

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroekologie a rostlinné produkce



**Stanovení optimálního termínu aplikace přípravku
Polyversum pro podporu výnosu a vytrvalosti jetele
lučního
Diplomová práce**

Bc. Ondřej Szabó

Rostlinná produkce

doc. Ing. Josef Hakl, Ph.D

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení optimálního termínu aplikace přípravku Polyversum pro podporu výnosu a vytrvalosti jetele lučního" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20.7. 2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval především Martinu Pisarčíkovi a Josefu Haklovi za vedení této práce, odbornou pomoc, spolupráci, a především za trpělivost. Na těchto řádcích bych rád poděkoval také pánům Josefu Weberovi, Václavu Kůstkovi a Václavu Schleissovi za praktický úvod do agronomické disciplíny. Zároveň bych rád poděkoval celé mojí rodině za podporu při celém studiu a nemalou pomoc při sepisování této diplomové práce.

Zpracování diplomové práce bylo podpořeno grantem TAČR u „Využití přípravku Polyversum pro zvýšení vytrvalosti a výnosů porostů jetelovin“ č. projektu TJ01000150.

Stanovení optimálního termínu aplikace přípravku Polyversum pro podporu výnosu a vytrvalosti jetele lučního

Souhrn

Kořenové a krčkové choroby hrají významnou roli v produkci píce z jetele lučního. Především mají vliv na vytrvalost a výnos. Kvůli nízké rentabilitě a nízké účinnosti se nepoužívají syntetické fungicidy. Nejen proto se začíná uplatňovat biologická ochrana. Jedním z používaných organismů, které jsou již registrované do jiných plodin, jsou oospory *Pythium oligandrum* (přípravek Polyversum). Cílem této práce bylo zjistit, jaký má vliv aplikace tohoto přípravku na jetel luční a jaká je vhodná doba pro ošetřování. Byly zjišťovány některé ukazatele, především pak výnos, výška porostu, ukazatele kořenové morfologie a ukazatele napadenosti chorobami. Byly založeny dva pokusy na šlechtitelské stanici Větrov. První experiment (Větrov 1) byl založen v roce 2016 a byl zde zkoušen přípravek Polyversum na dvou odrůdách jetele – Start a Callisto v základní (ošetření na podzim) a intenzivně ošetřované variantě (ošetření po každé seči) v kontrastu s neošetřovanou kontrolou. Druhý experiment (Větrov 2) byl založen v roce 2018. Na tomto pokuse byl porovnáván přípravek Polyversum ve třech intenzitách ošetřování (jarní ošetření, podzimní ošetření a ošetření po každé seči) s neošetřovanou kontrolou a s variantou ošetřovanou fungicidem Prosaro. Bylo zjištěno, že přípravek měl pozitivní vliv na větvení kořenů a na zdravotní stav porostů ve druhém produkčním roce experimentu Větrov 1 a v prvním roce experimentu Větrov 2. Statisticky průkazný vliv na výnos byl zjištěn pouze ve druhém užitkovém roce experimentu Větrov 1 ve prospěch varianty ošetřované po každé seči. Ačkoliv měl přípravek Prosaro vliv na výšku porostů a na ukazatele napadení rostlin, v některých parametrech nedosahoval takové účinnosti jako podzimní aplikace Polyversa. Z výsledků vyplývá, že ošetřování přípravkem Polyversum má své výhody, a to dokonce i v suchých ročnících. Ekonomicky nejvýhodnější se jeví pravidelná podzimní aplikace. Přínos aplikace spočívá nejenom v antifungálním, ale také ve stimulačním efektu, který není dosud tolik prozkoumán.

Klíčová slova: jeteloviny; *Pythium oligandrum*; biologická ochrana; jetel luční

Determination of optimal term of Polyversum application for supportment of yield and persistence of red clover

Summary

Root and root crown diseases play a significant role in red clover forage production. Especially, they have important influence for plant persistence and forage yield. There are not used any synthetic fungicides because of low rentability and efectivity. These reasons are encouraging for establishment of biological protection. One of this biological agens, which is already registered in another crops are oospores of *Pythium oligandrum* (Polyversum). The goal of this thesis was to discover influence of the preparation and the optimal timing for effective utilization. Some indicators were investigated, especially yield, compressed sward height, traits of root morphology and diseases damage. Two experiments have been conducted at the breeding station in Větrov. The first experiment (Větrov 1) was set up in 2016. This experiment tested Polyversum in basic (application in autumn) and enhanced intensity (application after each cut) in the contrast with untreated control of two varieties of red clover – Start and Callisto. It was discovered that the Polyversum had positive effect for root branching and for plant's health in the second harvest year. Yield was statistically improved only at intensive treatment in the second harvest year. The second experiment (Větrov 2) was set up in 2018. This experiment compared Polyversum in three intensities of treatments (spring, autumn and after each cut) in comparison with untreated control and fungicide application (preparation Prosaro). It was proved that Prosaro had influence on compres sward height and on disease infestance but some of the parameters do not reach efficiency in comparision to autumn treatment variation. The autumn application can be considered as the most effective timming. Polyversum treatment variation may offer stand and yield advantages also during the dry years. These advantages ar related not only to antifungal effect, but also to stimulation effect, which hasn't been completely discovered yet.

Keywords: legumes; *Pythium oligandrum*; biological protection; red clover

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Význam, botanika a agrotechnika jetele lučního (<i>Trifolium pratense</i>)	10
3.2 Popis vybraných biotických a abiotických faktorů, které ovlivňují vytrvalost a výnos jetele v polních podmínkách.....	11
3.2.1 Frekvence sečí	11
3.2.2 Výživa mikroelementy.....	11
3.2.3 Přítomnost symbiontů.....	11
3.2.4 Půdní podmínky.....	11
3.3 Nejvýznamnější choroby jetelovin.....	12
3.3.1 Bílá hniloba jetele (patogen <i>Sclerotinia trifoliorum</i> Eriksson).....	12
3.3.2 Krčkové a kořenové hniloby jetele (patogen <i>Fusarium</i> spp.).....	13
3.3.3 Antraknóza jetele (<i>Coleotrichum trifolii</i>)	13
3.4 Strategie, které se využívají ke zvýšení vytrvalosti jetelovin	14
3.4.1 Šlechtění	14
3.4.1.1 Historie	14
3.4.1.2 Šlechtění v ČR a SR	14
3.4.1.3 Současnost.....	15
3.4.2 Pesticidní ošetření	15
3.4.3 Biologická ochrana	16
3.4.3.1 <i>Coniothyrium minitans</i>	17
3.4.3.2 <i>Pythium oligandrum</i>	18
3.5 Vztahy mezi napadením kořenového systému jetelovin, morfologií kořenů a produktivitou porostu.....	19
3.6 Odůvodnění této studie.....	20
4 Metodika	21
4.1 Založení pokusů.....	21
4.1.1 Stanoviště Větrov 1.....	21
4.1.2 Stanoviště Větrov 2.....	21
4.2 Hodnocení nadzemní fytomasy	21

4.3	Hodnocení podzemní fytomasy	22
4.4	Laboratorní metody qPCR.....	23
4.5	Statistické analýzy	23
5	Výsledky	24
5.1	Větrov 1	24
5.2	Větrov 2	24
5.2.1	Výskyt mikroorganismů v kořenech.....	25
5.3	Ekonomika ošetřování	25
6	Diskuse	26
6.1	Vliv ošetření na zdravotní stav.....	26
6.2	Vliv ošetření na podzemní a nadzemní biomasu	26
6.3	Výskyt mikroorganismů v pletivech kořenů.....	27
	Doporučení pro praxi a.....	27
6.4	ekonomika ošetřování	27
6.5	Ekologické aspekty ošetřování přípravkem Polyversum	28
7	Závěr.....	29

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá problematikou udržení vytrvalosti a produktivity porostů jetele lučního v průběhu pěstování. Jedním z hlavních problémů při pěstování jetele lučního je obecně to, že vlivem různých biotických (choroby, hraboši...) a abiotických (sucho, mráz...) faktorů porosty jetele lučního řídnou, či úplně exitují. Velmi významným faktorem je vliv patogenů, nejčastěji tzv. komplex kořenových a krčkových chorob. Jelikož šlechtění na rezistenci (toleranci) proti těmto chorobám je diskutabilní, je potřeba se zaměřit na ochranu přímou. Tato myšlenka samozřejmě není nová, avšak používání syntetických fungicidů často snižuje výnosy vlivem negativního působení na symbiotické bakterie anebo je ekonomicky či ekologicky neprůchodné. Z těchto důvodů se jako perspektivní jeví zaměření na biologickou ochranu. Jedním z nadějných přípravků, který se nejčastěji skloňuje v souvislosti s biologickou ochranou, je Polyversum (*Pythium oligandrum*), jehož účinek byl prokázán na řadě jiných plodin, jako jsou rajčata, česnek, hrách, cukrová řepa, ječmen, brambory nebo réva vinná. V oblasti pícnin, respektive jetelovin byly zaznamenány první zajímavé výsledky, a proto se tato diplomová práce zabývá vhodným načasováním aplikace přípravku nejenom z pohledu výnosů, ale i celkového stavu porostu jetele lučního.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce byla optimalizace aplikace přípravku Polyversum proti kořenovým chorobám jetele lučního se zaměřením na zvýšení výnosu a vytrvalosti porostů. Součástí této práce bylo i vyhodnocení rentability využití přípravku Polyversum.

Hypotézy:

1. Přípravek Polyversum negativně ovlivňuje výskyt kořenových patogenů.
2. Termín aplikace přípravku Polyversum dlouhodobě podporuje vyšší hustotu porostu a růst kořenového systému.
3. Termín aplikace přípravku Polyversum ovlivňuje výnosové ukazatele jetele lučního.
4. Termín aplikace přípravku Polyversum ovlivňuje ekonomický efekt použití přípravku.

3 Literární rešerše

3.1 Význam, botanika a agrotechnika jetele lučního (*Trifolium pratense*)

Jetel luční (*Trifolium pratense*) je jen na produkci semene pěstován celosvětově téměř na 4 milionech hektarech půdy (Riday 2010). Ve směskách s trávami je taktéž pěstován na 4 miliónech hektarech (Klimenko et al. 2010) a v monokultuře na výrobu píce lze odhadnout, že se pěstuje na bezmála 20 milionech hektarů. To z něj dělá jeden z nejvýznamnějších pícíních druhů střední Evropy, potažmo i světa. Na území České republiky (viz Graf 1) je pak intenzivněji pěstován od roku 1730 (Hejduk & Knot 2010). Pěstování jetele přineslo znatelné změny v hospodaření, jelikož nahradilo do té doby často praktikovaný úhorový systém obdělávání půdy. Díky tomu se zvýšila produkce krmiva pro hospodářská zvířata a tím také hnoje pro hnojení ostatních polí. Další výhodou pěstování se stalo obohacení půdy o dusík fixovaný rostlinami přímo ze vzduchu. Tyto změny v zemědělství lze srovnávat významem s pozdější průmyslovou revolucí (Fergus & Hollowell 1960). V dnešní době pozorujeme v České republice a v EU pozvolný nárůst v pěstování jetele lučního, a to hned z několika důvodů. Prvním z nich jsou dnešní vysoké ceny energií, které jsou potřeba pro výrobu dusíku z Haber-Boschovy syntézy. Druhým je obecný příklon směrem k větší ekologizaci zemědělství a třetím je zákaz krmení masokostních mouček v EU (Hejduk & Knot 2010). Dalším důvodem může být i zavedení povinného greeningu v rámci podpor SAPS.

Podle Kubáta (2002) jsou rozlišovány 3 poddruhy jetele lučního: subsp. *pratense*, subsp. *sativum* a subsp. *americanum*. V České republice se jedná o domácí druh, který se přirozeně vyskytuje v diploidní formě.

Jetel luční má vyšší toleranci k mělčím, kyseljším a vlhčím půdám než vojtěška setá, a také lépe reaguje s trávami ve směsích. To je důvod, proč ve střední Evropě našel tento druh takové široké využití a uplatnění (Hejduk 2015). Další výhodou jetele oproti vojtěšce je obsah enzymu polyfenol oxidázy, který pozitivně ovlivňuje využití proteinů v bacheru přežvýkavců a zároveň potlačuje proteolýzu při procesu silážování (Hejduk & Knot 2010). Dalším rozdílem oproti vojtěšce je vyšší chutnost píce, vyšší procento vodorozpustných sacharidů. Dále je nutné zmínit, že píce nelignifikuje tak rychle, a proto z hlediska výživářského lze sklízet až do kvetení. Z hlediska agronomického však už nikoliv, jelikož nakvétání snižuje vytrvalost porostu – proto je třeba sklízet ve fázi butonizace, kdy mají rostliny sušinu více než 18 % (kvůli snadnějšímu zavádání nebo sušení).

Jetel luční slouží v současné době v ČR jako přerušovač obilních sledů. Zároveň se uvádí, že jetel by měl na stejný pozemek přijít nejdříve za 4 roky po sobě kvůli jetelové únavě. Jetelová únava je jednostranné vyčerpání živin v kombinaci s nastřádanými půdními patogeny.

Lze volit jarní, letní i podzimní termíny výsevů. Zároveň je možná volba mezi čistým výsevem a výsevem do krycí plodiny. Jako krycí plodinu lze zvolit prakticky cokoliv, co se týče obilnin a luskovinoobilných směsek. Hnojení dusíkem se neprovádí, výjimkou může být regenerační hnojení na jaře, ještě předtím, než se ze zimy „probudí“ také symbiotické bakterie. Hnojení fosforem a draslíkem provádíme před zakládáním porostů (selgen.cz).

3.2 Popis vybraných biotických a abiotických faktorů, které ovlivňují vytrvalost a výnos jetele v polních podmínkách

Jetel luční (*Trifolium pratense*) při 3 sečích za rok dává stabilní výnosy pouze 2 produkční roky (nepočítaje první rok založení). Poté výnosy suché hmoty rapidně ubývají (Marshall et al. 2012). Taylor (2008) uvádí, že ke zvýšení vytrvalosti je nezbytné rozšířit odolnost jetele proti chorobám a škůdcům.

3.2.1 Frekvence sečí

Někteří autoři (např. Sheldrick et al. 1986) tvrdí, že vyšší frekvence sečí vede k zeslabení rostlin, snížení jejich výnosů a snížení jejich vytrvalosti. Jiní (např. Hejduk 2015) zjistili, že zvyšování intenzity sečí porostů jetele lučního nevede vždy přímo k nižším výnosům a vytrvalosti porostů. Dokonce při zachování stejného výnosu, při vyšší frekvenci seče, dochází ke zlepšení kvality píče.

3.2.2 Výživa mikroelementy

Stoltz & Wallenhammar (2012) zjistili, že na fitness jetele lučního v polních podmínkách má vliv výživa některými mikroelementy, především bórem (B), mědí (Cu), manganem (Mn) a zinkem (Zn). Tyto mikroelementy slouží jako enzymatické kofaktory nebo regulátory, zodpovědné za biosyntézu fenolů a ligninu, které představují dva důležité mechanismy v rostlinách (Marschner 1995). Bylo zjištěno, že existuje vztah mezi rostoucí koncentrací některých mikroprvků v kořenech a klesající DSI (z anglického disease severity index – stupeň napadení kořenů). DSI klesá v důsledku Mn a Zn hnojení. Naopak aplikace B a Cu zapříčiňují lehké zvýšení DSI. Z toho vyplývá, že hnojení Mn a Zn může redukovat kořenové hniloby a díky tomu zvyšovat vytrvalost rostlin (Stoltz & Wallenhammar 2012). V jiném experimentu se však efekt výživy mikroprvky proti půdním chorobám nepotvrdil (Stoltz & Wallenhammar 2018). Steiner & Alderman (2003) publikovali, že aplikace Mg má též pozitivní efekt na produkci semene.

3.2.3 Přítomnost symbiontů

Jetel luční patří do čeledi bobovité (*Fabaceae*), což mimo jiné znamená, že kořeny těchto rostlin, respektive specializované útvary zvané hlízky, obývají symbiotické bakterie rodu *Rhizobium*. Kořeny jetele lučního obsahují ve svých exudátech seskviterpeny a strigolaktony (především orobanchol), které lákají symbiotické houby, ale také kořeny parazitických rostlin. Těchto látek vylučuje rostlina více při větší deficienci fosforu (Yoneyama et al. 2007). Sturz et al. (1997) zjistili, že kořeny jetele lučního kolonizuje více druhů a rodů bakterií. Konkrétně zjistili 31 druhů, ze 14 rodů. Dále se podařilo dokázat, že inokulací *Rhizobium leguminosarum* BV *trifolii* samostatně, nevede k většímu vzrůstu. Naopak koinokulace bakterie *R. leguminosarum* BV *trifolii* ve směsi s *Bacillus insolitus*, *B. brevis* nebo *Agrobacterium rhizogenes* A. růst podpořila.

3.2.4 Půdní podmínky

Rice et al. (1977) zjistili, že půdní reakce nemá takový vliv na výnos jetele lučního (*Trifolium pratense*), tak jako tomu je u vojtěšky seté (*Medicago sativa*). Na druhou stranu se

podarilo prokázat, že při pH půdy nižší než 4,5 se snižuje počet *Rhizobium trifolii*. Autoři se však domnívají, že tento úbytek má na svědomí spíše vysoká koncentrace hliníku. Tyto závěry jsou v souladu s jinými zdroji, které uvádějí, že *R. trifolii*, je tolerantnější ke kyselému pH, než *R. meliloti* (Jensen 1942). Tímto problémem se zabývali Watkin et al. (2000), kteří testovali růst nových kmenů *R. trifolii* v různě kyselém prostředí. Kmeny WSM409, NA3039 a WU95 byly vyhodnoceny jako nejlepší pro osidlování kyselých půd.

3.3 Nejvýznamnější choroby jetelovin

Skutečnost, že jetel luční je náchylný ke kořenovým chorobám, je dlouhodobě známá (Mann 1938; Skipp et al. 1986). První písemnou zmínku o chorobách jetele publikovali již Lawes et al. (1860), kteří popisovali situaci z roku 1849 ve Velké Británii. Již tehdy farmáři věděli, že opakované pěstování jetele na stejném pozemku není možné právě kvůli chorobám a tyto choroby souhrnně nazývaly jako „clover sickness“, neboli choroby jetele (Young et Morton 1862; Lawes et Gilbert 1880). V roce 1943 bylo známo až 139 původců chorob u jetele lučního (Chilton et al. 1943). Ve Velké Británii bylo pozorováno, že napadení chorobami závisí na průběhu počasí během roku (Weston et al. 1946), především na úhrnech srážek během prosince a ledna (Loveless 1951).

Hlavní faktory, které vedou ke značné redukci výnosů u jetele lučního (od 30 do 80 %) jsou kořenové a krčkové hniloby, které jsou způsobovány několika půdními patogeny (Novosiolova 2002). Výzkum, který byl organizován v Norsku během 70. let ukázal, že výskyt kořenových hnilob u jetele je velice častý (Rufelt 1979). Eriksson (1880) identifikoval, že jetel napadá převážně původce *Sclerotinia trifolium* Erikss. Yli-Mattila et al. (2010) zjistili, že druhové složení patogenů, způsobujících krčkové a kořenové hniloby, závisí mimo jiné na formě pěstování (ekologické vs. konvenční). *Fusarium avenaceum* bylo zjištěno jako nejčastěji se vyskytující, avšak na půdách v eko režimu se vyskytovalo méně. Naopak *Gliocladium* spp., *Trichoderma* spp. a *Rhizoctonia* spp. byly nalezeny častěji na půdách, které jsou v ekologickém režimu již více než 10 let.

3.3.1 Bílá hniloba jetele (patogen *Sclerotinia trifoliorum* Eriksson)

Tato choroba je celosvětově rozšířena v oblastech, kde jsou mírné zimy nebo zimy se sněhovou pokrývkou (bez holomrazů). V Severní Evropě, bývalém Sovětském svazu, Kanadě a v určitých oblastech USA tato choroba způsobuje nejhorší ekonomické ztráty. *S. trifoliorum* má široké spektrum hostitelů, zahrnujících druhy: vojtěška setá (*Medicago sativa*), tollice dětelová (*Medicago lupulina*), štírovník růžkatý (*Lotus corniculatus*), vičenec ligrus (*Onobrychis viciifolia*), jetel inkarnát (*Trifolium incarnatum*), jetel luční (*Trifolium pratense*) a jetel zvrhlý (*Trifolium hybridum*). Jetel plazivý (*Trifolium repens*) je všeobecně považován za méně vhodného hostitele, ale není zcela rezistentní.

Mnoho dalších druhů rodu *Sclerotinia* sp. může ojediněle napadat bobovité. Choroba je obecně chápána jako kořenová či krčková, avšak napadány mohou být všechny části rostlin. Ze symptomů této choroby se nejprve objevují malé hnědé skvrny na listech a řapících. Silněji napadené listy se stávají šedivě hnědými, vadnou a později jsou potaženy bílým myceliem, které se šíří ke krčku a ke kořenům (Hanson & Kreitlow 1953). Symptomy této hniloby se rychle objevují, když se teploty zvyšují a sníh roztaje (Klimenko et al. 2010). V pozdní zimě nebo

časném jaru se choroba šíří dovnitř do kořenů. Některé části mycelia se poté mění na tvrdé útvary tzv. sklerocia, přičemž tyto útvary jsou klíčové pro přežití patogenu do dalších let. Velikost sklerocií se pohybuje rozměrově mezi jetelovým a hrachovým semenem. Až to podmínky dovolí, sklerocia začnou produkovat apothecia (plodnice), která produkují miliony spor. Ty kolonizují nové rostliny a životní cyklus se tím uzavírá (Hanson & Kreitlow 1953). Nízké sezónní teploty jsou prevencí rozvoje této choroby (Tribe 1957). Vleugels et al. (2013) zmiňuje, že některé populace jetele lučního vykazují jistou míru odolnosti, avšak zároveň tvrdí, že úplná rezistence proti *S. trifoliorum* nebude zřejmě nikdy dosaženo.

3.3.2 Krčkové a kořenové hniloby jetele (patogen *Fusarium* spp.)

Další důležitou chorobou je fusariová hniloba, která je způsobována druhy *Fusarium oxysporum*, *F. solani* a *F. roseum* (Klimenko et al. 2010). Někteří autoři označují tuto chorobu za nejčastější důvod řídnutí porostů (např. Hanson & Kreitlow 1953; Riday 2010). Naproti tomu např. Wallenhammar et al. (2006) tvrdí, že až do počátku 70. let byla fusariová hniloba ve Švédsku prakticky neznámá. Většina druhů tohoto rodu jsou slabými patogeny, způsobující poškození až poté, co jsou rostliny oslabeny nebo zraněny. Většina z nich je ale také téměř všudypřítomná v půdě. Symptomy jsou buď lokální, anebo jsou zaznamenány jako obecná hniloba jakékoliv části kořenového systému. Mohou být napadány jak primární, tak sekundární kořeny, tak i kořenový krček. Choroba může být lokalizována jak na povrchu, tak v příčném řezu kořene. Místa napadení mají barvu od tmavě hnědé po černou. Kořeny, které jsou zničené, se snaží rostliny nahrazovat novými sekundárními kořeny, avšak tento proces bývá pomalejší, a tudíž rostliny do druhého roku hynou (Hanson & Kreitlow 1953). Nejvíce náchylná k napadení fusariovými hnilobami bývá kořenová špička, respektive dolní dva centimetry kořene. Napadený kořen často ztrácí schopnost elongace ještě před penetrací mycelia. Uvádí se, že nejvíce náchylnými rostlinami z čeledi bobovitých jsou štírovník růžkatý a jetel plazivý, středně náchylnými jsou jetel luční a vojtěška setá. V experimentech bylo prokázáno, že *F. roseum*, *F. oxysporum*, *F. solani* a *F. moniliforme* obvykle způsobovaly vyšší frekvenci infekce, výskyt lézí a inhibici kořenového vzrůstu na rostlinách, ze kterých se inokulum odebíralo než na rostlinách, kam bylo později přeneseno (Leath & Kendal 1978). To vede k závěru, že přenos patogenu není vždy dokonalý a samotné rostliny mají různou odolnost.

3.3.3 Antraknóza jetele (*Coleotrichum trifolii*)

C. trifolii způsobuje antraknózu u jetele. Někteří autoři ji nazývají jako tzv. „jižní antraknózu“ (southern anthracnose) a uvádějí ji mezi 10 nejzávažnějších chorob světa obecně (Jacob et al. 2015). Monteith (1928) tvrdí, že počátkem 20. století byly antraknózy nejdůležitější chorobou jetele v USA. Onemocnění se projevuje na všech zelených částech rostlin. Napadány jsou rostliny ve všech fázích vývoje od klíčení až po dospělost. Antraknóza se nejprve projevuje na horních listech jako povlak plísně, později jako nekrotické skvrny. Tyto skvrny se zvětšují a mohou vést až k ohýbání stonku. Po dozrání začne mycelium produkovat růžovou masu spor, která se dále šíří při vysoké vlhkosti rosou, deštěm, ale také hmyzem. Na delší vzdálenosti se choroba šíří buďto osivem, anebo mechanizací (Jacob et al. 2015).

3.4 Strategie, které se využívají ke zvýšení vytrvalosti jetelovin

Snížená vytrvalost výrazně omezuje efektivitu využívání víceletých pícnin, zejména pak jetele lučního. Příčiny snížené vytrvalosti, která se promítá do snížení počtu rostlin a následně i výnosů píce byly shrnuty a dobře zdokumentovány v řadě studií, kde bylo potvrzeno, že kořenové choroby jsou důležitým faktorem při vyčerpávání porostů (např. Marten 1989; Riday 2010). Také Vasiljevic et al. (2005) uvádějí, že ve většině oblastí světa je problém s vytrvalostí jetele lučního, a že choroby kořenového systému jsou hlavním limitujícím faktorem. Nutno podotknout, že dodnes není uspokojivě vyřešen jakýkoliv druh ochrany proti patogenům způsobující kořenové a krčkové choroby a žádné odrůdy jetele lučního s vysokým stupněm rezistence nebyly vyšlechtěny (Stoltz & Wallenhammar 2012).

3.4.1 Šlechtění

3.4.1.1 Historie

Po objevu účinku kolchicinu v roce 1937 se začalo se šlechtěním tetraploidních odrůd jetele (Taylor & Quesenberry 1996). Už v roce 1939 byla vyšlechtěna první tetraploidní odrůda jetele lučního (Sjodin & Ellerström 1986). Bylo prokázáno, že tetraploidní odrůdy jetele jsou odolnější vůči *Sclerotinia trifolium* Erikss. než jejich diploidní formy (Vestad 1960). Na druhou stranu např. Öhberg et al. (2008) pak tvrdí, že tetraploidní odrůdy mají vyšší odolnost jen v některých podmínkách, například v severnějších oblastech. Dále uvádí nižší mortalitu v důsledku napadení chorobami u pozdně kvetoucích odrůd. Nevýhodou tetraploidních odrůd je nižší výnos semene až o 28 % (Riday 2010).

3.4.1.2 Šlechtění v ČR a SR

Studium genetických zdrojů jetele lučního a dalších pícních druhů, má v České republice dlouhou tradici (Vacek 1963). První šlechtitelská stanice byla otevřena v Měšicích u Tábora roku 1893. Význam této stanice vzrostl ve 20. a 30. letech, nástupem známého jihočeského šlechtitele – pícnináře – Ing. J. Koláře. Následoval vznik dalších šlechtitelských stanic po celém Československu. Nejznámější je patrně ta v Chlumci nad Cidlinou, kde se podařilo vyšlechtit až dodnes používanou odrůdu Chlumecký. Velkým přínosem ve šlechtění jetele lučního bylo zavedení polyploidizace diploidních odrůd. Touto problematikou se zabývala od roku 1962, po nástupu Ing. A. Fojtíka, CSc, především šlechtitelská stanice v Hladkých Životicích, která byla tehdy součástí Šlechtitelského a semenářského podniku v Olomouci. Později byla zahájena polyploidizace i ve Šlechtitelské stanici v Domoradicích. Obě stanice byly součástí Osevy, výzkumného a šlechtitelského ústavu pícninářského v Troubsku u Brna. V tomto období vznikl mezinárodní šlechtitelský tým v rámci zemí RVHP, ve kterém spolupracovali šlechtitelé jetelů z Československa, Polska a NDR. Ze spolupráce vzešla většina dnes povolených tetraploidních odrůd, jak v Domoradicích, tak v Hladkých Životicích i na Slovensku. Spolupráce byla přínosem hlavně proto, že docházelo k výměně výchozích materiálů jak na diploidní, tak na tetraploidní úrovni a bylo započato s rezistentním šlechtěním vůči *Sclerotinia trifoliorum* a houbám rodu *Fusarium* (Kulovaná, 2002).

