

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra agroekologie a rostlinné produkce**

**Využití biologických přípravků pro zvýšení vytrvalosti
a výnosů porostů jetelovin**

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Martin Písařčík

Školitel: doc. Ing. Josef Hák, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: „Využití biologických přípravků pro zvýšení vytrvalosti a výnosů porostů jetelovin“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne 18.10. 2019

.....

Martin Pisarčík

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval zejména školiteli **doc. Ing. Josefu Haklovi, Ph.D.** za cenné rady, konzultace, trpělivost a odborné vedení mé disertační práce. Velký dík patří i ostatním „pícninářům“ z katedry agroekologie a rostlinné produkce, pracovníkům Výzkumné stanice FAPPZ v Červeném Újezdě a šlechtitelské stanice Větrov OSEVA UNI a.s. Díky také všem studentům magisterského a bakalářského studia, kteří se podíleli na laboratorní práci a na polních pokusech. V neposlední řadě děkuji své **rodině** za podporu během studia.

Práce byla uskutečněna za podpory **Grantové agentury FAPPZ na České zemědělské univerzitě v Praze** (GAFAPPZ SV17-16-21240 a SV18-09-21240) a **Technologické agentury České republiky** (TJ01000150).

Obsah

1 Úvod	6
2 Literární přehled	7
2.1 Nejvýznamnější choroby jetelovin	7
2.1.1 Padání klíčnicích rostlin jetele a vojtěšky	7
2.1.2 Bílá hniloba jetele (dříve: rakovina jetele)	7
2.1.3 Krčkové a kořenové hniloby jetele	8
2.1.4 Verticiliové a fusariové vadnutí vojtěšky	9
2.1.5 Antraknóza jetele a vojtěšky.....	10
2.2 Současné možnosti regulace napadení porostů jetelovin	11
2.2.1 Vliv agrotechniky	11
2.2.2 Volba odrůdy	12
2.2.3 Poznatky v chemické ochraně jetelovin	13
2.3 Možnosti biologické ochrany	14
2.3.1 <i>Pythium oligandrum</i>	15
2.3.2 <i>Coniothyrium minitans</i>	16
2.3.3 <i>Bacillus spp.</i>	17
2.3.4 <i>Streptomyces spp.</i>	18
2.3.5 <i>Trichoderma spp.</i>	18
2.3.6 <i>Clonostachys rosea</i>	19
2.4 Limity biologické ochrany	19
2.5 Rostlinné stimulanty	20
2.5.1 Alginátové přípravky	20
2.5.2 Přípravek Albit	22
2.6 Morfologie kořenového systému ve vztahu ke zdravotnímu stavu a výnosovému potenciálu porostů jetelovin	23
3 Cíle práce a hypotézy	26
3.1 Hypotézy	26
4 Publikované práce	27

In-field lucerne root morphology traits over time in relation to forage yield, plant density, and root disease under two cutting managements.....	28
Development of lucerne root morphology traits in lucerne-grass mixture in relation to forage yield and root disease score.....	38
Effect of <i>Pythium oligandrum</i> and poly-beta-hydroxy butyric acid application on root growth, forage yield and root diseases of red clover under field conditions.	47
Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality.....	56
5 Sumární diskuse	63
6 Závěr.....	69
7 Seznam použité literatury.....	72
8 Seznam použitých zkratek.....	82
9 Přílohy	83

1 Úvod

V současné době je celospolečenským trendem snížit používání chemických přípravků v zemědělství a zamezit jejich negativním dopadům na lidské zdraví a životní prostředí. Biologická ochrana rostlin je stále více zkoumána jako významná alternativa k syntetickým pesticidům.

Víceleté píce představují významnou složku krmivové základny přežvýkavců. Jeteloviny mají velmi pozitivní úlohu v celkové bilanci dusíku, neboť hektar vojtěšky seté nebo jetele lučního je schopen fixovat až 300 kg dusíku za rok, což znamená úsporu až 1200 kg emisí CO₂. V nadzemní hmotě a po zaorávce kořenového systému a posklizňových zbytků je to dalších 150 kg dusíku. Jeteloviny působí dále jako přerušovače obilných sledů, zanechávají v půdě značné množství organické hmoty podílející se také na tvorbě trvalého humusu, podporují biologický život půdy, provzdušňují půdu, zlepšují využitelnost živin pro další plodiny, narušují utužené podorniči, velmi výrazně zvyšují výnos následné plodiny bez jakéhokoli dalšího materiálního nebo energetického vstupu.

Vytrvalost porostů pícních plodin a udržování vysokých výnosů v dlouhodobé časové řadě představuje velmi cenný benefit, který může významně snižovat náklady na vyrábění krmiva. Tento žádoucí efekt a veskrze pozitivní působení víceletých pícnin se však neprojeví automaticky všude tam, kde je založíme, ale jedním z nutných předpokladů je i zdravý, zapojený porost v dobrém výživném stavu v půdních a klimatických podmínkách odpovídajících zvolenému druhu pěstované plodiny. Napadení kořenového systému jetelovin houbovými chorobami je významným faktorem snižování vytrvalosti porostů a následně i poklesu výnosů píce. Přímá ochrana proti kořenovým chorobám jetelovin však v praxi neexistuje.

Z toho důvodu se tato práce zabývá hodnocením morfologie a zdravotního stavu kořenů jetelovin v návaznosti na výnos píce. Dále se zabývá současnými pokroky v biologické ochraně rostlin a z toho vyplývajících nových možností řešení tohoto problému, efektivitou využití biologické ochrany a rostlinných stimulátorů z pohledu napadení chorobami, výnosnosti a vytrvalosti porostů jetelovin.

2 Literární přehled

Nízká vytrvalost porostů je hlavním omezením při používání víceletých píceň, zejména pak jetele lučního. Příčiny špatné vytrvalosti byly shrnuty a dobře zdokumentovány, kde mnoho studií ukázalo, že kořenové choroby jsou důležitým faktorem při vyčerpávání porostů (Marten, 1989). Také Táborská (2003) potvrzuje, že napadení porostů jetelovin houbovými patogeny je významným faktorem snížení výnosů píče. Patologický projev spočívá hlavně v poškození pletiv, kořenového krčku a kořenů patrném v příčném i podélném řezu. Chemická fungicidní ochrana se u jetelovin v praxi nepoužívá, protože choroby mají komplikovanou etiologii (Nedělník, 2008).

2.1 Nejvýznamnější choroby jetelovin

2.1.1 Padání klíčnicích rostlin jetele a vojtěšky

V rané fázi růstu jsou jeteloviny ohroženy komplexem patogenních mikroorganismů, tvořících mikroflóru osiva a půdy. Dominantními mikroorganismy jsou druhy rodu *Pythium* a *Fusarium*. Ve spojení s nevhodnými kultivačními podmínkami (zamokřený pozemek, nevyrovnaná výživa) dochází k padání klíčnicích rostlin, a tím k výrazné redukci počtu jedinců již v okamžiku založení porostů. Při působení těchto patogenů spolu s žírem listopasů z rodu *Sitona*, může dojít k totálnímu odumření vzházejícího porostu. Možnosti ochrany spočívají ve výsevu kvalitního certifikovaného osiva a v dodržení základních agrotechnických zásad (Nedělník *et* Pokorný, 2005).

2.1.2 Bílá hniloba jetele (dříve: rakovina jetele)

Vleugels *et al.* (2013) uvádějí, že tuto chorobu způsobují patogeny *Sclerotinia trifoliorum* Erikks. a *Sclerotinia sclerotiorum*. Jedná se o velmi významné onemocnění, které způsobuje závažné škody na porostech jetele lučního, zejména v oblastech s mírnou zimou. Jetel luční může být tímto patogenem zcela zničen již po prvním zimním období, zvláště když je podzim deštivý a zima relativně teplá. *Sclerotinia* vytváří apotecia, která jsou hnědé barvy a přibližně 2 cm velká. Na konci října apothecia vytváří velká množství askospor, které jsou rozptýleny větrem a mohou infikovat jetel prostřednictvím přímého průniku. V prosinci, kdy jsou rostliny oslabeny zimním stresem, začne *S. trifoliorum* kolonizovat celou rostlinu. Na začátku jara vznikají v napadených rostlinách nová sklerocia. Sklerocia mohou v půdě přežít

až sedm let. Podle Kazdy *et al.* (2010) je ochrana proti napadení *S. trifoliorum* jen preventivní, a to zejména vyrovnaná výživa porostů a snaha maximálně zamezit mechanickému poškození rostlin.

Vývoj kořenové hniloby do značné míry závisí na povětrnostních podmínkách: za nepříznivých podmínek pro rozvoj choroby se nemoc téměř neprojeví, přičemž příznivé podmínky mohou vést k úplnému zničení porostu. Příznivé podmínky zahrnují vlhký podzim, nezbytný pro klíčení askospor, teplou a vlhkou zimu s krátkým obdobím mrazu. O *S. trifoliorum* je zatím jen málo informací, dosavadní studie zahrnují výzkum omezených lokálních izolátů. Je třeba provést molekulární studie o genetické rozmanitosti *S. trifoliorum* v evropském měřítku (Vleugels *et al.*, 2013).

2.1.3 Krčkové a kořenové hniloby jetele

V současné době se za hlavní původce patologických poškození kořenových pletiv považují zástupci rodu *Fusarium*. V našich podmínkách jsou to především druhy *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. solani* a *F. oxysporum*. Patologický projev těchto patogenů tkví v poškození pletiv kořenového krčku a kořenů. U invazivního způsobu šíření decimuje tato nemoc rostliny již v roce založení porostů (Nedělník *et* Pokorný, 2005). *Fusarium avenaceum* vytváří štíhlé, tenké konidie velikosti 12-98 x 2,2-5,5 µm. Její chlamydostry nejsou známy. *Fusarium solani* je velmi rozšířená a na umělých živných půdách patří mezi rychle rostoucí fuzária, dosahující v 8 dnech průměru kolonie 7,3-8 cm při 25 °C na bramborovém agaru. Mikrokonidie jsou 1-2 buněčné oválné nebo téměř cylindrické. Makrokonidie mají 0-7 přehrádek o velikosti 5-82 x 2,8-6,5 µm. V průměru je *F. solani* větší než další druh *F. oxysporum*. Makrokonidie *Fusarium culmorum* mají velmi silné buňky-téměř čtvercového tvaru se 3-9 přehrádkami a o velikosti 24-42 až 36-57 x 4,5-7,5 µm. *Fusarium oxysporum* je jedno z nejvariabilnějších fuzárií. Má mnoho speciálních forem (forma *specialis-f.sp.*) parazitujících na různých plodinách a velké množství variací. Patří opět mezi rychle rostoucí fuzária, kolonie dosahuje v průměru 7,5-8 cm v 8 dnech při 25 °C na bramborovém agaru, mikrokonidie mají 1-2 buňky, mírně zakřivené. Makrokonidie *F. oxysporum v. oxysporum* mají 0-7 přehrádek (Hýsek *et al.*, 2008). Podle Kazdy *et al.* (2010) není chemická ochrana k dispozici. Kořenové hniloby jetele lučního jsou dlouhodobým problémem v mnoha oblastech světa, již Kilpatrick *et al.* (1954) ve své práci popisují, jak ve Wisconsinu, na poli obsahující komplex patogenů napadajících kořeny, zůstalo rok po vyšetí pouze 1,2 % zdravých rostlin jetele lučního.

2.1.4 Verticiliové a fusariové vadnutí vojtěšky

Je to komplexní onemocnění, vyvolávané patogeny *Fusarium oxysporum* a *Verticillium albo-atrum*. Podle Bocsy *et al.* (1994) jsou tyto patogeny u vojtěšky nejčastější příčinou nízké vytrvalosti. Kazda *et al.* (2010) uvádějí, že *Verticillium albo-atrum* je mikroskopická vláknitá houba s přehrádkovaným myceliem, konidiofory mají typické přeslenité větvení. Konidie jsou jednobuněčné, elipsovité nebo nepravidelně cylindrické. *Verticillium albo-atrum* netvoří mikrosklerocia. Symptomatologickým projevem je zežloutnutí nebo zhnědnutí cév xylému (Kůdela, 1970). Choroba se projevuje předčasným řidnutím porostu, snížením výnosu píce a semene (Kůdela, 1978), nejčastěji však ve druhém a třetím vegetačním roce (Kazda *et al.*, 2010).

Předčasné prořidnutí porostů má za následek prudký pokles výnosu, obzvláště v druhé a třetí seči 2. užitkového roku. Avšak již v 1. užitkovém roce bývá napadena až jedna třetina rostlin v porostu. Průběh onemocnění je pozvolný, od napadení k odumření rostliny uplyne zpravidla jeden rok (Kůdela, 1974). Svobodová *et al.* (1992) uvádějí, že vlivem chorob kořene a kořenového krčku vojtěšky je snížen výnos ve 3. roce vegetace o 15-24 %. V polním pokusu Šantrůčka (1989) došlo k teoretickému snížení výnosu vlivem kořenových chorob až o 27 %. Podle Kůdely (1978) je vlivem přirozené infekce patogenů způsobujících vadnutí vojtěšky způsobena ztráta 9,35 % rostlin v prvním užitkovém roce, 47,05 % ve druhém užitkovém roce a 90,18 % ve třetím užitkovém roce, což je v souladu s tvrzením Šantrůčka (1989), který uvádí, že kořenovými chorobami může být ve třetím vegetačním roce napadeno 57 % a na začátku 4. vegetačního roku až 84 % porostů vojtěšky.

Příznaky vyvolané *Verticillium albo-atrum* jsou téměř identické k příznakům vyvolaným patogenem *Fusarium oxysporum*. Podle Kazdy *et al.* (2010) je při napadení *F. oxysporum* na podélném řezu stonkem vidět červenohnědé zabarvení cévních svazků a při napadení *V. albo-atrum* je zabarvení vnitřních pletiv stonku šedé. Agrios (2004) uvádí, že fusariové vadnutí se projevuje až při vyšších teplotách. Teplotní optimum pro *Verticillium albo-atrum* je 20 až 25 °C. Ochrana spočívá dle Kazdy *et al.* (2010) ve správné agrotechnice. Snahou by mělo být maximální omezení přejezdů porostu, při nichž dochází k poškození krčků rostlin, které je významným faktorem pro napadení rostlin. V polních podmínkách se často jedná o směsné infekce, jak ilustruje poměr původců *Fusarium spp.* a *Verticillium spp.* 63:37 při mikrobiologické kultivaci napadených kořenů vojtěšky (Hakl *et al.*, 2017).

Hakl *et al.* (2004) uvádějí, že intenzita napadení chorobami vojtěšky má vliv na redukcii počtu lodyh i na redukcii délky lodyh u vojtěšky seté. K prokazatelnému snižování délky lodyh dochází již při 2. stupni napadení. K průkazné redukcii počtu lodyh oproti zdravým rostlinám dochází při 3. stupni intenzity napadení. Při 6. stupni napadení většina rostlin netvoří lodyhy vůbec, některé rostliny pouze sporadicky. Z hlediska délky lodyh dochází k negativnímu vlivu již od počátku infekce, u 6. stupně intenzity dochází redukcii délky lodyh až o 90 %. V práci Hakl *et al.* (2007) se uvádí rozdíl mezi vlivem napadení kořenů na počet lodyh v jarním a podzimním období. Zatímco v podzimním období dochází k redukcii počtu lodyh již od 2. stupně napadení, v jarním období není v počtu lodyh mezi stupněm intenzity napadení 0-5 žádný podstatný rozdíl. Počet lodyh na rostlině musí být posuzován ve vztahu k průměru hlavního kořene a na podzim dosahuje u zdravých rostlin hodnoty 1 lodyha/mm kořene. V jarním období bývá vyšší produktivita zdravých rostlin, a to 1,5 lodyhy/mm. U 1. až 5. stupně intenzity napadení se produktivita udržuje v rozmezí 1,2 až 1,3 lodyh/mm a u nejvíce napadených rostlin (stupeň 6) dosahuje na jaře i na podzim shodně rozmezí 0,3-0,4 lodyh/mm.

2.1.5 Antraknóza jetele a vojtěšky

Jedná se o středně významné onemocnění způsobené patogenem *Colletotrichum trifolii*. Je to mikroskopická houba vytvářející jednobuněčné, oválné konidie, které se tvoří v útvaru zvaném *acervuli*. Onemocnění se projevuje postupným odumíráním rostlin, především koncem léta. Napadané porosty mohou v dalších letech obrůstat, ale obvykle odumírají během první poloviny vegetačního období. Ve spodní části stonku jsou patrné tmavé nekrózy, na odumřelém pletivu lze pozorovat konidie. *Colletotrichum trifolii* přetrvává ve formě mycelia v pletivu hostitele. Choroba se nevyskytuje pravidelně, při teplém a deštivém počasí je výskyt velmi pravděpodobný, v některých letech je schopna postihnout téměř celý porost a ztráty pak dosahují 80-100 %. K ošetření není v ČR registrován žádný přípravek. Napadané porosty se doporučuje sekat jako poslední, aby nedošlo k přenosu patogenu nářadím na další porosty (Kazda *et al.*, 2010). Jacob *et al.* (2010) také popisují velké ztráty na výnosech jetele lučního vlivem výskytu *Colletotrichum trifolii* v Německu a navrhují šlechtění odolnějších odrůd.

2.2 Současné možnosti regulace napadení porostů jetele

2.2.1 Vliv agrotechniky

Při pěstování jetele lučního jsou choroby kořenového systému hlavním limitujícím faktorem. Intenzitu napadení ovlivňuje kromě odrůdy i řada vnějších faktorů, jako jsou výběr lokality a agrotechnika. Podle Kováčikové *et* Kúdely (1984) se v letech 1961-1982 kvůli špatnému přezimování zaoralo v ČSR 1,37-37,25 % celkové výměry jetele lučního. Nejčastějšími příčinami jarních zaorávek porostů jetele pěstovaného v monokultuře podle Kováčikové *et* Kúdely (1983) byly: nedostatečný vývin podsevů jetele vlivem sucha v roce výsevu, nadměrné srážky vedoucí k poškození porostů mechanizací při sklizni, nadměrný rozvoj populací hraboše polního na podzim, časté periody oblev na konci zimy.

Z výzkumu Svobodové *et* Šantrůčka (1992) vyplývá, že zhutnění půdy má významný vliv na výskyt chorob kořene a kořenového krčku vojtěšky a výrazně ovlivňuje výnos a vytrvalost porostů. Šantrůček (1988) uvádí, že vlastní zhutnění půdy se podílí na snižování píce vojtěšky ve 3. roce vegetace pouze 15-30 %, zatímco vliv poškození porostu zemědělskou mechanizací je 70-85 %. Při přejezdech mechanizace dochází k rozdrčení a olámání lodyh, rozmačkání kořenových krčků a vrchní části kořenového systému. Nepřímo se projevuje zmenšení půdní pórovitosti, obsahu vzduchu v půdě, zmenšení její propustnosti pro vodu a zvýšení mechanického odporu půdy proti pronikání kořenů.

Kúdela (1978) uvádí, že intenzivní využívání porostů vojtěšky zvyšuje škodlivost verticiliového a fusariového vadnutí vojtěšky. Každá seč je příležitostí k šíření původců chorob kořenového systému v porostech, z nemocných rostlin na zdravé. Při intenzivním využívání porostů častějšími sečemi, je průběh onemocnění rychlejší, odumírání rostlin a prořídnutí porostu časnější. K nebezpečí rozšíření patogenů je nutno přihlížet při organizaci sklizně. Je nutné se vyvarovat přejíždění sklízecích strojů z napadených porostů (v 2. užitkovém roce a starších) na nenapadené porosty (v roce zasetí a v 1. užitkovém roce), nejdříve sklízet zdravé porosty a nejspíše silně napadené. Stejně je to i u jetele lučního, jak uvádí Rufelt (1987), s vyšší intenzitou sečení porostů roste významně i výskyt kořenových chorob jetele. Při přejezdu ze silně zamořeného pozemku se dříve doporučovalo dezinfikovat žací mechanismy např. formalímem (Kúdela, 1978). Také mechanické ošetřování porostů, jako např. vláčení, vede k vyššímu výskytu kořenových a krčkových chorob (Svobodová *et al.*, 2003).

Podle Kúdely (1978), je možné úpravou pH půdy pomocí vápnění na neutrální redukovat četnost napadených rostlin vojtěšky a oddálit nebo zmírnit projev onemocnění na nadzemních orgánech. Hlavním způsobem ochrany však zůstává šlechtění na odolnost, neboť samotným vápněním nelze vyloučit značné ztráty na výnosech, dojde-li k infekci u náchylných rostlin. Také Steiner *et* Alderman (2003) uvádějí, že pH půdy je důležitým agronomickým parametrem, který ovlivňuje výskyt kořenových chorob u jetele lučního.

2.2.2 Volba odrůdy

Výsledky Hakla *et al.* (2009) ukazují, že existují určité rozdíly v odolnosti mezi odrůdami vojtěšky, ale žádnou odrůdu v českém sortimentu nelze pokládat za zcela odolnou, přičemž rozsah napadení kořenů vojtěšky může dosahovat až do 95 %. V polních pokusech Máškové *et al.* (2009) se průměrné napadení českých odrůd vojtěšky kořenovými chorobami pohybovalo okolo 29 %. Malatin *et* Manninger (1980) z Výzkumného ústavu v Kumpoltu publikovali výsledky vykazující vysokou odolnost maďarských odrůd vojtěšky: Furez (odolná proti *Fusarium*) a Vertibenda (odolná proti *Verticillium albo-atrum*), ale další výzkumy tyto vlastnosti nepotvrdily. Hlavičková *et al.* (2002) došli k závěru, že vyšlechtěné odolnější odrůdy jsou patogeny pod vlivem mechanizačních zásahů napadány stejně jako starší odrůdy. Autoři navrhují v průběhu šlechtění prokazatelně zjišťovat odolnost nových odrůd k jednotlivým patogenům i při mechanickém poškozování kořenového systému.

Klimeš *et al.* (2001) publikovali, že na vyšlechtěné odrůdy jetele lučního jsou kladeny velmi vysoké nároky. Důraz je kladen především na vyšší výnosy píce, zvýšenou výnosovou jistotu a zlepšenou jakost sklizené hmoty. Rovněž se požaduje zvýšená odolnost proti chorobám a škůdcům, zlepšené přezimování, rozdílná ranost, zvýšená vytrvalost a schopnost obrůstání. Právě vytrvalost jetele lučního je podle Vasiljevice *et al.* (2005) problém ve většině oblastí světa. Šlechtitelé stojí podle Klimeše *et al.* (2001) před velmi obtížnými úkoly. Navíc je v České republice velice řídká síť odrůdových zkušebních stanic. To je v souladu s tvrzením Nedělníka *et* Pokorného (2005), že výnos už není hlavním sledovaným kritériem kvality odrůd jetelovin. V dnešní době s rostoucím významem jetelovin nejenom jako pícnin na orné půdě stoupá požadavek na dobrý zdravotní stav a na zvýšenou vytrvalost a konkurenceschopnost.

Podle Hejduka (2006) existují průkazné rozdíly mezi vytrvalostí jednotlivých odrůd jetele lučního.

Podle Hejduka *et* Knota (2010) nejvytrvalejšími odrůdami jsou Artus a Milvus (Švýcarsko), Lucrum (Německo), Amos, Spurt a Start (Česká republika). Z výzkumu Wallenhammar *et al.* (2006) vyplývá, že průměrný podíl nemocných rostlin jetele lučního ve Švédsku v roce výsevu činí 35 %, v prvním užitkovém roce 79 % a ve druhém užitkovém roce 96 %. Öhberg (2008) uvádí, že tetraploidní odrůdy jetele lučního používané ve Švédsku, vykazují nižší podíl napadených rostlin, ale tyto rostliny mají v porovnání diploidními odrůdami vyšší stupeň napadení.

2.2.3 Poznatky v chemické ochraně jetelovin

Již na přelomu 50. a 60. letch byly ve Švédsku provedeny první výzkumy 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). 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. Larkin *et al.* (1995) v nádobových experimentech prokázali, že fungicidní látka metalaxyl aplikovaná na půdu, snižuje negativní 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 metalaxyl příliš účinný (Larkin *et al.*, 1995).

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. V současné době není v České republice k dispozici žádný fungicidní přípravek určený pro ochranu jetelovin.

2.3 Možnosti biologické ochrany

Biologická ochrana rostlin se jeví jako bezpečná alternativa, která je stále více zkoumána, aby poskytla účinnou ochranu proti chorobám rostlin. 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) uvádějí, 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.

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. 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 *et Boland*, 2003). Podle Gerbore *et al.* (2014) se v posledním desetiletí nejvíce studuje vliv *Pythium oligandrum* ze třídy Oomycota. Podle Benhamou *et al.* (2012) je *P. oligandrum* nyní považováno za nejslibnější biologickou ochranu z třídy *Oomycetes* pro použití v zemědělství.

2.3.1 *Pythium oligandrum*

Brožová (2002) uvádí, že Oomycety jsou obecně vnímány jako agresivní rostlinné patogeny způsobující vážné ztráty výnosu na plodinách, *Pythium oligandrum* se však tomuto zařazení zcela vymyká, neboť napadá patogeny svého druhu. Již Veselý (1978) pozoroval hyperparazitismus *P. oligandrum* na ostatní druhy ve stejné třídě.

Gerbore *et al.* (2014) uvádějí, že *P. oligandrum* působí buď přímo, anebo nepřímo k ochraně rostlin a dokáže snížit patogenitu velkého množství chorob v rozmezí 15-100 %. *Pythium oligandrum* lze použít pro biologické ošetření širokého spektra plodin, protože má schopnost napadat většinu houbových patogenů rostlin.

Pythium oligandrum není translokováno do rostliny přes list, ale buď parazituje některé fytopatogeny na povrchu rostliny nebo kolonizuje kořenový systém a produkcí proteinů v buněčné stěně indukuje v rostlinách tvorbu etylenu, který pak v rostlinách řídí procesy indukované rezistence (Benhamou *et al.*, 2012). Hase *et al.* (2006) uvádějí jako elicitující protein oligandrin, který spouští cytologické a biochemické modifikace v buňkách rostlin a tím vyvolává jejich odolnost vůči patogenům. Dalšími látkami izolovanými v buněčné stěně *P. oligandrum* jsou podle Benhamou *et al.* (2001) glukany a chitosan. Chitosan působí jako přírodní fungicid na houbové hyfy a buněčné membrány, narušuje buněčné stěny a cytoplazmu a tím přímo inhibuje klíčení spór a růst mycelia (Li *et al.*, 2009).

Cagaň *et al.* (2010) uvádějí, že organismus *P. oligandrum* je schopen kolonizovat kořenový systém, kde je pak prospěšný při výměně látek s rostlinou. Zároveň je schopný potlačit růst patogenních hub. Podle Benhamou *et al.* (2012) látky produkované *P. oligandrum* stimulují imunitní systém rostliny, podporují její růst a zlepšují celkovou výkonnost porostů. Také LeFloch *et al.* (2003) uvádějí, že imunizace rostlin je velmi důležitým mechanismem účinku *P. oligandrum*.

O schopnosti *P. oligandrum* produkovat další sekundární metabolity není více známo. Další výzkumy by měly přispět ke zvýšení výkonu *P. oligandrum* a jeho použití jako silné biologické ochrany. Sekvenování genomu *P. oligandrum* by v blízké budoucnosti mělo poskytnout detailní vhled do této problematiky (Benhamou *et al.*, 2012).

Nejčastěji se podrobuje *P. oligandrum* laboratorním experimentům a experimentům v pokusných sklenicích. Polní pokusy se často neprovádí, a pokud ano, tak jsou zaměřené na olejniny, obilniny, vinou révu a chmel (Procházková-Rulfová, 2009). Hibar *et al.* (2006) prokázali vliv *P. oligandrum* na fusariové choroby rajčete. V České republice se od roku 1993 vyvíjí biologický přípravek Polyversum na bázi *P. oligandrum*. Jeho výroba se neustále

zdokonaluje. V současné době registrace tohoto přípravku zahrnuje mnoho plodin, např. řepku, hořčici, slunečnici, mák, chmel, okrasné a golfové trávníky, okrasné a lesní školky, jahody, vinnou révu, pšenici, ječmen, žito, tritikále, brukvovitou zeleninu, rajče, okurku a papriku. Procházková-Rulfová (2009) uvádí, že přípravek Polyversum je při aplikaci k řepce stejně účinný jako chemický standard, jeho výhodou jsou navíc nižší náklady aplikace na 1 ha. I přes zajímavé výsledky u ostatních plodin nebyl zatím efekt využití tohoto mikroorganismu sledován u víceletých píceňin.

2.3.2 *Coniothyrium minitans*

Podle Öhberg *et* Bang (2010) je *Coniothyrium minitans* podobně jako *P. oligandrum* obligátní mykoparazitický organismus přirozeně se vyskytující po celém světě, její spory v půdě infikují a parazitují na přítomných sklerociích patogenů *Sclerotinia spp.* a poměrně rychle je rozkládají.

Hyfy *Coniothyrium minitans* pronikají do buněčné stěny hostitele. Hostitelská cytoplasma se rozpadá a dochází ke zhroucení buněčných stěn v důsledku infekce (Huang *et* Hoes, 1976). Podle Whippe *et* Gerlagha (1992) k rozvoji *C. minitans* dochází zejména v provzdušněné povrchové vrstvě půdy do hloubky cca 10 cm při teplotách nad 1 °C. Maximální klíčení spor a růstu dochází při relativní vlhkosti vzduchu nad 95 %. Při zamrznutí půdy *C. minitans* pozastavuje svůj růst, ale nedochází k odumření. Účinnost odstranění zdrojů infekce z povrchové vrstvy půdy se pohybuje od 95 do 100 %. *C. minitans* přežije a šíří se v půdě po dobu nejméně dvou let a je schopno nadále poskytovat určitou kontrolu onemocnění.

V České republice byl registrován přípravek CONTANS WG k ochraně řepky olejky, hořčice bílé, slunečnice, máku, zeleniny, okrasných rostlin, tabáku, luskovin, aromatických a léčivých rostlin a čekanky proti sklerotínii. Používá se k ochraně rostlin aplikací před setím nebo po sklizni na kontaminované posklizňové zbytky.

Výsledky polních experimentů ve Skandinávii, které provedli Öhberg *et* Bang (2010) ukazují, že *C. minitans* může být využito k ochraně jetele lučního proti *S. trifoliorum*. Přes drsné půdní a teplotní podmínky na pokusných stanovištích bylo použito vhodné bez ohledu na to, zda aplikace probíhala před setím nebo již ve vegetačním stádiu, *C. minitans* zůstalo životaschopné i po zimním období, což potvrzuje využití *C. minitans* i v podmínkách s širokým rozsahem teplot. *Coniothyrium minitans* může infikovat sklerocia *S. trifoliorum* jak na lehkých, tak i těžkých půdách.

Dále je z výsledků Öhberg *et* Bang (2010) patrné, že při předset'ové aplikaci *C. minitans* dochází ke zvýšení výnosů jetele lučního o 21-32 %. Další polní experimenty jsou podle autorů nezbytné, protože ještě není přesně známo, jakou měrou *C. minitans* ovlivňuje přežití sklerocií *S. trifoliorum* v provozních zemědělských podmínkách vzhledem k termínům aplikace a objemu aplikované dávky.

2.3.3 *Bacillus spp.*

Bakterie z rodu *Bacillus* jsou mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují v půdě a jsou dobře známy jako producenti široké škály sloučenin. Tyto bakterie mají genom složený z 5 až 8 % z genů, které zajišťují biosyntézu sekundárních metabolitů. Nejdůležitějšími bioaktivními molekulami těchto bakterií jsou neribosomálně syntetizované peptidy, lipopeptidy, polyketidy, bakteriociny a siderofory. Tyto látky mají široké spektrum antagonistické aktivity proti rostlinným patogenním bakteriím, houbám a virům. Lipopeptidy ovlivňují cílové buňky na úrovni buněčné membrány, jejich biologická aktivita spočívá především v inhibici růstu rostlinných patogenů, kompetici a indukci systémové rezistence v rostlinách (Fira *et al.*, 2018). To potvrzuje i Rahman *et al.* (2016), kteří uvádějí, že při indukci systémové rezistence bylo pozorováno potlačení kořenových i listových chorob.

V laboratorním prostředí bylo prokázáno, že některé kmeny tohoto organismu se vyznačují velmi silnou antibakteriální a antimykotickou aktivitou proti fytopatogenům (Fira *et al.*, 2018). To se také potvrdilo účinkem *Bacillus spp.* proti fusariozám na pšenici (Schisler *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2018) nebo proti strupovitosti u brambor (Lin *et al.*, 2018). U vojtěšky byl v práci Handelsmana *et al.* (1990) pozorován vliv 700 bakteriálních kmenů mikroorganismů na padání klíčících rostlin, z nichž pouze kmen *Bacillus cereus* UW85 příznaky této choroby zcela potlačil. V polních experimentech se pak tento kmen osvědčil hlavně v ochraně vojtěšky proti *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*.

Rahman *et al.* (2016) uvádějí, že v poslední době mnohé agrochemické společnosti začleňují přípravky *Bacillus spp.* do svého portfolia a předpokládá se, že biologické přípravky na bázi *Bacillus spp.* se stanou v budoucnu nejpoužívanějším nástrojem pro ochranu rostlin.

2.3.4 *Streptomyces spp.*

Jedná se o všudypřítomné a přirozeně se vyskytující bakterie, které se běžně vyskytují v půdním prostředí. *Streptomyces* kolonizuje kořeny rostlin a působí jako mykoparazit houbových patogenů, který pomáhá chránit rostliny. Zajišťuje ochranu zejména proti těmto patogenním organismům: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Aphanomyces*, *Monosporascus*, *Armillaria*, *Sclerotinia*, *Postia*, *Verticillium*, *Geotrichum* (Pertot *et al.*, 2015). Jones *et Samac* (1996) uvádějí, že *Streptomyces* je schopno inhibovat 93 kmenů půdních patogenů. Podle Pertota *et al.* (2015) je dalším významným mechanismem tvorba a vylučování antifungálních metabolitů, např. antibiotika a/nebo antifungální sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností nebo lytické enzymy jako je chitináza.

Jakmile tato bakterie úspěšně kolonizuje kořeny, může neustále chránit rostlinu. Na druhou stranu účinnost není extrémně vysoká a rhizosférové kompetence nejsou prokázány u mnoha plodin. Možným způsobem, jak zlepšit účinnost *Streptomyces*, je kombinování s dalšími biologickými přípravky.

Jones *et Samac* (1996) ve skleníkových pokusech prokázali vliv *Streptomyces* na zlepšení zdravotního stavu vaječnicků, snížení podílu nemocných rostlin a potlačení původců kořenových hnilob. Stejně tak Xiao *et al.* (2002) uvádějí efekt *Streptomyces* na snížení počtu nemocných rostlin. V polních pokusech se však tento efekt potvrdil jen v kombinaci s fungicidní látkou metalaxyl.

