

## Компоненти на клетъчните стени на италиански райграс в зависимост от фазата на реколтиране и приложеното азотно торене

Йордан Маркович<sup>1</sup>, Миряна Петровиц<sup>1</sup>, Джордже Лазаревиц<sup>1</sup>,  
Снежана Анджелкович<sup>1</sup>, Владимир Зорнич<sup>1</sup>, Таня Васич<sup>2</sup>, Ратибор  
Щрбанович<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт по фуражни култури, 37251 Глободер, Крушевац, Република Сърбия

<sup>2</sup>Нишки университет, Селскостопански факултет, Косанчицева 4, 37000  
Крушевац, Република Сърбия

<sup>3</sup>Институт по растителна защита и околна среда Белград, Теодор Драйзер 1,  
11000 Белград, Република Сърбия

## Cell Wall Components of Italian Ryegrass Depending on the Harvest and Application of Nitrogen Fertilizer

Jordan Marković<sup>1</sup>, Mirjana Petrović<sup>1</sup>, Đorđe Lazarević<sup>1</sup>, Snežana  
Anđelković<sup>1</sup>, Vladimir Zornić<sup>1</sup>, Tanja Vasić<sup>2</sup>, Ratibor Štrbanović<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute for Forage Crops, 37251 Globoder, Kruševac, R Serbia

<sup>2</sup>University of Niš, Faculty of agriculture Kruševac, Kosančićeva 4, 37000 Kruševac, R  
Serbia

<sup>3</sup>Institute for plantprotection and environment, Teodora Drajzera 9, 11000 belgrade, R  
Serbia

E-mail: jordan.markovic@ikbks.com

Original scientific paper

### РЕЗЮМЕ

Значението на многогодишните треви е многопосочно. Те са в основата на устойчивото животновъдство и фуражната промишленост; основна храна за преживните животни в райони с умерен климат; компоненти на естествени и засети пасища, естествени и засети ливади, които могат да се използват за сено, сенаж и силаж. Правилното управление на многогодишните треви води до ниски

### SUMMARY

The importance of perennial grasses is multiple. They represent the basis of sustainable animal husbandry and the basis of the animal feed industry, forming the staple food of ruminants in areas with a moderate climate as components of natural and sown grasslands, natural and sown meadows that can be used through mowing, haylage and silage.

Adequate and advanced management of perennial grasses results in low prices of

цени на фуражите (значително пониски от тези на концентрираните фуражи). Италианският райграс се характеризира с бързо развитие и продуктивност на голямо количество качествени фуражни посеви. Целта на настоящето изследване е да се определи съдържанието на компонентите в клетъчните стени в сухото вещество на италиански райграс, като важни показатели за поемането и усвояването на сухото вещество в зависимост от фазата на реколтиране и внасянето на азотни минерални торове. Опитът е заложен в опитното поле на Институт по фуражни култури в Крушевац, Сърбия, по произволна блокова методика в три повторения. Резултатите от изследването показват, че с най-високо съдържание на НДВ и КДВ са тревостоите третирани с 90 kg N/ha (I откос), а с най-високо съдържание на лигнин е фуражната маса третирана с 60 kg N/ha (II откос). Въз основа на стойностите за НДВ и КДВ, е установено, че при италианския райграс, с най-висока ОХС е фуражната маса на житната култура от I откос, във варианта без внасяне на N минерални торове.

**Ключови думи:** италиански райграс, компоненти на клетъчната стена, относителна хранителна стойност

## УВОД

Многогодишните тревы са в основата на устойчивото животновъдство и хранителната индустрия, служейки за основен източник на храна за преживните животни в районите с умерен климат и като компоненти на естествените и засети пасища (Stošić et al., 2005), естествените и засети ливади, използвани за косене (Stošić and Radojević, 1980), сено и силаж (Dinić et al., 2003). Подходящото и високотехническо управление на

forages, significantly lower than concentrated feed. Italian ryegrass is characterized by rapid development and production of a large amount of quality forage crops.

The aim of this study was to determine the content of cell wall components in the dry matter of Italian ryegrass, as important indicators of dry matter intake and digestibility depending on the time of harvesting and the application of nitrogen mineral fertilizers.

The experiment was set up at the experimental field of the Institute for Forage Crops Kruševac, Serbia, according to a random block system in three repetitions. The research results showed that the highest content of NDF and ADF was found in the treatment with 90 kg N/ha in the I cut, while the highest amount of lignin was found in the treatment with 60 kg N/ha in the II cut. Based on the obtained values for NDF and ADF, the results showed that the highest value for the RFV of Italian ryegrass in the I cut is in the treatment without the application of N mineral fertilizers.

**Keywords:** Italian ryegrass, cell wall componets, relative feed value

## INTRODUCTION

Perrenial grasses are the foundation of sustainable animal husbandry and the animal feed industry, serving as the primary source of food for ruminants in temperate climate areas as components of natural and sown pastures (Stošić et al., 2005), natural and sown meadows that can be used through mowing (Stošić and Radojević, 1980), hay and silage (Dinić et al., 2003).

Adequate and sophisticated management of perennial grass fields leads in forage

полетата с многогодишни житни култури води до много по-ниски цени на фуражните култури, спрямо цените на концентрирания фураж. Най-важните видове използвани за фураж са английски райграс (*Lolium perenne* L.), ливадна власатка (*Festuca pratensis* Huds.), тръстиковидна власатка (*Festuca arundinacea* Schreb.), звездан (*Phleum pratense* L.), италиански райграс (*Lolium multiflorum* Lam.), червена власатка (*Festuca rubra* L.) и др. Освен това, многогодишните житни треви имат много важна роля за опазването на почвата, водата и природните местообитания, докато някои видове (английски райграс, червена власатка, тръстиковидна власатка и др.) се използват като основни паркови видове за умерен климат. Въпреки че тази група растения включва голям брой видове, ограничен брой от тях се отглеждат като културни растения за целите на фуражо-производството. При това, те заемат по-голямата част от земеделската земя и следователно осигуряват значителна част от фуражите, консумирани от домашните животни в районите с умерен климат по света, особено в полета с по-висока надморска височина (Tomić and Sokolović, 2007).

