

\\IHPS

Inštitut za hmeljarstvo
in pivovarstvo
Slovenije

Slovenian Institute
of Hop Research
and Brewing

Hmeljarski bilten Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756
ISSN za spletno izdajo 2536-1988

31 (2024)

Žalec 2024

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
Slovenian Institute of Hop Research and Brewing

Hmeljarski bilten

Hop Bulletin

31 (2024)

\\IHPS

Žalec, 2024

Hmeljarski bilten / Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

Izdaja / Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) /
Issued by Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS)
Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija / Slovenia

Urednika / dr. Barbara Čeh in dr. Boštjan Naglič
Editors

Uredniški odbor / dr. Barbara Čeh (IHPS), izr. prof. dr. Andreja Čerenak (IHPS), prof. dr.
Editorial board Jernej Jakše (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani / University of
Ljubljana, Biotechnical Faculty – BF UL), izr. prof. dr. Iztok Jože Košir
(IHPS), doc. dr. Rok Mihelič (BF UL), dr. Boštjan Naglič (IHPS), prof. dr.
Martin Pavlovič (IHPS in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede
Univerze v Mariboru / Faculty of Agriculture and Life Sciences University
of Maribor), dr. Sebastjan Radišek (IHPS), dr. Magda Rak Cizej (IHPS), dr.
Siniša Srečec (Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Hrvatska /
College of Agriculture at Križevci, Croatia), dr. Igor Šantavec (BF UL), prof.
dr. Dominik Vodnik (BF UL)

Naslov Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija / Slovenia;
uredništva, e-pošta / e-mail: barbara.ceph@ihps.si
politika / Člani uredniškega odbora so tudi recenzenti prispevkov. Prispevki so
Editorial office poslanim člankom se avtorji strinjajo tudi za spletno objavo revije. /
and policy Articles are reviewed and revised. Authors are fully responsible for
linguistic structure of the text. By sending an article, the authors agree for
the online and printed publication of the journal.

Recenzenti / **v tej številki izven uredniškega odbora:**
Reviewers outside the Editorial Board for this number:
doc. dr. Marko Flajšman (UL BF), dr. Tanja Guček (IHPS), Lucija Luskar
(IHPS), dr. Helena Volk (UL BF), dr. Miha Ocvirk (IHPS)

Tehnično
urejanje / mag. Jolanda Persolja in Žan Trošt
Technical editing

Domača stran / <http://www.ihps.si/raziskave-in-razvoj/publikacije/hmeljarski-bilten/>
Home page

Bilten zajemajo / COBISS, CABI Publishing, EBSCO Publishing
Indexed and
abstracted by

Tisk / Printed by Grafika Gracer d. o. o.

Avtorske pravice / © 2024 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije /
Copyright © 2024 Slovenian Institute of Hop Research and Brewing
Izdajo sofinancira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in
inovacijsko dejavnost RS. /
The issue was financially supported by the Slovenian Research and
Innovation Agency.

VSEBINA / CONTENTS

Tanja GUČEK

Primerjava različnih načinov homogenizacije tkiva za hitro določanje viroidov v hmelju

Comparison of different types of tissue homogenization for fast detection of hop viroids..... 9

Helena VOLK, Sebastjan RADIŠEK, Andreja ČERENAK and Jernej JAKŠE
Validation of the potential of highly expressed transcripts as markers of early stages of CBCVd infection of hops

Validacija potenciala močno izraženih transkriptov kot pokazateljev zgodnjih faz okužbe hmelja s CBCVd 27

Helena VOLK in Jernej JAKŠE

Viroidi kot inovativno biotehnoško orodje: kratek pregled in zgodnji obeti

Viroids as an innovative biotechnological tool: a brief overview and early prospects 37

Taja JESENIČNIK

Potencial tehnologije SIGS za zatiranje glive *Verticillium nonalfalfae*

Potential of SIGS technology for suppressing the *Verticillium nonalfalfae* fungus 46

Magda Rak CIZEJ, Franček POLIČNIK and Octave LACROIX

Reproductive potential of female european corn borer (*Ostrinia nubilalis* HBN.) - a useful tool for biological control in hops (*Humulus lupulus* L.)

Reprodukcijski potencial samic koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* HBN.) – koristno orodje za biotično varstvo hmelja (*Humulus lupulus* L.)..... 58

Douglas MACKINNON and Martin PAVLOVIČ

Supply changes caused by proprietary hop varieties

Lastniške sorte spreminjajo razmere v ponudbi hmelja 72

Barbara ČEH, Matej KNAPIČ, Igor ŠANTAVEC, Ana KARNIČNIK KLANČNIK, Bojan ČREMOŽNIK, Monika OSET LUSKAR, Sebastjan RADIŠEK, Jure FERLIN in Boštjan NAGLIČ

Vpliv podsevkov na izbrane talne parametre

Impact of catch crops on selected soil parameters..... 84

Gašper KORAT, Petra TERPINC, Iztok Jože KOŠIR in Miha OCVIRK

Vpliv dodatka Aromazyme na glukozidazno aktivnost

Effect of Aromazyme addition on glucosidase activity 100

Marjeta ERŽEN, Iztok Jože KOŠIR, Miha OCVIRK, Samo KREFT in Andreja ČERENAK <u>Vsebnost kanabinoidov v različnih fenotipih konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.) carmagnola selected in selekcije finola</u> Cannabinoids content in different hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.) phenotypes of carmagnola selected and finola selection	107
Marjeta ERŽEN, Iztok Jože KOŠIR, Miha OCVIRK, Samo KREFT in Andreja ČERENAK <u>Vsebnost komponent eteričnega olja v različnih fenotipih navadne konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.)</u> Components of essential oils in different hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.) phenotypes	118
Dunja BANDELJ, Matjaž HLADNIK in Alenka BARUCA ARBEITER <u>Izzivi pri prenosu prostorastočih zdravilnih in aromatičnih rastlin v pridelavo</u> Challenges in the transfer of wild medicinal and aromatic plants into an agroecosystem	130
Tamara KOROŠEC, Mojca HRIBERNIK in Barbara ČEH <u>Poskus ekološke pridelave kurkume (<i>Curcuma longa</i>) v Sloveniji</u> Potentials for organic production of turmeric (<i>Curcuma longa</i>) in Slovenia	150
Martin PAVLOVIČ, Monika OSET LUSKAR in Nataša FERANT <u>Model za oceno ekonomike pridelave zelišč</u> A model for an assessment of economics in production of herbs	161

PRIMERJAVA RAZLIČNIH NAČINOV HOMOGENIZACIJE TKIVA ZA HITRO DOLOČANJE VIROIDOV V HMELJU

Tanja GUČEK¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 18. 11. 2024

Sprejeto / Accepted: 23. 11. 2024

Izvleček

Homogenizacija je pomemben proces v številnih industrijskih panogah, kot so farmacija, živilstvo, kozmetika in biotehnologija. Pri diagnostiki rastlinskih patogenov predstavlja homogenizacija ključen korak določitve patogena, saj omogoča izolacijo njegovega genoma iz rastline. Na trgu je dostopnih veliko različnih tipov homogenizatorjev, ki se uporabljajo za specifične aplikacije, zato je težko izbrati pravega. Z namenom razvoja metode za hitro detekcijo viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na terenu smo v raziskavi primerjali pet različnih ročnih homogenizatorjev v treh različnih pufrih. Vzorce smo na prisotnost viroidov CBCVd in hmeljevega latentnega viroida (HLVd) analizirali s RT-PCR v realnem času za sočasno določanje. Dodatno smo HLVd testirali z RT-RPA s komercialnim kompletom reagentov AmplifyRP® XRT. Pri uporabi različnih homogenizatorjev smo viroide v vzorcih hmelja uspešno potrdili pri vseh. Za uspešno detekcijo je zadostovala že manjša stopnja homogenizacije z uporabo kovinskega pestila ali baterijskega homogenizatorja. V primeru uporabe različnih pufrov smo potrdili velik vpliv na rezultate. Pri vodi tretirani z DEPC in komercialnem pufru GEB3 smo dobili pozitivne rezultate, pri pufru GEB4 pa smo bili uspešni samo pri 10 % vzorcev. Pri RT-RPA smo za HLVd prav tako potrdili vpliv pufru in boljše rezultate pri uporabi pufru GEB3. Rezultati RT-RPA so se ujemali z mRT-qPCR, pri nekaterih homogenizatorjih smo imeli težave z nespecifičnimi signali v zdravih vzorcih hmelja. V raziskavi smo s primerjavo različnih ročnih homogenizatorjev potrdili, da lahko z vsemi homogenizatorji z uporabo ustreznega pufru dobimo zanesljive rezultate s hitro izolacijo, kar lahko uporabimo pri detekciji viroidov na terenu.

Ključne besede: detekcija na terenu, ročni homogenizatorji, RT-RPA, RT-qPCR

COMPARISON OF DIFFERENT TYPES OF TISSUE HOMOGENIZATION FOR FAST DETECTION OF HOP VIROID

Abstract

Homogenization is an important process in many industries such as pharmaceuticals, food, cosmetics and biotechnology. In the plant pathogen

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

diagnostics, homogenization is a key step in determine the pathogen, as it enables the isolation of its genome from the plant. There are various types of homogenizers available, each one designed for a specific application, so choosing the right one can be difficult. In order to develop method for the rapid detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd) in the field, we compared five different hand homogenizers in three different buffers. The samples were analyzed for the presence of CBCVd and hop latent viroid (HLVd) by real-time PCR for simultaneous detection. HLVd was additionally tested by RT-RPA using the commercial kit AmplifyRP® XRT. When using different homogenizers, viroids in hop samples were successfully confirmed with all of them. A small degree of homogenization using a metal pestle or battery homogenizer was sufficient for successful detection. In the case of using different buffers, we confirmed a large impact on the results. With DEPC treated water and the commercial GEB3 buffer, we obtained positive results, but with the GEB4 buffer, we were only successful at 10 % samples. With RT-RPA for HLVd we also confirmed the influence of the buffer and better results when using the GEB3 buffer. The RT-RPA results agreed with mRT-qPCR, with some homogenizers we had problems with non-specific signals in healthy hop samples. In the research, by comparing different hand homogenizers, we confirmed that by using any of them with suitable buffer, we can get reliable results with fast isolation, which can be used in the detection of viroids in the field.

Key words: detection in the field, hand homogenizers, RT-RPA, RT-qPCR

1 UVOD

Homogenizacija je ključen korak vsake raziskave, ki vključuje izolacijo določenih komponent iz intaktnega vzorca (Burden, 2012). Proces vključuje zmanjšanje velikosti delcev vzorca z uporabo homogenizatorjev z namenom, da se proizvede enakomeren in stabilen izdelek. Obstaja velik izbor metod, reagentov in orodji, ki so uporabljeni v številnih različnih kombinacijah homogenizacije vzorcev (Burden 2012; Drawell 2023; BioCompare 2024). Postopek homogenizacije je v objavljenih protokolih zelo pogosto slabo opisan in se podaja med raziskovalci kot dobro varovana družinska skrivnost. Posledično je med laboratoriji zelo velika variacija v metodologiji. Mogoče je vpliv homogenizacije na poskus minimalen, ampak izbira ustreznega orodja, kemije in metode lahko ima zelo velik vpliv na končni rezultat (Burden, 2012).

Za razvoj uspešnega načina homogenizacije je pomembno poznati značilnosti končnega lizata in omejitve tarčne molekule. Glavne biokemijske tarče iz bioloških vzorcev so proteini, DNA in RNA, ki zahtevajo učinkovito lizo celic brez razgradnje nukleinskih kislin (NA; DNA in RNA) (Tan in Yiap, 2009; Burden, 2012). Pri testiranju proteinov se uporabljajo pogoji brez denaturacije, brez močnih detergentov ali kaotropov (npr. urea), ki prekinajo hidrofobne interakcije v proteinih (Burden, 2012). V primeru izolacije RNA je potrebno izvesti lizo celic v kombinaciji z denaturacijo nukleo-proteinskih kompleksov in inaktivacijo nukleaz (RNaze) pri zelo nizkih temperaturah (Tan in Yiap, 2009; Burden, 2012). Hkrati je zelo pomembno, da je tarčna RNA brez nečistoč, kot so proteini, polisaharidi, lipidi, druge nukleinske

kislina (RNA brez DNA in obratno) in metaboliti (Tan in Yiap, 2009). Pri izolaciji DNA se prav tako ob homogenizaciji iz celic sprostijo nukleaze, ki jih inaktiviramo z dodatkom EDTA, ki veže Mg^{2+} ion, ki je nujen za aktivnost DNaz (Burden, 2012).

Za izbor ustrezne metode homogenizacije je nujno razumeti lokalizacijo patogena v rastlini in prisotnost rastlinskih komponent, ki bi lahko negativno vplivale na rezultat (Ivanov in sod., 2020). Homogenizacija mora omogočati učinkovito lizo celic in porušiti celično steno in organele ter sprostiti znotrajcelične komponente brez zaviranja nadaljnjih korakov izolacije in detekcije (Emaus in sod., 2020). Za lizo celic se lahko uporablja kemične in mehanske metode ali kombinacijo obeh. Kemične metode se lahko izvedejo z denaturacijo ali brez, mehanske pa lahko omogočajo delno ali celovito lizo celic (Burden, 2012; Emaus in sod., 2020).

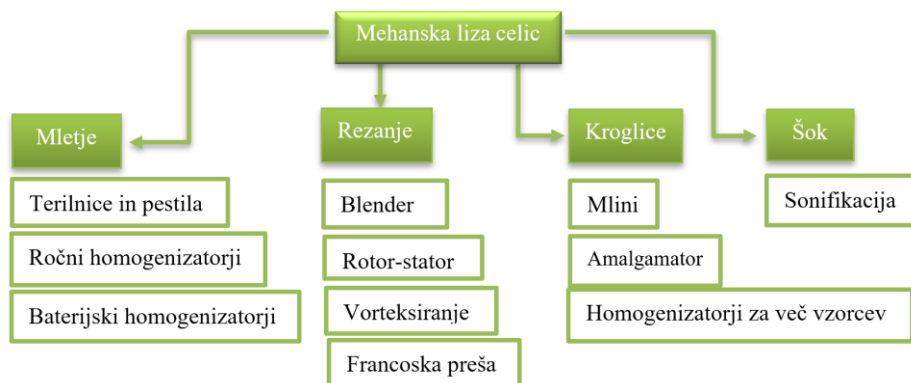
V primeru kemičnih metod se za lizo celic uporablja pufre, ki imajo določen pH in lahko nadzorujejo ionsko moč in aktivnost nukleaz ter s tem zagotavljajo stabilnost. Surfaktanti oziroma detergenti lahko povzročijo lizo bioloških membran, saj so sestavljeni iz hidrofobnega repa in hidrofilne glave. Po učinkovitosti se med sabo lahko precej razlikujejo, kar je odvisno predvsem od tipa hidrofilnega dela (ionski ali ne-ionski) (preglednica 1) (Burden, 2012). Za izolacijo NA iz rastlin se najpogosteje uporablja kationski detergent CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid) (Burden, 2012; Ivanov in sod., 2020). Poleg detergentov se za kemijsko lizo celic uporabljajo kaotropi, encimi in drugi aditivi, kot so na primer stabilizatorji (sukroza, sorbitol...), ki še dodatno pomagajo pri učinkovitejši lizi celic (Burden, 2012).

Preglednica 1: Seznam detergentov uporabljenih za lizo celic in njihove značilnosti (povzeto po Burden, 2012).

Detergent	Tip	Značilnosti	Uporabljena koncentracija
SDS (natrijev dodecilsulfat)	anionski	Močan detergent, ki uniči membrano in denaturira proteine.	Od 1 do 10 %
Natrijev deoksiholat	kationski	Spada med žolčne kisline. Uporablja se za raztapljanje proteinov in prekinitev interakcij med proteini.	0,5 %
CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid)	kationski	Uporablja se za izolacijo DNA iz rastlin. Polisaharidi iz rastlin so netopni v CTAB pufru in visokih koncentracijah NaCl. Zato se lahko DNA loči od rastlinskih karbohidratov.	2 %
NP-40 (nonil fenoksi-polietoksi-etanol)	ne-ionski	Blagi surfaktant, ki lahko raztopi citoplazemsko membrano. Jedrne membrane ne raztopi, zato se ga uporablja za njegovo izolacijo.	Od 0,1 do 1 %
Triton X-100	ne-ionski	Blagi surfaktant, ki ima polietilen oksid za hidrofilno skupino in tetrametilbutil fenilno skupino za hidrofoben del.	Za lizo do 5 %, za spiranje od 0,1 do 0,5 %

Detergent	Tip	Značilnosti	Uporabljena koncentracija
Tween 20	ne-ionski	Surfaktant, ki je modificiran sorbitol prijazen do biomolekul in zato pogosto uporabljen v hrani, farmaciji in raztopinah za spiranje.	0,1 %

Za mehansko lizo celic se lahko uporablja različne načine homogenizacije, od mletja, rezanja, uporabe kroglic in šoka (slika 1) (Burden, 2012; Ivanov in sod., 2020). Obstaja ogromno število metod (omenjene so samo nekatere), za večjo učinkovitost lize pa se pogosto uporabljajo kombinacije različnih načinov in tipov homogenizacije. Mletje (ang. grinding) se lahko uporablja za mokre, suhe, zamrznjene, sveže in trde vzorce. Zaradi trenja lahko pride do segrevanja, zato se vzorce pogosto prej zamrzne ali pa se uporabi tekoči dušik. Za mletje so še vedno pogosto v uporabi terilnice in pestila, obstaja pa tudi veliko različnih ročnih homogenizatorjev (stekleni, plastična in kovinska pestila...). Prednost je, da so cenovno ugodni in enostavni za uporabo, težavo pa ponovno predstavlja analiza večjega števila vzorcev. V tem primeru se lahko uporabi baterijske ročne homogenizatorje, ki so hitrejši ampak še vedno dovolj praktični, da se jih lahko uporabi tudi zunaj laboratorija (Burden, 2012).



Slika 1: Shematski prikaz načinov mehanske lize celic. Mletje, rezanje, uporaba kroglic in šoka. Povzeto po Burden, 2012.

Drug način mehanske lize celic predstavlja rezanje (ang. shearing), ki se izvaja z uporabo sekljalnikov (»blender«), rotor-stator naprav (podobno paličnem mešalniku), vorteksov (v kombinaciji s kroglicami), francoske preše (za tekoče vzorce) in številnih drugih orodji. Eden izmed pogosto uporabljenih načinov mehanske lize celic je uporaba kroglic, ki so lahko različnih velikosti in materialov (kovinske, silikatne, keramične...). Za rastline se priporoča uporaba 2,8 do 3 mm velikih kroglic v mikrocentrifugirkah z manj kot 50 mg vzorca in do 500 µL pufru. Za mešanje se lahko uporabljajo »amalgmatorji« (ang. dental mixers), ki tubice zaklenejo v malo »stresajočo roko«, ki hitro oscilira. Za več vzorcev (do 24) obstajajo homogenizatorji (npr. FastPrep®), ki delujejo na podoben način kot

centrifuga, le da oscilirajo pri visokih hitrostih (8000 rpm). Za analiziranje večjega števila vzorcev se uporabljajo »mešalni mlini« (ang. mixer mills), ki vzorce držijo v stojalih in stresajo v obliki številke 8 (npr. Geno/Grinder®). Za nekatere vzorce je primerna uporaba šoka, kjer s pomočjo sonifikacije in pritiska v nekaj sekundah povzroči lizo celic (Burden, 2012). Na trgu je dostopnih veliko različnih tipov homogenizatorjev, ki se uporabljajo za specifične aplikacije, zato je težko izbrati pravega.

Z namenom razvoja metode CRISPR/Cas12a-RT-RPA za hitro detekcijo viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na terenu smo v raziskavi primerjali pet različnih ročnih homogenizatorjev (plastično in kovinsko pestilo, baterijski homogenizator, kovinske kroglice, Bioreba homogenizator z vrečko) v treh različnih pufrih. Vzorce smo na prisotnost viroida CBCVd in HLVd analizirali s RT-PCR v realnem času za sočasno določanje (duplex, duRT-qPCR in multiplex, mRT-qPCR). Dodatno smo HLVd testirali z RT-RPA (pomnoževanje z rekombinazno polimerazo, RPA) s komercialnim kompletom reagentov AmplifyRP® XRT for HLVd. Primerjava različnih načinov homogenizacije nam bo omogočila razvoj hitre izolacije, ki bo v kombinaciji z razvojem metode za hitro določanje viroidov primerna tudi za uporabo na terenu.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za analizo primerjave homogenizatorjev smo uporabili hmelj sorte Celeia (CEL), Aurora (AU) in Bobek (BO) okužen z viroidoma CBCVd in HLVd. Kot negativno kontrolo smo uporabili hmelj sorte Celeia negativen na viroid CBCVd in HLVd. Rastline so del Referenčne zbirke DL in so bile na prisotnost viroidov predhodno testirane z RT-PCR PCR po ustaljenem protokolu (Guček in sod., 2019). Zaradi neenakomerne razporeditve viroidov po rastlini smo vzorčili 4-6 simptomatičnih listov iz različnih delov rastline in vzorce združili v en vzorec. Rastline smo vzorčili na dan analize, do pričetka analize so bili vzorci shranjeni pri +4 °C (Poskus I) ali pa smo vzorce shranili pri – 70 °C (Poskus II).

2.2 Izolacija nukleinskih kislin s CTAB reagentom

Z namenom primerjave rezultatov »hitre« izolacije z rutinsko izolacijo nukleinskih kislin, smo iz hmelja NA izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). Uporabili smo 100 mg tkiva (listi hmelja), ki smo ga zdrobili v terilnicah. Vzorce smo raztopili v 50 µl TE pufra (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) in jih shranili pri -20 °C. Da bi preprečili vpliv inhibitorjev, smo pred analizo izolirano NA 10-krat razredčili v vodi brez RNaz (Sigma-Aldrich, ZDA).

2.3 Primerjava različnih homogenizatorjev in pufrov "hitre" izolacije

Pri »hitri izolaciji« nukleinskih kislin (NA) oziroma pripravi rastlinskega soka za direktno določanje viroidov CBCVD in HLVd smo primerjali dva poskusa (PI in PII). V prvem poskusu (PI) smo primerjali pet različnih homogenizatorjev:

- plastično pestilo (Kimble, DWK Life Sciences, ZDA)
- kovinsko pestilo (Kimble)
- baterijski homogenizator (Kimble; uporaba v kombinaciji s plastičnimi pestili Kimble)
- kovinske kroglice (velikost 5 mm, Qiagen, Nemčija)
- Bioreba homogenizator z vrečko (Bioreba, Švica)

Vzorke različnih sort hmelja smo z različnimi homogenizatorji zmleli v vodi tretirani z DEPC (Merck, Nemčija). Na ta način smo želeli preveriti učinkovitost homogenizatorjev. V drugem poskusu (PII) smo z istimi homogenizatorji primerjali dva različna pufra GEB3 in GEB4 (General Extextraction Buffer 3 ali 4, Agdia, ZDA), z namenom, da ugotovimo vpliv pufrov na homogenizacijo. Hkrati smo med poskusi analizirali tudi vpliv svežega (PI) in zamrznjenega tkiva (PII) hmelja na homogenizacijo. Dodatno smo za namene testiranja HLVd z RT-RPA metodo izvedli še primerjavo dveh načinov mletja (točka 2.5).

2.3.1 POSKUS I (PI)

Pri prvem poskusu (PI) primerjave različnih homogenizatorjev pri »hitri« izolaciji smo vzorce hmelja za direktno določanje pripravili po modificiranem protokolu naših predhodnih raziskav (Guček in Radišek, 2023a). Svežemu vzorec listov hmelja (50 mg) smo za lažje mletje dodali 1 mL vode tretirane z DEPC (Merck, Nemčija). Vsak vzorec smo analizirali v dveh tehničnih ponovitvah. V primeru plastičnega (okrajšava S1) in kovinskega (S2) pestila, baterijskega homogenizatorja (S3) in kovinskih kroglic (S4) smo vzorec mleli v vodi tretirani z DEPC v 1,5 mL mikrocentrifugirski (slika 2). V primeru Bioreba ročnega homogenizatorja (Bioreba, Švica) smo vzorec zdrobili v vrečki za ekstrakcijo (univerzalna velikost, Bioreba, Švica) in sok prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Vse vzorce smo centrifugirali 4 minute pri 12 700 rpm (vrtljajih na minuto) in 4 °C. Supernatant smo nato odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in ostalo zavrgli. Vzorce smo razredčili v 10 mM Tris (Invitrogen, ZDA), uporabili smo 20- in 100-kratno redčitev. Vzorce smo z mRT-qPCR in duRT-qPCR analizirali še isti dan.

2.3.2 POSKUS II (PII)

Pri drugem poskusu (PII) primerjave različnih homogenizatorjev pri »hitri« izolaciji smo vzorce hmelja analizirali po istem postopku kot pri prvem poskusu. Razlika je bila samo, da smo uporabili zamrznjeno tkivo hmelja in namesto vode tretirane z DEPC dodali dva različna pufra GEB3 in GEB4 (Agdia, slika 3). Pufer GEB3 in GEB4 smo pripravili po navodilih proizvajalca in umerili pH za GEB3 od pH 7,2 do 7,8 in za GEB4 od pH 7,2 do 7,6. Vzorce smo po homogenizaciji in centrifugiranju 20-krat

razredčili v 10 mM Tris (Invitrogen, ZDA). Vzorce smo z duRT-qPCR, mRT-qPCR in RT-RPA analizirali še isti dan.

2.4 duRT-qPCR in mRT-qPCR reakcija

Analizo duRT-qPCR in mRT-qPCR smo izvedli s kompletom SensiFAST Probe No-ROX Kit (Bioline, Meridian Bioscience) in encimom reverzno transkriptazo MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) v inštrumentu LightCycler96 (Roche, Švica). Z duRT-qPCR smo sočasno analizirali prisotnost viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192 v vzorcih hmelja s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (ZO), kot predhodno opisano v Guček in Radišek (2023b). Z mRT-qPCR smo sočasno analizirali prisotnost viroidov CBCVd, HLVd in HSVd hmelja s specifičnimi ZO, kot predhodno opisano v Guček in sod. (2023). Vzorce smo analizirali z reakcijami v enem koraku, v eni ali dveh tehničnih ponovitvah na ploščah za 96 vzorcev z detekcijskim sistemom LightCycler96 (Roche) in programom LightCycler96 Software 1.1.0.1320, pri čemer so bile vse nastavitve programa avtomatske.

2.5 RT-RPA reakcija

RT-RPA reakcijo smo izvedli s kompletom AmplifyRP® XRT for HLVd (XCS 76500, Agdia, ZDA) v inštrumentu LightCycler96 (Roche). Reakcijo smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca in vzorce pomnoževali 20 min pri 42 °C. Pri prvem testiranju RT-RPA kita za določanje HLVd smo primerjali dva načina homogenizacije vzorcev (A1 in A2). V prvem primeru smo za analizo uporabili 0,15 g listov hmelja (hmelj sorte Celeia (CEL) okužen s CBCVd in HLVd, hmelj sorte Celeia brez virusov in viroidov (BVV)), ki smo jih homogenizirali v priloženi vrečki s pufrom (A1). V drugem primeru smo 0,05 g listov hmelja (CEL, BVV) homogenizirali s plastičnim pestilom v epici v GEB3 pufru (Agdia) (A2). V nadaljevanju smo z RT-RPA na HLVd analizirali vzorce hmelja homogenizirane v pufru GEB3, ki so bili del PII.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 POSKUS I

V prvem poskusu primerjave različnih načinov homogenizacije smo pri mletju v vodi tretirani z DEPC dobili zelo različne stopnje homogenizacije (slika 2). V primeru uporabe plastičnega in kovinskega pestila smo lahko liste hmelja zmleli na manjše delce in z mešanjem in drgnjenjem ob rob mikrocentrifugirke dobili dobro homogen vzorec. Ves pufer smo dodali že na začetku mletja, kar nam je v nekaterih primerih povzročalo težave, ker je zaradi intenzivnega mešanja pufer šel čez rob mikrocentrifugirke. Podobne težave nam je povzročala uporaba baterijskega homogenizatorja, kjer je zaradi vrtnčenja med mešanjem prišlo do špricanja in uhajanja pufra čez rob. Temu bi se lahko izognili s postopnim dodajanjem manjših količin pufra. V primeru uporabe baterijskega homogenizatorja smo liste zmleli na manjše dele, vendar ne tako homogeno kot s samimi pestili. Težave smo imeli s samim postopkom, ker nam je nastavek uhajal iz ročaja, zaradi premočnega mešanja.



Slika 2: Prikaz vzorcev hmelja zmletih z vodo tretirano z DEPC z uporabo različnih ročnih homogenizatorjev (PI). Od leve proti desni plastično in kovinsko pestilo, baterijski homogenizator, kovinska kroglica in Bioreba homogenizator.

Ko smo za mešanje uporabili kovinske kroglice smo si pomagali z uporabo vorteksa, ker je bilo zaradi količine tkiva in velikosti kroglice ročno težko izvesti mešanje. Glede na ostale načine mletja, se je v tem primeru tkivo najmanj zmelalo (slika 2). Za boljšo homogenost vzorca bi najverjetneje potrebovali hitrejša mešanja z uporabo homogenizatorja. Pri uporabi ročnega homogenizatorja in Bioreba vrečke smo dobili najbolj homogen vzorec (slika 2), ki pa ga je bilo nekoliko težje s pipeto prenesti iz vrečke v mikrocentrifugirko, zaradi penjenja in razporeditve po celi vrečki. Razlika v stopnji homogenizacije je bila tudi zaradi razlik v tkivu, v primeru sorte Aurora in Celeia smo imeli na voljo namreč bolj suhe in starejše liste, v primeru sorte Bobek pa mehkejše in mlajše.

Pri analizi rezultatov smo z mRT-qPCR dobili zelo malo pozitivnih vrednosti pri viroidu CBCVd, pri viroidu HLVd pa smo dobili največ pozitivnih vrednosti pri uporabi kovinskih kroglic, baterijskega homogenizatorja in kovinskega pestila (preglednica 2). V primeru plastičnega pestila in Bioreba homogenizatorja nismo dobili pozitivnih vrednosti, razlog je najverjetneje v prisotnih inhibitorjih. Zaradi zelo dobre homogenizacije tkiva je bilo v homogenatu prisotnih več inhibitorjev, ki so imeli negativen vpliv na mRT-qPCR reakcijo. Z mRT-qPCR reakcijo smo analizirali tudi vzorce izolirane s CTAB reagentom in pri vseh dobili pozitiven signale s Cq-vrednostmi med 13 in 16 (preglednica 2), kar pomeni, da je bila v vzorcih prisotna velika koncentracija viroidov CBCVd in HLVd. V primeru duRT-qPCR smo vzorce analizirali pri 20- in 100-kratni redčitvi in zaradi boljše občutljivosti metode dobili več pozitivnih vrednosti za CBCVd (preglednica 2). Pri analizi interne kontrole mRNA1192, ki nam pove informacijo o kvaliteti izolirane RNA, smo skoraj pri vseh vzorcih dobili pozitivne vrednosti, ki pa so precej višje kot v predhodnih primerih, ko smo analizirali vzorce izolirane s CTAB ali komercialnimi kiti (Guček in Radišek, 2023a). Rezultati za viroid CBCVd so podobni kot pri analizi HLVd viroida, razen da smo v tem primeru bili uspešni tudi pri uporabi plastičnega pestila in Bioreba homogenizatorja. Cq-vrednosti za homogenizacijo v vodi tretirani z DEPC so precej višje kot s standardno izolacijo s CTAB reagentom, kljub temu so lahko z vsemi načini uspešno potrdili prisotnost viroidov v vzorcih.

Preglednica 2: Rezultati analize vzorcev hmelja z različnimi homogenizatorji v vodi tretirani z DEPC z duRT-qPCR in mRT-qPCR. Podane so povprečne Cq-vrednosti za negativne vzorce hmelja (BVV) in različne sorte hmelja okužene s CBCVd in HLVd. Za duRT-qPCR so podani rezultati za 20- in 100-kratno redčitev. Obarvani okvirčki predstavljajo pozitivne rezultate za CBCVd in HLVd.

Oznaka vzorca	duRT-qPCR				mRT-qPCR	
	Cq CBCVd 20x	Cq CBCVd 100x	Cq mRNA1192 20x	Cq mRNA1192 100x	Cq CBCVd 20x	Cq HLVd 20x
Plastično pestilo (S1)						
BVV	-	-	31,88	33,52	-	-
BVV	-	-	32,77	35,54	-	-
AU	27,90	29,54	33,27	35,67	-	-
AU	26,37	26,89	34,12	35,42	-	-
CEL	29,99	-	32,22	33,28	-	-
CEL	-	-	31,56	33,30	-	-
BO	28,15	28,60	31,06	31,79	-	-
BO	24,59	25,29	30,73	32,38	-	-
Kovinsko pestilo (S2)						
BVV	-	-	33,77	-	-	-
BVV	-	-	32,34	34,09	-	-
AU	23,72	23,96	32,73	32,65	-	26,09
AU	28,20	29,06	33,56	35,46	-	27,43
CEL	26,47	26,72	30,11	31,54	-	-
CEL	-	-	35,08	34,50	-	-
BO	24,50	25,06	30,59	31,72	-	-
BO	26,43	27,51	31,92	32,47	-	30,05
KIMBLE baterijski (S3)						
BVV	-	-	33,19	35,96	-	-
BVV	-	-	33,84	33,53	-	-
AU	26,73	27,91	32,09	32,63	-	27,80
AU	28,61	28,40	-	36,07	-	-
CEL	26,58	26,94	29,82	31,19	-	-
CEL	25,89	26,75	30,46	31,57	-	25,23
BO	24,75	26,32	30,83	32,83	24,74	25,00
BO	24,42	25,93	30,44	31,83	24,43	24,85

Oznaka vzorca	duRT-qPCR				mRT-qPCR	
	Cq CBCVd 20x	Cq CBCVd 100x	Cq mRNA1192 20x	Cq mRNA1192 100x	Cq CBCVd 20x	Cq HLVd 20x
Kovinske kroglice (S4)						
BVV	-	-	-	-	-	-
BVV	-	-	34,28	35,09	-	-
AU	29,33	-	34,97	-	-	29,80
AU	29,47	-	34,48	-	-	30,13
CEL	29,49	-	35,54	-	-	30,21
CEL	27,51	28,59	30,76	33,34	-	26,90
BO	27,41	29,45	35,00	35,46	26,78	27,05
BO	26,97	27,80	32,09	34,03	25,99	27,24
Bioreba vrečka (B1)						
BVV	-	-	33,20	33,89	-	-
BVV	-	-	34,21	30,28	-	-
AU	27,30	27,35	31,31	31,59	-	-
AU	27,19	26,94	30,96	31,22	-	-
CEL	-	-	28,31	30,97	-	-
CEL	-	-	30,05	31,34	-	-
BO	24,39	25,65	27,32	28,83	-	-
BO	25,07	25,37	27,59	28,36	-	-
CTAB						
BVV	/	/	/	/	-	-
BVV	/	/	/	/	-	-
AU	/	/	/	/	16,91	16,50
AU	/	/	/	/	16,33	16,17
CEL	/	/	/	/	16,37	15,90
CEL	/	/	/	/	15,70	15,45
BO	/	/	/	/	14,22	13,98
BO	/	/	/	/	14,99	14,78
Kontrole						
CBCVd	11,95	/	16,69	/	13,65	-
gBI CBCVd	9,71	/	-	/	9,92	-
HLVd	/	/	/	/	-	16,37

Oznaka vzorca	duRT-qPCR				mRT-qPCR	
	Cq CBCVd 20x	Cq CBCVd 100x	Cq mRNA1192 20x	Cq mRNA1192 100x	Cq CBCVd 20x	Cq HLVd 20x
gBI HLVd	/	/	/	/	-	9,24
BVV	-	/	20,15	/	-	-
H2O	-	/	-	/	-	-

*BVV, hmelj brez virusov in viroidov; AU, hmelj sorte Aurora okužen s CBCVd in HLVd; CEL, hmelj sorte Celeia okužen s CBCVd in HLVd; BO, hmelj sorte Bobek okužen s CBCVd in HLVd; CBCVd, hmelj okužen s CBCVd- pozitivna kontrola amplifikacije; gBI, gBlocks umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd ali HLVd; H2O, voda brez nukleaz- negativna kontrola amplifikacije; -, negativen rezultat; /, ni bilo testirano

3.2 POSKUS II

Pri analizi vzorcev hmelja s pufroma GEB3 in GEB4 smo pri drugem poskusu (PII) dobili glede stopnje homogenizacije podobne rezultate kot pri PI (slika 3). Pri večini vzorcev nismo dobili tako homogenih vzorcev kot pri PI. Glavno razliko glede na PI je predstavljala uporaba zamrznjenega tkiva, ki je negativno vplivala na mletje, ker se vzorci niso tako lepo zmleli. Zamrznjeno tkivo nekaterih vzorcev se je zaradi večjega števila analiz pred postopkom mletja delno odtalilo in postalo težavno za mletje z uporabo pestil. Težavo je predstavljalo tudi penjenje vzorcev zaradi pufrov GEB3 in GEB4 (slika 3), ki smo jim v postopku priprave dodali Tween 20 (Agdia).



Slika 3: Različni homogenizatorji od leve proti desni. Plastično in kovinsko pestilo, baterijski homogenizator, kovinska kroglica, ročni homogenizator z Bioreba vrečko. Prikaz homogenizacije z različnimi pestili in končnega homogenata listov hmelja v pufrih GEB3 in GEB4.

Vzorci smo analizirali z mRT-qPCR in duRT-qPCR in dobili veliko razliko med rezultati vzorcev homogeniziranimi z GEB3 in GEB4 pufrom (preglednica 3). Pri GEB3 pufru smo dobili pozitivne vrednosti pri vseh homogenizatorjih in obeh viroidih. V primeru GEB4 pufra pa smo bili pri viroidu HLVd uspešni samo pri treh vzorcih in pri viroidu CBCVd pri dveh, kar je nekje 10 % učinkovitost homogenizacije. Glede na to, da smo uporabili iste vzorce in homogenizatorje in oba pufra uporabljali sočasno, sklepamo, da je lahko razlog v neuspešni detekciji samo v uporabi pufra GEB4. Ker je pufer komercialno dostopen ne vemo kaj so njegove sestavine, predvidevamo pa, da je pufru GEB4 dodana neka komponenta, ki preprečuje uspešno detekcijo viroidov v hmelju. Rezultati nas ne presenečajo, ker smo v predhodnih testiranjih pufrov GEB3 in GEB4 (neobjavljeno) dobili primerljive rezultate in bili večkrat neuspešni pri določanju viroidov. Takrat smo mislili, da je bil razlog v uporabi neustreznega tkiva oziroma redčenju homogenata v vodi namesto Tris, ampak je bil vzrok v sestavi pufra. Vpliv pH v tem primeru najverjetneje nima vloge, ker je razlika med pufroma minimalna.

Preglednica 3: Rezultati analize vzorcev hmelja z različnimi homogenizatorji v GEB3 in GEB4 pufru z duRT-qPCR in mRT-qPCR za CBCVd in HLVd. Podane so Cq-vrednosti za negativne vzorce hmelja (BVV) in različne sorte hmelja okužene s CBCVd in HLVd pri 20-kratni redčitvi vzorcev. Podane so tudi vrednosti fluorescence za RT-RPA za HLVd za vzorce v GEB3 pufru. Obarvani okvirčki predstavljajo pozitivne rezultate za CBCVd in HLVd.

Oznaka vzorca	duRT-qPCR		mRT-qPCR		RT-RPA
	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Cq CBCVd	Cq HLVd	Fluorescenca za HLVd (au)
GEB3+ plastično pestilo (S1)					
BVV S1-G3	-	-	-	-	0,0907035
AU S1-G3	24,67	-	25,46	23,97	0,116957
CEL S1-G3	21,52	-	21,39	21,09	0,225781
BO S1-G3	25,55	-	-	31,78	0,0923695
GEB3+ kovinsko pestilo (S2)					
BVV S2-G3	-	-	-	-	0,11248
AU S2-G3	24,51	-	25,29	25,93	0,127637
CEL S2-G3	21,70	-	21,65	21,08	0,203339
BO S2-G3	24,66	-	25,63	28,25	0,093333
GEB3+ KIMBLE baterijski (S3)					
BVV S3-G3	-	-	-	-	0,107973
AU S3-G3	22,38	-	22,57	22,11	0,184288
CEL S3-G3	21,20	-	21,35	19,93	0,273003
BO S3-G3	-	-	-	-	0,0883392
GEB3+ kovinske kroglice (S4)					
BVV S4-G3	-	-	-	-	0,148126
AU S4-G3	-	-	-	26,40	0,0947697

Oznaka vzorca	duRT-qPCR		mRT-qPCR		RT-RPA
	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Cq CBCVd	Cq HLVD	Fluorescenca za HLVD (au)
CEL S4-G3	25,64	-	-	25,09	0,1969
BO S4-G3	25,38	-	-	26,86	0,106099
Bioreba vrečka+GEB3 (B1)					
BVV B1-G3	-	29,46	-	-	0,054335
AU B1-G3	-	-	-	-	0,0718663
CEL B1-G3	23,10	-	23,66	22,29	0,193504
BO B1-G3	-	30,47	-	-	0,0723803
GEB4+ plastično pestilo (S1)					
BVV S1-G4	-	-	-	-	/
AU S1-G4	-	-	-	-	/
CEL S1-G4	-	-	-	-	/
BO S1-G4	-	-	-	32,10	/
GEB4+ kovinsko pestilo (S2)					
BVV S2-G4	-	-	-	-	/
AU S2-G4	-	-	-	-	/
CEL S2-G4	-	-	-	-	/
BO S2-G4	-	-	-	-	/
GEB4+ KIMBLE baterijski (S3)					
BVV S3-G4	-	-	-	-	/
AU S3-G4	-	-	-	-	/
CEL S3-G4	-	-	-	-	/
BO S3-G4	-	-	-	27,95	/
GEB4+ kovinske kroglice (S4)					
BVV S4-G4	-	-	-	-	/
AU S4-G4	-	-	-	-	/
CEL S4-G4	25,92	-	-	27,98	/
BO S4-G4	-	-	-	-	/
Bioreba vrečka+GEB4 (B1)					
BVV B1-G4	-	25,30	-	-	/
AU B1-G4	-	-	-	-	/
CEL B1-G4	24,41	-	-	-	/
BO B1-G4	-	27,52	-	-	/
Kontrole					
CBCVd	14,71	18,32	-	/	/

Oznaka vzorca	duRT-qPCR		mRT-qPCR		RT-RPA
	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Cq CBCVd	Cq HLVd	Fluorescenca za HLVd (au)
gBlocks CBCVd	10,49	-	08,45	/	/
BVV	-	21,13	/	/	/
H2O	-	-	/	/	/
HLVd	/	/	-	17,19	/
gBlocks HLVd	/	/	-	14,52	/
Tris 10 mM	/	/	-	-	/

*BVV, hmelj brez virusov in viroidov; AU, hmelj sorte Aurora okužen s CBCVd in HLVd; CEL, hmelj sorte Celeia okužen s CBCVd in HLVd; BO, hmelj sorte Bobek okužen s CBCVd in HLVd; CBCVd, hmelj okužen s CBCVd- pozitivna kontrola amplifikacije; gBl, gBlocks umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd ali HLVd; H2O, voda brez nukleaz- negativna kontrola amplifikacije; -, negativen rezultat; /, ni bilo testirano

Kot pričakovano smo z duRT-qPCR dobili več pozitivnih vrednosti za viroid CBCVd, ker je metoda bolj občutljiva (preglednica 3). Viroid CBCVd smo uspešno določili pri vseh pozitivnih vzorcih z uporabo plastičnega in kovinskega pestila. Pri baterijskem homogenizatorju in kroglicah smo bili malo manj uspešni in najmanj pri uporabi Bioreba homogenizatorja. Za viroid HLVd smo dobili vse ustrezne rezultate z uporabo plastičnega in kovinskega pestila in kovinskih kroglic. Manj uspešni smo bili pri uporabi baterijskega in Bioreba homogenizatorja. Rezultati se med viroidoma CBCVd in HLVd precej ujemajo, razlike v Cq vrednostih so večje med vzorci, različnih sort, ker je bila že v osnovi razlika med koncentracijami viroidov v tkivih. Zanimivo je, da smo za isti vzorec, naprimer hmelj sorte Celeia (CEL) z uporabo različnih homogenizatorjev (plastično, kovinsko, baterijsko) dobili enake Cq-vrednosti za CBCVd in HLVd, iz česar lahko sklepamo, da omenjeni homogenizatorji omogočajo primerljivo stopnjo homogenizacije. Primerljive so tudi vrednosti za sorto Aurora, pri sorti Bobek pa smo že v osnovi imeli višje Cq-vrednosti, posledično pri uporabi baterijskega homogenizatorja nismo dobili pozitivne vrednosti. Koncentracija viroida CBCVd je bila v tkivu sorte Celeia precej višja kot pri ostalih, ker smo pri vzorcu CEL dobili pozitivne signale tudi pri Bioreba homogenizatorju pri GEB3 in GEB4 pufru, kot pri kovinskih kroglicah pri GEB4 pufru.

Če rezultate primerjamo s prvim poskusom (preglednica 2), kjer smo prav tako uspešno določili viroid CBCVd z vsemi homogenizatorji, lahko ugotovimo, da so Cq-vrednosti iz PI precej višje kot pri PII (preglednica 3). Uporaba pufru GEB3 je omogočila večjo stabilizacijo komponent in zmanjšala vpliv inhibitorjev, ker smo dobili z GEB3 več pozitivnih vrednosti. Vendar pa je uporaba pufru GEB3 glede na PI negativno vplivala na detekcijo interne kontrole mRNA1192, ker smo dobili samo dva pozitivna signala. Razlog bi lahko bil tudi v uporabi zamrznjenega tkiva, ampak glede na to, da z rednimi analizami pogosto testiramo tkivo, ki je zamrznjeno in odtaljeno, in interna kontrola vseeno deluje, sklepamo, da bi lahko bil razlog v uporabi pufru GEB3. Glede na rezultate obeh poskusov lahko sklepamo, da lahko viroida CBCVd in HLVd v hmelju z RT-qPCR uspešno detektiramo po

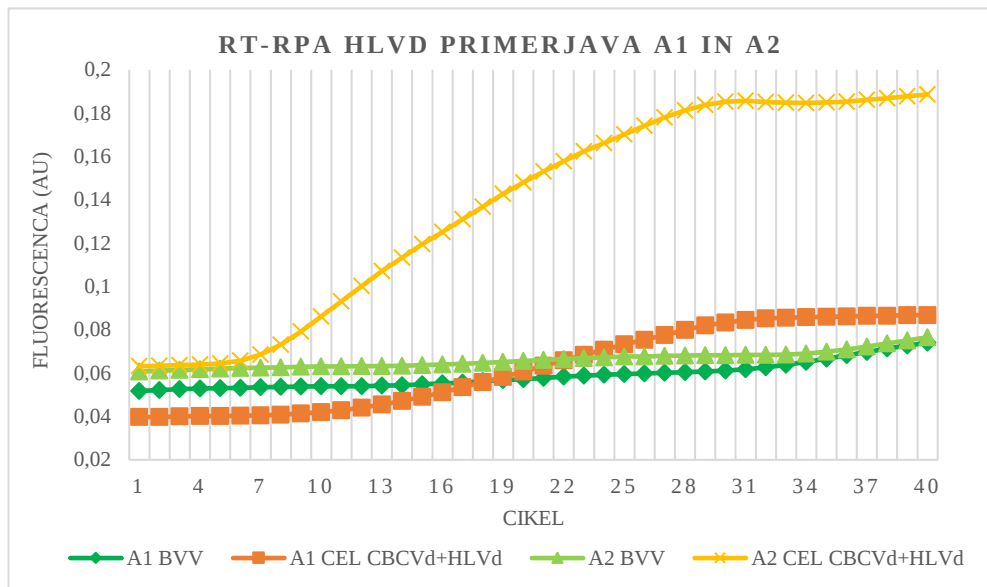
homogenizaciji s katerimkoli od uporabljenih ročnih homogenizatorjev. Na rezultate ima velik vpliv uporaba ustreznega pufru, uporabljeno tkivo (mehko/krhko/staro...) in kot pričakovano, sama koncentracija viroida v vzorcu. Za detekcijo viroidov v hmelju smo potrdili ustreznost pufru GEB3 in neustreznost pufru GEB4. Z vodo tretirano z DEPC smo lahko uspešno določili viroide ampak smo dobili zelo visoke Cq-vrednosti, ki so bile precej višje kot s CTAB reagentom, kar lahko vodi v napačno interpretacijo in lažno negativne rezultate. Uporaba pufru GEB3 je posledično primernejša. Razlika med posameznimi ročnimi homogenizatorji je bila predvsem v stopnji homogenizacije, ki pa se je razlikovala tudi zaradi razlik v uporabljenem tkivu. Zanimivo je, da smo lahko viroide uspešno določili že ob manjši stopnji homogenizacije, ko smo na primer uporabili kovinske kroglice, hkrati pa smo bili neuspešni pri Bioreba vrečkah, kjer smo dobili najbolj homogene vzorce. Tako da, glede na stopnjo homogenizacije težko govorimo o vplivu na rezultat. Glede na rezultate sklepamo, da je najboljša neke vrste srednja pot. Pri uporabi pufru GEB3 smo dobili najboljše rezultate pri plastičnem in kovinskem pestilu, ki imata slabšo stopnjo homogenizacije kot Bioreba vrečke, ampak boljše kot kovinske kroglice in baterijski homogenizator. Če povzamemo, v primeru, da liza celic ni zadostna tvegamo, da se v pufer ne sprosti dovolj viroida in posledično, zaradi slabše občutljivosti metode dobimo lažno negativne rezultate. V primeru zelo dobre homogenizacije pa se zaradi uspešne lize celic v pufer sprosti tudi veliko drugih komponent, ki inhibirajo reakcijo in ponovno dobimo lažno negativne rezultate. Rešitev je tako v uporabi plastičnih in kovinskih pestil, ki zagotovijo ustrezno homogenizacijo in pozitivne rezultate.

Rezultate težko primerjamo s predhodnimi objavami, ker je, kot že omenjeno, postopek homogenizacije v objavljenih protokolih zelo pogosto slabo opisan. Ker se sklepa, da je vpliv homogenizacije na poskus minimalen, se na ta del ne polaga veliko opazenj. Raziskovalci, ki na novo razvijajo metode imajo tako težave kje dobili informacije o ustrezni izbiri metode homogenizacije. Ker je med laboratoriji zelo velika variacija v metodologiji, je potrebno za uspešno detekcijo patogenov postopek homogenizacije dobro optimizirati. Izbira ustreznega orodja, kemije in metode lahko ima zelo velik vpliv na končni rezultat (Burden, 2012).

3.3 RT-RPA

Dodatno smo vzorce na prisotnost viroida HLVd analizirali z metodo RT-RPA in testirali komercialno dostopen kit AmplifyRP® XRT. Zaradi enostavnosti uporabe RT-RPA kita smo uspeli viroid HLVd v vzorcu določiti v 30 minutah. Vzorec smo najprej zmleli (5 min), zmešali z reagenti proizvajalca (5 min) in nato pomnožili pri konstantni temperaturi (20 min). Rezultate smo spremljali v realnem času in za rezultat dobili krivuljo, ki je pomenila povišanje fluorescence (slika 4). Metoda je podobna RT-qPCR, vendar v tem primeru nimamo Cq-vrednosti ampak vrednosti fluorescence. Krivuljo dobimo, če se nam fluorescenca ustrezno poviša, kar pomeni, da je v vzorcu prisotna tarča, ki je viroid HLVd. V prvem delu testiranja kita smo primerjali dva različna načina homogenizacije (A1 in A2) in dobili v vzorcih okuženega hmelja (CEL CBCVd+HLVd) višje vrednosti fluorescence kot pri neokuženem hmelju (BVV), kjer je vrednost ostala nespremenjena skoraj do konca

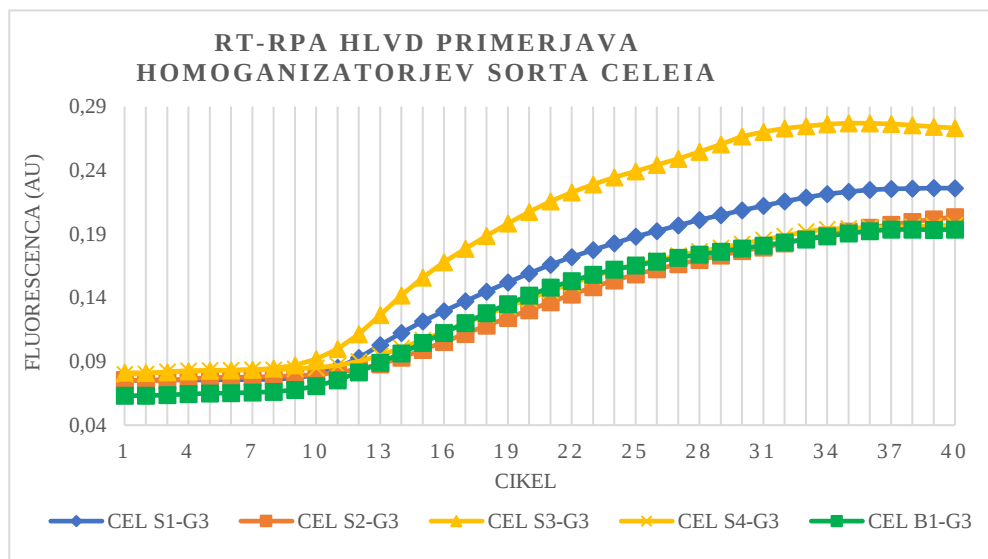
reakcije. Glede na primerjavo načinov homogenizacije smo dobili pri A1, kjer smo uporabili ročni homogenizator Bioreba in priloženo vrečko s pufrom proizvajalca, precej nižje vrednosti, kot pa pri uporabi načina A2 (slika 4). Pri A2 smo vzorce zmleli v mikrocentrifugirki z GEB3 pufrom in dobili za več kot 2-krat višjo vrednost fluorescence (slika 4). Glede na vrednosti fluorescence v negativnih vzorcih bi za način A1 težko z gotovostjo trdili, da je vzorec pozitiven, ker je razlika v maksimalni vrednosti fluorescence zanemarljiva.



Slika 4: Rezultati primerjave RT-RPA za določanje HLVD v zdravih vzorcih (BVV) in okuženih vzorcih (CEL, CBCVd+HLVd) hmelja z dvema načinoma homogenizacije (A1 in A2). Podane so vrednosti fluorescence v različnih časovnih točkah.

Glede na rezultate smo se odločili, da v drugem delu testiramo vzorce zmlete v GEB3 pufu. Z RT-RPA smo na viroid HLVD testirali vzorce poskusa II (PII) (preglednica 3) in dobili rezultate primerljive z RT-qPCR. Potrdili smo manjšo občutljivost metode RT-PCR, ker smo lahko uspešno detektirali samo vzorce s Cq vrednostjo nižjo kot 26. Pri uporabi nekaterih homogenizatorjev, kot sta kovinsko pestilo in kovinske kroglice smo dobili v negativnih vzorcih visoke vrednosti fluorescence, kar kaže na kontaminacijo. Razlog bi lahko bil v predhodni uporabi pestila in kroglic za mletje pozitivnih vzorcev. Kljub temu, da smo jih pred uporabo razkužili, bi lahko ostanki vplivali na lažno pozitiven rezultat. Glede na to, da pri občutljivejšem RT-qPCR nismo dobili nobenih vrednosti, bi lahko bil razlog tudi v kontaminaciji med pipetiranjem RT-RPA reakcije. Najvišje vrednosti fluorescence za viroid HLVD smo dobili za vzorce CEL pri uporabi baterijskega homogenizatorja in plastičnega pestila (slika 5). Pri uporabi Bioreba homogenizatorja, kovinskih kroglic in kovinskega pestila smo dobili primerljive vrednosti fluorescence. