ikbks.com

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Минералите са необходими за почти всички жизнени процеси в организма. Недостигът на някои основни макро или микроминерали при животните води до поява на аномалии, които могат да бъдат коригирани чрез добавка на необходимите елементи.

Фуражите са важен източник на минерали за преживните животни. В някои случаи те могат да осигурят достатъчни количества от всички

SUMMARY

Minerals are required for virtually all vital processes in the body. A deficiency of each essential macrominerals or microminerals in animals results in abnormalities that can only be corrected by supplementation of the deficient minerals.

Forages provide an important source of minerals for ruminants. In some instances, forages may provide adequate quantities of all essential minerals

основни минерали, необходими на преживните животни. В други случаи при недостиг на един или повече минерали е необходима добавката им, за оптималното развитие на животните. Връзката на някои минерали с влакнините или други неразтворими растителни компоненти, може да намали скоростта и степента на освобождаване на минерали от фуражите в стомашно-чревния тракт. Целта на това проучване е да се определят промените в концентрацията на минералните вещества в сухото вещество на червената детелина – (сортове К 39 и К 32) с напредване на растежа и развитието на растенията в първи подраст, както и да се определи количеството на минералните вещества, свързани с компонентите на клетъчните стени. Бяха изследвани три фази на развитие при два сорта червена детелина – бутонизация, начало на цъфтеж и масов цъфтеж в първи подраст. Експериментът беше проведен по блоков метод в три рандомизирани повторения.

Концентрацията на Fe, Zn, Cu и Mn беше определена чрез атомна абсорбционна спектрофотометрия. Според дисперсионният анализ, съществуват значими разлики в развитието на растенията през различните фази на развитие по отношение концентрацията на изследваните минерали. Най-високата концентрация на елементите Cu и Mn е свързана с компонентите на клетъчните стени при червената детелина.

Ключови думи: червена детелина, компоненти на клетъчната стена, микроелементи

УВОД

Червената детелина (*Trifolium pratense* L.) е едно от най-важните бобови растения, отглеждани в

required by ruminants. In other situations, forages are deficient in one or more minerals and supplementation is required for optimal animal performances.

The association of certain minerals with fiber or other insoluble plant components could decrease the rate and extent of mineral release from forages in the gastrointestinal tract.

Objectives of this study was to determine changes in minerals concentration in dry matter of red clover – K 39 and K 32 cultivars with advancing plant growth and development in the first cut, and to measure the amount of minerals associated with the cell wall components.

Three stages of red clover cultivars – mid bud stage, early bloom and mid bloom, were examined in the first cut. The experiment was established as a completely randomized block design in three replications.

The concentration of Fe, Zn, Cu and Mn were measured by atomic absorbance spectrophotometry. Analyses of variances revealed significant differences between stages of plant development for investigated minerals.

The highest proportion of Cu and Mn were associated with cell wall components of red clover.

Keywords: red clover, cell wall componets, microelements

INTRODUCTION

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is one of the most important leguminous plants grown in the temperate climate

умерения климатичен пояс. Тя се развива добре върху различни видове почви, има способността да усвоява атмосферен азот и се характеризира с висока хранителна стойност за преживните животни. Като цяло хранителната стойност на фуражите зависи от много фактори, включително етапа на развитие, условията на околната среда, торенето, прибирането, сорта и др. Сортовете червена детелина се различават по качество в зависимост от това дали са диплоидни или тетраплоидни, както и от продължителността на вегетацията (Drobna and Jančovič, 2006).

Хранителната и енергийна стойност на фуража зависят от състава и количеството на минералните елементи, необходими за растежа и здравословното състояние на животните (Emanuele and Staples, 1990; Kincaid and Cronrath, 1983). В резултат на многобройни изследвания е установено, че количеството на микроелементите в хранителните вещества е неравномерно и зависи от растителния вид, фазата на развитие, агроекологичните фактори, климатичните фактори и т.н. (Harrison et al., 1992; Ledoux and Martz., 1991; Suttle and Jones, 1989). Трябва да се подчертае необходимостта от определяне на референтни стойности на микроелементите, както и на взаимната връзка между тях. Нуждите от минерални вещества за поддържане продуктивността на животните не са еднакви. Някои елементи са необходими в значителни количества и когато те липсват в храната, животните често боледуват. Предозирането на някои елементи също може да повлияе здравето и продуктивността на животните (Dunn and Moss, 1992).

Връзката на някои минерали с влакнинните или други неразтворими растителни компоненти, може да

zone. It grows well on different types of soils, has the ability to fix atmospheric nitrogen and is characterized by high nutritional value for ruminants.

Generally, nutritive value of forages depends on many factors including the stage of development, environmental conditions, fertilization, harvesting, variety, etc.

Varieties of red clover differ in quality depending on whether they are diploid or tetraploid and the length of vegetation (Drobna and Jančovič, 2006).

Therefore, all nutrients can be characterized by energy or nutritional value, but also by the composition and amount of mineral elements necessary for the animal growth and health (Emanuele and Staples, 1990; Kincaid and Cronrath, 1983).

Based on numerous tests, it was established that the amount of microelements in nutrients is unequal and depends on the plant species, stage of plant maturity, agroecological factors, climatic factors, etc. (Harrison et al., 1992; Ledoux and Martz., 1991; Suttle and Jones, 1989).

The necessity of studying the nutritional limits of microelements as well as their mutual relationship should be emphasized. The minerals requirements for maintenance and productivity of animals are not equal.

Some elements are required in significant quantities and when they are lacking in the diet, animals often get sick. An excess of certain elements can also affect the health and productivity of animals (Dunn and Moss, 1992).