Многогодишните житни треви се характеризират с висока продуктивност на биомаса, т.е. сухо вещество, което е с отлично качество, при реколтиране в подходяща фаза. Фуражните житни треви се отглеждат рядко в самостоятелни посеви, но често се култивират с бобови и други треви като образуват плътен тревостой и са с по-висока икономическа ефективност. Високото съдържание на въглехидрати, ги прави подходящи за силажиране с бобови растения.

Италианският райграс (*Lolium multiflorum* L.) е фуражна култура с отлично качество. При храненето на

crop prices that are much lower than concentrated feed pricing.

The most important species for forages are English ryegrass (*Lolium perenne* L.), meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), birdsfoot trefoil (*Phleum pratense* L.), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), red fescue (*Festuca rubra* L.), etc.

In addition, perennial grasses have a very important role in the preservation of soil, water and natural habitats, while certain species (English ryegrass, red fescue, tall fescue, etc.) are used as the main park species of a temperate climate.

Although this group of plants comprises a large number of species, only a small number of them have been domesticated for the purpose of forage production. Furthermore, they occupy the majority of agricultural land and hence provide a considerable portion of the forages consumed by domestic animals in temperate regions of the world, particularly in higher altitude fields (Tomić and Sokolović, 2007).

Perennial grasses are characterized by their outstanding production of biomass, i.e. dry matter, which, if harvested at the appropriate time, is of excellent quality. Forages are rarely sown individually, but are frequently cultivated in combinations with legumes and other grasses due to the completeness of the vegetative space and economic exploitation.

Due to their high sugar content, they are ideal for ensiling with legumes.

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) is a forage crop that represents excellent quality forage. In animal

животните може да се използва в пряно състояние, като свежа маса, за паша, за приготвяне на сено, силаж и сенаж. Добивите на свежа маса от хектар са 20-40 t ha<sup>-1</sup>, а на сено - 5-15 t ha<sup>-1</sup>. В сравнение с други житни треви, италианският райграс се характеризира с по-ниски стойности на общи азотни вещества, но значително по-високо съдържание на въглехидрати и вода, което го прави много добър компонент за силажиране на тревната маса. Годишно, може да осигури 3-6 откоса, а съдържанието на хранителни вещества се променя в зависимост от вегетационната фаза на развитие (Gatarić et al., 2014).

Химическият анализ на храните по системата Weende не отговаря на нуждите на съвременното хранене, но позволява ориентировъчно да се предвиди хранителната стойност на храните и различните хранителни вещества, като те се допълват с по-прецизни данни за химичния състав, тоест върху определени сложни хранителни вещества. Недостатъците на тази система за изпитване на качеството на фуражите са забелязани още, когато беше предложена. Основните критики бяха, че суровата целулоза и безазотните екстракти не представляват химично определени вещества, и че биологичните разлики между тях не са значими. Необходимо е да се подчертае, че всички или почти всички нормативи в храненето на различните видове и категории домашни животни са определени въз основа на химически анализи по системата Weende.

Чрез разработване на система за детергентен анализ при определяне на влакнините през шейсетте години на миналия век (Van Soest and Wine, 1967) се постига значителен успех относно състава на хранителните вещества (Mertens, 1993), който се основава на факта, че влакнините, както и тяхната смиланост, са

nutrition, it can be used fresh, as green mass, for grazing, for preparing hay, and for preparing silage and haylage. Yields of green mass per hectare range from 20-40 t or 5-15 t ha<sup>-1</sup> of hay.

Compared to other grasses, Italian ryegrass contains a slightly lower level of total nitrogen substances, but a significantly higher content of sugar and water, which is a very good plant for ensilageing.

During the year, it can provide 3-6 cuts, and nutrient content varies depending on the stage of vegetation (Gatarić et al., 2014).

The chemical analysis of food according to the Weende system does not meet the needs of modern nutrition, but despite this, indicative information is obtained on the nutritional value of food and different nutrients, and these are supplemented with more precise data on the chemical composition of food, that is, on certain complex nutrients.

The shortcomings of this feed quality testing system were noted even at the time it was proposed. The main criticisms were that crude cellulose and nitrogen-free extracts do not represent chemically defined substances and that the biological differences between them are not realistic. However, it should be emphasized that all or almost all normatives in the nutrition of different species and categories of domestic animals were determined on the basis of chemical analyzes according to the Weende system.

By developing a detergent analysis system for fiber determination in the sixties of the last century (Van Soest and Wine, 1967), significant progress was made in understanding the composition of nutrients (Mertens, 1993), which is based on the fact that fiber, as well as its digestibility, is a crucial factor which affects the overall digestibility of nutrients.

фактори влияещи върху цялостната смилаемост на хранителните вещества. През последните години обект на изследване са предимно количеството хранителните вещества във фуражната маса и неговата усвояемост от животните. научната дейност е съсредоточена и върху процеса и продължителността на храносмилането, както и взаимодействията между хранителните елементи, които влияят на храносмилането на поетата храна (Mertens, 1994). С подобни нови изследвания може да се заключи, че физическата и биологична достъпност на хранителните вещества във фуража е също толкова важна, колкото и химичният им състав, както и въздействието им върху продуктивността на животните (Mertens, 2011).

Относителната хранителна стойност (ОХС) е важен критерий за оценка на качеството на фуража. Тя е показател за качество на фуража, използван широко за ценообразуване на сеното. Използва се в обученията по качество на фуража, а също и от производители на семена, за да се определят предимствата в сорта (Moore and Undersander, 2002) и представлява скала за енергийния потенциал (Henning et al., 1999). Киселинно-детергентни влакнини (КДВ) оценяват смилаемостта на фуража, а неутрално-детергентните влакнини (НДВ) са оценка за усвояването на фуража (Caddel and Allen, 1994). Стойностите на ОХС са въз основа на усвояването, и на смилаемостта и по този начин определят качеството на фуража, като използва тези две реакции на животните. Въпреки това, показателите за качество на фуража, (включително ОХС), са променливи величини, влияещи се от различни фактори в местните пасища. Относителната хранителна стойност

More recently, emphasis has been placed on the availability of nutrients for animals, that is, on their digestibility.

Much work has also been done to understand the importance of the process and length of digestion, as well as the interactions between nutrient elements that affect the digestion of ingested food (Mertens, 1994).

With these new findings, it can be concluded that the physical and biological accessibility of nutrients in feed is as important as their chemical composition, as well as their impact on animal performance (Mertens, 2011).