2.3.5 *Trichoderma spp.*

Jedná se o saprotrofní, oportunistické, nevirulentní organismy, které působí paraziticky a prostřednictvím antibioly na mnoho patogenních organismů způsobujících onemocnění rostlin (De Jaeger *et al.*, 2011). Podle Leelavathi *et al.* (2014) je rod *Trichoderma* přítomen ve všech půdách a jedná se o nejrozšířenější kultivované houby. Houby rodu *Trichoderma* jsou také významným zprostředkovatelem anorganických živin v půdě, rozpouští fosfáty a další sloučeniny, podporují rozvoj kořenů, dokáží deaktivovat enzymy patogenů a obdobně jako *P. oligandrum* vytváří indukovanou rezistenci rostlin.

Účinky byly popsány proti následujícím patogenům: *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici* a *Drechsler asorokiniana* (Küçük *et Kivanç*, 2003).

2.3.6 *Clonostachys rosea*

Jedná se o běžně se vyskytující půdní houbu s celosvětovým rozšířením. Nejčastěji se vyskytuje na orné půdě a v trvalých travních porostech. Podílí se na rozkladu zbytků organické hmoty v půdě a mykoparaziticky degraduje široké spektrum půdních fytopatogenních hub. Optimální teplota pro růst je v rozmezí 20-25 °C s teplotním minimem 4-8 °C. Rozkládá mycelium hub *Ceratocystis*, *Trichothecium*, *Thamnidium*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Aureobasidium*, *Aphanomyces*, *Bipolaris*, *Fusarium* aj.

Mykoparaziticky účinné kmeny *C. rosea* produkují několik specifických extracelulárních enzymů (beta-N-acetylhexosaminidáza, chitináza, β -1,4-chitobiosidáza, glucan β -1,3-glucosidáza a proteáza) rozpouštějících buněčné stěny fytopatogenních hub (Ondráčková *et al.*, 2014).

V České republice byl registrován pomocný rostlinný přípravek Gliorex a Clonoplus, který je možné použít na široké spektrum pěstovaných plodin. Aplikace se provádí nejčastěji na osivo, případně i do půdy nebo pěstebních substrátů. V průběhu vývoje obou přípravků, ale i v současné době, byly kmeny houby *C. rosea* testovány u širokého spektra polních plodin, jako jsou luskoviny, obilniny, mák, kmín, brambory, česnek nebo mrkev. Například v porostech luskovin došlo po aplikaci *C. rosea* ke zlepšení zdravotního stav kořenů a zvýšení výnosu až o 26 %. U pšenice seté regovaly ošetřené varianty zvýšením výnosu o 14 % oproti kontrole a zvýšením výnosu o 4 % ve srovnání s chemicky mořenou variantou. Aplikace k bramborám zvýšila průměrný výnos o 27 % oproti neošetřené kontrole (Ondráčková *et al.*, 2019). Vliv přípravku na jeteloviny zatím není znám.

2.4 Limity biologické ochrany

U biologické ochrany existuje řada faktorů, které limitují její účinnost. Brožová (2002) upozorňuje na to, že účinek těchto biologických přípravků je silně ovlivňován přírodními podmínkami jako je teplota, vlhkost vzduchu nebo pH půdy. Například klíčení oospor *Pythium oligandrum* dle Elnaghy *et al.* (2009) nastává v teplotním rozmezí od 10 do 30 °C, optimálně při 25 °C. Pokud jde o pH, ke klíčení oospor dochází v rozsahu 5-9 pH, optimálně mezi 6,5-8 pH.

Biologické agens můžou rovněž představovat riziko pro necílové organismy. Organismus, který se zdá být schopen ovládat chorobu rostliny bez poškození hostitelské rostliny, může stále 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. Mykorrhizní a necílové saprofytické houby jsou zvláště v ohrožení, protože většina biologických agens jsou parazitární na nejméně jeden druh hub. Toxiny produkované biologickými agens mohou nejen poškodit žádoucí půdní mikroorganismy, ale i rostliny. Protože se jedná o živé látky, jejich vývoj a rozšíření může být nepředvídatelný, a proto je třeba předvídat možné komplikace a zmírnit případné nežádoucí účinky. Biologická ochrana je uváděna jako "přírodní" a "s nízkým rizikem", bývá často osvobozena od důkladného testování požadované pro chemické přípravky na ochranu rostlin (Brimmer *et* Boland, 2003). To vyplývá i ze studie Gerbore *et al.* (2014), kde autoři upozorňují, že velkou neznámou je dopad dlouhodobé biologické ochrany na životní prostředí.

2.5 Rostlinné stimulanty

Další možností fungicidní ochrany je použití látek stimulujících životaschopnost rostlin. Je prokázáno, že rostlinné stimulanty dovedou zvýšit výnos a jeho kvalitu, zvýšit odolnost rostlin vůči chorobám a suchu, zvýšit účinnost a snížit výdaje používaných tradičních chemických pesticidů a hnojiv (Novik, 2013).

2.5.1 Alginátové přípravky

Algináty jsou přírodní produkty získávané z mořských řas. Mořské řasy jsou nižší stélkaté výtrusné rostliny, které mají velmi pestré chemické složení a obsahují mnoho mikroorganismů. Vyznačují se širokým spektrem biologicky účinných látek, jsou to zejména aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, organické kyseliny, sacharidy, škrob, minerální látky, uronové kyseliny, vitamíny a další přírodní substance. Biochemickým rozbořením řas bylo zjištěno, že obsahují až 60 mikroprvků zastoupených ve větším množství než v suchozemských rostlinách. Z organických látek kromě sacharidů, bílkovin, tuků a vitamínů jsou v mořských řasách přítomny látky stimulační a antibiotické povahy. Mořské řasy rodu *Ascophyllum nodosum* obsahují sloučeniny kyseliny indolyloctové, kyselinu alginovou a její soli (Povolný, 1975). Kyselina indolyloctová je významným auxinem (Šebánek, 1983).

První zmínky o příznivých účincích mořských řas pochází již ze starověku z přímořských oblastí Číny a Japonska, kde byly používány jako lidská potrava a krmivo pro dobytek. Antičtí Římané používali mořské řasy také jako hnojivo (Povolný, 1968).

V České republice se komerční alginátové přípravky objevily v 80. letech. Šlo o produkty kanadské firmy Kelp Products International (přípravek Micro-mist) a německé firmy Bio-algen (přípravek S-90). Přípravky se ujaly mezi zahrádkáři pro svou jednoduchou aplikaci, naprostou zdravotní nezávadnost a pro potenciální zvýšení výnosu zeleniny, ovoce i okrasných rostlin.

Experimentálně byly alginátové přípravky podrobeny při pokusech na rajčatech v 60. letech. V těchto pokusech byl použit usušený extrakt z mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (výrobce norská firma Algea) pod názvem Algifert a extrakt ze sušených mletých řas s obchodním označením Algit. Povolný (1975) uvádí, že výnosy rajčat se po postřicích 1 % roztokem Algifertu vzrostly o 19 % a po postřicích 10 % roztokem Algitu o 26 %.

V 90. letech se Šantrůček *et* Svobodová (1995) zabývali vlivem alginátových přípravků S-90 a Micro-Mist na výnos, kvalitu a vzcházivost vojtěšky. V řadě případů došlo ke zpomalení vzcházení nebo i zhoršení vzcházivosti. V polních pokusech se účinky alginátových preparátů projevíly pouze tam, kde byly zhoršené růstové podmínky např. nevhodná kultivace, a to zejména ve 3. seči. Na zhutněných půdách byl efekt aplikace vyšší než na půdách nezhutněných. Šantrůček *et* Svobodová (1996) poukazují na to, že nedostatky v přípravě půdy nemohou být plně eliminovány aplikací alginátových přípravků. Přípravky se můžou uplatnit při nepříznivých podmínkách např. vytvoření půdního škraloupu (Šantrůček *et* Svobodová, 1995).

Účinek alginátových přípravků souvisí s jejich proměnlivým složením, které závisí na růstu a vývinu rostlin-mořských řas pro výrobu přípravků (Šantrůček *et* Svobodová, 2002). Šantrůček *et al.* (1995) také upozorňují na nutnost důsledného dodržení koncentrace a přesnosti aplikace přípravku.

Šantrůček *et* Svobodová (1996) došli k závěru, že použití alginátových preparátů v porostech vojtěšky je nerentabilní vzhledem k nízkým účinkům a vysokým nákladům na jednu aplikaci, navíc má pravidelná aplikace alginátových přípravku zanedbatelný vliv. V nádobových pokusech Svobodová *et* Šantrůček (1998) také zjistili, že alginátové přípravky průkazně nezvyšovaly celkovou vzcházivost trav.

V České republice je v současné době registrován biologický přípravek pro podporu zdravotního stavu rostlin Alginure, kde účinnou složkou jsou výtažky z mořských řas, výtažky z rostlin (algináty, laminariny, cytokininy, proteiny, betainy, peptidy, sacharidy, hormony a další), fosfáty a fosfonáty ve formě draselných solí kyseliny fosforečné a fosforité. Prostředek Alginure podporuje odolnost rostlin vůči napadení houbovými chorobami, plísním, strupovitosti a padlí. Po aplikaci prostředku Alginure dochází v rostlinách k aktivaci řady obranných biochemických mechanismů, přičemž nejrychleji-do dvou hodin, je plně aktivována

tvorba peroxidu vodíku. Poté je rostlina schopna tvořit kyselinu salicylovou, PR proteiny, a nakonec během dvou dnů je plně aktivována i produkce fytoalexinů. Tímto způsobem je možno mnoho druhů rostlin cestou indukované rezistence velmi účinně, a hlavně včas připravit na napadení patogeny. Podle dávky působí Alginure buď preventivně, nebo při aplikaci zvýšené dávky i kurativně. Přípravek dosahuje příznivých výsledků proti potlačení houbových patogenů na vinné révě (Monnet, 2015; Rychlá *et al.*, 2012) a jahodníku (Boček *et al.*, 2012). Nové série polních pokusů založených v rámci této disertační práce by měla ověřit možnosti biologické ochrany a stimulace růstu u jetelovin pomocí tohoto přípravku, neboť vývoj alginátových přípravků od 80. let značně pokročil.

2.5.2 Přípravek Albit

Podle Zlotnikova (2006) má biopreparát Albit komplexní účinek a široké spektrum působení, kombinuje vlastnosti růstového stimulatoru, biofungicidu, hnojiva a antidotu. Pozitivní účinek Albitu potvrdilo více než 500 polních pokusů na 60 zemědělských plodinách ve 45 regionech Ruska.

Albit je v České republice registrován jako pomocný rostlinný přípravek určený zejména pro obilniny, brambory, slunečnici, zeleninu, kukuřici, řepku olejku, vinnou révu, luštěniny, cukrovou řepu a jahodník. Účinnou látkou pomocného přípravku Albit je kyselina polybetahydroxymásečná. Jedná se o přirozenou zásobní látku prospěšných půdních bakterií. Novik (2013) uvádí, že Albit neobsahuje živé mikroorganismy, jako je tomu např. u přípravku Polyversum, ale přímo ovlivňuje půdní mikroflóru. Také zlepšuje zásobování rostlin výživnými látkami, zvyšuje solubilizaci fosfátů a fixaci dusíku.

Vzhledem ke svým imunizačním vlastnostem je Albit sám o sobě schopen chránit rostliny před chorobami. Tento preparát je například účinný proti hlavním chorobám lnu, bílé a šedé hnilobě slunečnice, rzím a skvrnitostem, a také proti hnilobě kořenů obilovin s účinností až 90 %. Nicméně, fungicidní vlastnosti Albitu, podobně jako u většiny biologických preparátů, se dostatečně projevují pouze při nízkém až středním napadení rostlin chorobami. Na vyšší úrovni infekce se Albit používá v kombinaci s chemickými fungicidy. Ve většině případů se používá pouze minimální doporučená dávka chemických fungicidů, protože při současném použití Albitu se zvyšuje účinek chemických fungicidů (Zlotnikov *et al.*, 2008).

Zlotnikov *et al.* (2016) uvádějí, že ošetření Albitem zapříčiňuje změny v mikrobiální komunitě rhizosféry rostlin, což se projevuje ve sníženém počtu mikroskopických patogenních hub a zvýšením počtu prospěšných půdních bakterií. Bylo zaznamenáno zvýšení

počtu mikroorganismů z rodu *Gliocladium*, *Cladosporium* a *Trichoderma*, kteří patří mezi významné antagonisty houbových patogenů rostlin. Vlivem aplikace Albitu se v půdě také zvýšil počet dalších bakterií stimulujících rostliny a poutajících vzdušný dusík např. *Azotobacter*.

V polním pokusu Ryabchinskaya *et al.* (2008) se při aplikaci přípravku Albit na porosty jetele lučního, výnos zelené hmoty oproti kontrole zvýšil o 40 %. Vysoký účinek aplikace byl zaznamenán i u potlačení patogenních hub. Pod vlivem tohoto stimulantu rostlin jetel luční tvořil více lodyh a tím i více nadzemní biomasy. Autoři uvádí, že používání Albitu na porosty jetele lučního je ekonomicky efektivní s vysokou návratností (až 9,9 krát). V práci Kharchenka *et al.* (2009) je uvedeno, že ošetření přípravkem Albit v porostu jetele lučního vedlo ke snížení podílu nemocných rostlin v průměru o 21 % oproti neošetřené kontrole.

Kharchenko *et al.* (2008) uvádějí, že výnosy zelené hmoty u vojtěšky seté se při použití Albitu v dávce 40 ml.ha⁻¹ zvýšily o 19,7 % oproti neošetřené variantě. Při dalším zvýšení dávky Albitu na 80 ml.ha⁻¹ vzrostl výnos oproti kontrole o 15,1 %. Přípravek měl také vliv na zvýšení tvorby lodyh, ošetřené porosty byly vyšší, vzrostla rychlost klíčení, zrychlení nastoupení fáze butonizace, zvýšení počtu květenství a zvýšení odolnosti k řadě nemocí. U ošetřených variant byl zvýšen počet lodyh na m² v rozmezí 15,6-29,1 %. Ekonomická efektivita aplikace Albitu byla vysoká, návratnost činila 6,1násobek vstupů. Ve střední a západní Evropě však efekty využití tohoto přípravku dosud ověřovány nebyly.

2.6 Morfologie kořenového systému ve vztahu ke zdravotnímu stavu a výnosovému potenciálu porostů jetelovin

Jak již bylo zmíněno výše, kořenové choroby jetelovin způsobují předčasné prořídnutí porostu, kdy dochází nejprve ke snížení produkční schopnosti infikovaných rostlin, a nakonec až k jejich odumření (Táborská, 2003). Při plánovaném hodnocení vlivu testovaných přípravků při ochraně porostů jetelovin se však nelze zaměřit pouze na výnos píče či zdravotní stav kořenů, ale rostliny je třeba hodnotit komplexním způsobem. Chmelíková *et al.* (2015) zdůrazňuje, že je důležité posuzovat parametry jak nadzemních, tak i podzemních částí rostlin. Tyto vztahy bylo nutné vzít v rámci zpracování této disertační práce v úvahu a zařadit rovněž hodnocení vlivu aplikace přípravků i na samotný kořenový systém jetelovin.

Pro jeteloviny je typická mohutná kořenová soustava s hlavním kúlovitým kořenem, která se dále vyznačuje i symbiózou s hlízkovými bakteriemi. Kořenový systém dosahuje

nejmohutnějšího vývoje u vojtěšky seté. Vojtěška vytváří ze všech plodin největší množství kořenové hmoty, které činí u vyvinutého porostu 7,5-12 t.ha⁻¹. V prvním vegetačním roce dokonce vytváří více kořenové hmoty než hmoty nadzemní (Klesnil, 1978).

V porovnání s obilninami zanechává vojtěška v půdě prostřednictvím kořenových a posklizňových zbytků značně větší množství živin, a to dusíku 3-7krát více, fosforu 1,5-3krát více, draslíku 1,5-2krát a vápníku 2-3krát více. Lignifikovaná kořenová hmota vojtěšky se pomaleji rozkládá, takže je cenným materiálem pro tvorbu trvalého humusu. Kořenový systém vojtěšky je charakterizován značnou sekreční a exkreční činností a příznivě ovlivňuje rozvoj půdních mikroorganismů. Celková mohutnost a intenzita zakořeňování vojtěšky je závislá na mnoha faktorech, zejména na půdních podmínkách, agrotechnice, na zpracování půdy, ale také i na době výsevu (Klesnil, 1978). Mohutnost kořenového systému má přímý vliv na výnosy píce. Čím vyšší jsou výnosy píce, tím více se vytváří kořenové hmoty a tím je i větší vliv vojtěšky na úrodnost půdy, a to i v hlubších vrstvách (Klesnil, 1978).

Mimo velikosti či hloubky kořenění je u vojtěšky intenzivně studovány i samotná morfologie kořenového systému (např. McIntosh *et al.*, 1980). Johnson *et al.* (1996) uvádějí, že kořenová morfologie ovlivňuje příjem živin, produktivitu a vytrvalost vojtěšky seté. I mnoho dalších studií prokázalo, že produktivita vojtěšky seté je ovlivněna morfologií kořenového systému (Johnson *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2000). Byla zaznamenána také pozitivní korelace mezi výnosem a velikostí kořenů vojtěšky (Saindon *et al.*, 1991; Chloupek *et al.*, 1999), která se však nemusí projevit v optimálních růstových podmínkách (Hakl *et al.*, 2017). Vývoj morfologie kořenového systému jetele lučního je také úzce spojen s celkovou výnosností a vytrvalostí porostů (Sawai *et al.*, 1986; Montpetit *et al.*, 1991a). Řada autorů hodnotí pestrou škálu parametrů kořenové morfologie, není však ustálen žádný metodický postup. Lamb *et al.* (2000) sice navrhuje určitý návod pro krátkodobé sledování, ale chybí systém pro víceleté polní měření, který by měl ověřený vztah k agronomickým parametrům porostu. Proto není zcela jasné, jak při posuzování vlivu biologických přípravků kořenový systém efektivně hodnotit.

Houbové patogeny se také významně podílejí na utváření kořenového systému vojtěšky, kdy jejich vlivem dochází k potlačení růstu kořenů a změnám v morfologii kořenového systému vojtěšky seté. Kořeny infikovaných vzcházejících rostlin méně větví a vytvářejí celkově méně laterálních kořenů, mají i kratší kořeny. Není ještě přesně znám vzájemný vztah mezi všemi houbovými patogeny, růstem kořenů a zdravím rostlin. Další výzkumy by měly podrobněji objasnit tyto důležité interakce (Larkin *et al.*, 1995). Mimo těchto zmíněných souvislostí mezi morfologií kořenů a jejich zdravotním stavem u monokulturně pěstovaných jetelovin chybí také

studie, které by objasnily tyto vztahy u jetelovin v jetelovinotravních směsích. Tyto směsi jsou v řadě případů preferovány, neboť travní komponenty v jetelovinotravních směsích zabraňují zaplevelení porostů (Bélanger *et al.*, 2014) a tyto porosty dosahují celkově vyšších výnosů v porovnání s monokulturami jetelovin (Sturludóttir *et al.*, 2014). Pro potenciální testování přípravků v těchto směsích bude proto nutné objasnit vliv přítomnosti travního komponentu na morfologii a zdravotní stav kořenů jetelovin v jetelovinotravních směsích.

Závěrem literární rešerše lze shrnout, že kořenové choroby jetelovin představují významný limitující faktor při jejich pěstování, ale dosud v praxi neexistuje žádný doporučovaný způsob přímé ochrany. Snížit působení patogenních chorob je zatím možné pouze šlechtěním na odolnost a pěstitelskou prevencí (eliminace zhutnění půdy a poškození rostlin, vhodné pH a hnojení aj.). Současné pokroky v biologické ochraně rostlin však skýtají nové možnosti řešení tohoto problému, a proto se tato práce primárně zabývá posouzením efektivity využití biologické ochrany a rostlinných stimulátorů z pohledu napadení rostlin chorobami, ale i dopady těchto aplikací na morfologii kořenového systému, strukturu výnosotvorných prvků v návaznosti na produktivnost a vytrvalost porostů jetelovin. Součástí disertační práce je i vyhodnocení ekonomického významu těchto opatření. Použitá metoda hodnocení morfologie kořenového systému v polních pokusech vychází z předchozích zkušeností s touto problematikou, převážně shrnutou v publikacích (Hakl *et al.*, 2017; Hakl *et al.*, 2018).

3 Cíle práce a hypotézy

- 1) Stanovit které faktory ovlivňují morfologické parametry kořenů vojtěšky seté a jaký je vztah morfologie k výnosu a zdravotnímu stavu porostů.
- 2) Analyzovat vliv přítomnosti travního komponentu v jetelovinotravní směsi ve vztahu k vývoji morfologie kořenového systému vojtěšky seté.
- 3) Posoudit efektivitu využití biologické ochrany a rostlinných stimulátorů z pohledu napadení rostlin chorobami, tak i z hlediska výnosnosti a vytrvalosti porostů jetelovin, včetně jejich ekonomického přínosu.

3.1 Hypotézy

- Hypotéza 1

Vybrané parametry morfologie kořenů vojtěšky seté mají vztah k výnosu a zdravotnímu stavu jetelovin při polním pěstování.

- Hypotéza 2

Rozvoj morfologie kořene vojtěšky seté je v jetelovinotravní směsi ovlivněn podílem travního komponentu.

- Hypotéza 3

Používání biologických přípravků v porostech jetelovin zvyšuje jejich výnos a vytrvalost.

- Hypotéza 4

Používání biologických přípravků v porostech jetelovin snižuje jejich napadení houbovými patogeny.

- Hypotéza 5

Aplikace biologických přípravků v porostech jetelovin přináší pozitivní ekonomický efekt.

4 Publikované práce

Seznam publikací tvořících metodickou a výsledkovou část práce:

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, 109-11

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.

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*. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104968>. (In press)

Pisarčík, M., Hakl, J., Menšík, L., Szábo, O., Nerušil, P. 2019. Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality. *Plant Soil and Environment*. <https://doi.org/10.17221/398/2019-PSE>. (In press)

**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.

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

Josef Hakl*, Martin Písařčík, Zuzana Hrevušová, Jaromír Šantrůček

Department of Forage Crops and Grassland Management, Czech University of Life Sciences Prague, 165 00 Praha – Suchbát, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Forage
Alfalfa
Medicago
Tap-root diameter
Root branching

ABSTRACT

Changes in lucerne (*Medicago sativa* L.) root morphology concurrent with forage growth have been little studied in multi-year field experiments with lucerne stands though they could provide explanations for differences in performance among tested treatments. Our objectives were: (i) to compare lucerne root trait development under three- and four-cut managements over a 4-year period, and (ii) to investigate relationships among root traits, and between root traits and lucerne varieties, cutting frequencies, root sampling periods, lucerne dry matter yield and evidence of root disease incidence and plant density, using multivariate methods. Treatments were a factorial combination of 15 lucerne cultivars with managements of three and four cuts per year. Each spring and autumn, plants were evaluated for root morphology traits and scored for root disease. Root morphology traits were strongly modified by sampling period and plant density, which together explained over 40% of total variability. The development over time was positively associated with an increase in tap-root diameter (TD) and root mass accumulation, whereas root density determined changes in root branching traits. The four-cut management reduced TD and root branching in association with lower forage yield. Variety effect was significant but contributed only 2.8% of total variability. Root branching showed a positive correlation with forage yield through a large increase of TD for branch-rooted plants, but more intensive root branching was associated with a significantly higher disease score than in tap-rooted plants. For optimization of evaluation of root traits, we proposed a root potential index (RPI) integrating TD and plant density. This RPI showed a closer relation to yield than TD, plant density or root biomass alone, in the arable cultivation layer. Our results reveal that monitoring of root morphology is an effective tool to characterize the production potential of lucerne as a sown field crop, and may explain yield differences among the various experimental treatments. Understanding these relationships between root morphology and lucerne stand performance can help in breeding selection as well as effective lucerne stand evaluation.

1. Introduction

The high forage production potential of lucerne (*Medicago sativa* L.) has been attributed in part to its efficient use of water and nutrients as a result of its root architecture, particularly deep tap root system, although its root development is also sensitive to conditions in the rooting zone (Frame, 2005). Root traits also play an important role in the soil carbon balance of agroecosystems (Thivierge et al., 2016). Investigations of the root systems of field-grown plants that have extensive rooting systems, such as lucerne, is very labor intensive and time consuming (Lamb et al., 2000a). This may explain why this type of research is seldom conducted, compared with studies of the above-

ground parts of plant development.

Lucerne root morphology has been widely investigated. Almost a century ago, Garver (1922) suggested that root growth was influenced by soil, climate, cultural treatment, and injury. Increasing forage yield is a major goal of most lucerne breeding programs, and root research has focused primarily on supporting this breeding objective. Consequently, the critical role of root morphology in forage crop persistence and productivity has been recognized in many studies (McIntosh and Miller, 1980; Johnson et al., 1996, 1998; Lamb et al., 1999, 2000b). Positive correlations between plant forage yield and the size of the root system have been found (Saindon et al., 1991; Chloupek et al., 1999), suggesting that a selection for larger root systems may increase forage

Abbreviations: DMY, dry matter yield; IRB, Intensity of root-branching; LDM, Lateral root dry matter; LRD, Lateral root diameter; LRN, Lateral root number; LRP, Lateral root position; PD, Plant density; PRDS, Plant root disease score; RB, Percentage of branch-rooted plants; RDM, Total root dry matter; RFM, Plant root fresh matter; RPI, Root potential index; RPIcor, Root potential index corrected for SRDS; SRDS, Stand root disease score; TD, Tap-root diameter; TDM, Tap-root dry matter

* Corresponding author to: Faculty of Agrobiotechnology, Food and Natural Resources, Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchbát, Czech Republic.

E-mail address: hakl@af.czu.cz (J. Hakl).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2017.07.017>

Received 17 March 2017; Received in revised form 29 June 2017; Accepted 25 July 2017
0378-4290/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

yield. A tendency for higher yield associated with branch-rooted plants producing lateral roots has been reported, usually with medium correlation coefficients (McIntosh and Miller, 1980). Some root traits are heritable (Saindon et al., 1991; Johnson et al., 1996; Lamb et al., 1999) which has supported the idea about the benefits of phenotypic selection on more fibrous or lateral roots for improving forage yield (Lamb et al., 2000b; Vaughan et al., 2002). A suitable methodology for investigation of lucerne root morphology was proposed by Lamb et al. (2000a) for field plots using plants with uniform spacing.

Another group of studies has focused on lucerne root traits in relation to various environmental or anthropogenic factors. Root traits have been investigated in relation to soil salinity (Vaughan et al., 2002), dynamics of nodulation (Chmelíková et al., 2015), drought stress (Annicchiarico, 2007), soil compaction and tractor wheeling (Glaž, 2008), soil tillage (Vasileva and Pachev, 2015), or soil nutrient content and fertilization (Russelle and Lamb, 2011). Cutting management (timing and frequency) is an important factor affecting lucerne stand development (Frame, 2005); however, there is a lack of studies about its effect on root morphology traits.

In spite of well-documented positive relationships between plant root traits and plant productivity, these results cannot always be applied effectively in field situations. Large genotype × environment interactions that alter root branching expression seem to exist (Pederson et al., 1984). Moreover, root traits are continually changing over time (Suzuki et al., 1991) and there is also a strong and direct impact of lucerne stand density on root traits (Hakl et al., 2011). In particular, the density effect could not prevail under the uniform plant spacing that characterizes experiments in controlled conditions, in pot or in a field under uniform plant spatial arrangement, this density effect will not commonly be apparent. In contrast, in common stands of lucerne growing in the field, plant density varies naturally and it decreases over time, as documented in many field studies (Ventroni et al., 2010). Moreover, the difference between root traits at the plant level and at the stand level must be carefully distinguished in field environments. Plant traits are measured for individual plants whereas stand traits are calculated as the average value of plants per unit area. Forage yield is generally expressed per unit area and, therefore, discrepancy between the effects of plant vs. stand traits can emerge.

The roots of lucerne can therefore be regarded as a key part of the plant in terms of their importance for productivity of the plant and the stand. It is difficult, however, to measure these root traits. Furthermore, their contribution to the stand performance may be concealed by the effects of other natural factors such as time development. For successful application of knowledge about how lucerne root morphology may support agronomical stand traits, it is necessary to understand the

relationships among root morphology traits, applied field management, and natural changes associated with changes over time and in plant density. Despite previous extensive research, there is a lack of multi-year studies investigating the development of lucerne root traits in field environments in order to clarify these relationships at the stand level. Therefore, a field study with lucerne sown in a common stand density was conducted over a 4-year period with the following aims (i) to compare the effect of root sampling periods and of three- and four-cut managements on lucerne root trait development at the plant and stand level; (ii) to evaluate advantages and disadvantages of root branching in the multi-year study; and (iii) to investigate relationships between root traits and lucerne varieties, cutting management, and root sampling periods. The study also focused on investigation of relationships between root morphology and important agronomic traits such as yield and root disease resistance. Clarification of these relationships could be valuable for optimization of lucerne root morphology evaluation in the field environment.

2. Materials and methods

2.1. Field experiment

The experiment was established in April 2006 on a clayey-loam Haplic Luvisol (clay 22.4%) at the experimental field station Červený Újezd (50°04' N, 14°10' E; elevation 410 m a.s.l.). The long term (50 year) mean annual temperature of the site is 7.7 °C and annual rainfall is 493 mm. Fifteen lucerne varieties (the French variety Europe, 13 Czech lucerne varieties, and one candidate variety) were established and managed under two cutting frequencies (three or four cuts per growing season). Cutting dates were determined by the flowering stage and bud stage (Kalu and Fick, 1983) for three and four cuts, respectively. A split-plot factorial design with four replicates was used, with cutting management as the main factor (main plots) and lucerne varieties as the subfactor (subplots). Consequently, there were 30 subplots of 7.2 × 2.5 m in each block. Plots were not fertilized.

The plots were established on 28th April by row sowing (with 0.125 m between rows), and the seeding rate was 700 germinated seeds per m² for all lucerne varieties (typically equivalent to about 15 kg seed per hectare). In the sowing year there were two harvests only, and in subsequent years the plots were cut three or four times per year depending on the cutting management treatment. Cutting dates and annual weather data are presented in Table 1. Fresh matter yield was assessed by harvesting and weighing from 10 m² in the centre of each subplot using a mower MF-70 with working width 1.4 m. A subsample from each plot was oven dried at 60 °C to enable determination of dry

Table 1

Annual mean temperature, cumulated precipitation, harvest dates, annual dry matter yield and root sampling dates and surface of sampling area for the four years of the study.

Year	2006		2007		2008		2009	
Annual temperature mean (°C)	8.8 (+1.11) ^a		9.7 (+1.94) ^a		9.2 (+1.5) ^a		8.8 (+1.07) ^a	
Annual cumulated precipitation (mm)	467 (−26.5) ^a		515 (+21.7) ^a		518 (+25.1) ^a		554 (+61.3) ^a	
Annual dry matter yield (t ha ^{−1})	2.46		14.95		15.45		17.05	
Harvest management	3 cut	4 cut	3 cut	4 cut	3 cut	4 cut	3 cut	4 cut
Cut 1	19 July		22 May		2 June		21 May	
Cut 2	18 October		4 July		14 July		16 July	
Cut 3			5 September		17 September		9 September	
Cut 4					11 October		12 October	
Root sampling period								
<i>Spring Dates</i>			11 April		21 April		8 April	
Sampling area (cm)			25 × 25		25 × 40		25 × 40	
Plant density			137		91		83	
			128		99		84	
<i>Autumn Dates</i>	28 October		29 October		3 November		5 November	
Sampling area (cm)	25 × 25		25 × 30		25 × 40		25 × 50	
Plant density	196	195	129	164	93	96	78	75

^a Difference relative to long-term mean (1960–2010).

matter yield (DMY, t ha⁻¹).

2.2. Root sampling

From autumn 2006 to autumn 2009, roots were sampled on the sides of each plot (outside the harvested area) in each spring and autumn. As there was a natural reduction in plant density with time, it was necessary to increase the root sampling area on successive samplings to provide a similar number of plants. Plant density (PD, number of plants per m²) was derived from plant count per sample and size of the root sampling area. Sampling dates and size of the root sampling areas are shown in Table 1. On a given sampling date, all plants in each sampling area were dug to a depth of about 20–25 cm. Samples were hand-washed before measurements of root morphology.

2.3. Measurements and calculation of root morphology traits

The plant root traits evaluated were tap-root diameter below the crown (TD, mm), lateral root position (LRP, depth of the lateral root closest to the crown, mm), lateral root number per plant tap-root (LRN, when larger than 1 mm), lateral root diameter (LRD, measured near the tap-root, mm), the obtained tap-root length (mm), and total root fresh matter (RFM, g). The RFM was expressed per cm of tap-root length for each evaluated plant. Lateral roots were separated near the tap-root, and tap-root and lateral roots were oven-dried at 60 °C and weighed. Tap-root (TDM), lateral root (LDM), and total root dry matter (RDM) per m² were calculated based on the size of the sampling area. Plants were separated into classes according to their number of lateral roots. Plants without lateral roots (tap-rooted plants) were considered to be class 0, and other classes represented branch-rooted plants with 1 or 2 (class 1), 3 or 4 (class 2), and 5 and more (class 3) lateral roots. Presence of fibrous roots (< 1 mm) was not evaluated because of their sporadic occurrence, likely due to the root sampling, higher soil clay content and washing techniques.

Plant root disease score (PRDS) was scored subjectively and based on discoloration on a cross-cut of the tap-root, as per Kúdela (1970). The following rating was used: 0 = healthy plant, no discoloration in the root; 1–6 = living plant with increasing level of root damage; 7 = dead plant. In autumn 2009, a simple microbiological cultivation of causal agents in eight samples of damaged roots (two per block) was realized where *Fusarium* spp. and *Verticilium* spp. were detected in ratio of 63: 37. The stand root disease score (SRDS, %) represented the projected potential yield decrease associated with the average annual plot PRDS (adapted from Kúdela, 1970) for particular levels of disease infestation. For plant traits related to root branching (LRP, LRN, LRD), the average value was calculated only for branch-rooted plants. Intensity of root-branching (IRB) was calculated as average LRN score in the sample. The percentage of branch-rooted plants (RBP, %) was calculated for each sample. The root potential index (RPI) was created as an indicator integrating TD and PD. The RPI was considered as the total area of tap-root cross sections in the sampling area (cm²) divided by the root sampling area (m²), and calculated as:

$$\text{RPI (cm}^2 \text{ m}^{-2}\text{)} = [(\text{TD}/2)^2 \times \pi \times \text{PD}]/100$$

where TD is average tap-root diameter (mm) per sample and PD is plant density per m². RPI_{cor} represented the RPI value reduced in proportion of the SRDS value in order to consider damaged area by root diseases. Values for morphological traits were expressed per plant (n = 8623) and/or per stand (average of the plants in the sampling area, n = 720).

2.4. Statistical analysis

A three-way analysis of variance (ANOVA) between external factors (root sampling period, cutting management, and lucerne variety) was used to investigate differences in root morphology traits at plant and

stand levels. The effect of cutting management was treated as a whole-plot factor and variety as split-plot factor. Because PD in root sampling areas differed between sampling periods (see Table 1), PD was used as a covariate for some analyses (Tables 4 and 6). Differences in annual DMY were also analysed in this model. Effect of the root-sampling period on root traits was investigated separately by a two-way ANOVA within each cutting management. Influence of intensity of root branching on selected plant traits was analysed by a one-way ANOVA. All factors were considered as fixed, and significant differences between means were reported using the Tukey HSD test at $\alpha = 0.05$. All these analyses were carried out using the STATISTICA program (StatSoft, 2012).

Ordination methods were also used because they allow separation and quantification of important variables simultaneously, with graphical visualization in ordination plots. Redundancy analysis (RDA) was used to perform three main analyses (A₁₋₃) from the variance partitioning procedure (ter Braak and Šmilauer, 2002), with assessment of the proportion of variability of tested variables that could be explained by explanatory variables while the effect of others could be excluded as covariates. The option of centre and standardization by dependent variables was used in RDA. Stand root morphology traits used in analysis 1 and 2 are shown in Table 4. In analysis 3, average plot SRDS and annual DMY, together with DMY in the first, second and third cuts were related to the average values of stand root morphology traits in spring and autumn. The statistical significance of the first and all of the other constrained canonical axes was determined by the Monte Carlo permutation test (499 permutations). All ordination analyses were performed in the CANOCO 4.5 program (ter Braak and Šmilauer 2002).

The ordination plots of RDA were created in CanoDraw (Microcomputer Power, Ithaca, NY) The ordination biplot depicts the relationship between stand root morphology traits (dependent variables) and period, cutting management, and plant density (explanatory variables). The triplot presents relationships between stand DMY and disease score (dependent variables), stand root morphology traits (explanatory variables), and cutting management (used as a supplementary variable).

3. Results

Overview of acronyms and descriptions of all evaluated root morphology traits at plant and stand levels, together with their means and variability, are summarized in Table 2. In total, 720 stand samples were evaluated, representing a total of 8623 plants.

3.1. Root morphology development under different cutting management

The development of root morphology at plant level from 2006 to 2009 (seven sampling periods) within each cutting management is shown in Table 3. A constant significant increase of all evaluated traits over time is clearly visible ($P < 0.001$), with the exception of LRP, which decreased slightly, and of LRN which remained almost unchanged. The impact of cutting management was significant ($P < 0.001$) for all plant traits except LRN and PRDS. The cutting frequency of three cuts per year provided higher values for TD by 0.48 mm, LRP by 3.97 mm, LRD by 0.23 mm and RFW by 0.10 g cm⁻¹, in comparison with the four-cut management. Effect of variety was significant for all root traits.

The development of stand root morphology traits over time (over six root-sampling periods) within each cutting management is reported at Table 4. Plant density significantly decreased over time whereas TD increased ($P < 0.001$). The average RB in the seeding year was 61% (data not shown) and reached 82% in the autumn 2009, although no significant trend was observed between spring 2007 and autumn 2009. Most of the other traits significantly increased between the spring and autumn sampling periods of each year. During overwintering there was

Table 2

Acronyms, descriptions, means, standard deviations (SD) and ranges of lucerne root morphology traits evaluated at plant and at stand level.

Acronyms	Description	Plant level (n = 8623)				Stand level (n = 720)			
		mean	SD	min	max	mean	SD	min	max
Dry and fresh matter									
RFM	Plant root fresh matter (g cm of tap root)	0.47	0.50	0.01	11.33				
RDM	Total root dry matter (g m ⁻²)					295	138	33	861
TDM	Tap-root dry matter (g m ⁻²)					238	118	24	645
LDM	Lateral root dry matter (g m ⁻²)					57.6	41	3	304
Root morphology and plant density									
TD	Tap-root diameter below the crown (mm)	8.8	4	1	30	10.0	3	2	24
LRD	Lateral root diameter (mm)	2.3	1	1	14	2.4	1	1	18
PD	Plant density (number of plant m ⁻²)					105	64	8	528
RPI	Root potential index = area of TD cross section per area unit (cm ² m ⁻²)					71.2	42	1	532
RPI _{cor}	Root potential index corrected for SRDS					58.4	29	1	371
Root branching									
LRP	Lateral root position (depth of first branching in mm)	34	30	1	280	32.3	15	3	117
LRN	Lateral root number (per branch-rooted plant)	3.6	3	1	22	4.4	2	1	13
IRB	Intensity of root-branching (lateral root number plant ⁻¹ in the sample)					1.5	1	0	3
RB	Percentage of branch-rooted plants (%)					75	20	0	100
Root disease									
PRDS	Plant root disease score (score for root disease infestation)	0.9	1.4	0	7				
SRDS	Stand root disease score expressed as the reduction of stand productivity (%)					14.3	13	0	57

often a reduction in the values for root traits whereas increases were observed during the growing season. The higher (4-cut) cutting frequency significantly reduced TD, IRB, RB, LDM, RPI and RPI_{cor}. Cutting management had no impact on PD and SRDS. Effect of variety was significant for all stand traits except for RB, LDM, and SRDS.

3.2. Impact of root branching at plant level

The effect of plant root branching on other root morphological traits at plant level is summarized in Table 5. The TD was almost doubled and RFM was 3.7 times higher for the most intensively branch-rooted plants (class 3), relative to tap-rooted plants (class 0). In contrast, the LRP and LRD were continuously reduced from class 1 to class 3. Increase in root branching intensity also resulted in a significantly higher PRDS. The stability of these effects over time is shown in Fig. 1.

Table 3

Effect of root sampling period, cutting management and lucerne variety on lucerne root morphology traits evaluated at plant level. Description of acronyms for root morphology traits is given in Table 2.

Factor	cut	TD	LRP	LRN	LRD	RFM	PRDS	n
2006 autumn		6.4 ^a	35.6 ^{cd}	2.8 ^c	2.3 ^a	0.31 ^a	0.22 ^a	600
2007 spring		5.9 ^a	34.7 ^{bcd}	3.4 ^{abc}	2.0 ^d	0.29 ^a	0.23 ^{ab}	513
2007 autumn		8.9 ^b	26.7 ^a	3.7 ^{ab}	2.6 ^{bc}	0.55 ^{bc}	0.40 ^b	596
2008 spring	3	8.2 ^b	37.2 ^d	3.9 ^{ab}	2.3 ^a	0.46 ^c	0.31 ^{ab}	545
2008 autumn		10.4 ^c	29.6 ^{ab}	3.9 ^{ab}	2.4 ^a	0.63 ^b	1.31 ^c	557
2009 spring		10.5 ^c	29.4 ^b	3.9 ^{ab}	2.4 ^{ab}	0.61 ^b	1.14 ^c	594
2009 autumn		12.8 ^d	31.3 ^{abc}	4.0 ^b	2.8 ^c	0.78 ^d	2.35 ^d	622
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
2006 autumn		6.1 ^a	39.4 ^{bcd}	3.0 ^b	2.2 ^{abc}	0.29 ^{ac}	0.21 ^a	673
2007 spring		6.0 ^a	41.3 ^d	3.5 ^{ab}	2.0 ^a	0.25 ^c	0.27 ^a	480
2007 autumn		7.2 ^c	34.4 ^{abc}	3.5 ^a	2.1 ^{ab}	0.36 ^a	0.20 ^a	758
2008 spring	4	8.1 ^d	40.8 ^{cd}	3.7 ^a	2.1 ^{ab}	0.35 ^a	0.27 ^a	592
2008 autumn		10.1 ^b	31.7 ^a	3.9 ^a	2.3 ^{bc}	0.56 ^d	1.35 ^b	577
2009 spring		10.3 ^b	33.3 ^{ab}	3.5 ^{ab}	2.2 ^{ab}	0.51 ^d	1.26 ^b	629
2009 autumn		11.6 ^c	33.3 ^a	3.6 ^a	2.4 ^c	0.55 ^d	2.38 ^c	886
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
Cutting management	3	9.09	31.79	3.67	2.42	0.52	0.81	4027
	4	8.61	35.76	3.53	2.19	0.42	0.85	4596
	<i>P</i> **	< 0.001	0.061	0.130	< 0.001	< 0.001	0.333	
Variety	<i>P</i> **	< 0.001	0.027	0.006	0.028	< 0.001	0.003	
Density (covariate)	<i>P</i> **	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		

P: probability; * two-way ANOVA within each cutting management; ** three-way ANOVA or ANCOVA; different letters indicate statistical differences between sampling periods for Tukey HSD, α = 0.05.

Table 4

Effect of root sampling period within cutting managements (n = 60), effect of cutting management (n = 360) and effect of lucerne variety (n = 48) over years on dry matter yield (DMY) and lucerne root morphology traits evaluated at stand level. Description of acronyms of root morphology traits is given in Table 2.

Factor	Cut	DMY	PD	TD	IRB	RB	TDM	LDM	RDM	RPI	SRDS	RPI _{cor}
2007 spring			136.8 ^b	6.49 ^c	1.44	75 ^{ac}	103.7 ^c	31.1 ^d	134.8 ^c	39.1 ^b	3.8 ^a	37.8 ^c
2007 autumn		15.3 ^a	129.1 ^b	9.76 ^a	1.62	80 ^{ab}	227.9 ^a	66.1 ^{ab}	294.0 ^a	83.2 ^a	6.5 ^a	77.9 ^b
2008 spring	3		90.8 ^a	9.52 ^a	1.64	79 ^{ab}	175.9 ^c	51.3 ^a	227.3 ^d	52.0 ^c	5.6 ^a	49.1 ^d
2008 autumn		15.8 ^a	92.8 ^a	11.45 ^b	1.69	81 ^{ab}	309.7 ^b	87.7 ^c	397.4 ^b	82.0 ^a	20.2 ^b	65.8 ^a
2009 spring			82.6 ^a	11.64 ^b	1.62	69 ^c	228.8 ^a	57.0 ^a	285.7 ^a	75.3 ^a	17.3 ^b	62.4 ^a
2009 autumn		17.4 ^b	77.8 ^a	13.76 ^d	1.77	88 ^b	314.2 ^b	76.9 ^{bc}	391.2 ^b	103.8 ^d	33.1 ^c	68.9 ^{ab}
	P*	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.069	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
2007 spring			128.0 ^b	6.48 ^c	1.44	74 ^a	105.7 ^c	29.2 ^a	134.9 ^c	37.8 ^b	3.8 ^a	36.3 ^d
2007 autumn		14.6 ^a	164.2 ^c	7.87 ^b	1.37	71 ^{ab}	245.9 ^b	53.0 ^{bc}	298.9 ^b	70.2 ^a	3.2 ^a	68.0 ^c
2008 spring	4		98.7 ^a	8.83 ^b	1.35	70 ^{ab}	182.7 ^a	40.7 ^{ab}	223.3 ^a	52.7 ^c	4.1 ^a	50.6 ^a
2008 autumn		15.1 ^a	96.2 ^a	10.78 ^a	1.58	78 ^a	314.5 ^d	72.2 ^{cd}	386.7 ^d	79.9 ^a	20.9 ^b	63.7 ^{bc}
2009 spring			83.9 ^a	11.16 ^a	1.46	62 ^b	219.5 ^{ab}	47.6 ^{ab}	267.1 ^{ab}	70.6 ^a	19.4 ^b	57.2 ^{ab}
2009 autumn		16.7 ^b	75.1 ^a	11.88 ^a	1.38	75 ^a	431.4 ^e	78.0 ^d	509.4 ^e	79.5 ^a	33.2 ^c	52.6 ^a
	P*	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.238	0.004	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Cutting management	3	16.1	101.7	10.4	1.61	0.78	226.7	61.7	288.4	73.2	14.4	60.8
	4	15.5	107.7	9.6	1.44	0.72	249.9	53.5	303.4	64.6	14.1	54.2
	P**	< 0.001	0.158	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.006	0.054	< 0.001	0.695	< 0.001
Variety	P**	0.001	< 0.001	0.010	0.071	0.256	0.002	0.115	0.002	0.009	0.595	0.001
Density (covariate)	P**	–	–	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	–	< 0.001	–

P: probability; * two-way ANOVA within each cutting management; ** three-way ANOVA or ANCOVA; different letters indicate statistical differences between sampling periods for Tukey HSD, α = 0.05.

represents the sampling-period effect (time); the second (vertical) axis represents PD, whilst cutting management points are located in the centre of the figure. All root trait data (except for LRP) were ordinated on the left side of Fig. 2 (together with later sampling periods) indicating their increase over the season and over years. Each over-wintering period (from the autumn of one year to the spring of the next year) resulted in a back shift to the right side of Fig. 2, showing a tendency for decrease of root traits. The effect of time was especially associated with an increase in root dry matter (RDM, TDM), SRDS, TD and RPI. Plant density was mostly in an inverse relationship with traits characterizing root branching (IRB, LRN, RB, LRD). Compared with the four-cut management, the three-cut management also resulted in an increase in root branching traits. There was a high score for TD on both axes, indicating its positive response to time together with negative relationship to PD.

In the second analysis (A₂; Table 6), after excluding the variety effect, the three other external factors (sampling period, cutting management, and plant density) taken separately explained 26.8, 1.4 and 13.5%, respectively, of the variability, whereas there was an overlap of 0.6% of their respective influences. As with A₁, all these analyses were statistically significant (P < 0.002).

3.4. Contribution of stand root morphology traits to forage yield and root disease score

There was a greater DMY in 2009 than in the two previous years. The three-cut management provided significantly (P < 0.001) higher DMY (+ 0.6 t ha⁻¹) than the four-cut management, and this effect was

stable across years. Lastly, the effect of variety on DMY was significant (P = 0.001). The SRDS was low until autumn 2008, and the highest value was observed in autumn 2009.

In the third analysis (A₃; Table 6), the contribution of root morphology traits to lucerne DMY and SRDS was investigated at the stand level. With the use of lucerne variety and sampling period as covariates, the root morphology traits explained 10.5% of DMY and SRDS (P < 0.002). This relationship is shown in the ordination triplot of RDA (Fig. 3). The first canonical axis represents the relationship between DMY and root traits, in which annual DMY, and first and second cut DMY are located on the right, together with the increase of LRD, RB, IRB, RPI and RPI_{cor}. The vertical axis represents SRDS with positive correlation to LRN and other root-branching traits. The three-cut management is related to a larger annual DMY and larger first and second cut DMY, while the four-cut management is related to larger DMY for the third cut. Moreover, the three-cut management is associated with an increase in root-branching traits whereas the four-cut management is associated with an increase in root dry matter traits (RDM, TDM).

4. Discussion

4.1. Impact of sampling period, cutting management and lucerne variety on development of root traits

The development of plant root traits over time follows a pattern described by Suzuki (1991) in a ten-year study, in which the TD and LRN increased with the decrease of stand density over time (Fig. 2). In

Table 5

Effect of plant root branching class (average of seven sampling periods) on other traits of root morphology at plant level. Description of acronyms for root morphology traits is given in Table 2.

Branching class	TD	LRP	LRN	LRD	RFM	PRDS	n
0	6.51 ^a		0		0.25 ^a	0.65 ^a	2588
1	7.84 ^b	42.58 ^a	1–2	2.36 ^a	0.35 ^b	0.87 ^b	2610
2	9.90 ^c	30.20 ^b	3–4	2.28 ^a	0.54 ^c	1.06 ^c	1831
3	13.00 ^d	23.22 ^c	5 and more	2.24 ^b	0.93 ^d	1.19 ^d	1593
P	< 0.001	< 0.001		0.033	< 0.001	< 0.001	

P: probability; different letters indicate statistical differences between branching classes for Tukey HSD, α = 0.05.

Table 6

Results of redundancy analyses (RDA) investigating the effects of explanatory variables on variability for investigated lucerne morphology traits at stand level. Description of root morphology traits is given in Table 2.

Analysis	Investigated variables	Explanatory variables	Covariate	% ax. 1 (% all)	F 1 ax. 1 (F 1 all)	P 1 ax. 1 (P 1 all)	Illustrated
A ₁	Root morphology traits at stand level	Sampling period, Cutting management, Lucerne variety, Plant density	–	24.1 (45.1)	222.1 (27.3)	0.002 (0.002)	Fig. 2
		Lucerne variety (VA)	–	1.3 (2.8)	9.5 (1.4)	0.066 (0.012)	
		Sampling period, Cutting management, Plant density	Variety	23.4 (42.3)	222.0 (76.8)	0.002 (0.002)	
A ₂	Root morphology traits at stand level	Sampling period (PE)	VA, CM, PD	23.0 (26.8)	273.1 (68.2)	0.002 (0.002)	Fig. 3
		Cutting management (CM)	VA, PE, PD	1.4	17.8	0.002	
		Plant density (PD)	VA, PE, CM	13.5	171.1	0.002	
A ₃	Dry matter yield, Disease score	Root morphology traits at stand level	VA, PE	5.6 (10.5)	38.7 (7.3)	0.002 (0.002)	Fig. 3

% ax. 1 (all) – variability of investigated variables explained by canonical axis 1 or by all axes in brackets; F 1 (all) – F statistics for the test of axis 1 or all axes in brackets; P 1 (all) – corresponding probability value obtained by the Monte Carlo permutation test (499 permutations) for the test of axis 1 or all axes in brackets.

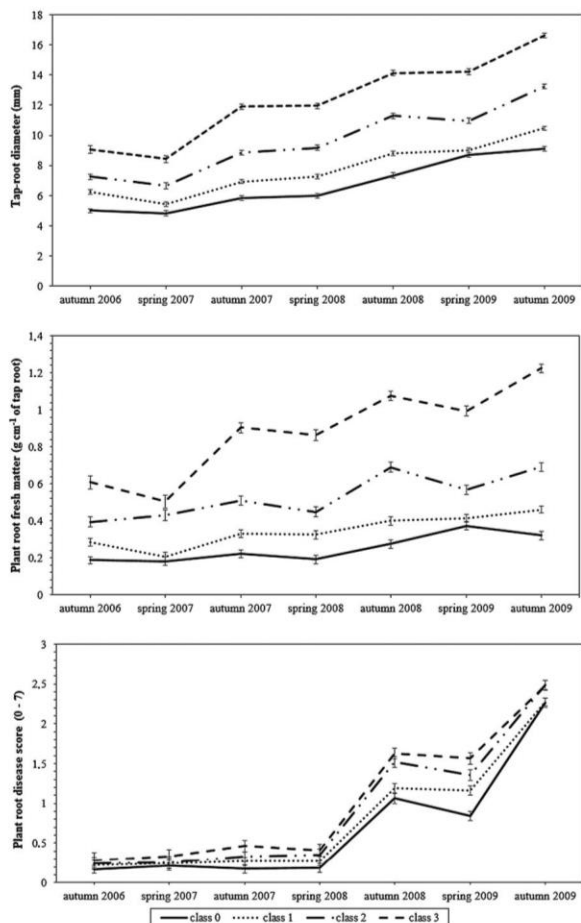


Fig. 1. Effect of root branching classes on tap-root diameter, plant root fresh matter and root disease score at the plant level. Class 0 = 0 LRN (lateral root number), Class 1 = LRN 1–2, Class 2 = LRN 3–4, Class 3 = LRN 5 and more. Vertical bars represent standard errors of mean.

comparison with that study, a similar average value of TD (10 mm) and rate of development (+ 2 mm per growing season) was observed in the present study for plants from 2 to 4 years old (2007–2009). Suzuki (1991) reported an average LRN that was twice as large as in the present study (7.4 vs. 3.6, respectively) and a larger development rate over time. The greater LRN in Suzuki (1991) could be attributed to the lower stand density in that experiment, given that fewer than 100 plants m⁻² survived the first winter and only about 40 plants m⁻² remained in subsequent years. A positive relationship between TD and LRN has been

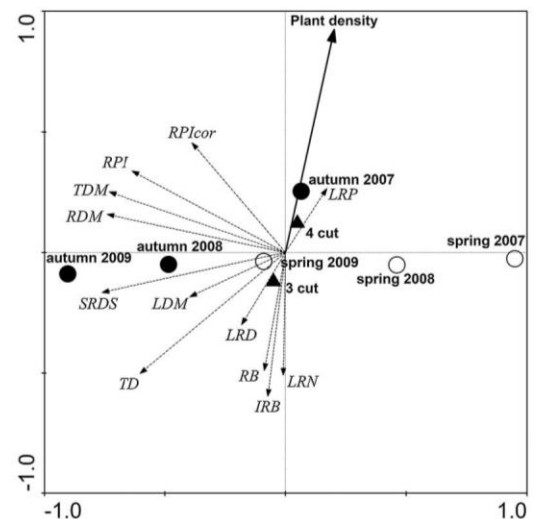


Fig. 2. Ordination biplot showing relationships between lucerne root morphology traits at stand level (dependent variables, broken line arrows) with respect to explanatory variables: plant density (bold line arrows) and labels for cutting management (triangles) and root sampling periods (spring = empty circles, autumn = full circles). Description of acronyms for root morphology traits is given in Table 2.

confirmed within plants of the same age (Johnson et al., 1998), in the seeding year (Lamb et al., 2000b), from year to year (Lamb et al., 2000a) as well as over a seven-year experiment (Hakl et al., 2011). The tendency for an increase in LRD together with TD was shown by Johnson et al. (1998) and is also visible in the present study (Fig. 2). In an opposite trend to TD, LRP decreased with time and increased with plant density (Fig. 2). Values of LRP varied from 27 to 41 mm, which are larger values than previously reported (Gaughan, 2012) for initial growth stages, but there is lack of multi-year studies describing changes of LRP over time. The higher LRP value seems to be indicator for reduced intensity of root branching.

Although RDA indicated that cutting management does not explain a large part of root traits variability in lucerne (Table 6), its effect was significant for most plant and stand root traits (Table 3 and 4). According to Ventroni et al. (2010), higher cutting frequency resulted in reduced plant survival. This was not the case in the present study, although this probably reflects the relatively small differences in intensity between cutting managements. Regarding root morphology, traits at the plant level (TD, LRD and RFM; Table 3) and at the stand level (TD, IRB, RB, LDM, and RPI; Table 4) were clearly reduced under the four-cut management, relative to the three-cut management. These results demonstrated that the application of a higher cutting frequency reduced the development of root traits morphology and, especially,

resulted in a lower intensity of root branching. The four-cut management resulted in a significantly higher TDM but lower LDM relative to the three-cut management. Reduced root branching has been reported to be associated with lower above-ground biomass (McIntosh and Miller, 1980). This is in line with the present study, in which the higher cutting frequency resulted in lower DMY. The higher value of TD was positively related to stem number per plant (Suzuki, 1991) and forage yield (Lamb et al., 2000b). Therefore, the reduction of TD under higher cut frequency could result in lower shoot number m^{-2} and shoot mass, as reported by Ventroni et al. (2010). Difference in total RDM (tap and lateral roots) between the two cutting managements was near significance. It seems that a more intensive cutting frequency may not limit RDM and PD but it probably reduces the productivity (herbage accumulation) of plants by altering their root morphology traits. Ventroni et al. (2010) suggested that a decreasing crown size could explain lower plant productivity. The present results, however, propose reduced root branching as an explanation for lower TD and consequently for reduced plant productivity.

A comparison of varieties was not a focus of the present study because only European varieties with similar fall dormancy were evaluated. The results revealed, however, that differences between varieties may be detected for almost all traits. This finding is consistent with previous research that has documented the possibility for detecting differences in root traits among lucerne varieties (Johnson et al., 1998), lucerne subspecies (Haki et al., 2010), or different selected progenies (Lamb et al., 1999). It seems that differences among varieties or genotypes can be detected in spite of density changes in relation with plant age.

4.2. Tap-rooted vs. branch-rooted plants

The higher productive potential of branch-rooted plants reported by McIntosh and Miller (1980) and Saindon et al. (1991) corresponds with the results in Table 5, where significant differences in root traits among different classes of root branching are presented. The increase in LRN corresponds to an increase in TD and RFM, two traits that are known to be correlated with DMY (Lamb et al., 2000b; Odorizzi et al., 2008). Lamb et al. (1999) also reported a positive association between TD and LRN. The increase in LRN also corresponds to a decrease in LRP and LRD. The effect of branching classes can be influenced by plant development over time (Suzuki, 1991) since older plants generally provided larger values for TD and RFM. Avoiding the time effect, Fig. 1 confirmed that the above trends for TD and RFM in relation with LRN were independent of plant age, and that differences between branching classes even increased over the 4-year period. Lamb et al. (2000b) did not observe significant differences in disease rating for selected tap-rooted populations in comparison with branch-rooted populations. In contrast, the results presented here showed a significant increase in PRDS under higher classes of root branching. This discrepancy can be explained by the relatively smaller differences in root traits between the populations reported by Lamb et al. (2000b) in comparison with the highly contrasted root traits between classes in the present study. Differences between root branching classes for PRDS were consistent over time (Fig. 1), although they were larger in autumn 2008 and spring 2009.

It can be concluded that higher production potential of branch-rooted plants was realized through larger TD and RFM independently of the sampling period. Increase in DMY over years implies that the production potential of the stand can be maintained or even increased through higher intensity of root branching. On the other hand, this potential could be reduced by a higher disease score; for tap-rooted plants (class 1) this was considerably lower, on average approximately half the score of plants that had 5 and more lateral roots (class 3).

4.3. Relationships among root traits and contribution of external factors

All of the above mentioned results show the combined effects of the decreasing plant density that occurs over subsequent sampling periods. These effects could not be easily separated in the short-term studies that are usually conducted with plants at lower plant density in contrast to common stands. Moreover, a common simple correlation approach fails to provide a causative explanation for these complex processes.

The results for RDA identified that sampling period (time) was the most important factor, and it explained more than half of the total variability in stand root traits (26.8% of 45.1%; Table 6). This effect of time was related mainly to root mass accumulation (RDM, TDM and LDM) together with TD increase, which is visible on the horizontal axis of Fig. 2. Plant density was the second most important factor explaining variability (13.5% of 45.1%). In the field environment, PD can be considered as a factor that primarily controls the changes in lucerne root branching (RB, LRN, LRD, LRP) which is demonstrated on the vertical canonical axis of Fig. 2. Lower PD was also related to a larger TD value, and the initialization of growth of lateral roots under conditions of lower plant density is probably a stimulus for TD increase. For RB, time seems to be a secondary factor, being derived from a natural decrease in PD over time. Intensive root branching as main response to lower PD is also in line with the work of Lamb et al. (2000a) which showed that solid-seeded plants needed more time to show maximum expression of root traits than spaced plants. The key impact of density on root branching is also supported by the results from a previous study (Haki et al., 2011) where extremely high density eliminated root branching in the seeding year, and where LRN and RB were strongly reduced for up to 6 years of vegetation. According to Lamb et al. (2000a), the LRN score per plant increased up to the 20th week after planting, and 7 lateral roots per plant were observed for the solid-seeded treatment with a seeding rate of 84 germinated seeds m^{-2} . In the present experiment, the lower value of 2.9 lateral roots per branched root plant at the 27th week was associated with a much higher plant density (700 germinated seeds m^{-2}). The results presented in Table 3 showed that the increase in LRN mostly occurred between the seeding year and the following year. Haki et al. (2011) also reported that the correlation between PD and RB decreased over time, which suggests that the effect of plant density could play a critical role in the seeding year. McIntosh and Miller (1980) reported similar ratios of branch-rooted plants in spite of their lower plant density (4 plants m^{-2}). Indeed, lateral root initiation was reported to begin as soon as the primary root reached 10–14 cm (Gaughan, 2012).

4.4. Effect of stand root morphology traits on forage yield and disease score

Lucerne DMY in experimental plots is generally influenced by environmental factors such as weather and soil nutrient concentration (Haki et al., 2016) and anthropogenic factors like cutting management (Ventroni et al., 2010) or tractor wheeling (Glaž, 2008). Taking all factors into account, the direct contribution of root morphology trait to DMY variability is probably not very high. Indeed, Odorizzi et al. (2008) did not find a simple correlation between DMY and most of the root traits in their study. In the present study, after excluding the effect of lucerne variety and sampling period, root morphology significantly explained about 10% of DMY variability (Table 6, Analysis 3). Plant density and TD showed positive but small response to DMY. This result is in line with the positive but inconsistent relationship between TD and DMY observed by Lamb et al. (2000b) under 170 plants m^{-2} , observed only in the first year of the experiment out of two. Increasing LRD and decreasing LRP provided better response to DMY than LRN (Fig. 3), in contrast with reported positive correlation between DMY and LRN (McIntosh and Miller, 1980; Saindon et al., 1991). Discrepancy in association between DMY and plant branching between studies could emerge from different plant age, spatial arrangement, as well as from contrast between plant vs. stand traits, or greenhouse vs. field

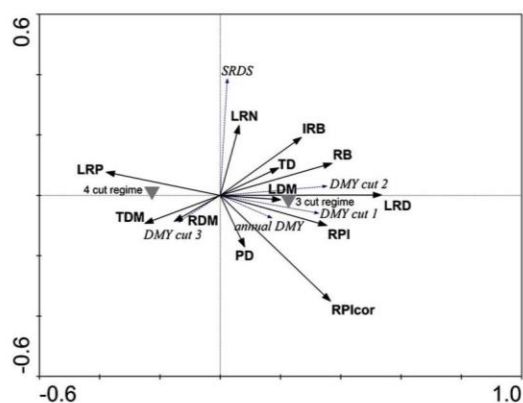


Fig. 3. Ordination triplot showing relationships between annual and cuts dry matter yield (dependent variables, broken line arrows) and root morphology traits at stand level (explanatory variables, bold line arrows) with respect to cutting management (supplementary variables, triangles). Description of acronyms for root morphology traits is given in Table 2.

experiments. Present results clearly documented positive relationships between DMY and stand root branching traits (IRB, RB) in field environment, in line with results of Lamb et al. (2000b) where DMY was positively associated with more intensive root branching. It can be explained by the positive effect of root branching on increasing the TD, which was documented in Table 4. As already mentioned, lucerne plants with higher TD produced larger amount of stems per plant (Suzuki, 1991). Shoot height, which was recognized by Ventroni et al. (2010) as influencing DMY, could also be higher for plants with higher TD.

Lucerne plants are prone to many diseases affecting foliage and roots (Frame, 2005). Root disease (SRDS and PRDS) could also affect DMY. In the present study, SRDS increased with time (Tables 4 and 6), and was especially higher in 2009, which appears to be the coldest and the most humid year of this experiment. Nevertheless, this year also provided the highest DMY due to favourable weather condition. LRN was positively correlated with SRDS (Fig. 3) in the second canonical axes.

4.5. Optimization of root morphology evaluation in field environment

This study demonstrated that the range of lucerne root morphology traits that can be measured in the field provided only low relationship with plot DMY under multidimensional visualisation. The closest relation to DMY showed LRD (first canonical axis) but this is evaluated rarely and it is difficult to measure for more lateral roots per plant. Plant density is traditionally evaluated in most studies with regard to DMY and yield components (Ventroni et al., 2010) and plant size (expressed as TD) is also recommended (Lamb et al., 2000a). Fig. 3 shows that DMY is related to both TD and PD. Therefore, an optimal balance between plant size and density is necessary to reflect DMY. The proposed RPI integrates plant size through TD, which was able to reflect the effect of root branching, together with PD, as a variable related to the area. The RPI resulted in the closest correlation with annual and first cut yield in this study (see Fig. 3). Differences in RPI also positively correspond with significant differences in DMY between three- and four-cut management. Based on this result, RPI can be considered as the closest predictor of the productive potential of lucerne stand derived from simple traits of root morphology. It could be used also for practical comparison of various experimental treatments (e.g. seeding rate, fertilization) in field studies in relation to their impact on root development and potential productivity.

Correction of RPI for SRDS (RPI_{cor}) was not beneficial in this study and gave the same score on the first canonical axis with respect to DMY. This could be due to the low range of disease scores in this experiment

and the highest rainfall in 2009.

Regarding the root dry matter, the soil sampling to 20–25 cm depth (the arable cultivation layer in the experiment) did not allow access of the total root mass, and lucerne roots can reach up to 370 cm (Fan et al., 2016). Despite this limitation, for practical reasons sampling is usually restricted to the arable cultivation layer (Johnson et al., 1998; Lamb et al., 2000b; Hák et al., 2011). According to Fan et al. (2016), 50% of lucerne root mass is located in the 0–18 cm soil layer; therefore this layer should be representative for this evaluation. Root dry matter in the arable layer does not always correlate with root system size, but can be compared within the same *Medicago* subspecies (Hák et al., 2010). After excluding the effects of lucerne varieties and sampling period, results of the RDA in Fig. 3 documented that DMY was not positively related to stand RDM or TDM. Some studies have documented a positive relation between root mass and forage yield (McIntosh and Miller, 1980; Saindon et al., 1991) but no consistent relation was found by Lamb et al. (2000b). The present results are also in line with findings of Annicchiarico (2007) where DMY differences among varieties did not correspond with their root dry matter, when evaluated in a metal container. On the other hand, Annicchiarico (2007) observed a positive relationship between DMY and root dry matter under drought stress. This is in accordance with the correlation between RDM, TDM and DMY at the third cut in the present study (Fig. 3), where high temperatures and occurrence of drought at this period of the summer are common. It can be concluded that higher dry root mass accumulation can be beneficial under stress conditions, but it is unlikely to provide any DMY advantage in a favorable environment. These results support the idea that the study of lucerne root systems should not focus only on total root mass but rather it should include morphology traits, especially in terms of understanding effects on DMY. Indeed, this study has highlighted that some calculated traits of stand root morphology, such as RPI, can show a more close relationship to DMY than other simple root traits or the quantity of root mass in the arable layer. An understanding of these relationships between root morphology and lucerne stand performance can help in breeding selection as well as in effective lucerne stand evaluation.

5. Conclusion

Our study provides evidence that: (i) a greater frequency of cutting reduced TD and root branching traits which resulted in lower yield; (ii) sampling period and PD contributed to about 40% of total variability of stand root morphology traits, and that period was positively associated with TD and root mass accumulation whereas PD determined the changes in root branching; (iii) DMY was not associated with RDM but was positively related to root branching traits, and (iv) a proposed RPI integrating TD and PD correlated better with DMY than any other individual root traits investigated. It was clearly demonstrated that root morphology is an effective tool for characterizing lucerne grown in a common stand, which have the potential to explain yield differences among various experimental treatments.

Funding

This research was supported by “S” grant of MŠMT ČR.

Acknowledgement

We thank Kamila Mášková for assistance in field measurements, Eva Vlková for cultivation of disease agents and Marie-Noëlle Thivierge for careful reading and useful comments.

