Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (42-52)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Ефективна система за земеделие в пасищни тревостои в Карпатите

Теодор Маруска, Василе Адриан Блаж, Василе Мокану*,
Адриан Тудор Ене, Кристина Андреea Андреоиу, Марчела Драгос,
Паул Заведеи Мариан

Изследователски институт по фуражни култури, Брашов, Румъния
**E-mail: vasmocanu@yahoo.com*

An efficient farming system in mountain grasslands from Carpathian

Teodor Marusca, Vasile Adrian Blaj, Vasile Mocanu*,
Adrian Tudor Ene, Cristina Andreea Andreoiu, Marcela Dragos,
Paul Zevedei Marian

Research-Development Institute for Grasslands, Brasov, Romania

РЕЗЮМЕ

В Изследователски център по планински фуражни култури в планина Бучеджи, разположена на 1800 m н.в., със субалпийска растителност (Pinus mugo), върху тревостой завладян от 40-60% картъл (*Nardus stricta*), се извършват експерименти от 1995 за да се подобрят пасищата и отглеждането на млечни крави порода "Швиц".

В статията са представени данни за период от 20 години, от 5 различни варианта за подобряване и използване на млечни крави при субалпийски тревостой, съответно: **T** - (контролен парцел), деградирало пасище с *Nardus stricta*, разположено в периферията на експерименталното поле, **A** – пасище с *Nardus stricta* частично подобрено чрез ограждане; **B** – пасище с *Nardus stricta* подобрено с химически тор последван от ограждане; **C** – естествено пасище подобрено чрез варуване, химическо торене и ограждане, **D** – пасище подся-

SUMMARY

At the Mountain Grasslands Research Centre from the Bucegi Plateau, located at 1800 meters altitude in the juniper subalpine level (*Pinus mugo*) on a grassland invaded in 40-60% by *Nardus stricta,* have been carried out experiments to improve pastures and exploitation with dairy cows Schwyz breed, since 1995..

In the paper are presented data, on average 20 years, for 5 types of improvement and exploitation with dairy cows of subalpine grassland, respectively: **T** – (control plot), degraded pasture of *Nardus stricta,* located peripherally on the experimental field; **A** – pasture of *Nardus stricta* partially improved by paddocking; **B** - pasture of *Nardus stricta* improved by chemical fertilization follow by paddocking; **C** - natural pasture improved by liming, chemical fertilization and paddocking, **D** – reseeded pasture in 1995 year, after which was applied liming,

о през 1995, след което приложено варуване, химическо торене и ограждане.

Резултатите подчертават оптималната стратегия за преминаване към биологично земеделие, при субалпийски тревостои.

Забелязано е, че след 20 години, чрез частично подобряване на тревното покритие чрез ограждане и рационална паша с оптимален брой животни на хектар, млекопроизводство е увеличено само с 45% (A вариант).

В сравнение, подобрените варианти чрез повърхностни операции (B и C) и пълно подсяване (D), средно за период от 20 години, предоставят увеличаване от 3 до 4.8 пъти на сухото вещество, и от 3.8 до 5.1 пъти мляко на хектар, спрямо контролния парцел (T), което е повече от убедително.

Ключови думи: субалпийски пасища, *Nardus stricta,* ограждане, варуване, третиране с хербицид, паша

chemical fertilization and paddocking.

The results highlighted the optimal strategy for conversion to organic farming, on subalpine grasslands.

It has been noticed that, after 20 years, by improving partially of grassy carpet by paddocking and rational grazing with optimal livestock unit per hectare, milk production was increased only with 45% (A variant).

In comparison, the improved variants by surface operations (B and C) and total reseeding (D) ,on an average of 20 years, provide increases of 3 to 4.8 times DM and 3.8 to 5.1 times milk per hectare, versus control plot (T), which is more than conclusive.

Key words: subalpine pastures, *Nardus stricta* species, paddocking, liming, herbicide treatment, grazing

УВОД

Планинските тревостои в румънските Карпати досега не са включвани в интензивна система за наторяване с биологични или химически торове, в сравнение с други държави от Западна Европа с по-развито животновъдство, които прилагат дози азот от поне 150-200 kg/ha на година, в продължение на няколко десетилетия.

Поради липса на торене и неразумно използване, повечето планински тревостои в Румъния са в напреднал стадий на деградация, като преобладаващият вид при тях е картъл (*Nardus stricta*) и други видове без стопанско значение (Bărbulescu and Motca, 1983; Puşcaru et al., 1956).

INTRODUCTION

Mountain grasslands in the Romanian Carpathians were not included yet in a more intensive system of fertilization with organic or chemical fertilizers compared to other countries from Western Europe with more developed animal husbandry, where have applied doses of at least 150-200 kg N/ha per year, during more decades.

Because of this deficiency of fertilization and unreasonable utilization, the most mountain Romanian grasslands are in an advanced stage of degradation, being dominated by species *Nardus stricta* and other worthless species. (Bărbulescu and Motca, 1983; Puşcaru et al., 1956).

Директната промяна на деградирали тревостои в биологично земеделие е напълно неефективна без цялостно подобряване качеството на тревостоя с конвенционални средства. Първо, всички държави, които преминават към биологично земеделие имат добро тревно покритие, образувано поради прилагани торове и разумна употреба на тревостоите чрез паша и коситба.

В Румъния се прилага идеята за директно преминаване от деградирали пасища към биологично земеделие, което е голяма грешка, която е действително доказана чрез продължителен експеримент в планина Бучеджи. При по-малки райони, върху склон, при необработвана повърхност или почви със скали може да се използва система за ограждане, като основно средство за подобряване на тревостоя и за приложение на органични торове (Maruşca and Frame, 2003).

Във всички случаи, първо е необходимо да се използват неселективни хербициди, варуване и химическо торене с фосфор в оградени зони или да се приложат азотни торове, после след 2 години на преобразуване може да премине към правилно биологично земеделие за да се получат биологични животнски продукти.

Direct change of degraded grasslands in an organic farming is totally ineffective without radically improve the quality of sward with conventional means.

At start all countries that make the transition to organic farming have a valuable grassy carpet because of fertilizers applied and a rational use of grasslands by grazing and cutting.

In Romania is practicing the idea of direct transition from degraded pastures to organic farming, which is a big error that is proved concretely through longstanding experimentation in Bucegi Mountains. On smaller areas, on slopes, on non-mechanized surface or soils with rocks can be used paddocking system as the main means of improving the sward and for organic fertilizing (Maruşca and Frame, 2003).

In all cases, it is firstly necessary to use total herbicides, liming and chemical fertilization with phosphorus in paddocked areas or for completeness the application of nitrogen fertilizers, then after 2 years of conversion it can proceed to a proper organic farming to achieve organic animal products.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите са започнати през 1995 в Изследователската база за планински тревостои в планината Бучежи, разположена на 1.800 m н.в., в субалпийски планински пояс с клек (*Pinus mugo*) в пасища с картъл (*Nardus stricta*), който преобладава с 40-60%.

За да се постигнат целите на изследването е създадено експерименталното поле. Кратко представяне на експерименталнте варианти за подобряване на деградирали субалпийски пасища с картъл (*Nardus stricta*) и пасищно използване на млечни крави порода "Швиц", започвайки в началото на юни до първата дестдневка на септември (приблизително 85 пасищни дни).

- Т - полупостоянно пасище деградирало поради инвазия на картъл (Nardus stricta), несъобразна паша (1996-1999), контролен парцел;

- А - полупостоянно пасище с картъл (Nardus stricta), частично подобрено с метод на ограждане, рационална паша (2000-2015);

- В - полупостоянно пасище с картъл (Nardus stricta), подобрено чрез торене с химикали N 150 kg/ha + 50 kg/ha P2O5: + 5 kg/ha K2O, в три поредни години, последвано от паша на една крава/6 m^2, за 5 нощи, през 2004 и 2010, с едновременно приложение на 100 kg/ha P2O5, (1996-2015);

MATERIAL AND METHODS

The experiments were started in 1995 to Research Base of Mountain Grasslands from Bucegi Plateau, located at 1.800 m altitude, in the sub-alpine mountain pine (*Pinus mugo*) on a dominated pasture of *Nardus stricta* species with a rate of 40-60%.

To achieve the purpose of testing was designed an experimental field. A brief presentation of experimental variations to improve degraded subalpine pastures of *Nardus stricta* and use by grazing with dairy cows, brown Schwyz breed, starting on begin of June up to the first decade of September (approx. 85 grazing days):

- T - semi-permanent pasture degraded by *Nardus stricta* invasion, grazed unreasonable (1996-1999), control plot;

- A - semi-permanent pasture of *Nardus stricta*, partially improved by paddocking method, rational grazed (2000-2015);

- B - semi-permanent pasture of *Nardus stricta*, improved by fertilization with chemicals N 150 kg/ha + 50 kg/ha P_2O_5: + 50 kg/ha K_2O, on three consecutive years, followed by grazing one cow/6 m^2, 5 nights, in 2004 and 2010 , simultaneously with application of 100 kg/ha P_2O_5, (1996-2015);

- С - като вариант В, заедно с варуване с прахообразна вар до постигане на необходимото киселинно ниво с Ah 2/3 (приблизително 7.5 t/ha CaO, 1995-2015);

- D - същото торене като варианти В и С, варуване като разтвора в С, третиран с хербицид, глифозат (Roundup, 5 l/ha), обработка на тревостоя с култиватор на дълбочина от 10-12 cm, и засят през 1995 с тревни смески съдържащи: *Phleum pratense,* сорт "Фаворит" *(40%), Festuca pratensis,* сорт "Трансилвански*" (25%), Lolium perenne,* сорт "Мара" *(5%), Trifolium hybridum,* сорт "Брашов" *(15%)* и *Lotus corniculatus,* сорт "Ливада" (15%) (1995-2015).

Умишлено видовете от местната флора на субалпийските пасища не са сложени в смеската със семена, за да се знае с по-голяма точност създаването и дълготрайността на засетите растения (ежегоден дял на участие) в подсятото пасище.

- C - idem variant B, plus liming with powdered lime to correct acidity level at Ah 2/3 (approx. 7.5 t/ha CaO, 1995-2015);

- D - the same fertilization as variants B and C, liming as solution C, treated with herbicide, glyphosate (Roundup, 5 l/ha, 1995, on summer), sward processing with tiller at a depth of 10-12 cm, and sown, in 1995, with a mixture of herbage seeds consists of: *Phleum pratense,* Favorit variety (40%), *Festuca pratensis,* Transilvan variety (25%), *Lolium perenne*, Mara variety (5%), *Trifolium hybridum,* Brasov variety (15%) and *Lotus corniculatus*, Livada variety (15%) (1995-2015).

Intentionally, the species from spontaneous flora of subalpine pastures have been not introduced in seed mixture, to know more precisely the establishment and longevity of sown plants (annual participation rate) in reseeded pasture.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В производителността на деградиралите субалпийски тревостои (Таблица 1) доминира вид *Nardus stricta*, като количеството на сухо вещество (СВ) и краве мляко, средно за период от четири години е 1.2 t/ha СВ и 846 l/ha (вар. 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Productivity of degraded subalpine grasslands (Table 1) dominated by *Nardus stricta* species, quantified by dry matter (DM) and cow milk, averaged over four years was 1.2 t/ha, DM and 846 l/ha (var. 1).

Таблица 1. Сравнителни данни средно за продуктивността на субалпийски пасища с Nardus stricta подобрени с различни методи, за период от 20 години, Blana – Bucegi 1996-2015

Table 1. Comparative average data regarding the productivity of subalpine *Nardus stricta* pastures improved by different methods, on 20 years, Blana – Bucegi 1996-2015

Вариант/Variant (Група от млечни крави/Lot of dairy cow)	Добив на сухо вещество (СВ) Dry mater production, (DM)		Производство на краве мляко Cow milk production	
	t/ha	%	l/ha	%
T *) – контролен парцел/control plot, *Nardus stricta* 40 – 60 %	1,20	100	846	100
A **) – рационална паша/частично ограждане rational grazing, partially paddocked	1,93	160	1.224	145
B *)–** тор NPK + ограждане + P (приложение на фосфор fertilization NPK + paddocking+ P(phosphorus application)	3,59	300	3.224	381
C*) –** варуване CaO + торене NPK + ограждане + P (приложение на фосфор) / liming CaO + fertilization NPK + paddocking+ P (phosphorus application)	4,42	368	3.862	457
D*) –** посяване + варуване CaO + тор NPK+ограждане+ P (приложение на фосфор)/sowing + liming CaO + fertilization NPK+paddocking+ P (phosphorus application)	5,72	479	4.320	511

*) T = стадо извън експерименталното поле на плато Бучежи, с данни събрани в периода 1996-1999, натовареност на пасището от 0.6 ЖЕ (животински единици) / ha / 85 пасищни дни;
**) A = група от крави, които пасат в експерименталното поле, на 30 хектара, в периода от 2000-2015, с натовареност от 1.2 ЖЕ / ha / 85 пасищни дни;
***) B, C и D в периода 1996 – 2015 със средна натовареност от 4 ЖЕ / ha / 85 дни.

*) T = the herd outside of experimental field from Bucegi Plateau, with data collected in the period 1996-1999, with a stocking rate of 0.6 LU (livestock unit) / ha / 85 grazing days;
**) A = group of cows that graze in the experimental field, on 30 hectares, in the period 2000-2015, with a stocking rate of 1.2 LU / ha / 85 grazing days;
***) B, C and D in the period 1996 - 2015 with an average stocking rate of 4 LU / ha / 85 days.

Директното преминаване на тези пасища с деградирал тревостой към ефективно биологично земеделие е почти невъзможно, имайки предвид твърде ниското ниво на продуктивност и твърде бавното преминаване към подходящо покритие.

След 20 години, тревното покритие е частично подобрено чрез рационална паша с оптимална натовареност, а млекопроизводство се увеличава само с 45%, което е твърде малко.

За сравнение, подобрените варианти чрез повърхностни операции (B и C) и пълно

A direct conversion of these pastures with degraded sward to an effective organic farming it is almost impossible, given the very low level of productivity and very slow evolution to a proper carpet.

After 20 years, grassy carpet, partially ameliorated by rational grazing and used by grazing with an optimal stocking rate, the milk production increased by only 45%, which is very little.

In comparison, the improved variants by surface operations (B and C) and total reseeding (D) ,on

подсяване (D), средно за период от 20 години, се осигурява увеличаване от 3 до 4.8 пъти на сухото вещество, и от 3.8 до 5.1 пъти мляко на хектар, спрямо контролния парцел (T), което е повече от убедително.

Чрез конвенционални операции за подобряване извършени с варианти B, C и D, последвани от две години на преминаване към биологично земеделие, добив на СВ и мляко достига до оптималното ниво (Таблица 2 и 3).

an average of 20 years, provide increases of 3 to 4.8 times DM and 3.8 to 5.1 times milk per hectare, versus control plot (T), which is more than conclusive.

By conventional improvement operations carried out in variants B, C and D, followed by two years of conversion to organic farming, yield of DM and milk are at the optimum level (Table 2 and 3).

Таблица 2. Динамика на средния добив на сухо вещество при субалпийски подобрени пасища, Блана - Бучежи 1996-2015
Table 2. Dynamics of the average dry mater yield on subalpine improved pastures, Blana - Bucegi 1996-2015

Спесификация Specification	**Период Period**	**Добив СВ/DM yield, t/ha**		
		B	**C**	**D**
Мелиоративно подобряване Pedoameliorative improvement	1995	***** ***** *****	***** **Варуван** **Limed** *****	**С хербициди** **варуван** **засяван** **Herbicided** **limed** **Sown**
1. **Конвенционално производство** **Conventional Production** Ежегодно торене, последователно за 3 години, с 150 kg/ha N, 50 kg/ha P_2O_5 и 50 kg/haK_2O,/последвано от 2 години период на преобразуване Annual fertilization, consecutively three years, with 150 kg/ha N, 50 kg/ha P_2O_5 and 50 kg/haK_2O, /followed by two years of conversion	**1996 - 2000**	**3,28**	**3,82**	**4,71**
2. **Биологична продукция** **Organic production**	a)2001-2005	3,90	5,16	7,95
Ограждение с една крава/6 m^2 + 5 нощи + 100 kg / ha P_2O_5, биологична продукция за период от 6 години Paddocking one cow / 6 m^2, 5 nights + 100 kg/ha P_2O_5, organic product in a period of 6 years	b)2006-2010	2,99	3,67	5,64
	c)2011-2015	4,20	5,01	4,70
	Средно Average 2001-2015	**3,70**	**4,61**	**6,10**
Общо средно/General average	**1996 - 2015**	**3,59**	**4,42**	**5,75**
Въздействие на варуването за период от 20 год. **Effect of liming for 20 years period**		**100**	**123**	**160**
Въздействие на сеитба за период от 20 г. **Effect of sowing for 20 years period**		*****	**100**	**130**

Таблица 3. Динамика на средното млекопроизводство върху субалпийски подобрени пасища, Блана - Бучежи 1996-2015, %
Table 3. Dynamics of the average milk production on subalpine improved pastures, Blana - Bucegi 1996-2015, %

Спесификация Specification	Период Period	Млекопроизводство Milk production, (l/ha)		
		B	C	D
Мелиоративно подобряване Pedoameliorative improvement	1995	* * *	* Варуван Limed *	С хербициди Варуван Засяван Herbicided Limed Sown
1. **Конвенционално производство** **Conventional Production** Ежегодно торене, последователно за 3 години, с 150 kg/ha N, 50 kg/ha P_2O_5 и 50 kg/haK_2O,/последвано от 2 години период на преобразуване Annual fertilization, consecutively three years, with 150 kg/ha N, 50 kg/ha P_2O_5 and 50 kg / haK_2O, followed by two years of conversion	**1996-2000**	**3.652**	**4.417**	**4.709**
2. **Органична продукция** **Organic production** Ограждение с една крава/6 m^2 + 5 нощи + 100 kg/ha P_2O_5, биологична продукция за период от 6 години Paddocking one cow / 6 m^2,5 nights + 100 kg/ha P_2O_5, organic product in a period of 6 years	a) 2001-2005	2.291	3.259	4.617
	b) 2006-2010	3.700	4.073	4.485
	c) 2011-2015	3.254	3.700	3.472
	Средно Average 2001-2015	**3.081**	**3.676**	**4.191**
Общо средно/General average	**1996-2015**	**3.367**	**3.862**	**4.320**
Въздействие на варуването за период от 20 години Effect of liming for 20 years period		**100%**	**120%**	**134%**
Въздействие на сеитба за период от 20 години Effect of sowing for 20 years period		*	**100%**	**112%**

Средно за период от 20 години, третирането с вар увеличава продуктивност на СВ с 23% и 60% в подсяти пасища и висококачествен фураж.

В същия период, варуването увеличава млекопроизводство с 20% при полупостоянно пасище и 34% при засято пасище.

Не са необходими трудоемки икономически изчисления за да се покаже икономическата ефективност на варуването, което има въздействие повече от 25-30 години, и на засято пасище, което може да

On 20 years average, the liming treatment increased production of DM with 23% and 60% in reseeded pastures and a high-quality forage.

In the same period the liming proved an increase in milk production of 20% on semi-permanent pasture and 34% on sown pasture.

No laborious economic calculations are necessary to demonstrate the economic efficiency of liming that has an effect more than 25-30 years and pasture sown establishing which can be used nearly 20 years, even

бъде използвано поне 20 години, дори при 1.800 m надморска височина (Таблица 4).

at 1.800 m altitude (Table 4).

Таблица 4. Динамика на относително варуване и ефект на засяване върху добива на СВ и млекопроизводство, Блана - Бучежи 1996-2015
Table 4. Dynamics of the relative liming and sowing effect on DM yield and milk production, Blana – Bucegi 1996-2015

Период Period	Въздействие на варуването (B спрямо C Effect of liming (B versus C)	Въздействие на сеитба (C спрямо D Effect of sowing (C versus D)
Добив СВ/DM yield (%)		
a) 2001-2005	132	154
b) 2006-2010	123	154
c) 2011-2015	119	94
Средно СВ/Average of DM (%)	**125**	**132**
Млекопроизводство/Milk production (%)		
a) 2001-2005	142	142
b) 2006-2010	110	110
c) 2011-2015	114	94
Средно млекопроизводство Average of milk production (%)	**119**	**114**

При анализа на биологичната продукция за период от петнадесет години (2001-2015) се установи, че въздействието на варуването намалява от 32 до 19%, а добивът на СВ на засетия тревостой от 154 до 94%.

Същият спад се забелязва при средното млекопроизводство в подобрените варианти. Ако се сравни всеки от подобрените варианти с другите алтернативи, T = стадо извън експерименталното поле или A = рационална паша, и ограждане като единственият начин за биологично торене на пасища с *Nardus stricta*, се установява необходимост от подобряване на тревостоя и след 2 години на целенасочено трансформиране да се стигне до биологично земеделие.

Analysing the organic production on fifteen year period, 2001-2015, it is found that the effect of liming is in retreat from 32 to 19% and the DM yield of sown grassland from 154 to 94%.

The same decline has and average milk production in the improved variants. If will compare any improved variant with other alternatives, T = herd outside of the experimental field or A = rational grazing and paddocked as the only means of organic fertilization on *Nardus stricta* pastures, it is found the necessity to improve the sward by and after 2 years of legal conversion to get to organic farming.

Условията на немеханизираните повърхности и други постоянни зони могат да бъдат използвани за подобряване на системата на ограждане, но в случая на пасища с *Nardus stricta* тя се разширява много, като до 20 години ще може да се използва само върху 15% от района.

Така често препоръката, че системата може да подобри пасища доминирани от картъл само чрез ограждане в разумен период е само частично вярна, тъй като тя не решава напълно подобряването на деградиралия тревотой, преди приложение на биологично земеделие.