Česká národní kolekce genetických zdrojů jetele lučního byla založena v roce 2006. Tato kolekce měla k roku 2012 57 tetraploidních odrůd a nově vyšlechtěných tetraploidních odrůd a

130 diploidních odrůd, nově vyšlechtěných odrůd a divokých forem z přírody (Vymyslický et al. 2012).

3.4.1.3 Současnost

Šlechtění jetele lučního se v současné době ubírá několika směry: šlechtění na rezistenci proti patogenům, šlechtění na vyšší výnos sušiny a šlechtění do směsí na pastviny (Riday 2010). Šlechtění jetele má i svá úskalí. Prvním z nich je potřeba opylovačů, v tomto případě nejčastěji čmeláků (Steiner & Alderman 2003). Zemědělci, kteří pěstují jetel na semeno, říkají, že na některých lokalitách „je jetel hluchá,“ což znamená, že opylení zřejmě neproběhlo, ať už z různých důvodů (ústní sdělení, Václav Schleiss – zemědělec). Zkušenosti zemědělců samozřejmě korespondují s řadou výzkumů. Například na výzkumných plochách ve státě Oregon byla zaznamenána prokazatelně několikanásobně vyšší sklizeň semene jetele lučního po opylení čmeláky (Rao & Stephen 2009). Dalším problémem v opylování je gametofytická inkompatibilita, což znamená, že pyl se stejnou S alelou, jako má blizna, zpomalně prorůstá čnělkou (Taylor & Smith 1980). V minulosti existovaly i výzkumy, které se zabývaly samoopylením u jetele (Rinke & Johnson 1941).

Po celém světě se šlechtění jetele lučního zaměřuje na zvýšení vytrvalosti a rezistence (tolerance) k biotickým a abiotickým faktorům, výnosů a kvality, která je charakterizována kvalitou a stabilitou proteinů, obsahem silážovatelných cukrů a stravitelností buněčných stěn (Řepková & Nedělník 2014). Osvědčenou metodou k regulaci kořenových hnilob se stalo ve 40 a 50. letech pěstování rezistentních odrůd (Loveless 1951).

Téma rezistence je i v současnosti aktuální. O tom svědčí například výzkum, který měl zjistit, které odrůdy jetele lučního jsou rezistentní vůči *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. v polních i laboratorních podmínkách. V roce, kdy byl infekční tlak nízký, byl zjištěn značný rozdíl v poškození rostlin mezi diploidními a tetraploidními odrůdami, kdy tetraploidní odrůdy vykazovaly menší napadení. V roce, kdy byl infekční tlak až 5krát větší, nebyly zjištěny žádné rozdíly, co se týče ploidie. Nejvyšší rezistenci vykazovaly odrůdy Tempus, Dolina, Vesna, Nemaro a Arimaičiai a linie Nos. 2096, 2106, 1582 a 2282 (Mikaliuniene 2015). Je známo, že odrůdy jetele jsou uzpůsobeny lokálními podmínkám a z tohoto důvodu je těžké, ne-li nemožné vyšlechtit nějakou universální odrůdu, která by se hodila do všech podmínek a byla zcela rezistentní k houbovým patogenům (Riday 2010). Toto potvrzuje i výzkum Steinera et al. (1997), kteří zjistili, že produkce semene je vyšší u lokálních ekotypů než u rezistentních odrůd.

3.4.2 Pesticidní ošetření

Fungicidní ošetření je první logickou cestou, jak zabránit napadení rostlin houbovými organismy. V praxi se toto ošetření u jetele lučního nepoužívá hned z několika důvodů. Prvním z nich je samozřejmě ekonomická náročnost. Druhým důvodem jsou také ekologické aspekty, jelikož toto ošetření má vliv i na necílové organismy. Třetím a nejdůležitějším faktorem je snížení produktivity růstu při použití některých fungicidů.

Již na přelomu 50. a 60. let byly ve Švédsku provedeny první výzkumy o vlivu použití fungicidních přípravků proti chorobám kořenového systému jetele lučního (Öhberg 2008). V polních pokusech Leatha et al. (1973) fungicid Benomyl pozitivně ovlivnil výnos jetele lučního, ale pozdější studie uvádí negativní účinek přípravku na výnos ve druhém užitkovém roce porostu (Jenkyn 1975). Larkin et al. (1995) prokázali, že fungicidní látka metalaxyl aplikovaná

na půdu v nádobových experimentech snižuje vliv půdních patogenů na kořenový systém vojtěšky seté. Ošetřené rostliny měly vyšší počet laterálních kořenů, větší délku kořenového systému a obecně složitější vzory větvení než u neošetřených rostlin. V polních pokusech se však účinek metalaxylu nepotvrdil (Larkin et al. 1996) a ani při ošetření osiva vojtěšky nebyl příliš účinný (Larkin et al. 1995).

Yang et al. (2011) píše o vlivu některých skupin fungicidů na necílové organismy. Tvrdí například, že zatím neznáme všechny negativní důsledky na půdní mikroorganismy a tyto negativní důsledky se pak mohou nepřímo projevit také na výnosu. Například při použití fungicidů Triton X45, Manoxol OT a PP 222 při koncentracích 1000, 2500 a 5000 $\mu\text{g. gram}^{-1}$ půdy se aktivita nitrogenázy a hmotnosti rostlin prokazatelně snižují (Fisher et al. 1978). Také bylo prokázáno postižení symbiotické fixace dusíku hlízkovými bakteriemi v podmínkách in vitro při použití fungicidů thiram, oxycarboxin a „Ethylan CP“ (Fisher 1976). Jiné pokusy dokazují, že při použití různých pesticidů (Funaben T a Pivot 100 SL herbicid) dojde ke snížení aktivity nitrogenázy v symbiotických bakteriích, a to jak v polních, tak i v nádobových pokusech. Autorka také pozorovala negativní účinek pesticidů na tvorbu hlízek, kořenový vývoj a výnos jetele. Aplikované herbicidy a fungicidy také inhibují množení mikroorganismů v půdě pod jetelem lučním v prvních dnech po aplikaci, ale později stimulují jejich množení (Niewiadomska 2004). Je dokonce popsána negativní reziduální účinnost fungicidů Thiram a Previcur, které byly v osevním postupu aplikovány na předplodinu cukrovou řepu. Naopak pozitivní efekt přinesla aplikace *Pseudomonas fluorescens*, rovněž na předplodinu (Walsh et al. 2003). Nan et al. (1991) ve své práci ověřovali účinnost sedmi fungicidních látek vůči patogenním houbám – původcům onemocnění kořenové soustavy jetele lučního. Látka prochloraz měla nejvyšší aktivitu proti izolovaným patogenům z kořenů jetele lučního. Ve skleníkových experimentech došlo po čtyřech týdnech od aplikace vlivem této látky k celkovému poklesu populace houbových organismů v půdě a ve vyšších koncentracích pak prochloraz tlumil růst jetele lučního. Jiné výsledky, například Skipp et al. (1986), ukazují prokazatelnou účinnost fungicidů benomyl a metalaxyl proti padání klíčnicích rostlin a hnílobám kořenů, ačkoliv použití těchto fungicidů zcela neeliminovála napadení.

Podle Suprapta (2012) se zemědělci stále častěji spoléhají na použití syntetických fungicidů k potlačení houbových chorob rostlin. Nesprávné používání těchto chemikálií však může způsobit vážné poškození životního prostředí a další zdravotní rizika. Öhberg (2008) uvádí, že použití fungicidů musí být ekologicky i ekonomicky oprávněné. Chemická fungicidní ochrana se proti těmto chorobám v praxi téměř nepoužívá i proto, že choroby mají komplikovanou etiologii (Nedělník 2008). V současné době není v České republice registrován žádný fungicidní přípravek určený pro ochranu kořenů jetelovin.

3.4.3 Biologická ochrana

Houbové infekce mohou být redukovány pomocí inokulace povrchů rostlin či semen různými bakteriemi, houbami, kvasinkami i viry. Biologická ochrana nabízí atraktivní alternativu konvenční ochraně rostlin představované především chemickými přípravky. Mikrobiologické přípravky jsou často vnímány jako méně zatěžující životní prostředí a jejich komplexní působení pomáhá předcházet vzniku rezistence (Elad & Freeman 2002).

Prevence rozvinutí infekce či její potlačení je založeno na různých mechanismech bioagens: Vyvolání indukované rezistence v hostitelské rostlině, kompeticí o zdroje a prostor,

antibiosa, hyperparasitismus, redukce saprofytické schopnosti patogena anebo redukce šíření spor (Elad & Freeman 2002). Mnohé rody hub mají mechanismy, které jim umožní efektivně léčit nebo předcházet vzniku listových a kořenových chorob, jejichž původcem jsou patogenní houby. Jednou ze strategií používaných biologickými agens je mykoparasitismus (Brimmer & Boland 2003). Jedná se o konkurenční až predanční vztah dvou organismů, přičemž parazitovaný organismus pochází z říše hub. Je známá celá řada mykoparazitů, jako například *Trichoderma asperellum* nebo *Coniothyrium minitans* (Pertot et al. 2015).

Několik mikroorganismů bylo testováno a bylo prokázáno, že jsou antagoničtí vůči houbovým patogenům (Suprpta 2012). Podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES, kterou se stanovuje rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů, je třeba v zemědělství pečlivě zvažovat veškeré dostupné metody ochrany rostlin a následně integrovat vhodná opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin či jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit, a které snižují či minimalizují ohrožení lidského zdraví nebo životního prostředí. Tento systém ochrany rostlin klade důraz na růst rostlin, při co nejmenším narušení zemědělských ekosystémů a podporuje mechanismy přirozené ochrany proti škodlivým organismům.

Biologická ochrana rostlin proti houbovým patogenům je studována více jak 80 let, ale až v posledních letech se daří několika společnostem vyvíjet mikroorganismy pro ochranu rostlin jako komerční produkty (Suprpta 2012). Hýsek et al. (2008) vysvětlují, že rozvoj studia mikroorganismů přišel s vytvořením světelné mikroskopické techniky a zavedením kultivačních metodik mikroorganismů. Tyto zachycovací metody jsou dnes stále zdokonalovány. Velké množství mikroorganismů však není možné kultivovat, např. biotrofní fytopatogeny, které se pomnožují pouze v živé rostlině, stejně tak i mnohé anaerobní mikroorganismy, které mají velmi specifické požadavky na své životní prostředí v průběhu svého růstu.

Vývoj nových biologických produktů proti rostlinným chorobám vyžaduje zkoumání vlastností velkého počtu kandidátů, kteří mají antagonistický vztah k patogenům. Antagonistní organismus využívaný komerčně musí splňovat několik podmínek. Kromě toho, že musí být speciálně adaptovaný pro napadání určitého rostlinného patogenu, musí být bezpečný a ekonomicky přijatelný. V úvahu bereme velikost trhu, ekologické charakteristiky, náklady, bezpečnost, environmentální rizika a možnosti ochrany duševního vlastnictví (Köhl et al. 2011).

Pro biologickou ochranu zemědělských plodin je v Evropě registrováno 14 rodů hub a bakterií (Gerbore et al. 2014). Hledá se prostředek s vysokou bezpečností a s minimálním dopadem na životní prostředí. Podle Gerbore et al. (2014) se v posledním desetiletí nejvíce studuje vliv *Pythium oligandrum* ze třídy Oomycota.

3.4.3.1 *Coniothyrium minitans*

Již v padesátých letech byl zkoumán vliv tohoto organismu, který má parazitální vztah k fytopatogennímu rodu *Sclerotinia*, k využití k biologické regulaci *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. Bylo zjištěno, že v určitých podmínkách je *C. minitans* efektivní k biologické regulaci sklerocií *S. trifoliorum*. Pro dobrý efekt je vhodné zajistit maximální kontakt inokula s půdou tak aby byl, pokud možno, kontakt sklerocií přímo s inokulem *C. minitans*. Jako nejlepší dobu

pro ošetření organismem *C. minitans* se uvádí doba při přípravě set'ového lůžka. Doporučuje se kypření na kritickou hloubku, pod kterou už nejsou sklerocia aktivní. Sklerocia musí být zničena ještě, než se na nich začnou vytvářet apothecia. Při dokonalém promíchání kultury s půdou byla při experimentu účinnost 85–99 % zničených sklerocií do 11 týdnů. Dalších 14 týdnů byla půda vysoce infekční (Tribe 1957). Öhberg (2008) zjistila, že tento organismus velmi dobře potlačuje rozvoj *S. trifoliorum* ve vlhkých a chladných podmínkách. *C. minitans* je dnes používána k regulaci sklerocií *S. trifoliorum* a *S. sclerotiorum*. Zemědělci v České republice znají tento přípravek pod obchodním názvem Contans WG a využívají jej především do porostů řepky, kde *S. sclerotiorum* škodí v posledních letech ve velké míře. Aplikuje se asi 3–4 měsíce před nástupem choroby nebo po sklizni předplodiny pomocí postřikovače a s následnou podmínkou. Organismus *C. minitans* vyžaduje přítomnost hostitele, aby zůstal ve vegetativní fázi (Pertot et al. 2015). Öhberg & Bång (2010) pozorovali prokazatelně vyšší účinnost přípravku Contans WG na tetraploidní odrůdu jetele SW Torum oproti diploidní odrůdě Jesper.

3.4.3.2 *Pythium oligandrum*

Drechsler (1946) zjistil, že se jedná o půdní organismus, který dokáže fungovat v mykorrhizním stavu s rostlinami a zároveň parazitovat ostatní houby ze stejného i jiných rodů (BCA – biocontrol agent). Dnes je ve světě zkoumáno několik kmenů tohoto organismu (Vallance et al. 2009). Brožová (2002) zastává názor, že využití tohoto organismu je založeno především v preventivním působení. Mnoho autorů, např. Yacoub et al. (2018) referují také o stimulačních účincích tohoto organismu (Obr. 6).