References

Annicchiarico, P., 2007. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops*

- Res. 102, 51–59.
- Chloupek, O., Skácel, M., Ehrengergerová, J., 1999. Effect of divergent selection for root size in field-grown alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 79, 93–95.
- Chmelíková, L., Wolfrum, S., Schmid, A., Hejman, M., Hülsbergen, K.J., 2015. Seasonal development of biomass yield in grass legume mixture on different soils and development of above- and belowground organs of *Medicago sativa*. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 329–346.
- Fan, J., McConkey, B., Wang, H., Janzen, H., 2016. Root distribution by depth for temperate agricultural crops. *Field Crops Res.* 189, 68–74.
- Frame, J., 2005. Forage Legumes for Temperate Grasslands. FAO and Enfield NH: Science Publishers Inc, Rome, pp. 101–115.
- Głab, T., 2008. Effects of tractor wheeling on root morphology and yield of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Grass Forage Sci.* 63, 398–406.
- Garver, S., 1922. Alfalfa root studies. US Department of Agriculture. Washington D. C. No. 1087.
- Gaughan, B.J., 2012. Seedling root morphology of six alfalfa populations. *J. Undergraduate Res.* 10 (1), 3.
- Hák, J., Hrevušová, Z., Krajč, L., Drobná, J., 2010. The comparison of root system size among selected populations within *Medicago sativa* complex. *Sci. Agricult. Bohemica* 41 (3), 129–133.
- Hák, J., Fuksa, P., Šantrůček, J., Mášková, K., 2011. The development of lucerne root morphology traits under high initial stand density within a seven year period. *Plant Soil Environ.* 57, 81–87.
- Hák, J., Kunzová, E., Konečná, J., 2016. Impact of long-term organic and mineral fertilization on lucerne forage yield over 8 year period. *Plant Soil Environ.* 62 (1), 36–41.
- Johnson, L.D., Marquez-Ortiz, J.J., Barnes, D.K., Lamb, J.F.S., 1996. Inheritance of root traits in alfalfa. *Crop Sci.* 36 (6), 1482–1487.
- Johnson, L.D., Marquez-Ortiz, J., Lamb, J.F.S., Barnes, D.K., 1998. Root morphology of alfalfa plant introductions and cultivar. *Crop Sci.* 38, 497–502.
- Kůdela, V., 1970. A way to evaluate the resistance of lucerne varieties to vascular wilt (in Czech). *Rostlinná výroba* 16 (9), 1041–1050.
- Kalu, B.A., Fick, G.W., 1983. Morphological stage of development as a predictor of alfalfa herbage quality. *Crop Sci.* 36, 91–97.
- Lamb, J.F.S., Barnes, D.K., Henjum, K.I., 1999. Gain from two cycles of divergent selection for root morphology in alfalfa. *Crop Sci.* 39, 1026–1035.
- Lamb, J.F.S., Johnson, L.D., Barnes, D.K., Marquez-Ortiz, J., 2000a. A method to characterize root morphology traits in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 80, 97–104.
- Lamb, J.F.S., Samac, N.A., Barnes, D.K., Henjum, K.I., 2000b. Increased herbage yield in alfalfa associated with selection fibrous and lateral roots. *Crop Sci.* 40, 693–699.
- McIntosh, M.S., Miller, D.A., 1980. Development of root branching in three alfalfa cultivars. *Crop Sci.* 20, 807–809.
- Odorizzi, A., Basigalup, D., Arolfo, V., Balzarini, M., 2008. Root traits variability in alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations with a high number of lateral roots (in Spanish). *Agriscientia* 25, 65–74.
- Pederson, G.A., Hill, R.R., Kendall, W.A., 1984. Genetic variability for root characters in alfalfa populations differing in winterhardiness. *Crop Sci.* 24, 465–468.
- Russelle, M.P., Lamb, J.A.F.S., 2011. Divergent alfalfa root system architecture is maintained across environment and nutrient supply. *Agron. J.* 103, 1115–1123.
- Saindon, G., Michaud, R., St-Pierre, C.A., 1991. Breeding for root yield in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 71 (3), 727–735.
- StatSoft, Inc., 2012. Statistica for Windows. StatSoft, Tulsa, USA.
- Suzuki, M., 1991. Effect of stand age on agronomic morphological, and chemical characteristic of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 71, 445–452.
- Thivierge, M.-N., Angers, D.A., Chantigny, M.H., Seguin, P., Vanasse, A., 2016. Root traits and carbon input in field-grown sweet pearl millet, sweet sorghum, and grain corn. *Agron. J.* 108, 459–471.
- Vasileva, V., Pachev, I., 2015. Root mass accumulation after different fertilization and soil cultivation of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Appl. Sci.* 15, 1245–1250.
- Vaughan, L.V., MacAdam, J.W., Smith, S.E., Dudley, L.M., 2002. Root growth and yield of differing alfalfa rooting populations under increasing salinity and zero leaching. *Crop Sci.* 42, 2064–2071.
- Ventroni, L.M., Volenec, J.J., Cangiano, C.A., 2010. Fall dormancy and cutting frequency impact on alfalfa yield and yield components. *Field Crops Res.* 119, 252–259.
- ter Braak, C.J.F., Šmilauer, P., 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca USA.

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., Fuksa, P., Šantrůček, J. 2018.



Development of lucerne root morphology traits in lucerne-grass mixture in relation to forage yield and root disease score

Josef Hakl*, Martin Písařčík, Pavel Fuksa, Jaromír Šantrůček

Department of Forage Crops and Grassland Management, Czech University of Life Sciences Prague, 165 00 Praha-Suchdol, Czech Republic



ARTICLE INFO

Keywords:

Forage
Alfalfa
Medicago
Festulolium
Tap-root diameter
Root branching

ABSTRACT

It is a common practice to grow lucerne (*Medicago sativa* L.) in mixture with grass. The development of lucerne root morphology along with concomitant forage mixture growth, however, has been rarely studied in multi-year field experiments. Our objectives were: (i) to assess the effect of a grass component on lucerne root trait development, (ii) to evaluate changes in forage yield and aboveground traits in the lucerne monocultures and lucerne-grass mixtures and (iii) to investigate the relationships between root traits and lucerne yield, total forage yield, as well as forage aboveground traits, using multivariate methods. Treatments were a factorial combination of four lucerne varieties and three lucerne sowing ratios [100% (L100), 90% (L90) and 75% (L75)] with grass hybrid *Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum* under a three-cut harvesting regime in a 4-year experiment. Lucerne yield, total forage yield and forage aboveground traits were evaluated at each cut. Each autumn, lucerne plants were evaluated for root morphology traits and scored for root disease. The negative impact of the presence of a grass component on lucerne root morphology development was observed only in combination with the higher lucerne sowing ratio (L90), with reduced intensity of root branching and increased depth of the first lateral root. In two post-seeding years out of three, total forage yield was 4–8 % higher for lucerne-grass mixture in comparison with monoculture. From all lucerne yield components in the mixture, stem density was the best predictor for lucerne yield. Lucerne root morphology explains about 10% of forage yield and aboveground traits variability where calculated root potential index, lucerne plant density and root dry matter mostly correlated with lucerne yield in the mixture. Root potential index was an effective indicator for monitoring root development and was even effective for comparing lucerne varieties in mixture. Understanding the relationships between root morphology development and lucerne stand performance in a mixture can help in optimization of sowing ratio and stand evaluation.

1. Introduction

Lucerne (*Medicago sativa* L.) is a forage legume frequently sown in mixture with grasses or grown alone as a monoculture. There is an agronomic benefit of legume-grass mixtures, compared with monocultures, in terms of increased forage yield (Sturludóttir et al., 2014) and specifically for lucerne-grass mixtures by numerous studies (Thompson, 2013; Hakl et al., 2014; Tracy et al., 2016). The inclusion of a grass component with lucerne may also reduce weed ingress (Sanderson et al., 2012; Bélanger et al., 2014), increase the sward's adaptability to environmental changes and give a more balanced nutrient composition for successful ensiling or animal feeding (Frame et al., 1997). The extent of lucerne-grass mixture implementation is

more pronounced in areas with humid climate conditions and it reaches about 20% of the total lucerne area in central Europe (Hakl et al., 2014). Legume-grass mixtures are predominant on dairy farms in northern areas of North America (Thivierge et al., 2016).

The growing of lucerne in association with grass species has been widely investigated, and research in this field has generally focused on forage stand productivity in terms of adaptability across multiple environments (Tracy et al., 2016), growth and nutritive value under climate change (Thivierge et al., 2016), comparison of different companion grass species (Thompson, 2013), species evenness (Sanderson et al., 2012), forage nutritive value (Vasileva and Naydenova, 2017) or weed suppression (Bélanger et al., 2014). Other aspects frequently reported are the impact of lucerne-grass mixtures on N yield and N₂

Abbreviations: IRB, intensity of root-branching; LRD, lateral root diameter; LRN, lateral root number; LRP, lateral root position; PRDS, plant root disease score; RB, percentage of branch-rooted plants; RPI, root potential index; SRDS, stand root disease score; TD, tap-root diameter

* Corresponding author at: Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Kamýcká 129, Praha – Suchdol, 165 00, Czech Republic.

E-mail address: hakl@af.czu.cz (J. Hakl).

<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.07.009>

Received 23 March 2018; Received in revised form 18 July 2018; Accepted 20 July 2018
0378-4290/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

fixation (Rasmussen et al., 2012), or N transfer to grass species (Louarn et al., 2015).

Despite previous extensive research, less attention has been paid to belowground biomass in these mixtures. According to Chmelíková et al. (2015), a holistic analysis including above- and belowground traits should be used for the evaluation of forage crops. Ghimire et al. (2014) investigated soil organic matter contribution of lucerne-grass stands and reported that conventional management yielded more forage dry matter while reduced-tillage accumulated more soil organic carbon. Lucerne rooting strategy and rhizodeposit quality also has been considered responsible for differences in amounts and dynamics of N transfer to grasses (Louarn et al., 2015). Total root biomass in lucerne-grass mixture has not been found to be higher than that of lucerne grown in monoculture (Pietsch et al., 2007). As noted by Hák et al. (2017), the study of lucerne root systems should not focus only on total root mass but should also include morphology traits and focus on the relationship between these traits and forage yield.

For lucerne monoculture, the critical role of root morphology in persistence and productivity has been recognized (Johnson et al., 1998; Lamb et al., 1999). Suitable methodology for investigation of lucerne root morphology was proposed by Lamb et al. (2000a) for field plots using plants with uniform spacing. In row-seeded stands, lucerne root morphology development is affected by genotype \times environment interactions (Pederson et al., 1984), stand age (Suzuki, 1991) and changes in plant density (Hák et al., 2017). A large pool of root morphology traits can be measured on individual plants (Johnson et al., 1998). The difference between root traits at the plant level and at the stand level, however, must be carefully distinguished in field environments. A previous study comparing the contribution of root morphology traits to the agronomic performance of lucerne revealed that a root potential index (RPI) integrating tap-root diameter and plant density correlated better with plot forage yield than any other individual root trait investigated (Hák et al., 2017).

In spite of well-documented positive relationships established between root traits and stand productivity, lucerne root morphology traits have never been investigated in a multi-year field study comparing lucerne monoculture with lucerne-grass mixtures. Therefore, a field study with lucerne sown in monoculture and mixtures varying in grass sowing ratios was conducted over a 4-year period with the following aims: (i) to assess the effect of a grass component on lucerne root trait development at the plant and stand level; (ii) to evaluate changes in forage traits at the stand level in the lucerne monoculture and lucerne-grass mixtures; (iii) to investigate differences in root traits among lucerne varieties in relation to forage traits; and (iv) to investigate the relationships between root traits and forage structure traits, forage yield and root disease resistance. Clarification of these complex relationships could be valuable for optimization of lucerne root morphology development in the lucerne-grass mixtures.

2. Materials and methods

2.1. Field experiment

The experiment was established in 2008 on a clay-loam Haplic Luvisol at the experimental field station Červený Újezd, Czech Republic (50°04' N, 14°10' E; elevation 410 m a.s.l.). The long term (50-year) mean annual temperature of the site is 7.7 °C and cumulative annual rainfall is 493 mm. Four lucerne varieties (Jarka, Oslava, Tereza, Zuzana) were established and managed under three sowing ratios [100% in lucerne monoculture (L100), and in mixtures with grass comprising 90% (L90) or 75% (L75) of lucerne seed numbers]. The grass component was a festulolium of ryegrass type (var. Achilles), which is a hybrid between meadow fescue (*Festuca pratensis*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). A completely randomised block design with four replicates was used. Consequently, there were 12 plots of 7.2 \times 2.5 m in each block. Plots were never fertilized.

Table 1

Annual temperature and precipitation, root sampling area and sampling dates, and forage harvest dates and dry matter yield for the four years of the study.

Year	2008	2009	2010	2011
Annual temperature mean (°C)	9.2	8.8	7.4	9.1
Annual cumulated precipitation (mm)	518	554	763	541
Root sampling area (cm \times cm)	25 \times 25	25 \times 30	25 \times 40	25 \times 50
Root sampling dates	12 November	2 November	1 November	31 October
Forage harvest dates				
Cut 1	16 July	25 May	30 May	26 May
Cut 2	9 October	16 July	13 July	13 July
Cut 3		8 October	6 October	6 October
Annual plot forage dry matter yield (Mg ha ⁻¹)	3.29	17.09	17.43	14.87

The long term (50-year) mean annual temperature is 7.7 °C and cumulative annual rainfall is 493 mm.

The plots were established on 24 April 2008 by row sowing (with 0.125 m between rows). The 700 viable seeds were sown per m² for all lucerne varieties in monoculture, corresponding to 15.6–20.3 kg seeds ha⁻¹ depending upon seed characteristics. In the mixtures, seeding rates were reduced to 90% (L90) and 75% (L75) of the monoculture. The seeding rate of the grass component in the mixture was of 3.0 kg ha⁻¹ (in L90) and 7.6 kg ha⁻¹ (in L75). In the seeding year there were two harvests only, and in subsequent years the plots were cut three times per year. Except for the seeding year, cutting dates were determined by the bud stage and flowering stage for first cut and subsequent cuts, respectively. Annual weather data and cutting dates are presented in Table 1. Fresh matter yield was assessed by harvesting 10 m² in the centre of each plot using a mower (MF-70, Agrostroj Jičín, Czech Republic) with a working width of 1.4 m.

2.2. Forage sampling and forage structure traits measurement

Before each harvest, a permanent quadrat (25 cm \times 20 cm, fixed on right side of the harvested strip) was manually harvested in each plot by cutting plants at 5 cm aboveground. The following forage traits were evaluated for the lucerne and grass components in the sample (Table 2): stem density (stem m⁻²), maximal stem length in the sample (cm) and mean stem dry weight (g stem⁻¹). Stems included tillers in the case of festulolium. A subsample of approximately 200 g from each quadrat was oven-dried at 60 °C for 48 h to enable determination of the proportion of lucerne (g kg⁻¹) in total dry matter yield. Lucerne yield (Mg ha⁻¹) was consequently calculated from fresh matter yield in the harvested strip (10 m²) and dry matter content and lucerne proportion in the permanent quadrat.

2.3. Root sampling

From autumn 2008 to autumn 2011, plant root systems were dug to a depth of about 20–25 cm outside the harvested area of each plot. It was necessary to increase the root sampling area on successive samplings to provide a similar number of plants. Plant density (plant m⁻²) was derived from plant count per sample and size of the root sampling area. Sampling dates and size of the root sampling areas are presented in Table 1. Root samples hand-washed before measurements of root morphology were made.

2.4. Measurements and calculation of root morphology traits

The plant root traits evaluated (Table 2) were tap-root diameter

Table 2

Variables and their descriptions, acronyms, means, standard deviations (SD) and ranges of lucerne root and forage traits evaluated at plant or stand level.

Variables	Root traits at plant level (n = 2864)					Root traits at stand level (n = 192)			
	Acronyms	mean	SD	min	max	mean	SD	min	max
Root morphology and plant density									
Tap-root diameter below the crown (mm)	TD	7.29	3.93	1.00	25.00	8.70	3.52	2.84	21.00
Lateral root diameter (mm)	LRD	1.7	0.8	1.0	8.0	1.8	0.4	1.0	3.2
Plant density (number of lucerne plant m ⁻²)						188	148	16	912
Root dry matter (g m ⁻²)						324	146	66	909
Root potential index = area of TD cross section per area unit (cm ² m ⁻²)	RPI					78.0	33.7	14.1	166.0
Root branching									
Lateral root position (depth of first branching in mm)	LRP	36.9	34.2	4.0	350.0	34.9	14.3	8.0	107.2
Lateral root number (per branch-rooted plant)	LRN	3.2	2.6	1.0	24.0	3.5	2.0	1.0	15.7
Intensity of root-branching (lateral root number plant ⁻¹ in the sample)	IRB					1.33	0.71	0.05	3.00
Percentage of branch-rooted plants (%)	RB					71	24	5	100
Root disease									
Plant root disease score (for root disease infestation, 1 to 7)	PRDS	1.18	1.60	0.00	7.00				
Stand root disease score expressed as the potential reduction of stand productivity (%)	SRDS					22.7	18.4	0.0	75.1
Forage traits at stand level									
		Lucerne (n = 528)				Grass (n = 352)			
		mean	SD	min	max	mean	SD	min	max
Maximal stem length in the sample (cm)		86.5	22.7	20.0	130.0	49.0	44.0	0	130.0
Stem density (stem m ⁻²)		603	226	120	1400	293	327	0	2400
Mean stem dry weight (g stem ⁻¹)		1.21	0.60	0.11	3.65	0.18	0.33	0	6.52
Proportion of lucerne in total yield (g kg ⁻¹)		900.0	122.1	374.4	1000.0				
Lucerne dry matter yield (Mg ha ⁻¹)		11.8	5.4	1.9	18.8				
Total dry matter yield (all species, Mg ha ⁻¹)		13.2	5.9	2.5	19.3				

below the crown (TD, mm), lateral root position (LRP, depth of the lateral root closest to the crown, mm), lateral root number per plant tap-root (LRN, when larger than 1 mm), and lateral root diameter (LRD, measured near the tap-root, mm). Root samples were oven-dried at 60 °C and total root dry matter (g m⁻²) was calculated based on the size of the sampling area

Plant root disease score (PRDS) was scored subjectively and based on discoloration on a cross-cut of the tap-root following Kúdela (1970). This rating was used: 0 = healthy plant, no discoloration in the root; 1–6 = living plant with increasing level of root damage; 7 = dead plant. The stand root disease score (SRDS, %) represented the theoretical lucerne yield reduction based on average autumn plot PRDS in line with Haki et al. (2017). For plant traits related to lateral roots, the average value was calculated only for branch-rooted plants, while intensity of root-branching (IRB) was calculated as average LRN per plant, including plants that were not branch-rooted. The percentage of branch-rooted plants (BR, %) was calculated for each sample. The root potential index (RPI) was used as an indicator integrating TD and plant density (Haki et al., 2017). Values for root traits were expressed per plant (n = 2864) and per stand as average of the plants in the sampling area (n = 192).

2.5. Statistical analysis

A two-way analysis of variance (ANOVA) within each sowing ratio was used to investigate differences in root traits at plant and stand levels. Influence of sowing ratio on root morphology traits was analysed by a three-way ANOVA. Lucerne plant density differed between varieties and for this reason it was used as a covariate for selected root variables. Differences in annual lucerne and total yield were analysed separately by a two-way ANOVA within each year, and the influence of

successive cuts on forage yield was investigated by three-way ANOVA. Effect of the sowing ratio on forage traits was investigated by a three-way ANOVA within each year. Influence of cut order on forage traits was analysed by a four-way ANOVA. All factors were considered as fixed, and significant differences between means were reported using the Tukey HSD test at $\alpha = 0.05$. All these analyses were carried out using the STATISTICA program (StatSoft, 2012).

Redundancy analysis (RDA) was used to investigate the contribution of stand root morphology traits to annual plot yield and average plot forage traits across cuts. The effect of year and variety were excluded as covariates. The option of centre and standardization by dependent variables was used in the RDA. The statistical significance of the first and all of the other constrained canonical axes was determined by the Monte Carlo permutation test (499 permutations). Ordination analyses were performed in the CANOCO 4.5 program (ter Braak and Šmilauer, 2002).

The ordination biplot of RDA presents relationships between mixture total yield, lucerne yield and forage traits (dependent variables), and stand root morphology traits (explanatory variables). The biplot was created in CanoDraw (Microcomputer Power, Ithaca, NY).

3. Results

Overview of descriptions and basic statistical characteristics of all evaluated root morphology traits at plant and stand levels as well as forage traits, together with their means and variability, are summarized in Table 2. For root morphology, 192 stand samples were evaluated, representing a total of 2864 plants. In total, 528 forage samples were evaluated in 11 cuts.

Table 3
Effect of year within lucerne sowing ratio and effect of lucerne sowing ratio on lucerne root morphology traits evaluated at plant level.

Year	Lucerne sowing ratio	All plants			Branch-rooted plants			
		Tap-root diameter	Plant root disease score	n	Lateral root position	Lateral root number	Lateral root diameter	n
2008	L100	3.69 ^d	0.14 ^d	404	32.4 ^{ab}	2.0 ^b	1.5 ^b	150
2009		6.67 ^c	0.87 ^c	348	38.3 ^a	2.3 ^b	1.5 ^b	215
2010		9.62 ^b	1.89 ^b	242	38.5 ^a	4.0 ^a	1.9 ^a	200
2011		12.27 ^a	3.31 ^a	135	27.2 ^b	4.2 ^a	1.9 ^a	117
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001		0.010	< 0.001	< 0.001	
2008	L90	4.04 ^d	0.13 ^d	304	40.6	2.0 ^c	1.6 ^b	87
2009		7.11 ^c	1.09 ^c	272	38.2	2.8 ^b	1.7 ^{ab}	172
2010		8.77 ^b	1.40 ^b	263	42.0	3.4 ^a	1.7 ^{ab}	195
2011		11.47 ^a	2.83 ^a	136	38.1	4.0 ^a	1.9 ^a	103
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001		0.674	< 0.001	0.018	
2008	L75	4.60 ^d	0.27 ^d	222	38.4 ^{ab}	2.0 ^c	1.5 ^b	83
2009		8.00 ^c	1.14 ^c	193	42.9 ^a	3.2 ^a	1.8 ^b	132
2010		9.44 ^b	1.70 ^b	216	31.8 ^b	3.8 ^{ab}	1.8 ^b	188
2011		11.97 ^a	3.17 ^a	129	31.4 ^b	4.4 ^b	2.1 ^a	111
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001		0.019	< 0.001	< 0.001	
Mean across years	L100	7.92 ^c	1.51 ^{ab}	1129	34.5 ^b	3.1	1.72	682
	L90	7.89 ^b	1.38 ^b	975	39.2 ^a	3.1	1.73	557
	L75	8.51 ^a	1.57 ^a	760	35.6 ^{ab}	3.3	1.78	514
	<i>P</i> **	< 0.001	0.006		0.047	0.168	0.436	

P: probability; * two-way ANOVA (year, variety) within each lucerne sowing ratio; ** three-way ANOVA (year, lucerne sowing ratio, variety); different letters indicate statistical differences between years* or sowing ratios** for Tukey HSD, α = 0.05.

Table 4
Effect of year within lucerne sowing ratio and effect of lucerne sowing ratio on lucerne root morphology traits evaluated at stand level. Results are averaged among lucerne varieties.

Year	Lucerne sowing ratio	Plant density	Tap-root diameter	Intensity of root-branching	Percentage of branch-rooted plants	Root dry matter	Root potential index	Stand root disease score
2008	L100	404 ^a	4.02 ^d	0.70 ^b	49 ^c	236 ^b	44.6 ^c	2.7 ^d
2009		290 ^a	7.23 ^c	1.05 ^b	67 ^b	424 ^a	101.6 ^{ab}	13.9 ^c
2010		151 ^b	10.79 ^b	1.82 ^a	87 ^a	464 ^a	113.0 ^a	30.4 ^b
2011		68 ^b	12.85 ^a	1.94 ^a	89 ^a	287 ^b	81.6 ^b	48.6 ^a
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
2008	L90	304 ^a	4.37 ^d	0.52 ^c	38 ^b	177 ^b	40.2 ^c	2.0 ^c
2009		227 ^{ab}	7.54 ^c	1.13 ^b	68 ^a	416 ^a	91.7 ^b	15.8 ^b
2010		164 ^{bc}	9.55 ^b	1.52 ^{ab}	81 ^a	456 ^a	102.7 ^a	21.1 ^b
2011		68 ^c	12.10 ^a	1.58 ^a	78 ^a	269 ^b	71.6 ^b	44.0 ^a
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
2008	L75	222 ^a	4.75 ^c	0.57 ^b	43 ^c	140 ^c	36.5 ^c	3.4 ^d
2009		161 ^{ab}	8.78 ^b	1.43 ^a	75 ^b	374 ^a	82.8 ^{ab}	17.1 ^c
2010		135 ^{ac}	10.00 ^b	1.76 ^a	90 ^a	393 ^a	96.3 ^a	25.5 ^b
2011		65 ^c	12.45 ^a	1.92 ^a	89 ^a	251 ^b	74.0 ^b	47.7 ^a
	<i>P</i> *	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Mean across years	L100	228 ^a	8.72	1.38 ^{ab}	73 ^{ab}	353 ^a	85.2 ^a	23.9
	L90	191 ^{ab}	8.39	1.19 ^b	66 ^b	329 ^{ab}	76.5 ^{ab}	20.7
	L75	146 ^b	8.99	1.42 ^a	74 ^a	290 ^b	72.4 ^b	23.4
	<i>P</i> **	< 0.001	0.182	0.022	0.020	0.002	0.007	0.089

P: probability; * two-way ANOVA (year, variety) within each lucerne sowing ratio; ** three-way ANOVA (year, lucerne sowing ratio, variety); different letters indicate statistical differences between years* or sowing ratios** for Tukey HSD, α = 0.05.

3.1. Lucerne root morphology development under different sowing ratios

The development of root morphology at plant level from 2008 to 2011 within each sowing ratio is reported in Table 3. With the exception of LRP, a constant significant increase of all evaluated traits over time is clearly visible (*P* < 0.001) within each sowing ratio. The LRP decreased slightly over time with L100 and L75 sowing ratios whilst it remained statistically unchanged with L90. When averaged across years, the impact of the sowing ratio was significant (*P* < 0.05) for TD, PRDS and LRP, and L75 provided the highest values for all these variables except of LRP. Lucerne sowing ratio L90 reached the lowest TD

and the highest LRP in comparison with other treatments.

The development of stand root morphology traits over time within each sowing ratio is reported in Table 4. In contrast to plant level, TD at stand level was not significantly different between sowing ratios. Lucerne plant density significantly decreased over time whereas TD and SRDS increased (*P* < 0.001). With the L100 sowing ratio, the decrease in plant density was significant from year to year, whereas significant differences were only detected after two years with L90, and after three years with L75. The general increase with years in root branching traits (IRB, RB) was observed within all sowing ratios. Root dry matter and RPI increased up to 2010 and then were significantly reduced in 2011

Table 5

Effect of lucerne sowing ratio within year and effect of cut order on dry matter yield and forage structure traits at stand level. Results are averaged among lucerne varieties. Results by year represent the sum (yield) or the average (all other variates) for cuts.

Year	Lucerne sowing ratio	Total yield	Lucerne yield	Lucerne				Grass		
				Stem length	Stem density	Stem weight	Lucerne proportion	Stem length	Stem density	Stem weight
2008	L75	3.3 ^{ab}	2.5 ^c	44.5	558 ^b	0.43	752 ^b	32.6	622 ^a	0.11
	L90	3.1 ^b	2.7 ^b	45.4	614 ^{ab}	0.43	881 ^a	30.3	320 ^b	0.12
	L100	3.4 ^a	3.4 ^a	48.7	720 ^a	0.49	100	0	0	0
	<i>P</i> *	0.011	< 0.001	<i>P</i> **	0.119	0.012	0.419	< 0.001	0.231	< 0.001
2009	L75	16.9	13.2 ^c	89.5 ^c	546 ^c	1.41	775 ^b	84.4 ^a	755 ^a	0.38
	L90	17.0	14.6 ^b	94.2 ^b	642 ^b	1.45	867 ^a	76.5 ^b	487 ^b	0.26
	L100	17.4	17.4 ^a	100.7 ^a	787 ^a	1.36	1000	0	0	0
	<i>P</i> *	0.102	< 0.001	<i>P</i> **	< 0.001	< 0.001	0.569	< 0.001	0.042	< 0.001
2010	L75	18.0 ^a	14.7 ^b	101.5	554 ^b	1.30	838 ^b	84.2	483 ^a	0.27
	L90	17.7 ^a	15.4 ^{ab}	98.5	599 ^b	1.18	889 ^a	81.7	325 ^b	0.26
	L100	16.6 ^b	16.6 ^a	101.3	693 ^a	1.26	1000	0	0	0
	<i>P</i> *	0.002	< 0.001	<i>P</i> **	0.223	< 0.001	0.233	0.001	0.355	< 0.001
2011	L75	15.3 ^a	13.0 ^b	92.2	487 ^b	1.47	858 ^b	90.7 ^a	321 ^a	0.34
	L90	14.9 ^{ab}	13.6 ^a	90.1	488 ^b	1.49	914 ^a	78.0 ^b	213 ^b	0.29
	L100	14.5 ^b	14.5 ^b	91.0	575 ^a	1.53	1000	0	0	0
	<i>P</i> *	0.035	< 0.001	<i>P</i> **	0.521	0.001	0.641	0.002	0.006	< 0.001
Cut	1	6.8 ^a	6.2 ^a	98.2 ^a	697 ^a	1.6 ^a	857 ^b	95.2 ^b	455 ^a	0.34 ^a
	2	5.9 ^b	5.1 ^b	100.6 ^a	639 ^b	1.2 ^c	798 ^c	102.2 ^a	491 ^a	0.42 ^a
	3	3.7 ^c	3.5 ^c	87.5 ^b	455 ^c	1.4 ^b	916 ^a	50.3 ^c	346 ^b	0.14 ^b
	<i>P</i> ***	< 0.001	< 0.001	<i>P</i> ***	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

P: probability; * two-way ANOVA (lucerne sowing ratio, variety) within each year; ** three-way ANOVA (cut order, lucerne sowing ratio, variety) within each year; ***four-way ANOVA (year, lucerne sowing ratio, cut order, variety); different letters indicate statistical differences between sowing ratios or cuts for Tukey HSD, $\alpha = 0.05$.

for all sowing ratios. When averaged across years, lucerne plant density, root dry matter and RPI increased with increasing sowing ratios. The sowing ratio L90 provided a significant decrease in root branching traits (IRB and RB), together with the lowest SRDS.

3.2. Impact of lucerne sowing ratio on forage yield and forage structure traits

The effect of sowing ratio and cuts on forage yield and stand structure is summarized in Table 5. For every year of the experiment, annual lucerne yield was significantly lower at the L75 sowing ratio than with L100. Annual total yield varied among years depending on weather conditions. The greatest total yield was observed with the L100 sowing ratio in 2008, whereas it was greater with L75 than L100 in 2010 and 2011.

Lucerne stem length was not influenced by sowing ratios in any year with the exception of 2009, where a significant decrease in stem length was observed with sowing ratios from L100 to L75. Lucerne stem density was consistently reduced in lucerne-grass mixture (sowing ratios L75 and L90) in comparison with lucerne pure stand (L100). Real lucerne proportions in the mixture mostly corresponded to sowing ratios in 2008 and 2009 and then increased in 2010 and 2011, but there was always a significant difference between L75 and L90. Grass stem density was consistently greater with L75 than L90 sowing ratios. In 2009 and 2011, a grass stem length was higher in L75 in comparison with L90. Sowing ratio had no impact on lucerne or grass stem weight. Effect of cut was significant for all forage traits ($P < 0.001$).

3.3. Differences among lucerne varieties in root and forage traits

The results of varieties comparison in root morphology and forage structure traits are summarized in Table 6. There were differences between varieties for root traits in LRD and PRDS at plant level. For root traits at stand level, only RPI and SRDS were significantly different among varieties, and TD reached $P 0.055$. Tukey’s HSD did not show any significant differences for RPI but variety Jarka provided a

considerably lower value in comparison with other varieties. The variety Zuzana provided a better root disease resistance than variety Jarka at plant and stand level. With respect to forage aboveground traits, differences between varieties were detected in lucerne stem length, density and weight, where variety Zuzana achieved significantly higher density and lower length and weight in comparison with variety Jarka.

3.4. Contribution of root morphology traits to forage structure traits and dry matter yield

The contribution of root morphology traits to annual total and lucerne forage yields and means of forage structure traits across cuts in post-seeding years was investigated in a RDA analysis (Fig. 1). With the use of lucerne variety and year as covariates, root morphology significantly explained 9.7% of yield and forage traits variability in the grass mixture ($P < 0.014$). The horizontal axis represents the opposite association between lucerne yield, proportion in the mixture, stem length and density, which are located on the right, and grass stem length, weight and density, on the left side. An increase of root traits such as RPI, plant density and root dry matter supported an increase in lucerne forage traits whereas an increase in grass forage traits was correlated with higher LRP. The vertical axis represents total yield with negative correlation to lucerne stem weight, LRN and other root-branching traits as well as to higher SRDS. Stand root disease score increased especially with root branching traits (Fig. 1 and Table 4) and this effect was independent on changes in lucerne yield. Correction of RPI for SRDS following Hakl et al. (2017) was not beneficial for yield prediction or any other evaluation in comparison with RPI (data not shown).

Table 6

Effect of variety on root morphology traits, dry matter yield and forage traits over years. Results are averaged among years and represent the sum (total yield and lucerne yield) or the average (all other variates) for all forage cuts.

Group of traits	Traits	Variety				Covariate	
		Zuzana	Tereza	Jarka	Oslava	P	P
Root morphology traits at plant level	Lateral root number	3.0	3.3	3.1	3.0	< 0.001	0.150
	Lateral root diameter	1.9 ^a	1.7 ^b	1.7 ^{ab}	1.7 ^b	< 0.001	0.005
	Plant root disease score	1.30 ^b	1.60 ^{ab}	1.58 ^a	1.48 ^{ab}	–	< 0.001
Root morphology traits at stand level	Plant density	204	195	155	199	–	0.139
	Tap-root diameter	8.48	9.14	8.85	8.34	< 0.001	0.055
	Intensity of root-branching	1.33	1.34	1.39	1.25	< 0.001	0.454
	Percentage of branch-rooted plants	73	71	72	69	< 0.001	0.441
	Root dry matter	344	324	313	315	< 0.001	0.320
	Root potential index	81.9 ^a	78.5 ^a	70.1 ^a	81.7 ^a	–	0.044
	Stand root disease score	19.3 ^b	25.1 ^a	24.4 ^a	21.9 ^{ab}	–	0.006
Forage traits at stand level	Total dry matter yield	16.7	16.4	16.2	16.5	–	0.283
	Lucerne dry matter yield	14.8	14.8	14.6	14.9	–	0.660
	Lucerne maximal stem length	92.5 ^b	96.1 ^{ab}	97.7 ^a	95.4 ^{ab}	–	0.005
	Lucerne stem density	632 ^a	585 ^{ab}	564 ^b	606 ^{ab}	–	0.017
	Lucerne mean stem dry weight	1.28 ^b	1.44 ^{ab}	1.47 ^a	1.34 ^{ab}	–	0.013
	Grass maximal stem length	83.5	83.7	80.1	83.0	–	0.621
	Grass stem density	444	457	443	379	–	0.231
	Grass mean stem dry weight	0.36	0.28	0.26	0.30	–	0.398
	Proportion of lucerne	84.2	86.0	86.0	86.6	–	0.509

P: probability; three-way ANOVA or ANCOVA; plant density was used as a covariate for selected variables, different letters indicate statistical differences between varieties for Tukey HSD, $\alpha = 0.05$.