On the no mechanized surfaces or other stationary area conditions can be used for improving the paddocking system, but in this case of *Nardus stricta* pastures it extends very long, being possible in 20 years only on 15% of the area.

So, often the recommendation that it can improve the pastures dominated by *Nardus stricta* only by paddocking in a reasonable period is only partially correct, because it not fully solve the improvement of degraded sward, before implementation of organic farming.

ИЗВОДИ

- Планинските пасища с доминиране на вида *Nardus stricta* не могат директно и напълно да бъдат предназначени за биологично земеделие, поради деградиралия тревостой и продължителния период за подобряване на системата за ограждане, която може да покрие до 15% от повърхността;
- Приложението на конвенционални методи за подобряване на деградирал тревостой чрез употреба на хербицид, варуване, подсяване и торене 3 поредни години, следвани от 2 години на преобразуване е оптималният метод за преминаване към биологично земеделие;
- Резултатите получени в

CONCLUSIONS

- Mountain pastures dominated by species *Nardus stricta* species cannot be intended directly and entirely for organic farming, because of the degraded sward and a very long period to improve by paddocking system; it can cover up to 15% of the surface;
- Applying the conventional methods to improve the degraded sward by herbicide use, liming, reseeding and fertilizing 3 consecutive years, followed by 2 years of conversion is the optimal method of transition to organic farming;
- The results obtained in a

постоянно място в плато Бучежи, разположено на 1.800 m надморска височина, очертават оптималната стратегия за преминаване към биологично земеделие, където се достига средно до 4.8 t/ha СВ и 3.650 l/ha краве мляко, средно за период от 15 години, в сравнение с 1.2 t/ha СВ и 850 l/ha мляко добити на близко неподробено пасище, считано за контролен парцел;

- Ефектът от подобрението на калция средно за период от 20 години е 25-60% в добавка към производството на СВ и 20-34% за млекопроизводство, което се счита, че може да има въздействие до 25-30 години и повече;
- Въздействието на подсяването в сравнение с полупостоянно пасище за същия период от 20 години се проявява с 30% по-висок добив на СВ и 12% за млекопроизводството, като добрата ефективност се ограничава от 15 до 20 години, което е приложимо за по-малки зони, и подходяща селскостопанска механизация.

stationary from Bucegi Plateau, located at 1.800 m altitude, highlighted the optimal strategy of transition to organic farming, where it obtained an average 4.8 t/ha DM and 3.650 l/ha of cow milk, on 15 years average, compared to 1.2 t/ha DM and 850 l/ha milk made on nearby unimproved pasture, regarded as a control plot;

- Effect of calcium amendment on 20-year average was 25-60% in addition to the production of DM and 20-34% for milk production, estimating that it may have effect up to 25-30 years and more;
- Effect of reseeded versus semi-permanent pasture on the same period of 20 years was 30% higher for the DM yield and 12% for milk production, being limited to 15 to 20 years with a good efficiency, applicable the smaller areas, suitable agricultural mechanization.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Barbulescu C., Motca Gh.** Pasunile muntilor inalti. *Ed. Ceres*, 1983, Bucuresti.

2. Marusca T., Frame J. Pasture improvement strategies in the Carpathians pacage with dairy cows EGF – 2003, Bulgaria, Optimal Forage Systems for Animal Production and the Environement, *Grassland Science in Europe*, 2003, vol.8, pp. 219-221.

3. **Puscaru D., Puscaru-Soroceanu, Evdochia Pauca A., Serbanescu I., Beldie Al., Stefureac T., Cernescu N., Saghin F., Cretu V., Lupan L., Tascenco V.** Pasunile alpine din Muntii Bucegi. *Ed. Academiei Romane*, 1956.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (53-70)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Морфологично определяне на вид *Colletotrichum*, причиняваш антракноза по люцерната в Сърбия

Таня Васич*, Снежана Анджелокович, Ясмина Радович,
Зоран Лугич, Йордан Маркович, Миряна Петрович

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

Morphological determination of *Colletotrichum* species, causing the anthracnose of alfalfa in Serbia

Tanja Vasić*, Snežana Andjeloković, Jasmina Radović,
Zoran Lugić, Jordan Marković, Mirjana Petrović

Institute for Forage Crops, 37251 Kruševac, Serbia

РЕЗЮМЕ

Люцерната (*Medicago sativa* L.) е многогодишна бобова трева, характерна с висок добив и добро качество. Антракнозата при люцерната, чиито причинители са *Colletotrichum trifolii* и *C. destructivum,* е широко разпространена болест в Сърбия, която предизвиква сериозни икономически щети. През лятото и есента в полето започват да се появяват болни растения. Гъбичката колонизира заразените стебла и навлиза в короната и главния корен, причинявайки некроза на тъканите, предразположеност към зимни измръзвания, увяхване или смърт на растението. След няколко дни има промяна в консистенцията и цвета, и се появява неравномерен растеж на изпитаните изолати. Проучването включва осем изолата (Coll-4, Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-44, Coll-48, Coll-68 и Coll-75), произлезли от наранявания открити по стеблата на проби от люцерна в Сърбия. Изучените изолати са класи-

SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a perennial legume characterized by high yield and good quality. Anthracanose of alfalfa, causal agents *Colletotrichum trifolii* and *C. destructivum*, prevalent in Serbia regarding damages which induced, represented economic important disease on alfalfa. During the summer and autumn diseased plants start to appear in the field. The fungus colonizes infected stems and enters the crown and taproot, causing necrosis of tissue, predisposition to winter injury, and wilting or plant death.

After a few days there is a culture change in consistency and color, and there has been the uneven growth of the tested isolates.

The study included eight isolates (Coll-4, Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-44, Coll-48, Coll-68 and Coll-75), originated from lesions found on alfalfa stems sampled in Serbia. The studied isolates were

фицирани в три групи въз основа на морфологични сходства с референтните щамове от видове *C. trifolii* и *C. destructivum*. Изолатът Coll-4, който се характеризира като *C. trifolii* има тъмни маслинено-зелени колонии, бавен растеж в PDA среда (картофено-декстрозен агар). Изолати Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68 и Coll-75 са характеризирани като *C. destructivum* в PDA среда, оформят колонии с памукоподобна тъкан, кадифено-сива до бледа маслинено-зелена на цвят и имат много по-бърз растеж в сравнение с първата група изолати. Изолатите от третата група *C. linicola* имат светло-зелен памукоподобен мицел с тъмно-зелен център, които има малко по-слаб растеж в сравнение с втората група изолати. Морфологичната характеристика на изолатите на *Colletotrichum* spp., патогенни за люцерната в Сърбия, е условна идентификация за видовото ниво, която се доказва като надеждна. Тези резултати се потвърждават от молекулярната идентификация и характеристика на изследваните изолати.

Ключови думи: антракноза, люцерна, морфологична характеристика, *Colletotrichum destructivum*, *C. linicola*, *C. trifolii*

classified into three groups based on morphological similarities with the reference strains of type *C. trifolii* and *C. destructivum*. Isolate Coll-4, which is characterized as *C. trifolii* had dark olive-green colonies, slow growing on PDA medium.

Isolates Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll- 48, Coll-68 and Coll-75 were characterized as *C. destructivum* on PDA medium, formed colonies with cotton-like texture, velvety gray to pale olive green color and had a much faster growth in comparison to the first group of isolates. Isolates of the third group *C. linicola* had a bright green cotton-like mycelium with dark green center and has a slightly lower growth compared to the second group of isolates.

Morphological characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. pathogenic to alfalfa in Serbia is conditional identification to the species level and proved to be reliable. These results are confirmed by molecular identification and characterization of studied isolates.

Key words: anthracnose, alfalfa, morphological characterization, *Colletotrichum destructivum*, *C. linicola, C. trifolii*

УВОД

Люцерната (*Medicago sativa* L.) е най-важният и широко разпространен вид фуражна бобова трева. *Colletotrichum trifolii* и *C. destructivum* е гъбичен патоген, който предизвиква антракноза при люцерната. Антракнозата причинява значителни загуби при посевите от люцерна в Сърбия (Vasić, 2013). Почвеното заразяване на люцерната с *C. destructivum* причинява значителни загуби в добива в Северна

INTRODUCTION

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is the most important and widely grown forage legume worldwide. *Colletotrichum trifolii* and *C. destructivum* is a fungal pathogen which causes anthracnose disease in alfalfa. Anthracnose causes significant losses in alfalfa crops in Serbia (Vasić, 2013). Soil infections of alfalfa by *C. destructivum* have caused considerable yield losses in North America (Boland and Brochu,

Америка (Boland and Brochu, 1989), Европа (Vasić, 2013), Северна и Южна Африка (Koch et al., 1989). Обхватът от гостоприемници на *C. destructivum* е широк и включва редица видове люцерна (*Phaseolus lathyroides*, *Glycine max*, *Trifolium* spp. и други), тютюн и кукувича прежда (Latundr-Dada et al., 1996).

Заразените растения проявяват симптоми по стеблата като бледо жълти, кафеникави, ромбовидни наранявания, в които се развиват черни асервули (Stuteville and Erwin, 1990). При подходящи условия, нараняванията стават по-големи, срастват се, обелват и убиват едно или повече стебла. Гъбичките след това се разпространяват вътрешно в тъканите на короната от наранявания в основата на стеблата. Синьо-черното потъмняване на нападнатата тъкан характеризира фаза на болестта, в която загнива короната. Симптомите също така включват почерняване и унищожаване на дръжките и образуване на овчарска гега, когато стеблото увяхва и умира внезапно.

Тъй като люцерната е многогодишна, гъбичките могат да се задържат в стеблата и короните на люцерната, отглеждана в по-топли райони и да заразят повторно околните растения, когато условията са благоприятни. Антракнозата ограничава продуктивността на люцерната като повлиява на растежа на

1989), Europe (Vasić, 2013), North and South Africa (Koch et al., 1989). The host range of *C. destructivum* is wide and includes a number of legumes (*Phaseolus lathyroides*, *Glycine max*, *Trifolium* spp. and others), tobacco and dodder (Latundr-Dada et al., 1996).

Infected plants manifest symptoms on stems as straw-colored, brown-bordered, and diamond-shaped lesions in which black acervuli develop (Stuteville and Erwin, 1990). Under favorable conditions, these lesions become enlarged, coalesce, girdle, and kill one or more stems.

The fungus then spreads internally into crown tissues from lesions on stem bases. A bluish-black discoloration of invaded tissue characterizes the crown rot phase of the disease.

Symptoms also include blackening and killing of petioles and formation of a shepherd’s crook when the stem wilts and dies suddenly.

As alfalfa is a perennial, the fungus can persist in stems and crowns of alfalfa grown in warmer areas and re-infect the surrounding plants when conditions are favorable.

Anthracnose limits alfalfa production by affecting plant growth, plant vigor, forage yield

растението, жизнеността, фуражния добив и качество. Сериозна инфекция при податливи сортове люцерна може да причини загуби от 25-30% във фуражния добив (Barnes et al., 1969).

Цел на настоящето изследване е да се определи морфологичната характеристика на изолати на *Colletotrichum* spp. патогенни за люцерната в Сърбия и възможност за идентификация на видово ниво.

and quality.

Severe infection in susceptible alfalfa varieties can cause 25-30% losses in forage yield (Barnes et al., 1969).

The aim of this study was to determine the morphological characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. pathogenic to alfalfa in Serbia and the possibility of identification to the species level.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изолатите включени в настоящето изследване са селектирани от 2005 до 2010, като произлизат от наранявания открити по стебла на люцерна събрана в Сърбия. Изследването включва осем изолата (Coll-4, Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-44, Coll-48, Coll-68 и Coll-75) (Таблица 1). Сравнителното изследване включва два референтни изолата: *C. destructivum* CC657 (колекция на CBS с култури от плесени, дрожди, бактерии, плазмиди и фаги, Холандия) и *C. trifolii (CBS 158.83)* (колекция на CBS с култури от плесени, дрожди, бактерии, плазмиди и фаги, Холандия). Експериментът е проведен в лабораториите на Институт по фуражни култури, Крушевац.

MATERIAL AND METHODS

Isolates included in this study were selected from 2005 to 2010, were originated from lesions found on alfalfa stems sampled in Serbia. The study included eight isolates (Coll-4, Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-44, Coll-48, Coll-68 and Coll-75) (Table 1). The comparattive study included two referente isolate: *C. destructivum* CC657 (CBS Culture Collection of Fungi, Yeast, Bacteria, Plasmids and Phages, Netherlands) and *C. trifolii* (CBS 158.83) (CBS Culture Collection of Fungi, Yeast, Bacteria, Plasmids and Phages, Netherlands. The experiment was conducted in the laboratories of the Institute for forage crops, Kruševac.

Таблица 1. Изолати от род *Colletotrichum* избрани за изследване
Table 1. Isolates from the genus *Colletotrichum* selected for research

Местоположение Locality	Окръг/District	Година на изолата Years of isolate	Растение-гостоприемник Plant host	Изолати Isolates
С. Варварин/S. Varvarin	Расина/Rasina	2005	люцерна/Alfalfa	Coll-4
Вранеши/Vraneši	Рашки/Raški	2005	люцерна/Alfalfa	Coll-8
Глободер/Globoder	Расина/Rasina	2005	люцерна/Alfalfa	Coll-9
Трнавци/Trnavci	Нишава/Nišava	2007	люцерна/Alfalfa	Coll-18
Српска Црња/Srpska Crnja	Южнобанатски/South Banat	2009	люцерна/Alfalfa	Coll-44
Добричево/Dobričevo	Поморавски/Pomoravlje	2010	люцерна/Alfalfa	Coll-48
Давидовац/Davidovac	Пчински/Pčinj	2010	люцерна/Alfalfa	Coll-68
Чуруг/Čurug	Южнобачки/South Backa	2010	люцерна/Alfalfa	Coll-75

Изолатите са подложени на интензивно наблюдение в хранителна среда по методите на Baxter et al. (1983). (1983). Характеристиките на културата са сравнени чрез картофено-декстрозен агар (PDA), като тази хранителna среда се приготвя от 200 g картофи, 17-20 g декстроза, 17-20 g агар и 1 литър дестилирана вода (Dhingra and Sinclair, 1995) и Агар от листа на карамфил (CLA) е приготвен от 20 грама агар и 1000 ml дестилирана вода, към която е добавена част листа от карамфил към 2 ml от средата (Waller et al., 1998). Пет повторения от всеки изолат от среда са инкубирани при 25 ^{o}C и описани на десетия ден от инкубацията. Линейното увеличаване в диаметъра на колонията е отчетено като средна стойност на измерванията по две диаметрални оси, измервано от ден трети до ден десети.

Структурата на въздушния мицел, цвета на перефериятa на колонията, зониране и обра-

Isolates were submitted to intensive observation on nutritive media by methods Baxter et al. (1983). Culture traits were compared on Potato Dexstrose Agar (PDA), this nutritive media is prepared from 200 g potatoes, 17-20 g dexstrose, 17-20 g agar and 1 liter of distilled water (Dhingra and Sinclair, 1995) and Carnation Leaf-piece Agar (CLA) was prepared from 20 grams of agar and 1000 ml of distilled water, to which was added by a fragment of the carnation leafs to 2 ml of medium (Waller et al., 1998).

Five replicates of each isolate per medium were incubated at 25 ^{o}C and described on the tenth day of incubation. Linear increase in colony diameter was recorded as the mean of measurements along two diametrical axes measured from day three to day ten.

Texture of aerial mycelium, color of colony edges, zonation and formation appressoria were

зуване на апресории са описани от Hawksworth (1974). Наличието или отсъствието на власинки в културата е определено според метода на Smith и Black (1990). Възможностите за телеоморфен етап при изследваните изолати се определят според метода на Baxter et al. (1983). Средните размери на конидии се определят чрез измерване дължината и широчината на 30 случайно избрани конидии при изследвани изолати отглеждани върху PDA, като е използван светлинен микроскоп (Olympus CX41).

described by Hawksworth (1974). Presence or absence of seta in culture was determined using the according methods by Smith and Black (1990). Possibilities of teleomorphic stage forming in examined isolates were determined using the according method by Baxter et al. (1983). Average dimensions of conidia were determined by measuring the length and width of 30 randomly selected conidia studied isolates grown on PDA, using a light microscope (Olympus CX41).

РЕЗУЛТАТИ

Всички изолати на *Colletotrichum* spp. върху PDA среда, 24 часа след посяване, образуват началото на мицела, бял и въздушен вид, диаметър от 3-4 mm. След няколко дни има промяна в консистенцията и цвета, като се появява неравномерно израстване на изпитаните изолати. Въз основа на изразените характеристики, колониите от гъбички *Colletotrichum* spp. могат да бъдат класифицирани в три морфологични групи.

Първата група изолати (Coll-4, CBS 158.83 определени като *C. trifolii*) върху PDA среда, започват да оформят белезникав мицел през първия ден на посяване, с колонии от 3-4 mm в диаметър около мястото на посяване. Когато колонията достигне 40 mm в диаметър, тя започ-

RESULTS

All isolates of *Colletotrichum* spp. on PDA medium, 24 h after seeding, form the beginning of mycelium, white and airy appearance, diameter of 3-4 mm. After a few days there is a culture change in consistency and color, and there has been the uneven growth of the tested isolates. On the basis of the expressed features, colonies of fungi *Colletotrichum* spp. can be classified into three morphological groups.

The first group of isolates (Coll-4, CBS 158.83 identified as *C. trifolii*) on PDA medium, began to form whitish mycelium in the first day of seeding, with the colonies of 3-4 mm in diameter around the place of seeding.

When the colony reached 40 mm

ва да потъмнява в средата и се променя към маслинено зелен цвят, докато периферията на колонията все още остава с белезникав цвят (снимка 1а). Периферията на колониите е цяла и леко вълнообразна. Крайната зона е от бяла до мръсно бяла. От обратната страна на колониите, крайната зона е мръсно бяла на цвят с тъмномаслинена централна част.

Втората група изолати (Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC657 определени като *C. destructivum*) също оформят белезникав мицел от 5 mm диаметър на първия ден от посяването, но имат малко по-бърз темп на растеж. След петия ден, колониите достигат 55 mm в диаметър и започват да потъмняват по средата. Периферията на колониите е леко влакнеста. Крайните зони са с мръсно бял цвят (снимка 2а).

Третата група изолати оформят белезникав мицел около мястото на посявката през първия ден на посяване. Диаметърът е 4-5 mm (Coll-44 се идентифицира като *C. linicola*). След петия ден на посяване, колониите достигат 50 mm в диаметър и започват да потъмняват по средата. Мицелът има памукоподобна текстура с тъмен център със сив до бледо маслинено-зелен цвят (снимка 3а).

Микроскопските изследвания на колонии на изолат *Colletotrichum* spp. (отгледан

in diameter, it started to darken in the middle and began to change to the olive green color, while the edges of the colony still retained a whitish color (picture 1a). Edges of the colonies were whole and mildly wavy. The edge zone was white to off-white. On the reverse side of the colonies, marginal zone is off-white in color with a dark olive-central part.

The second group of isolates (Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC657 identified as *C. destructivum*) also formed whitish mycelium of 5 mm in diameter on the first day of seeding, but had slightly faster pace of growth. After the fifth day, colonies reached 55 mm in diameter and started to darken in the middle. Edges of colonies were slightly fibrous. Marginal zones are off-white color (picture 2a).

The third group of isolates formed whitish mycelium around the seeding spot in the first day of seeding. The diameter was 4-5 mm (Coll-44 identified as *C. linicola*). After the fifth day of seeding, colonies reached 50 mm in diameter and started to darken in the middle. The mycelium had cottony texture with the dark center of gray to pale olive green color (picture 3a).

Microscopic examination colonies of *Colletotrichum* spp. isolate (grown on PDA and CLA

върху повърхности с PDA и CLA при температура от 25 ° за 7 дни), показват че няма значими разлики в морфологичните характеристики на мицела. Младите хифи са разклонени, прозрачни и със зърнистоклетъчно съдържание (Таблица 2).

surfaces at a temperature of 25 ° C for 7 days), showed that there were no significant differences in morphological characteristics of mycelium. Young hyphae were branched, hyaline and with granular cell content (Table 2).

Таблица 2. Размери на хифи на изолати на *Colletotrichum* spp.
Table 2. Dimensions hifa study of isolates of *Colletotrichum* spp.

Група/Видове Group/Species	Изолати Isolates	Дължина на хифи (µm) Hyphae length (µm)	Широчина на хифи (µm) Hyphae width (µm)
I	Coll-4	7.5 [a]	3.75
C. trifolii	CBS 158.83	12.5	3.75
	Coll-8	10	3.75
	Coll-9	20	5
II	Coll-18	12.5	3
C. destructivum	Coll-48	15	3.75
	Coll-68	17.5	5
	Coll-75	12.5	3.75
	CC657	7.5	3.75
III *C. linicola*	Coll-44	10	2.75

a – средна стойност на 30 повторения (измервания)
a – average value of 30 repetitions (measures)

Асервулите образувани в културата са черни с много дебели стени. Всички изследвани изолати на *Colletotrichum* spp. в една култура оформят строматични форми, във всички изолати, от които конидиите се освобождават във формата на плътни капчици, или течна желатинова маса (матрица) с оранжев цвят до бледо розов (Таблица 3).

Acervuli formed in culture are black with heavily thickened walls. All studied isolates of *Colletotrichum* spp. in a culture formed stromatic formations, in all isolates, from which the conidia were released in the form of dense droplets, or liquid gelatinous mass (matrix) of orange color to pale pink (Table 3).

Таблица 3. Диаметър на асервули на изолати *Colletotrichum* spp. върху PDA среда (µm)
Table 3. Diameter of acervuli of *Colletotrichum* spp. isolates on PDA medium (µm)

Група/Видове Group/Species	Изолати Isolates	min.	max.	Средно Average
I	Coll-4	100	250	200[a]
C. trifolii	CBS 158.83	100	300	250
II *C. destructivum*	Coll-8	110	210	160
	Coll-9	80	200	100
	Coll-18	100	300	250
	Coll-48	100	300	200
	Coll-68	110	350	250
	Coll-75	100	450	280
	CC657	100	350	280
III *C. linicola*	Coll-44	100	300	200

a – средна стойност от 10 измервания
a – average value of 10 measures

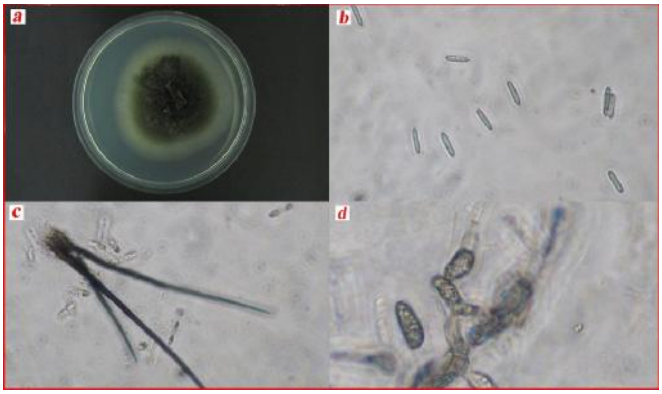
Снимка 1. *Colletotrichum trifolii:* Морфологически характеристики на колонии (a) на възраст 7 дни при PDA среда, конидии (b), власинки (c) и апресории (d) Coll-4 изолати произлизащи от люцерна
Picture 1. *Colletotrichum trifolii*: The morphological characteristics of colonies (a) old 7 days at PDA medium, conidia (b), setae (c) and appressoria (d) Coll-4 isolates originating from alfalfa

Изолатът Coll-4, който принадлежи на вид *C. trifolii*, има конидии, които са цилиндрични и закръглени в двата края, с размери 12.5-17.5 x 5-7.5 µm и средно 15 x 5.67 µm (снимка 1 b). Власинките са от светло до тъмно кафяви, леко наклонени, с гладки и леко набръчкани

Isolate Coll-4, which belongs to the species *C. trifolii*, had conidia which were cylindrical and rounded at both ends, measuring 12.5-17.5 x 5-7.5 µm and in average 15 x 5.67 µm (picture 1b). Setae were light to dark brown, mildly sloped, with smooth or slightly wrinkled surfaces often

повърхности често разширени в основата, заострени и леко тъмни на върха. Власинките имат 1-3 септи (средно по 2), с размери от 75-100 x 2.5 µm, средно 91.1 x 2.5 µm. Власинките често са скрити близо до конидии от светло оранжева до бледо розова маса (снимка 1 c). Изолатите на *C. trifolii* оформят апресории в културата, които са сферични. Размерите на апресориите са 12.9-17.4 x 5-7.5 µm, средно 15.21 x 6.25 µm (снимка 1d).

extended at the base, pointed and slightly darker at the top. Setae had 1-3 septa (2 on average), with dimensions of 75-100 x 2.5 µm on average 91.1 x 2.5 µm. Setae are often hidden near a light orange to a pale pink mass of conidia (picture 1c). Isolates of *C. trifolii* formed appresoria in culture, which were spherical. Dimensions of appresoria were 12.9-17.4 x 5-7.5 µm, on average15.21 x 6.25 µm (picture 1d).



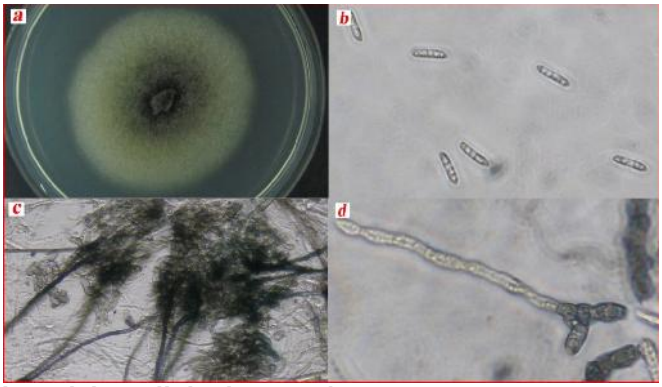
Снимка 2. *Colletotrichum destructivum:* Морфологични характеристики на колонии (a) на възраст 7 дни в PDA среда, конидии (b), власинки (c) и апресории (d) изолати Coll-18 произлезли от люцерна
Picture 2. *Colletotrichum destructivum*: The morphological characteristics of colonies (a) old 7 days at PDA medium, conidia (b), setae (c) and appressoria (d) Coll-18 isolates originating from alfalfa

Средният размер на конидиите на изолатите на *C. destructivum* е 10-25 x 2.5-7.5 µm, средно 18.78 x 3.37 µm (снимка 2). Изследваните изолати оформят много власинки в конидиомата, с размери 50-150 x 2.5-7.5 µm, средно 118.9 x 5.2 µm. Те са септирани с 1-7 септи,

The average size of conidia of isolates of *C. destructivum* was 10-25 x 2.5-7.5 µm on average 18.78 x 3.37 µm (picture 2b). The studied isolates formed setae abundantly in conidiomata, measuring 50-150 x 2.5-7.5 µm on average 118.9 x 5.2 µm. They were septated and had 1-7 septae,

средно по 3 (снимка 2 c). Всички изследвани изолати на *C. destructivum* образуват апресории (снимка 2 d). Размерите на апресориите са 13.25-18.75 x 5.7 – 9.6 µm, средно, 12.94 x 6.35 µm. Апресориите на всички изследвани изолати на *C. destructivum* са с неправилни форми, първоначално безцветни, но с възрастта стават тъмнокафяви и дебелостенни.

and on average 3 (picture 2c). All tested isolates of *C. destructivum* formed appresoria(picture 2d). Appresoria dimensions were 13.25-18.75 x 5.7- 9.6 µm, on average, 12.94 x 6.35 µm. Appresoria of all tested isolates of *C. destructivum* were irregularly shaped, initially colorless, but with age became dark brown with thickened walls.



Снимка 3. *Colletotrichum linicola:* Морфологични характеристики на колонии (a) на възраст 7 дни в PDA среда, конидии (b), власинки (c) и апресории (d) изолати Coll-44 произлезли от люцерна
Picture 3. *Colletotrichum linicola*: The morphological characteristics of colonies (a) old 7 days at PDA medium, conidia (b), setae (c) and appressoria (d) Coll-44 isolates originating from alfalfa

Изолат Coll-44, определен като *C. linicola*, има конидии с размер 12.5-25 x 2.5-7.5 µm, средно 19.83 x 4.42 µm (снимка 3b). Изолатът на *C. linicola* формира многобройни власинки в културата след пет дни на посяване (снимка 3c). Власинките са леко тъмни в основата си и септирани на върха с 1-3 септи, 2 средно. Размерите на власинките са 100-185.5 x 2.5-5

Isolate Coll-44, identified as *C. linicola,* had conidia with the size of 12.5-25 x 2.5-7.5 µm, an average of 19.83 x 4.42 µm (picture 3b). The isolate of *C. linicola* form numerous setae in culture after five days of seeding (picture 3c). The setae were slightly darker are at the basis of and septated at the top with 1-3 septae, 2 on average. The dimensions of setae were 100-

μm, средно 160.9 x 3.12 μm. Размерите на апресориите са от 5-17.5 x 2.5-7.5 μm, средно 11.8 x 5.9 μm (снимка 3d). Получените апресории са удължени, яйцевидни по форма, първоначално безцветни, по-късно стават кафяви с удебелени външни стени.

Въз основа на проведеното изследване, апресориите се различават силно измежду изследваните видове. Формата и размерите на апресориите са много полезни таксономични критерии за разграничаване между видовете в рамките на род *Colletotrichum*.

Всички изследвани изолати на *Colletotrichum* spp., произлизащи в Сърбия (Coll-4 Coll-8, 9-Coll, Coll-18 Coll-44 Coll-48 Coll-68 Coll-75) както и референтните изолати CC657 (*C. destructivum*) и CBS 158.83 (*C. trifolii*), произлизащи от Холандия, не оформят перитеции в културата. Независимо от факта, че формирането на перитеции се наблюдава в няколко случаи, след 30 дни, след 6 и 12 месеца до пълно изразходване на културите.

185.5 x 2.5-5 μm an average of 160.9 x 3.12 μm. Dimensions of appresoria were from 5-17.5 x 2.5-7.5 μm, an average of 11.8 x 5.9 μm (picture 3d). The resulting appresoria are elongated, egg-like in shape, initially colorless, later becoming brown with thickened outer walls.

Based on the conducted research, the appresoria differ greatly among the studied species. The shape and dimensions of appresoria are very useful taxonomic criteria for distinguishing between species within the genus *Colletotrichum*.

All studied isolates of *Colletotrichum* spp., originating in Serbia (Coll-4 Coll-8, 9-Coll, Coll-18 Coll-44 Coll-48 Coll-68 Coll-75) as well as the reference isolates CC657 (*C. destructivum*) and CBS 158.83 (*C. trifolii*), originating in the Netherlands, did not form perithecia in culture. Despite the fact that the formation of perithecia observed on several occasions, after 30 days, after 6 and 12 months to complete exhaustion of the cultures.

ОБСЪЖДАНЕ

Изследваните изолати са класифицирани в три групи въз основа на морфологични сходства с референтните щамове от вида *C. trifolii* и *C. destructivum*. Изолатът Coll-4, който се характеризира като *C. trifolii* има

DISCUSSION

The studied isolates were classified into three groups based on morphological similarities with the reference strains of type *C. trifolii* and *C. destructivum*. Isolate Coll-4, which is characterized as *C. trifolii* had dark olive-green

тъмни маслиненозелени колонии, бавен растеж в PDA среда. Изолати Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68 и Coll-75 са характеризирани като *C. destructivum* в PDA среда, оформят колонии с памукоподобна тъкан, кадифено-сива до бледа маслиненозелена на цвят и имат много по-бърз растеж в сравнение с първата група изолати. Изолатите от третата група *C. linicola* имат светлозелен памукоподобен мицел с тъмнозелен център, които имат малко по-слаб растеж в сравнение с втората група изолати. Резултатите от настоящето изследване са сходни с резултатите от други изследователи (Baxster et al., 1983; Hyde et al. 2009 и Tunali et al., 2008) за видове *C. trifolii*, *C. destructivum* и *C. linicola*.

Всички изследвани изолати на *Colletotrichum* spp. оформят спорангий – асервули. Размерите на асервулите варират от 100 до 280 µm, които в рамките на колонията, са групирани в централната част, разпръснати или концентрично подредени. Сходни резултати са публикувани от Baxster et al. (1983) и Vasić et al. (2011).

Изследваните изолати на *C. destructivum* оформят власики в конидиомата, които имат кафяв цвят, леко тъмни в основата и по-светли към върха, като са септирани от 1-7 септи (3 средно), прави или леко извити, с гладка или набраздена

colonies, slow growing on PDA medium. Isolates Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll- 48, Coll-68 and Coll-75 were characterized as *C. destructivum* on PDA medium, formed colonies with cotton-like texture, velvety gray to pale olive green color and had a much faster growth in comparison to the first group of isolates. Isolates of the third group *C. linicola* had a bright green cotton-like mycelium with dark green center and has a slightly lower growth compared to the second group of isolates.

The results of this research are similar to the results of other researchers (Baxster et al., 1983; Hyde et al. 2009 and Tunali et al., 2008) for the species of *C. trifolii*, *C. destructivum* and *C. linicola*.

All studied isolates of *Colletotrichum* spp. formed fruiting bodies - acervuli. Dimensions of acervuli ranged from 100 to 280 µm, which, within a colony, were grouped in the central part, scattered or concentrically arranged. Similar results were published by Baxster et al. (1983) and Vasić et al. (2011).

The studied isolates of *C. destructivum* formed setae within conidiomata, which had brown color, slightly darker at the base and brighter towards the top, were septated and had 1-7 septae (3 on average), straight or slightly curved, with smooth or wrinkled

повърхност. Власинките на *C. destructivum* са малко по-дълги, отколкото власинките на изолатите на *C. trifolii*. Изследваният изолат *Colletotrihum linicola* оформя власинки в рамките на конидиомата, които имат светъл до тъмен кафяв цвят, в основата си са малко по-тъмни и по-светли на върха и са септирани с 3 септи.

Установените различия между изолатите са важни, за да се определят видовете, така че те са използвани като таксономични критерии. Резултатите са сходни с тези на Baxter et al. (1983); Frayssinet (2008) и Tunali et al. (2008).

Формата и размерите на описаните изолати отговарят на вид *C. trifolii* описан от множество автори, които работят върху люцерната (Baxter et al., 1983; Boland и Brochu, 1989; O'Neill et al., 1997 и Vasić et al., 2011).

Изолатите на *C. destructivum* оформят конидии, които са цилиндрични, заострени от единия край и заоблени от другия край. Резултатите са сходни с тези на Baxter et al. (1983) и Latunde-Dada и Lucas (2007).

C. linicola имат цилиндрични, заострени в единия край и заоблени в другия край конидии. Формата и размерите на конидиите съответстват на твърденията описани за *C. linicola* от различни автори Latunde-Dada and Lucas (2007), които изслед-

surface. Setae of *C. destructivum* were slightly longer than the setae of isolates of *C. trifolii*.

Studied isolate *Colletotrihum linicola* formed setae within conidiomata, and they had light to dark brown color, at the base are slightly darker and lighter at the top and were septated with 3 septae.

The determined differences between isolates are important to identify species, so they are used as taxonomic criteria. The results are similar to the results of Baxter et al. (1983); Frayssinet (2008) and Tunali et al. (2008).

The shape and dimensions in the described isolates correspond to the species *C. trifolii* described by various authors who worked on alfalfa (Baxter et al., 1983; Boland and Brochu, 1989; O'Neill et al., 1997 and Vasić et al., 2011).

Isolates of *C. destructivum* formed conidia that were cylindrical, tapered at one end and rounded at the other end. The results are similar to Baxter et al. (1983) and Latunde-Dada and Lucas (2007).

C. linicola had cylindrical, tapered at one end and rounded at the other end conidia. The shape and dimensions of conidia coincide with the statements described in *C. linicola* by various authors Latunde-Dada and Lucas (2007) who studied isolates from linseed

ват изолати от ленено семе и Tunali et al. (2008), които изследват изолати от поветица.

По време на развитието на конидиите на изолатите на *C. trifolii* има известни промени. В началото има увеличаване и конидиите стават по-прозрачни, докато в екваториалната част на конидиите се оформят септи. Това е значителна морфологична характеристика на този вид. Според O Connell et al. (1992), конидии от вида C*. orbiculare*, *C. malvacearum*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* не образуват септа по време на развитието, което може да бъде един от показателите, когато се определя тяхната таксономична връзка.

В настоящето изследване, се определя че изолатът *C. destructivum* по време на развитието на конидии оформя септи в екваториалната част, което е значима характеристика за този вид. Освен това, и при изолата *C. linicola* по време на развитието на конидии се образуват екваториални септи. Latunde-Dada and Lucas (2007) and Shen et al. (2001) предполагат, че видовете *C. destructivum* и *C. linicola* оформят септи по време на развитието на конидии.

Според вида на конидиите и оформянето на екваториални септи по време на развитието на конидии, *C. trifolii* се различават от други видове от комплекса *Colletotrichum* при люцерната в Сърбия.

and Tunali et al. (2008) who studied isolates from field bindweed.

During the germination of conidia of isolates *C. trifolii* there were certain changes. In the beginning, there was swelling and conidia were becoming more transparent, whereas in the equatorial part of the conidia septae were formed. This is a significant morphological characteristic of this species. According to O Connell et al. (1992), conidia of species *C. orbiculare*, *C. malvacearum*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* do not form septa during germination, which can be one of the indicators when determining their taxonomic affiliation.

In this study, it was determined that the isolate *C. destructivum* during germination of conidia formed septa in the equatorial part, which is a significant characteristic of this species. Also, in the isolate *C. linicola* during germination of conidia equatorial septa was formed. Latunde-Dada and Lucas (2007) and Shen et al. (2001) suggest that the species *C. destructivum* and *C. linicola* formed septa during germination of conidia.

According to the type of conidia and the formation of the equatorial septa during germination of conidia, *C. trifolii* differs from the other two species of *Colletotrichum* complex on

Въз основа на проведеното изследване, може да се твърди, че апресориите се различават силно измежду изследваните видове. Резултатите получени от тези изследвания съвпадат с резултатите от Baxter et al. (1983); Latunde-Dada и Lucas (2007) и Tunali et al. (2008).

Всички изследвани изолати на *Colletotrichum* spp., произлизащи от Сърбия, както и контролните изолати CC657 и CBS 158.83, произлизащи от Холандия, не оформят перитеции, нито в културата (в условията на експериментално залагане) или в изкуствено заразени растения люцерна. Тези резултати са в съгласие с резултатите на Baxter et al. (1983), които също не успяват да породят оформяне на телеоморфни етапи.

Морфологичната характеристика на изолатите на *Colletotrichum* spp., патогенни за люцерната в Сърбия, е условна идентификация за видовото ниво, която се доказва като надеждна. Тези резултати се потвърждават от молекулярната идентификация и характеристика на изследваните изолати.

alfalfa in Serbia.

Based on the conducted research it can be asserted that appresoria differ greatly among the studied species. The results obtained in these studies coincide with the results of Baxter et al. (1983); Latunde-Dada and Lucas (2007) and Tunali et al. (2008).

All studied isolates of *Colletotrichum* spp., originating in Serbia, as well as control isolates CC657 and CBS 158.83, originating in the Netherlands, did not form perithecia, neither in culture (in the conditions of the experiment setup) or in artificially inoculated alfalfa plants. These results are consistent with results of Baxter et al. (1983), which also failed to induce the formation of teleomorph stages.

Morphological characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. pathogenic to alfalfa in Serbia is conditional identification to the species level and proved to be reliable. These results are confirmed by molecular identification and characterization of studied isolates.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящият труд е финансиран от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, проект TR 31057.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bailey J.A., Jeger M.J.** *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. *CAB International,* 1992, Wallingford, UK.
2. **Barnes D.K., Ostazeski S.A., Schillinger J.A., Hanson C.H.** Effect of Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) Infection on Yield, Stand, and Vigor of Alfalfa. *Crop Science,* 1969, 9, 344-346.
3. **Baxter A.P., Westhuizen G.C.A. van der, Eicker A.** Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany*, 1983, 2: 259-289.
4. **Boland G.J., Brochu L.D.** *Colletotrichum destructivum* on alfalfa in Ontario and cultivar response to anthracnose. *Canadian Journal of Plant Pathology,* 1989, 11: 303-307.
5. **Dhingra O.D., Sinclar J.B.** Basic Plant Pathology Methods, second edition. *CRC Press, INc.,* 1995, Boca Raton, Florida, USA.
6. **Frayssinet S.** *Colletotrichum destructivum* a new lucerne pathogen in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes,* 2008, 3: 68.
7. **Hyde K.D., Cai, L., McKenzie E.H.C., Yang Y.L., Zhang J.Z. and Prihastuti H.** *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity,* 2009, 39: 1-17.
8. **Hawksworth D.L., Graham S.O.** Mycologists Handbook. *Commonwealth mycological Institute,* 1974, Kew, Englad.
9. **Koch S. H., Baxter A. P., Knox-Davies P. S.** Identity and pathogeneicity of *Colletotrichum* species from *Medicago sativa* in South Africa. *Phytophylactica,* 1989, 21: 69-78.
10. **Latunde-Dada A.O., Bailey J.A., Lucas J.A.** Infection process of *Colletotrichum destructivum* O'Gara from lucerne (*Medicago sativa* L.). *European Journal of Plant Pathology,* 1997, 103: 35-41.
11. **Latunde-Dada A.O., Lucas J.A.** Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum, C. linicola* and *C. truncatum. Plant Pathology,* 2007, 56: 437–447.
12. **O'Connell R.J., Nash C., Bailey J.A.** Lecityn Cytochemistry: A New Approach to Understanding Cell Differentiation, Pathogenesis and Taxonomy in *Colletotrichum*. In ''*Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control'' by Bailey J. A. and Jegger M. J. eds *CAB International,* 1992, Wallingford, Oxon, UK, 67-87.
13. **O'Neill N.R., van Berkum P., Lin J.J., Kuo J., Ude G.N., Kenworthy W., Saunders J.A.** Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology,* 1997, 87: 745-750.
14. **Shen S., Goodwin P., Hsiang T.** Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. *Mycological Research,* 2001, 105 (11): 1340-1347.
15. **Smith B.J., Black L.L.** Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotricum* species isolated from strawberry. *Plant Disease,* 1990, 74: 69-76.
16. **Stuteville D.L., Erwin D.C.** Compendium of alfalfa diseases, second edition. *St. Paul, Minnesota USA: The American Phytopathological Society,* 1990, Aps Press, 84.
17. **Tunali B., Berner D.K., Dubin H.** First report of leaf spot caused by *Colletotrichum* cf. *linicola* on field bindweed in Turkey. *Plant Disease*, 2008, 92: 316.
18. **Vasić, T., Trkuljlja V., Rajčević B., Živković S., Anđelković S., Marković J.** Molecular and morphological determination isolates of *Colletotrichum triifolii* origination from alfalfa. *Matica Srpska proceedings for natural sciences,* 2011, Srbija,

Novi Sad, 2011, No 120: 197-203.
19. **Vasić T.** Characterization of *Colletotrichum* species, causing the anthracnose of alfalfa in Serbia and genotype susceptibility. *Doctoral thesis,* 2013, Univeristy of Belgrade, Faculty of Agriculture, Serbia, 1-178.
20. **Waller J.M., Rithcie B.J.,** Holderness, M. Plant clinic handbook. *CAB International,* 1998, Wallingford, Oxon.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (71-84)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Селективност на хербицида Клеранда при люцерна (*Medicago sativa* L.)