The relative feed value (RFV) has become important criteria for evaluating the quality of the forage. RFV is a forage quality index used widely for hay pricing. It is used for forage-quality education and also by seed producers to indicate variety improvement (Moore and Undersander, 2002) and it is an energy-based scale (Henning et al., 1999).

Acid detergent fiber (ADF) estimates forage digestibility and neutral detergent fiber (NDF) provides an estimate for forage intake (Caddel and Allen, 1994).

RFV is obtained on the basis of both intake and digestibility; thus, RFV reflects the forage quality by using these two animal responses. However, the forage-quality parameters including the RFV are variable and almost everything can affect them in one way or another in native pastures.

The RFV hay-grading system is based on the full-bloom alfalfa hay, which has an

на сеното се изчислява въз основа на сено от люцерна в пълен цъфтеж, което с ОХС 100. Житните треви, обаче, обикновено имат по-високи концентрации на НДВ спрямо бобовите растения в същия етап от растежа, но, НДВ в тревите са по-смилаеми сравнени с тези в люцерната (Brown and Pittman, 1991; Ward, 2008).

Целта на настоящето изследване е да се определят основните компоненти на клетъчните стени на италиански райграс в зависимост от фазата на реколтиране и приложеното азотно торене. Предвид съдържанието на компонентите на клетъчните стени се изчислява относителната хранителна стойност като важен критерий за оценка на фуражното качество.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в опитното поле на Институт по фуражни култури Крушевац, Сърбия. Експериментът е създаден по метода на рандомизиран пълен блоков метод, в три повторения. Изследваният район е разположен на 166 m надморска височина в Централна Сърбия. Средната годишна температура и сумата на валежите за района са съответно 12.6°C и 653.2 mm. В основната методика на експеримента са заложили следните норми на торене с азот: 0 (контрола), 60 и 90 kg/ha. Нормите на торене са приложени върху почвената повърхност на две части - преди сеитба и след първата коситба на тревостоите. Сеитбата на италианският райграс (сорт К 13), е осъществена през ноември - 2016 г. Първият откос е реколтиран през пролетта на (9 май) 2017 г., а вторият в началото на лятото (22 юни). Растенията са реколтирани във фаза на пълен цъфтеж със съдържание на СВ около 215 g kg<sup>-1</sup> - за първи откос и 245 g kg<sup>-1</sup> - за втори откос. Сухото вещество е определено чрез

RFV of 100.

However, grasses usually have higher concentrations of NDF than legumes at the same plant growth stages. But NDF in grasses is more digestible than NDF from alfalfa (Brown and Pittman, 1991; Ward, 2008).

The aim of this investigation was to determine the main cell wall components of Italian ryegrass depending on the harvest and application of nitrogen fertilizer.

According to the content of cell wall components, Relative Feed Value, as important criteria for evaluating the quality of forages was calculated.

## MATERIAL AND METHODS

The study was carried out at the experimental field of Institute for forage crops Kruševac, Serbia.

The experiment was established by the method of randomized complete block design in three replications. The study area was situated at altitude of 166 m above sea level in Central Serbia. The mean annual temperature and the total precipitation for the region are 12.6°C and 653.2 mm, respectively. 0 (control), 60 and 90 kg/ha of nitrogen doses were set in main experiment design.

Fertilizer doses were applied to the soil surface in two parts, before planting and after the first harvesting. Italian ryegrass, cultivar K 13, was planted in November 2016, with the first cutting in the spring 2017 – on May the 9<sup>th</sup>, and the second cutting in the early summer – on June the 22<sup>nd</sup>. Plants were harvested in full flowering stage with DM content about 215 g kg<sup>-1</sup> for first cutting and 245 g kg<sup>-1</sup> for second cutting. Dry matter was determined by drying out samples in an

изсушаване на пробите в пещ при 60° C в продължение на 48 часа. Изсушената проба се смила и пресява до размер на частиците - 1 mm. Всички анализи са направени в два екземпляра.

Данните за суровия протеин (СП), неутрално-детергентните влакнини (НДВ), киселинно-детергентни влакнини (КДВ), смилаемостта на сухото вещество (ССВ), прием на сухо вещество (ПСВ) и относителна хранителна стойност (ОСХ) са определени в резултат на анализ или изчисление.

Суровият протеин е изчислен косвено от количеството общ азот, измерено по метода на Kjeldahl, умножено по фактор - 6.25 (АОАС 984.13, 1990).

НДВ са определени чрез екстракция на 0.5 g проба със 100 ml кипящ неутрален детергентен разтвор в продължение на 60 минути. Остатъкът е събран чрез филтриране през тигел Gooch с голяма шупливост. Следва промиване с гореща вода, и ацетон, и сушене в сушилня при 100°С за една нощ (Van Soest et al. 1991).

КДВ са определени чрез екстракция на 1 g проба със 100 ml кипящ разтвор на киселинен детергент в продължение на 60 минути. Следва промиване с гореща вода и с ацетон, и сушене в сушилня за една нощ при 100°С (АОАС 973.18).

Количеството хемицелулоза в пробите е определено като разлика между количествата НДВ и КДВ (Van Soest et al., 1991).

Лигнинът е определен по методът на АОАС 973.18 с 72%-ен разтвор на сярна киселина. КДЛ е изолиран чрез напълване на тигела, съдържащ КДВ, с 12 M сярна киселина, след което е оставена да се отцеди от тигела. Периодично се добавя допълнителна киселина с хидролиза в продължение на 3 часа при стайна температура. Неразтворимият в

oven-drying cabinet at 60° C for 48 hours, and grinding and sieving them to 1 mm particle size. All analysis were done in duplicate.

The dates of Crude Protein (CP), Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), Digestibility Dry Matter (DDM), Dry Matter Intake (DMI) and Relative Feed Value (RFV) were determined in the result of analyze or calculate.

Crude protein was computed indirectly from the amount of total nitrogen, measured by the Kjeldahl metod, multiplied by factor 6.25 (АОАС 984.13, 1990).

Briefly, NDF was measured by extraction of 0,5 g sample with 100 ml of boiling neutral detergent solution for 60 min. The residue was collected by filtration through a coarse porosity Gooch crucible, washed with hot water, rinsed with acetone and dried at 100° C overnight (Van Soest et al. 1991).