The association of certain minerals with fiber or other insoluble plant components could decrease the rate and

намали скоростта и степента на освобождаване на минерали от фуражите в стомашно-чревния тракт. Способността на даден фураж да осигури на животните достатъчно минерални вещества зависи от тяхното съдържание и биодостъпност. Според O'Dell (1984) бионаличността на даден минерал се определя от делът на погълнатия елемент, който се абсорбира, транспортира до мястото на действие и се превръща във физиологично активна форма.

Биодостъпността на минералните вещества във фуража при преживните животни може да бъде повлияна от разпределението на минералните вещества във фуража и от химичната им форма. Установено е, че редица минерали са свързани с клетъчните стени на растенията. Според резултатите получени от Whitehead et al. (1985), в клетъчните стени с по-малки количества са елементи като фосфор, сяра, калий и магнезий, докато калций, манганът, цинкът и медта са в по-големи количества. Разликите между фуражите също са очевидни. По-голям процент от общото количество калций, манган, цинк и мед се намира в клетъчните стени на бялата детелина в сравнение с тръстиковидната власатка. Значителна част от общото количество калций, мед, цинк и желязо в сеното и тревния силаж от люцерна може да бъде свързана с фракцията на неутрално детергентните влакнини (НДВ) (Kincaid and Cronrath, 1983).

Растителните клетъчни стени са богати на съединения, които могат да свързват дву- и тривалентни метални катиони. Полизахаридите играят решаваща роля в свързването и натрупването на микроелементи в клетъчните стени, независимо, че съединения като пектини, аминокиселини и феноли също участват в този процес (Krzetowska,

extent of mineral release from forages in the gastrointestinal tract.

The ability of a forage to provide animals with an adequate supply of minerals is dependent on the mineral content and also the bioavailability of the mineral.

According to O'Dell (1984), bioavailability of a mineral is defined as the proportion of the ingested element that is absorbed, transported to its site of action, and converted to a physiologically active form.

Bioavailability of forage minerals to ruminants may be affected by the distribution of minerals within the forage and the chemical form of the elements present.

A number of minerals have been found to be associated with the plant cell wall. According to the results obtained by Whitehead et al., (1985) only small amounts of phosphorus, sulphur, potassium and magnesium were located in the cell wall, while larger quantities of calcium, manganese, zinc and copper were present.

Differences among forages also were apparent, with a much higher percentage of the total calcium, manganese, zinc and copper present in the cell wall of white clover compared to tall fescue.

A significant amount of the total calcium, copper, zinc and iron in alfalfa hay and grass silage may be associated with the neutral detergent fiber (NDF) fraction (Kincaid and Cronrath, 1983).

Plant cell wall are rich in compounds which are able to bind divalent and trivalent metal cations. Polysaccharides play a crucial role in trace metal binding and accumulation in the cell wall, although other compounds such as pectins, amino acids and phenolics also take part in this process (Krzetowska, 2011).

2011). Много автори (Dronnet et al., 1996; Kartel et al., 1999; Davis et al., 2003; Pellow et al., 2007) посочват, че способността за свързване на двувалентни метални катиони зависи от броя на функционалните групи като -COOH, -OH и -SH, които се намират в съединенията на клетъчната стена. Същите автори стигат и до заключението, че същественият капацитет на клетъчната стена за свързване на двувалентни и тривалентни метални катиони зависи главно от количеството на полизахаридите, изобилстващи от карбоксилни групи.

Целта на това изследване беше да се определят общите концентрации на желязо, мед, цинк и манган в сухото вещество на два сорта червена детелина, прибрани в три фази на развитие при първа коситба, взаимовръзките между тях, както и количествата на тези микроелементи, свързани с неутрално детергентни влакнини (НДВ) и киселинно детергентни влакнини (КДВ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Този експеримент е проведен в опитното поле на Института по фуражни култури в Крушевац, Р. Сърбия (43° 34' 58" N, 21° 19' 35" E). Районът на изследването е разположен на 166 м надморска височина в Югоизточна Сърбия. Според химичните си свойства, почвата принадлежи към групата на слабо киселите почви (pH 6.5 във воден разтвор и 5.7 в N KCl), а според съдържанието на хумус (2.6%) в хумусно-акумулиращия слой се отнася към групата на средно богатите почви. Съдържанието на общ азот (0.16%) класифицира тази почва в групата на средно богатите почви с много ниско съдържание на достъпен фосфор (4.9 mg P₂O₅ /100 g почва) и

Many authors (Dronnet et al., 1996; Kartel et al., 1999; Davis et al., 2003; Pellow et al., 2007) indicated that the ability to bind divalent metal cations depends on the number of functional groups such as -COOH, -OH and -SH occurring in cell wall compounds.

The same authors also concluded that the essential capacity of the cell wall for binding divalent and trivalent metal cations depends mainly on the amount of polysaccharides abundant in carboxyl groups.

The aim of this investigation was to determine the total concentrations of ferrum, copper, zinc and manganese in the dry matter of two cultivars of red clover harvested at three development stages in the first cut, their mutual relationships, as well as the amounts of these microelements associated with neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF).

MATERIAL AND METHODS

This experiment was carried out in the experimental field of the Institute for Forage Crops Kruševac, R Serbia (43° 34' 58" N, 21° 19' 35" E). The study area was located 166 m above sea level in South-East Serbia. According to its chemical properties, the soil belonged to the group of slightly acid soils (pH of 6.5 in aqueous solution and 5.7 in N KCl). In the humus-accumulating layer, the humus content was 2.6% and it belonged to the group of medium-rich soils. The total nitrogen content of 0.16% classified this soil also in the group of medium-rich soils. The soil had a very poor content of available phosphorus (4.9 mg P₂O₅ /100 g of soil), and a potassium content of 23.1 mg K₂O/100 g of soil.

калий от 23.1 mg K₂O/100 g почва. Общото съдържание на Fe, Zn Cu и Mn в почвата е съответно 411 mg kg⁻¹, 26.1 mg kg⁻¹, 9.9 mg kg⁻¹ и 243.8 mg kg⁻¹. Достъпното съдържание на Fe, Zn, Cu и Mn е съответно 91 mg kg⁻¹, 8.7 mg kg⁻¹, 5.2 mg kg⁻¹ и 175.5 mg kg⁻¹.

Опитът е проведен по блоковият метод, в три повторения и схема 2 × 3 третирания (2 сорта и 3 етапа на развитие). Направена е оценка на два сорта червена детелина (cv K 39 и cv K 32) в три фази на развитие през пролетния период на растеж.

Диплоидният сорт червена детелина K 39 (2n) е създаден от голям брой местни популации чрез многобройни цикли на рекурентна фенотипна селекция за продуктивност и биологично-морфологични характеристики (FMA, 2001). Той е устойчив на засушаване и ниски температури, както и на най-значимите икономически болести. Той е отличен източник на пчелна паша и има голям потенциал за производство на семена поради дългия си цикъл на цъфтеж. Тетраплоидният сорт червена детелина - K 32 (4n) е създаден чрез изкуствено удвояване (с помощта на колхицин) на хромозомите на три отделни сорта: K 17, Changins и Viola (FMA, 1993). Характеризира се с големи листа и жизнени цветове. Този сорт червена детелина е устойчив на икономически важни болести и неприятели, както и на ниски температури, но е чувствителен към засушаване. В години с достатъчно валежи и при напояване има висока продуктивност на суха маса. Съдържа висока концентрация на протеини и ниска концентрация на влакнини поради големия дял на листата.

Растенията от чистите посеви се отрязват ръчно с ножица на около 5-7 cm над повърхността на почвата. Първият изследван етап на развитие е фаза бутонизация (Б), при който

The total content of Fe, Zn Cu and Mn in the soil was 411 mg kg⁻¹, 26.1 mg kg⁻¹, 9.9 mg kg⁻¹ and 243.8 mg kg⁻¹, respectively. The available content of Fe, Zn, Cu and Mn was 91 mg kg⁻¹, 8.7 mg kg⁻¹, 5.2 mg kg⁻¹ and 175.5 mg kg⁻¹, respectively.

The experiment was set up as a randomized complete block with three replications and in a 2 × 3 arrangement of treatments (2 cultivars and 3 stages of development). Two cultivars of red clover (cv K 39 and cv K 32) were evaluated at three stages of development in the spring growth.

The diploid red clover cultivar - K 39 (2n) was developed from a large number of domestic populations through numerous cycles of phenotypic recurrent selection for productivity and biological-morphological characteristics (FMA, 2001).

It is drought and low temperature tolerant, as well as resistant to the most economically significant diseases. It makes an excellent bee pasture and has a strong seed output potential due to its long flowering cycle.

The tetraploid red clover cultivar - K 32 (4n) was made by artificially doubling (by colchicine) the chromosomes of three separate varieties: K 17, Changins, and Viola (FMA, 1993). It is characterized by big leaves and vigorous plants.

This red clover cultivar is resistant to economically important diseases and pests, as well as to low temperatures, however, it is drought sensitive.

It produces high DM yields in years with sufficient precipitation and irrigation. It has high protein and low fibre concentrations due to its high proportion of leaves.

Plants from a pure stand were cut manually with scissors at about 5–7 cm above the soil surface. The first studied stage of development was mid bud (MB) where plants were harvested after a

растенията са реколтирани след период на растеж от 62 дни (7 май), вторият е начало на цъфтеж (НЦ) - при цъфтеж 10-15% (растенията са реколтирани след период на растеж от 77 дни - 21 май), а третият е масов цъфтеж (МЦ) - 50% от цъфтежа, при който растенията са реколтирани след период на растеж от 85 дни (29 май). Фуражните проби са изсушени до постоянно тегло при 65°C за 48 часа и след това са смлени с помощта на лабораторна мелница PX-MFC 90 D (KINEMATICA, Luzern, Швейцария) през сито с размер 1 mm. Всички анализи са извършвани върху две паралелни проби, а концентрациите на компонентите са изчислени на база 105°C СВ.

Общите концентрации на Fe, Zn, Cu и Mn, както и количествата им, свързани с неутрално детергентни влакнини (НДВ) и киселинно детергентни влакнини (КДВ), са измерени чрез атомна абсорбционна спектрофотометрия (PERKIN ELMER 1100 B).

Експериментът е проведен по блоков метод с три повторения и факторна подредба на шест третирания (два сорта червена детелина и три етапа на развитие, n = 18). Данните бяха обработени чрез дисперсионен анализ с помощта на STATISTICA 6. Разликите между етапите на развитие при растенията бяха сравнени чрез теста на Tukey. Резултатите се считаха за статистически значими при $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Земеделските почви се различават значително по общото съдържание на микроелементи и способността да осигуряват микроелементи в количества, достатъчни за оптимален растеж на културите (White and Zasoski, 1999).

growing period of 62 days (7 May), the second was early bloom (EBL) at around 10–15% of flowering where plants were harvested after a growing period of 77 days (21 May), and the third was mid bloom (MBL) at around 50% of flowering where plants were harvested after a growing period of 85 days (29 May). Forage samples were dried to constant weight at 65°C for 48h and then ground using a hammer grinding laboratory mill PX-MFC 90 D (KINEMATICA, Luzern, Switzerland) through a screen size of 1 mm. All analyses were done in duplicate and component concentrations were expressed on a 105°C DM basis.

The total concentrations of Fe, Zn, Cu and Mn, as well as their amounts associated with neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were measured by atomic absorbance spectrophotometry (PERKIN ELMER 1100 B).

The experiment was established as a randomized complete block design with three replications and a factorial arrangement of six treatments (two red clover cultivars and three stages of development, n = 18). The data were subjected to an analysis of variance using the STATISTICA 6. Differences among treatments were tested using Tukey's test. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Agricultural soils vary widely in their total micronutrient content and in their ability to supply micronutrients in quantities sufficient for optimal crop growth (White and Zasoski, 1999).