Пламен Маринов-Серафимов*, Ирена Голубинова

Институт по фуражните култури, 5800 Плевен, България
**E-mail: plserafimov@abv.bg*

Selectivity of herbicide Kleranda in alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Plamen Marinov-Serafimov*, Irena Golubinova

Institute of Forage Crops, 5800 Pleven, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

С цел установяване селективността на двукомпонентния хербицид 375 g/l метазахлор + 17.5 g/l имазамокс (Клеранда) в опитното поле на Институт по фуражните култури-Плевен е изведен полски опит с люцерна сорт „Дара". Установено е, че хербицидът Клеранда (375 g/l метазахлор + 17.5 g/l имазамокс) приложен в доза – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da притежава висока селективност (бал - 1÷ 1.5) и не оказва отрицателно влияние върху добива и химичния състав, формираната свежа и суха биомаса kg/da при тествания сорт люцерна „Дара", като разликите са статистически недоказани (при P=0.05), спрямо еталона Листего 40 (40 g/l имазамокс) приложен в доза 50 ml/da (еталон) + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da. Хербицидът Клеранда може да се използва в „стари" люцернови посеви във фаза трети троен лист на културата в доза 150 ml/da + адювант Деш ХЦ в доза 200 ml/da.

Ключови думи: люцерна, селективност, фитотоксичност, хербицид

SUMMARY

In order to establish the selectivity of the two-component herbicide 375 g/l metazachlor + 17.5 g/l imazamox (Kleranda) in the experimental field of the Institute of Forage Crops-Pleven was conducted field experience with alfalfa variety "Dara". It was found that herbicide Kleranda (375 g/l metazachlor + 17.5 g/l imazamox) applied at the dose - 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da has a high selectivity (score 1 ÷ 1.5), no negative effect on yield, chemical composition of the formed fresh and dry biomass kg/da in the tested alfalfa cultivar "Dara", the differences are not statistically proven significant difference (at P = 0.05) compared to the standard Listego 40 (40 g/l imazamox) applied at a dose of 50 ml/da + adjuvant Dash HC at 100 ml/da.

Kleranda herbicide can be used in „old" crop at the third trifoliate leaf of alfalfa at a dose of 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da

Key words: alfalfa, selectivity, phytotoxicity, herbicide

УВОД

Люцерната (*Medicago sativa* L.) е една от най-важните фуражни култура в света от групата на многогодишните бобови култури, поради високата си продуктивност, екологична пластичност към почвените и климатични условия (Li et al., 2014).

Проявяването на пълния биологичен потенциал на люцерната и дълготрайността на използване на посевите, зависи основно от степента на заплевеляване (Meiss et al., 2010).

Отрицателното влияние на плевелите видове и степента на заплевеляване се изразяват в намаляване гъстота и дълготрайността на тревостоите, както и в силно редуциране на добива на суха биомаса и от семена (Dimitrova, 2005; Cummings et al., 2004).

Това налага извеждане на химична борба срещу плевелите видове, за да се осигурят чисти посеви (от плевели) с подобрен ботанически състав и с увеличена добивност (Arregui et al., 2001; Dimitrova, 2001).

Ефикасната борба срещу плевелните видове при люцерната заемат важно място в технологията на отглеждането ú, поради което, хербицидите (доказана ефикасност, лесна приложимост и бързо инициално действие), имат най-голям дял от използваните пестициди (Arregui et al., 2001).

INTRODUCTION

The alfalfa (*Medicago sativa* L.) is one of the most important forage crops in the world from the group of perennial legume crops owing to its high productivity, ecological plasticity of to soil and climatic conditions (Li et al., 2014).

Full expression of alfalfa biological potential and its continuing use depend on degrees of weed infestation of its stands (Meiss et al., 2010).

The negative influence of weeds and the degree of weed infestation finds expression is the decreased density and persistency of swards, as well as in strong reduction of dry biomass and seeds yield (Dimitrova, 2005; Cummings et al., 2004)

It creates a necessity to chemical control the weed in order to secure pure stands (without weeds), improve their botanical composition and increase their productivity (Arregui et al., 2001; Dimitrova, 2001).

Effective weed control against weed species in alfalfa occupy an important place in the technology of cultivation, therefore, herbicides (proven efficiency, easy workability and rapid initiation action) have the largest share of pesticides used (Arregui et al., 2001).

Динамичните промени в предлаганите хербициди на пестицидния пазар, променящите се плевелни асоциации и нарастващите изисквания за опазване на екосистемите налагат необходимостта от нови проучвания относно усъвършенстване на методите и средствата за борба срещу плевелите.

Всичко това налага извършване на системни проучвания за търсене на „нови" хербициди предлагани на пазара с висока селективност към люцерната.

Според Negrisoli (2014) селективността се отнася до способността на хербицидите да унищожават заплевелителите при различни селскостопански култури, но без да оказват фитотоксично въздействие върху растежните и репродуктивни прояви на културните видове и сортове растения.

Devine et al. (1993) установява, че растителните видове и сортове проявяват различна чувствителност към определен хербицид.

Подобни проучвания у нас са крайно ограничени. Маринов-Серафимов, Кертикова (2011) установяват специфична сортова реакции на генотипове люцер-на (*Medicago sativa* L.) към хербицида Пледж 50 ВП

Целта на изследването е да се установи селективността на хербицида Клеранда (375 g/l метазахлор + 17.5 g/l имазамокс) при люцерна (*Medicago sativa* L.).

Dynamic changes in the offered herbicides on the pesticide market, changing weed associations and increasing requirements for conservation of the ecosystems call for the necessity for new researches concerning improvement of the methods and means for weed control.

All this requires conducting systematic research to search for "new" herbicide available on the market with high selectivity to alfalfa.

According to Negrisoli (2014) selectivity is the ability of herbicides to destroy weeds in different cultures, but not to have phytotoxic effects on the growth and yield of crop species and varieties of plants.

Devine et al. (1993) found that plant species and cultivars show different sensitivities to a specified herbicide.

Similar studies in Bulgaria are extremely limited. Marinov-Serafimov and Kertikova (2011) have establish specific varieties reactions of alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes to the herbicide Pledge 50 WP

The objective of this study was to establish the selectivity of the herbicide Kleranda (375 g/l metazachlor + 17.5 g/l imazamox) of alfalfa (*Medicago sativa* L.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проведено през 2014 и 2015 година в опитното поле на Института по фуражните култури-Плевен на слабо излужен, средномощен чернозем при неполивни условия с люцерна (*Medicago sativa* L.), сорт „Дара“. Сортът „Дара“ представлява синтетична популация чрез обединяване на репродуктивните потомства на седем зародишни плазми показали най-добри стойности при три вида потомства. Характеризира се с комплексна устойчивост на болести (фузариум) и неприятели (люцернов семеяд), дълготрайност, бърз темп на подрастване, интензивен есенен растеж и висок добив на семена (Kertikova, 2008). Опитът е заложен върху изграден посев от люцерна, сорт „Дара“ (четвърта и пета година от създаване му) с големина на реколтната парцела 5 m^2 по блоковия метод със следните варианти: V_1 – 375 g/l метазахлор + 17.5 g/l имазамокс (Клеранда) – в доза – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da и V_2 – имазамокс 40 g/l (Листего 40) в доза 50 ml/da (еталон) + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da. Тествания двукомпонентен хербицид (Клеранда) е регистриран в България за борба срещу житни и широколистни плевели при Clearfield хибриди маслодайна рапица.

Внасянето на хербицидите е извършено с гръбна пръскачка

MATERIAL AND METHODS

During the period of 2011-2012, a study was conducted in the experimental field of the Institute of Forage Crops-Pleven on a slightly leached medium – deep chernozem under nonirrigated conditions with an alfalfa *Medicago sativa* L. cultivar "Dara". Cultivar „Dara“ represents a synthetic population through uniting of the reproductive progeny of seven germplasm having shown best values in all three types of progeny. Characterized by complex resistance to diseases (fusarium) and insect pests (lucerne chalcid), persistence, quick rate of regrowth, intensive autumn growth and high seed yield (Kertikova,2008). The trial was laid with an alfalfa cultivar "Dara" constructed grass stands (four and five years of used) with a size of harvest plot of 5 m^2 at the block method including the following treatments: V_1 - 375 g/l metazachlor + 17.5 g/l imazamox (Kleranda) – at dose – 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da and V_2 – Imazamox 40 g/l (Listego 40) at dose of 50 ml/da (standart) + adjuvant Dash HC at 100 ml/da. The two components herbicides tested in this study have been registered in Bulgaria for weed control in Clearfield oilseed rape hybrids with activity spectra including dicotyledonous and annual monocotyledonous weeds.

Treatments were conducted with 40 l/da water solutions using a

"РТР 18" при разход на работен разтвор 40 l/da с конична дюза, налягане P_{max} 3 bar, V_{max} 1.64 l, and Q_{max} 0.65 l/min, през пролетта в начало на вегетацията във фенофаза трети троен лист на люцерната.

Всички показатели са определяни на 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дни след третирането (DAT) с хербицидите. Визуални отчитания в балове, за определяне на фитотоксичността на хербицидите по скалата на (European Research Society Weed) (бал 1 – без повреди, бал 9 – напълно унищожени растения); Жизненост (*CV*) (бал 0 – напълно унищожени растения, бал 100 растенията са без повреди) Stall et al. (1989); Покритие (GC) (0 – 100% за всички варианти на опита) (Stall, 2002); Анализ на продуктивността: формираната свежа биомаса в g на едно стъбло от люцерна, добив свежа и суха биомаса, kg/da и добив на семена, kg/da – който не е обект на дискусия в тази статия. Определян е химичния състав на надземна биомаса от люцерната за всички варианти на опита, както следва: общ азот (N) по метода на метода на Келдал калций (Ca) – комплексометрично и фосфор (P) – колориметрично (Sandev, 1979); сурови влакнини (по Веенде метода) и сурова пепел – чрез изгаряне в муфелна пещ при температура при 550 ^{o}C. Получените експерименталните данни са анализирани с

manual "PTP 18" spreading machine with conic nozzle, pressure P_{max} 3 bar, V_{max} 1.64 l, and Q_{max} 0.65 l/min, in spring at the beginning of vegetation in the phase first trifoliate leaves of alfalfa.

All following characteristics were assessed 7, 14, 21, 28, 35 and 42 day after treatment (DAT) with herbicides. Visual defined in balls, to determine the phytotoxicity of herbicides using the 1-9 logarithmic scale of the EWRS (European Weed Research Society) (score 1 – no damage and score 9 – completely destroyed crop); Crop vigor (*CV*) (score 0 – completely destroyed crop and score 100 – no damage) Stall et al. (1989); Ground cover (GC) (0 – 100% for each treatments) (Stall, 2002); Analysis of productivity: fresh biomass formed of a stem of alfalfa, fresh and dry biomass yield, kg/da and seed yield, kg/da – which is not subject to discussion in this article. The chemical composition was determined in aboveground biomass, root biomass grain of alfalfa for all treatments as follows: Total Nitrogen (N) was determined according to Kheldahl method, calcium (Ca) – complexometrically (Sandev, 1979), phosphorus (P) – colorimetrical method crude fiber (in Veendam method) and Crude ash – by burning in a muffle furnace at a temperature of 550 ^{o}C. The collected experimental data were analyzed using by the

помощта на софтуера STATGRAPHICS Plus за Windows Ver. 2.1 и STATISTICA Ver. 10.

software Statgraphics Plus for Windows Ver. 2.1 and STATISTICA Ver. 10.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В агро-метеорологично отношение, годините през които е проведен експеримента 2014 и 2015 г. се различават значително в сравнение със средните за периода 1964-2013 (Таблица 1).

RESULTS AND DISCUSSION

The years 2014 and 2015 during which the experiment was carried out considerably differed in agro-meteorological respect compared to the average for the period1964-2013 (Table 1).

Таблица 1. Агрометеорологични показатели
Table 1. Agrometeorological conditions

Години Years	Вегетационен период / Vegetation period								
	Температура на въздуха, t^0 C Air temperature, t^0 C								$\bar{X}$ III - X, ^{0}C
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
2014	9.7	13.1	16.7	20.6	23.1	23.7	17.9	12.1	17.1
2015	6.8	12.2	18.8	20.7	25.5	24.4	20.0	10.9	17.4
1964-2013	6.4	12.0	17.7	21.2	23.4	22.9	18.3	12.1	16.8
Години Years	Месечни суми на валежите, *mm* / Monthly rainfall, *mm*								∑ III - X, mm
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
2014	76.9	139.8	83	54.3	71.8	23.9	142.6	79.1	671.4
2015	68.4	43.6	30.6	95.9	21.5	29.9	130.3	92.7	512.9
1964-2013	35.6	48.7	62.9	63.7	61.5	45.5	45.3	34.6	397.8
Години Years	Индекс на сухота / De Martonne aridity index, I_{ar}-*DM*								$\bar{X}$ III - X
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
2014	46.8	72.6	37.3	21.3	26.0	8.5	61.3	43.0	37.1
2015	48.9	23.6	12.8	37.5	7.3	10.4	52.1	53.2	28.1
1964-2013	26.0	26.6	27.2	24.5	22.1	16.6	19.2	18.8	22.3

Средно месечните температури на въздуха са с наднормални стойности от -1.2 до 3.3 ^{o}C.

Месечните суми на валеж са със силна вариабилност и са повишени от 16.7 до 314.8% и понижени от 10.5 до 65.0% в сравнение със средните за

The average monthly air temperatures are distinguished above normal values from -1.2 to 3.3 ^{o}C

The monthly sums of precipitation are strong variability - with higher from 16.7 to 314.8% and reduced by 10.5 to 65.0% compared to the average for the

периода 1964 - 2013.

Според индексът за аридност на де Мартон (I_{ar}-*DM*) за периода III-X на 2014 г. се характеризира, като умерено влажна (I_{ar}-*DM* $_{35<I\leq40}$ = 37.1), а 2015 г., като умерено суха (I_{ar}-*DM* $_{24<I\leq30}$= 28.1).

Резултатите от оценката на селективност (Таблица 2) показват, че хербицидът Клеранда приложен в доза – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da не проявява фитотоксичен ефект върху люцерната в сравнение с еталона Листего 40 приложен в доза 50 ml/da (еталон) + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da.

Фитотоксичното въздействие на Клеранда – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da се изразява в хлороза по листа в относително слаба степен (бал 2), но само през първата година от проучването, четиринадесет дни след извършване на апликацията (14 DAT), което показва ниска фитотоксичност на хербицида.

С удължаване периода на вегетация на люцерната до четиридесет и втория ден, след извършване на апликацията (42 DAT), наблюдавания слаб фитотоксичен ефект върху културата от приложението на хербицида Клеранда се запазва.

period1964 - 2013.

According to de Martonne aridity index (I_{ar}-*DM*) for the period the III-X on the year 2014 was characterized as moderately humid (I_{ar}-*DM* $_{35<I\leq40}$ = 37.1), 2015 as moderately arid (I_{ar}-*DM* $_{24<I\leq30}$= 28.1).

The results of selectivity evaluation (Table 2) showed that the tested herbicide (Kleranda) – at dose – 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da had no phytotoxic effects on alfalfa compared to standard Listego 40 applied at dose of 50 ml/da + adjuvant Dash HC at 100 ml/da.

Phytotoxic effects of Kleranda – at dose - 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da were observed as chlorosis on leaves in relatively low degree (2 scores), but only the first year of study fourteen days after treatment (14 DAT), which indicates low phytotoxicity to the herbicide.

With the increase of the growing season of alfalfa for the forty-second day after application (42 DAT), a slight phytotoxic effect of culture after the application of herbicide Kleranda retained.

Таблица 2. Визуално отчитане на фитотоксичност, жизненост и покритие на люцерната в зависимост от приложените хербициди
Table 2. Visual detection of phytotoxicity, crop vigor and ground cover of alfalfa according to the appended herbicides

№	Вариант Treatments	Доза, ml/da Dose, ml/da	0 DBA	7DAA	14 DAA	21 DAA	28DAA	35 DAA	42DAA
			Фитотоксичност / Phytotoxicity						
			2014						
V_1	Клеранда/Kleranda	150	1	1	2	2	2	2	2
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	1	1	1	1	1	1	1
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2015						
			1	1	1	1	1	1	1
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard))	50	1	1	1	1	1	1	1
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2014 - 2015						
			1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	1	1	1	1	1	1	1
			Жизненост / Crop vigor						
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2014						
			100	100	95	95	90	90	90
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	100	100	100	100	100	100	100
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2015						
			100	100	100	100	100	100	100
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	100	100	100	100	100	100	100
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2014 - 2015						
			100	100	98	89	95	95	95
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	100	100	100	100	100	100	100
			Покритие / Ground cover						
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2014						
			30	30	40	50	60	75	85
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	30	30	40	60	70	80	90
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2015						
			35	50	50	65	65	75	85
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	35	50	50	65	65	75	85
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2014 - 2015						
			33	40	45	58	63	75	85
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	33	40	45	63	68	78	88

От анализа на данните по отношение на визуалните оценки за фитотоксичност в зависимост от приложението на хербицида Клеранда е видно, че

It is evident from analysis of data regarding the visual assessments of phytotoxicity depending on the application of the herbicide Kleranda is apparent

стойностите не се отклоняват значително, спрямо еталона Листего 40.

Действието на хербицида (Клеранда) не оказва влияние върху жизнеността (CV) и покритието (GC) на люцерната в сравнение с еталона Листего 40 (Таблица 2).

По отношение показателя темп на отрастване на стеблата на люцерната не се очертава закономерна тенденция между отделните варианти, а по-скоро са налице известни малки различия през отделните години на проучване (6.3-62.2 cm и 8.8-44.0 cm) и зависи основно от онтогенетичното развитие и от фенофазата на люцерната (Таблица 3).

that the values do not differ significantly, compared to the standard Listego 40.

The herbicide action (Kleranda) did not affect significantly the crop vigor (CV) and ground cover (GC) of alfalfa compared to standard Listego 40 (Table 2).

With regard to the character of the rate of growing up alfalfa, there was no regular tendency between the different treatments, but there were some small differences in the different years of the study (6.3-62.2 cm и 8.8-44.0 cm) as depends on the ontogenetic development and growing stages of alfalfa (Table 3).

Таблица 3. Темп на отрастване на люцерната в зависимост от приложените хербициди, cm
Table 3. Growth rate of alfalfa according to the applied herbicides, cm

№	Варианти Treatments	Доза, ml/da Dose, ml/da	0DBA	7DAA	14 DAA	21 DAA	28DAA	35 DAA	42DAA
			2014						
V_1	Клеранда/Kleranda	150	7.1b	19.0a	24.7a	36.0a	40.9a	48.4a	59.1a
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	6.3a	19.0a	28.5b	39.0b	43.0ab	51.3ab	62.2ab
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2015						
			8.8a	15.8a	20.6a	25.4a	33.1a	44.0a	-
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	8.8a	15.8a	20.2a	25.5a	32.5a	42.6ab	-
V_1	Клеранда/Kleranda	150	2014 -2015						
			8.0a	17.4a	22.7a	30.7a	37.0a	46.2a	59.1a
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	7.6a	17.4a	24.4a	32.3a	37.8a	47.0a	62.2ab

a, b - статистически доказани разлики в сравнение със стандарта при p<0.05
a, b -Statistically proven significant difference with the standard at p<0.05

Изключение от описаната зависимост се установява само през първата година на проучване, където темпа на отрастване на люцерната на 14 и 21

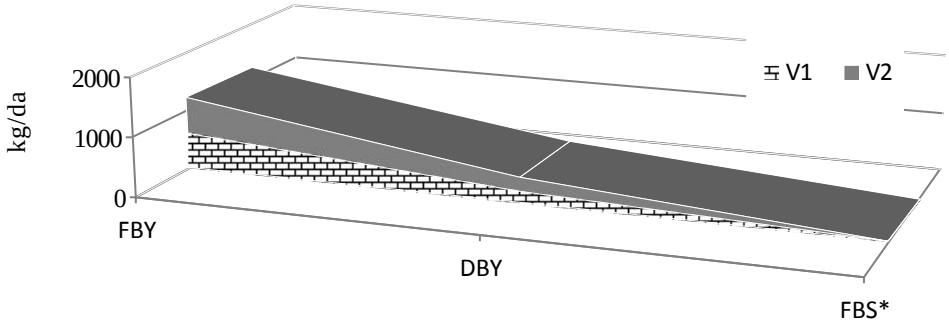
An exception to that described depending was established only in the first year of study, where the rate of growing up alfalfa on 14 and 21 days after

ден (14 и 21 DAT) след третиране с Клеранда в доза – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da е статистически доказано намален (P=0.05), спрямо еталона Листего 40, приложен в доза 50 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da.

Формирания добив свежа биомаса (kg/da) от люцерната (Фигура 1) след приложение на хербицида Клеранда в доза – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da съставлява 98.3% в сравнение с еталона Листего 40 приложен в доза 50 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da, като разликите са статистически недоказани при P=0.05.

treatment (14 and 21 DAT) with Kleranda at dose - 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da statistically proven reduced (P=0.05), compared to the standard Listego 40 applied at dose of 50 ml/da + adjuvant Dash HC at 100 ml/da.

Formed fresh biomass yield (kg/da) from alfalfa (Figure 1) after application on herbicide Kleranda at dose - 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da constitutes 98.3%, compared to the standart Listego 40 applied at dose of 50 ml/da + adjuvant Dash HC at 100 ml/da and the differences had no statistical significance (P=0.05), average for the period of study.