ADF was measured by extraction of a 1 g sample with 100 ml of boiling acid detergent solution for 60 min. The ADF was then collected by filtration through the crucible. The ADF, after washing with hot water and rinsing with acetone, was dried overnight at 100° C. (АОАС 973.18).

The amount of hemicellulose in samples was determined as a difference between the amounts of NDF and ADF (Van Soest et al.,1991).

Lignin was determined as lignin insoluble in 72% sulfuric acid, applying the method of АОАС 973.18. Briefly, ADL was isolated by filling the crucible containing the ADF with 12 M sulfuric acid and allowing it to drain from the crucible. Additional acid was added periodically over the 3 h room-temperature hydrolysis.

The acid insoluble residue was collected

киселина остатък е събран чрез филтруване и е промит обилно с гореща вода. Следва промиване с ацетон преди пробата да бъде изсушена в сушилня за една нощ при 100°C. Съдържанието на КДЛ е определено като разликата в теглото на остатъка преди и след опепеляване в муфелна пещ при 450°C.

ССВ, ПСВ и ОХС са изчислени съгласно следните уравнения, адаптирани от общи формули за фуражи (Moor and Undersander, 2002):

$$\text{ССВ, \%} = 88.9 - (0.779 \times \text{КДВ, \%})$$

$$\text{ПСВ, \%} = 120 / \text{НДВ}$$

$$\text{ОХС, \%} = (\text{ССВ, \%} \times \text{ПСВ, \%}) / 1.29$$

Данните са анализирани с помощта на ANOVA при рандомизиран блоков модел, чрез програма Stat. Мек. Statistica 6. Статистическата значимост на разликите, тествани с помощта на LSD-тест, и значимите разлики между средните стойности са приети при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Концентрацията на СП, НДВ, КДВ, хемицелулозата и лигнина в сухото вещество на италианския райграс в зависимост от внасянето на азотни торове, реколтиран в първи и втори откос, са представени в Таблицы 1 и 2.

Стойностите на СП на италианския райграс са повлияни значително от азотната норма и при двата откоса. Най-ниско съдържание на СП е определено при контролата ( $N_0$ ) без прилагане на азот, като определените стойности са съответно  $76.4 \text{ g kg}^{-1}$  СВ и  $81.8 \text{ g kg}^{-1}$  СВ за първи и втори откос. Разликата в съдържанието на СП при третиране с  $N_{60}$  и  $N_{90}$  в първи откос е статистически

by filtration and extensively washed with hot water.

A final acetone rinse was used prior to drying the sample overnight at 100°C.

The ADL content was determined as the difference in weight of the residue before and after ashing at 450°C.

DDM, DMI and RFV were calculated according to the following equations adapted from common formulas for forages (Moor and Undersander, 2002):

$$\text{DDM, \%} = 88.9 - (0.779 \times \text{ADF, \%})$$

$$\text{DMI, \%} = 120 / \text{NDF}$$

$$\text{RFV, \%} = (\text{DDM, \%} \times \text{DMI, \%}) / 1.29$$

Data were analyzed using ANOVA in a randomized block design using the Stat. Soft. Statistica 6.

The statistical significance of differences tested using LSD-test and significant differences among means were accepted at  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The CP, NDF, ADF, Hemicellulose and lignin concentration in dry matter of Italian ryegrass depending on the nitrogen fertilizer application, harvested in the first cut and the second cut are presented in Tables 1 and 2.

The CP values of Italian ryegrass were significantly influenced by N dose in both cuts. The lowest CP content was determined in the control treatment ( $N_0$ ) without nitrogen application, and determined values were  $76.4 \text{ g kg}^{-1}$  DM and  $81.8 \text{ g kg}^{-1}$  DM in the first and the second cut, respectively.

The CP content of  $N_{60}$  and  $N_{90}$  treatments were statistically similar in the first cut,



недоказана, но при втори откос, с най-високото съдържание на СП е фуражната маса третирана с N<sub>90</sub> (102 g kg<sup>-1</sup> СВ). Съдържанието на СП, получено при първи откос, е по-ниско със 7.07% (третиране с N<sub>0</sub>), 1.85% (третиране с N<sub>60</sub>) и 3.23% (третиране с N<sub>90</sub>), спрямо втори откос .

При италианският райграс, по-високите дози N и в двата откоса следват повишаваща тенденция относно съдържанието на НДВ. Въпреки това, съдържанието на НДВ, определено при внасяне на доза азот от N<sub>60</sub> и N<sub>90</sub>, е с доказана разлика спрямо контролата (N<sub>0</sub>), p<0.05. От друга страна, съдържанието на НДВ при третиране с N<sub>60</sub> и N<sub>90</sub> е статистически сходно. Съдържанието на НДВ, във вариантите с прилагане на доза N<sub>90</sub>, е по-високо спрямо вариантите с внесен N<sub>60</sub> и в двата откоса. Съдържанието на НДВ, получено при първи откос, също е по-ниско с 10.51% (третиране с N<sub>0</sub>), 5.89% (третиране с N<sub>60</sub>) и 8.89% (третиране с N<sub>90</sub>).

but in the second cut, the highest content of CP was obtained in treatment N<sub>90</sub> (102 g kg<sup>-1</sup> DM).

The CP content obtained in the first cutting was lower by 7.07% (N<sub>0</sub> treatment), 1.85% (N<sub>60</sub> treatment) and 3.23% (N<sub>90</sub> treatment) than obtained in the second cutting (Tables 1 and 2).

NDF contents of Italian ryegrass tended to increase with increasing N doses in both cuts. However, the NDF contents determined in N<sub>60</sub> and N<sub>90</sub> nitrogen applications were different from the control (N<sub>0</sub>), p<0.05.

On the other hand, the NDF contents in N<sub>60</sub> and N<sub>90</sub> treatments were statistically similar. The NDF content determined in N<sub>90</sub> nitrogen application was higher than N<sub>60</sub> nitrogen application in both cuts. The NDF content obtained in the first cutting was also lower by 10.51% (N<sub>0</sub> treatment of nitrogen application), 5.89% (N<sub>60</sub> treatment of nitrogen application) and 8.89% (N<sub>90</sub> treatment of nitrogen application).

**Таблица 1. Съдържание на суров протеин и компоненти на клетъчните стени на италиански райграс в зависимост от внасянето на азотни торове, реколтиран в първи откос, g kg<sup>-1</sup> СВ**

**Table 1. Content of Crude Protein and cell wall components of Italian ryegrass depending on nitrogen fertilizer application harvested in the first cut, g kg<sup>-1</sup> DM**

Обработки Treatments	СП / CP	НДВ / NDF	КДВ / ADF	Хемицелулоза Hemicellulose	Лигнин / Lignin
N <sub>60</sub>	96.9 <sup>a</sup>	614.5 <sup>a</sup>	410.9 <sup>b</sup>	203.6 <sup>ns</sup>	81.7 <sup>a</sup>
N <sub>90</sub>	98.8 <sup>a</sup>	623.2 <sup>a</sup>	427.6 <sup>a</sup>	195.5 <sup>ns</sup>	73.6 <sup>b</sup>
N <sub>0</sub>	76.4 <sup>c</sup>	577.1 <sup>b</sup>	382.6 <sup>c</sup>	194.5 <sup>ns</sup>	67.2 <sup>c</sup>

N<sub>60</sub> – внасяне на 60 kg N тор на ha; N<sub>90</sub> - внасяне на 90 kg азотен тор на ha; N<sub>0</sub> – обработка без внасяне на азотен тор; СП – суров протеин; НДВ – Неутрално- детергентни влакнини; КДВ – Киселинно-детергентни влакнини; Различните букви в колоната означават средни стойности със значими разлики (P<0.05).

N<sub>60</sub> – application of 60 kg N fertilizer per ha; N<sub>90</sub> - application of 90 kg N fertilizer per ha; N<sub>0</sub> – treatment without application of nitrogen fertilizer; CP – Crude Protein; NDF – Neutral Detergent Fiber; ADF – Acid Detergent Fiber; Different letters in the column denote significantly different means (P< 0.05).

Увеличаването на азотните дози повишава съдържанието на КДВ в първи откос (Таблица 1). Съдържанието на КДВ в италианския райграс е  $382.6 \text{ g kg}^{-1}$  СВ,  $410.9 \text{ g kg}^{-1}$  СВ и  $427.6 \text{ g kg}^{-1}$  СВ съответно за  $N_0$ ,  $N_{60}$  и  $N_{90}$ . От друга страна, съдържанието на КДВ варира от  $418.2 \text{ g kg}^{-1}$  СВ до  $443.1 \text{ g kg}^{-1}$  СВ във втори откос (Таблица 2). Съдържанието на КДВ при  $N_{60}$  и  $N_{90}$  е доказано по-високо ( $p < 0.05$ ) спрямо това на  $N_0$ , но разликата в стойностите ( $N_{60}$  и  $N_{90}$ ) е статистически незначима. Съдържанието на КДВ във втори откос, е по-високо сравнено с първи откос.

The increase in nitrogen doses caused a increase in ADF content in the first cut (Table 1). ADF contents of Italian ryegrass were  $382.6 \text{ g kg}^{-1}$  DM,  $410.9 \text{ g kg}^{-1}$  DM and  $427.6 \text{ g kg}^{-1}$  DM for  $N_0$ ,  $N_{60}$  and  $N_{90}$ , respectively. On the other hand, content of ADF ranged from  $418.2 \text{ g kg}^{-1}$  DM to  $443.1 \text{ g kg}^{-1}$  DM in the second cut (Table 2).

ADF contents of  $N_{60}$  and  $N_{90}$  were higher ( $p < 0.05$ ) than those of  $N_0$ , but the difference in values ( $N_{60}$  and  $N_{90}$ ) was statistically insignificant. ADF content determined at the second cutting was higher than determined in the first cutting.

**Таблица 2. Съдържание на суров протеин и компоненти на клетъчната стена на италиански райграс в зависимост от внасяне на азотни торове, реколтиран във втори откос,  $\text{g kg}^{-1}$  СВ**

**Table 2. Content of Crude Protein and cell wall components of Italian ryegrass depending on nitrogen fertilizer application harvested in the second cut,  $\text{g kg}^{-1}$  DM**

Обработки / Treatments	СП / CP	НДВ / NDF	КДВ / ADF	Хемицелулоза / Hemicellulose	Лигнин / Lignin
$N_{60}$	98.7 <sup>b</sup>	650.8 <sup>a</sup>	443.1 <sup>a</sup>	207.6 <sup>b</sup>	112.7 <sup>a</sup>
$N_{90}$	102.0 <sup>a</sup>	650.7 <sup>a</sup>	433.6 <sup>a</sup>	217.1 <sup>ab</sup>	111.8 <sup>ab</sup>
$N_0$	81.8 <sup>c</sup>	637.8 <sup>b</sup>	418.2 <sup>b</sup>	219.7 <sup>a</sup>	105.4 <sup>b</sup>

$N_{60}$  – внасяне на 60 kg N тор на ha;  $N_{90}$  - внасяне на 90 kg N тор на ha;  $N_0$  – обработка без внасяне на азотен тор; СП – суров протеин; НДВ – Неутрално- детергентни влакнини; КДВ – Киселинно-детергентни влакнини; Различните букви в колоната означават средни стойности със значими разлики ( $P < 0.05$ ).

$N_{60}$  – application of 60 kg N fertilizer per ha;  $N_{90}$  - application of 90 kg N fertilizer per ha;  $N_0$  – treatment without application of nitrogen fertilizer; CP – Crude Protein; NDF – Neutral Detergent Fiber; ADF – Acid Detergent Fiber; Different letters in the column denote significantly different means ( $P < 0.05$ ).

Няма значимо влияние на азотното торене в първи откос по отношение на съдържанието на хемицелулоза (Таблица 1). Съдържанието на хемицелулоза варира от  $194.5 \text{ g kg}^{-1}$  СВ ( $N_0$ ) до  $203.6 \text{ g kg}^{-1}$  СВ ( $N_{60}$ ) в зависимост от дозите

The effect of N doses was not significant at the first cutting in terms of the hemicelluloses content (Table 1).

Hemicellulose contents ranged from  $194.5 \text{ g kg}^{-1}$  DM ( $N_0$ ) to  $203.6 \text{ g kg}^{-1}$  DM ( $N_{60}$ ) depending on N doses. In the

N. При втори откос, получените стойности за съдържанието на хемицелулоза варират от 207.6 g kg<sup>-1</sup> СВ (N<sub>60</sub>) до 2019.7 g kg<sup>-1</sup> СВ (N<sub>0</sub>). Най-високата стойност относно съдържанието на хемицелулоза е получена при нетретираната контрола (N<sub>0</sub>), а най-ниско при третиране с прилагане на азот N<sub>60</sub>.

Влиянието на азотното торене е значително по отношение на съдържанието на лигнин в първи и втори откос. Внасянето на азотен тор предизвиква повишаване на съдържанието на лигнин в италианския райграс при първи и втори откос. Съдържанието на лигнин, при прилагане на азот N<sub>60</sub>, е по-високо, спрямо това при доза N<sub>90</sub> (p<0.05) в първи откос, но във втори откос получените стойности са сходни (112.7 g kg<sup>-1</sup> СВ при внасяне на азот N<sub>60</sub> и 111.8 g kg<sup>-1</sup> СВ при внасяне на азот N<sub>90</sub>).

Влиянието на азотни торове върху ПСВ, ССВ и ОХС на италиански райграс, реколтиран в първи и втори откос, са представени в Таблицы 3 и 4.

second cutting, values obtained for hemicelluloses content ranged from 207.6 g kg<sup>-1</sup> DM (N<sub>60</sub>) to 2019.7 g kg<sup>-1</sup> DM (N<sub>0</sub>).

The highest value for hemicelluloses content was obtained in control treatment (N<sub>0</sub>), and the lowest content was determined in N<sub>60</sub> nitrogen application treatment.

The effect of nitrogen application was significant in terms of lignin content in the first and the second cut. Application of N fertilizer caused increasing lignin content of Italian ryegrass in the first and the second cut.

The lignin content determined in N<sub>60</sub> nitrogen application was higher than in N<sub>90</sub> nitrogen application (p< 0.05) in the first cut, but in the second cut obtained values for lignin content were similar (112.7 g kg<sup>-1</sup> DM in N<sub>60</sub> nitrogen application and 111.8 g kg<sup>-1</sup> DM in N<sub>90</sub> nitrogen application).

The effects of nitrogen fertilizer application on DMI, DMD and RFV of Italian ryegrass harvested in the first and in the second cut are presented in the Tables 3 and 4.

**Таблица 3. ПСВ, ССВ и ОХС на италиански райграс под влияние на азотното торене, реколтиран в първи откос**  
**Table 3. DMI, DDM and RFV of Italian ryegrass depending on nitrogen fertilizer application harvested in the first cut**

Обработки Treatments	ПСВ, % от телесното тегло DMI, % of body weight	ССВ, / DDM, %	ОХС / RFV, %
N <sub>60</sub>	1.95 <sup>b</sup>	56.89 <sup>b</sup>	86.13 <sup>b</sup>
N <sub>90</sub>	1.93 <sup>b</sup>	55.59 <sup>b</sup>	82.98 <sup>c</sup>
N <sub>0</sub>	2.08 <sup>a</sup>	59.09 <sup>a</sup>	95.25 <sup>a</sup>

N<sub>60</sub> – внасяне на 60 kg N тор на ха; N<sub>90</sub> – внасяне на 90 kg N тор на ха; N<sub>0</sub> – обработка без внасяне на азотен тор; ПСВ - Прием на сухо вещество; ССВ - Смаляемост на сухо вещество; ОХС - Относителна хранителна стойност; Различните букви в колоната означават средни стойности със значими разлики (P<0.05).

N<sub>60</sub> – application of 60 kg N fertilizer per ha; N<sub>90</sub> – application of 90 kg N fertilizer per ha; N<sub>0</sub> – treatment without application of nitrogen fertilizer; CP – Crude Protein; NDF – Neutral Detergent Fiber; ADF – Acid Detergent Fiber; Different letters in the column denote significantly different means (P< 0.05).

**Таблица 4. ПСВ, ССВ и ОХС на италиански райграс под влияние на азотното торене, реколтиран във втори откос**

**Table 4. DMI, DDM and RFV of Italian ryegrass depending on nitrogen fertilizer application harvested in the second cut**

Обработки Treatments	ПСВ, % от телесното тегло DMI, % of body weight	ССВ, / DDM, %	ОХС / RFV, %
N <sub>60</sub>	1.84 <sup>ns</sup>	54.38 <sup>b</sup>	77.73 <sup>b</sup>
N <sub>90</sub>	1.84 <sup>ns</sup>	55.12 <sup>ab</sup>	78.81 <sup>b</sup>
N <sub>0</sub>	1.88 <sup>ns</sup>	56.32 <sup>a</sup>	82.14 <sup>a</sup>

N<sub>60</sub> – внасяне на 60 kg N тор на ха; N<sub>90</sub> - внасяне на 90 kg N тор на ха; N<sub>0</sub> – обработка без внасяне на азотен тор; ПСВ - Прием на сухо вещество; ССВ - Смилаемост на сухо вещество; ОХС - Относителна хранителна стойност; Различните букви в колоната означават средни стойности със значими разлики (P<0.05).

N<sub>60</sub> – application of 60 kg N fertilizer per ha; N<sub>90</sub> - application of 90 kg N fertilizer per ha; N<sub>0</sub> – treatment without application of nitrogen fertilizer; CP – Crude Protein; NDF – Neutral Detergent Fiber; ADF – Acid Detergent Fiber; Different letters in the column denote significantly different means (P< 0.05).

В първи откос се наблюдава постепенно понижаване в стойностите на ПСВ и ССВ с повишаване на азотната норма (Таблица 3). Най-висок ПСВ (2.08% от телесното тегло) и ССВ (59.09%) е получен при неторената контрола (N<sub>0</sub>), а най-ниски при третиране с N<sub>90</sub> (1.93% от телесното тегло и 55.59%, съответно). Стойностите на ПСВ и ССВ при третирането с N<sub>60</sub> и N<sub>90</sub> са статистически сходни. ОХС, получена при първи откос, варира от 95.25 до 82.98. ОХС на италиански райграс, реколтиран в първи откос, бележи понижаваша тенденция с увеличаване на дозите N торове (Таблица 3).

ПСВ на италиански райграс, събран при втори откос, варира от 1.88% от телесното тегло (азот N<sub>0</sub>) до 1.84% от телесното тегло (азот N<sub>60</sub> и N<sub>90</sub>). ПСВ на италиански райграс, събран при втори откос, не се различава статистически. ССВ и ОХС на италианския райграс, реколтиран във втори откос, имат същата тенденция. Най-високите стойности на ССВ и ОХС са установени при контролата (N<sub>0</sub>) без внасяне на азот (съответно 56.32% и 82.14). Стойностите на ССВ и ОХС при

A continuous decrease in the DMI and DDM due to increased nitrogen application dose was observed in the first cut (Table 3).

The highest DMI (2.08% of body weight) and DDM (59.09%) were obtained from control treatment (N<sub>0</sub>), while the lowest DMI and DDM were obtained from N<sub>90</sub> nitrogen treatment (1.93% of body weight and 55.59%, respectively). The DMI and DDM values of N<sub>60</sub> and N<sub>90</sub> treatments were statistically similar. RFV obtained in the first cut ranged from 95.25 to 82.98. RFV of Italian ryegrass harvested in the first cut tended to decrease with increasing N fertilizer doses (Table 3).

DMI of Italian ryegrass harvested in the second cut ranged from 1.88% of body weight (N<sub>0</sub> nitrogen application) to 1.84% of body weight (N<sub>60</sub> and N<sub>90</sub> nitrogen application).

DMI of Italian ryegrass harvested in the second cut were not statistically different. The DDM and RFV of Italian ryegrass harvested in the second cut had the same tendency.

The highest values of DDM and RFV were determined in the control treatment (N<sub>0</sub>) without nitrogen application (56.32% and 82.14, respectively).

вариантите с N<sub>60</sub> и N<sub>90</sub> са статистически сходни и се повишават с увеличаване на дозата на азотния тор (Таблица 4).

Настоящото проучване потвърди, че азотното торене в подходяща доза може да бъде ефективен метод за увеличаване на протеиновото съдържание при нископротеинови треви и за задоволяване протеиновите нужди на животните. От друга страна, концентрацията на структурни въглехидрати във фуражите се влияе от редица фактори. Сезонните промени или промените в етапа на растеж могат да повлияят на концентрацията на структурни въглехидрати, тъй като делът на съблата спрямо този на листата ще се увеличи при зрялост. Редица автори сочат, че при оценка на качеството на фуража за преживни животни е много важно да се има предвид съдържанието на НДВ и КДВ.. Високото съдържание на НДВ във фуражите влияе отрицателно върху консумацията му, докато твърде високото съдържание на КДВ намалява общата смилаемост на фуража (Belanger et al., 2013.; Beart and Van Waes, 2014.; Van Soest et al., 1991.). Съдържанието на структурни въглехидрати се влияе и от внасянето на торове. Babnik (1995) показва, че съзряването и високите норми азотно торене водят до повишено съдържание на целулоза, КДВ, НДВ и сурови влакнини. Резултатите, получени в настоящето проучване, не съвпадат с тези на Godlowska and Ciepiela (2021), които посочват, че нивата на азот значително намаляват съдържанието на НДВ и КДВ в сухото вещество при италианския райграс. Данните от нашето изследване показват, че стойностите на тези показатели се увеличават или не се променят с увеличаване на азотната доза (Heeren et al., 2014, Peyraud et al.,

The DDM and RFV values of N<sub>60</sub> and N<sub>90</sub> were statistically similar, but increased with increasing nitrogen fertilizer doses (Table 4).

This study confirmed that nitrogen fertilization at the appropriate dose can be an effective tool to increase the protein content of low protein grasses to meet the protein needs of animals.

On the other hand, the concentration of structural carbohydrates in forages is influenced by a number of factors. Seasonal or stage of growth changes can affect the concentration of structural carbohydrates, since the proportion of stem tissue relative to leaf tissue would increase upon maturity. Some authors indicated that it is very important to take into account in the quality assessment of feed for ruminants the content of NDF and ADF.

A high NDF content in feeds negatively affects its consumption, whereas too high ADF content reduces the total feed digestibility (Belanger et al., 2013.; Beart and Van Waes, 2014.; Van Soest et al., 1991.)

Structural carbohydrates content was also influenced by fertilizer applications. Babnik (1995) showed that ageing and an increase in N fertilization resulted in an increased content of cellulose, ADF, NDF and crude fibre.

Godlowska and Ciepiela (2021) indicated that nitrogen rates significantly reduced the content of NDF and ADF in the dry matter of Italian ryegrass. Results obtained in this study are not consistent with those results. Our results are similar with some previous research results, which indicated that these values increased or did not change with increasing nitrogen doses (Heeren et al., 2014, Peyraud et al., 1997, Astigarraga et al., 1997).

1997, Astigarraga et al., 1997). Ertekin et al.(2022) установяват, че влиянието на дозата N върху ПСВ, ССВ и ОХС е значително и подобно. Тези автори посочват, че и трите характеристики имат тенденция да се увеличават с увеличаване на дозите N, което не е в съответствие с резултатите, получени в настоящето проучване. Същите автори установиха, че ПСВ намалява при втори откос, но без съществено влияние върху стойностите на ССВ или ОХС. Резултатите от настоящето проучване показват, че стойността на ПСВ, определена при първи откос (1.9% от телесното тегло), е по-висока от определената във втори откос (1.8% от телесното тегло).

### **ИЗВОДИ**

Доказано е положителното влияние в резултат на прилагане на азотни торове относно съдържанието на СП в сухото вещество при италианския райграс. Не се доказва предполагаемата хипотеза, че внасянето на азотен тор ще повиши и подобри хранителната стойност на тревите чрез понижаване на компонентите на клетъчната стена. Концентрацията на НДВ, КДВ и лигнин е по-ниска в първи откос, докато ССВ е по-висока. Увеличаването на дозата на внесения азотен тор не понижава количеството на анализирани компоненти на клетъчната стена. ОХС също е по-висока при първи откос. От голямо значение е да се отбележи, че внасянето на азотни торове би имало значително влияние върху добива на свежа маса и сухо вещество, но няма такова върху хранителната стойност на италианския райграс.

### **БЛАГОДАРНОСТИ**

Изследването в настоящата статия е част от проект №: 451-03-47/2023-01/200217, който се финансира от Министерството на образованието, науката и

Ertekin et al. (2022) found that the effects of N doses on DMI, DMD and RFV were significant and parallel.

These authors indicated that all three characteristics tended to increase with increasing N doses, which was not in consistent with results obtained in this study.

The same authors also found that DMI decreased at the second cut, but no effects were noted on DMD or RFV. Results from this study showed that DMI value determined at the first cutting (1.9% of body weight) was higher than determined at the second cutting (1.8% of body weight).

### **CONCLUSIONS**

There were confirmed positive effects resulting from nitrogen fertilizer application in Italian ryegrass CP content. There was not confirmed the assumed hypothesis that an application of nitrogen fertilizer will make it possible to improve the feeding value of grasses by reducing the cell wall components.

The concentrations of NDF, ADF and lignin were lower at the first cut, whereas DDM was higher. Increasing nitrogen fertilizer application did not reduce the quantity of analyzed cell wall components.

RFV was also higher in the first cut. It is of great importance to mention that nitrogen fertilizer application would have significant effect on achievement of green matter and dry matter yield, whereas there was no effect on nutritive value of Italian ryegrass.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The research in this paper is part of Project No.: 451-03-47/2023-01/200217 which is financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **АОАС**, 1997. Official method 973.18 Fiber (acid detergent) and lignin in animal feed. Official methods of analysis of AOAC International, 16<sup>th</sup> edition.
2. **АОАС**, 1990. Official method 984.13 Crude protein in animal feed, forage, grain, and oil seeds. Official methods of analysis of AOAC International, 15<sup>th</sup> edition.
3. **Astigarraga, L., J. L. Peyraud and L. Delaby**, 2002. Effect of nitrogen fertilizer rate and protein supplementation on the herbage intake and the nitrogen balance of grazing dairy cows. *Animal Research*, 51, 279-293.
4. **Babnik, D.**, 1995. Some environmental effects on relationships between *in sacco* degradability of protein and dry matter and chemical composition of Italian ryegrass. *Archiv of Animal Nutrition*, 48, 303-317.
5. **Beart, J. and C. Van Waes**, 2014. Improvement of the digestibility of Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) inspired by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grassland Science in Europe*, 19, 172-174.
6. **Belanger, G. P. Virkafarvi, M. Duru, G. F. Tremblay and K. Saarijarvi**, 2013. Herbage nutritive in less-favoured areas of cool regions. *Grassland Science of Europe*, 18, 57-70.
7. **Brown, W. F. and W. D. Pittman**, 1991. Concentration and degradation of nitrogen and fiber fractions in selected tropical grasses and legumes. *Tropical Grasslands*, 25, 305-312.
8. **Caddel, J. and E. Allen**, 1994. Forage quality interpretations. Oklahoma Cooperative Extension Service. Extension Facts F-2117. Oklahoma State University, Stillwater, OK.
9. **Dinić, B., D. Lazarević, S. Ignjatović and N. Đorđević**, 2003. The influence of development phase and dry matter level on quality and nutritive value of orchardgrass silage. Proceeding of the 11<sup>th</sup> International Scientific Symposium "Forage Conservation", 9-11 September, Nitra, Slovak Republic, 130-131.
10. **Ertekin, I., I. Atis, Z. Y. Aygun, S. Yilmaz and M. Kizilsimsek**, 2022. Effects of different nitrogen doses and cultivars on fermentation quality and nutritive value of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) silages. *Animal Bioscience*, 35 (1), 39-46.
11. **Gatarić, Đ., M. Drinić, V. Radić and A. Kralj**, 2014. Production on arable land and nutritional value of forage plants. East Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.
12. **Godłowska, A. and G. A. Ciepiela**, 2021. Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) fiber fraction content and dry matter digestibility following biostimulant application against the background of varied nitrogen regime. *Agronomy*, 11, 39-50.
13. **Heeren, J. A. H., S. C. Podesta and B. Hatew**, 2014. Rumen degradation characteristics of ryegrass herbage and ryegrass silage are affected by interactions between stage of maturity and nitrogen fertilization rate. *Animal Production Science*, 54, 1263-1267.
14. **Henning, J. C., G. D. Lacefield and Donna, P. D. Amaral**, 1999. Interpreting Forage Quality Reports – Online publication. ID-101. Cooperative Extension Service, University of Kentucky, College of Agriculture, Lexington, KY.
15. **Mertens, D. R.**, 1993. Importance of the detergent system of feed analyses for improving animal nutrition. Proceeding of Crnell Nutrition Conference, Ithaca, NY, 5-36.
16. **Mertens, D. R.**, 1994. Regulation of forage intake, p. 450-493. In: Forage

quality, Evaluation and Utilization, Fahey G. C., Collins, M., Mertens, D. R., Moser, L. E. (ed. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America), Madison, WI.

**17. Mertens, D. R.,** 2011. Measurements of forage quality. Tri-State Dairy Nutrition Conference, 19-20 April, 149-160.

**18. Moor, J. E. and D. J. Undersander,** 2002. Relative forage quality: An alternative to RFV and quality index. Proceedings of 13<sup>th</sup> Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 10-11 January, Florida, 16-29.

**19. Peyraud, J. L., L. Astigarraga and P. Faverdin,** 1997. Digestion of fresh perennial ryegrass fertilized at two levels of nitrogen by lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 64, 155-171.

**20. Stošić, M., D. Lazarević, B. Dinić, D. Terzić and A. Simić,** 2005. Natural grasslands as basic of livestock development in hilly-mountainous regions of central Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21 (1), 265-273.

**21. Stošić, M. and D. Radojević,** 1980. Duration and suitability of grass-legume mixtures for forage production in the mountain regions of Serbia. Proceedings of the 8<sup>th</sup> general meeting of the EGF, Zagreb, Croatia, 93-101.

**22. Tomić, Z. and D. Sokolović,** 2007. Breeding of perennial grasses – methods criteria and results in Serbia. A periodical of scientific research on field and vegetable crops, 44, 51-69.

**23. Van Soest, P. J. and R. H. Wine,** 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*, 50, 50-55.

**24. Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis,** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.

**25. Ward, R.,** 2008. Relative Feed Value (RFV) vs. Relative Forage Quality (RFQ) – Cumberland Valley Analytical Services, Inc. Hagerstown.