Недостигът на хранителни вещества при растенията, свързан с ниското съдържание на Fe, Zn, Cu и Mn в земеделските почви, е рядкост. но Общото им съдържание в почвата дава приблизителна представа за тяхната усвояемост им от растенията. Това е така, защото наличието на хранителни вещества зависи от рН на почвата, съдържанието на органични вещества и други физични и химични условия в ризосферата (Govasmark et al., 2005).

В Таблица 1 е представено влиянието на сорта и етапа на развитие на растенията от червена детелина върху концентрацията на Fe, Zn, Cu и Mn в сухото вещество, при реколтиране на пролетния подраст.

Nutrient deficiency in plants related to a low total content of Fe, Zn, Cu and Mn in agricultural soils is rare, but total soil levels are only roughly indicative of plant availability.

This is because nutrient availability depends on soil pH, organic matter content and other physical and chemical conditions in the rhizosphere (Govasmark et al., 2005).

Table 1 shows the impact of red clover cultivar and stage of plant development on Fe, Zn, Cu and Mn concentration in the dry matter of red clover harvested in the first growth – spring vegetation period.

Таблица 1. Съдържание на Fe, Zn, Cu и Mn в сухото вещество на червена детелина, в първи откос, mg kg⁻¹ СВ

Table 1. Content of Fe, Zn, Cu and Mn in the dry matter of red clover harvested in the first cut, mg kg⁻¹ DM

Етапи на развитие /Treatments	Fe		Zn		Cu		Mn	
	K-39	K - 32	K-39	K - 32	K-39	K - 32	K-39	K - 32
Б/МВ	350.3 ^a	162.0 ^b	36.6 ^{bc}	43.2 ^a	5.4 ^d	17.2 ^a	44.8 ^a	46.9 ^a
НЦ/EBL	159.0 ^b	86.9 ^c	34.6 ^c	34.5 ^c	5.4 ^d	12.3 ^b	31.2 ^c	37.9 ^b
МЦ/MBL	152.3 ^b	152.5 ^b	32.2 ^c	39.7 ^{ab}	9.0 ^c	18.7 ^a	33.2 ^{bc}	45.1 ^a

Б – реколтиране във фенофаза бутонизация; НЦ – начало на цъфтеж; МЦ – масов цъфтеж; К - 39 - диплоиден сорт червена детелина; К - 32 - тетраплоиден сорт червена детелина; Различните букви в колоната означават значително различни средства (P < 0.05).

MB – mid bud stage of plant development; EBL – early bloom of plant development; MBL – mid bloom of plant development; К – 39 – diploid red clover cultivar; К – 32 – tetraploid red clover cultivar; Different letters in the column denote significantly different means (P < 0.05).

Средното съдържание на Fe в диплоидния сорт червена детелина е по-високо (p < 0.05), сравнено с тетраплоидния (с изключение на фаза масов цъфтеж). Съдържанието на Fe намалява с напредване на зрелостта при диплоидния сорт червена детелина (от фаза бутонизация до фаза масов цъфтеж), като варира от 350.3 до 152.3 mg kg⁻¹ СВ. От друга страна, при тетраплоидния сорт

Averaged content of Fe in the diploid red clover cultivar was higher (p < 0.05) than in the tetraploid red clover cultivar, except at the mid bloom stage of growth.

The content of Fe decreased with advancing maturity in diploid red clover cultivar, ranged from 350.3 to 152.3 mg kg⁻¹ DM from mid bud stage to mid bloom stage of growth.

червена детелина съдържанието на Fe се увеличава във фаза цъфтеж (Таблица 1).

Установени са значителни разлики ($p < 0.05$) в концентрацията на Zn между сортовете червена детелина. Тетраплоидният сорт на червената детелина е с най-висока концентрация на Zn във фаза бутонизация ($43.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ СВ}$), следвана от фаза масов цъфтеж ($39.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DM}$).

Концентрациите на Cu и Mn са по-високи при тетраплоидния сорт червена детелина спрямо диплоидния. С напредване растежа и развитието на растенията, концентрацията на Cu нараства съответно от 5.4 до $9.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ СВ}$ при диплоидния и от 17.2 до $18.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ СВ}$ при тетраплоидния сорт червена детелина.

Сортовете червена детелина са с максимална концентрация на Cu и Mn съответно във фаза масов цъфтеж и бутонизация (Таблица 1).

Подобни резултати за концентрациите на Fe, Zn, Cu и Mn в сухото вещество на червената детелина са докладвани от Kunelius et al. (2000). Резултатите в проучването на Schlegel et al. (2016) сочат, че с напредване фазата на растеж и развитие, концентрацията на Fe, Zn, Cu и Mn прогресивно намалява във фуражите. От друга страна, същите автори установяват, че всички минерални концентрации (с изключение на Fe) са по-високи при вторично подрастване в сравнение първоначално пролетно отрастване.

Коефициентите на взаимна зависимост между Fe, Zn, Cu и Mn са представени в Таблица 2.

On the other hand, content of Fe increased with blooming in the tetraploid red clover cultivar (Table 1).

Significant differences ($p < 0.05$) were found in Zn concentration of the red clover cultivars. The highest Zn concentration was determined at the mid bud stage of growth in tetraploid red clover cultivar ($43.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DM}$), followed by the mid bloom stage of growth ($39.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DM}$).

Cu and Mn concentrations, on the other hand, were higher in tetraploid red clover cultivar than in the diploid red clover cultivar. With advancing plant growth and development Cu concentration increased from 5.4 to $9.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DM}$ in diploid red clover cultivar and from 17.2 to $18.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DM}$ in tetraploid red clover cultivar, respectively. The maximum Cu concentration was observed at mid bloom stage of growth in both red clover cultivars, whereas the maximum Mn concentration was observed at mid bud stage of growth in both red clover cultivars (Table 1).