Фиг. 1. Добив свежа и суха биомаса (kg/da) от люцерната, средно за периода на проучване

Fig. 1. Fresh and dry biomass yield (kg/da) of alfalfa average for the period

Легенда: V_1 – 375 g/l метазахлор + 17.5 g/l имазамокс (Клеранда) + аджувант Деш ХЦ; V_2 – имазамокс 40 g/l (Листего 40) + аджувант Деш ХЦ; FBY – добив свежа биомаса, kg/da; DBY – добив суха биомаса, kg/da; FBS - формираната свежа биомаса на едно стъбло (g) от люцерната.

Legend: V_1 - 375 g/l metazachlor + 17.5 g/l imazamox (Kleranda) + adjuvant Dash HC; V_2 - imazamox 40 g/l (Listego 40) + adjuvant Dash HC; FBY – fresh biomass yield, kg/da; DBY – dry biomass yield, kg/da; FBS - of fresh biomass formed of a stem (g) of alfalfa.

Незначителни са разликите в добива на суха биомаса (kg/da) от люцерната, средно за периода на проучване, което се дължи на селективността на тествания хербицид - Клеранда приложен в доза 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da. Аналогични са и получените резултати по отношение формираната свежа биомаса на едно стъбло от люцерна (Фигура 1).

Анализът на данните от Таблица 4 показват, че съдържанието на суровата пепел (CA), сурови влакнини (CF) и фосфор (P) в надземната биомаса на люцерната, средно за периода на проучване, след прилагане на хербицида Клеранда са увеличени от 0.12 до 0.83% в сравнение със стандарта – Листего 40.

The differences in the yield of dry biomass (kg/da) from alfalfa for an average period of the study were not significant due to the selectivity of the tested herbicide Kleranda applied in a dose 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da. Analogous results are obtained in respect of fresh biomass formed of a stem of alfalfa (Figure 1).

Analysis of the data from Table 4 showed that the crude ash (CA), crude fiber (CF) and phosphorus (P) content in above-ground biomass of alfalfa, average for the period of study, after application of the herbicide Kleranda increased from 0.12 to 0.83% compared to standard – Listego 40.

Таблица 4. Химичен състав на надземната биомаса от люцерна след третиране на посева с хербициди, %
Table 4. Chemical composition of the above-ground biomass of alfalfa crop after treatment with herbicides, %

№	Варианти Treatments	Доза, ml/da Dose, ml/da	CA	CF	N	P	Ca
			2014				
V_1	Клеранда/Kleranda	150	9.77a	23.52a	3.279a	0.381a	1.778a
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	10.17a	20.94a	3.718a	0.413a	1.888a
			2015				
V_1	Клеранда/Kleranda	150	10.66a	23.97a	3.501a	0.492a	1.925a
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	10.02a	24.90a	3.1785a	0.411a	2.008a
			Средно/Average				
V_1	Клеранда/Kleranda	150	10.22a	23.75a	3.390a	0.437a	1.852a
V_2	Листего 40 (Еталон) Listego 40 (Standard)	50	10.10a	22.92a	3.448a	0.412a	1.948a

Легенда: CA - сурова пепел; CF - сурови влакнини; a – статистически недоказани разлики в сравнение със стандарта при p<0.05
Legend: CA - crude ash CF - crude fiber; a - not statistically proven significant difference with the standard at p<0.05

Съдържанието на общ азот (N) и калций (Ca) в надземната биомаса на люцерната е по-ниско (от 0.058 до 0.096%) в сравнение с еталона (Листего 40 приложен в доза 50 ml/da (еталон) + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da), когато се използва хербицида Клеранда в доза 150 ml/da + адювант Деш ХЦ в доза 200 ml/da.

Независимо от наблюдаваните разлики в химичения състав на формираната надземна биомаса от люцерна, след третиране с хербициди Клеранда + адювант Деш ХЦ, разликите са статистически не доказани при P=0.05, в сравнение със стандарта (Листего 40 + аджувант Деш ХЦ). Следователно, приложението на хербицида Клеранда в доза 150 ml/da + адювант Деш ХЦ в доза 200 ml/da не оказва влияние върху химичения състав на формираната биомаса от люцерната.

Total nitrogen (N) and calcium (Ca) content in the above-ground biomass of alfalfa was low (from 0.058 to 0.096%) than the standart (Listego 40 applied at dose of 50 ml/da + adjuvant Dash HC at 100 ml/da) when herbicide Kleranda was used – for the dose of 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da.

Irrespective of observed differences in the chemical composition of above-ground biomass of alfalfa after treatment with the herbicides Kleranda + adjuvant Dash HC, the differences were not statistically proven *significant difference* at P = 0.05 compared with the standard (Listego 40 + adjuvant Dash HC).Therefore, application of the herbicide Kleranda in a dose 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da does not affect the chemical composition of the formed biomass of alfalfa.

ИЗВОДИ

Двукомпонентният хербицид Клеранда (375 g/l метазахлор + 17.5 g/l имазамокс) приложен в доза – 150 ml/da + аджувант Деш ХЦ в доза 200 ml/da притежава висока селективност (бал - 1÷ 1.5) и не оказва отрицателно влияние върху добива и химичения състав на формираната свежа и суха биомаса kg/da при тествания сорт люцерна „Дара“, като разликите са статистически недоказани

CONCLUSIONS

The two-component herbicide Kleranda (375 g/l metazachlor + 17.5 g/l imazamox) applied at the dose – 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da has a high selectivity (score 1 ÷ 1.5), no negative effect on yield and on chemical composition of the formed fresh and dry biomass kg/da in the tested alfalfa cultivar "Dara", the differences are not statistically proven significant difference (at P = 0.05) compared

(при P=0.05), спрямо еталона Листего 40 (40 g/l имазамокс) приложен в доза 50 ml/da (еталон) + аджувант Деш ХЦ в доза 100 ml/da.

Хербицидът Клеранда може да се използва в „стари“ люцернови посеви във фаза трети троен лист на културата в доза 150 ml/da + адювант Деш ХЦ в доза 200 ml/da.

to the standard Listego 40 (40 g/l imazamox) applied at a dose of 50 ml/da (standart) + adjuvant Dash HC at 100 ml/da.

Kleranda herbicide can be used in old crop (2, 3, 4 and 5 years) at the third trifoliate leaf of alfalfa at a dose of 150 ml/da + adjuvant Dash HC at 200 ml/da.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Маринов-Серафимов Пл., Кертикова Д.** Проучване селективността на флумиоксазин 500 g/kg (ПЛЕДЖ 50 ВП) при образци люцерна с оглед на селекцията. *Почвознание, Агрохимия и Екология,* 2011, 45, № 4, pp. 65-73.
2. **Arregui M. C., Sánchez D., Scotta R.** Weed Control in Established Alfalfa (*Medicago sativa*) with Postemergence Herbicides. *Weed technology*, 2001, 15, № 3, pp. 424-428.
3. **Cummings D., Berberet R., Stritzke J., Caddel J.** Sod-seeding and grazing effects on alfalfa weevils, weeds, and forage yields in established alfalfa. *Agronomy Journal*, 2004, 96, pp. 1216-1221.
4. **Devine M., Duke S., Fedtke C.** Physiology of herbicide action. Englewood Cliffs: Prentice Hall, pp. 441, 1993.
5. **Dimitrova Ts.** Effect of the time of treatment of an old lucerne stand on the efficiency of herbicide Pivot 100SL (100g/l imazethapyr). *Plant Science*, 2001, 28, pp. 279-282.
6. **Dimitrova Ts.** Influence of shepherds purse (*Capsella bursa pastoris* (L.) Medic.) and its control on seed productivity of lucerne (*Medicago sativa* L.). In: 1*3-th EWRS Symposium, Bari, Italy, CD-ROM,* 2005.
7. **Kertikova D.** The newest achievements in lucerne breeding in

REFERENCES

1. **Arregui M. C., Sánchez D., Scotta R.** Weed Control in Established Alfalfa (*Medicago sativa*) with Postemergence Herbicides. *Weed technology*, 2001, 15, № 3, pp. 424-428.
2. **Cummings D., Berberet R., Stritzke J., Caddel J.** Sod-seeding and grazing effects on alfalfa weevils, weeds, and forage yields in established alfalfa. *Agronomy Journal*, 2004, 96, pp. 1216-1221.
3. **Devine M., Duke S., Fedtke C.** Physiology of herbicide action. Englewood Cliffs: Prentice Hall, pp. 441, 1993.
4. **Dimitrova Ts.** Effect of the time of treatment of an old lucerne stand on the efficiency of herbicide Pivot 100SL (100g/l imazethapyr). *Plant Science*, 2001, 28, pp. 279-282.
5. **Dimitrova Ts.** Influence of shepherds purse (*Capsella bursa pastoris* (L.) Medic.) and its control on seed productivity of lucerne (*Medicago sativa* L.). In: 1*3-th EWRS Symposium, Bari, Italy, CD-ROM,* 2005.
6. **Kertikova D.** The newest achievements in lucerne breeding in Bulgaria. In Proc. Breeding 08, 24-27 November 2008, Novi Sad, Serbia, pp. 509-512.
7. **Li X., Han Y., Wei Y., Acharya A., Farmer A., Ho J.** Development of an Alfalfa SNP Array and Its Use to Evaluate Patterns of Population Structure and

Bulgaria. In Proc. Breeding 08, 24-27 November 2008, Novi Sad, Serbia, pp. 509-512.
8. **Li X., Han Y., Wei Y., Acharya A., Farmer A., Ho J.** Development of an Alfalfa SNP Array and Its Use to Evaluate Patterns of Population Structure and Linkage Disequilibrium. *PLoS ONE*, 2014, 9, № 1, pp. 1-9.
9. **Meiss H., Mediene S., Waldhardt R., Caneill J., Bretagnolle V., Reboud X., Munier Jolain N.** Perennial lucerne affects weed community trajectories in grain crop rotations. *Weed Research*, 2010, 50, № 4, pp. 331-340.
10. Negrisoli E., Velini E., Tofoli G., Cavenaghi A., Martins D., Morelli J., Costa A. Selectivity of pre-emergence herbicides to sugarcane treated with nematicides. *Planta Daninha,* 2014, 22, pp. 567-575.
11. **Sandev S.** Chemical methods of analysis of forages. Zemizdat Sofia, 1979.
12. **Stall W. M., Locascio S. J., Hochmuth R.I.** Premergence snd postmergence weed control in snap beans. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 1989, 102, pp. 329-332.
13. **Stall W. M.** 2002. Weed control trials in vegetable crops. *Horticultural Sciences Department. University of Florida Ifas extension,* 2002, ir4.rutgers.edu/FoodUse/PerfData/693.
Linkage Disequilibrium. *PLoS ONE*, 2014, 9, № 1, pp. 1-9.
8. **Marinov-Serafimov Pl., Kertikova D.** Study of Flumioxazine 500 g/kg (Pledge 50 VP) selectivity in alfalfa accessions with view of breeding. *Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 2011, 45, № 4, pp. 65-73. (in Bulgarian)
9. **Meiss H., Mediene S., Waldhardt R., Caneill J., Bretagnolle V., Reboud X., Munier-Jolain N.** Perennial lucerne affects weed community trajectories in grain crop rotations. *Weed Research*, 2010, 50, № 4, pp. 331-340.
10. **Negrisoli E., Velini E., Tofoli G., Cavenaghi A., Martins D., Morelli J., Costa A.** Selectivity of pre-emergence herbicides to sugarcane treated with nematicides. *Planta Daninha,* 2014, 22, pp. 567-575.
11. **Sandev S.** Chemical methods of analysis of forages. Zemizdat Sofia, 1979.
12. **Stall W. M., Locascio S. J., Hochmuth R.I.** Premergence snd postmergence weed control in snap beans. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 1989, 102, pp. 329-332.
13. **Stall W. M.** 2002. Weed control trials in vegetable crops. *Horticultural Sciences Department. University of Florida Ifas extension,* 2002, ir4.rutgers.edu/FoodUse/PerfData/693.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (85-98)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Чувствителност на не генно модифицирани генотипове соя (*Glycine max* (L.) Merrill) към глифозат I. Фитотоксичност и възстановителна способност

Пламен Маринов-Серафимов[1]*, Аксения Алексиева[2], Ирена Голубинова[1]

[1]*Институт по фуражните култури, 5800 Плевен, България*
[2]*Опитна станция по соята, 2500 Павликени, България*
**E-mail: plserafimov@abv.bg*

Sensitivity of non-genetically modified soybean genotypes (*Glycine max* (L.) Merrill) to glyphosate I. Phytotoxity and regrowing ability

Plamen Marinov-Serafimov[1]*, Aksenia Aleksieva[2], Irena Golubinova[1]

[1]*Institute of Forage Crops, 5800 Pleven, Bulgaria*
[2]*Soybean experimental station, 5200 Pavlikeni, Bulgaria*

РЕЗЮМЕ

През периода 2009-2010 година в Опитна станция по соята, Павликени, България при полски условия беше проучена чувствителността, преживяемостта и възстановителната способност на осем генотипа соя (*Glycine max* (L.) merrill) към три дози 0.720, 1.440 и 2.160 g a. в., ha глифозат.

Установено е, че приложените дози глифозат оказват потискащо въздействие върху височината и преживяемостта на растенията до 45 ден след извършване на пръскането (45 DAT).

Изпитаните генотипове соя проявяват различна чувствителност и възстановителна способност към глифозат. Във фенофаза цъфтеж (BBCH – 63-65) възстановителната способност на сорта Сребрина и линия Rr е добра и варира в границите от 1.0 до 2.5 бала, докато при сортовете Авигея,

SUMMARY

The effect of three application doses of glyphosate 0.720, 1.440 and 2.160 g a. i., ha on the sensitive, survival and regrowing on eight soybean genotypes (*Glycine max* (L.) Merrill) were determinated in field conditions at Soybean experimental station, Pavlikeni, Bulgaria within 2009-2010.

It was found that the applied doses of the glyphosate had a inhibitory effect on the plant height and regrowing ability by 45 days after treatment (45 DAT).

The studied soybean genotypes showed different levels of glyphosate sensitivity, survival and regrowing.

In growing stage (BBCH – 61-65) Srebrina cultivar and Rr line showed good survival and regrowing score from 1.0 to 2.5 and varieties Avigea, Divna and

Дивна и Карина е лоша и е в интервала от 2.5 до 3.0 бала.

Ключови думи: соя генотипи, глифозат, фитотоксичност, възстановяване

Karina had bad scores (2.5-3.0).

Key words: soybean genotype, glyphosate, phytotoxicity, regrowing ability

УВОД

Заплевеляването при соята (*Glycine max* (L.) Merrill) е един от най-важните фактори, които оказват влияние при формирането на добива от соево зърно (Oerke, 2006; Fickett et al., 2013).

През последното десетилетие научно-изследователската работа се фокусира върху проучването на чувствителността на не генно модифицирани (*не ГМ*) сортове соя към глифозат, като средство за борба с плевелите (McCann et al., 2005; Bonny, 2009; Bajpai and Srivastava, 2013).

Глифозатът (N-[Phosphonomethyl] glycine) е активната субстанция на системни, тотални, широкоспектърни хербициди, който се използват за борба срещу редица едногодишни и многогодишни плевелни видове, поглъща се през листата и се придвижва чрез проводящата система на растенията (Duke, 1996; Pesticide Information Profiles, 1996).

Проучванията на Duke (1998) и King et al. (2001) показват, че глифозатът инхибира синтеза на ензима 5-Enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate (EPSP), отговарящ за синтеза на аминокиселините в растителните организми (Kishore et al., 1992).

INTRODUCTION

Weed infestation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is most important factor influencing soybean grain yield (Oerke, 2006; Fickett et al., 2013).

In the past decade, research work has focused on the study of sensitivity to glyphosate in non-genetically (*non-GM*) modified soybean genotypes, as a means for weed control (McCann et al., 2005; Bonny, 2009; Bajpai and Srivastava, 2013).

Glyphosate (N-[Phosphonomethyl] glycine) is the active ingredient of the systemic and non-selective (or broad-spectrum) herbicides, that are used to control most annual and perennial weeds **(**Pesticide Information Profiles, 1996). As an herbicide, glyphosate works by being absorbed into the plant mainly through its leaves but also through soft stalk tissue (Duke, 1996).

Studies conducted by Duke (1998) and King et al. (2001) showed that the glyphosate inhibits amino acid metabolism known as the shikimic acid pathway, its main target being enzyme 5- Enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate (EPSP) synthase, responsible for

Nelson and Renner (2001) съобщават, че прилагането на 840 g a. в., ha глифозат във фенофаза трети троен лист (BBCH - 13) от развитието на генетично модифицирани (*ГМ*) и *не-ГМ* соеви растения, не оказва съществено влияние върху листната повърхност на културата.

Според Al-Khatib and Peterson (1999) и Cedergreen (2008) прилагането на глифозат в редуцирани дози в началните етапи от развитието на соевите растения (BBCH 13-14) не оказва съществено влияние върху добива от соево зърно.

Zambrano et al. (2003), Main at al. (2004), Davis (2006), съобщават за естествено възникваща генно – контролирана хербицидна устойчивост към глифозат при соята, която не се дължи на генно инженерство и която може да бъде прехвърлена в други чувствителни генотипове чрез традиционните селекционни методи.

Целта на изследването е да се установи и сравни чувствителността на генотипове соя към различни дози глифозат при полски условия и да се отберат такива с естествена толерантност.

amino acid synthesis in plants (Kishore et al., 1992).

Nelson and Renner (2001), reported that the application of 840 g a.i., ha glyphosate at the three trifoliate leaf stage (BBCH - 13) of *GM* and *non-GM* 212 soybean plants had no significant effect on leaf area of the crop.

According to Al- Khatib and Peterson (1999) и Cedergreen (2008) application at reduced doses of glyphosate at the initial developmental stages of soybean plants (BBCH 13-14) did not affect soybean grain yields significantly.

Zambrano et al. (2003), Main at al. (2004), Davis (2006), reported for naturally-occurring and genetically – controlled glyphosate herbicide resistance in soybean, that is not attributable to genetic engineering and this resistance can be transferred to other sensitive genotypes by conventional breeding methods.

The objective of this study was to determine and compare the sensitivities of soybean genotypes to different doses glyphosate under field conditions to find of donors for the tolerance for the purpose of a selection.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проведено през 2009 и 2010 година в Опитна станция по соята, Павликени, при неполивни условия. Опитът е заложен по перпендикулярния метод в

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted within 2009 - 2010 at the Soybean experimental station Pavlikeni, without irrigation. The trial was carried out by the perpendicular design with four replications and

четири повто-рения с големинна на опитната площ 3 m^2.

Проучено е влиянието на три дози глифозат – 0.720, 1.440, и 2.160 g a. в., ha, като е използван търговският продукт Раундъп (360 g/l глифозат + 180 g/l сърфъктант) при осем генотипа соя – български линии, сортове и кандидат-сортове соя не генно модифицирани (*не ГМ*) към глифозат. Характеристиките на генотиповете соя са представени в Таблица 1.

with the size of the experimental plot 3 m^2.

Studied the impact of three doses of glyphosate - 0.720, 1.440, and 2.160 g a. i., ha, when a used commercial product Roundup (360 g/l glyphosate +180 g/l surfactant) on eight Bulgarian genotypes non-genetically (*non-GM*) modified soybean to glyphosate (lines, varieties and candidate varieties) of soybean. The characteristics of soybean genotypes are shown in Table 1.

Таблица 1. Генотипове соя
Table 1. Soybean genotypes

№	Генотип Genotype	Метод Method	Група на зрелост Maturity group
1.	Мира 96/Mira 96	Експериментален мутагенез Experimental mutagenesis	II
2.	Сребрина/Srebrina	Хибридизация / Hybridization	II
3.	Авигея/Avigeia	Хибридизация / Hybridization	I
4.	Дивна/Divna	Хибридизация / Hybridization	0
5.	Карина/Karina	Хибридизация / Hybridization	I
6.	F5№24	Хибридизация / Hybridization	I
7.	М – 18/4	Експериментален мутагенез Experimental mutagenesis	II
8.	Rr	Междувидова хибридизация Interspecies hybridization	II

Във фенофаза трети троен лист (BBCH - 13), генотиповете соя е извършена апликация съответно с 0.720, 1.440, и 2.160 g a. в., ha глифозат, а в контролните варианти с дестилирана вода.

Третиранията са извършени с гръбна пръскачка "РТР 18" с конична дюза, при налягане P_{max} 3 bar, V_{max} 1.68 l и Q_{max} 0.65 l/min с работен разтвор от 500 l/ha.

At the growth stage of three trifoliate leaves (BBCH - 13) the soybean genotypes were sprayed respectively with 0.720, 1.440, and 2.160 g a. i., ha glyphosate, and in the control treatments with distilled water.

Treatments were conducted with a knapsack sprayer "PTP 18" with conic nozzle, pressure P_{max} 3 bar, V_{max} 1.68 l, and Q_{max} 0.65 l/min, with a working solution quantity of 500 l/ha.