Benhamou et al. (1997) zjistili, že krátce po kontaktu *Pythium oligandrum* s myceliem parazitované houby dochází ke ztrátě a kolapsu turgoru. Snímky z elektronového mikroskopu naznačují, že dochází k totální dezintegraci buněčné cytoplasmy, ztrátě cytoplasmatické membrány a následně i protoplastu. Během této doby zůstává buněčná stěna z chitinu zcela zachovalá a hyfy pronikají do patogenního organismu. V této době už mycelium patogenu dále neroste, avšak bílé mycelium *Pythium oligandrum* ano (Brožová 2002). Podle patogenů se rozlišují 3 typy reakcí na mykoparazitismus:

1. Rychlá lýza: je charakteristická tím, že hyfa patogena přestává ihned růst a *P. oligandrum* penetruje buněčnou stěnu. Nakonec dochází k lýze buňky patogena. Tento příklad se týká většiny druhů houbových patogenů až na *Pythium* sp. a *Rhizoctonia solani*.
2. Rychlá granulace: je typická dezintegrací a granulací obsahu buňky patogenu, výjimečně lýzou buňky. To následně vede k zastavení růstu a zprůhlednění hyf. Jediným dosud známým patogenem s touto interakcí je *R. solani*.
3. Pomalá granulace, bez lýzy: Tato interakce je typická pro všechny druhy *Pythium* sp. Je založena pouze na granulování a zesvětlení obsahu buněk patogena 1–8 minut po kontaktu s hyfou *P. oligandrum* (Lewis et al. 1989).

Rovněž bylo zjištěno, že *Pythium oligandrum* pomáhá rostlině vytvořit indukovanou rezistenci proti patogenům (Benhamou et al. 1997). Indukovaná rezistence spočívá ve vytváření určitých proteinů (tzv. elicitory) v membráně buněčných stěn (cell-wall protein-CWP) organismem *Pythium oligandrum*, které nemají přímý fungicidní účinek proti patogenům, ale pomáhají rostlinám dále vyrábět různé látky, jako například fenolické sloučeniny, chitinázu (rozkládá buněčnou stěnu hub z chitinu), anebo fenylalanin amonium lyázu, které již přímý

fungicidní účinek mají (Takenaka et al. 2003). Benhamou et al. (2001) uvádějí dvě látky, které extrahovali z buněčné stěny *P. oligandrum*, a které dokáží fungovat jako elicitory. První sloučeninou je oligandrin, jehož přítomnost v rostlinách napadených patogeny je v úzké korelaci s přítomností velké řady antifungálních látek. Druhou sloučeninou je chitosan, pro jehož přítomnost je charakteristické utváření strukturálních bariér v místě, kde se patogeny pokoušejí penetrovat. Gerbore et al. (2014) uvádějí, že *P. oligandrum* nedokáže po penetraci do kořenového pletiva v rostlině přežít a jeho efekt je založen pouze na elicitorech. Nicméně Le Floch et al. (2007) namítají, že pokud má být vliv *P. oligandrum* na rostlinu příznivý, musí v rostlinném pletivu přežít. Gerbore et al. (2014) také tvrdí, že oproti jiným BCA dokáže pronikat hlouběji do rostlinného pletiva, což by mohlo vést k vyšší účinnosti oproti např. *Trichoderma* sp. Dále se uvádí, že *P. oligandrum* nenarušuje kořenovou mikroflóru rostlin. Le Floch et al. (2007) tvrdí, že samotný organismus *P. oligandrum* produkuje látky oligandrin (glykoproteinový elicitor) a tryptamin (látko ze skupiny auxinů), což jsou molekuly, zajišťující vyšší vzrůst rostlin. Zároveň se podařilo prokázat, že kolonizace kořenů (v tomto případě rajčat) organismem *Pythium oligandrum* probíhá bez zjevného porušení buněk. Hyfy *Pythium oligandrum* na svých koncích v rostlinném pletivu vytvářejí prázdné buňky (Lewis et al. 1989). V těchto buňkách vznikají nové oospory, které pak v prostředí přetrvávají a při správných podmínkách opět klíčí a opět kolonizují stanoviště. Jednotlivé kmeny *P. oligandrum* mají různou schopnost vytvářet oospory. Bylo prokázáno, že kmen, který měl tvořit nejméně oospor, byl po skončení pěstební sezóny nejvíce početný (Vallance et al. 2009).

Možnosti aplikace *Pythium oligandrum* jsou velice pestré. Ať už jsou to jednoduché postřiky, půdní drenáže, nebo inokulace oospor v prášku na povrch semen a sadby (Brožová 2002). Zároveň není jednoduché určit, zda při dané aplikaci bude přípravek účinkovat, jelikož klíčení oospor je ovlivněno několika různými faktory, jako například kořenovými exudáty, věkem rostlin a kmenem *P. oligandrum*. Dále je limitováno přežití samotných hyf v závislosti na přítomnosti půdních patogenů např. *Pythium. dissotocum* (Vallance et al. 2009).

3.5 Vztahy mezi napadením kořenového systému jetelovin, morfologií kořenů a produktivitou porostu

Některé studie na kořenovém systému jetelovin prokázaly určité souvislosti mezi utvářením kořenového systému a jeho napadením chorobami (Larkin et al. 1995). Polní studie u vojtěšky prokázaly pozitivní korelace mezi průměrem hlavního kořene, jeho větvením i stupněm napadením chorobami. Větvení kořenů souviselo především se změnami hustoty porostu a mělo pozitivní vliv na výnosy píče (Hakl et al. 2017). V případě vojtěškotravních směsí mělo snížení větvení kořenů vlivem přítomnosti travního komponentu za následek i nižší stupeň napadení kořenů (Hakl et al. 2018). Tyto souvislosti ukazují, že při komplexním hodnocení dopadů testovaných opatření u jetelovin a hledání jejich příčin je třeba vzít v úvahu nejen samotný zdravotní stav kořenů a výnos píče, ale také vývoj morfologie kořenového systému jetelovin.

3.6 Odůvodnění této studie

Pokusů, dokazující účinnost *P. oligandrum* proti chorobám, je celá řada. Většinou se jedná o skleníkové, nebo laboratorní studie na jednoletých polních plodinách a zelenině: rajčata (Hibar et al. 2006), hrách (Bradshaw-Smith et al. 1991), cukrová řepa (Holmes et al. 1998; Takenaka et al. 2006), ječmen (Kowalska & Zbytek 2015), brambory (Ikeda et al. 2012) nebo vinná réva (Daraignes et al. 2018). Publikované výsledky výzkumu, které by dokládaly účinnost *P. oligandrum* na fitness jetele lučního nebyly k dispozici. Jelikož tento přípravek vykazuje účinnost u řady jiných plodin, bylo zapotřebí zjistit, zda má podobný efekt i na jetel luční a následně zjistit vhodnou dávku, načasování aplikace a vyčíslit ekonomiku tohoto opatření. První výsledky autorského kolektivu byly publikovány v impaktovaných časopisech v letošním a loňském roce (Pisarčík et al. 2019a; Pisarčík et al. 2020). V rámci projektu TAČR byla vydána i certifikovaná metodika, která se zabývá vyhodnocením efektu aplikací přípravku u jetele lučního a vojtěšky seté (Pisarčík et al. 2019b) ve 4 polních pokusech na třech lokalitách. Z této metodiky vychází první část předložené diplomové práce. Druhá část se zabývá testováním optimálního načasování aplikace.

4 Metodika

4.1 Založení pokusů

Dva maloparcelkové pokusy s jetelem lučním byly založeny ve šlechtitelské stanici Větrov, patřící pod společnost Oseva UNI Choceň a. s. Nadmořská výška stanice je 620 m. n. m., průměrná roční teplota 6.9 °C, průměrné roční srážky činí 642 mm, půdní druh je hlinitopísčité, půdní typ hnědozem, půdní reakce mírně kyselá.

4.1.1 Stanoviště Větrov 1

První polní pokus byl založen v roce 2016. Na jaře byl porost jetele lučního založen čistým výsevem odrůd Start a Callisto v designu znáhodněných bloků ve čtyřech opakováních (viz Obr. 1 a Obr. 3), na okrajích byla použita odrůda Viola. Výsevek u všech odrůd činil 7 milionů klíčivých semen (MKS). ha⁻¹. Z hlediska aplikace přípravků byly u obou odrůd zařazeny následující varianty: neošetřená kontrola, ošetření přípravkem Polyversum v podzimním termínu (PO2) nebo po každé seči (PO3). Doplnkově byla sledována i odrůda Viola ve dvou variantách, kontrolní a variantě intenzivně ošetřované přípravkem Polyversum (PO3). Dávkování přípravku a termíny aplikací u jednotlivých variant jsou uvedené v Tab. 1. Rozměry parcel byly 8 x 1,25 m se sklizňovou plochou 10 m². Po vzejití se stanovila hustota porostu. Porost byl využíván třísečně, s výjimkou roku založení, kde proběhla jen odplevelovací a podzimní seč. Pokusné parcely byly sklizeny sklizňovým strojem Haldrup, pracovní záběr 1,25 m (viz Obr. 2). Během seče sklizňový stroj zaznamenává výnos čerstvé hmoty z jednotlivých parcel. Termíny sečí v hodnocených letech jsou uvedeny také v Tab.1. Další sledované parametry nadzemní hmoty i odebraných kořenů jsou uvedeny v kapitole 4.2 a 4.3 společně pro všechny hodnocené experimenty.

4.1.2 Stanoviště Větrov 2

Druhý pokus s jetelem lučním byl založen na jaře 2018 s čistým výsevem odrůdy Start (viz Obr. 4). Výsevek činil 7 MKS.ha⁻¹. Z hlediska aplikace přípravků byly v designu náhodných bloků ve čtyřech opakováních zařazeny neošetřená kontrola a 3 varianty ošetření přípravkem Polyversum, kde byla srovnávána jarní (PO1), podzimní (PO2) a intenzivní varianta aplikací přípravků po každé seči (PO3), přičemž dávkování a termíny jsou uvedeny v Tab. 1. Dále byla založena varianta chemicky ošetřovaná fungicidem Prosaro (CH). Rozměry parcel byly 8 x 1,25 m se sklizňovou plochou 10 m². Porost byl využíván třísečně s výjimkou prvního roku, kdy byla provedena pouze odplevelovací seč. Sklízňe probíhaly metodicky shodně s pokusem Větrov 1, přičemž termíny sečí jsou uvedeny v Tab. 1. Další sledované parametry nadzemní hmoty i odebraných kořenů jsou uvedeny v kapitole 4.2 a 4.3 společně pro všechny hodnocené experimenty.

4.2 Hodnocení nadzemní fytomasy

Před každou sečí byly ze všech parcel uvedených pokusů odebrány vzorky nadzemní hmoty z 0,5 m řádku. U odebraných vzorků byly stanoveny následující parametry:

- počet lodyh na m² (stem density, **SD**)

- délka nejdelší lodyhy (maximal stem length, **MSL**)

U porostu byl dále stanoven:

- stlačená výška porostu pomocí talířového měřidla RPM (compressed height, **CH**) v šesti měřeních na parcele (viz Obr. 5)
- výnos sušiny v t.ha⁻¹ (dry matter yield, **DMY**)

Pro výpočet výnosu sušiny z parcely byla použita hmotnost čerstvé píče z parcely a průměrná hodnota sušiny z varianty. Výnosy z jednotlivých sečí byly sečteny pro stanovení celkového ročního výnosu sušiny.

4.3 Hodnocení podzemní fytomasy

Na podzim každého roku byly odebrány vzorky kořenů z hloubky do 25 cm, vždy z 0,25 až 1,0 m délky v jednom řádku. Odběrová plocha v čase narůstala z důvodu přirozeného poklesu počtu rostlin na jednotku plochy (termíny viz Tab.1). U odebraných vzorků byly následně sledovány dále uvedené parametry týkající se hustoty porostu, morfologie kořenů a jejich zdravotního stavu:

- hustota porostu (plant density, **PD**) – počet rostlin na m²
- průměr hlavního kořene (tap-root diameter, **TD**) - nůžkami byla odstříhnuta nadzemní část rostliny pod kořenovým krčkem a posuvným měřidlem změřen průměr hlavního kořene u každé rostliny (uváděno v mm)
- počet větví hlavního kořene (lateral root numer, **LRN**) – byl určen počet větví (o průměru 1 mm a více) na hlavním kořeni. Hodnota je uváděna v ks na hlavní kořen u rostlin s rozvětveným hlavním kořenem
- podíl rostlin s rozvětveným hlavním kořenem (ratio of branch-rooted, **RB**) - % větvících kořenů ve vzorku
- délka kořene – průměrná délka kořene ve vzorku (v cm), bylo použito jako pomocný parametr ve vztahu k hmotnosti kořenů na vzorek
- kořenové vlášení (fibrous root mass, **FRM**) – intenzita tvorby laterálních kořenů s průměrem pod 1 mm (odhadnuto subjektivně na stupnici 1–5, kde 1 je absence a 5 je silná tvorba FRM)
- hmotnost kořene (root dry matter, **RDM**) – vzorky kořenů byly vyprány, usušeny při teplotě 60 °C do konstantní hmotnosti a hmotnost byla přepočtena na plochu (g.m⁻²)
- Index potenciálu kořenů (root potential index, **RPI**) – celková plocha řezu kořenového krčku na jednotku plochy (cm².m⁻²).
 - Výpočet dle Hakla et al. (2017): $RPI (cm^2.m^{-2}) = [(TD/2)^2 \times \pi \times PD]/100$
- Index potenciálu kořenů korigovaný (root potential index corrected, **RPI cor**) – Index potenciálu kořenů korigovaný o oblasti napadení kořene podle průměrného stupně napadení kořene
- stupeň napadení chorobami kořene a kořenového krčku z příčného řezu kořene (plant root disease score, **PRDS**) hodnocené dle metodiky práce Hakla et al. (2017) u všech rostlin dle následující stupnice: 0 = zdravá, žádné změny zbarvení na řezu kořene, 1–6 = napadené rostliny s rostoucí úrovní poškození kořene, 7 = odumřelá rostlina
- podíl nemocných rostlin (infestation percentage **IP**) – procentuální vyjádření podílu nemocných rostlin.

4.4 Laboratorní metody qPCR

Během vegetace byly odebírány vzorky fytohmoty (listy a lodyhy) těsně před sečí a následně do deseti dní po aplikaci přípravku. Odběry probíhaly ze středu každé parcely. Kořeny pro shodné analýzy byly odebírány na podzim, odděleně od vzorků na hodnocení morfologie a zdravotního stavu. Ošetřované varianty byly odebrány ve dvou opakováních, kontrola v jednom opakování byla odebrána do oddělené vzorkovnice a samostatnými nůžkami, tak aby nedocházelo k možné kontaminaci s ošetřovanými variantami. Kontrola byla odebírána pouze v roce 2018, pro upřesnění metodických postupů. Vzorky byly uloženy v čajových sáčkích a z pokusů byly přepravovány v lednici. Po příjezdu do laboratoře byly vzorky ihned zmrazeny na -89 °C. Vzorky byly následně lyofilizovány při nízkém tlaku a teplotě v přístroji L4-55 a následně vloženy do vzorkovnic se silikagelem, aby nedocházelo ke zpětnému jímání vzdušné vlhkosti. Analýzy vzorků byly uskutečněny v laboratoři firmy Biopreparáty v Úhercích.

Metoda qPCR (real time polymerase chain reaction) je založena na podobném principu jako PCR (polymerase chain reaction) s tím rozdílem, že je využit speciální cycler, který kontinuálně zaznamenává množství určité DNA. Tato detekce je založena na fluorescenci substrátu až po navázání na DNA. Lze říct, že čím více vzorek emituje záření, tím více cílové DNA se v něm nachází. Nutno podotknout, že se zde musí počítat i s určitou efektivitou samotné PCR reakce, jelikož primery, které zajišťují rozmnožování konkrétního úseku DNA, nefungují vždy stoprocentně. Nakonec se výsledek odečte z kalibrační křivky. Jako substrát se nejčastěji používá CyberGreen, jelikož se váže nespecificky (Diguita et al. 2010).

Vzorky byly analyzovány v triplikátu, veškeré vzorky, negativní i pozitivní kontroly a standardy se tedy analyzovaly ve třech nezávislých PCR reakcích. Standardy byly dodány tvůrcem původního kitu na detekci *Pythium oligandrum* firmou Generi Biotech Hradec Králové. Jako negativní kontrola byla použita voda z mixeru po zpracování všech vzorků. Jde o dva po sobě jdoucí výplachy standardním způsobem použitým během stanovení. Jako pozitivní kontrola byl použit Ecosin, který byl velmi zředěný rozmixovaný do litru vody, a ještě stokrát ředěný, přesto poskytl bez problémů signál.

V laboratoři v Úhercích bylo na základě dostupných standardů kvantifikováno *Pythium oligandrum* a spektrum fytopatogenů (*Coletotrichum spp.*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinium spp.*, *Verticilium dahliae* a *Verticilium albo-atrum*).

4.5 Statistické analýzy

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny analýzou rozptylu (ANOVA) a následně Tukeyho post-hoc testem, zpracovány do tabulek samostatně pro každé stanoviště. Varianty ošetření byly vždy porovnávány v každém roce samostatně, z důvodu velkých meziročních rozdílů u řady hodnocených parametrů. V parametrech týkající se kořenové morfologie byla využita ANOVA s kovariátou, která brala v úvahu také vliv hustoty porostu.

5 Výsledky

V Tabulkách 2 až 3 jsou u podzemní fytomasy prezentovány vybrané parametry kořenové morfologie a zdravotní stav kořenů, u nadzemní fytomasy je uváděna stlačená výška porostu, výnos sušiny a procentický podíl výnosu oproti kontrole.

5.1 Větrov 1

U jetele lučního na stanovišti Větrov 1 (viz Tab. 2.) byl průkazný efekt přípravku Polyversum na výskyt kořenových onemocnění zaznamenán pouze v posledním roce experimentu, kdy byl zjištěn významně nižší stupeň napadení kořenů u rostlin ošetřených přípravkem Polyversum (4,58) oproti neošetřené kontrole (4,94). V druhém užitkovém roce rostliny na variantě s intenzivním ošetřením přípravkem Polyversum vykazovaly větší průměr kořenového krčku (+ 4 %), rozvětvení kořene (+ 27 %), výšky porostu (+ 13 %) a výnos (+ 18 %) ve srovnání s kontrolou. Obě intenzity ošetření přípravkem Polyversum v roce 2018 významně snižovaly PRDS v průměru o 8 %, ale průkazně vyšší výnos poskytla pouze intenzivní varianta. Nebyl zaznamenán žádný vliv přípravků na hustotu lodyh na m² a to v žádném roce.

5.2 Větrov 2

V pokusu s jetelem lučním na stanovišti Větrov 2 (viz Tab. 3.) došlo v roce založení experimentu ke statisticky významnému rozdílu mezi podíly napadených kořenů i průměrného stupně napadení. Nejnižší podíl nemocných kořenů a PRDS byl zaznamenán u varianty PO2 (15,5 % resp. 0,70), zatímco nejvyšší hodnoty vykázala varianta kontrola (41,2 % nemocných kořenů a 2,00 PRDS). Nutno poukázat na variantu Prosaro, u které byl také zaznamenán nízký podíl nemocných rostlin a PRDS (20,4 % resp. 0,72) a oba parametry se statisticky nelišily od varianty PO2. U varianty PO3 byl 2,5násobně vyšší podíl napadených kořenů oproti variantě PO2. Podobně jako na předchozí lokalitě byl také pozitivní trend ošetření Polyversem v parametru větvení kořenů. Přípravek Prosaro naopak jako by inhiboval rozvoj laterálních kořenů a kořenového vlášení.

V roce 2019 nebyl zjištěn statisticky průkazný vyšší výnos u variant ošetřených přípravkem Polyversum, avšak trend vyšších výnosů u ošetřovaných variant zde je, a to dokonce i na variantě ošetřované Prosarem. Byla zaznamenána průkazně vyšší průměrná výška porostu (CH) před sklizní u varianty PO3 (31 cm) oproti neošetřené kontrole a PO1 (28 cm), což koresponduje s (neprůkazným) navýšením výnosu u varianty PO3 o 19 % oproti kontrole. Nejvyšší výška byla pak zaznamenána na variantě Prosaro. Z Tab. 3. lze dále zjistit, že došlo k pozitivnímu působení ošetření PO2 na PRDS v porovnání s ostatními variantami. Průměr hlavního kořene byl statisticky nejmenší u varianty PO3 (6,41 cm). Varianta PO2 si zachovala do roku 2019 statisticky nejnižší PRDS a neprůkazně nižší podíl nemocných kořenů (IP) oproti variantě kontrola. Byl rovněž zaznamenán průkazný vliv přípravku na hustotu porostu (PD), kdy se od kontroly statisticky lišily všechny varianty, nejvyšší hustotu porostu měla varianta PO3 (420 rostlin na m²).

5.2.1 Výskyt mikroorganismů v kořenech

Detekce mikroorganismu *Pythium oligandrum* v nadzemních částech jetelovin vykazala v roce 2018 nekonzistentní výsledky, a proto dále nejsou uváděny. V podzemní biomase byl v roce 2018 u jetele lučního pozitivní záchyt těchto fytopatogenních hub: *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* and *F. solani*. Zastoupení pozitivních záchytů patogenů bylo u neošetřené kontroly 75 %, u PO1 63 % a u PO2 38 %. Organismy rodu *Sclerotinia* a *Colletotrichum* nebyly ve vzorcích detekovány.

Výsledky z roku 2019 jsou zaznamenány v Grafu 2. *Verticilium dahliae* nebylo zjištěno v žádném vzorku. *Pythium oligandrum* bylo zjištěno ve všech vzorcích v obou odběrech. Největší spektrum patogenů pak vykazovaly ošetřované varianty, především pak varianta Prosaro (CH) a PO3.

5.3 Ekonomika ošetřování

V ekonomice pěstování víceletých pícnin na orné půdě je rozhodující cena vypěstované píce a náklady na její produkci. V Grafu 3 a 4 je uvedeno porovnání rentability ošetření podle jednotlivých stanovišť a roků, při použití velkoobchodní ceny přípravku Polyversum 720 Kč/ha (rok 2018), průměrné cena služeb za postřikování 300 Kč/ha a při ceně 3000 Kč/ 1t sušiny píce. Při zhodnocení ekonomické návratnosti jetele lučního vychází nejrentabilněji ve 2. užitkovém roce na stanovišti Větrov 1 intenzivně ošetřovaná varianta (PO3) s ekonomickým přínosem 2882 Kč na ha, základní podzimní aplikace měla přínos 781 Kč na ha. V prvních dvou letech experimentu nedošlo k významným rozdílům ve výnosech, takže ekonomický přínos zde nebyl zaznamenán. Na stanovišti Větrov 2 se ekonomicky pozitivně projevila podzimní aplikace přípravku již v prvním užitkovém roce s přínosem 1681 Kč na ha.

6 Diskuse

6.1 Vliv ošetření na zdravotní stav

Výsledky pokusu (Větrov 1) dokládají, že pozitivní působení přípravku Polyversum u jetele ve druhém užitkovém roce bylo více závislé na stimulačních efektech na podzemní (průměr hlavního kořene, větvení kořenů) i nadzemní části rostlin (výška porostu, výnos), než na snížení stupně napadení kořenů, ačkoliv u parameru PRDS byl v posledním roce zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a variantami ošetřenými přípravkem Polyversum. Nižší podíl napadených kořenů (IP) v roce 2018, nižší PRDS v obou letech u varianty PO2 oproti kontrole (Větrov 2) a nižší PRDS v roce 2018 u variant ošetřovaných přípravkem Polyversum plně koresponduje s výsledky řady dalších autorů o snížení napadení i u jiných plodin, například výsledky Kurzawińskiej & Stanisława (2008) ukazují nižší procento infikovaných hlíz a nižší stupeň napadení hlíz brambor (*Solanum tuberosum*). Ošetřování přípravkem Prosaro se rovněž ukázalo jako účinné, jelikož PRDS v roce 2018 byl statisticky podobný jako u varianty PO2. V roce založení pokusu Větrov 2 měla aplikace Polyversa na podzim srovnatelný vliv na zdravotní stav jako aplikace Prosara, což souhlasí s výsledky Larkina et al. (1995), který v nádobových pokusech potvrzuje, že při injektáži fungicidů do půdy se prokazatelně zvyšuje odolnost vůči půdním patogenům nebo s výsledky Rekanovice et al. (2007), kteří referují o vyšší účinnosti chemického ošetřování oproti tomu biologickému.

6.2 Vliv ošetření na podzemní a nadzemní biomasu

V letech 2017 a 2018 došlo v porostu jetele lučního (Větrov 1) ke stagnaci vývoje TD (8,9 mm vs. 9,1 mm) při vysokém poklesu PD (377 vs. 203 rostlin), což je výrazný rozdíl oproti publikovanému kontinuálnímu nárůstu TD u vojtěšky v průměru o 3 mm ročně (Hakl et al. 2017; Hakl et al. 2018). Zdá se, že jetel luční oproti vojtěšce nemohl kompenzovat pokles PD v průběhu času zvýšením TD a větvením kořene. I přes neprůkazný výnosový rozdíl na pokuse Větrov 2 v roce 2019 byla zaznamenána průkazně vyšší průměrná výška porostu před sklizní u varianty Prosaro oproti neošetřené kontrole a PO1, což koresponduje s (neprůkazným) navýšením výnosu u varianty Prosaro oproti kontrole. V Tabulce 2 je vidět vztah mezi stlačenou výškou a DMY na pokuse Větrov 1 v roce 2018, kde jsou rozdíly mezi intenzivně ošetřovanou variantou (PO3) a kontrolou průkazné. Uvedené je v souladu s výsledky o pozitivní korelaci mezi stlačenou výškou porostu a výnosy u vojtěšky (Hakl et al. 2012).

Průměr hlavního kořene u varianty PO3 na pokuse Větrov 2 v roce 2019 byl statisticky nejnižší v souladu s nejvyšší zaznamenanou hustotou porostu, neboť hustota porostu je v negativní korelaci s TD jak u vojtěšky (Hakl et al. 2017), tak i u jetele lučního (Pisarčík et al. 2020). Lze se do značné míry domnívat, že aplikace na variantě PO3 snižovala mortalitu rostlin jetele, přičemž vyšší hustota porostů u ošetřovaných variant bude mít pozitivní vliv na výnosy suché píče v následujícím roce a na vytrvalost porostů.

Při pohledu na Tabulku 3 (Větrov 2) lze poukázat na fakt, že IP do jisté míry souvisí s průměrnou výškou porostů a výnosy u jednotlivých variant, což je zde v kontrastu s pokusem na lokalitě Větrov 1, kdy byly průměrný výnos suché hmoty a stlačená výška ovlivněny spíše stimulačním efektem přípravku než fungicidním efektem. Vyšší variabilita dat mezi 4

opakováními u výnosů sice neposkytla průkazné výnosové rozdíly mezi variantami, ale průkazné hodnoty výšky porostu spolu s vyššími průměry výnosů na variantách PO2 a PO3 ukazují na potenciál zvýšení výnosů u těchto termínů ošetření. Zajímavostí je také fakt, že zatímco u neošetřovaných variantách na obou pokusech má LRN poměrně progresivní růst v čase z prvního do druhého roku, na ošetřovaných variantách k takovému progresivnímu větvení nedochází (Větrov 2), či dokonce klesá počet vedlejších kořenů (Větrov 1). Z výsledků je patrné, že přípravek nepůsobí ve všech letech a na všech lokalitách stejně. Proto je potřeba aplikaci přizpůsobit půdně-klimatickým podmínkám stanoviště a také momentálnímu stavu počasí (především vlhkosti v porostu). Na výsledcích z tohoto experimentu lze demonstrovat, že ošetření tímto přípravkem mělo smysl i ve srážkově podprůměrných letech. Tento fakt je závažný především v případě, uvědomíme-li si, že houbám podobné organismy, jakým je i *P. oligandrum* prosperují jen ve vlhkých podmínkách. Uvedené je v rozporu s Boček et al. (2013), kteří si vysvětlují vyšší účinnost přípravku Polyversum v roce 2011, kdy bylo vlhké jaro oproti roku 2012, kdy bylo suché počasí. Lze tedy shrnout, že pro aplikaci přípravku musí být příznivé vlhkostní podmínky (aplikace na suchou půdu není efektivní), ale i další průběh povětrnosti musí být příznivý pro rozvoj patogenů, aby se mohl projevit pozitivní efekt ošetření. Pro vyvolání stimulačního efektu na růst rostlin není přítomnost patogenů rozhodující, ale příznivé počasí musí umožnit rostlinám využití stimulačního efektu.

6.3 Výskyt mikroorganismů v pletivech kořenů

Při pohledu na Graf 2 si lze všimnout, že organismus *Pythium oligandrum* se nenachází pouze ve variantách ošetřovaných přípravkem Polyversum, což je dané tím, že *Pythium oligandrum* je volně se vyskytující organismus, se kterým se setkáme ve všech půdách (Drechsler 1946).

Z patogenů, které byly zjišťovány se jako nejčastěji se vyskytující projevilo *Verticillium albo-atrum*, u kterého byla zaznamenána nejnižší četnost výskytu na variantě kontrola, což není v souladu s řadou jiných publikací, které dokazují účinnost přípravku Polyversum na výskyt *Verticilia* (Rekanovic et al. 2007).

6.4 Doporučení pro praxi a ekonomika ošetřování

Na základě současných výsledků lze první ošetření prozatím doporučit až na podzim v prvním užitkovém roce a následně opakovat aplikaci vždy minimálně na podzim jako tzv. základní ošetření. V druhém užitkovém roce lze zvážit i variantu intenzivního ošetření přípravkem, která může přinést výrazný ekonomický efekt. Zůstává rovněž otázkou, zda se bude opakovat situace jako v roce 2018, kdy se objemná krmiva stala velmi nedostatkovou komoditou a tržní cena sena a senáže vzrostla až na trojnásobek. Tato situace výrazně ovlivnila rentabilitu pěstování pícnin, a tudíž by i výrazně ovlivnila výsledný ekonomický efekt potenciálních aplikací. Dlouhodobé predikce klimatických změn spíše potvrzují fakt globálního oteplování a jiného rozložení srážek bez ohledu na to, zda za tímto oteplováním stojí člověk či nikoli. Za těchto podmínek by pak volba aplikace podobných přípravků mohla být do budoucna tou „trvale udržitelnou cestou,“ jak dosáhnout kvalitních výnosů píce a také ekonomické rentability při pěstování víceletých pícnin.

6.5 Ekologické aspekty ošetřování přípravkem Polyversum

I v souvislosti s využíváním biologické ochrany rostlin také existují určitá rizika, která nejsou ještě zcela probádána, a je třeba na ně upozornit. Brimmer & Boland (2003) poukazují na to, že organismus, který se zdá být schopen ovládat chorobu rostliny bez poškození hostitelské rostliny, může představovat riziko pro jiné organismy ve stejném cílovém prostředí. Interakce mezi mykoparazitickými houbami a ostatními organismy v prostředí se velmi obtížně testuje. Stále jsou neznámé patogenní vztahy s necílovými houbami, bakteriemi, rostlinami nebo živočichy. Biologická ochrana je uváděna jako „přírodní“ a „s nízkým rizikem,“ bývá často osvobozena od důkladného testování požadované pro chemické přípravky na ochranu rostlin. To vyplývá i ze studie Gerbore et al. (2014), kde se upozorňuje na to, že velkou neznámou je dopad dlouhodobé biologické ochrany na životní prostředí.

Tyto rizika se samozřejmě můžou týkat také organismu *Pythium oligandrum*, který se potenciálně stává konkurentem bakterií a hub. Byl například pozorován vliv *Pythium oligandrum* na pěstování pečárky dvouvýtrusné (*Agaricus bisporus*), avšak retardace a následné plné obnovení růstu této plodiny vedlo k domněnce, že vliv organismu *P. oligandrum* je přechodný (Fletcher et al. 1990). Lze se domnívat, že pokud nějaká rizika ohledně *P. oligandrum* v souvislosti s konkurencí s necílovými organismy existují, pak by to mohl být potenciální vliv na organismy podporující tvorbu siláží, anebo s organismy žijícími v batoru. Nicméně je nutné připomenout, že se jedná o volně žijící organismus a pokud nějaká rizika existují, tak jsou minimální. Je zapotřebí také shrnout negativní působení přípravku, a sice, že varianty nejintenzivněji ošetřované měly v některých letech horší některé výnosotvorné parametry oproti jednou ošetřovaným variantám, viz nižší výnos na lokalitě Větrov 1 v roce založení u PO2 = 7,21 t. ha⁻¹ oproti PO3 = 6,76 t. ha⁻¹ s p = 0,058. Zmíněný trend je celkem pochopitelný a v rámci starého českého pořekadla „všeho moc škodí,“ se můžeme dočíst mnoha příkladů negativního vlivu nadměrného používání podobných přípravků, jako například Hayat et al (2016) referují o allicinu (silice v česneku) jako o látce s antifungicidním účinkem a také jako o látce s fyto toxickým účinkem. Podle nich je nejdůležitější správná dávka. Nadměrné používání Polyversa mohlo v tomto případě vést ke kompetici o zdroje s ostatními symbionty, kteří se řadí mezi mykorhizní organismy. Brimmer & Boland (2003) totiž uvádí, že vlivem produkce oligandrinu organismem *P. oligandrum* se může hostitelské pletivo stát nedostupné pro jiné mykorhizní houby. Tato potenciální vysvětlení jsou v souladu s publikovanými negativními dopady častých aplikací Polyversa na výnos píce a kořenový systém při pěstování vojtěšky seté (Pisarčík et al. 2019a; Pisarčík et al. 2019b).

7 Závěr

1. Aplikace přípravku Polyversum měla prokazatelně pozitivní vliv na snížení stupně napadení kořenů u ošetřovaných variant, i když tento efekt nebyl konzistentní ve všech letech.
2. Aplikace přípravku Polyversum měla vliv na vyšší větvení kořenů a většího podílu větvících kořenů u ošetřovaných variant.
3. Přípravek ukázal potenciál pro zvýšení výšky porostu a výnosu spíše formou stimulace rostlin než přímé ochrany proti patogenům. Tyto efekty se projevily především při podzimní aplikaci či intenzivním sledu aplikací po každé seči.
4. Aplikace přípravkem Polyversum vykazala v některých produkčních letech významný pozitivní ekonomický efekt, ale vzhledem ke komplikovanému doporučení optimálního načasování aplikace během vegetace a nepravidelným výnosovým efektům, lze zatím z ekonomického pohledu pro rok výsevu a první užitkový rok doporučit pouze pravidelnou podzimní aplikaci a intenzivní ošetřování volit případně až pro druhý užitkový rok.

8 Literatura

Benhamou, N, Rey P, Chérif M, Hockenhull J, Tirilly Y. 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* **87(1)**: 108-122.

Benhamou N, Bélanger RR, Rey P, Tirilly Y. 2001. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39(7-8)**: 681-696.

Boček S, Salaš P, Sasková H, Mokričková J. 2013. Effect of Alginure® (seaweed extract), Myco-Sin® VIN (sulfuric clay) and Polyversum® (*Pythium oligandrum* Drechs.) on yield and disease control in organic strawberries. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **60**: 19-28.

Bradshaw-Smith RP, Whalley WM, Craig GD. 1991. Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal footrot pathogens of peas. *Mycol. Res* **95**: 861-865.

Brimmer TA, Boland GJ. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 3-16.

Brožová J. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science* **38(1)**: 29-35.

Daraignes L, Gerbore J, Yacoub A, Dubois L, Romand C, Zekri O, Fermaud M. 2018. Efficacy of *P. oligandrum* affected by its association with bacterial BCAs and rootstock effect in controlling grapevine trunk diseases. *Biological Control* **119**: 59-67.

Diguita CF, Rousseaux S, Weidmann S, Bretin N, Vincent B, Guilloux-Banatier M, Alexandre H. 2010. Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS microbiology letters* **313(1)**: 81-87.

Drechsler C. 1946. Several species of *Pythium peculiar* in their sexual development. *Phytopathology* **36**: 781-864.

Elad Y, Freeman S. 2002. Biological control of fungal plant pathogens. *Agricultural Applications*. 93-109.

Eriksson, J. 1880. Om Klöfverroten med särskilt afsseende på dess uppträdande ivart fädernesland 1878-1879. *Akad. Handl. ach. Tidsskr.* **1**: 28-42.

Fergus EN, Hollowell EA. 1960. Red clover. *Advances in Agronomy* **12**: 365-436.

Fisher DJ, Hayes AL, Jones CA. 1978. Effects of some surfactant fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. *Annals of Applied Biology* **90(1)**: 73-84.

Fisher DJ. 1976. Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. *Pesticide Science* **7(1)**: 10-18.

Fletcher JT, Smewin BJ, O'Brien A. 1990. *Pythium oligandrum* associated with a cropping disorder of *Agaricus bisporus*. *Plant Pathology* **39**: 603-605.

Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research* **21(7)**: 4847-4860.

Hakl J, Hrevušová Z, Hejcman M, Fuksa P. 2012. The use of a rising plate meter to evaluate lucerne (*Medicago sativa* L.) height as an important agronomic trait enabling yield estimation. *Grass and Forage Science* **67**: 589-596.

Hakl J, Pisarčík M, Fuksa P, Šantrůček J. 2018. Development of lucerne root morphology traits in lucerne-grass mixture in relation to forage yield and root disease score. *Field Crops Research* **226**: 66-73.

Hakl J, Pisarčík M, Hrevušová Z, Šantrůček J. 2017. In-field lucerne root morphology traits over time in relation to forage yield, plant density, and root disease under two cutting managements. *Field Crops Research* **213**: 109-117.

Hanson, E. W., Kreitlow, K. W. 1953. The many ailments of clover. Pages 217-228 in US. Dept. of Agric. Yearbook. Office editors. Plant Diseases, United States Government Printing. Washington D. C.

Hayat S, Cheng Z, Ahmad H, Ali M, Chen X, Wang, M. 2016. Garlic, from remedy to stimulant: evaluation of antifungal potential reveals diversity in phytoalexin alliin content among garlic cultivars; alliin containing aqueous garlic extracts trigger antioxidants in cucumber. *Frontiers in plant science* **7**: 1235.

Hejduk S, Knot P. 2010. Effect of provenance and ploidity of red clover varieties on productivity, persistence and growth pattern in mixture with grasses. *Plant, Soil and Environment* **56(3)**: 111-119.

Hejduk S. 2015. Effect of cutting frequency of four red clover cultivars on forage yield and persistence. *Grassland Science in Europe* **20**: 230-232.

Hibar K, Daami-Remadi M, Hamada W, El-Mahjoub M. 2006. Bio-fungicides as an alternative for tomato *Fusarium* crown and root rot control. *Tunis. J. Plant Prot* **1, 19**: 19-29.

Holmes KA, Nayagam SD, Craig, GD. 1998. Factors affecting the control of *Pythium ultimum* damping-off of sugar beet by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathol* **47**: 516-522.

Hýsek J, Vach M, Javůrek M. 2008. Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 24 p. ISBN 978-80-87011-56-0.

Chilton SJP, Henson L, Johnson HW. 1943. Fungi reported on species of *Medicago*, *Melilotus*, and *Trifolium*. United States Department of Agriculture, Washington D.C.

Ikeda S, Shimizu A, Shimizu M, Takahashi H, Takenaka S. 2012. Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*. *Biol. Control* **60**: 297-304.

Jacob I, Hartmann S, Schubiger FX, Struck C. 2015. Resistance screening of red clover cultivars to *Colletotrichum trifolii* and improving the resistance level through recurrent selection. *Euphytica* **204(2)**: 303-310.

Jenkyn JF. 1975. The effect of benomyl sprays on *Sclerotinia trifoliorum* and yield of red clover. *Annals of Applied Biology* **81(3)**: 419-423.

Jensen HL. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proc. Linnean Soc. N.S.W.* **67**: 98-108.

Klimenko I, Razgulayeva N, Gau M, Okumura K, Nakaya A, Tabata S, Kozlov NN, Isobe S. 2010. Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover. *Theoretical and applied genetics* **120(6)**: 1253-1263.

Köhl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M, Blum B. 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control* **57(1)**: 1-12.

Kowalska J, Zbytek Z. 2015. Microbiological dressing of spring barley seeds as a method of improvement in plant development. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* **60(4)**: 9 -12.

Kubát K. 2002. Klíč ke květeně České republiky. Academia. Praha.

Kulovaná E. 2002. Historie a současnost českého šlechtění jetele lučního. *Úroda* **23.5. 2002**.

Larkin RP, English JT, Mihail JD. 1995. Effects of infection by *Pythium* spp. on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology* **85(4)**: 430-435.

Larkin RR, English JT, Mihail JD. 1996. The relationship of infection by *Pythium* spp. to root system morphology of alfalfa seedlings in the field. *Plant Dis.* **80**: 281-285.

Lawes JB, Gilbert JH, Evan, P. 1860. On the source of the nitrogen; with special reference to the question whether plants assimilate free or uncombined nitrogen. *Proc R Soc Lond* **10**: 544-557.

Lawes JB, Gilbert JH. 1880. Agricultural, botanical, and chemical results of experiments on the mixed herbage of permanent meadow, conducted for more than twenty years in succession on the same land. Part I. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **171**: 289-416.

Le Floch G, Tambong J, Vallance J, Tirilly Y, Lévesque A, Rey P. 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS microbiology ecology* **61(2)**: 317-326.

Leath KT, Kendall WA. 1978. Fusarium root rot of forage species: pathogenicity and host range. *Phytopathology* **68**: 826-831.

Leath KT, Zeiders KE, Byers RA. 1973. Increased Yield and Persistence of Red Clover after a Soil Drench Application of Benomyl. *Agron. Journal* **65**: 1008-1010.

Lewis K, Whipps JM, Cooke RC. 1989. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. *Biotechnology of fungi for improving plant growth* **16**: 191.

Loveless AR. 1951. Observations on the biology of clover rot. *Annals of applied biology* **38(3)**: 642-663.

Mann HH. 1938. Investigations on clover sickness. *The Journal of Agricultural Science* **28(3)**: 437-455.

Marshall AH, Lowe M, Vale J. 2012. Improved persistence of red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties in mixed swards. *Grassland Science in Europe* **17**: 73-75.

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd. Edn. Academic Pres., New York.

Marten GC. 1989. Summary of the trilateral workshop on persistence of forage legumes. *Persistence of forage legumes (persistenceoffo)*. 569-572.

Mikaliuniene J, Lemežiene N, Danyte V, Suproniene S. 2015. Evaluation of red clover (*Trifolium pratense* L.) resistance to Sclerotinia crown and root rot (*Sclerotinia trifoliorum*) in the laboratory and field conditions. *Zemdirbyste-Agriculture*, **102(2)**: 167-176.

Monteith J. 1928. Clover anthracnose caused by *Colletotrichum trifolii*. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, WASHINGTON, D. C.

Nan ZB, Skipp RA, Long PG. 1991. Use of fungicides to assess the effects of root disease: effects of prochloraz on red clover and microbial populations in soil and roots. *Soil biology and biochemistry* **23(8)**: 743-750.

Nedělník J. 2008. Choroby píce. In: Metodická příručka ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům, I. Polní plodiny, ČSR Praha, 382-383.

Niewiadomska A. 2004. Effect of Carbendazim, Imazetapir and Thiram on Nitrogenase Activity, the Number of Microorganisms in Soil and Yield of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *Polish Journal of Environmental Studies* **13(4)**: 403-410.

Novosiolova A. 2002. Increasing of red clover resistance to disease and pests. *Clover in Russia* **126**.

Öhberg H, Bång U. 2010. Biological control of clover rot on red clover by *Coniothyrium minitans* under natural and controlled climatic conditions. *Biocontrol science and technology* **20(1)**: 25-36.

Öhberg H, Ruth P, Bång U. 2008. Differential responses of red clover cultivars to *Sclerotinia trifoliorum* under diverse natural climatic conditions. *Plant pathology* **57(3)**: 459-466.

Öhberg, H. 2008. Studies of the persistence of red clover cultivars in Sweden [doktorská práce]. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Agricultural Research for Northern Sweden Umeå. Umeå.

Pertot I, Alabouvette C, Hinarejos E, Franca S. 2015. Mini paper—the use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases. EIP-AGRI Focus Group Soil-borne diseases.

Rice WA, Penney DC, Nyborg M. 1977. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Canadian Journal of Soil Science* **57(2)**: 197-203.

Pisarčík M, Hakl J, Menšík L, Szabó O, Nerušil P. 2019a. Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality. *Plant, Soil and Environment* **65(10)**: 477-482.

Pisarčík M, Hakl J, Menšík L, Szabó O. 2019b. Využití přípravku Polyversum pro zvýšení vytrvalosti a výnosů porostů jetelovin. ČZU, Praha.

Pisarčík M, Hakl J, Hrevušová Z. 2020. Effect of *Pythium oligandrum* and poly-beta-hydroxy butyric acid application on root growth, forage yield and root diseases of red clover under field conditions. *Crop Protection* **127**: 104968.

Rekanovic E, Milijasevic S, Todorovic B, Potocnik I. 2007. Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium* wilt in pepper. *Phytoparasitica* **35(5)**: 436.

Riday H. 2010. Progress made in improving red clover (*Trifolium pratense* L.) through breeding. *International Journal of Plant Breeding* **4(1)**: 22-29.

Rao S, Stephen WP. 2009. Bumble bee pollinators in red clover seed production. *Crop Science* **49(6)**: 2207-2214.

Rinke EH, Johnson, IJ. 1941. Self-fertility in red clover in Minnesota. *Journal of the American Society of Agronomy*. 512-520.

Rufelt S. 1979. Clover rot cause, occurrence, causes and significance in Sweden (Klöverens rotröta, förekomst, orsaker och betydelse). Plant Protection Reports Agriculture (Sverige. Växtskyddsrapporter, Jordbruk) **9**: 43. (in finish).

Řepková J, Nedělník J. 2014. Modern methods for genetic improvement of *Trifolium pratense*. Czech journal of genetics and plant breeding **50(2)**: 92-99.

Sheldrick RD, Lavender RH, Tewson VJ. 1986. The effects of frequency of defoliation, date of first cut and heading date of a perennial ryegrass companion on the yield, quality and persistence of diploid and tetraploid broad red clover. Pages. Grass and forage science **41.2**: 137-149.

Sjödin J, Ellerström S. 1986. Autopolyploid forage crops.

Skipp RA, Christensen MJ, Biao NZ. 1986. Invasion of red clover (*Trifolium pratense*) roots by soilborne fungi. New Zealand journal of agricultural research, **29(2)**: 305-313.

Směrnice Evropského parlamentu a rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Úřední věstník Evropské unie. L 309. 71-86.

Steiner JJ, Alderman SC. 2003. Red clover seed production. Crop Science **43(2)**: 624-630.

Steiner JJ, Smith RR, Alderman SC. 1997. Red clover seed production: IV. Root rot resistance under forage and seed production systems. Crop science **37(4)**: 1278-1282.

Stoltz E, Wallenhammar AC. 2012. Micronutrients reduce root rot in red clover (*Trifolium pratense*). Journal of Plant Diseases and Protection **119(3)**: 92-99.

Stoltz E, Wallenhammar AC. 2018. Effects of Mn and Zn on root rot and biomass production in red clover (*Trifolium pratense* L.). Sustainable meat and milk production from grasslands **23**: 354-356.

Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. Biology and Fertility of Soils **25(1)**: 13-19.

Supranta DN. 2012. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences **18(2)**: 1-8.

Takenaka S, Nakamura Y, Kono T, Sekiguchi H, Masunaka A, Takahashi H. 2006. Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. Mol. Plant Pathol **7**: 325-339.

Takenaka S, Nishio Z, Nakamura Y. 2003. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Phytopathology **93(10)**: 1228-1232.

Taylor NL, Quesenberry KH. 1996. Red clover science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Taylor NL. 2008. A century of clover breeding developments in the United States. Crop Science **48(1)**: 1-13.

Taylor NL, Smith RR. 1980. Red clover breeding and genetics. Advances in Agronomy **31**: 125-154.

Tribe HT. 1957. On the parasitism of *Sclerotinia trifoliorum* by *Coniothyrium minitans*. Transactions of the British mycological society **40(4)**: 489-499.

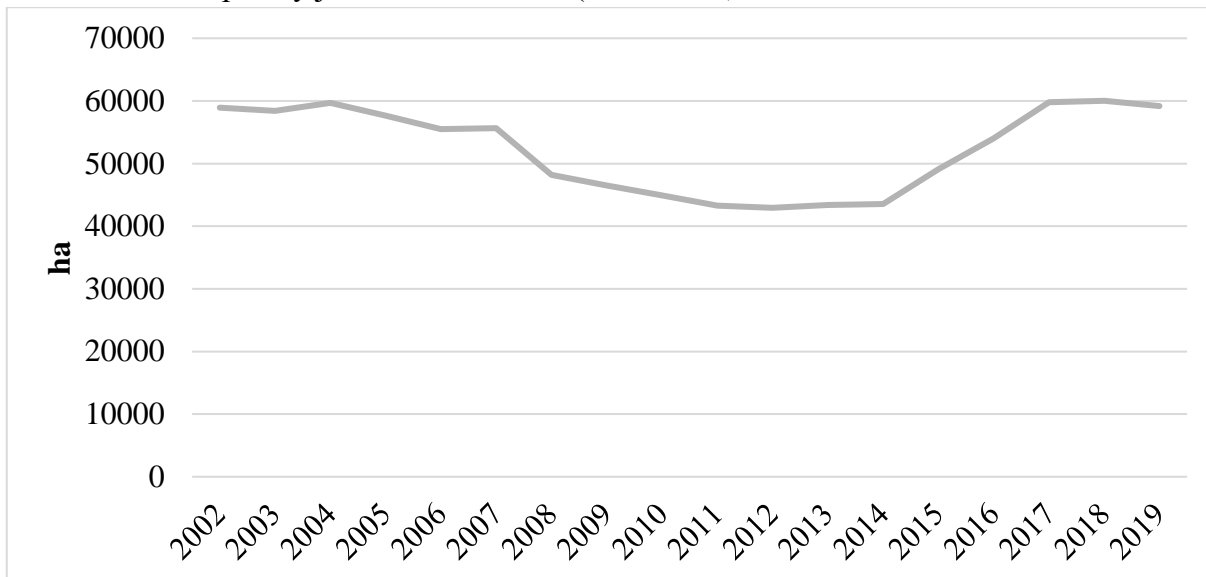
- Vacek V. 1963. Studium, udržování a využití světových sortimentů pícních rostlin. I. Planá flora. A. Čeleď motýlokvěté (*Papilionaceae*). Dílčí závěrečná zpráva, VSP Troubsko.
- Vallance J, Le Floch G, Déniel F, Barbier G, Lévesque CA, Rey P. 2009. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiology*: **75(14)**: 4790-4800.
- Vasiljevic S, Pataki I, Surlan-Momirovic G, Zivanovic T. 2005. Production potential and persistence of red clover varieties. Integrating Efficient Grassland Farming and Biodiversity. **20**: 577-580.
- Vestad R. 1960. The effect of induced autotetraploidy on resistance to clover rot (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.) in red clover. *Euphytica* **9(1)**: 35-38.
- Vleugels T., Baert J, Van Bockstaele E. 2013. Evaluation of a diverse red clover collection for clover rot resistance (*Sclerotinia trifoliorum*). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. **78(3)**: 519-522.
- Wallenhammar AC, Adolfsson E, Engström M, Henriksson M, Lundmark S, Roempke G, Ståhl P. 2006. Field surveys of Fusarium root rot in organic red clover leys. *Grassland Science in Europe* **11**: 369-371.
- Walsh UF, Moënné-Loccoz Y, Tichy HV, Gardner A, Corkery, DM, Lorkhe S, O'gara F. 2003. Residual impact of the biocontrol inoculant *Pseudomonas fluorescens* F113 on the resident population of rhizobia nodulating a red clover rotation crop. *Microbial ecology*, **45(2)**: 145-155.
- Watkin EL, O'Hara GW, Howieson JG, Glenn AR. 2000. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry* **32(10)**: 1393-1403.
- Weston WD, Loveless AR, Taylor RE. 1946. Clover rot. *The Journal of Agricultural Science* **36(1)**: 18-28.
- Yacoub A, Gerbore J, Magnin N, Haidar R, Compant S, Rey P. 2018. Transcriptional analysis of the interaction between the oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, and the roots of *Vitis vinifera* L. *Biological Control* **120**: 26-35.
- Yang C, Hamel C, Vujanovic V, Gan Y. 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology*. 2011.
- Yli-Mattila T, Kalko G, Hannukkala A, Paavanen-Huhtala S, Hakala K. 2010. Prevalence, species composition, genetic variation and pathogenicity of clover rot (*Sclerotinia trifoliorum*) and *Fusarium* spp. in red clover in Finland. *European journal of plant pathology* **126(1)**: 13.
- Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H. 2007. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225(4)**: 1031-1038.
- Young A, Morton JC. 1862. *Arthur Young's Farmer's Calendar: Describing the business necessary to be performed on various kinds of farms during every month in the year*. Routledge, Warne, and Routledge. London. 624 p.
- Selgen a.s. 2019. Technická doporučení: Jetel luční. Available from <https://selgen.cz/agrotechnicka-doporuceni-2/jetel-lucni/> (accessed January 2020).
- Vymyslicky T, Smarda P, Pelikan J, Cholastova T, Nedelnik J, Moravcova H, Polakova M. 2012. Evaluation of the Czech core collection of *Trifolium pratense*, including

morphological, molecular and phytopathological data. African Journal of Biotechnology, **11(15)**: 3583-3595.

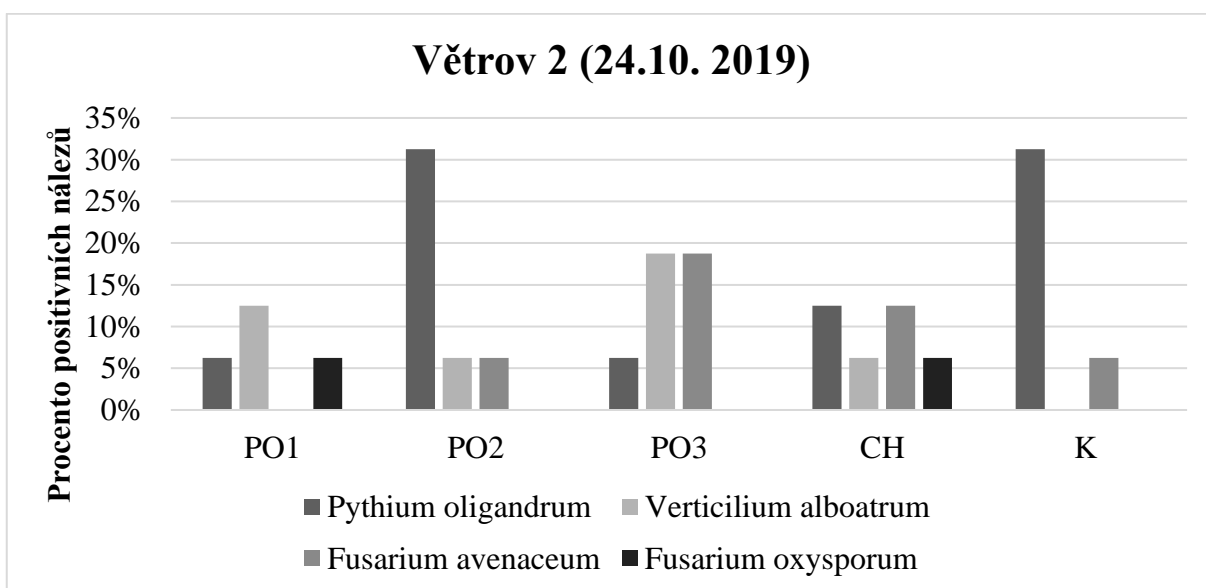
9 Samostatné přílohy

9.1 Grafy

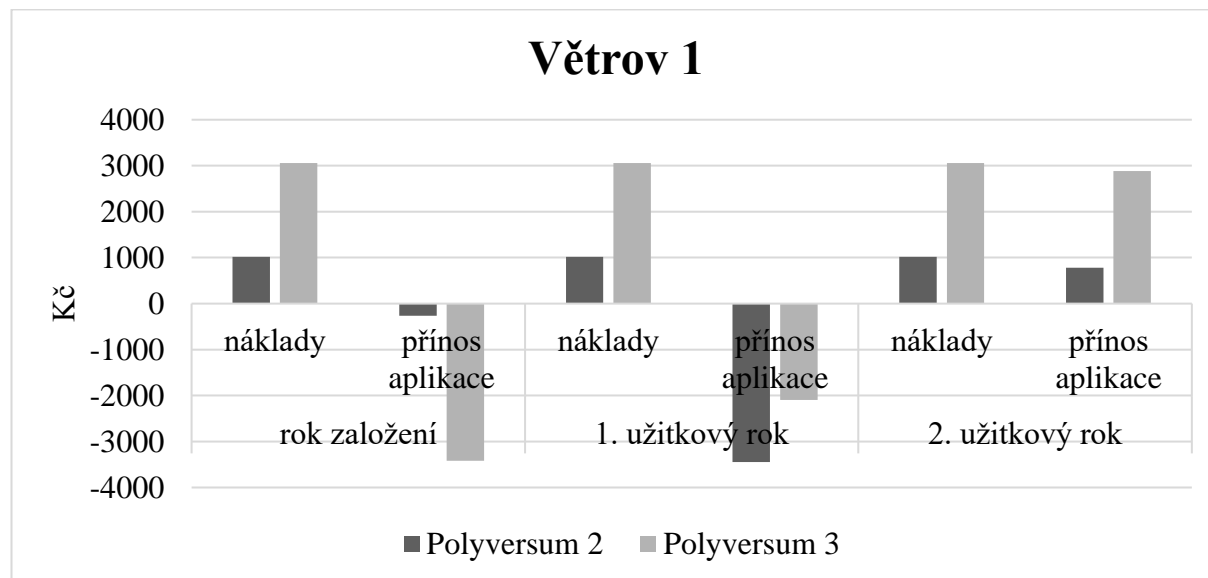
Graf 1: Pěstební plochy jetele lučního v ČR (ČSÚ, 2019)