Similar results for Fe, Zn, Cu and Mn concentrations in the dry matter of red clover were reported by Kunelius et al. (2000).

Results obtained in the study conducting by Schlegel et al. (2016) showed that with increasing growth stage concentration of Fe, Zn, Cu and Mn progressively decreased in forages.

On the other hand, the same authors found that all mineral concentrations, except Fe concentration, were higher in subsequent harvests than in the first seasonal harvest.

The mutual relationship coefficients between Fe, Zn, Cu and Mn are presented in the Table 2.

Таблица 2. Коефициент на взаимна зависимост между Fe, Zn, Cu и Mn в сухото вещество на червена детелина, в първи откос
Table 2. Mutual relationship coefficient between Fe, Zn, Cu and Mn in the dry matter of red clover harvested in the first cut

Обработки / Treatments	Fe-Zn		Fe-Cu		Fe-Mn		Zn-Cu		Zn-Mn		Cu-Mn	
	K-39	K-32	K-39	K-32	K-39	K-32	K-39	K-32	K-39	K-32	K-39	K-32
Б/MB	9.6 ^a	3.7 ^{bc}	65.2 ^a	9.5 ^c	7.8 ^a	3.5 ^{cd}	6.7 ^a	2.5 ^c	0.8 ^b	0.9 ^{ab}	0.1 ^c	0.4 ^a
НЦ/EBL	4.6 ^b	2.5 ^c	29.5 ^b	7.0 ^c	5.1 ^b	2.3 ^d	6.4 ^a	2.8 ^{bc}	1.1 ^a	0.9 ^{ab}	0.1 ^c	0.4 ^a
МЦ/MBL	4.7 ^b	3.8 ^{bc}	17.1 ^{bc}	8.1 ^c	4.6 ^{bc}	3.4 ^{cd}	3.6 ^b	2.1 ^c	0.9 ^{ab}	0.9 ^{ab}	0.3 ^b	0.4 ^a

Б – реколтиране във фенофаза бутонизация; НЦ – начало на цъфтеж; МЦ – масов цъфтеж; К - 39 - диплоиден сорт червена детелина; К - 32 - тетраплоиден сорт червена детелина; Различните букви в колоната означават значително различни средни стойности (P < 0.05).

MB – mid bud stage of plant development; EBL – early bloom of plant development; MBL – mid bloom of plant development; K – 39 – diploid red clover cultivar; K – 32 – tetraploid red clover cultivar; Different letters in the column denote significantly different means (P < 0.05).

Резултатите, получени в това проучване, показват, че концентрацията на Zn е по-висока от концентрацията на Cu при двата сорта червена детелина, а връзката им варира съответно от 6.7 (във фенофаза бутонизация) до 3.6 (в масов цъфтеж) - при диплоидния сорт, и от 2.5 (във фенофаза бутонизация) до 2.1 (масов цъфтеж) респективно при тетраплоидния сорт червена детелина. От друга страна, концентрациите на Zn и Cu са по-ниски спрямо концентрацията на Mn, при двата сорта червена детелина. Взаимната връзка между Zn и Mn, както и Cu и Mn са постоянни при тетраплоидния сорт червена детелина с напредване на растежа и развитието на растенията.

Антагонизмите между катионите Fe, Zn, Cu и Mn предполагат, че тези ефекти могат да бъдат обяснени с взаимодействието катион-катион, сходни механизми на поглъщане и конкуренция между катионите (Rietra et al., 2017). Необходими са допълнителни изследвания по отношение на някои катион-анионни взаимодействия, които могат да бъдат специфични, а именно взаимодействието на P и Zn.

The results obtained in this study showed that Zn concentration was higher than Cu concentration in both red clover cultivars, and their relationship ranged from 6.7 at mid bud stage of plant development to 3.6 at mid bloom stage of development in diploid red clover cultivar, and from 2.5 at mid bud stage of development to 2.1 at mid bloom stage of development in tetraploid red clover cultivar, respectively.

On the other hand, Zn and Cu concentrations were lower than Mn concentration in both red clover cultivars. Mutual relationship between Zn and Mn as well as Cu and Mn were constant in tetraploid red clover cultivar with advancing plant growth and development.

The antagonisms between the cations Fe, Zn, Cu and Mn suggest that with cation-cation interactions, similar uptake mechanisms and competition between the cations might explain these effects (Rietra et al., 2017).

Further investigations are required regarding to some cation-anion interactions that might be specific, notably P and Zn interaction.

Антагонизмът между Mn и Fe е проследен в някои изследвания (Bansal et al., 1999; Ghosemi-Fasaei and Ronaghi, 2008; Kobrace and Shamsi, 2011). Двата хранителни елемента имат един преносител в плазмената мембрана. Авторите посочват, че Fe има отрицателен ефект върху усвояването на Mn. Адитивни и синергични реакции (Agarwala et al., 1995; Khurana and Chatterjee, 2000) са докладвани за Cu и Zn в комбинация, с положителен ефект на Zn върху усвояването на Cu и обратно, в случай на дефицитни и адекватни нива на Cu, и Zn в хранителната среда.

В растенията съотношението между Fe и Mn (съотношение Fe/Mn) трябва да бъде в границите от 1,5 до 2,5. При екстремно високи и ниски съотношения растенията могат да пострадат от токсичността съответно на Fe и Mn (Adriano, 2001). Освен антагонизма на Fe и Mn при растенията, тези метали проявяват антагонистични и синергични ефекти при животните (Aschner and Aschner, 1991; Erikson and Aschner, 2006).

Количеството Fe, Zn, Cu и Mn, свързано с компонентите на клетъчните стени - NDF и ADF, е представено в Таблица 3 и Таблица 4.

The antagonisms between Mn and Fe was noticed in some studies (Bansal et al., 1999; Ghosemi-Fasaei and Ronaghi, 2008; Kobrace and Shamsi, 2011), and these two nutrients have one plasma membrane transporter.

These authors indicated that there was a negative effect of Fe on Mn uptake. Additive and synergistic responses (Agarwala et al., 1995; Khurana and Chatterjee, 2000) were reported for Cu and Zn in combination with a positive effect of Zn on Cu uptake and *vice versa* in case of deficient and adequate Cu and Zn levels in the growing medium.

In plants the ratio between Fe and Mn (Fe/Mn ratio) should be in the range 1.5 to 2.5.

At extreme high and low ratios the plants might suffer from Fe and Mn toxicity, respectively (Adriano, 2001). Apart from the antagonism of Fe and Mn in plants, these metals most likely display antagonistic as well as synergistic effects in animals (Aschner and Aschner, 1991; Erikson and Aschner, 2006).

The amount of Fe, Zn, Cu and Mn associated with cell wall components – NDF and ADF are presented in the Table 3 and Table 4.

Таблица 3. Съдържание на Fe, Zn, Cu и Mn, свързани с неутрално детергентни влакнини (НДВ) от червена детелина, в първи откос, mg kg⁻¹ СВ
Table 3. Content of Fe, Zn, Cu and Mn associated with neutral detergent fiber (NDF) of red clover harvested in the first cut, mg kg⁻¹ DM

Обработки / Treatments	Fe		Zn		Cu		Mn	
	K-39	K - 32	K-39	K - 32	K-39	K - 32	K-39	K - 32
MB	25.6 ^a	16.1 ^b	1.5 ^{ns}	1.4 ^{ns}	0.36 ^b	0.30 ^b	3.6 ^d	4.9 ^b
EBL	12.1 ^c	7.0 ^d	1.4 ^{ns}	1.3 ^{ns}	0.45 ^{ab}	0.39 ^{ab}	3.0 ^e	4.3 ^c
MBL	10.9 ^c	12.6 ^c	1.9 ^{ns}	1.7 ^{ns}	0.54 ^a	0.45 ^{ab}	3.6 ^d	5.5 ^a

Б - реколтиране във фенофаза бутонизация; НЦ - начало на цъфтеж; МЦ - масов цъфтеж; К - 39 - диплоиден сорт червена детелина; К - 32 - тетраплоиден сорт червена детелина; Различните букви в колоната означават значително различни средни стойности (P <0.05).

MB – mid bud stage of plant development; EBL – early bloom of plant development; MBL – mid bloom of plant development; K – 39 – diploid red clover cultivar; K – 32 – tetraploid red clover cultivar; Different letters in the column denote significantly different means (P <0.05).

Таблица 4. Съдържание на Fe, Zn, Cu и Mn, свързани с киселинно-детергентните влакнини (КДВ) на червена детелина, в първи откос, mg kg⁻¹ СВ

Table 4. Content of Fe, Zn, Cu and Mn associated with acid detergent fiber (ADF) of red clover harvested in the first cut, mg kg⁻¹ DM

Обработки /Treatments	Fe		Zn		Cu		Mn	
	K-39	K - 32	K-39	K - 32	K-39	K - 32	K-39	K - 32
MB	32.4 ^a	17.5 ^b	8.0 ^{ab}	5.0 ^c	0.60 ^c	0.80 ^{bc}	3.9 ^d	5.2 ^b
EBL	13.4 ^c	8.1 ^e	8.0 ^{ab}	6.0 ^{bc}	0.85 ^{bc}	0.95 ^{ab}	3.9 ^d	4.4 ^c
MBL	11.5 ^d	13.5 ^c	8.5 ^a	4.5 ^c	0.80 ^{bc}	1.10 ^a	4.1 ^{cd}	6.0 ^a

Б - реколтиране във фенофаза бутонизация; НЦ - начало на цъфтеж; МЦ - масов цъфтеж; К - 39 - диплоиден сорт червена детелина; К - 32 - тетраплоиден сорт червена детелина; Различните букви в колоната означават значително различни средни стойности (P <0.05).

MB – mid bud stage of plant development; EBL – early bloom of plant development; MBL – mid bloom of plant development; К – 39 – diploid red clover cultivar; К – 32 – tetraploid red clover cultivar; Different letters in the column denote significantly different means (P <0.05).

Резултатите за количеството Fe, свързано с НДВ, показват, че при диплоидната червена детелина определено по-голямо е количеството на Fe свързано с НДВ спрямо тетраплоидния сорт (Таблица 3). Въпреки, че количеството Fe свързано с НДВ е по-ниско при тетраплоидния сорт червена детелина, най-високото съдържание на общо Fe (9.9%), свързано с НДВ, е във фаза бутонизация. Количествата Zn, свързани с НДВ не се променят значимо с растежа и развитието на растенията (p > 0.05). Най-високото от общото съдържание на Zn (5.9% и 4.2%) в диплоидния и тетраплоидния сорт червена детелина, съответно) е определено във фаза масов цъфтеж. Количествата Cu, свързани с НДВ, варират от 0.36 до 0.54 mg kg⁻¹ СВ - при диплоидния сорт червена детелина и от 0.30 до 0.45 mg kg⁻¹ СВ - при тетраплоидния сорт червена детелина. Най-високото от общото съдържание на Mn (12.2% и 10.8%) е определено във фаза масов цъфтеж за двата сорта червена детелина.

Количеството на Fe, свързано с

Results of the amount of Fe associated with NDF obtained in this study showed that higher amounts of Fe associated with NDF was determined in diploid red clover than in tetraploid red clover cultivar (Table 3).

Although, the amounts of Fe associated with NDF was lower in tetraploid red clover cultivar, the highest (9.9%) of total Fe content associated with NDF was determined at mid bud stage of development in this red clover cultivar.

The amounts of Zn associated with NDF did not change with plant growth and development (p > 0.05), but the highest (5.9% and 4.2% of total Zn content in diploid and tetraploid red clover cultivar, respectively) was determined at mid bloom stage of plant development in both investigated red clover cultivars.

The amounts of Cu associated with NDF ranged from 0.36 to 0.54 mg kg⁻¹ DM in diploid red clover cultivar and from 0.30 to 0.45 mg kg⁻¹ DM in tetraploid red clover cultivar. The highest, 12.2% and 10.8% of total Mn content was determined at the mid bloom stage of development in tetraploid and diploid red clover cultivar, respectively.

The amount of Fe associated with

КДВ, варира от 32.4 до 11.5 mg kg⁻¹ СВ при диплоидния сорт червена детелина, като най-високата стойност е във фаза бутонизация и представлява 9.2% от общото съдържание на Fe. При тетраплоидния сорт, варирането на стойностите на показателя е от 17.5 до 8.1 mg kg⁻¹ СВ, като най-високата стойност в бутонизация представлява 10.8% от общото съдържание на Fe (Таблица 4). Количеството Zn, свързано с КДВ при диплоидната червена детелина, е сходно, но най-високата стойност е определена във фаза цъфтеж и представлява 26.4% от общото съдържание на Zn. За разлика от диплоидния сорт, тетраплоидния сорт червена детелина при масов цъфтеж на е определено с най-ниско съдържание на Zn, свързан с КДВ (4.5 mg kg⁻¹ СВ - 11.3% от общото съдържание на Zn). Най-ниското съдържание на Cu, свързано с КДВ, е във фаза бутонизация на диплоидния сорт червена детелина (0.60 mg kg⁻¹ СВ - 11.1% от общото съдържание на Cu), а най-високата стойност - при масов цъфтеж на растенията от тетраплоидния сорт (1.10 mg kg⁻¹ СВ - 5.9% от общото съдържание на Cu). Количеството на Mn, свързано с КДВ, варира от 3.9 до 4.1 mg kg⁻¹ СВ при диплоидния сорт червена детелина и от 5.2 до 6.0 mg kg⁻¹ СВ при тетраплоидния. Най-голямото количество Mn, свързано с КДВ, представлява 12.3 и 13.3% от общото съдържание на Mn съответно в диплоидния и тетраплоидния сорт червена детелина.

Възможните връзки между съставите на несмилаемите влакнини и наличието на минерали при преживните животни са били обект на малко внимание. Kabaija and Smith (1988) изследват експериментални дажби, съдържащи 15.5, 33.5 или 60% НДВ, и стигат до заключението, че с

ADF ranged from 32.4 to 11.5 mg kg⁻¹ DM in diploid red clover cultivar with the highest value at mid bud stage represented 9.2% of total Fe content and from 17.5 to 8.1 mg kg⁻¹ DM in tetraploid red clover cultivar with the highest value at mid bud stage of development represented 10.8% of total Fe content (Table 4).

The amount of Zn associated with ADF in diploid red clover was similar, but the highest value determined at mid bloom stage of growth (26.4%) of total Zn content.

Despite the diploid red clover cultivar, at mid bloom stage of growth in tetraploid red clover cultivar the lowest Zn content associated with ADF was determined (4.5 mg kg⁻¹ DM – 11.3% of total Zn content).

The lowest Cu content associated with ADF was determined at mid bud stage of growth in diploid red clover cultivar (0.60 mg kg⁻¹ DM – 11.1% of total Cu content), and the highest value at mid bloom stage of growth in tetraploid red clover cultivar (1.10 mg kg⁻¹ DM – 5.9% of total Cu content).

The amount of Mn associated with ADF ranged from 3.9 to 4.1 mg kg⁻¹ DM in diploid red clover cultivar and from 5.2 to 6.0 mg kg⁻¹ DM in tetraploid red clover cultivar. The highest amount of Mn associated with ADF represent 12.3 and 13.3% of total Mn content in diploid and tetraploid red clover cultivar, respectively.

Possible relationships between undigested fiber constituents and mineral availability in ruminants have received little attention.

Kabaija and Smith (1988) studied the experimental diets contained 15.5, 33.5 or 60% NDF and concluded that increasing dietary fiber greatly

увеличаването на хранителните влакнини, значително намалява видимата абсорбция на манган, цинк, желязо и мед. Същите автори посочват, че нивото на влакнините влияе и върху количеството на микроелементите, разтворими в различните сегменти на стомашно-чревния тракт.

ИЗВОДИ

Резултатите, получени в това проучване показват, че сорта и фазата на развитие имат значително влияние върху концентрацията на Fe, Zn, Cu и Mn при червената детелина. Диплоидният сорт е с по-висока концентрация на Fe и с по-ниска на Zn, Cu и Mn при всички етапи от развитието на растенията. Най-висок коефициент на взаимна зависимост е наблюдаван между Fe и Cu при диплоидния сорт червена детелина и варира от 62,5 до 17,1. По-високата концентрация на Fe, Zn, Cu и Mn е свързана предимно с КДВ спрямо НДВ при всички изследвани етапи от развитието на растенията за двата сорта червена детелина. Това може да се обясни с факта, че неутрално детергентният разтвор съдържа етилен-диаминотетраоцетна киселина (EDTA), която може да разтвори някои от тези елементи и да образува разтворими хелати. Необходими са допълнителни изследвания в тази област, за да се определи връзката на тези елементи с НДВ и КДВ в зависимост от сезона на вегетация, растителните видове, сортове и др.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването в тази статия е част от проект № 451-03-66/2024-03/200217, който се финансира от Министерството на образованието,

decreased apparent absorption of manganese, zinc, iron and copper.

The same authors also indicated that fiber level also affected the proportion of trace minerals soluble in different segments of the gastrointestinal tract.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study indicate that red clover cultivar and stage of development had a significant influence on Fe, Zn, Cu and Mn concentration in investigated red clover cultivars.