За всички варианти на опита са проследени следните показатели:

- Процент преживели растения, %; Височина а растенията (cm) във фенофаза BBCH – 89; Фитотоксичност на хербицида в зависимост от използваните дози при генотиповете соя по скалата на EWRS (бал 1 – без повреди; бал 9 – напълно унищожени растения), като отчитанията са извършвани на 7, 15, 30 и 45 ден след третирането;
- Жизнеността (CV) е определяна по 11 балната скала (0 – напълно унищожени растения; 10 - растения без повреди) (Shinggu et al., 2009);
- Покритие на посева (GC) е определяно във фенофаза цъфтеж (BBCH- 63-65) в проценти от 0 до 100% (0 – растенията са загинали; 100% растения покриват земната повърхност) (Malthus et al., 2013; Fontenot et al., 2015);
- Възстановяването (RG) на соевите растения е определяно във фенофаза цъфтеж (BBCH- 63-65), съгласно адаптираната шест степена скала на Frenlin and Jones (1984) - (0 – Възстановя-ване, без повреди; Без повреди; 1- Възстановяване с лек остатъ-чен ефект, пълно възстановява-не; 2- Умерено възстановяване с възможен остатъчен ефект; 3- Възстановяване със силен остатъчен ефект; 4- Слабо възстановяванена растенията и загиване

The following indicators were studied for all treatments:

- The percentage of surviving plants, %;
- Plant height (cm) in growth stage BBCH – 89, herbicide phytotoxicity, depending on application doses, in the soybean genotypes according to an EWRS scale (score 1 – no damage; score 9 – completely killed plants), the recording being performed on the 7^{th}, 15^{th}, 30^{th} and 45^{th} day after treatment (DAT);
- Crop vigor (CV) was determined according to a 11 score scale, where 0 - completely dead plants and 10 - very healthy growing plants (Shinggu et al., 2009);
- Ground cover (GC) of the soybean was determined visually and was recorded on a scale of 0-100% (0 - no plants, 100% plants covering the entire surface area) in growth stage flowering BBCH- 63-65 (Malthus et al., 2013; Fontenot et al., 2015).
- The regrowth (RG) soybean plants was determinet in growth stage flowering BBCH- 63-65 according adapted to a six score scale of Frenlin and Jones (1984) - (0 - very healthy growing plants; 1- Regrowth, slight residual effect, complete recovery likely; 2- Regrowth, modedose residual effect recovery possible; 3- Regrowth, severe residual effect recovery unlikely; 4- Low regrowth and plants dead and 5-Dead, does not establish regrowth of the

и 5- Загиване на растенията, не се установява възстановяване).

- Процентът на преживяемост на растенията за всеки вариант е предварително трансформиран по уравнението $Y = arcsin\sqrt{(x_{\%} / 100)}$ (Hinkelman & Kempthorne, 1994).

Получените експериментални данни са обработени с помоща на софтуера Statgraphics Plus for Windows Ver. 2.1 and Statistica Ver. 10.

plants).

- The percentage of of surviving plants in each treatment was previously transformed by the equation $Y = arcsin\sqrt{(x_{\%} / 100)}$ (Hinkelman & Kempthorne, 1994).

The data obtained were analyzed using the software Statgraphics Plus for Windows Ver. 2.1 and Statistica Ver. 10.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Дозите от 0.720, 1.440 и 1.160 g a. в., ha на използвания глифозат приложени във фенофаза трети троен лист (BBCH - 13) на соята оказват статистическо доказано влияние (P=0.05) върху преживяемостта на генотиповете соя и условно могат да се представят в следния ред: Дивна (33.0%) → F5№27 (33.9%) → №18/4 (35.2%) → Карина (35.5%) → Авигея (43.0%) → Мира 96 (43.3%) → линия Rr (52.4%) → Сребрина (54.3%).

С увеличаване дозите на хербицида се наблюдава обща тенденция за снижаване преживяемостта на растенията, спрямо контролните варианти при всички генотипове соя (от 8.1 до 87.5%) (Фигура 1).

Генотиповете Мира 96, Дивна, Карина, F5№27 и №18/4 могат да се определят, като силно чувствителни, тъй като при всички проучвани дози пре-

RESULTS AND DISCUSSION

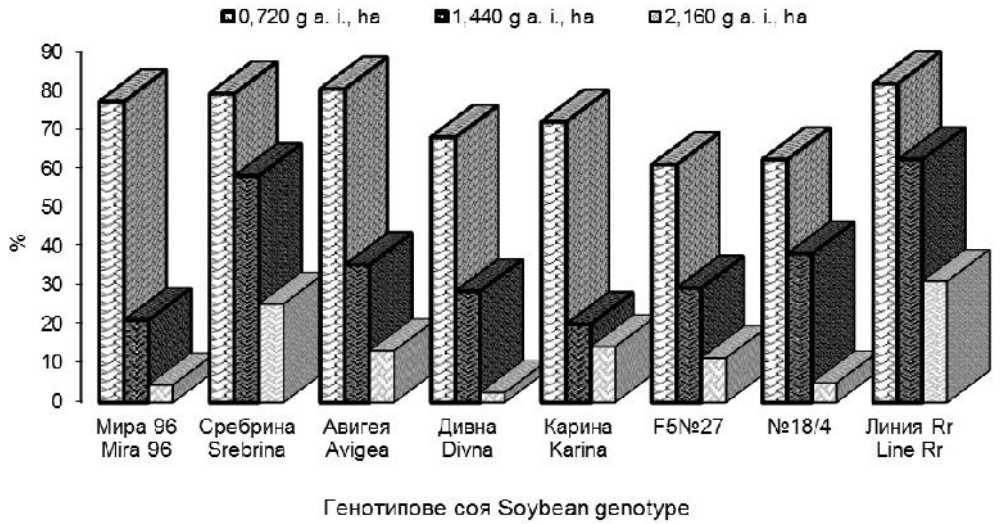
The doses of glyphosate 0.720, 1.440 and 1.160 g a. i., ha, applied at the soybean at growth stage third trifoliate leaf (BBCH - 13) had statistically significant effect (P=0.05) on the survival soybean genotypes and can be presented conditionally in the following order: Divna (33.0%) → F5№27 (33.9%) → №18/4 (35.2%) → Karina (35.5%) → Avigea (43.0%) → Mira 96 (43.3%) → line Rr (52.4%) → Srebrina (54.3%).

With the increase of the herbicide doses there was a general tendency of its decrease in all soybean genotypes from 8.1 to 87.5%, as against the control treatments (Figure 1).

The genotypes Mira 96, Divna, Karina, F5№27 and №18/4 can be considered highly sensitive because their survival under all doses varied from 77.2 to 2.5%,

живяемостта им варира в границите от 77.2 до 2.5%. Генотиповете Авигея, Сребрина и линия Rr са по – слабо чувствителни след приложението на глифозат, а преживяемостта им е от 81.9 до 13.2%.

where as genotypes Avigea, Srebrina and line Rr are less sensitive to applications glyphosate and their survival varied from 81.9 to 13.2%.



Фиг. 1. Преживяемост на проучваните генотипове соя в зависимост от дозата на използвания глифозат в процент спрямо контролния вариант, средно за периода на проучване 2009-2010 година
Fig. 1. Survival of the soybean genotypes, depending on glyphosate application dose as percentage of the control, average for the period 2009-2010

Наблюдава се специфична генотипна реакция по отношение на фитотоксичността на използвания хербицид глифозат при генотиповете соя (Таблица 2).

Хербицидът приложен в доза 0.720 g a. в., ha предизвиква слаба до умерена фитотоксичност (бал 2.0 – 3.5) до 45 ден след третирането (45 DAA), наблюдават се хлоротични петна между жилките на листата при генотиповете соя Мира 96, Дивна, Карина, F5№27 и №18/4.

A specific genotype response was also observed with regard to phytotoxicity of the applied herbicide glyphosate to the soybean genotypes (Table 2).

The herbicide applied at the dose of 0.720 g a. i., ha caused phytotoxicity - low to modedose (score 2-3) to the 45th day after treatment (45 DAT) in genotypes Mira 96, Divna, Karina, F5№27 and №18/4 where chlorotic spots were observed among leaf veins.

Изключение се наблюдава само при генотиповете Сребрина и линия Rr, където се установява слаб фитотоксичен ефект (бал 1.5) до 45 ден след третирането (45 DAA) при приложената по-ниска доза на глифозат от 0.720 g a. в., ha.

An exception was observed only in genotypes Srebrina and line Rr, where induced phytotoxicity were lower (score 1.5) to the 45th day after treatment (45 DAT) at the lower applied dose glyphosate of 0.720 g a. i., ha.

Таблица 2. Фитотоксичност на глифозат при генотипове соя средно за периода на проучване 2009-2010 г.
Table 2. Phytotoxicity of glyphosate in soybean genotypes, average for the period 2009-2010

№	Генотип Genotype	Доза g a. в., ha Dose g a. i, ha	Фитотоксичност / Phytotoxicity							
			7 DAT		15 DAT		30 DAT		45 DAT	
			EWRS	CV	EWRS	CV	EWRS	CV	EWRS	CV
1.	Мира 96 Mira 96	0.720	2.5	9	3.0	8	2.5	9	2.5	9
		1.440	7.0	2	7.0	2	5.0	5	4.5	6
		2.160	8.0	1	8.5	1	7.5	2	5.0	5
2.	Сребрина Srebrina	0.720	2.5	9	3.0	8	1.5	9	1.5	9
		1.440	3.5	7	4.0	6	3.0	8	2.5	9
		2.160	8.0	1	5.5	5	5.5	5	4.5	6
3.	Авигея Avigeia	0.720	2.5	9	3.0	8	2.5	9	2.5	9
		1.440	5.0	5	5.5	5	4.5	6	3.5	7
		2.160	7.0	2	8.5	1	8.5	1	8.5	1
4.	Дивна Divna	0.720	2.5	9	3.0	8	3.0	8	3.0	8
		1.440	4.0	6	5.0	5	5.5	5	4.5	6
		2.160	7.0	2	8.5	1	8.5	1	8.5	1
5.	Карина Karina	0.720	2.5	9	3.0	8	2.0	9	2.0	9
		1.440	7.0	2	7.0	2	6.0	4	4.5	6
		2.160	7.0	2	8.0	1	6.0	4	6.0	4
6.	F5№24	0.720	3.0	1	3.5	7	2.0	9	2.0	9
		1.440	6.0	4	6.5	3	6.5	3	5.5	5
		2.160	7.0	2	7.0	2	6.5	3	6.5	3
7.	M – 18/4	0.720	3.5	7	4.5	6	2.5	9	2.5	9
		1.440	6.0	4	6.0	4	4.5	6	4.0	6
		2.160	7.5	2	8.5	1	8.0	1	8.0	1
8.	Rr	0.720	2.0	9	2.0	9	1.5	9	1.5	9
		1.440	4.0	6	4.5	6	4.0	6	3.0	8
		2.160	6.0	4	5.5	5	5.0	4	4.0	6

Легенда: Фитотоксичност по скалата на EWRS, Жизненост (CV); DAT – дни след третиране; а. в. – активно вещество
Legend: Phytotoxicity according to an EWRS scale; Crop vigor (CV) according to a eleven score scale; DAT – day after treatment; a. i - active ingredient

С увеличаване дозите на глифозата (1.140 и 2.160 g a. в., ha) фитотоксичността при геноти-

Under the higher doses 1.140 и 2.160 g a. i., ha of glyphosate, phytotoxicity to the

пове соя нараства от умерена до силна (бал 3.5 - 8.5), изразяваща се в хлороза, епинастични изкривявания на дръжките на листата и некрози, докато при генотиповете реагирали с по-висока чувствителност - до загиване на растенията (бал 8.5) (Таблица 2).

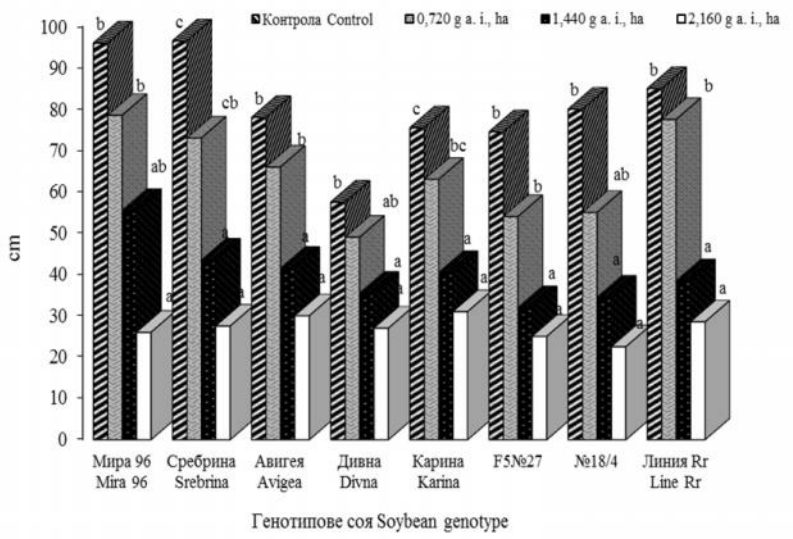
Аналогични са и получените резултати при проследяване жизнеността (CV) на генотиповете соя в зависимост от дозата на приложения хербицид (Таблица 2).

Най-ниската доза на приложения глифозат (0.720 g a. в., ha) не предизвиква инхибиращ ефект върху височината на растенията и покритието (GC) при всички генотипове соя, като разликите са статистически недоказани при P=0.05 (Фигура 2 и Таблица 3).

soybean genotypes was moderate to high (score 3.5 - 8.5) and manifested aschlorosis epinastic bending of leaf and necrosis, but the genotypes responding with higher sensitivity were completely killed plants (score 8.5) (Table 2).

The results obtained were analogous in terms of the crop vigor (CV) of the soybean genotypes depending on the application doses of herbicide (Table 2).

The lowest dose of glyphosate (0.720 g a. i., ha) applied do not induce an inhibitory effect on plant height and the ground cover (GC) of the plants and the differences are not statistically significant at P=0.05 (Figure 2 and Table 3).



Фиг. 2. Височина на растенията в зависимост от приложената доза глифозат, в % от контролата, средно за периода на проучване 2009-2010 г.
Fig. 2. Plant height depending on applied dose of glyphosate as percentage to control, average for the period 2009-2010

С нарастване дозата на хербицида (1.440 - 2.160 g a. в., ha) височината и покритието (GC) на растенията намалява, непропорционално с увеличаване концентрацията му, като разликите са статистически доказани при P=0.05. Изключение от описаната зависимост се установява само при сорта Сребрина (Фигура 2).

Установена е силна отрицателна корелационна зависимост - *r* от -0.960 до -0.994 между дозата на приложения глифозат и височината на растенията при генотипове соя.

Възстановяването на растенията при генотиповете соя във фенофаза цъфтеж (BBCH - 63-65) варира в зависимост от генотипа и от дозата на приложения глифозат (Таблица 3).

При най-ниската доза на приложения хербицид (0.720 g a. в., ha) възстановителната способност е по-силна и варира в границите от 1.0 до 1.5 бала, но само при генотипове Мира 96, Сребрина, Карина, F5№27, №18/4, Линия Rr, докато при Авигея и Дивна е относително по-слаба от 2.0 до 2.5 бала.

С нарастване дозата на приложения глифозат (1.440 и 2.160 g a. в., ha), възстановителната способност на генотиповете соя намалява (от 2.5 до 4.0 бала), непропорционално с увеличаване на концентрацията му.

With increasing of glyphosate doses (1.440 - 2.160 g a. i., ha), the plants height and ground cover (GC) decreased disproportionately to the increase in the doses of herbicide, the differences being statistically significant at P=0.05. An exception to the relationship described was observed only in Srebrina cultivar (Figure 2).

It was found a strong negative correlation - *r* from -0.960 to -0.994 between the applied doses of glyphosate and plant height in the soybean genotypes.

The regrowth ability of plants at soybean genotypes in growth stage flowering (BBCH - 63-65) has varied depending on the genotype and applied dose of glyphosate (Table 3).

At the lowest dose of the herbicide (0.720 g a. i., ha) applied, the regrowth ability of plants is stronger and ranges from 1.0 to 1.5 score, but only to genotypes Mira 96, Srebrina, Divna, Karina, F5№27, №18/4, Line Rr, while Avigea and Divnais are relatively low from 2.0 to 2.5 score.

With increasing of glyphosate doses (1.440 - 2.160 g a. i., ha) applied, the regrowth ability of soybean genotypes decreased (from 2.5 to 4.0 score) disproportionately to the increase in the dose of herbicide.

Таблица 3. Възстановителна способност и покритие след приложение на глифозат при генотипове соя средно за периода на проучване 2009-2010 година

Table 3. Regrowth ability and ground cover after application of glyphosate in soybean genotypes, average for the period 2009-2010

№	Генотип Genotype	Доза g а.в., ha Dose g a. i, ha	GC	RG
1	Мира 96 / Mira 96	0.720	0.720	1.5
		1.440	1.440	2.5
		2.160	2.160	3.5
2.	Сребрина / Srebrina	0.720	0.720	1.0
		1.440	1.440	1.5
		2.160	2.160	2.5
3.	Авигея / Avigeia	0.720	0.720	2.0
		1.440	1.440	3.0
		2.160	2.160	3.5
4.	Дивна / Divna	0.720	0.720	2.5
		1.440	1.440	3.0
		2.160	2.160	3.5
5.	Карина / Karina	0.720	0.720	1.5
		1.440	1.440	3.0
		2.160	2.160	3.5
6.	F5№24	0.720	0.720	1.0
		1.440	1.440	2.5
		2.160	2.160	3.0
7.	М – 18/4	0.720	0.720	1.5
		1.440	1.440	2.5
		2.160	2.160	4.0
8.	Rr	0.720	0.720	1.0
		1.440	1.440	1.5
		2.160	2.160	2.0

Легенда: Покритие на посева (GC); Възстановяване (RG) на генотиповете соя; а. в. – активно вещество

Legend: Ground cover (GC); regrowth rating(RG) of soybean genotypes; a. i - active ingredient

Изключение от описаната зависимост се наблюдава при най-високата приложена доза (2.160 g a. в., ha) глифозат, но само при сортовете Сребрина и Линия Rr, при които възстановителната способност е добра и варира в границите от 1.0 до 2.5 бала, което определя наличието на по-слаба чувствителност към глифозат и могат да бъдат изпол-

An exception from the described relationship is observed at the highest dose (2.160 g a. i., ha) glyphosate just only by Srebrina cultivar and line Rr, because of their good regrowing ability (score from 1.0 to 2.5).These genotypes showed a lower sensitivity to glyphosate and can be used for donors of tolerance in breeding

звани като донори за толерантност за нуждите на селекцията.

Следователно, наблюдаваните разлики при генотиповете соя по отношение на чувствителността им към глифозат и възстановителната им способност могат да бъдат обяснени с генетични различия, тъй като сравненията между тях са направени при еднакви условия и дози на прилагания хербицид.

programmes.

Therefore, the differences observed between soybean genotypes with regard to their sensitivity to glyphosate and regrowth ability can be explained with their genetic differences, because comparisons between them were made under the same conditions and herbicide application doses.

ИЗВОДИ

Приложените дози глифозат във фенофаза трети троен лист на соята (BBCH - 13) имат статистически доказан инхибиращ ефект (P=0.05) върху преживяемостта на генотиповете соя. Според показаните данни те могат да се представят в следния ред: Дивна (33.0%) → F5№27 (33.9%) → №18/4 (35.2%) → Карина (35.5%) → Авигея (43.0%) → Мира 96 (43.3%) → линия Rr (52.4%) → Сребрина (54.3%).

Генотиповете Мира 96, Дивна, Карина, F5№27 и №18/4 са силно чувствителни с преживяемост от 2.5 до 77.2% при всички приложени дози глифозат. Авигея, Сребрина и линия Rr са по- слабо чувствителни, а преживяемостта им варира в границите от 81.9 до 13.2%.

Генотиповете соя показват различна възстановителна способност към глифозат. Във фенофаза цъфтеж (BBCH – 63-65) възстановителната способност на сорта Сребрина и линия Rr е

CONCLUSIONS

The doses of glyphosate applied on the soybean at growth stage third trifoliate leaf (BBCH - 13) had statistically significant effect (P=0.05) on the survival of the soybean genotypes. According to showed data they can be presented as: Divna (33.0%) → F5№27 (33.9%) → №18/4 (35.2%) → Karina (35.5%) → Avigea (43.0%) → Mira 96 (43.3%) → line Rr (52.4%) → Srebrina (54.3%).

Mira 96, Divna, Karina, F5№27 and №18/4 genotypes are highly sensitive to all glyphosate doses applied with survival from 2.5 to 77.2%. Avigea, Srebrina and line Rr are low sensitive to glyphosate with survival varying from 81.9 to 13.2%.

Soybean genotypes showed different regrowing ability to glyphosate. In growing stage (BBCH – 61-65) Srebrina cultivar and Rr line have a good regrowing ability, varying from 1.0 to 2.5.

добра и варира в границите от 1.0 до 2.5 бала. Сортовете Авигея, Дивна и Карина имат по – ниска възстановителна способност с балова оценка от 2.5 до 3.0.

Avigea, Divna and Karina have a lower regrowing ability with score from 2.5 to 3.0.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Al-Khatib K., Peterson D.** Soybean (Glycine max) response to simulated drift from selected sulfonylurea herbicides. Dicamba, Glyphosate and Glufosinate. *Weed Technology,* 1999, 13, № 2, pp. 264-270.
2. **Bajpai J., Srivastava A.** Evaluation of germination and seedling toleranve index of black gram genotypes in response to herbicide glyphosate. *Annals of Plant Sciences*, 2013, 2, № 9, pp. 351-357.
3. **Bonny S.** Genetically Modified Glyphosate-Tolerant Soybean in the USA: Adoption Factors, Impacts and Prospects – A Review. *Agron Sustain Dev Journal*, 2009, 28, pp. 257-272.
4. **Cedergreen N.** Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental pollution*, 2008, 156, № 3, pp. 1099.
5. **Davis W.** Soybean seeds and plants exhibiting natural herbicide resistance. United States Natural Genes, Inc. (Plainview, TX, US) 7135626, http://www.freepatentsonline.com/7135626.html, 2006.
6. **Duke S.** Glyphosate. In: *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action*. 1988, Marcel Dekker, New York, pp. 1-70
7. **Duke S.** Herbicide Resistant Crops. 1996, CRC Press, New York.
8. **Fickett N.D., Boerboom C. M., Stoltenberg D. E.** Soybean Yield Loss Potential Associated with Early-Season Weed Competition across 64 Site-Years. *Weed Science,* 2013, 61, № 3, pp. 500-507.
9. **Fontenot D., Griffin J., Baisakh N.** Growth comparisons and genetic diversity of Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) biotypes in Louisiana. *Journal of American Society of Sugar Cane Technologists,* 2015, 35, pp. 1-20.
10. **Frenlin R. R. A., Jones S.M.** Evalution of glifosate to control regrowth Eucaliptus spp in pine plantations in new Australia. 1984, http://caws.org.au/awc/1984/awc198412391.pdf
11. **Hamilton M.A., R.C. Russo, Thurston R.V.** Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ. Science and Technology*, 1977, 11, № 7, pp. 714-719.
12. **Hinnkelmann K., Kempthorne O.** Design and Analysis of Experiments. 1994, Vol. 1, Wiley and Sons, New York.
13. **King A., Purcell L., Vories E.** Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. *Agronomy Journal*, 2001, 93, № 1, pp. 179-186.
14. **Kishore G.M., Padgette S. R., Fraley T. R.** History of Herbicide-Tolerant Crops, Methods of Development and Current State of the Art: Emphasis on Glyphosate Tolerance. *Weed Technology*, 1992, 6, № 2, pp. 626-634.
15. **Main Ch., Pantalone V., Mueller T.** A novel approach to determine the glyphosate tolerant trait in soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, № 5, pp. 1224-1227.
16. **Malthus T., Barry S., Randall A., McVicar T. Bordas M., Stewart B., Guerschman P., Penrose L.** Ground cover monitoring for Australia: Sampling strategy

and selection of ground cover control sites. 2013, *SUSTAINABLE AGRICULTURE FLAGSHIP CSIRO. EP13058 Australia*
17. **McCann M. C., Liu K., Trujillo W. A., Dobert R. C.** Glyphosate-Tolerant Soybeans Remain Compositionally Equivalent to Conventional Soybeans (*Glycine max* L.) during Three Years of Field Testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, pp. 5331-5335.
18. MONSANTO. http://www.monsanto.com/glyphosate/Pages/default.aspx. 2002.
19. **Nelson K., Renner K.** Soybean growth and development as affected by glyphosate and postemergence herbicide tank mixtures. *Agronomy Journal*, 2001, 93, pp. 428-434, 2001.
20. **Oerke E. C.** Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 2006, 144, № 1, pp. 31-43.
21. **Pesticide Information Profiles.** Glyphosate, 1996, http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/glyphosa.htm.
22. **Shinggu C., Dadari S., Shebayan J., Adekpe D., Ishaya D.** Effects of variety crop arrangement and period of weed interference on the performance of maize grown in mixture in northern guinea savannah of nigeria. ARP, 2009.
23. **Zambrano A., Demey R., Gonzalez V.** In vitro selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. *Plant Molecular Biology Reporter,* 2003, 21, pp. 365-373.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 3, 2016, (99-113)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Биохимична оценка на селекционни линии пролетен фий (*Vicia sativa* L. *ssp. sativa*) и възможности за използването им като зелен фураж

Аксения Алексиева[1*], Татяна Божанска[2], Йорданка Найденова[3]

[1]Опитна станция по соята, ул. Руски № 61, 5200 Павликени, България
[2]Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. „Васил Левски" № 281, 5600 Троян, България
[3]Институт по фуражните култури, ул."Ген. Вл. Вазов" 89, 5800 Плевен, България
**E-mail: aaleksieva@abv.bg*

Biochemical evaluation of breed lines of common vetch (*Vicia sativa* L. *ssp. sativa*) and opportunities to use them as green forage

Aksenia Aleksieva[1*], Tatyana Bozhanska[2], Yordanka Naydenova[3]

[1]Experimental Station on Soybean 61 Ruski Str., 5200 Pavlikeni, Bulgaria
[2]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria
[3]Institute of Forage Crops, 89 Gen. Vladimir Vazov Str., 5800 Pleven, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

През периода 2012-2013 година са проучени шест мутантни линии пролетен фуражен фий по отношение пригодността им за използване като зелен фураж. Изходният сорт „Образец - 666" е използван като стандарт. За определяне на хранителната стойност на зелената им биомаса, във фаза „начало на цъфтеж" от линиите са взети проби свежа биомаса с тегло 500 g, на които извършен биохимичен анализ, включващ показателите суров протеин, сурови влакнини и структурни влакнинни компоненти на клетъчните стени в процент от сухото вещество. Определени са ензимната *in vitro* смилаемост на сухото вещество и потенциалната протеинова хранителна стойност чрез показателите общ смилаем протеин,

SUMMARY

During the period 2012-2013 six mutant lines of common vetch have been studied in relation to their suitability for green forage. The initial variety "Obrazetz-666" was used as a standard. In order to determine the nutritional value of their green biomass, in the phase of "beginning of flowering", samples with a weight of 500 g of fresh biomass were taken from these lines. Biochemical analysis was conducted on them including indicators, such as crude protein, crude fibers and structural fibrous components of the cell walls in percentage of dry matter.

The enzymatic *in vitro* digestion of dry matter and potential protein nutritional value were determined through indicators, such as total digestible protein (TDP),

смилаем протеин в тънките черва в зависимост от азота и смилаем протеин в тънките черва в зависимост от енергията. Линиите пролетен фий показват високо качество на получената зелена биомаса. Средно за периода на изследване, тя се характеризира с високо съдържание на суров протеин (22,08-23,51%) и ниско на структурните влакнинни компоненти: сурови влакнини – 23,18% неутрално-детергентни влакнини – 37,46% и киселинно-детергентни влакнини – 30,80%. Наблюдавана е висока смилаемост на сухото вещество при всички генотипове, вариращa от 68,23 до 72,15%. Линия №6 демонстрира най-добри качествени характеристики по състав и смилаемост на сухото вещество.

Ключови думи: фий (*Vicia sativa* L.), селекционни линии, качество на фуража**,** *in vitro* смилаемост – влакнинни компоненти на клетъчните стени

digestible protein in the small intestine depending on the nitrogen (PDIN) and digestible protein in the small intestine depending on the energy (PDIE). The lines of common vetch showed a high quality of green biomass obtained. It was characterized average for the period of study with a high content of crude protein (22.08-23.51%) and low content of the structural fibrous components: crude fibers – 23.18%, neutral detergent fibers – 37.46% and acid detergent fibers – 30. 80%. High digestibility of dry matter was observed for all genotypes, varied from 68.23 to 72.15%.

Line 6 demonstrated the best quality characteristics according to its composition and digestibility of dry matter.

Key words: vetch (*Vicia sativa* L.), breed lines, forage quality, *in vitro* digestibility – fibrous components of cell walls

УВОД

Обикновеният фий (*Vicia sativa ssp. sativa*) е едногодишна бобова култура, която може да бъде използвана като висококачествен фураж в животновъдството. Освен за паша, той може да се коси и суши за сено или да се преработи за силаж (Rahmati et al., 2012). Свежата зелена маса от фий съдържа високи нива на суров протеин (16,5-26,5%), което го прави отличен компонент в смески с някои житни култури, като овес или тритикале, тъй като увеличава значително съдържанието на суров протеин в тях, както и добива на зелена маса (Caballero et al.,1995, Lithourgidis et al., 2006, Aquilar-Lopez et al.,

INTRODUCTION

Common vetch (*Vicia sativa ssp. sativa*) is an annual legume species, which could be used as highly quality forage in stock-breeding. Besides grazing, it could be mowed and dried for hay or to be processed for silage (Rahmati et al., 2012).

Fresh green mass of vetch contains high levels of crude protein (16.5-26.5%), which makes it an excellent component in mixtures with some grass species, such as oats and triticale, as it increases significantly the content of crude protein in them, as well as the green matter yield (Caballero et al., 1995; Lithourgidis et al., 2006; Aquilar-Lopez et al., 2013).

2013). Отглеждането му в смески значително може да повиши стойностите на КДВ и НДВ и да доведе до влошаване качеството на получавания фураж (Assefa & Ledin, 2001). Поради високото съдържание на суров протеин фият може да се използва като добавка в грубите фуражи, използвани за храна при млекодайните крави, с което се намалява необходимостта от допълнително закупуване на протеин (Osuji et al., 1993).

Съдържанието на влакнините е особено важно при определяне качеството на фуражите, а като доминантен фактор се явява общата концентрация на неутрално-детергентните влакнини (НДВ). Повишаването на концентрацията на този компонент над критичната стойност от 60% значително намалява свободното поемане на фуража от животните, както и ефективността на преработването му. Концентрацията на киселинно-детергентни влакнини (КДВ) пряко влияе върху смилаемостта на фуражите, като по – ниските концентрации значително я повишават (Gezahagn et al., 2014).

Обикновеният фий се характеризира с висока смилаемост на сухото вещество (65.5%), а стойностите на КДВ и НДВ в получавания от него зелен фураж са значително по-ниски в сравнение с другите бобови култури (Kiraz, 2011). При монокултурното отглеждане на

Its cultivation in mixtures with cereal grains could increase significantly the values of ADF and NDF and to lead to deterioration of obtained forage (Assefa & Ledin, 2001). Due to its high content of crude protein, vetch could be used as a supplement to rough feed, which is used as feed for dairy cows, which reduces the need to purchase additional protein (Osuji et al., 1993).

The fiber content is particularly important in determining the forage quality, and the dominant factor is the total concentration of neutral-detergent fiber (NDF). The increase of concentration of that component over the critical value of 60% significantly reduces the free forage intake by the animals, as well as the effectiveness of its processing.

Concentration of acid detergent fibers (ADF) directly affects the forage digestibility, as the lower concentration significantly decreases it (Gezahagn et al., 2014).

Common vetch is characterized by a high dry matter digestibility (65.5%), and the values of ADF and NDF in its green forage are significantly lower in comparison with other legumes (Kiraz, 2011).

In monoculture cultivation of

обикновенния фий някои важни качествени характеристики, като съдържание на суров протеин (СР) и киселинно-детергентен лигнин (КДЛ), обща смилаемост на хранителните вещества (ОСВ), поемане на сухото вещество (ПСВ) и относителната хранителна стойност (ОХС) значително повишават стойностите си в сравнение с отглеждането на фия в смески с пшеничен компонент (Karagić et al., 2011; 2012).

Целта на настоящото изследване е да се направи биохимична оценка и сравнителна характеристика на селекционни линии пролетен фий и чрез основните биохимични показатели, характеризиращи качеството на фуража, да се прецени пригодността им за използване като зелен фураж.

common vetch, some important quality characteristics, such as crude protein content (CP) and acid detergent lignin (ADL), total digestible nutrients (TDN), dry matter intake (DMI) and relative feed value (RFV) significantly increase their values in comparison with cultivation of vetch in mixtures with wheat component (Karagić et al., 2011; 2012).

The aim of present study is to do a biochemical evaluation and comparative characteristics of the newly created germplasm of common vetch, and through main biochemical indicators, which characterize the quality of forage, to estimate if it appropriate to use it as green forage.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитът е изведен през периода 2012-2013 година в експерименталното поле на Опитната станция по соята-Павликени. Проучването включва шест мутантни линии пролетен фуражен фий: №2, №3, №4, №5 и №6. Линиите са създадени чрез химичен мутагенезис от българския сорт Образец - 666, използван като стандарт в опита под №1. Линиите бяха заложени в конкурсно изпитване по блоковия метод в 4 повторения и големина на реколтната парцелка 5m^2. Във фаза „начало

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted in the period 2012/2013 in the experimental field of the Experimental Station on Soybean-Pavlikeni. The study included 6 mutant lines of common vetch: No2, No3, No4, No5, No6 and No7. The lines were created through chemical mutagenesis from Bulgarian cultivar "Obrazets 666", used as a standard in the experiment under No1. Lines were set in a competitive testing according to a block method in four replications and a size of the harvest plot 5 m^2. In the phase

на цъфтеж” от повторенията на всяка линия са взети проби свежа биомаса с тегло от 500 g. Извършен е биохимичен анализ, който включва показатели за основен биохимичен състав и хранителна стойност на фуража: съдържание на суров протеин (СП), сурови влакнини (СВ) – определени по Weende метода (AOAC 2000), структурните влакнинни компоненти на клетъчните стени по систематичния детергентен анализ (Goering & Van Soest, 1970) като процент от сухото вещество. Ензимната *in vitro* смилаемост на сухото вещество (СмСВ) е определена като процент по двустепенния пепсин-целулазен метод на Aufrere (1982). Потенциалната протеинова хранителна стойност е оценена по Френската система (INRA 1988) чрез показателите общ смилаем протеин/суров смилаем протеин (TDP/PBD), PDIN – смилаем протеин в тънките черва в зависимост от азота и PDIE – смилаем протеин в тънките черва в зависимост от енергията. Направен е сравнителен анализ на линиите по качество на фуража, оценени са техните индивидуални и референтни стойности, както и степента на вариране на изследваните показатели според значимостта им за качеството на фуража.

Получените резултати са обработени статистически чрез вариационен и рангов анализ (Генчев и др., 1975).

"beginning of flowering" from the replications of each line were taken samples of fresh biomass with a weight of 500 g. Biochemical analysis was conducted, which included indicators for basic biochemical composition and nutritional value of forage: crude protein content (CP), crude fiber (CF) – determined according to Weende method (AOAC 2000), structural fibrous components of cell walls according to systematic detergent analysis (Goering & Van Soest, 1970) as a percentage of dry matter. The enzymatic *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) was determined as a percentage according to two-stage pepsine-cellulase method developed by Aufrere (1982). Potential protein feed value was assessed according to French system (INRA 1988) through the indicators TDP/ PBD – Total Digestible Protein/ Protein Brute Digestible, PDIN – digestible protein in small intestine depending on the nitrogen and PDIE – digestible protein in small intestine depending on the energy. A comparative analysis of lines was done according to forage quality, their individual and reference values were assessed, as well as the degree of variation of studied parameters according to their significance for the forage quality.

The results were processed statistically by analysis of variance and ranking analysis (Genchev et al., 1975).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Съставът и смилаемостта на зелената биомаса на фуражните бобови треви са от съществено значение за оценка на тяхната хранителна стойност и ефективното им оползотворяване. Съдържанието на суров протеин в зелената маса на проучваните селекционни линии фий е много високо. Средно за периода варира в границите от 22,08 до 23,51% от сухото вещество (Таблица 1). За линия 7 се наблюдава най-висока средна стойност на този основен показател (23,69%), като превишението спрямо средната стойност за изходния сорт Образец 666 (22,72%) се оценява като слабо. При същата линия съдържанието на сурови влакнини във фаза начало на цъфтеж е с най-ниска средна стойност – 21,84%. Средно коефициентът на вариране (CV%) и за двата лабораторно определени показателя на основния състав е 1,8 и 4,6% респективно, което доказва, че те не могат да служат като селекционни критерии. Малко над средното за групата проучвани е протеиновото съдържание на линии 6 и 5. Сравнително ниско и с незначителна разлика спрямо стандарта (22,94%) е съдържанието на сурови влакнини във фуражната маса, получена от линии 6 – 22,53% (ранг 2) и 2 – 22,65% (ранг 3), средно за периода на изпитване.

RESULTS AND DISCUSSION

Content and digestibility of green biomass of forage legume grasses are essential for the assessment of their nutritional value and effective utilization. Crude protein content in the green mass of studied breed lines of vetch was very high.

Average for the period it varied in the range from 22.08 to 23.51% of dry matter (Table 1). The highest average value was observed for line 7 of this basic indicator (23.69%), as the excess in relation to the average value for the initial cultivar "Obrazets 666" (22.72%) was assessed as weak.

The lowest average value of crude fiber content for the same line was in the phase beginning of flowering – 21.84%. The average coefficient of variance (CV%) for both laboratory determined indicators of the basic composition was 1.8 and 4.6% respectively, which proves that they could not serve as a selection criterion. The protein content of lines 6 and 5 was slightly above the average for the group.

The crude fiber content was relatively low and with insignificant difference from the standard (22.94%) in the forage mass, harvested from lines 6 – 22.53% (rank 2) and 2 – 22.65% (rank 3), average for the period of testing.

Таблица 1. Основен химичен състав и смилаемост *in vitro* на сухо вещество при селекционни линии фий, %

Table1. General chemical composition and *in vitro* digestibility of dry matter of breeding vetch lines, %

Линия/Line Сорт/Variety	Суров протеин,% Crude protein,%				Сурови влакнини ,% Crude fiber,%				Смилаемост на сухо в-во,% *in vitro* digestibility of dry matter,%			
	2012	2013	Mean	R	2012	2013	Mean	R	2012	2013	Mean	R
1	22,25	22,54	22,40	6	23,00	22,87	22,94	4	72,15	68,26	70,20	**3**
2	23,06	21,92	22,49	5	21,53	23,77	22,65	**3**	70,47	68,97	69,72	4
3	22,38	21,77	22,08	7	24,36	24,31	24,34	6	72,12	65,41	68,76	6
4	23,41	21,89	22,65	4	25,36	24,39	24,88	7	71,27	65,19	68,23	**7**
5	22,74	22,98	22,86	**3**	23,28	22,88	23,08	5	71,09	69,66	70,38	**2**
6	23,35	22,53	22,94	**2**	23,23	21,83	22,53	**2**	68,37	68,70	70,54	**1**
7	23,33	23,69	23,51	**1**	21,63	22,05	21,84	**1**	70,69	68,64	69,66	5
Средно/Mean	**22,93**	**22,47**	**22,72**		**23,21**	**23,16**	**23,18**		**70,57**	**67,64**	**69,46**	
Min	22,25	21,77	22,08		21,53	21,83	21,84		68,37	65,19	68,23	
Max	23,41	23,69	23,51		25,36	24,39	24,88		72,15	69,66	70,54	
SD	*0,48*	*0,69*	*0,40*		*1,27*	*1,03*	*1,06*		*1,48*	*1,82*	*0,94*	
CV	**2,1**	**3,1**	**1,8**		**5,5**	**4,4**	**4,6**		**2,1**	**2,7**	**1,4**	

Основен критерий в оценката на качеството и хранителната стойност на фуража е ензимната *in vitro* смилаемост на сухото вещество (Fahey & Hussein, 1999). Повишеното съдържание на протеин и по-ниското присъствие на лигноцелулозата в състава на растителната клетка води до по-висока *in vitro* смилаемост. Смилаемостта на проучваните селекционни линии фий е висока и варира в границите от 68,23 до 72,15%. Разликите между генотиповете по този показател са също незначителни – CV=1,4% (средно за периода 2012-2013 година) (Таблица 1). С най-висок процент смилаемост на сухото вещество е линия 6 – 70,54%, следвана от линия 5 – 70,38% и стандартния сорт Образец 666 – 70,20%. Линия 7, която се отличи с най-висок процент протеин заема ранг 5 (69,66%) при средна стойност на изслед-

A basic criterion for the assessment of quality and feeding value of forage is the enzyme *in vitro* dry matter digestibility (Fahey & Hussein, 1999). The increased protein content and the lower presence of lignocellulose in the plant cell lead to higher *in vitro* digestibility.

Digestibility of studied breed lines of vetch was higher and varied within the range from 68.23 to 72.15%. Differences among genotypes for that indicator were also insignificant – CV=1.4% (average for the period 2012-2013) (Table 1). Line 6 had the highest percentage of dry matter digestibility – 70.54%, followed by line 5 – 70.38% and the standard cultivar "Obrazets 666" – 70.20%.

Line 7, which was distinguished by the highest percentage of protein, took rank 5 (69.66%) with an average value of the studied group

ваната група от 69,46%.

Съдържанието на структурните полиозиди определени като *неутрално-детергентни влакнини (НДВ), киселинно-детергентни влакнини (КДВ), киселинно-детергентен лигнин (КДЛ) и целулоза* са главен източник на хранителна енергия за преживните животни като помалко от 50% от тях се смилат и оползотворяват (Fahey & Hussein, 1999). При проучваните линии бяха установени значително ниски стойности за НДВ, КДВ, КДЛ, както и увеличение на съдържанието на хемицелулозата, което е от голямо значение за качеството и хранителната стойност на получената биомаса.

Линия 6 е с най-ниско съдържание на НДВ – 36,14% при средна стойност 37,46% (Таблица 2). Важно е да се отбележи, че за двете години на проучване стойностите на този показател при всички генотипове са значително по-ниски от критичната стойност – 60%, при която се ограничава свободното поемане и ефективната преработка на зелената маса. Този показател е известен селекционен критерий при фуражните култури, чиито по-ниски стойности са свързани с повишаване качеството на фуража и неговото потенциалното поемане от животните (Casler & Vogel, 1999).

of 69.46%.

The content of structural polyosides determined as neutral detergent fibers (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL) and cellulose are the main source of nutritional energy for the ruminants, as less than 50% of them are digested and used (Fahey & Hussein, 1999).

Significantly low values of NDF, ADF, ADL were found in the studied lines, as well as an increase in hemicellulose content, which is of great importance for the quality and feeding value of obtained biomass.

Line 6 had the lowest content of NDF – 36.14% with an average value 37.46% (Table 2). It is important to note that for the two years of study, the values of that indicator for all genotypes were significantly lower than the critical value – 60%, wherein the free intake and effective processing of green mass was limited.

This indicator is a well-known selection criterion for forage cultures, whose lower values are related with an increase in forage quality and its potential intake by animals (Casler & Vogel, 1999).