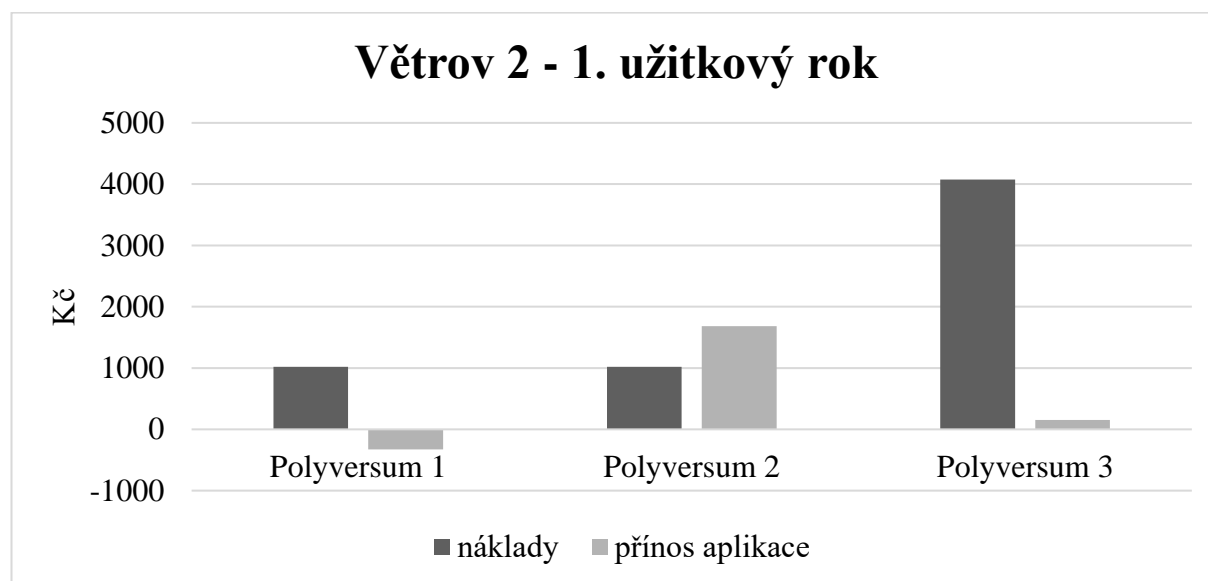
Graf 2: Detekce mikroorganismů ve fytomase kořenů



Graf 3: Ekonomické zhodnocení ošetřování přípravkem Polyversum (Polyversum 2 – ošetřování na podzim, Polyversum 3 – ošetřování po každé seči)



Graf 4: Ekonomické zhodnocení ošetřování přípravkem Polyversum (Polyversum 1 – ošetřování na jaře, Polyversum 2 – ošetřování na podzim, Polyversum 3 – ošetřování po každé seči)



9.2 Tabulky

Tabulka 1: Termíny aplikací přípravku, provedených sečí a odběrů kořenů dle jednotlivých lokalit.

		Větrov 1	Větrov 2
	Plodina	Jetel luční	Jetel luční
	Založení pokusu	4/2016	4/2018
2016	Polyversum 2 (PO2)	25.10.	-
	Polyversum 3 (PO3)	10.6., 16.8., 25.10	-
	Odběr kořenů	8.11.; 25 x 12,5 cm	-
	Termíny sečí	11.8.,18.10.	-
2017	Polyversum 2 (PO2)	12.9.	-
	Polyversum 3 (PO3)	16.6., 28.7., 12.9.	-
	Odběr kořenů	2.11.; 50 x 12,5 cm	-
	Termíny sečí	6.6., 18.7., 6.9.	-
2018	Polyversum 1 (PO1)	-	3.6.
	Polyversum 2 (PO2)	19.9.	19.9.
	Polyversum 3 (PO3)	3.6., 16.7., 19.9.	3.6. a 19.9.
	Prosaro	-	19.9.
	Odběr kořenů	2.10.; 100 x 12,5 cm	12.10.; 33 x 12,5 cm
	Termíny sečí	29.5., 16.7., 19.9.	10.6. a 28.8.
2019	Polyversum 1 (PO1)	-	6.4.
	Polyversum 2 (PO2)	-	13.9.
	Polyversum 3 (PO3)	6.4., 28.6., 30.7.	6.4., 28.6., 30.7., 13.9.
	Prosaro	-	13.9.
	Odběr kořenů	-	8.10.; 50 x 12,5 cm
	Termíny sečí	19.6., 30.7.	19.6., 30.7., 19.9.

Tabulka 2: Efekt aplikace přípravku Polyversum na stanovišti Větrov 1 v porostu jetele lučního na hustotu porostu (PD), průměr hlavního kořene (TD), podíl větví kořenů (RB), počet větví kořene (LRN), podíl nemocných kořenů (IP), stupeň napadení kořene (PRDS), výnos sušiny (DMY), stlačená výška porostu (CH), procentické porovnání výnosů oproti kontrole (%DMY). P: pravděpodobnost F-testu, třífaktorová ANOVA (varianta, odrůda, blok) s interakcí odrůda × varianta. Písmenné indexy vyjadřují rozdíly Tukey testu na hladině $\alpha = 0,05$.

Rok	Ošetření		PD	TD	RB	LRN	IP	PRDS	CH	DMY	%DMY
2016	Neošetřená kontrola		536	5,93	31,1 ^a	2,35	30,9	1,75	-	6,88	100
	Polyversum 2		532	5,75	44,9 ^b	3,04	23,6	1,88	-	7,21	105
	Polyversum 3		599	5,68	51,6 ^b	2,70	24,5	1,59	-	6,76	98
	<i>P</i>		0,672	0,069	0,021	0,272	0,371	0,733	-	0,058	-
2017	Neošetřená kontrola		350	8,67	56,4	2,44	79,0	3,07	46,3	17,45	100
	Polyversum 2		382	8,77	59,0	2,26	76,6	3,01	46,6	16,64	95
	Polyversum 3		397	8,77	53,4	2,24	74,9	2,98	46,7	17,77	102
	<i>P</i>		0,722	0,891	0,622	0,486	0,161	0,935	0,133	0,344	-
2018	Neošetřená kontrola		198	8,57 ^b	48,0 ^a	2,01	93,7	4,94 ^b	33,7 ^a	11,17 ^a	100
	Polyversum 2		202	9,44 ^a	55,0 ^{ab}	2,19	95,6	4,53 ^a	36,1 ^{ab}	11,77 ^{ab}	105
	Polyversum 3		222	8,93 ^a	61,0 ^b	2,34	94,9	4,63 ^a	38,1 ^b	13,15 ^b	118
	<i>P</i>		0,711	0,012	0,041	0,096	0,712	0,011	<0,001	0,029	-

Tabulka 3: Efekt aplikace přípravku Polyversum na stanovišti Větrov 2 v porostu jetele lučního na hustotu porostu (PD), průměr hlavního kořene (TD), podíl větvících kořenů (RB), počet větví kořene (LRN), podíl nemocných kořenů (IP), stupeň napadení kořene (PRDS), výnos sušiny (DMY), stlačená výška porostu (CH), procentické porovnání výnosů oproti kontrole (%DMY). P: pravděpodobnost F-testu, dvoufaktorová ANOVA (varianta, blok). Písmenné indexy vyjadřují rozdíly Tukey testu na hladině $\alpha = 0,05$.

Rok	Ošetření		PD	TD	RB	LRN	IP	PRDS	CH	DMY	%DMY
2018	Kontrola		268	3,34	7,16a	0,80	41,7 ^a	2,00 ^a	-	-	-
	Polyversum 1		404	3,75	20,17a	1,54	26,8 ^{ab}	1,59 ^{ab}	-	-	-
	Polyversum 2		509	3,95	20,08a	1,53	15,5 ^b	0,70 ^b	-	-	-
	Polyversum 3		299	3,94	16,74a	1,45	38,6 ^a	1,74 ^{ab}	-	-	-
	Prosaro		362	3,85	2,83a	1,39	20,4 ^{ab}	0,72 ^b	-	-	-
	<i>P</i>		0,322	0,064	0,026	0,266	<0,001	0,002	-	-	-
2019	Kontrola		208 ^a	7,66 ^a	56,86	3,27 ^a	94,1	4,45 ^{ab}	28,3 ^a	7,38	100
	Polyversum 1		338 ^b	7,56 ^a	48,78	2,15 ^{ab}	96,3	4,51 ^b	28,3 ^a	7,61	103
	Polyversum 2		281 ^c	7,32 ^a	40,50	1,97 ^b	91,1	2,89 ^c	29,6 ^{ab}	8,28	112
	Polyversum 3		420 ^d	6,41 ^b	34,48	1,73 ^b	87,1	3,55 ^{ac}	31,0 ^{ab}	8,79	119
	Prosaro		347 ^b	6,88 ^{ab}	47,12	2,76 ^a	88,5	3,43 ^{ac}	32,3 ^b	9,01	122
	<i>P</i>		<0,001	<0,001	0,073	0,046	0,185	<0,001	<0,001	0,853	

9.3 Obrázky

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	O1 (Odrůda Viola)	K1 (Odrůda Start)	K2 (Odrůda Callisto)	PO2 (Odrůda Start)	PO2 (Odrůda Callisto)	PO1 (Odrůda Start)	PO1 (Odrůda Callisto)	O2 PO2 (Odrůda Viola)
B	O1 PO2 (Odrůda Viola)	PO1 (Odrůda Start)	PO1 (Odrůda Callisto)	PO2 (Odrůda Start)	PO2 (Odrůda Callisto)	K1 (Odrůda Start)	K2 (Odrůda Callisto)	O2 (Odrůda Viola)
C	O1 (Odrůda Viola)	K1 (Odrůda Start)	K2 (Odrůda Callisto)	PO1 (Odrůda Start)	PO1 (Odrůda Callisto)	PO2 (Odrůda Start)	PO2 (Odrůda Callisto)	O2 PO2 (Odrůda Viola)
D	O1 PO2 (Odrůda Viola)	PO2 (Odrůda Start)	PO2 (Odrůda Callisto)	PO1 (Odrůda Start)	PO1 (Odrůda Callisto)	K1 (Odrůda Start)	K2 (Odrůda Callisto)	O2 (Odrůda Viola)

Obrázek 1: Design experimentu Větrov 1. Varianty jsou blíže popsány v Tab. 1.



Obrázek 2: Sklizeň porostu jetele lučního sklízecím strojem Haldrup dne 6. 6. 2017. (Autor: Martin Písařík)



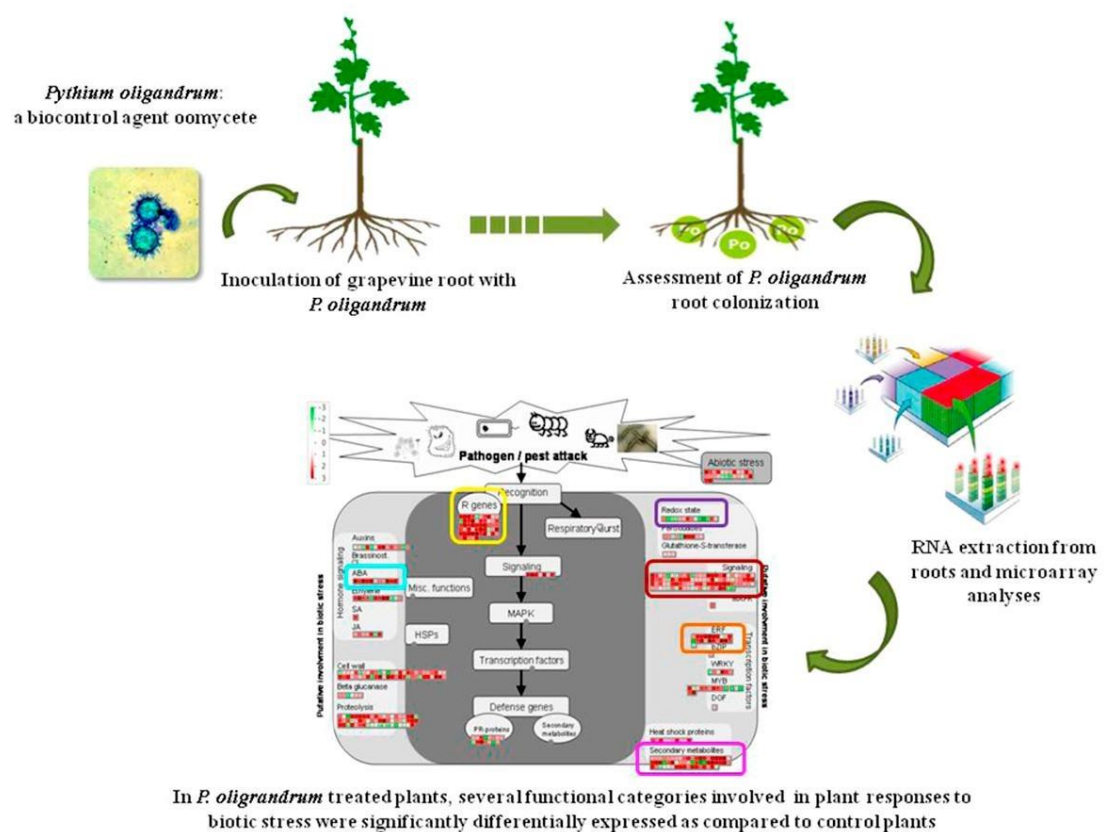
Obrázek 3: Stav porostu jetele lučního na stanovišti Větrov 2, 9.7. 2019. (Autor: Martin Písařík)

	1	2	3	4	5	6	7
A	O1	K	PO1	PO2	PO3	CH	O2
B	O1	CH	PO3	PO2	PO1	K	O2
C	O1	PO1	K	PO2	PO3	CH	O2
D	O1	CH	PO3	PO1	K	PO2	O2

Obrázek 4: Design experimentu Větrov 2. Varianty jsou blíže popsány v Tab. 1.



Obrázek 5: Měření výšky porostu pomocí talířového měřidla (RPM). (Autor: Josef Hakl)



Obrázek 6: Popis stimulačního efektu přípravku *Pythium oligandrum*. (Zdroj: Yacoub et al. (2018))