Diploid red clover cultivar was higher in Fe concentration, whereas it was lower in Zn, Cu and Mn concentration at all stages of plant development.

The highest mutual relationship coefficient was observed between Fe and Cu in diploid red clover cultivar, and ranged from 62.5 to 17.1.

Higher concentration of Fe, Zn, Cu and Mn were associated with ADF than with NDF at all investigated stages of plant development in both red clover cultivars. This could be explain by the fact that neutral detergent solution contains etilen-diamino-tetraacetic acid (EDTA), which can solve some of these elements and make with them soluble chelates. Further investigations in this field are required regarding to determine the association of these elements with NDF and ADF depending on the season of vegetation, plant species, varieties, etc.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research in this paper is part of Project № 451-03-66/2024-03/200217 which is financed by the Ministry of Education, Science and Technological

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Adriano, D. C.**, 2001. Trace elements in Terrestrial environments, biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. New York, Berlin and Heidelberg, Springer, pp. 499-546.
2. **Agarwala, S. C., B. D. Nautiyal, C. Chatterjee and N. Nautriyal**, 1995. Variations in copper and zinc supply influence growth and activities of some enzymes in maize. *Soil Science and Plant Nutrition*, 41 (2), 329-335
3. **Aschner, M. and J. L. Aschner**, 1991. Manganese neurotoxicity: Cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neuroscience and Biobehavior Review*, 15, 333-340.
4. **Bansal, R. L., D. S. Chahal and V. K. Nayyar**, 1999. Effect of iron-manganese interaction on the yield and content of Fe and Mn in maize (*Zea mays* L.). *Acta Agronomica Hungarica*, 47 (1), 19-25.
5. **Drobna, J. and J. Jančovič**, 2006. Estimation of red clover (*Trifolium pratense* L.) forage quality parameters depending on the variety, cut and growing year. *Plant, Soil and Environment*, 52 (10), 468-475.
6. **Dunn, T. G. and G. E. Moss**, 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *Journal of Animal Science*, 70 1580-1593.
7. **Emanuele, S. M. and C. R. Staples**, 1990. Ruminant release of minerals from six forage species. *Journal of Animal Science*, 68, 2052-2060.
8. **Erikson, K. M. and M. Aschner**, 2006. Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. *Neurotoxicology*, 27, 125-130.
9. **FMA.**, 1993. A new variety of red clover "Kruševačka" K – 32. Decision of the Federal Ministry of Agriculture. Federal Institute for plant and animal resources no. 2/0-04-025/033, 03.05.1993.
10. **FMA.**, 2001. A new variety of red clover "Kruševačka" K – 39. Decision of the Federal Ministry of Agriculture. Federal Institute for plant and animal resources no. 4/008-186/057, 14.07.2001.
11. **Ghasemi-Faseal, R. and A. Ranaghi**, 2008. Interaction of iron with copper, zinc and manganese in wheat as affected by iron and manganese in a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*, 31 (5), 839-848.
12. **Govasmark, E., A. Steen, A. K. Bakken, T. Strøm and S. Hansen**, 2005. Factors affecting the concentration of Zn, Fe and Mn in herbage from organic farms and in relation to dietary requirements of ruminants. *Acta Agricultural Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*, 55 (2), 131-142.
13. **Harrison, G. A., K. A. Dawson and R. W. Hemken**, 1992. Effects of high iron and sulphate ion concentrations on dry matter digestion and volatile fatty acid production by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, 70, 1188-1194.
14. **Kabajia, E. and O. B. Smith**, 1988. Trace elements kinetics in the digestive tract of sheep fed diets with graded levels of dietary fiber. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 59, 218-224.
15. **Kincaid, R. L. and J. D. Cronrath**, 1983. Amounts and distribution of minerals in Washington forages. *Journal of Dairy Science*, 66, 821-824.
16. **Khurana, N. and C. Chatterjee**, 2000. Deficiency of manganese is alleviated

more by low zinc than low copper in wheat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31 (15-16), 2617-2625.

17. **Kobraee, S. and K. Shamsi**, 2011. Effects of Zn, Fe and Mn on soybean production. *Ecology, Environment and Conservation*, 17 (2), 191-196.

18. **Krzetowska, M.**, 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodelling and its role in defense strategy. *Acta Physiologica Plantarum*, 33, 35-51.

19. **Kunelius, H. T., K. B. McRae, S. A. E. Fillmore and G. Dürr**, 2000. Single-cut red clover combined with late timothy may be valuable in short-term rotations. *Canadian Journal of Plant Science*, 80, 309-313.

20. **Ledoux, D. R. and F. A. Martz**, 1991. Ruminant solubilisation of selected macrominerals from forages and diets. *Journal of Dairy Science*, 74, 1654-1661.

21. **O'Dell, B. L.**, 1984. Bioavailability of trace elements. *Nutrition Reviews*, 42, 301-308.

22. **Rietra, R. P., M. Heinen, C. O. Dimkpa and P. S. Vindravan**, 2017. Effects of nutrient antagonism and synergism on yield and fertilizer use efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48 (16), 1895-1920.

23. **Schlegel, P., U. Wyss, Y. Arrigo and H. D. Hess**, 2016. Mineral concentrations of fresh herbage from mixed grassland as influenced by botanical composition, harvest time and growth stage. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 226-233.

24. **Suttle, N. F. and D. G. Jones**, 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: Trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. *Journal of Nutrition*, 119, 1055-1061.

25. **White, J. G. and R. J. Zasoski**, 1999. Mapping soil micronutrients. *Field Crop Research*, 60, 11-26.

26. **Whitehead, D. C., K. M. Goulden and R. D. Hartley**, 1985. The distribution of nutrient elements in cell wall and other fractions of the herbage of some grasses and legumes. *Journal of the Science of the Food and Agriculture* 36, 311-318.