Таблица 2 Структурни влакнинни компоненти на селекционни линии фий, в % сухо вещество, средно за 2012-2013 година

Table 2. Structural fiber components of breeding vetch lines, in % dry matter, average for 2012-2013

Линия/Line	НДВ/NDF				КДВ/ADF				КДЛ/ADL			
Сорт/Variety	2012	2013	Mean	R	2012	2013	Mean	R	2012	2013	Mean	R
1	38,75	35,62	37,18	4	31,30	28,08	29,69	**2**	5,39	5,87	5,63	**2**
2	43,84	37,99	40,92	7	29,62	28,93	29,28	**1**	5,10	5,98	5,54	**1**
3	37,46	37,55	37,50	6	32,33	29,98	31,16	6	5,73	6,16	5,94	**3**
4	36,06	37,39	36,72	**2**	32,09	30,14	31,12	5	6,51	6,13	6,32	6
5	38,16	35,64	36,90	**3**	36,16	28,53	32,34	**7**	6,12	6,77	6,44	7
6	36,94	35,34	36,14	**1**	32,96	28,08	30,52	4	6,42	5,85	6,14	5
7	40,74	34,11	37,42	5	31,56	28,45	30,00	**3**	5,80	6,27	6,04	4
Средно/Mean	**38,56**	**36,23**	**37,46**		**32,37**	**28,88**	**30,80**		**5,86**	**6,15**	**6,00**	
Min	36,06	34,11	36,14		29,62	28,08	29,28		5,10	5,85	5,54	
Max	40,74	37,99	40,92		36,16	30,14	32,34		6,51	6,77	6,44	
SD	*2,39*	*1,42*	*1,46*		*1,87*	*0,85*	*1,15*		*0,52*	*0,32*	*0,33*	
CV	**6,2**	**3,9**	**3,9**		**5,8**	**3,0**	**3,7**		**8,9**	**5,1**	**5,6**	

НДВ/NDF – Неутрално-детергентни влакнини/Neutral-detergent fiber; КДВ/ADF – Кисилинно-детергентни влакнини/Acid-detergent fiber; КДЛ/ADL – Киселинно-детергентен лигнин/Acid-detergent lignin; % dry matter;

Киселинно-детергентните влакнини са фракция, включваща лигнина и целулозата на клетъчните стени и определяща смилаемостта на фуража. Съдържанието им е под критичните за този компонент нива от 40% и варира в границите от 28,08 до 36,16%. Средно за периода с по-ниско съдържание на лигноцелулоза спрямо изходния сорт (29,69) е само линия 2 (29,28%). Отчетената средна стойност на всички генотипове за периода е 30,80% или с около 7%-ни единици по-ниска от тази на НДВ (37,46%).

Киселинно-детергентния лигнин се характеризира със стойности от 5,10 до 6,77%, което е съществена предпоставка за полягане на стъблото при фиевите растения. По този показател, линия 2 е с най-ниска средна стойност – 5,54%, при средна за периода 2012-2013

Acid detergent fibers are fractions, including lignin and cellulose of cell walls, which determine forage digestibility. Their content is below the critical levels of 40% for that component and varied in the range from 28.08 to 36.16%. Only line 2 (29.28%) had a lower lignocellulose content average for the period in comparison with the source cultivar (26.69%). The indicated average value of all genotypes for the period was 30.80% or about 7% units higher than that of NDF (37.46%).

Acid detergent lignin was characterized with values from 5.10 to 6.77%, which was an essential prerequisite for a lodging of the stem of vetch plants. Line 2 had the lowest average value according to these indicators – 5.54%, while the average for the period of 2012/2013 was 6.00%.

година – 6,00%. Коефициентът на вариране между генотиповете също е нисък, със стойност – CV=5.6%.

Емпирично определените стойности на хемицелулозата и целулозата и тяхното съдържание във фуража имат висока значимост при храненето на животните. Съдържанието на смилаемия полиозид хемицелулоза варира от 2,00 до 14,22% (линия 2), а това на целулозата от 21,76 до 30,04% (Таблица 3).

The coefficient of variance among genotypes was also lower, with a value – CV=5.6%

Empirically determined values of hemicellulose and cellulose, and their content in the forage have a high significance for feeding of animals. The content of digestible polyoside hemicellulose varied from 2.00 to 14.22% (line 2), and that of cellulose from 21.76 to 30.04% (Table 3).

Таблица 3 Структурни влакнинни компоненти на селекционни линии фий, в % сухо вещество, средно за 2012-2013 година
Table 3. Structural fiber components components of breeding vetch lines, in % dry matter, average for 2012-2013

Линия/Line Сорт/Variety	Хемицелулоза Hemicellulose				Целулоза Cellulose				Степен на лигнификация Rank of lignification			
	2012	2013	Mean	R	2012	2013	Mean	R	2012	2013	Mean	R
1	7,45	7,54	7,50	**2**	25,91	22,21	24,06	**3**	13,9	16,5	15,2	**2**
2	14,22	9,06	11,64	**1**	24,52	22,95	23,74	**1**	11,6	15,7	13,6	**1**
3	5,13	7,57	6,35	4	26,60	23,82	25,21	6	15,3	16,4	15,8	4
4	3,97	7,25	5,61	6	25,58	24,01	24,80	5	18,0	16,3	17,2	6
5	2,00	7,11	4,55	7	30,04	21,76	25,90	7	16,0	19,0	17,5	7
6	3,98	7,26	5,62	5	26,54	22,23	24,38	4	17,4	16,6	17,0	5
7	9,18	5,66	7,42	**3**	25,76	22,18	23,97	**2**	14,2	18,4	15,4	**3**
Средно/Mean	**6,00**	**7,35**	**6,65**		**26,42**	**22,73**	**24,58**		**15,2**	**17,0**	**16,0**	
Min	2,00	5,66	4,55		24,52	21,76	23,74		11,6	15,7	13,6	
Max	14,22	9,06	11,64		30,04	24,01	25,90		18,0	19,0	17,5	
SD	*4,15*	*0,99*	*2,31*		*1,74*	*0,88*	*0,77*		*2,20*	*1,22*	*1,38*	
CV	**69**	**13,5**	**34**		**6,6**	**3,9**	**3,1**		**14,4**	**7,2**	**8,6**	

С най-висок коефициент на вариране във фаза начало на цъфтеж е влакнинната фракция хемицелулоза (CV=34%). Сравнително висок е и вариационния коефициент по отношение степента на лигнификация – CV=8,6%.

Поради високото съдържание на протеин в надземната биомаса, пролетния фий се отличава с висока протеинова

The fiber fraction of hemicellulose had the highest coefficient of variation in the phase of beginning of flowering (CV=34%). The variation coefficient in relation to the degree of lignification was comparatively high – CV=8.6%. Due to the high protein content in the aboveground biomass, common vetch is distinguished by a high protein nutritional value (Osuji et al.,

хранителна стойност (Osuji et al., 1993). Общия смилаем протеин TDP/PBD варира от 172 до 191 g kg^{-1} , а смилаемият протеин в тънките черва в зависимост от азота (PDIN) и енергията (PDIE) – от 137 до 149 g kg^{-1} и от 102 до 108 g kg^{-1} (Таблица 4). Потенциалната протеинова хранителна стой-ност е най-висока за линия 7: TDP/PBD – 190 g kg^{-1} (при средна стойност 182 g kg^{-1}), PDIN – 148 g kg^{-1} (при средна стойност 143 g kg^{-1}) и PDIE – 108 g kg^{-1} (при средна стойност 107 g kg^{-1}), следвана от линия 6: TDP/PBD – 184 g kg^{-1} (ранг 2), PDIN – 144 g kg^{-1} (ранг 2), PDIE– 106 g kg^{-1} (ранг 4) и линия 5: TDP/PBD – 183 g kg^{-1} (ранг 3), PDIN – 144 g kg^{-1} (ранг 3), PDIE – 108 g kg^{-1} (ранг 1). Не са наблюдавани съществени различия при рангуването на линиите по показателите за протеинова хранителна стойност.

1993). The total digestible protein (TDP/PBD) varied from 172 to 191 g kg^{-1}, and the digestible protein in small intestine depending on nitrogen (PDIN) and energy (PDIE) – from 137 to 149 g kg^{-1}, and from 102 to 108 g kg^{-1} (Table 4). The potential protein nutritional value was the highest for line 7: TDP/PBD – 190 g kg-1 (with an average of 182 g kg^{-1}), PDIN - 148 g kg^{-1} (with an average value of 143 g kg^{-1}) and PDIE – 108 g kg^{-1} (with an average value of 107 g kg^{-1}), followed by line 6: TDP/ PBD – 184 g kg^{-1} (rank 2), PDIN – 144 g kg^{-1} (rank 2), PDIE – 106 g kg^{-1} (rank 4) and line 5: TDP/PBD – 183 g kg^{-1} (rank 3), PDIN – 144 g kg^{-1} (rank 3), PDIE – 108 g kg^{-1} (rank 1). There were no significant differences in ranking of lines according to indicators for the protein nutritional value.

Таблица 4. Протеинова хранителна стойност на селекционни линии фий, g kg^{-1} сухо вещество средно за 2012 - 2013 година
Table 4. Protein nutritive value of breeding vetch lines, g kg^{-1} DM, average for 2012 - 2013

Линия/Line Сорт/Variety	Общ смилаем протеин TDP/PBD				Смилаем протеин в тънките черва в зависимост от азота PDIN				Общ смилаем протеин в тънките черва в зависимост от енергията PDIE			
	2012	2013	Средно Mean	R	2012	2013	Средно Mean	R	2012	2013	Средно Mean	R
1	178	180	179	6	140	142	141	6	107	106	107	3
2	186	174	180	5	145	138	142	4	107	104	106	4
3	179	172	176	7	141	137	139	7	107	102	105	7
4	189	173	181	4	147	137	142	4	108	103	106	4
5	182	184	183	**3**	143	144	144	**3**	107	108	108	**1**
6	188	179	184	**2**	147	141	144	**2**	106	106	106	4
7	188	191	190	**1**	147	149	148	**1**	108	108	108	**1**
Средно/Mean	**184**	**179**	**182**		**144**	**141**	**143**		**107**	**105**	**107**	
Min	178	172	176		140	137	139		106	102	105	
Max	189	191	190		147	149	148		108	108	108	
SD	*4,31*	*6,83*	*4,45*		*2,98*	*4,37*	*2,85*		*0,64*	*2,36*	*1,13*	
CV	**2,3**	**3,8**	**2,4**		**2,1**	**3,1**	**2,0**		**0,6**	**2,2**	**1,1**	

PBD/TDP – Общ смилаем протеин (Protein brute digestible/Total digestible protein) – DM; PDIN – digestible protein in small intestine depending on nitrogen; PDIE – digestible protein in small intestine depending on energy, R – Rank

Комплексната оценка на качеството и хранителната стойност на фуража получен от проучваните селекционни линии фий се основава на определените средни стойности на лабораторно анализираните показатели (СП, СВ, НДВ, КДВ, КДЛ и *in vitro* СмСВ), рангуването им и аритметичната сума от тези рангове (Таблица 5).

С най-висока сумарна рангова оценка по проучваните показатели е линия №6.

The comprehensive assessment of the quality and feeding value of forage resulting from studied selection lines of vetch is based on certain average values of the laboratory analyzed indicators (CP, DM, NDF, ADF, ADL and *in vitro* DMD), the ranking and arithmetic sum of these ranks (Table 5).

Line 6 is with the highest sum rank according to the studied indicators.

Таблица 5. Средни стойности и ранг на състава, съдържанието на структурни влакнинни компоненти (% сухо вещество) и смилаемостта (%) на селекционни линии фий

Table 5. Mean values and Ranging of composition, structural fiber components content (% dry matter) and digestibility (%) of breeding vetch lines

Линия/Line	СП		СВ		НДВ		КДВ		КДЛ		СмСВ		Arithmetic	
Сорт/Variety	CP	R	CF	R	NDF	R	ADF	R	ADL	R	*in vitro* DMD	R	rang sum	R
1	22,40	6	22,94	4	37,18	4	29,69	**2**	5,63	**2**	70,20	**3**	21	**3**
2	22,49	5	22,65	**3**	40,92	7	29,28	**1**	5,54	**1**	69,72	4	21	**3**
3	22,08	7	24,34	6	37,50	6	31,16	6	5,94	**3**	68,76	6	34	7
4	22,65	4	24,88	7	36,72	**2**	31,12	5	6,32	6	68,23	**7**	31	6
5	22,86	**3**	23,08	5	36,90	**3**	32,34	**7**	6,44	7	70,38	**2**	27	5
6	22,94	**2**	22,53	**2**	36,14	**1**	30,52	4	6,14	5	70,54	**1**	15	**1**
7	23,51	**1**	21,84	**1**	37,42	5	30,00	**3**	6,04	4	69,66	5	19	**2**
Средно/Mean	**22,72**		**23,18**		**37,46**		**30,80**		**6,00**		**69,46**			
Min	22,08		21,84		36,14		29,28		5,54		68,23			
Max	23,51		24,88		40,92		32,34		6,44		70,54			
SD	*0,40*		*1,06*		*1,46*		*1,15*		*0,33*		*0,94*			
CV	**1,8**		**4,6**		**3,9**		**3,7**		**5,6**		**1,4**			

СП/CP- –Суров протеин/Crude protein; СВ/CF – Сурови влакнини/Crude fiber; НДВ/NDF – Неутрално-детергентни влакнини/Neutral-detergent fiber; КДВ/ADF – Киселинно-детергентни влакнини/Acid-detergent fiber; КДЛ/ADL – Киселинно-детергентен лигнин/Acid-detergent lignin; % dry matter; СмСВ/IVDMD – Смилаемост на сухо вещество/*In vitro* dry matter digestibility; %; R – Rank

ИЗВОДИ

Проучваните селекционни линии пролетен фий показват високо качество на получената зелена биомаса. Средно за периода на изследване, във фаза начало на цъфтеж, тя се характеризира с високо съдържание на *суров протеин* (22,08-23,51%)

CONCLUSIONS

The studied breed lines of vetch showed a high quality of green biomass.

It was characterized average for the period of study with a high content of crude protein (22.08-23.51%) and a low content

и ниско на структурните влакнинни компоненти: *сурови влакнини* – 23,18% *неутрално-детергентни влакнини* – 37,46% и *киселинно-детергентни влакнини* – 30,80%. Наблюдавана е висока смилаемост на сухото вещество при всички генотипове, вариращa от 68,23 до 72,15% при средна стойност за две годишния период – 69,46%.

Установена е висока степен на вариране за показателя хемицелулоза (CV=34%).

Линия №6 демонстрира най-добри качествени характеристики по състав и смилаемост на сухото вещество.

of structural fibrous components: crude fibers – 23.18%, neutral detergent fibers – 37.46% and acid detergent fibers – 30. 80%.

A high dry matter digestibility was observed for all genotypes, varied from 68.23 to 72.15% with an average value for the two year period – 69.46%.

A high degree of variation of the indicator of hemicellulose was found (CV=34%).

Line 6 demonstrated the best quality characteristics according its composition and dry matter digestibility.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Генчев Г., Маринков Е., Йовчева В., Огнянова А.** Биомерични методи в растениевъдството, генетиката и селекцията. 1975.
2. **Aquilar-Lopez E.Y., Boroques J.L., Dominquez I.A., Morales-Osorio A., De Guadalupe Gutierrez-Martinez M.** Forage yield, Chemical composition and In- vitro Gas Production of Triticale (x Triticose Wittmack) and Barley (Hordeum vulgare) associated with Common vetch (Vicia sativa) Preserved as Hay or Silage. 2013, 227-238.
3. **AOAC.** Official methods of analysis, 17-th ed. *Association of Analytical Chemists*, 2000, Gaithersburg, Maryland, USA.
4. **Assefa G. and Ledin I.** Effect of variety, soil type and fertilizer on the establishment, growth, forage yield, quality and voluntary intake by cattle of oats and vetches cultivated in pure stands and mixtures. *Anim. Feed Science and Technoogy*, 2001, 92, 95-111.
5. **Aufrere J.** Etude de la prevision de la digestibilite de la fourrages par une

REFERENCES

1. **AOAC.** Official methods of analysis, 17-th ed. *Association of Analytical Chemists*, 2000, Gaithersburg, Maryland, USA.
2. **Aquilar-Lopez E.Y., Boroques J.L., Dominquez I.A., Morales-Osorio A., De Guadalupe Gutierrez-Martinez M.** Forage yield, Chemical composition and In- vitro Gas Production of Triticale (x Triticose Wittmack) and Barley (Hordeum vulgare) associated with Common vetch (Vicia sativa) Preserved as Hay or Silage. 2013, 227-238.
3. **Assefa G. and Ledin I.** Effect of variety, soil type and fertilizer on the establishment, growth, forage yield, quality and voluntary intake by cattle of oats and vetches cultivated in pure stands and mixtures. *Anim. Feed Science and Technoogy*, 2001, 92, 95-111.
4. **Aufrere J.** Etude de la prevision de la digestibilite de la fourrages par une method enzymatic. *Ann. Zootech,* 1982, 31 (2): 111-130
5. **Caballero R, Goicoechea E.L., Hernaiz P.J.** Forage yields and quality of

method enzymatic. *Ann. Zootech,* 1982, 31 (2): 111-130
6. **Caballero R, Goicoechea E.L., Hernaiz P.J.** Forage yields and quality of common vetch and oat sown at varying seeding ratios and seeding rates of common vetch. *Field Crops Research*, 1995, 41, 135-140.
7. **Casler M., Vogel K.** Accomplishment and impact from breeding for increased forage nutritional value. *Crop Science*, 1999, 39: 12-20.
8. **Fahey G., Hussein H.** Forty years of forage quality research: Accomplishmend and impact from an animal nutrition perspective. *Crop Science*, 1999, 39: 4-12.
9. **INRA.** Alimemtation des bovines, ovins et caprins, R. Jarrige (ed.), *INRA Publ. Versailles*, 1988, France, 471 p
10. **Gezahagn K., Assefa G., Alemayehu M., Fekede F.** Forage nutritive values of vetch species and their accessions grown under nitosol and vertisol conditions in the central highlands of Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development,* 2014, 26, 1.
11. **Goering H., Van Soest P.** Forage fiber analysis, USDA-ARS, *Agric.Handb,* 1970, No 379, WashDC, 20 p.
12. **Karagić Đ., Vasiljević S., Katić S., Mikić A., Milić D., Milošević B., Dušanić N.** Yield And Quality of Winter Common Vetch (Vicia sativa L.) Haylage Depending on Sowing Method. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 2011, 27 (4): 1585-1594.
13. **Karagić Đ., Mikić A., Milošević B., Vasiljević S., Dušanić N.** Common vetch-wheat intercropping: Haylage yield and quality depending on sowing rates. *African Journal of Biotechnology,* 2012, vol. 11(30), pp. 7637-7642.
14. **Kiraz A. B.** Determination of Relative Feed Value of Some Legume Hays, Harvested at Flowering Stage. *Asian J. of Animal and Veterinary Advances*, 2011, 6 (5): 525-530.

common vetch and oat sown at varying seeding ratios and seeding rates of common vetch. *Field Crops Research*, 1995, 41, 135-140.
6. **Casler M., Vogel K.** Accomplishment and impact from breeding for increased forage nutritional value. *Crop Science*, 1999, 39: 12-20.
7. **Fahey G., Hussein H.** Forty years of forage quality research: Accomplishmend and impact from an animal nutrition perspective. *Crop Science*, 1999, 39: 4-12.
8. **Genchev G., Marinkov E. Yovcheva V., Ognyanova A.** Biometrical methods in plant-growing, genetics and breeding. 1975. (In Bulgarian)
9. **Gezahagn K., Assefa G., Alemayehu M., Fekede F.** Forage nutritive values of vetch species and their accessions grown under nitosol and vertisol conditions in the central highlands of Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development,* 2014, 26, 1.
10. **Goering H., Van Soest P.** Forage fiber analysis, USDA-ARS, *Agric.Handb,* 1970, No 379, WashDC, 20 p.
11. **INRA.** Alimemtation des bovines, ovins et caprins, R. Jarrige (ed.), *INRA Publ. Versailles*, 1988, France, 471 p
12. **Karagić Đ., Mikić A., Milošević B., Vasiljević S., Dušanić N.** Common vetch-wheat intercropping: Haylage yield and quality depending on sowing rates. *African Journal of Biotechnology,* 2012, vol. 11(30), pp. 7637-7642.
13. **Karagić Đ., Vasiljević S., Katić S., Mikić A., Milić D., Milošević B., Dušanić N.** Yield And Quality of Winter Common Vetch (Vicia sativa L.) Haylage Depending on Sowing Method. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 2011, 27 (4): 1585-1594.
14. **Kiraz A. B.** Determination of Relative Feed Value of Some Legume Hays, Harvested at Flowering Stage. *Asian J. of Animal and Veterinary Advances*, 2011, 6 (5): 525-530.

15. **Lithourgidis A.S., Vasilakoglou I.B., Dhima K.V, Dordas C.A, Yiakoulaki M.D.** Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seeding ratios. *Field Crops Research*, 2006, 99, 106-113.
16. **Osuji P. O., Nsahlai I. V., Khalili H.** Feed evaluation. *ILCA Manual 5 ILCA (International Livestock Center for Africa),* 1993, Addis Ababa, Ethiopia.
17. **Riday H., Brummer E., Moore K.** Heterosis of Forage Quality in Alfalfa. *Crop Science*, 2002, 42, 1088-1093.

15. **Lithourgidis A.S., Vasilakoglou I.B., Dhima K.V, Dordas C.A, Yiakoulaki M.D**. Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seeding ratios. *Field Crops Research*, 2006, 99, 106-113.
16. **Osuji P. O., Nsahlai I. V., Khalili H.** Feed evaluation. *ILCA Manual 5 ILCA (International Livestock Center for Africa),* 1993, Addis Ababa, Ethiopia.
17. **Riday H., Brummer E., Moore K.** Heterosis of Forage Quality in Alfalfa. *Crop Science*, 2002, 42, 1088-1093.