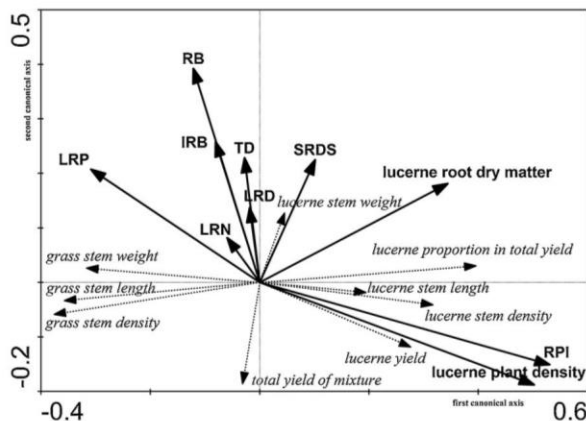


Fig. 1. Ordination biplot showing relationships between total and lucerne yield, lucerne and grass forage traits in post-seeding years (dependent variables, broken line arrows) and root morphology traits at stand level (explanatory variables, bold line arrows). Description of acronyms for root morphology is given in Table 2.

4. Discussion

4.1. Development of root traits and plant density under different sowing ratios

The development of plant root traits over time follows a pattern described by Hák et al. (2017) in a four-year field study with lucerne monoculture. The increase of TD and of the occurrence of roots of 2nd and 3rd order over the growing season was reported in Chmelíková et al. (2015) for lucerne roots in mixture with grass and the positive correlation between TD and root branching traits was presented by Johnson et al. (1998). In lucerne monoculture, LRP of root-branched plants was reported to decrease slightly over time (Hák et al., 2017). In the present experiment, this pattern was also observed for the L100 (pure lucerne) and L75 sowing ratios, but not for the L90. The L90 sowing ratio also had a significantly higher average LRP value than the

monoculture. This effect was not associated with lower LRN or LRD at plant level, in contrast to the significant positive correlation among LRP, LRN and LRD reported by Johnson et al. (1998). It seems that the presence of grass in the mixture in combination with higher lucerne plant density caused an increase in depth of root branching but did not influence other traits for root-branched plants. The highest values of TD with the L75 sowing ratio, when averaged among years, could be explained by the lowest average lucerne plant density for this treatment. Lamb et al. (2000a) also reported the effect of plant density on TD for lucerne, especially in the first years of growth.

Slowed development of the stand root traits was expected in the mixture, whereas only RPI and root dry matter decreased with the increase in the proportion of grass. Unexpectedly, root branching traits (IRB and RB) reached the lowest values with the L90 sowing ratio, although these traits did not significantly differ from pure lucerne (L100). This can be explained by the driving role of plant density in lucerne root branching, in accordance with the findings reported by Hák et al. (2017). In the mixture with grasses, lucerne root branching corresponded better with lucerne plant density than with sowing ratio. Lowest values of root branching with the L90 sowing ratio could be caused by interaction of higher lucerne plant density with grass concurrence in the mixture. The lowest value SRDS with the L90 can only be considered as an indirect effect of reduced root branching, in line with Hák et al. (2017), who demonstrated that lower intensity of root branching is associated with a decrease in root disease infestation.

Although there was a wide range in plant density, from 404 plants m⁻² in the monoculture to 222 plants m⁻² with the L75 sowing ratio in the seeding year, this evolved to a narrower range of 65–68 plants m⁻² across sowing ratios in the last year of experiment. This suggests a more rapid decline of lucerne plant density in monoculture in comparison with lucerne-grass mixture. This finding contrasts with results from Bélanger et al. (2014), where the presence of about 25% of timothy (*Phleum pratense*) in mixture with lucerne reduced the survival of lucerne plants in contrast to that of the monoculture. Generalization of results about the presence of grass on lucerne survival is difficult because of differences in experimental conditions between studies (choice of the grass species, proportion of grass in the mixture, water status at the studied site).

4.2. Changes in forage yield and forage structure traits under different lucerne sowing ratio

Total yield of both mixtures (L75 and L90) was 7.5% higher than that of the monoculture (L100) in 2010, and total yield of the mixture with L75 was also 5.5% higher than that of the monoculture in 2011, which corresponded with the significantly higher total yield of legume-grass mixtures reported by many studies (Husse et al., 2016; Elgersma and Søgaard, 2016). According to Sturludóttir et al. (2014), mixtures of grasses and clovers were between 7 and 15% more productive than the most productive monoculture in their study conducted over a number of sites in Northern Europe and Canada. For lucerne–grass mixtures, the equal yield for mixtures was observed by Pietsch et al. (2007) but significant increases in total yield have been often reported in comparison with monoculture (Haki et al., 2014), with average yield increase from 8% to 15% in field plot experiments (Thompson, 2013; Bélanger et al., 2014; Tracy et al., 2016).

Higher total yield of mixtures has been explained by asynchrony of seasonal stem growth (Husse et al., 2016), N transfer to grasses (Louarn et al., 2015), variable N₂ fixation (Rasmussen et al., 2012), more effective N acquisition (Nyfeler et al., 2011) or application of suitable N fertilization management (Tracy et al., 2016). Only a few studies have supported explanations of yield changes by monitoring of yield components such as stem density and mean stem weight. Lucerne plant density decreased over time, as also observed in Bélanger et al. (2014), which should result in changes of forage structure traits. From all monitored forage traits in the mixture, lucerne stem density showed the best correspondence with differences of lucerne yield between sowing treatments: this trait seems therefore to be an indicator for improved lucerne yield in the mixture. The similar plant density of 65–68 plants m⁻² for monoculture and both mixtures, in contrast with significantly higher lucerne stem density for monoculture in 2011, suggests it was the presence of the grass component and not a lower lucerne plant density that reduced lucerne stem density in the mixture.

For the lucerne monoculture, Ventroni et al. (2010) reported the stem height was the yield component that had the most impact on forage yield. In this experiment, the drier and warm conditions in the year 2009 contrast to 2010 might have contributed to reduction of lucerne stem length in the mixture with grass. Year 2011 had similar weather conditions without an effect on this trait, probably due to the decrease of grass proportion in line with a lower persistence of ryegrass type of festulolium. In 2010, favourable conditions (cold and humid weather) resulted in non-limited growth of lucerne and grass stems in all treatments. This suggests that a reduction of lucerne stem growth in the mixture with grasses could occur only with a high grass proportion together with limiting environmental factors such as a dry period.

4.3. Utilization of root morphology for variety comparison in lucerne-grass mixture

The focus here was whether root morphology of lucerne varieties can contribute in explaining inter-varietal differences in performance in the mixture or can help with selection of suitable varieties for growing in mixtures with grass. The comparison of varieties at plant level was consistent with previous research that documented the possibility of detecting differences in root traits among lucerne varieties (Johnson et al., 1998), or different selected progenies (Lamb et al., 1999). According to Haki et al. (2017), root traits measured at plant level may not reflect differences at stand level, which have a higher relevance to yield. Chmelíková et al. (2015) reported differences between TD among sites measured at plant level but it did not correspond with yield differences among these sites. Association between differences in root and forage traits among varieties seem to demonstrate that the higher RPI value could be a suitable indicator for variety productivity in the mixture because it supports higher lucerne stem density.

4.4. Effect of stand root morphology traits on forage yield, forage structure traits and stand root disease score

Although higher value of TD could be associated with stem number per plant (Suzuki, 1991), shoot height (Ventroni et al., 2010) or higher yield (Lamb et al., 2000b), this relationship seems to have been less important in this study where TD was not correlated with lucerne stem density or length in the mixture. This could be because the lucerne plant density showed a strong correlation with stem density and length. It seems that plant density played a more important role for lucerne yield and forage traits in the mixture than previously reported for lucerne in monoculture (Haki et al., 2017).

Root branching is considered to be beneficial for lucerne yield (Lamb et al., 2000b). Increasing LRD and decreasing LRP were found to correspond better to yield changes than LRN (Haki et al., 2017). The results of the present study demonstrated that greater root branching traits only slightly supported lucerne stem weight, but did not influence lucerne yield and in fact, total yield was inversely related to lucerne root branching (Fig. 1). It can be summarized that lucerne root branching may not be beneficial for total yield in the lucerne-grass mixtures. Positive correlation of LRP with grass stem traits indicate that grasses in mixture caused lucerne to form its root branches deeper than when it was grown in monoculture. Changes in plant density also contributed more to lucerne yield than previously observed in lucerne monoculture. Higher lucerne dry root mass accumulation can be beneficial for improving yield under stress conditions (Annicchiarico, 2007; Haki et al., 2017). Greater lucerne root dry matter resulted in greater lucerne yield and this supports the idea that the presence of a grass component in the mixture can be considered as a stress factor. However, it had no impact on total yield.

Root potential index in lucerne grass mixture was also found to be strongly correlated to lucerne traits, especially lucerne yield, stem density and proportion in total yield of mixture, in line with its previously reported positive relation to lucerne yield in monoculture (Haki et al., 2017). Variety comparison demonstrated that differences in RPI seemed to correspond better than plant density, root dry matter or root branching, with significant differences in forage traits between varieties. Based on this result, RPI integrating plant density and TD can be considered as the closest root indicator for the productive potential of lucerne in the lucerne-grass mixture.

In the present study, SRDS was not affected by presence of a grass component but it varied significantly among years and varieties. Reduced lucerne root branching in the mixture with grasses can contribute to lower SRDS, in line with the findings of Haki et al. (2017) in lucerne monoculture.

5. Conclusion

Our study provides evidence that: (i) the presence of a grass component in the mixture increases LRP of branch-rooted plants and reduces root branching traits at stand level at L90, in comparison with L75, and this difference was related to changes in lucerne plant density; (ii) the mixture provided higher total yield than lucerne in monoculture and lucerne stem density determines the changes in lucerne forage yield better than any other individual forage traits; (iii) RPI can be an effective indicator tool for variety comparison in the mixture enabling explanation of differences in forage traits, and (iv) lucerne yield and stem density were positively associated with plant density, RPI and root dry matter but not with root branching traits. This study has highlighted that effective evaluation of lucerne root morphology should include assessment of plant density, TD and LRN with calculation of RPI and IRB. Lateral root position can be of interest in lucerne-grass mixtures because of its positive correlation with grass proportion. Lower lucerne plant density can be considered as a factor promoting its root development when sown in mixture with grass, where plant density and root dry matter contribute more to lucerne yield than when sown in

monoculture.

Funding

This research was supported by “S” grant of MSMT CR. The completion of the paper was supported by project SV17-16-21240 of Grant Agency of the Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague.

Acknowledgements

We thank Ladislav Krajčič for assistance in field measurements and Marie-Noëlle Thivierge for careful reading and useful comments.

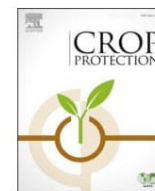
References

- Annicchiarico, P., 2007. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops Res.* 102, 51–59.
- Bélanger, G., Castonguay, Y., Lajeunesse, J., 2014. Benefits of mixing timothy with alfalfa for forage yield, nutritive value, and weed suppression in northern environments. *Can. J. Plant Sci.* 94, 51–60.
- Chmelková, L., Wolfrum, S., Schmid, A., Hejman, M., Hülsbergen, K.J., 2015. Seasonal development of biomass yield in grass legume mixture on different soils and development of above- and belowground organs of *Medicago sativa*. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 329–346.
- Elgersma, A., Soegaard, K., 2016. Effects of species diversity on seasonal variation in herbage yield and nutritive value of seven binary grass-legume mixtures and pure grass under cutting. *Eur. J. Agron.* 78, 73–83.
- Frame, J., Charlton, J.F.L., Laidlaw, A.S., 1997. *Temperate Forage Legumes*. CAB, Wallingford, UK 317 p.
- Ghimire, R., Norton, J.B., Pendall, E., 2014. Alfalfa-grass biomass, soil organic carbon, and total nitrogen under different management approaches in an irrigated agroecosystem. *Plant Soil* 374, 173–184.
- Hakl, J., Fuksa, P., Konečná, J., Páček, L., Šantrůček, J., 2014. Effect of applied cultivation technology and environmental conditions on lucerne farm yield in the Central Europe. *Plant Soil Environ.* 60, 475–480.
- Hakl, J., Písařík, M., Hřevušová, J., Šantrůček, J., 2017. In-field lucerne root morphology traits over time in relation to forage yield, plant density, and root disease under two cutting management. *Field Crop Res.* 213, 109–117.
- Husse, S., Huguenin-Elie, O., Buchmann, N., Lüscher, A., 2016. Larger yields of mixtures than monocultures of cultivated grassland species match with asynchrony in shoot growth among species but not with increased light interception. *Field Crops Res.* 194, 1–11.
- Johnson, L.D., Marquez-Ortiz, J., Lamb, J.F.S., Barnes, D.K., 1998. Root morphology of alfalfa plant introductions and cultivar. *Crop Sci.* 38, 497–502.
- Kůdela, V., 1970. A way to evaluate the resistance of lucerne varieties to vascular wilt (in Czech). *Rostlinná výroba* 16 (9), 1041–1050.
- Lamb, J.F.S., Barnes, D.K., Henjum, K.I., 1999. Gain from two cycles of divergent selection for root morphology in alfalfa. *Crop Sci.* 39, 1026–1035.
- Lamb, J.F.S., Johnson, L.D., Barnes, D.K., Marquez-Ortiz, J., 2000a. A method to characterize root morphology traits in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 80, 97–104.
- Lamb, J.F.S., Samac, N.A., Barnes, D.K., Henjum, K.I., 2000b. Increased herbage yield in alfalfa associated with selection fibrous and lateral roots. *Crop Sci.* 40, 693–699.
- Louarn, G., Pereira-Lopès, E., Fustec, J., Mary, B., Voisin, A.S., de Faccio Carvalho, P.C., Gastal, F., 2015. The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. *Plant Soil* 389, 289–305.
- Nyfefer, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E., Lüscher, A., 2011. Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 155–163.
- Pederson, G.A., Hill, R.R., Kendall, W.A., 1984. Genetic variability for root characters in alfalfa populations differing in winterhardiness. *Crop Sci.* 24, 465–468.
- Pietsch, G., Friedel, J.K., Freyer, B., 2007. Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Res.* 102, 104–118.
- Rasmussen, J., Soegaard, K., Pirhofer-Walzl, K., Eriksen, J., 2012. N 2-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. *Eur. J. Agron.* 36, 66–74.
- Sanderson, M.A., Brink, G., Ruth, L., Stout, R., 2012. Grass-legume mixtures suppress weeds during establishment better than monocultures. *Agron. J.* 104, 36–42.
- StatSoft Inc, 2012. *Statistica for Windows*. StatSoft, Tulsa, USA.
- Sturludóttir, E., Brophy, C., Bélanger, G., Gustavsson, A.M., Jørgensen, M., Lunnan, T., Helgadóttir, Á., 2014. Benefits of mixing grasses and legumes for herbage yield and nutritive value in Northern Europe and Canada. *Grass Forage Sci.* 69 (2), 229–240.
- Suzuki, M., 1991. Effect of stand age on agronomic, morphological, and chemical characteristic of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 71, 445–452.
- ter Braak, C.J.F., Šmilauer, P., 2002. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)*. Microcomputer Power, Ithaca, USA.
- Thivierge, M.N., Jégo, G., Bélanger, G., Bertrand, A., Tremblay, G.F., Rotz, C.A., Qian, B., 2016. Predicted yield and nutritive value of an alfalfa-timothy mixture under climate change and elevated atmospheric carbon dioxide. *Agron. J.* 108, 585–603.
- Thompson, D., 2013. Yield and nutritive value of irrigated tall fescue compared with orchardgrass: in monocultures or mixed with alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 93, 799–807.
- Tracy, B.F., Albrecht, K., Flores, J., Hall, M., Islam, A., Jones, G., Lamp, W., MacAdam, J.W., Skinner, H., Teutsch, C., 2016. Evaluation of alfalfa-tall fescue mixtures across multiple environments. *Crop Sci.* 56, 2026–2034.
- Vasileva, V., Naydenova, Y., 2017. Nutritive value of forage biomass from mixtures of alfalfa with cocksfoot and tall fescue. *J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci.* 5 (3), 121–129.
- Ventroni, L.M., Volenc, J.J., Cangiano, C.A., 2010. Fall dormancy and cutting frequency impact on alfalfa yield and yield components. *Field Crops Res.* 119, 252–259.

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 (In press).

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



Martin Písařík, Josef Hakl^{*}, Zuzana Hrevušová

Department of Agroecology and Crop Production, Czech University of Life Sciences Prague, 165 00, Praha, Suchbát, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Trifolium pratense
Root branching
Biological control
Pythium oligandrum
Poly-beta-hydroxy butyric acid

ABSTRACT

Root diseases of red clover (*Trifolium pratense* L.) contribute to reduced persistence and production of sown red clover stands; however, the potential of biological control of these diseases has not yet been investigated. Our objectives were to determine the effect of application of *Pythium oligandrum* and poly-beta-hydroxy butyric acid on (i) plant density and root morphology development, (ii) relationships between root branching and plant root disease score and (iii) forage yield and yield components of red clover in a three-year field experiment. Two red clover varieties (Start and Callisto) were established and managed under cutting (3 cuts per year) with four treatments: untreated control; spraying of poly-beta-hydroxy butyric acid (Albit); or application of *P. oligandrum* (Polyversum) at two intensities. Each autumn, plants were evaluated for root morphology traits and scored for root diseases. Forage dry matter yield, compressed stand height and stem density were evaluated in each cut. Effects on root discoloration were visible only in the last year of the experiment where significantly lower disease score was detected for both Polyversum treatments (4.58) compared with untreated control (4.94). In that year, Polyversum application at the higher intensity promoted increased tap-root diameter (+4%), root branching (+27%), stand height (+13%) and forage yield (+18%) in comparison with the control treatment. Improved forage yield was associated with plant growth stimulation more than from protection against *Fusarium*. Relationships among root traits and aboveground biomass highlight the need for evaluation of the effects of biological control of forage legumes considering root disease occurrence, together with root morphology traits and forage yield. This study demonstrated a potential of *P. oligandrum* for improving red clover yield, but optimization of application timing is necessary for determination of practical recommendations and economic efficiency.

1. Introduction

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a one of the most important perennial forage legumes of temperate climate zones worldwide (Riday, 2010). It is mainly used for cutting in sown grass–clover leys of 2–4 years duration, but it also occurs naturally in permanent grassland (Boller et al., 2010). Lower persistence of red clover in comparison with lucerne (*Medicago sativa* L.) has been documented for field production (Marley et al., 2003) and poor persistence presents a problem for farmers globally. Therefore, improvement of red clover yield is rarely carried out without simultaneously paying attention to resistance against biotic and abiotic stresses (Boller et al., 2010). Among factors affecting persistence can be considered the advancing age in conjunction with effects of

weather, cultivar, nutrition, intensity of cutting, pests and diseases or a combination of these (<https://onlinelibrary-wiley-com.infozdroje.czu.cz/doi/full/10.1111/j.1365-2494.2003.00392.x>; Frame, 1986; Sheldrick et al., 1986; Stoltz and Wallenhammar, 2012). Mortality of red clover plants is most frequently observed in conjunction with deteriorating crowns and roots (Riday, 2010). Many studies have documented that these root diseases cause significantly reduced red clover persistence and productivity in Europe (Ylimäki, 1967; Hejduk, 2006; Wallenhammar et al., 2006; Marshall et al., 2017) and elsewhere, including North America (Marten, 1989; Christie and Martin, 1999) and New Zealand (Skipp and Christensen, 1990). Root diseases are mainly caused by the *Fusarium* genus, where pathogenicity has been shown to differ significantly among species and among strains within species (Leath and

^{*} Corresponding author. Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Kamýcká 129, 165 00, Praha, Suchbát, Czech Republic.
E-mail address: hakl@af.czu.cz (J. Hakl).

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104968>

Received 17 April 2019; Received in revised form 12 September 2019; Accepted 19 September 2019

Available online 20 September 2019

0261-2194/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Kendall, 1978). Root damage usually develops rapidly in early spring, particularly when clover stands have been weakened over-the winter. *Fusarium* is considered the most important genus for decline of red clover persistence in Europe (Hejduk, 2006; Wallenhammar et al., 2006). Crown rot is caused by *Sclerotinia* spp and is more serious in areas with long winter periods whereas root rot can be observed during the growing period in north Europe (Ylimäki, 1967). In recent years there have also been failures of red clover in the field because of southern anthracnose, a disease caused by the fungus *Colletotrichum trifolii*, as shown, for example, in a study from Germany (Jacob et al., 2010).

The breeding of resistant varieties of red clover remains the main strategy for elimination of the effects of these detrimental diseases (Öhberg, 2008; Riday, 2010), and differences in resistance among red clover varieties have been documented in many studies (Hejduk and Knot, 2010; Vleugels et al., 2013). Plant morphology traits have a potential for selection for root disease resistance (Vleugels et al., 2013) and attention needs to be also focused on root morphology as root branching has been found to be positively related to its persistence (Montpetit and Coulman, 1991a). Persistent plants have a root system that has more adventitious roots, and some plants have the ability to regenerate shoots from the tap-root below the crown. Red clover plants with an adventitious root system may not be so severely impacted by individual infections, since loss of a single root would not be as critical as when there is infection and loss of the sole tap root, which essentially destroys the root system (Christie and Martin, 1999). Direct selection for root type in red clover does not necessarily lead to improved persistence but selections from old stands, regardless of root type, were found to lead to an increased frequency of fibrous root-type genotypes (Riday, 2010). According to Vleugels et al. (2013), complete resistance to clover rot may be never achieved, but recurrent selection over successive years is likely to result in improved resistance.

Independently of genotype, occurrence of root diseases is influenced by environmental and agronomic factors including soil pH (Steiner and Alderman, 2003) or intensity of cutting management (Rufelt, 1987). The first experimental investigations of direct protection against *Fusarium* and *Sclerotinia* were made using fungicides on red clover stands in the 1950s and 60s in Sweden (Öhberg, 2008; and references therein). The fungicide Benomyl (methyl 1-[butylcarbamoyl]-2-benzimidazolecarbamate) was found to have positive effects on red clover yield in field experiments (Leath et al., 1973), but subsequent studies reported negative effect in the post-seeding year (Jenkyn, 1975). The imidazole fungicide prochloraz suppressed pathogens in the soil in a greenhouse experiment but at higher concentrations it reduced red clover growth (Nan et al., 1991). There is no recommendation for fungicide use on clover forage, and there may be potential negative environmental impacts on non-target microorganisms, e.g. mycorrhizal fungi (Yang et al., 2011). Currently there are no fungicides registered in the Czech Republic for use on stands of red clover forage.

Biological control is an alternative potential approach for controlling fungal diseases. In this context Öhberg and Bang (2010) confirmed a positive effect of *Coniothrium minutans* when applied before seeding to increase red clover yield infected with *S. trifoliorum*. The genus *Streptomyces* was found to reduce root disease infestation in lucerne in a greenhouse experiment, but positive effects under field conditions were observed only in combination with metalaxyl (Jones and Samac, 1996). Mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, a non-pathogenic soil-inhabiting oomycete, has been observed for other Oomycetes by Veselý (1978). In a review, Benhamou et al. (2012) concluded that *P. oligandrum* has the ability to colonize the root ecosystems of many crop plants, directly attacking soil-borne fungal pathogens, promoting plant growth and increasing crop protection against fungal disease via the activation of the plant immune system. Induced resistance is based on elicitor properties of cell wall protein fractions produced by *P. oligandrum* promoting self-protection of plants (Takenaka, 2003). *Pythium oligandrum* is able to penetrate deeper into the plant tissue compared to other biological control agents, which could lead to higher efficacy (Gebore et al., 2014)

but the positive effect requires *P. oligandrum* to survive in the plant tissues (Le Floch et al., 2007). Utilization of *P. oligandrum* has focused on laboratory and greenhouse experiments, especially for annual crops such as tomato (Hibar et al., 2006), pea (Bradshaw-Smith et al., 1991), sugar beet (Takenaka et al., 2006), potato (Ikeda et al., 2012) or grape vine (Daraignes et al., 2018). There are apparently no published reports of *P. oligandrum* being used as a biological control agent in field experiments with perennial forage legumes.

There is yet another strategy for clover protection based on a group of plant stimulants, including poly-beta-hydroxy butyric acid. Testing of this substance in Russia was found to result in reduced occurrence of foliar disease in red clover and increased fresh matter yield by about 32–41% compared with the control (Kharchenko et al., 2009).

In spite of intensive global research during the last century to find ways of eliminating red clover root diseases, these root infections are still considered to be very important factors that lead to reduced red clover yield and persistence, particularly in Europe. A recent study from the UK reported a very large reduction in red clover herbage yield, from 13.9 t ha⁻¹ in the first to 3.4 t ha⁻¹ in the fourth post-seeding year (Marshall et al., 2017). Apart of selecting more resistant cultivars there are no direct crop protection treatments available for farmers. Fungicides have shown some positive effects under experimental conditions but their use is currently not economic in practice and may have negative environmental effects. The alternative approach of biological treatments represents an interesting way of addressing the problem, but this potential has not yet been investigated by field studies, particularly in the context of Central Europe. Research requirements include practical field-plot experiments including assessments of effects on forage yield and root disease score, but attention should be also paid to development of root morphology and monitoring of yield components. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of application of *P. oligandrum* and poly-beta-hydroxy butyric acid on (i) plant density and root morphology development, (ii) relationships between root branching, plant root disease score and stand productivity, (iii) forage yield and yield components of two red clover varieties in a three-year field experiment. These comprehensive evaluations provide valuable results for understanding the simultaneous effects of disease control on red clover root development, and the occurrence of root discoloration in association with stand performance.

2. Materials and methods

2.1. Field experiment

The three-year field experiment was established on April 2016 at the Plant Breeding Station Větrov of OSEVA UNI a. s. in the Czech Republic (620 m a.s.l.; GPS 49°30'58.79"N 14°27'59.57"E). The long-term (50-year) mean annual temperature is 7.2 °C and cumulative annual rainfall is 655 mm. The soil is loamy sand, moderately acid Cambisol. The site for the experiment was ploughed in autumn 2015 and cultivated before seeding. There was no evidence of red clover plants growing on the experimental site during the previous twenty years. The experiment included 2 × 4 factorial arrangements in completely randomized block design with 4 replications. Factors were two red clover varieties and four treatments of crop protection, thus comprising a total of 32 plots each of 10 m² area. The red clover varieties Start and Callisto were established at a seeding rate of 700 viable seeds per m² for both varieties, which corresponds to 16 kg seeds per hectare. Sowing was done on 25 April 2016 using a seed drill with 0.125 m between rows. The four treatments for control of disease were: untreated control, spraying of *P. oligandrum* in two different intensities (either once or three times per year) or poly-beta-hydroxy butyric acid (autumn application), always in the early regrowth stage within ten days after cutting. The utilization management comprised three cuts per year in years 2 and 3, and 2 cuts in year 1.

Product Polyversum® (Biopreparáty spol. s r. o., Czech Republic) was used as a source of *P. oligandrum* whereas poly-beta-hydroxy butyric

acid came from Albit® (OONPF Albit, Russia). The preparations and timing of applications are described in Table 1. Polyversum was activated 3 h before application. The treatments were applied in 0.03 L of water per m² (equivalent to 300 L of water per hectare) and were always applied in humid weather without intense sunshine, using a backpack sprayer (Cooper Pegler 15 EVO) with a working pressure of 3 bar.

2.2. Root morphology and root discoloration score

In each autumn of 2016–2018 (years 1–3), plants were dug to a depth of about 20–25 cm in each plot. The sampling area was increased from 25 × 12.5 cm in year 1 to 100 × 12.5 cm in order to provide a similar number of plants under the natural decrease of plant density. Plant density (PD, plants m⁻²) was calculated from the number of plants per sample and size of the root sampling area. Sampling dates and size of the root sampling areas are presented in Table 1. For each plant, the tap-root diameter below the crown (TD, mm) and the number of lateral roots per plant tap-root (LRN, when larger than 1 mm) were measured. Fine root mass (FRM, when less than 1 mm) occurrence was scored subjectively from 1 to 5 with scores of 1, 3, and 5 indicating none, moderate, and many fine roots, respectively. Plant root disease score (PRDS) was scored subjectively and based on discoloration on a cross-cut of the tap-root. The scoring, as described in Hák et al. (2017), was as follows: 0 = healthy plant, no discoloration in the root; 1–6 = living plant with increasing levels of root discoloration from 1 to 95% of cross-cut surface, in which class 2, 4 and 6 indicated 6–20, 41–60, and 81–95%, respectively; 7 = dead plant. Ratio of infected plant (IP) was assessed as a proportion of plants with visible root discoloration and plant root disease score values were averaged for discoloured plants. The ratio of branch-rooted plants (RB) was calculated based on LRN occurrence. The root potential index (RPI) integrating tap-root diameter and plant density was calculated according to Hák et al. (2017). Root samples (2 × 5 plants per plot) were taken on 2 October 2018 for precise detection of root pathogens. Tap-roots of five plants from each plot were mixed together, frozen and lyophilized. Quantitative real-time PCR (qPCR) were used for detection of *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani*), *Sclerotinia* and *Colletotrichum*, separately in each mixed sample.

2.3. Forage sampling and measurement of forage structure traits

Cutting was carried out at the bloom stage; dates are summarized in Table 1. Before each harvest, a permanent quadrat (50 cm × 12.5 cm,

Table 1

Annual temperature and precipitation, description of treatments, application dates of preparations, root sampling area and sampling dates, and forage harvest dates, for the three years of the study.

	2016	2017	2018	
Annual temperature mean (°C)	8.3 (+1.0) ^a	8.2 (+1.0) ^a	9.4 (+2.2) ^a	
Annual cumulated precipitation (mm)	668 (+12) ^a	701 (+45) ^a	538 (- 118) ^a	
Treatments	Dose	Application, sampling and harvest dates		
Untreated control (C)	–	–	–	
Albit (A)	40 ml ha ⁻¹	10 Jun, 25 Oct	12 Sep	19 Sep
Polyversum 1 (P1)	100 g ha ⁻¹	25 Oct	12 Sep	19 Sep
Polyversum 3 (P3)	100 g ha ⁻¹	10 Jun, 16 Aug, 25 Oct	16 Jun, 28 Jul, 12 Sep	3 Jun, 16 Jul, 19 Sep
Root sampling dates and sampling area	8 Nov; 25 × 12.5 cm	2 Nov; 50 × 12.5 cm	2 Oct; 100 × 12.5 cm	
Forage harvest dates	11 Aug and 18 Oct	6 Jun, 18 Jul and 6 Sep	29 May, 16 Jul, 19 Sep	

^a Difference from long-term mean (1967–2016).

fixed on the second row of the right side) was harvested in each plot by cutting plants at 5 cm aboveground using hand scissors. In these samples, the number of stems was assessed and stem density (SD, stem m⁻²) was calculated. Samples were oven-dried at 60 °C for 48 h to enable determination of dry matter content. The compressed height (CH, cm) was measured using a simple metal rising plate meter with disc diameter 0.3 m, area 0.07 m² and weight 0.2 kg, and six measurements were taken in each plot according to Hák et al. (2012). Plots were cut and fresh matter yield measured using a Haldrup plot harvester and dry matter yield (DMY) was calculated from average dry matter content.

2.4. Statistical analysis

Due to high natural differences in the evaluated traits among years, all analyses were performed separately for each year. Variables expressed in percentage were arcsin-transformed before analyses and back transformed means are presented in the results. Root morphology traits and root disease score were analysed by three-way ANOVA (treatment, variety, block) where plant density was used as a covariate for root traits analyses. The interaction variety × treatment was only considered in the model. The traits measured in each cut (compressed height and stem density) were evaluated by four-way ANOVA (treatment, variety, block, cut). All factors were considered as fixed, and significant differences between means were tested using the Tukey HSD test at $\alpha = 0.05$. All these analyses were carried out using the STATISTICA program (StatSoft, 2012). Redundancy analysis (RDA) was used to investigate the contribution of year and treatment to annual plot yield and root morphology traits. Effects of variety and block have been excluded as a covariate. Due to contrasting years, the principle component analysis (PCA) investigated these relationships within each year separately. The option of centre and standardization by dependent variables was used in the analyses which was performed in the CANOCO 4.5 program (ter Braak and Šmilauer, 2002). The ordination biplot of RDA presents effect of year and treatments (explanatory variables) in relation to variability of annual yield and root traits (dependent variables). The biplot was created in CanoDraw (Microcomputer Power, Ithaca, NY).

3. Results

In total, 2458 plants were evaluated for root morphology, of which 1731 were visually discoloured by root disease and 1319 were branch-rooted. Overall, 192 forage samples were evaluated during six cuts. The monthly temperature means and precipitations totals during the growing season in years 2016–2018 are shown in Fig. 1 (Větrov meteorological station). The highest annual precipitation occurred in 2017 (701 mm). The growth period from April to October was the warmest (15.7 °C) and driest (366 mm) in 2018. The driest months in this year were April (17 mm) and July (32 mm).

3.1. Root morphology and plant root disease score

Effect of biological control on root morphology traits and root discoloration is shown in Table 2. Application of Polyversum significantly increased the ratio of branch-rooted plants compared with the Control treatment in the seeding year but this effect was eliminated in 2017 and any other root traits were not significantly different between treatments. In the last year of the experiment, after decreases of plant density, a higher ratio of branch-rooted plants was again detected for Polyversum 3 compared with Control treatment. Both Polyversum treatments also showed significantly higher tap-root diameter than the control. No visible effect of the Albit was observed for any of the root traits measured. Root potential index and fine root mass were not significantly different between treatments within years. Interaction of treatment with variety was detected for lateral root number in 2016, where cv. Start exhibited at Polyversum 1 in contrast with Polyversum 3

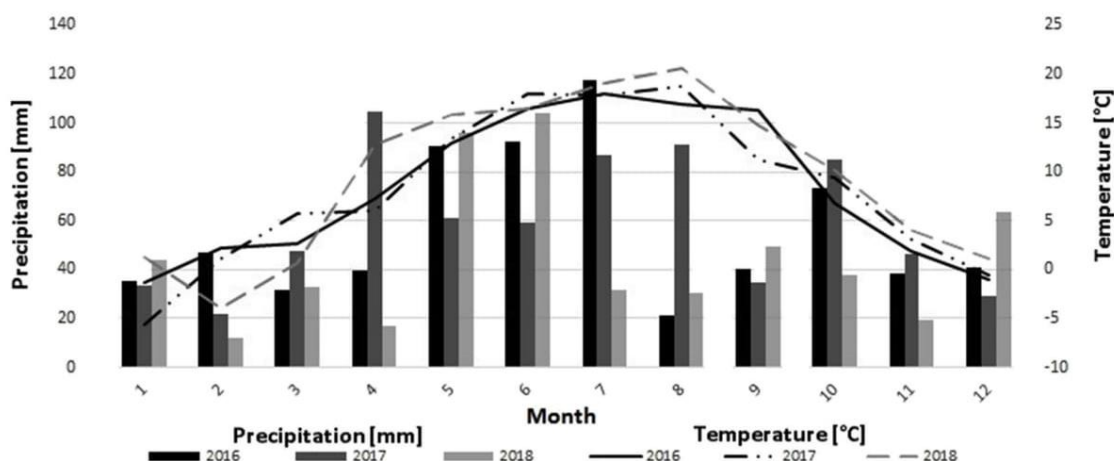


Fig. 1. The monthly sums of precipitation and temperature means during the experimental years, from the meteorological station Větrov, Czech Republic.

Table 2

Effect of biological control within year on red clover plant density (PD), tap root diameter (TD), root potential index (RPI), ratio of branch rooted plants (RB), lateral root number (LRN), fine root mass (FRM), percentage of infected plants (IP), plant root disease score (PRDS). Results are averaged between red clover varieties.

Year	Var	PD	TD	RPI	RB	LRN	FRM	IP	PRDS	n
2016	Untreated control	536	5.93	162.3	34.6 ^a	2.35	3.64	29.8	1.75	153
	Albit	667	6.19	184.0	67.2 ^b	2.58	3.40	27.3	1.78	191
	Polyversum 1	532	5.75	155.8	49.9 ^b	3.04	3.57	25.2	1.88	152
	Polyversum 3	599	5.68	153.7	56.5 ^b	2.70	3.66	27.4	1.59	171
	<i>P</i>	0.693	0.067	0.581	<0.001	0.272	0.150	0.818	0.733	
	Variety × treatment	0.187	0.204	0.136	0.063	0.007	0.192	0.167	0.207	
Density (covariate)		–	<0.001	–	<0.001	<0.001	0.010	–	–	
2017	Untreated control	350	8.67	223.4	55.7	2.44	3.00	83.2	3.07	200
	Albit	378	8.84	232.7	63.9	2.53	2.88	86.8	3.08	216
	Polyversum 1	382	8.77	230.3	56.2	2.26	3.29	76.6	3.01	219
	Polyversum 3	397	8.77	223.6	63.8	2.24	3.03	78.6	2.98	227
	<i>P</i>	0.713	0.890	0.956	0.433	0.486	0.201	0.068	0.935	
	Variety × treatment	0.844	0.080	0.454	0.059	0.960	0.601	0.017	0.290	
Density (covariate)		–	<0.001	–	<0.001	0.019	0.837	–	–	
2018	Untreated control	198	8.57 ^b	129.5	57.4 ^a	2.01	2.68	95.0	4.94 ^b	218
	Albit	191	8.98 ^{ab}	109.5	61.4 ^{ab}	2.48	2.92	97.0	4.78 ^{ab}	254
	Polyversum 1	202	9.44 ^a	136.1	56.4 ^a	2.19	2.76	96.6	4.53 ^a	231
	Polyversum 3	222	8.93 ^a	137.5	64.5 ^b	2.34	2.94	96.1	4.63 ^a	226
	<i>P</i>	0.702	0.002	0.319	0.017	0.096	0.145	0.567	0.031	
	Variety × treatment	0.513	0.016	0.701	0.002	0.971	<0.001	0.038	0.184	
Density (covariate)		–	<0.001	–	<0.001	0.003	0.011	–	–	

P: F – test probability of three-way ANOVA (treatment, variety, block) including variety × treatment interaction, different letters indicate statistical differences between treatments within years according to Tukey HSD test at $p < 0.05$.

treatment. In 2017, untreated cv Start reached the highest ratio of discoloured plants, with significant difference relative to cv. Calisto at Polyversum 1. In 2018, cv. Start reached the highest tap-root diameter at Polyversum 1 treatment whereas cv. Calisto provided higher value at Polyversum 3 in comparison with untreated control and Albit treatments. In this year, cv. Start had reduced fine root mass (score 2.56) at Polyversum 1 in contrast with the untreated control (score 3.17). Variety Calisto provide higher ratio of discoloured plants than cv. Start under Albit application (data not shown).

Effect of treatments on incidence of root discoloration in the two varieties of red clover was visible only in the last year of the experiment, when significantly lower plant root disease scores were detected for both of the Polyversum treatments. The percentage of discoloured plants was not significantly different between tested treatments. The variety Start provided a lower proportion of discoloured plants in the Polyversum 1

treatment, compared with the control treatment in both 2017 and 2018. All differences between varieties in selected traits are summarized in Table 3. Results of qPCR detected pathogens of genus *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* and *F. solani*) in 2018. The percentages of positive detections within each treatment were 75, 88, 63 and 38% for the untreated control, Albit, Polyversum 1 and Polyversum 3, respectively. Presence of the genera *Sclerotinia* and *Colletotrichum* were not detected.

3.2. Impact of root branching on root score

Relationships between root traits and discoloration over years are illustrated in the ordination biplot of RDA (Fig. 1) where effect of year and treatment explained 47.8% of root traits variability ($P = 0.002$). The effect of time was the main driving pattern for these changes and was

Table 3

Effect of red clover variety (cv Start, cv Callisto) on lateral root number (LRN), ratio of branch-rooted plants (RB), percentage of infected plants (IP), annual dry matter yield (DMY, t ha⁻¹) and compressed height (CH, cm). Results were averaged among treatments.

Year	LRN			RB			IP			DMY			CH		
	Start	Callisto	P ^a	Start	Callisto	P ^a	Start	Callisto	P ^a	Start	Callisto	P ^a	Start	Callisto	P ^b
2016	2.43	2.09	0.055	49.9	54.2	0.398	20.88 ^b	34.45 ^a	<0.001	6.87	6.92	0.673	–	–	
2017	2.28	2.45	0.270	58.1 ^b	62.5 ^a	0.049	83.38	79.46	0.188	17.05	17.46	0.366	46.6 ^a	45.1 ^b	0.045
2018	2.39 ^b	2.12 ^a	0.047	63.9 ^a	55.9 ^b	0.001	95.40	96.97	0.127	12.10	11.87	0.617	36.1	35.1	0.065

P: F – test probability.

^a Three-way ANOVA (treatment, variety, block) for annual yield.

^b Four-way ANOVA (treatment, variety, cut, block) for traits measured in each cut; different letters indicate statistical differences between varieties within each variable according to Tukey HSD test at p < 0.05.

especially associated with an increase in tap-root diameter and root discoloration with a simultaneous decrease in plant density and fine root mass (see the horizontal axis in Fig. 1). Differences of values of root traits and disease score between root branching classes are shown in Table 4. Increasing of lateral root number resulted in significantly higher tap-root diameter and fine root mass, whilst values for disease score were not significantly different across years. Disease score was significantly lower with increasing fine root class. No differences were detected in these patterns among treatments.

Results of PCA showed that plant density always was associated with reduced tap-root diameter and root branching within each year. In 2016, 2017, the lateral root number and ratio of branch-rooted plants showed a positive relation to disease score and ratio of discoloured roots whereas fine root mass had negative or indifferent relationships. In 2018, root branching became independent of disease score but fine root mass showed even slightly positive relation to this score and ratio of discoloured roots (Figures of PCA are not shown).

3.3. Dry matter yield and stand structure traits

A comparison of evaluated treatments and cuts in terms of forage yield, stem density and compressed height is presented in Table 5. In 2018, Polyversum 3 provided higher values for annual herbage yield and compressed height than the untreated control. The Polyversum 1 treatment was also higher than the control in compressed height, but without any significantly higher annual herbage yield. Results for the Albit treatment were similar to the control treatment for all the variables studied. Varieties reached the same amount of annual yield but cv. Start tended to achieve higher compressed height values across cuts (P = 0.045, Table 3). With regard to the cut, there were clear trends for decrease of annual yield, stem density and compressed height from first to third cut in 2017. In 2018, annual yield and compressed height were reduced in the first cut compared to 2017. Severe drought almost eliminated regrowth for the third cut of 2018, which resulted in extremely low values for annual yield and compressed height.

4. Discussion

4.1. Changes in root morphology and root discoloration under disease control

Application of Polyversum stimulated tap-root diameter and root branching of red clover plants, especially in the last year of the experiment. This finding is in line with the general statement about the role of *P. oligandrum* in promoting plant growth (Benhamou et al., 2012) although these effects have seldom been studied on plant roots, especially in field studies. Wulff et al. (1998) described stimulation of root elongation for hydroponically grown cucumber seedlings in a 12-day experiment when treated with *P. oligandrum*, in spite of a reduction of root length in the first two days. For greenhouse-grown tomato plants, addition of *P. oligandrum* to the substrate markedly increased lateral root development (Pharand et al., 2002). This stimulation corresponds to differences obtained in our field experiment between both of the Polyversum treatments relative to the control: on average 55% higher root branching in the first year and 27% in the last year. Interaction with variety suggests slightly different responses between varieties, as cv. Start provided the highest tap-root diameter in Polyversum 1 whereas cv. Callisto responded better to Polyversum 3.

The relationships obtained between root branching and plant density were in line with results from previous research with lucerne (Hakl et al., 2017) where changes in root branching were mainly driven by changes in plant density. In all years of the present experiment the values of red clover plant density were higher than those obtained in a study by Marley et al. (2003) who reported 300, 200 and 135 plants per m² for the first, second and third year of their experiment. The highest differences in root traits were observed in the final year, after a natural decrease of plant density. This suggests that the effect of Polyversum on root traits could be suppressed when red clover plants are present at higher plant density.

In contrast to continual increase of tap-root diameter in lucerne plants obtained over four-year experiments (Hakl et al., 2017, 2018), no comparable effect was detected in the present experiment with red clover; here the plant tap-root diameter remained almost unchanged (8.9 mm vs. 9.1 mm) while there was a marked decrease in plant density

Table 4

Effect of root branching class (average of three years) on taproot diameter (TD), fine root mass score (FRM), plant root disease score (PRDS) and lateral root number (LRN).

Lateral root branching class	LRN	TD	FRM	PRDS	n	Fine root branching class	TD	PRDS	n	LRN	n
0	0	6.81 ^a	2.97 ^a	2.60 ^a	1144	1	6.92 ^a	3.28 ^c	340	1.85 ^b	123
1	1–2	8.08 ^b	3.31 ^b	2.22 ^a	818	2	7.69 ^a	2.71 ^b	388	2.35 ^{ab}	196
2	3–4	9.40 ^c	3.53 ^c	2.34 ^a	333	3	7.91 ^a	2.40 ^a	675	2.41 ^a	360
3	5 and more	10.75 ^d	3.90 ^d	2.80 ^a	160	4	8.11 ^a	2.27 ^a	581	2.56 ^a	342
–						5	8.12 ^a	2.00 ^a	472	3.12 ^c	297
P		<0.001	<0.001	<0.001			<0.001	<0.001		<0.001	
Year		<0.001	<0.001	<0.001			<0.001	<0.001		<0.001	

P: F – test probability; two-way ANOVA (year, branching class); different letters indicate statistical differences between classes according to Tukey HSD test at p < 0.05.

Table 5

Effect of biological control treatments within year on red clover dry matter yield (DMY, t ha⁻¹), stem density (SD, stem m⁻²), and compressed height (CH, cm). Results are average values for the two red clover varieties.

Treatment	2016		2017		2018		
	DMY	DMY	SD	CH	DMY	SD	CH
Untreated control	6.88	17.45	596	46.3 ^a	11.17 ^a	559	33.7 ^a
Albit	6.72	17.16	614	45.0 ^a	11.85 ^{ab}	526	34.4 ^{ab}
Polyversum 1	7.21	16.64	583	46.6 ^a	11.77 ^{ab}	599	36.1 ^{bc}
Polyversum 3	6.76	17.77	607	46.7 ^a	13.15 ^b	622	38.1 ^c
<i>P</i> *	0.057	0.338	0.890	0.041	0.039	0.124	<0.001
Cut							
1	4.96	8.10 ^c	763 ^c	62.1 ^c	5.93 ^b	643 ^b	48.4 ^b
2	1.93	5.46 ^b	596 ^b	43.3 ^b	5.56 ^b	474 ^a	48.5 ^b
3	-	3.69 ^a	441 ^a	33.0 ^a	0.50 ^a	613 ^b	9.8 ^a
<i>P</i> **	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

P: F – test probability; * three-way ANOVA (treatment, variety, block) for annual yield, ** four-way ANOVA (treatment, variety, cut, block) for traits measured in each cut; different letters indicate statistical differences between treatments or cuts within columns according to Tukey HSD test at *p* < 0.05.

(377 vs. 203 plants) observed from 2017 to 2018. It seems that red clover was unable to compensate for the decrease in plant density over time by increasing the tap-root diameter and root branching traits. Treatments applied for disease control did not provide any significant effect on the described patterns of root morphology development. In the case of lucerne, crown traits of are also associated with the crop productivity (Marquez-Ortiz et al., 1999); therefore monitoring of some parameters of large red clover crowns would be a more effective approach than monitoring root traits only.

The two Polyversum application rates significantly reduced root discoloration by an average of 8% in the last year of the field experiment where only *Fusarium* was detected in plant roots. Similarly, a positive effect of *P. oligandrum* has also been reported to show reduction in root damage by *Fusarium* in tomato plants (Pharand et al., 2002). Any effect of Albit on root disease score or morphology observed in the present experiment is in contrast to the reduction of clover foliar diseases as described by Kharchenko et al. (2009). In the last year of our experiment, about 93% of plants were positively scored for root diseases without any consistent tendency in response of variety across years. This high percentage of discoloured plants is in line with Hejduk (2006) with regard to the increasing importance of root disease over successive years.

According to Gerbore et al. (2014), an impressive number of diseases of various plants can be controlled by *P. oligandrum*, the reduction of pathogenic attacks varying from 15 to 100%, depending on the host plant, the target pathogen, and the application method. However, under field conditions, the reported affect is highly variable and from positive to negative, as documented by several field studies (Ikeda et al., 2012; Boček et al., 2012; Kowalska and Zbytek, 2015) and also in the present experiment. This emphasizes the need for testing biological control measures under field conditions where interactions with variable environmental conditions can modify the efficacy of these methods. A further aspect is that the cumulative effect of root infections of forage legumes over successive years may eliminate the biological control efficacy. Autochthonous pathogens in general have a competitive advantage relative to introduced antagonists. The antagonists could be effective in reducing root infection if they survive in plant tissues but almost all of them do not have a curative effect (Le Floch et al., 2003).

4.2. Relationships between root morphology and root disease

We observed positive relationships between lateral root number and tap-root diameter, and root branching within separate years, which corresponds to results of Johnson et al. (1998) for lucerne. Correlation between lateral roots and disease score varied across years and this resulted in no-significance of score between lateral root number classes,

with no consistent trend. This is in contrast to lucerne, where an increase of root disease score with lateral root number was described by Haki et al. (2017). A higher disease score in lateral roots than in tap-roots of *Trifolium subterraneum* was reported by You et al. (2016) with a strong positive correlation between tap and lateral root disease score. In our study with red clover, presence of lateral roots was closely related to disease score only in the seeding year. Several studies have reported on the positive effect of adventitious root system on improved red clover plant persistence (Montpetit and Coulman, 1991a; Smith, 1989). Adventitious roots are characterized as having less than 2 mm diameter and their occurrence is usually scored on a subjective scale (Montpetit and Coulman, 1991b), similar to that used in this study. The positive effect of fine roots on lower root discoloration is in line with the reduced root disease score with increasing fine root mass branching classes as well as negative correlation between fine roots and disease score (Fig. 2). It can be summarized that a generalization of relationships between root morphology and disease score is more difficult for red clover than for lucerne, where these relationships remain stable across years (Haki et al., 2017, 2018). It seems that root branching enhanced the tap-root diameter similar to that for lucerne but increasing of the

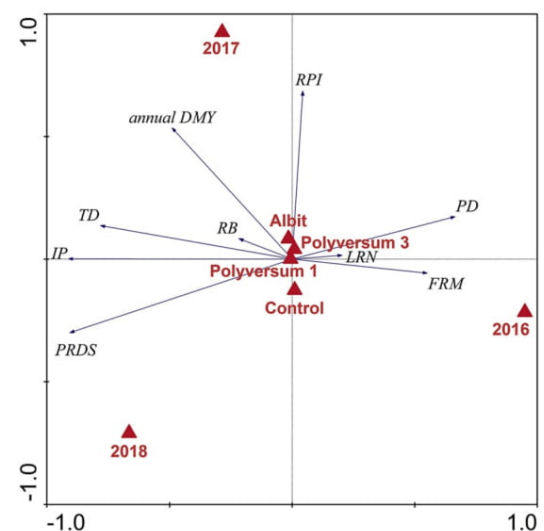


Fig. 2. Ordination biplot showing effect of year and treatments (explanatory variables, bold line arrows) on relationships between root traits and annual forage yield (dependent variables, thin line arrows). DMY = dry matter yield, FRM = fine root mass, IP = percentage of infected plants, LRN = lateral root number, PD = clover plant density, PRDS = plant root disease score, RB = ratio of branch rooted plants, RPI = root potential index, TD = tap root diameter.

lateral root number did not result in a consistently increased root disease score, probably due to simultaneous increase of fine root mass at more branched plants which had the opposite effect on disease score. It seems that red clover fine root mass plays a more important role than lateral root number in relation to the occurrence of root discoloration.

Taking into account the above-mentioned relationships, it seems that the positive effect of Polyversum on root disease score in the last year of the experiment was not directly associated with changes in root morphology. In contrast to the situation for lucerne, increasing of root branching at Polyversum 3 resulted even in lower root disease scores. On the other hand, there was reduction of the fine root mass for cv. Start in the Polyversum 1 treatment, but this variety also showed a tendency for lower ratio of discoloured plants compared with that of cv. Callisto.

4.3. Effect on forage yield and forage traits

The increase in annual forage yield by about 18% for the Polyversum 3 treatment, relative to the control treatment, in the last year of the experiment clearly demonstrated the potential of Polyversum for improving red clover yield. This corresponds with a range of studies about positive impacts of *P. oligandrum* on crop yield of tomato (Le Floch et al., 2003), bean (Patkowska, 2009) or strawberry (Boček et al., 2012). However, this positive yield effect in our experiment was only weakly related to a slightly improved root disease score value because the lower score was observed for both of the Polyversum treatments. Increase of red clover yield could be associated with enhanced red clover tap-root diameter and root branching, based on multivariate analyses, and this accords with positive effects of root branching on lucerne forage yield (Lamb et al., 2000). Root potential index corresponds with forage yield across year (Fig. 2) which is in line with Hakl et al. (2017) for lucerne, but a direct correlation with annual yield was found only in 2016. It seems probable that changes in red clover root potential index in post-seeding years were driven only by changes in plant density, and this can cause difficulties when using the root potential index as a predictor of annual yield. In summary, the stimulation effect of *P. oligandrum* on red clover root branching traits may have played a more important role than any direct effect of protection against fungal diseases, consistent with beneficial effects of crop growth promotion following root colonization by *P. oligandrum* as described by Benhamou et al. (2012) and Gerbore et al. (2014).

Improved forage yield was associated with an increase in the compressed height of the red clover stand, consistent with the positive relation between these variables as described in other studies, e.g. Hakl et al. (2012) for lucerne. Greater plant height corresponds with findings of Le Floch et al. (2007), who reported that *P. oligandrum* also produces auxin compounds supporting more intensive plant growth. In contrast to Kharchenko et al. (2009) who reported higher stem density and red clover yield after Albit application, in the present experiment no effect of Albit was detected. Description of relationships between root morphology, disease score and stand traits in association with forage yield has demonstrated the importance of this comprehensive evaluation of forage legumes in similar studies, where it could be valuable for understanding the causes and consequences (Hakl et al., 2018).

The close comparison between Polyversum 1 and Polyversum 3 treatments clearly demonstrated that regular autumn application (the Polyversum 1 treatment) was not sufficient for yield improvement in spite of detectable differences in selected root traits or compressed stand height. On the other hand, we could not verify if all six additional applications (of Polyversum 3 treatment) were necessary for yield improvement, and economic implications of cost versus response must also be considered. The efficacy of Polyversum is influenced by environmental factors such as temperature or humidity (Brožová, 2002), as well as root exudates, age of plants or presence of soil pathogens (Vallance et al., 2009). The soil moisture level within any given interval of application could be the most critical limiting factor even in a relatively humid location. This study has highlighted the difficulties of

investigating the biological control of soil-borne plant pathogens in perennial crops, even with repeated applications of biological control agents. Therefore, further research is warranted to optimize the application timing of the treatment for forage legumes.

5. Conclusion

This study showed clearly that *P. oligandrum* was able to provide positive responses in terms of a reduced score for plant root disease and also that it stimulated red clover root branching. Improved forage yield was visible only under more intensive (repeated) application and this improvement was associated with plant growth stimulation more than protection against fungal disease. Some interactions between treatment and red clover variety suggest the possibility of different responses between varieties with different intensity of *P. oligandrum* application, especially in terms of root traits. A herbage dry matter yield enhancement of about 18% demonstrated a potential for using *P. oligandrum* to improve red clover yield but optimization of application timing is necessary before it is possible to make practical recommendations and evaluate the economic efficiency of such treatments. The associations of stand productivity and root discoloration with root morphology highlight the need for evaluation of disease score together with root traits and forage yield.

Funding

This research was supported by project TJ01000150 of Technology Agency of the Czech Republic. The completion of the paper was supported by "S" grant of MŠMT ČR.

Acknowledgements

We sincerely thank Josef Procházka for field assistance and Štěpánka Tocaurová who helped with the laboratory work.

References

- Benhamou, N., LeFloch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic Access. Microbiology 158, 2679–2694.
- Boček, S., Salaš, P., Sasková, H., Mokříčková, J., 2012. Effect of Algisure® (seaweed extract), Myco-Sin® VIN (sulfuric clay) and Polyversum® (*Pythium oligandrum* Drechs.) on yield and disease control in organic strawberries. Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brunensis 60, 19–28.
- Boller, B., Schubiger, F.X., Kölliker, R., 2010. Red clover. In: Boller, B., Posselt, U.K., Veronesi, F. (Eds.), Fodder Crops and Amenity Grasses. Handbook of Plant Breeding, vol. 5. Springer, New York, NY, pp. 439–455.
- ter Braak, C.J.F., Šmilauer, P., 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, USA.
- Bradshaw-Smith, R.P., Whalley, W.M., Craig, G.D., 1991. Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal footrot pathogens of peas. Mycol. Res. 95, 861–865.
- Brožová, J., 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. Plant Prot. Sci. 38, 29–35.
- Christie, B., Martin, R., 1999. Selection for persistence in red clover. Can. J. Plant Sci. 79, 357–359.
- 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. Biol. Control 119, 59–67.
- Le Floch, G., Rey, P., Déniel, F., Benhamou, N., Picard, K., Tirilly, Y., 2003. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. Agronomie 23, 455–460.
- 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 Microbiol. Ecol. 61 (2), 317–326.
- Frame, J., 1986. The production and quality potential of four forage legumes sown alone and combined in various associations. Crop Res. 25, 103–122.
- 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*. Environ. Sci. Pollut. Control Ser. 21, 4847–4860.
- Hakl, J., Hrevušová, Z., Hejčman, 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 Forage Sci. 67, 589–596.

- Hakl, J., Pisarcik, M., Hrevašová, 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 Crop. Res.* 213, 109–117.
- Hakl, J., Pisarcik, 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 Crop. Res.* 226, 66–73.
- Hejduk, S., 2006. The persistency evaluation of Czech varieties of Red (*Trifolium pratense* L.) and Alsike Clover (*Trifolium hybridum* L.). *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brunensis* 54 (4), 133–138.
- 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 Environ.* 56, 111–119.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Hamada, W., El-Mahjoub, M., 2006. Bio-fungicides as an alternative for tomato Fusarium crown and root rot control. *Tunisian. J. Plant Prot.* 1, 19–29.
- 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, F.X., Struck, C., 2010. Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany concerning the resistance to Southern Anthracnose. *Grassland in a changing world*. In: *Proceedings 23rd General Meeting European Grassland Federation*, vol.15, pp. 344–346.
- Jenkyn, J.F., 1975. The effect of benomyl sprays on *Sclerotinia trifoliorum* and yield of red clover. *Ann. Appl. Biol.* 81, 419–423.
- Johnson, L.D., Marquez-Ortiz, J., Lamb, J.F.S., Barnes, D.K., 1998. Root morphology of alfalfa plant introductions and cultivar. *Crop Sci.* 38, 497–502.
- Jones, C.R., Samac, D.A., 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biol. Control* 7, 196–204.
- Kharchenko, G.L., Ryabchinskaya, T.A., Sarantseva, N.A., Bobreshova, I.Y., Zlotnikov, A. K., 2009. Integrated protection and increase of productivity of clover using the preparation Albit. *Zashchita i Karantin Rastenii* (6), 32 (In Russian).
- Kowalska, J., Zbytek, Z., 2015. Microbiological dressing of spring barley seeds as a method of improvement in plant development. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* 60, 9–12.
- Lamb, J.F.S., Samac, N.A., Barnes, D.K., Henjum, K.I., 2000. Increased herbage yield in alfalfa associated with selection fibrous and lateral roots. *Crop Sci.* 40, 693–699.
- Leath, K.T., Kendall, W.A., 1978. Fusarium root rot of forage species: pathogenicity and host range. *Phytopathology* 68, 826–831.
- Leath, K.T., Zeiders, K.E., Byers, R.A., 1973. Increased yield and persistence of red clover after a soil drench application of Benomyl. *Agron. J.* 65, 1008–1010.
- Marley, C.L., Fychan, R., Fraser, M.D., Winters, A., Jones, R., 2003. Effect of sowing ratio and stage of maturity at harvest on yield, persistency and chemical composition of fresh and ensiled red clover/lucerne bi-crops. *Grass Forage Sci.* 58, 397–406.
- Marquez-Ortiz, J.J., Lamb, J.F.S., Johnson, L.D., Barnes, D.K., Stucker, R.E., 1999. Heritability of crown traits in alfalfa. *Crop Sci.* 39, 38–43.
- Marshall, A.H., Collins, R.P., Vale, J., Lowe, M., 2017. Improved persistence of red clover (*Trifolium pratense* L.) increases the protein supplied by red clover/grass swards grown over four harvest years. *Eur. J. Agron.* 89, 38–45.
- Marten, G.C., 1989. Summary of the Trilateral Workshop on Persistence of Forage Legumes. *Persistence of forage legumes, (persistenceoffo)*, pp. 569–572.
- Montpetit, J.M., Coulman, B.E., 1991. Responses to divergent selection for adventitious root growth in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Euphytica* 58 (2), 119–127.
- Montpetit, J.M., Coulman, B.E., 1991. Relationship between spring vigor and the presence of adventitious roots in established stands of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Can. J. Plant Sci.* 71, 749–754.
- Nan, Z.B., Skipp, R.A., Long, P.G., 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 Biol. Biochem.* 23, 743–750.
- Patkowska, E., 2009. Effect of bio-products on bean yield and bacterial and fungal communities in the rhizosphere and non-rhizosphere. *Pol. J. Environ. Stud.* 18, 255–263.
- Pharand, B., Carisse, O., Benhamou, N., 2002. Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against Fusarium crown and root rot in tomato. *Phytopathology* 92, 424–438.
- Riday, H., 2010. Progress made in improving red clover (*Trifolium pratense* L.) through breeding. *Int. J. Plant Breed.* 4 (1), 22–29.
- Rufelt, S., 1987. A threshold value for cutting intensity in relation to Fusarium root rot of red clover (*Trifolium pratense* L.). *J. Phytopathol.* 118 (4), 301–305.
- Sheldrick, R.D., Lavender, R.H., Tewson, V.J., 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. *Grass Forage Sci.* 41 (2), 137–149.
- Skipp, R.A., Christensen, M.J., 1990. Selection for persistence in red clover: influence of root disease and stem nematode. *N. Z. J. Agric. Res.* 33, 319–333.
- Smith, R.R., 1989. Selection for Root Type in Red Clover. *Persistence of Forage Legumes, (persistenceoffo)*, pp. 111–116.
- StatSoft Inc, 2012. *Statistica for Windows*. StatSoft, Tulsa, USA.
- Steiner, J.J., Alderman, S.C., 2003. Red clover seed production: VI. Effect and economics of soil pH adjusted by lime application. *Crop Sci.* 43, 624–630.
- Stoltz, E., Wallenhammar, A.C., 2012. Micronutrients reduce root rot in red clover (*Trifolium pratense*). *J. Plant Dis. Prot.* 119 (3), 92–99.
- 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.
- 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.
- Vallance, J., Le Floch, G., Déniel, F., Barbier, G., Lévesque, C.A., Rey, P., 2009. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (14), 4790–4800.
- Vesely, D., 1978. Parasitic Relationships between *Pythium oligandrum* Drechsler and Some Other Species of the Oomycetes Class. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Zweite Natwiss. Abt. Mikrobiol. Landwirtschaft. Technol. Umweltschutzes* 133 (4), 341–349.
- Vleugels, T., Cnops, G., van Bockstaele, E., 2013. Screening for resistance to clover rot (*Sclerotinia* spp.) among a diverse collection of red clover populations (*Trifolium pratense* L.). *Euphytica* 194, 371–382.
- Wallenhammar, A.C., Adolffson, E., Henriksso, M., Lundmark, S., Roempke, G., 2006. Field surveys of Fusarium root rot in organic red clover leys. *Grassl. Sci. Eur.* 11, 369–371.
- Wulff, E.G., Pham, A.T.H., Chérif, M., Rey, P., Tirilly, Y., Hockenhull, J., 1998. Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plant pathogenic *Pythium* species: differential zoospore accumulation, colonization ability and plant growth response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 69–76.
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., Gan, Y., 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology* 1–8, 2011.
- Ylimäki, A., 1967. Root rot as a cause of red clover decline in leys in Finland. *Ann. Agric. Fenn.* 3, 79–89.
- You, M.P., O'Rourke, T.A., Foster, K., Snowball, R., Barbetti, M.J., 2016. Host resistances to *Aphanomyces trifolii* root rot of subterranean clover: first opportunity to successfully manage this severe pasture disease. *Plant Pathol.* 65 (6), 901–913.
- Öhberg, H., 2008. Studies of the persistence of red clover cultivars in Sweden, with particular reference to *Sclerotinia trifoliorum*. *Doctoral thesis*, 1652–6880, ISBN 978-91-85913-411.
- Öhberg, H., Bang, U., 2010. Biological control of clover rot on red clover by *Coniothyrium minitans* under natural and controlled climatic conditions. *Biocontrol Sci. Technol.* 20, 25–36.

Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality.

Plant Soil and Environment (In press).

Pisarčík, M., Hakl, J., Menšík, L., Szábo, O., Nerušil, P. 2019.

<https://doi.org/10.17221/398/2019-PSE>

Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality

MARTIN PISARČIK¹, JOSEF HAKL^{1*}, LADISLAV MENŠÍK², ONDŘEJ SZÁBO¹,
PAVEL NERUŠIL²

¹Department of Agroecology and Crop Production, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

²Crop Research Institute, Research Station of Grassland Ecosystems in Jevíčko, Jevíčko, Czech Republic

*Corresponding author: hakl@af.czu.cz

Citation: Písarčík M., Hakl J., Menšík L., Szábo O., Nerušil P. (2019): Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality. *Plant Soil Environ.*, 65.

Abstract: Root diseases of lucerne (*Medicago sativa* L.) play a significant role in reducing the persistence and productivity of stands; however, the potential of using biological control in lucerne crops has not yet been investigated. Our objectives were to determine the effect of biological crop protection on (i) lucerne plant density and root traits development and (ii) lucerne forage yield and nutritive value in a two-year field experiment. The lucerne stand was managed under three treatments of disease control: an untreated control and spraying with either Albit (hydrolysate of microorganisms containing microelements and poly-beta-hydroxy butyric acid) or Polyversum (mycoparasitic *Pythium oligandrum*) under five-cut utilization. Application of Albit resulted in a negative yield response, associated with a reduction of root branching, and it also reduced crude protein and increased crude fibre and water-soluble carbohydrates in the second cut of the first year of the experiment. Polyversum increased the percentage of infected plants relative to the control in the last year of the experiment. The study highlights that biological control of lucerne under field conditions may not always be beneficial because of the complex interactions between plant, biological preparation, and environment.

Keywords: Fabaceae; alfalfa; root disease; antifungal agent; fungicide

Root diseases are generally considered to be a serious factor limiting lucerne (*Medicago sativa* L.) persistence and yield through reduction of plant density and productivity (Gray and Koch 2004). No effective approved chemical fungicides are available for elimination of these diseases. Therefore crop protection is based on appropriate management practices such as improving the soil pH or ensuring adequate plant nutrition, as well sowing disease-resistant cultivars (Huang 2003), for which disease resistance has been shown to significantly improve forage yield in environments with severe root disease incidence (Lamb et al. 2006).

Biological control of fungal diseases has been investigated for more than 80 years, but commercial products

have become available only in recent years (Suprpta 2012), and about 14 genera of fungi or bacteria are registered in Europe (Gerbore et al. 2014). For lucerne, some positive effects were reported after *Streptomyces* (Xiao et al. 2002) or *Bacillus cereus* application (Handelsman et al. 1990). Benhamou et al. (2012) summarized findings that *Pythium oligandrum*, a non-pathogenic soil-inhabiting mycoparasitic oomycete, can increase crop protection against fungal disease. The utilization of *P. oligandrum* has been focused on laboratory and greenhouse experiments, especially for annual crops (Kowalska and Zbytek 2015). For perennial forage crops, the positive effect of *P. oligandrum* on red clover yield has been reported by Písarčík et al. (2020).

Supported by the Technology Agency of the Czech Republic, Project No. TJ01000150, and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. ČR-RO0418. The completion of the paper was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, S grant.

In addition to biological control agents, there is also a group of plant stimulants that have potential for reducing disease. Morsy et al. (2011) tested the application of salicylic acid, K_2HPO_4 , and neem (*Azadirachta indica*) oil on lucerne and reported a significant reduction of rust, downy mildew, and root rot infestation. The stimulator Albit, based on hydrolysate of microorganisms, microelements and poly-beta-hydroxy butyric acid has been tested in Russia, where its application reduced lucerne disease infestation and increased fresh matter yield by about 15–20% in comparison with the control, as a result of increased stand height and stem number (Kharchenko et al. 2008).

Although biological treatments represent an interesting means of reducing or eliminating lucerne root disease, there is a lack of field-based studies covering the Central Europe region. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of application of Albit and Polyversum on (i) lucerne plant density and root traits development and (ii) lucerne forage yield and nutritive value in a two-year field experiment. These comprehensive evaluations could be valuable for better understanding the simultaneous impact of application of biological treatments on lucerne root development, occurrence of root diseases, and stand performance.

MATERIAL AND METHODS

The field experiment was established in April 2016 in DrvÁovice in the Czech Republic (elevation 460 m a.s.l.). The long-term (30-year) mean annual temperature is 7.4°C, and cumulative annual rainfall is 545 mm. The soil type is loamy-sandy Cambisol (IUSS Working Group WRB 2015). The lucerne sowing rate was 700 viable seeds of cv. PÁlava per m² with a row distance of 125 mm.

The lucerne stand was managed under three treatments of biological disease control (untreated control, spraying with Albit or Polyversum) with a five-cut schedule at the early bud stage in post-seeding years. The preparation of Albit represents a 0.62% concentration of poly-beta-hydroxy butyric acid supplemented with mineral nutrients (OONPF Albit, Pushino, Russia), and Polyversum contains 1 000 000 active oospores of *Pythium oligandrum* M1 per gram (BiopreparÁty spol. s.r.o., Úherce, Czech Republic). Applied rates and timing of application are summarized in Table 1. Polyversum was activated 3 h before application. Rates of preparations were applied in 300 L of water per hectare, always in humid weather without direct sunshine. The experiment was arranged in completely randomized blocks in four replicated plots of each of the 3 treatments, which resulted in 12 plots each with a harvested area of 10 m².

Forage and root sampling and evaluation. All dried forage samples from 10 cuts (5 in each year) were milled to pass through a 1-mm screen and were scanned with a Foss NIR System 6500 (Hilleroed, Denmark) equipped with a spinning sample module, in reflectance range 1100–2500 nm, bandwidth 2 nm, measured in small ring cups. The estimated qualitative traits (g/kg DM) were crude protein (CP), crude fibre (CF), water-soluble carbohydrates (WSC), and organic matter digestibility (OMD, %).

In each autumn, plant root systems were dug to a depth of about 20–25 cm in each plot. Plant density (PD, plant/m²) was calculated from the number of plants per sample and the size of the root sampling area. For each plant, the tap-root diameter below the crown (TD, mm) and lateral root number per plant tap-root (LRN, when larger than 1 mm) were

Table 1. Annual temperature and precipitation, description of treatments, application dates of preparations, root sampling area, and sampling dates, and forage harvest dates, annual temperature, and precipitation for the two years of the study

	2017		2018	
Annual temperature mean (°C)		8.4 (+1.0)*		9.6 (+2.2)*
Annual cumulated precipitation (mm)		539 (–6)*		401 (–144)*
	dose	application, sampling and harvest dates		
Treatment	untreated control	–	–	–
	Albit	40 mL/ha	23 May	15 May
	Polyversum	100 g/ha	23 May	15 May
Root sampling dates and sampling area		14 Nov; 50 × 12.5 cm		1 Nov; 50 × 12.5 cm
Forage harvest dates		11 May, 16 Jun, 19 Jul, 24 Aug, and 11 Oct		4 May, 1 Jun, 19 Jul, 29 Aug, and 9 Oct

*difference to long-term mean (1981–2010)

<https://doi.org/10.17221/398/2019-PSE>

evaluated. Fine root mass (FRM, less than 1 mm) occurrence was scored subjectively from 1 to 5 with scores of 1, 3, and 5 indicating none, moderate, and many, respectively. The percentage of branch-rooted plants (RB) was calculated for each sample. The root potential index (RPI) integrating TD and plant density was assessed according to Hakl et al. (2017). Plant root disease score (PRDS) was scored subjectively and based on discoloration on a cross-cut of the tap-root with ratings from 0 (= healthy plant) to 7 (= dead plant) following Hakl et al. (2017). The ratio of infected plants (IP) was assessed as a proportion of plants with visible root discoloration, and PRDS values were averaged for infected plants.

Statistical analysis. The effect of biological control on root traits was analyzed by one-way ANOVA within each year where PD was used as a covariate for some analyses. Influence on annual forage yield was evaluated by two-way ANOVA. Forage yield and nutritive value in each cut were analyzed by three-way ANOVA with interaction. Significant differences between means were reported using the Tukey's *HSD* (honestly significant difference) test at $\alpha = 0.05$. Principal component analysis (PCA) was used for interpreting the relationships among forage yield and quality, root morphology and root disease occurrence. The PCA was used for calculating a component weight for the investigated variables (Meloun

and Militký 2011). All these analyses were carried out using the Statistica program (StatSoft 2012).

RESULTS

Application of Albit significantly reduced FRM and tended to the lowest values of TD ($P = 0.053$) and RB ($P = 0.063$) among all treatments (Table 2) in 2017. In 2018, the Polyversum treatment showed lower FRM and higher IP in comparison with the untreated control. Differences between years were detected in LRN and FRM, with higher values observed in 2018.

Forage yield was significantly reduced under treatment with Albit application compared with both the other treatments (Table 3). The most important negative impact was observed in 2017 when Albit caused stem dying-off and discoloration (yellowing) after application. The stand was regenerating until the end of the growing season. The Polyversum treatment did not differ from the untreated control. Interaction of cut \times year showed significant differences among all cuts in 2017, whereas in 2018 only the first cut was different from others (data not shown).

Application of Albit reduced forage CP in contrast to Polyversum, with a simultaneous increase in WSC content in comparison with the untreated control. Differences between years were observed for CP and WSC, whereas cuts were significantly different in all

Table 2. Effect of biological control and year on lucerne plant density (PD); tap root diameter (TD); root potential index (RPI); percentage of branch-rooted plants (RB); lateral root number (LRN); fine root mass (FRM); percentage of infected plants (IP) and plant root disease score (PRDS)

Year	Treatment	PD	TD	RPI	RB	LRN	FRM	IP	PRDS	<i>n</i>
2017	untreated control	158	8.00	89.7	78.7	2.32	2.91 ^b	66.7	1.95	60
	Albit	210	6.77	81.6	57.8	2.71	2.12 ^a	66.1	2.05	62
	Polyversum	179	7.92	94.7	70.5	2.38	2.40 ^{ab}	70.6	1.73	68
	<i>P</i>	0.674	0.053	0.913	0.063	0.613	< 0.001	0.839	0.483	
	density (covariate)	–	0.449	–	0.042	0.028	0.908	–	–	
2018	untreated control	165	7.97	88.1	77.1	3.37	3.87 ^b	48.9 ^a	2.09	47
	Albit	172	7.90	87.0	72.4	3.08	3.60 ^{ab}	57.1 ^{ab}	1.75	49
	Polyversum	161	7.75	86.3	74.5	2.56	3.06 ^a	76.1 ^b	1.83	46
	<i>P</i>	0.990	0.934	0.995	0.867	0.229	0.007	0.023	0.424	
	density (covariate)	–	< 0.001	–	0.024	< 0.001	0.018	–	–	
2017		182	7.48	88.6	68.1	2.36	2.45	67.9	1.90	190
2018		166	7.99	87.1	75.8	3.11	3.53	60.6	1.87	142
<i>P</i>		0.649	0.127	0.910	0.121	0.003	< 0.001	0.168	0.866	

P – probability of one-way ANOVA, different letters indicate statistical differences between treatments for Tukey's *HSD* (honestly significant difference), $\alpha = 0.05$

Table 3. Effect of year, biological control and cut order on lucerne dry matter forage yield (DMY, t/ha); crude protein (CP, g/kg); crude fibre (CF, g/kg); water-soluble carbohydrates (WSC, g/kg) and organic matter digestibility (OMD, %)

		Annual DMY	Cut DMY	CP	CF	WSC	OMD
Year	2017	12.19	2.44	210	213	40.9	74.5
	2018	7.64	1.53	214	216	39.0	74.6
	<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	0.032	0.130	0.003	0.673
Treatment	untreated control	10.58 ^b	2.12 ^b	213 ^{ab}	215	38.6 ^a	74.5
	Albit	8.83 ^a	1.77 ^a	208 ^a	217	41.1 ^b	74.5
	Polyversum	10.33 ^b	2.07 ^b	215 ^b	211	40.2 ^{ab}	74.6
	<i>P</i>	0.040	0.003	0.011	0.110	0.004	0.960
Cut	1		3.82 ^d	209 ^a	217 ^a	47.5 ^c	74.8 ^b
	2		2.20 ^c	212 ^a	221 ^a	40.5 ^b	75.4 ^{bc}
	3		1.67 ^b	208 ^a	223 ^{ab}	35.9 ^a	73.1 ^a
	4		1.40 ^b	194 ^b	230 ^b	36.3 ^a	73.2 ^a
	5		0.84 ^a	238 ^c	180 ^c	39.7 ^b	76.2 ^c
Cut			< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Year × treatment		0.932	0.896	0.309	0.162	0.917	0.210
Cut × year			< 0.001	0.056	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Cut × treatment			0.913	0.256	0.415	< 0.001	0.153
Cut × treatment × year			0.497	0.048	0.026	0.009	0.474

P – probability; two or three-way ANOVA with interactions, different letters indicate statistical differences between treatments or cuts for Tukey's *HSD* (honestly significant difference), $\alpha = 0.05$

traits of forage quality. Interaction with treatments was significant only with cut for WSC, where the Albit treatment had higher WSC content than the control in the second cut. Analyses of triple interactions showed that differences in forage quality (CP, CF, WSC) between treatments were detected, especially in the first year from the second to the third cut (data not shown) where the Albit treatment had forage with lower CP and higher WSC and CF.

Component weights of PC1, PC2, and PC3 explained together 93% of the variability (Figure 1). The PC1 axis characterizes the relationships between density, root morphology (RB, TD), and forage quality (OMD, CP, and WSC), whereas PC2 and PC3 demonstrate negative relation of yield to root branching (LRN, FRM) or forage quality (WSC). The analysis separated the biological treatment Albit (right side of Figure 1) and Polyversum (left upper side of PC3) from the untreated control.

DISCUSSION

Effect of biological control on forage yield and root disease score in association with root morphology. Application of Albit caused an average reduction of forage yield of about 16.5% with lower values in the first (−11.8%) than in the second year (−23.7%)

of the experiment. This is in contrast to the results of Kharchenko et al. (2008), where Albit was associated with increased fresh yield of lucerne of about 15–20%. The negative effect on forage yield obtained in our study could be associated primarily with reduced intensity of root branching and TD in lucerne under this treatment in 2017, corresponding with PCA analysis. These results are in line with a positive correlation between lucerne yield and root branching published by Hakl et al. (2017). Polyversum reduced FRM in the last year of the experiment without any negative correlations with TD, RB or forage yield. In summary, application of Albit may cause a negative lucerne yield response through damage to stem regrowth with subsequent reduction of root development and branching. The negative yield effect was more pronounced in the dry year of 2018. Our study suggests that an inappropriate date of foliar application about crop management and environment can probably cause a negative lucerne yield response, which is in contrast to the positive effect reported by Kharchenko et al. (2008).

A positive effect of *P. oligandrum* in the reduction of disease infestation has been reported in many studies, especially under greenhouse or laboratory conditions (e.g. Daraignes et al. 2018). In last year of our field experiment, application of Polyversum caused even significant

<https://doi.org/10.17221/398/2019-PSE>

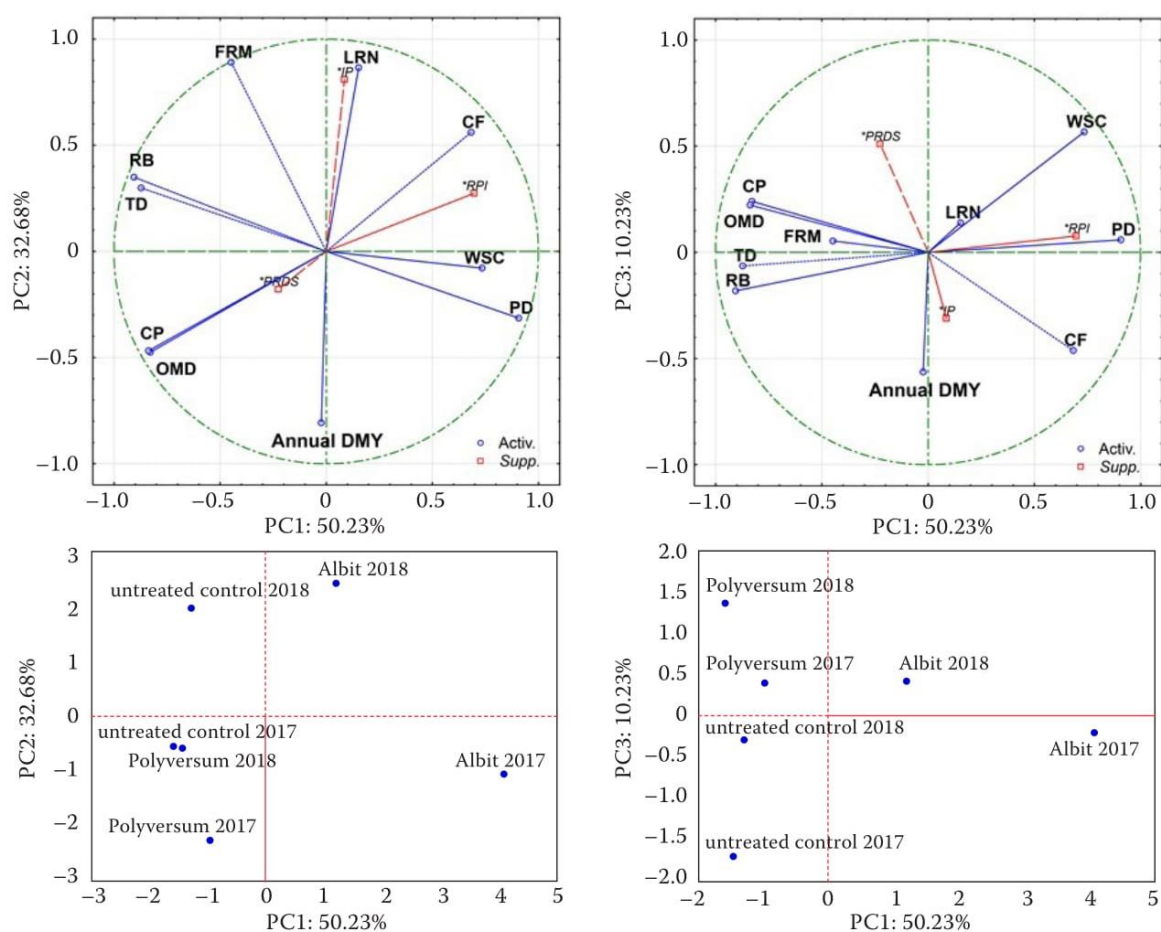


Figure 1. Relationships between forage and root traits under biological control of lucerne over the two years analyzed by principal component analysis. Annual DMY – dry matter forage yield; CP – crude protein; CF – crude fiber; WSC – water soluble carbohydrates; OMD – organic matter digestibility; PD – plant density; TD – tap root diameter; RPI – root potential index; RB – percentage of branch-rooted plants; LRN – lateral root number; FRM – fine root mass; IP – percentage of infected plants; PRDS – plant root disease score

increase of IP up to 76%, in contrast to 49% at untreated control. However, any negative yield effect was not observed due to low PRDS from 1.7 to 2.1. These results correspond with the few studies reporting negative effect of *P. oligandrum* application. Boček et al. (2013) reported a negative effect on disease incidence in strawberries in one year out of two with significantly reduced yield.

A negative effect of Polyversum application in lucerne seems to have been promoted under conditions of drought stress in the second year of the experiment. The growth period from April to September 2018 was warm (+3.5°C above normal) and dry (-75 mm below normal) with a marked reduction in forage yield from 12.2 to 7.6 t/ha. This is in line with the negative effect of drought on lucerne productivity through reduced stem length and density (Saeed and El-Nadi 1997). Our study also demonstrated that this stress also resulted in

cessation of common development of root morphology traits. Tap-root diameter did not differ between years; this was in contrast to regular annual increase about 3 mm per year reported by Hakl et al. (2017).

Influence of biological control on forage quality. Application of Albit led to generally lower forage quality in terms of lower CP and higher CF content in the harvested forage of some cuts. On the other hand, there was a higher WSC content. Lopachev et al. (2013) reported that high doses of Albit reduced the content of CP in barley, similar to the CP decrease in lucerne after Albit application. The impact on plant CP content could be associated with fact that the poly-beta-hydroxy butyric acid contained in Albit is also produced by Rhizobia as an energy source (Kivanc and Dombaycı 2016). According to Ratcliff et al. (2008), there can be a conflict of interest between rhizobia and legumes

due to a metabolic tradeoff between N₂ fixation and poly-beta-hydroxy butyric acid accumulation. It seems that application of preparations containing poly-beta-hydroxy butyric acid in lucerne stands could influence these relationships with negative impacts on CP content. Results of PCA also suggest possible correlations among root morphology traits and forage quality, but more definite conclusions would need to be supported by monitoring of stand structure parameters.

In summary, the different methods of disease control should be tested under field conditions because results show that negative effects on forage yield and quality can be observed. There are questions about the optimum timing of the application during the cutting schedule and also the impact of drought and temperature on the efficacy of the applied preparations. This study does not diminish the potential importance of biological control methods for forage legume crops, but it does highlight that applications under field conditions may not always give beneficial outcomes, in contrast to results of laboratory experiments, because of complicated interactions between plant, organism/preparation, and environment.

REFERENCES

- Benhamou N., le Floch G., Vallance J., Gerbore J., Grizard D., Rey P. (2012): *Pythium oligandrum*: An example of opportunistic success. *Microbiology*, 158: 2679–2694.
- Boček S., Salaš P., Sasková H., Mokričková J. (2013): Effect of Alginate[®] (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.
- Daraignes L., Gerbore J., Yacoub A., Dubois L., Romand C., Zekri O., Roudet J., Chambon P., 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.
- Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., Grizard D., Renault-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 International*, 21: 4847–4860.
- Gray E.A., Koch D.W. (2004): Influence of late-season harvesting, fall grazing, and fungicide treatment on Verticillium wilt incidence, plant density, and forage yield of alfalfa. *Plant Disease*, 88: 811–816.
- Hakl J., Písařík M., Hřevušová 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.
- Handelsman J., Raffel S., Mester E.H., Wunderlich L., Grau C.R. (1990): Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 713–718.
- Huang H.C. (2003): Verticillium wilt of alfalfa: Epidemiology and control strategies. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25: 328–338.
- IUSS Working Group WRB (2015): International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps. World Soil Resources Reports No. 106. Rome, Food and Agriculture Organization.
- Kharchenko G.L., Ryabchinskaya T.A., Sarantseva N.A., Bobreshova I.Y., Zlotnikov A.K. (2008): Methods for increasing the alfalfa productivity. *Zashchita i Karantin Rastenii*, 5: 36–37. (In Russian)
- Kivanc M., Dombaycı N. (2016): Production of poly-β-hydroxybutyric acid by rhizobium sp. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25: 1305–1311.
- 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: 9–12.
- Lamb J.F.S., Sheaffer C.C., Rhodes L.H., Sulc R.M., Undersander D.J., Brummer E.C. (2006): Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence, and nutritive value. *Crop Science*, 46: 902–909.
- Lopachev N.A., Amelin A.A., Efremova J.V., Melnikov V.P. (2013): The influence of biostimulants of growth and antifungals on productivity and quality of the brewing barley in the orel region. *Vestnik Orelgau*, 6: 18–22.
- Meloun M., Militký J. (2011): *Statistical Data Analysis. A Practical Guide with 1250 Exercises and Answer Key on CD*. New Delhi, Woodhead Publishing India.
- Morsy K.M., Abdel-Monaim M.F., Mazen M.M. (2011): Use of abiotic and biotic inducers for controlling fungal diseases and improving growth of Alfalfa. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5: 816–824.
- Písařík M., Hakl J., Hřevušová 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 condition. *Crop Protection*. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104968>. (In press)
- Ratcliff W.C., Kadam S.V., Denison R.F. (2008): Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. *FEMS Microbiology Ecology*, 65: 391–399.
- Saeed I.A.M., El-Nadi A.H. (1997): Irrigation effects on the growth, yield, and water use efficiency of alfalfa. *Irrigation Science*, 17: 63–68.
- StatSoft, Inc. (2012): *Statistica for Windows*. Tulsa, StatSoft.
- Suprapta D.N. (2012): Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 18: 1–8.
- Xiao K., Kinkel L.L., Samac D.A. (2002): Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23: 285–295.

Received on July 12, 2019

Accepted on October 1, 2019

Published online on October 17, 2019

5 Sumární diskuse

První studie „In-field lucerne root morphology traits over time in relation to forage yield, plant density, and root disease under two cutting managements“ (Hakl *et al.*, 2017) byla klíčovou pro pochopení vývoje kořenové morfologie vojtěšky seté v rámci víceletého experimentu. Základním cílem bylo posoudit morfologické vlastnosti kořenů ve vztahu k odrůdám vojtěšky, frekvenci sečí, obdobím odběru vzorků kořenů, výnosu nadzemní hmoty, výskytu kořenových chorob a k hustotě porostu. Vývoj kořene vojtěšky v čase byl pozitivně spojen s nárůstem průměru hlavního kořene (TD), zatímco změny hustoty byly klíčové pro vývoj parametrů větvení kořenového systému. Byla rovněž zaznamenána pozitivní korelace mezi větvením kořene (RB) a výnosem nadzemní hmoty vojtěšky, to je v souladu s dřívějšími studiemi (McIntosh *et Miller*, 1980; Saindon *et al.*, 1991). Intenzivněji rozvětvený kořen vykazoval vyšší hmotnost na jednotku délky, ale rovněž i vyšší hodnoty průměrného napadení kořene (PRDS). Tato studie ukázala, že vývoj kořenů vojtěšky v polních podmínkách během čtyřletého období je ovlivňován především věkem rostlin a změnami hustoty porostu. Vliv odrůdy nebo managementu je v porovnání s výše uvedenými vlivy minimální. Při hodnocení zdravotního stavu rostlin je třeba brát v úvahu, že více rozvětvený kořen dosahuje přirozeně vyššího stupně napadení než rostliny s nevětveným hlavním kořenem bez ohledu na stáří rostliny.

V rámci této studie byl rovněž zpracován návrh pro optimalizaci hodnocení morfologie kořenů pomocí indexu potenciálu kořenů (RPI), který v sobě integruje dva klíčové parametry: průměr hlavního kořene (reprezentuje velikost rostlin) a hustotu porostu (PD), která je klíčová pro výnos z jednotky plochy. Problémem je totiž fakt, že PD a TD jsou spolu v negativním vztahu, tj. čím méně rostlin, tím vyšší průměrný TD. Index potenciálu kořenů kombinující oba tyto parametry vykazoval významně užší vztah k výnosu, než tomu bylo u ostatních morfologických parametrů (TD, RB, PD, RDM). Bylo jasně prokázáno, že hodnocení kořenové morfologie je velmi užitečným nástrojem pro charakterizaci porostů vojtěšky seté, které může pomoci efektivně vysvětlit rozdíly ve výnosech nadzemní hmoty.

Publikace „Development of lucerne root morphology traits in lucerne-grass mixture in relation to forage yield and root disease score“ (Hakl *et al.*, 2018) pomohla porozumět vývoji kořenových parametrů vojtěšky seté ve směsi s travami. Parametr RPI se osvědčil jako účinný nástroj pro srovnávání odrůd ve směsi a umožňuje vysvětlit rozdíly v jejich výnosech píce a výnosotvorných prvcích. Výnos vojtěšky a hustota porostu byla pozitivně spojena s hustotou

rostlin na m², RPI a hmotností kořenů (RDM). Tato studie zdůraznila, že při efektivním hodnocení morfologie kořenů vojtěšky by se neměla opomíjet hustota rostlin, TD a počet větví hlavního kořene (LRN) s výpočtem RPI, případně intenzitou větvení (IRB). Nižší hustotu vojtěšky lze považovat za faktor, který podporuje vývin kořenů rostlin. U vojtěškotrav lze výnos predikovat pomocí hustoty rostlin a hmotnosti kořenů na m² lépe, než když je vyseta v monokultuře. Při přítomnosti trav spolu s vyšší hustotou vojtěšky v porostu došlo ke zvýšení hloubky rozvětvení kořenů, ale trávy ve směsi neovlivnily ostatní parametry rostlin vojtěšky s rozvětveným kořenem. Nižší stupeň napadení kořenů u varianty L90 při současném nižším větvení kořenů na úrovni porostu (RB) jasně ukázal, jak je větvení kořenů a jejich zdravotní stav vzájemně úzce propojen. Změny ve stupni napadení mohou být tedy vysvětleny rozdílnou morfologií rostlin mezi variantami, což je třeba vzít v úvahu při hodnocení výsledků. Větvící rostliny v zapojeném porostu jsou navíc jednoznačně produktivnější, což může kompenzovat i jejich opticky vyšší stupeň napadení.

Nejvyšší průměr kořenového krčku byl zaznamenán v porostech s nejnižší průměrnou hustotou rostlin vojtěšky, v souladu se výsledky Chmelíkové *et al.* (2015). Přítomnost travního komponentu snižovala větvení kořenů vojtěšky pouze v kombinaci s vyšším výsevkem vojtěšky. Studie tak naznačila, že upřednostňování vojtěšky ve směsi prostřednictvím zvyšování jejího výsevku může výrazněji zpomalit její rozvoj kořenů ve směsi, protože při vyšším podílu trávy a nižším výsevku vojtěšky bylo dosahováno obdobných hodnot kořenových parametrů. Je tak otázkou, zda používané vysoké výsevky vojtěšky ve směsi nejsou v tomto smyslu negativní. Pochopení vzájemných vztahů mezi vývojem kořenové morfologie, hustotou porostu a výnosem vojtěšky ve směsi může pomoci při optimalizaci výsevního poměru i při hodnocení porostu.

Z výsledků uvedených v publikacích Hakl *et al.* (2017) i Hakl *et al.* (2018) vyplývá, že posouzení kořenové morfologie je cestou k efektivnějšímu hodnocení porostů vojtěšky seté. Stanovit efektivní metodu hodnocení morfologických parametrů bylo klíčové pro následné hodnocení vlivu biologických přípravků na výnos a vytrvalost porostů jetelovin, přičemž metodické poznatky shrnuté v těchto publikacích byly v následujících experimentech plně využity. Ukázalo se, že jednoletý interval hodnocení je dostačující, neboť změny morfologie od podzimu do následujícího jara nejsou významné. Parametry kořenů u každého vzorku byly vztahovány k jeho hustotě, která fungovala jako kovariáta u vybraných analýz. Mimo hustoty (PD) byl sledován průměr hlavního kořene (TD) a jeho větvení (LRN, RB), což se

v předchozích studiích ukázalo jako hlavní parametry ve vztahu k výnosu porostů a zdravotního stavu kořenů.

Cílem publikace „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“ (Pisarčík *et al.*, 2020), která obsahuje stěžejní výsledky této práce, bylo ve tříletém polním experimentu zjistit vliv vybraných biologických přípravků na hustotu porostu jetele lučního, vývoj kořenné morfologie, výnos a výnosové parametry. Dalším cílem bylo zhodnotit vztahy mezi kořenovým větvením a průměrným stupněm napadení kořene u jetele lučního.

Aplikace přípravku Polyversum stimulovala rozvoj průměru hlavního kořene a větvení kořenů rostlin jetele lučního, zejména v posledním roce experimentu. To je v souladu s tvrzením, že organizmus *Pythium oligandrum* stimuluje růst rostlin (Benhamou *et al.*, 2012), ale tento efekt byl zřídka studován na kořenech získaných v rámci terénních studií. Wulff *et al.* (1998) popsali stimulaci prodloužení kořenů u hydroponicky pěstovaných sazenic okurky při jejich inokulaci organismem *Pythium oligandrum*. U rajčat *P. oligandrum* výrazně zvýšilo rozvoj laterálních kořenů (Pharand *et al.*, 2002).

To odpovídá rozdílům mezi variantami ošetřenými přípravkem Polyversum a kontrolní variantou (v průměru o 55 % vyšší podíl větvících kořenů) v prvním roce sledování experimentu. Rozdílný efekt intenzity ošetření na odrůdy byl zaznamenán v parametru TD, při nižší intenzitě ošetření přípravkem Polyversum nejlépe reagovala odrůda Start, zatímco u vyšší intenzity aplikace odrůda Callisto.

V předchozí publikaci Hakl *et al.* (2017) je uvedeno, že změny v rámci větvení kořenů vojtěšky byly převážně zapříčiněny změnami v hustotách rostlin. V experimentu byly hodnoty hustoty porostu jetele vyšší ve všech letech ve srovnání s hodnotami Marley *et al.* (2003), která uvádí 300, 200 a 135 rostlin na m² v prvním, druhém a třetím roce experimentu. Nejvýraznější rozdíly v kořenné morfologii byly pozorovány v posledním roce po přirozeném poklesu hustoty rostlin. Tento výsledek naznačuje, že pozitivní účinek přípravku Polyversum na TD a RB mohl být částečně potlačen vysokou hustotou rostlin v polním experimentu.

Na rozdíl od vojtěšky nejsou u jetele lučního k dispozici studie dokumentující vývoj morfologie kořenů v čase. V letech 2017 a 2018 došlo v porostu jetele lučního ke stagnaci růstu TD (8,9 mm vs. 9,1 mm) při vysokém poklesu PD (377 vs. 203 rostlin), což bylo v rozporu s předchozími poznatky o kontinuálním nárůstu TD u vojtěšky (Hakl *et al.*, 2017; Hakl *et al.*, 2018). Zdá se, že jetel luční nemohl kompenzovat pokles PD v průběhu času zvýšením TD a

větvením kořene. Změny RPI jetele lučního v užitkových letech byly závislé pouze na změnách PD, proto lze pomocí RPI výnos meziročně predikovat obtížněji než u vojtěšky. Marquez-Ortiz *et al.* (1999) uvádí, že kořenový krček je také spojen s produktivitou rostliny, proto by bylo vhodné posuzovat i parametry kořenového krčku jetelovin.

Obě intenzity ostření přípravkem Polyversum v roce 2018 významně snižovaly PRDS v průměru o 8 %. To je v souladu se studií Pharanda *et al.* (2002), který pozoroval pozitivní účinek *P. oligandrum* na snížení poškození kořenů rajčat patogeny z rodu *Fusarium*. Gerbore *et al.* (2014) zdůrazňuje, že je potřeba více terénních experimentů pro objektivní posouzení efektivity využití *P. oligandrum*. V posledním roce experimentu byla u 93 % rostlin pozitivní detekce chorob. Toto vysoké procento napadených rostlin je v souladu s tvrzením Hejduka (2006) o rostoucím významu kořenových onemocnění v průběhu užitkových let při pěstování jetele lučního.

Byly pozorovány pozitivní korelace mezi třídami LRN, TD a FRM. PRDS se významně nelišilo mezi třídami LRN na rozdíl od vojtěšky, jak je popisuje Hakl *et al.* (2017). Pozitivní vztah mezi LRN a TD u jetele lučního vykazuje stejnou závislost, kterou u vojtěšky popsal Johnson *et al.* (1998). Několik studií uvádí pozitivní vliv rozvoje systému adventivních kořenů na zlepšení odolnosti rostlin jetele (Montpetit *et Coulman*, 1991a; Smith 1989). Adventivní kořeny jsou charakterizovány jako kořeny o průměru do 2 mm a jejich výskyt se hodnotí na subjektivní škále (Montpetit *et Coulman*, 1991b). Podle Christie and Martin (1999) nemusí být jetel luční s více rozvětveným kořenovým systémem tak silně ovlivněn individuálními infekcemi, protože ztráta laterálního kořene není tak kritická jako ztráta hlavního kořene. Existují také viditelné pozitivní vztahy mezi FRM a LRN, jak bylo popsáno Johnsonem *et al.* (1998) pro vojtěšku, ale tento efekt nevedl ke změnám PRDS mezi třídami LRN. Pozitivní vliv přípravku Polyversum na PRDS v posledním roce experimentu nebyl přímo spojen se změnami v morfologii kořenů. Na rozdíl od vojtěšky zvýšení LRN nekoreluje s vyšším stupněm napadení, ale pouze s vyšší hodnotou TD. Tyto rozdíly mezi jetelem a vojtěškou však zdůrazňují fakt, že kořenové choroby a morfologie kořenů by měly být posuzovány v polních experimentech společně.

Rok 2018 jasně ukázal potenciál přípravku Polyversum pro zvýšení výnosu jetele lučního, u intenzivně ošetřované varianty došlo ke zvýšení ročního výnosu píce o 18 % oproti kontrolní variantě. Tomu nasvědčují i výsledky dalších autorů o pozitivním efektu *P. oligandrum* na výnos plodin (le Floch *et al.*, 2003; Patkowska *et al.*, 2009; Boček *et al.*, 2012). Tento pozitivní vliv však nemohl být spojen výhradně s parametrem PRDS, protože u obou

variant ošetřených přípravkem Polyversum bylo pozorováno nižší PRDS oproti kontrolní variantě. Zvýšení výnosu jetele lučního tak mohlo být spojeno především s vyšším rozvětvením kořene jetele lučního, protože mnohé studie uvádějí pozitivní účinky rozvětvení kořenů na výnos píce vojtěšky (Lamb *et al.* 2000; Hakl *et al.* 2017). Podpora větvení kořene či stimulace růstu nadzemní hmoty se mohla stát důležitějším aspektem než samotné potlačení chorob, což je v souladu předchozími studii, které popisují příznivé účinky podpory růstu plodin po kolonizaci kořenů organismem *P. oligandrum* (Benhamou *et al.*, 2012; Gerbore *et al.*, 2014). Zvýšený výnos jetele lučního korespondoval s vyšší výškou porostu, jak uvádějí Hakl *et al.* (2012) u vojtěšky. Vztahy mezi kořenovou morfologií a nadzemní biomasou poukazují na to, jak je důležité hodnotit účinek biologických přípravků na porosty jetelovin s ohledem na výskyt kořenových chorob spolu s kořenovými morfologickými rysy a výnosem nadzemní biomasy.

Nebyl zaznamenán žádný vliv přípravků na maximální délku lodyh a hustotu lodyh na m², to je v rozporu s výzkumy Kharchenka *et al.* (2009), kteří po aplikaci přípravku Albit zaznamenali vyšší hustotu lodyh a současně i vyšší výnos jetele. Při porovnání variant s odlišnou intenzitou aplikace přípravku Polyversum bylo jasně prokázáno, že jen pravidelná podzimní aplikace není dostatečná pro zvýšení výnosu navzdory získaným pozitivním rozdílům ve vybraných kořenových parametrech nebo výšce porostu. Wysocki *et al.* (2017) uvádí, že vysoce intenzivní aplikace *P. oligandrum* u jahodníku vykazovala pouze sporadicky pozitivní vliv na výnos.

Při zhodnocení ekonomické návratnosti jetele lučního pro rok 2018 (kap. Přílohy, tab. 2) vychází nejlépe intenzivní ošetření přípravkem Polyversum se ziskem 2889 Kč na ha, díky nízké ceně přípravku následuje Albit se ziskem 1531 Kč na ha. Avšak v rámci kompletního ekonomického vyhodnocení tří let trvání experimentu (kap. Přílohy, tab. 1) ani jedno z ošetření není rentabilní, protože v prvních dvou letech experimentu nedošlo k významným rozdílům ve výnosech. Přípravek Polyversum má nesporně určitý potenciál, ale je nutný další výzkum pro optimalizaci načasování aplikace přípravků.

Cílem další z publikovaných prací „Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality“ (Pisarčík *et al.*, 2019) bylo posoudit vliv přípravků Polyversum a Albit ve dvouletém polním experimentu na hustotu rostlin, morfologii kořenového systému, výnos a kvalitu píce vojtěšky seté. Tato studie, na rozdíl od experimentu s jetelem, dokumentuje, že při aplikaci biologických přípravků lze pozorovat i negativní účinek, protože interakce s proměnlivými podmínkami prostředí mohou silně ovlivnit účinnost těchto přípravků.

V experimentu došlo ke snížení výnosu vojtěšky seté u varianty ošetřené přípravkem Albit v průměru o 16,5 %. To je v rozporu s výsledky Kharchenka *et al.* (2008), který pozoroval zvýšení výnosu píce vojtěšky o 15-20 % při ošetření přípravkem Albit. Tento negativní účinek na výnos píce by mohl být spojen zejména se sníženou intenzitou kořenového větvení a TD v roce 2017. Tento trend je v souladu s pozitivní korelací mezi výnosem vojtěšky a větvením kořene zmíněné v předchozí práci Hakl *et al.* (2017). V experimentu se nepotvrdil pozitivní efekt přípravku Polyversum na stimulaci kořenového systému, jak uvádí Pisarčík *et al.* (2020) u jetele lučního. Varianty ošetřené přípravkem Polyversum vykázaly nižší FRM v posledním roce experimentu bez negativních korelací s TD, RB nebo výnosem píce. Aplikace přípravku Polyversum působila taktéž negativně na zdravotní stav kořenů, podíl napadených rostlin byl v roce 2018 76 % oproti neošetřené kontrole, kde bylo jen 49 % napadených rostlin. Tento výsledek koresponduje s prací Bočka *et al.* (2013), kteří zaznamenali vyšší výskyt onemocnění a nižší výnos u jahodníku. Negativní účinek byl pozorován také u vinné révy, kde bylo detekováno po ošetření *P. oligandrum* více genů patogenního organismu *P. chlamydozpora*, než tomu bylo před ošetřením (Yacoub *et al.*, 2016). V experimentu s vojtěškou byl však stupeň napadení celkově na nízké hodnotě kolem stupně 2, a pravděpodobně proto nebyl u varianty ošetřené přípravkem Polyversum zaznamenán negativní účinek na výnos píce. V tomto experimentu nebyly v parametru RPI žádné rozdíly mezi variantami, protože změny v kořenové morfologii byly detekovány pouze v parametru FRM místo PD nebo TD. Aplikace přípravku Albit snížila výnos a současně i utlumila rozvoj morfologických parametrů kořenů vojtěšky. Negativní efekt na výnos byl výraznější v suchém roce 2018. Důvodem negativního účinku na rozdíl od pozitivního účinku uváděného Kharchenkem *et al.* (2008) by mohl souviset s nevhodným načasováním aplikace. Tyto výsledky zdůrazňují potřebu testování biologických přípravků v polních podmínkách. Také je nutné zabývat se dlouhodobým dopadem biologických přípravků, aby bylo možné předvídat možné negativní účinky na životní prostředí (Gerbore *et al.*, 2014).

Varianta ošetřená přípravkem Albit vykazovala také nižší kvalitu píce vojtěšky, to se projevilo zejména nižším obsahem hrubého proteinu (CP) a vyšším obsahem hrubé vlákniny (CF) ve sklizené píci. Na druhé straně byl v píci vyšší obsah vodorozpustných sacharidů (WSC). To koresponduje s pokusy Lopacheva *et al.* (2013) který uvádí, že vysoké dávky přípravku Albit způsobují nižší obsah CP v ječmeni, podobně jako CP klesal po aplikaci přípravku Albit u vojtěšky. Tyto výsledky dokládají, že některé účinky biologických přípravků by mohly být detekovány také v kvalitativních parametrech pícnin.

6 Závěr

Jetel luční a vojtěška setá tvoří hlavní podíl pícnin na orné půdě, které jsou zdrojem kvalitních objemných krmiv s vysokým obsahem bílkovin a dobrou stravitelností. Kořenové choroby jetelovin však představují významný limitující faktor při jejich pěstování a v zemědělské praxi stále neexistuje žádný doporučený způsob přímé ochrany.

Výsledky této práce vyzdvihují roli vývoje kořenové morfologie v posouzení výnosového potenciálu porostů jetelovin, kde monitorování kořenového systému může pomoci s vysvětlením rozdílů mezi odlišnými experimentálními variantami. Větvení kořene, kořenové vlášení, průměr hlavního kořene, podíl nemocných rostlin a stupeň napadení kořene se ukázaly jako klíčové parametry při posuzování efektivity využití biologických přípravků u vojtěšky seté a jetele lučního.

Přípravek Polyversum v hlavní experimentální části práce snižoval stupeň napadení kořene a současně stimuloval větvení kořene jetele lučního. Zvýšení výnosu píce bylo zaznamenáno pouze při intenzivní aplikaci přípravku a bylo více spojeno se stimulací růstu rostlin než ochranou před houbovými chorobami. Projevila se také rozdílná reakce odrůd jetele lučního na intenzitu ošetřování přípravkem Polyversum. V roce 2018 vlivem intenzivní aplikace přípravku Polyversum došlo ke zvýšení výnosu píce o 18 %, což jasně prokazuje, že biologická ochrana může být účinným nástrojem ke zlepšení výnosu jetele lučního. V polním experimentu s vojtěškou setou se však aplikace biologických přípravků projevila spíše negativně. Na variantě ošetřené přípravkem Albit bylo pozorováno snížení výnosu píce ve spojení s nižším rozvojem parametrů kořenové morfologie, a také nižší kvalitou píce. Aplikace přípravku Polyversum sice neovlivnila výnos píce, ale zvýšila podíl nemocných rostlin a také tlumila rozvoj FRM ve druhém užitkovém roce porostu. Zjištěné negativní účinky pravděpodobně souvisejí s nevhodným načasováním aplikace a také s kombinací sucha v letech 2017-2018. Současně tyto výsledky nesnižují potenciál využití biologických přípravků v porostech vojtěšky seté, ale zdůrazňují, že použití biologických přípravků v polních podmínkách mohou komplikovat složité interakce s ostatními necílovými organismy, rostlinami a prostředím. Pro pochopení všech těchto vztahů je třeba dalších výzkumů v této oblasti. Praktická doporučení a vyšší ekonomická efektivita využití biologických přípravků v porostech jetelovin budou nyní záviset na optimalizaci načasování aplikací, což zůstává výzvou pro další výzkum.

Shrnutí stanovených hypotéz:

Hypotéza 1. Vybrané parametry morfologie kořenů vojtěšky seté mají vztah k výnosu a zdravotnímu stavu jetelovin při pěstování v polních podmínkách.

Průměr hlavního kořene a jeho větvení prokázaly vztah k výnosu píče a zdravotnímu stavu kořenů, hypotéza byla přijata (Hakl *et al.*, 2017; Hakl *et al.*, 2018)

Hypotéza 2. Rozvoj morfologie kořene vojtěšky seté je v jetelovino travní směsi ovlivněn podílem travního komponentu.

Přítomnost travního komponentu zvyšovala hloubku větvení kořenů vojtěšky, ale větvení kořenů bylo sníženo pouze v kombinaci s vyšším výsevkem. Hypotéza přijata (Hakl *et al.* 2018).

Hypotéza 3. Používání biologických přípravků v porostech jetelovin zvyšuje jejich výnos a vytrvalost.

U jetele byla hypotéza v publikaci Pisarčík *et al.* (2020) přijata, intenzivní aplikace přípravku Polyversum zvýšila výnos jetele lučního v druhém užitkovém roce o 18 %. U ošetření přípravkem Albit nebyly statisticky průkazné rozdíly. V pokusech s vojtěškou setou (Pisarčík *et al.* 2019) mělo ošetření přípravkem Albit negativní vliv na výnos, přípravek Polyversum nevykázal rozdíl oproti kontrolní variantě.

Hypotéza 4. Používání biologických přípravků v porostech jetelovin snižuje jejich napadení houbovými patogeny.

U jetele byla hypotéza byla ve studii Pisarčík *et al.* (2020) přijata, přípravek Polyversum měl pozitivní vliv na potlačení napadení kořene u obou úrovní intenzity aplikace. V práci Pisarčík *et al.* (2019) došlo k opačnému efektu, přípravek Polyversum zvyšoval podíl napadených rostlin v druhém roce experimentu. Přípravek Albit nevykázal účinky na zdravotní stav kořenů u obou druhů jetelovin.

Hypotéza 5. Aplikace biologických přípravků v porostech jetelovin přináší pozitivní ekonomický efekt.

Hypotéza nebyla přijata, aplikace při vyhodnocení celého období trvání experimentů nepřinesla pozitivní ekonomický efekt ani u jetele, kde byl zaznamenán pozitivní vliv na výnos. Mezi klíčové výzvy pro budoucí výzkum patří optimalizace aplikace biologických přípravků, především u jetele lučního, kde se projevil vysoký potenciál zvýšení výnosů.

7 Seznam použité literatury

- Agrios, G. N. 2004. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. 952 p.
- Bélangier, G., Castonguay, Y., Lajeunesse, J. 2013. Benefits of mixing timothy with alfalfa for forage yield, nutritive value, and weed suppression in northern environments. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(1), 51-60.
- Benhamou, N., Bélanger, R. R., Reyb, 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. p. 681-698.
- Benhamou, N., leFloch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P. 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic Access. *Microbiology*. 158. p. 2679-2694.
- Bocsa, I., Pummer, L., Horompoli, T. 1994. Importance of main Alfalfa Diseases in Eastern Europe as Determined by the use of specifically Resistant Varieties. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 29 (1-2). p. 39-48.
- Boček, S., Salaš, P., Sasková, H., Mokričková, J. 2012. 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 (8). p. 19-28.
- Brimmer, T. A., Boland, G. J. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. p. 3-16.
- Brožová, J. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*. 38. p. 29-35.
- Cagáň, L., Praslička J., Huszár J., Šrobárová A., Roháček T., Hudec K., Tancík J., Bokor P., Tóth P., Tóthová M., Barta M., Rlíášová M. 2010. Choroby a škodcovia poľných plodín. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. 677 p.
- De Jaeger, N., de la Providencia, I. E., de Boulois, H. D., Declerk, S. 2011. *Trichoderma harzianum* might impact phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol*. 77. p. 558-567.
- Elnaghy, M. A., Fadi-Allah, E.M., Abdelzaher, H. M. A., Moharam, S. A. 2009. Some chemical and physical factors affecting oospores production and germination of wild species of *Pythium irregulare*, *Pythium longisporangium* and *Pythium oligandrum*. *Journal of Botany*. 38 (2).

- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., LeFloch 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. p. 4847-4860.
- Hakl, J., Šantrůček, J., Kalista, J. 2004. Počet a délka lodyh u rostlin vojtěšky seté ve vztahu k intenzitě napadení chorobami kořenového systému. In. *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2004*. Sborník příspěvků z vědecké konference. AF ČZU, Praha, p. 142-145. ISBN 80-213-1182-7.
- Hakl, J., Šantrůček, J., Kovářová, D., Kalista, J. 2007. Tvorba lodyh u vojtěšky seté a intenzita napadení chorobami kořenového systému v jarním a podzimním období. In. *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2007*. Sborník příspěvků z vědecké konference. VÚRV a ČZU, Praha, p. 189-192. ISBN 978-80-213-1621-8.
- Hakl, J., Krajíc, L., Šantrůček, J., Hrubá, M. 2009. Vliv odolnosti k napadení chorobami kořenového systému na výnos vojtěšky seté v poloprovodných podmínkách. In. *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2009*. Sborník příspěvků z vědecké konference. VÚRV a ČZU, Praha, p. 191-194. ISBN 978-80-213-1874-8.
- Hakl, J., Hrevušová, Z., Hejzman, 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, 58 -596.
- Hakl, J., Písařík, 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. p. 109-117.
- Hakl, J., Písařík, 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. ISSN: 0378-4290.
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E. H., Wunderlich, L., Grau, C. R. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3):713-718.
- Hase, S., Shimizu, A., Nakaho, K., Takenaka, S., Takahashi, H. 2006. Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology*. 55. p. 537-543.

- Hejduk, S. 2006. The persistency evaluation of Czech varieties of Red (*Trifolium pratense* L.) and Alsike Clover (*Trifolium hybridum* L.). *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* LIV, No. 4, p. 133-138.
- 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). p. 111-119.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Hamada, W., El-Mahjoub M. 2006. Bio-Fungicides as an Alternative for Tomato Fusarium Crown and Root Rot Control. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 1. p. 19-29.
- Hlavičková, D., Šantrůček, J., Svobodová, M. 2002: Vlácení vojtěšky a oslabení rostlin. *Úroda*, ISSN 0139-6013, 51, (12), p. 26-27.
- Huang, H. C., Hoes, J. A. 1976. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Canadian Journal of Botany*. 54(5-6). p. 406-410.
- 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.
- Chen, L., Heng, J., Qin, S., Bian, K. 2018. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PloS one*, 13(6), 1-22.
- Chloupek, O., Skácel, M., Ehrengergerová, J., 1999. Effect of divergent selection for root size in field-grown alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* 79, p. 93-95.
- Chmelíková L., Wolfrum S., Schmid A., Hejcman M., Hülsbergen K.J. 2015. Seasonal development of biomass yield in grass legume mixture on different soils and development of above- and belowground organs of *Medicago sativa*. *Archives of Agronomy and Soil Science* 61, p. 329-346.
- Christie, B., Martin, R., 1999. Selection for persistence in red clover. *Canadian Journal plant Science*. 357–359.
- Jacob, I., Hartmann, S., Schubiger, F.X., Struck, C. 2010. Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany concerning the resistance to Southern Anthracnose. *Grassl. a Chang. world. Proc. 23rd Gen. Meet. Eur. Grassl. Fed.* 15, 344-346.
- Jenkyn, J. F. 1975. The effect of benomyl sprays on *Sclerotinia trifoliorum* and yield of red clover. *Annals of Applied Biology*, 81(3), 419-423.
- Johnson, L. D., Marquez-Ortiz, J. J., Barnes, D. K., Lamb, J. F. S. 1996. Inheritance of root traits in alfalfa. *Crop science*, 36(6), p. 1482-1487.

- Johnson, L.D., Marquez-Ortiz, J., Lamb, J.F.S., Barnes, D. K. 1998. Root morphology of alfalfa plant introductions and cultivar. *Crop Science* 38, p. 497-502.
- Jones, C. R., Samac, D. A. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biological Control*, 7(2), p. 196-204.
- Kazda, J., Mikulka, J., Prokinová, E. 2010. Encyklopedie ochrany rostlin: polní plodiny. Vyd. 1. Praha:ProfiPress. 399 p. ISBN 978-80-86726-34-2.
- Kharchenko, G.L., Ryabchinskayā, T. A., Sarantseva, N. A., Bobreshova, I. Y., Zlotnikov, A. K., Gins, V. K. 2008. Puti povyšeniya produktivnosti ljucerny. Zaščita i karantin rastenij. 5. p. 36-37. Original : Харченко Г.Л. Пути повышения продуктивности люцерны. / Г.Л. Харченко, Т.А. Рябчинская, Н.А. Саранцева, И.Ю. Бобрешова, А.К. Злотников, В.К. Гинс // Защита и карантин растений.-2008.-№ 5.-С. 36-37.
- Kharchenko, G. L., Ryabchinskayā, T. A., Sarantseva, N. A., Bobreshova, I. Y., Zlotnikov, A. K. 2009. Integrated protection and increase of productivity of clover using the preparation Albit. *Zashchita i Karantin Rastenij*, (6).
- Kilpatrick, R. A., Hanson, E. W., & Dickson, J. G. (1954). Root and crown rots of red clover in Wisconsin and the relative prevalence of associated fungi. *Phytopathology*, 44, p. 252-259.
- Klesnil, A. 1978. Intenzivní výroba píce. *SZN*. 392 p.
- Klimeš, F., Graman, J., Kobes, M., Houdek, I. 2001. Odrůdy jetele lučního v různých ekologických podmínkách. *Úroda*. 49. 8. p. 23-25. ISSN: 0139-6013.
- Kováčiková, E., Kůdela, V. 1983. Příčiny špatného přezimování jetele lučního. *Rostlinná výroba*. 30 (2). p. 201-208.
- Kováčiková, E., Kůdela, V. 1984. Rozbor jarních zaorávek jetele lučního v ČSR v letech 1961 - 1982. *Rostlinná výroba*. 30 (3). p. 295-300.
- Küçük, G., Kivanç, M. 2003. Isolation of *Trichoderma spp.* and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology*. 27. p. 247-253.
- Kůdela, V. 1970. Způsob hodnocení odolnosti odrůd vojtěšky vůči cévnímu vadnutí. *Rostlinná výroba*. 16 (9). p. 1041-1050.
- Kůdela, V. 1974. Úbytek rostlin v porostech vojtěšky a onemocnění cévním vadnutím. *Ochrana rostlin*. 10. p. 179-186.
- Kůdela, V. 1978. Soustava ochranných opatření proti cévnímu vadnutí vojtěšky. *Metodiky pro zavádění výsledků výzkumu do praxe*. ÚZTIZ. 2. 27 p.
- Lamb J.F.S., Barnes D. K., Henjum K. I. 1999. Gain from two cycles of divergent selection for root morphology in alfalfa. *Crop Science*. 39. p. 1026-1035.

- Lamb, J.F.S., Samac, N.A., Barnes, D.K., Henjum, K.I. 2000. Increased herbage yield in alfalfa associated with selection fibrous and lateral roots. *Crop Science*. 40. p. 693-699.
- Larkin, R. P., English, J. T., Mihail, J. D. 1995. Effects of infection by *Pythium spp.* on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology*, 85(4). p. 430-435.
- Larkin, R. R., English, J. T., Mihail, J. D. 1996. The relationship of infection by *Pythium spp.* to root system morphology of alfalfa seedlings in the field. *Plant Dis*. 80. p. 281-285.
- Leath, K. T., Zeiders, K. E., Byers, R. A. 1973. Increased Yield and Persistence of Red Clover after a Soil Drench Application of Benomyl. *Agron. J.* 65, 1008-1010.
- LeFloch, G., P. Rey, F. Déniel, N. Benhamou, K. Picard, and Y. Tirilly. 2003. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agronomia*. 23. p. 455-460.
- Leelavathi, M. S., Vani, L., Reena, P. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(1). p. 96-103.
- Li, Y. C., Sun, X. J., Bi, Y., Ge, Y. H., Wang, Y. 2009. Antifungal Activity of Chitosan on *Fusarium sulphureum* in Relation to Dry Rot of Potato Tuber. *Agricultural Sciences in China*. 8(5). p.597-604.
- Lin, C., Tsai, C. H., Chen, P. Y., Wu, C. Y., Chang, Y. L., Yang, Y. L., & Chen, Y. L. (2018). Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS one*, 13(4), 1-17.
- Malatin, K. M., Manninger, S., 1980. Field-test of Resistance to infectious wilt in lucerne at Kompolt. *Novenytermeles*. 29 (6). p. 497-504.
- Mášková, K., Hakl, J., Šantrůček, J. 2009. Hodnocení odolnosti k chorobám kořenového systému v sortimentu českých odrůd vojtěšky seté v druhém a třetím roce vegetace. In. *Aktuální témata v pícninářství a trávníkářství 2009*. Česká zemědělská univerzita v Praze. p. 59-62.
- Marley, C.L., Fychan, R., Fraser, M.D., Winters, A., Jones, R., 2003. Effect of sowing ratio and stage of maturity at harvest on yield, persistency and chemical composition of fresh and ensiled red clover/lucerne bi-crops. *Grass Forage Sci*. 58, 397–406.
- Marquez-Ortiz, J. J., Lamb, J. F. S., Johnson, L. D., Barnes, D. K., Stucker, R. E., 1999. Heritability of crown traits in alfalfa. *Crop science*, 39(1), 38-43.
- Marten, G. C. 1989. Summary of the trilateral workshop on persistence of forage legumes. *Persistence of forage legumes, (persistenceoffo)*, p. 569-572.

- McIntosh, M.S., Miller, D.A. 1980. Development of root branching in three alfalfa cultivars. *Crop Science*, 20. p. 807-809.
- Monnet, B. 2015. New algal biostimulant preparation without phosphonates (Alginure Biovital). *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut*. 179. 17p.
- Montpetit, J. M., Coulman, B. E., 1991a. Responses to divergent selection for adventitious root growth in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Euphytica*, 58(2), 119-127.
- Montpetit, J. M., Coulman, B. E., 1991b. Relationship between spring vigor and the presence of adventitious roots in established stands of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 71(3), 749-754.
- Nan, Z. B., Skipp, R. A., & Long, P. G. 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), p. 743-750.
- Nedělník, J. 2008. Choroby pícnin. In: *Metodická příručka ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům. I. Polní plodiny*. Praha. p. 382-383, 398-399. ISBN 978-80-02-02087-5.
- Nedělník, J., Pokorný, R. 2005. Choroby jetele a vojtěšky. *Farmář*. 11(10). p. 24-27.
- Novik, A. 2013. Albit-a multitaskwell-balancedprotective and stimulating agent. *Prosperous Oil Crops 2013. Conference on Prosperous Oil Crops*. p. 188-192.
- Öhberg, H. 2008. Studies of the Persistence of Red Clover Cultivars in Sweden, with Particular Reference to *Sclerotinia trifoliorum*. Doctoral thesis. ISSN 1652-6880, ISBN 978-91-85913-41-1
- Öhberg, H., Bang, 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). p. 25-36.
- Ondráčková, E., Ondřej, M., Both, Z., Nesrsta, M., Prokinová, E. 2014. Metodika biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys*. AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s. r. o., Zemědělská 16, 787 01Šumperk. ISBN 978-80-87360-32-3.
- Ondráčková, E., Ondřej, M., Prokinová, E. 2019. Biologická ochrana rostlin s využitím mykoparazitických hub. *Agromanuál*. dostupné online: <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/biologicka-ochrana-rostlin-s-vyuzitim-mykoparazitickyh-hub>>

- Patkowska, E., 2009. Effect of Bio-Products on Bean Yield and Bacterial and Fungal Communities in the Rhizosphere and Non-Rhizosphere. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(2), 255-263.
- Pertot, I., Alabouvette, C., Esteve, E. H., Franca, S. 2015. Mini-paper-The use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases. Eip-agri focus group soil-borne diseases. 11p.
- Pharand, B., Carisse, O., Benhamou, N., 2002. Cytological Aspects of Compost-Mediated Induced Resistance Against *Fusarium* Crown and Root Rot in Tomato. *Phytopathology* 92, 424–438.
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104968>. (In press)
- Pisarčík, M., Hakl, J., Menšík, L., Szábo, O., Nerušil, P. 2019. Biological control in lucerne crops can negatively affect the development of root morphology, forage yield and quality. *Plant Soil and Environment*. <https://doi.org/10.17221/398/2019-PSE>. (In press)
- Povolný, M. 1968. Sledování účinnosti extraktu z mořských řas na výnos a tržní jakost okurek nakládaček. *Rostlinná výroba*, 14, 1968, č.8, p. 847-858.
- Povolný, M. 1975. Vliv extraktu z mořských řas na jakost sadby, výnos, kvalitu sklizených a skladovaných rajčat. *Sborník vědecké konference VŠZ v Praze 2.-5.9. 1975, sekce fytotechnická*.
- Procházková-Rulfová, J. 2009. Polyversum-Biological Fungicide for Plants Protection. *Prosperous Oil Crops 2009. Conference on Prosperous Oil Crops*. p. 110-112.
ISBN: 978-80-213-2012-3
- Rufelt, S., 1987. A threshold value for cutting intensity in relation to *Fusarium* root rot of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Phytopathology*, 118(4), 301-305.
- Ryabchinskaya, T. A., Charčenko, G. L., Saranseva, H.A., Bobreshova, I. J. 2008. Ocenka zffektivnosti preparata Albit, TPS na klevere. *Federalnoe gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie Vserossijskij nauchno issledovatelskijj institut zashhitirastenijj*. 9 p. Original: Рябчинская, Т. А., Харченко, Г.Л., Саранцева, Н.А., Бобрешова, И.Ю. 2008. Оценка зффективности препарата Альбит, ТПС на клевере. *Федеральное государственное научное учреждение Всероссийский научно исследователь скийинститутзащиты растений*. 9 p.
- Rychlá, K., Katrňák, M., Psota, V. 2012. The treatment effect with Algisure on apple tree infection by *Venturia inaequalis*. *MENDEL NET 2012*. 10 p .

- Saindon, G., Michaud, R., St-Pierre, C. A. 1991. Breeding for root yield in alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* 71(3), p. 727-735.
- Sawai, A., Gau, M., Ueda, S., 1986. Difference in root system among growth types of red clover. *Japanese Journal of Grassland Science*, 32(2), 164-166.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 94(11), 1267-1271.
- 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. p. 71-86.
- Smith, R. R., 1989. Selection for root type in red clover. *Persistence of Forage Legumes*, (persistenceoffo), 111-116.
- Steiner, J. J., Alderman, S. C., 2003. Red Clover Seed Production : VI . Effect and Economics of Soil pH Adjusted 1, 624-630.
- Sturludóttir, E., Brophy, C., Bélanger, G., Gustavsson, A. M., Jørgensen, M., Lunnan, T., Helgadóttir,Á. 2014. Benefits of mixing grasses and legumes for herbage yield and nutritive value in Northern Europe and Canada. *Grass and forage science*, 69(2), 229-240.
- Suprpta, D. N. 2012. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 18(2). p. 1-8.
- Svobodová, M., Šantrůček, J. 1992. Vliv poškození rostlin a zhutnění půdy při přejezdech sklizňové mechanizace na kořenový systém vojtěšky ve 3. roce vegetace. *Sborník VŠZ Praha*, č.54, p. 277-286
- Svobodová, M., Šantrůček, J. 1998. Vliv alginátového preparátu S-90 na vzcházení vybraných druhů trav. *Rostlinná výroba*, 44, č.11, CS ISSN 0370-663X, p. 525-528.
- Svobodová, M., Šantrůček, J., Hlavičková, D. 2003. Influence of harrowing on the yield of alfalfa (*Medicago sativa* L.), Vliv vláčení na výnosy vojtěšky (*Medicago sativa* L.). *Proceedings of 11th International Symposium Forage Conservation 9.-11.9.2003*, Research Institute of Animal Production Nitra, 80-88872-31-6. p. 72-73.
- Šantrůček, J. 1988. Vliv zhutnění půdy na utváření kořenové soustavy vojtěšky ve 2. a 3. roce vegetace. *Sborník VŠZ Praha*. č. 48. p. 311-327.
- Šantrůček, J. 1989. Kultivace porostů vojtěšek a cévní vadnutí. *Sborník VŠZ Praha*. č. 50. p. 265-284.

- Šantrůček, J., Svobodová, M. 1995: Vliv aplikace alginátových preparátů (MICRO-MIST a S-90) na vzcházení a počáteční vývin vojtěšky seté. Sborník z mezinárodní vědecké konference k 35. výročí založení fakulty, JČU, ZF, České Budějovice, p. 221-231.
- Šantrůček, J., Svobodová, M., Fogl, J., Sváček, D., Šišková, J. 1995: Současné poznatky o vlivu alginátů na vývin vojtěšky a produkci píce. Sborník referátů z 5. konference Zamyšlení nad rostlinnou výrobou 14.12. 1995, II. část řešení grantových úkolů., ČZU Praha, p. 108-114.
- Šantrůček, J. Svobodová, M. 1996: Algináty a vzcházení vojtěšky. Úroda, 3, p. 32-33.
- Šantrůček, J., Svobodová, M. 2002. Extrakty z mořských řas pro výnos a kvalitu píce vojtěšky Sborník příspěvků z konference Setrvalý rozvoj rostlinné a živočišné produkce-cesta k rozvoji českého venkova. ČZU v Praze, 25.-26.9.2002. 169 p. ISBN 80-213-0923-1.
- Šebánek, J. 1983. Fyziologie rostlin. SZN Praha. 558 p.
- Táborská, M. 2003. Karanténí choroby a škůdci vojtěšky a rostlinolékařská kontrola. Úroda. 11. p. 179-186.
- 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. p. 577-580.
- Veselý, D. 1978. Parasitic Relationships between *Pythium oligandrum* Drechsler and Some Other Species of the Oomycetes Class. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes. 133 (4). p. 341-349.
- 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). p. 519-522.
- Wallenhammar, A. C., Adolfsson, E., Henriksson, M., Lundmark, S., Roempke, G. 2006. Field surveys of Fusarium root rot in organic red clover leys. Grassland Science in Europe, 11. p. 369-371.
- Whipps, J. M., Gerlagh, M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. Mycological Research. 96 (11). p. 897-907.
- Wysocki, K., Banaszkiwicz, T., Kopytowski, J., 2017. The effect of Asahi SL and Polyversum WP preparations on the chemical composition of strawberry fruits. Polish Journal of Natural Sciences, 32(3), 439-450.

- Wulff, E. G., Pham, A. T. H., Chérif, M., Rey, P., Tirilly, Y., Hockenhull, J., 1998. Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plant pathogenic *Pythium* species: differential zoospore accumulation, colonization ability and plant growth response. *European Journal of Plant Pathology*, 104(1), 69-76
- Xiao K., Kinkel L. L., Samacm D. A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23(3):285-295.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M. C., Corio-Costet, M. F., Guyoneaud, R., Rey, P., 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological control*, 92, 7-16.
- Zlotnikov, A.K. 2006. Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты сельскохозяйственных культур. Под ред. проф. Е. А. Мелькумовой. Подольск. ВНИИ защиты растений МСХ РФ.-327 С. Original: Злотников А.К. Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты сельскохозяйственных культур / А.К. Злотников // Под ред. проф. Е. А. Мелькумовой.- Подольск. -2006.-ВНИИ защиты растений МСХ РФ.-327 С.
- Zlotnikov, A.K., Aljochin, V.T., Andrianov, A.D. 2008. Сравнительная эффективность и воспроизводимость действия Альбита / В сб.: Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты растений: опыты, рекомендации, результаты применения. Издательство Агрорус. р. 30-41. Original: Злотников А.К. Сравнительная эффективность и воспроизводимость действия Альбита / В сб.: Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты растений: опыты, рекомендации, результаты применения. / А.К. Злотников, В.Т. Алёхин, А.Д. Андрианов с соавт. Под ред. акад. В.Г. Минеева // М., ООО «Издательство Агрорус».-2008.-С. 30-41.
- Zlotnikov, A.K., Duryunina, J.P., Kostina, N.V., Kurakov, E.B., Januševskaja, A.V., Leonov, N.N. Podvarko, A.T. Zlotnikov, K.M. 2016. Влияние биопрепарата Альбит на микрофлору почв. Защита и карантин растений. № 5. с. 24-26. Original: Злотников А.К. Влияние биопрепарата Альбит на микрофлору почв / А.К. Злотников, Е.П. Дурюнина, Н.В. Костина, А.В. Кураков, Э.Б. Янушевская, Н.Н. Леонов, А.Т. Подварко, К.М. Злотников // Защита и карантин растений.-2016.-№ 5.-С. 24-26

8 Seznam použitých zkratek

CF hrubá vláknina (crude fibre)

CP hrubý protein (crude protein)

FRM kořenové vlášení (fibrous root mass)

IRB intenzita větvení kořene (intensity root-branching)

LRN počet větví hlavního kořene (lateral root numer)

PD hustota porostu (plant density) - počet rostlin na m²

PRDS stupeň napadení chorobami kořene a kořenového krčku z příčného řezu kořene (plant root disease score)

RB podíl rostlin s rozvětveným kořenem (root branching)

RDM hmotnost kořene (root dry matter)

RPI index potenciálu kořenů (root potential index)

TD průměr kořenového krčku (tap-root diameter)

WSC vodorozpustné sacharidy (water soluble carbohydrates)

9 Přílohy

Tabulka 1: Ekonomické zhodnocení pokusu s jetelem lučním ve tříletém experimentu (2016-2018).

Varianta	Kumulativní výnos sušiny v t/ha (2016-2018)	Kumulativní navýšení výnosu (t/ha)	Náklady na aplikaci za 3 roky ¹	Přínos aplikace (Kč/ha) ²
Albit	35,73	0,23	2038	-1348
Polyversum 1x	35,62	0,12	3058	-2698
Polyversum 3x	37,68	2,18	9175	-2635
Kontrola	35,50	-	-	-

¹Velkoobchodní cena přípravku Polyversum v roce 2018 byla 720 Kč/ha, Albitu 210 Kč/ha, průměrná cena služeb (postřikování) 299,4 Kč/ha.

²Při výpočtu použita cena 3000 Kč za 1 t sušiny jetele lučního.

Tabulka 2: Ekonomické zhodnocení pokusu s jetelem lučním v roce 2018

Varianta	Výnos sušiny (t/ha)	Navýšení výnosu (t/ha)	Náklady na aplikaci ¹	Přínos aplikace (Kč/ha) ²
Albit	11,85	0,68	509	1531
Polyversum 1x	11,77	0,60	1019	781
Polyversum 3x	13,15	1,98	3058	2882
Kontrola	11,17	-	-	-

¹Velkoobchodní cena přípravku Polyversum v roce 2018 byla 720 Kč/ha, Albitu 210 Kč/ha, průměrná cena služeb (postřikování) 299,4 Kč/ha.

²Při výpočtu použita cena 3000 Kč za 1 t sušiny jetele lučního.

Obrázek 1: Odběr kořenů jetele lučního na podzim 2018 ze 100 cm řádku







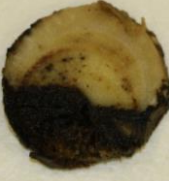


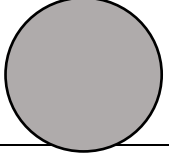
Autor: Martin Písařík

Obrázek 2: Sklizeň porostu jetele lučního sklízecím strojem Haldrup (1. seč, dne 6. 6. 2017)



Autor: Martin Písařík

Obrázek 3: Znázornění jednotlivých stupňů napadení kořene

Stupeň	Diskolorace	Řez kořenem
0	0 - 1 %	
1	1 - 5 %	
2	6 - 20 %	
3	21 - 40 %	
4	41 - 60 %	
5	61 - 80 %	
6	81 - 95 %	
7	100 %	

Autoři: Josef Hakl a Martin Pisarčík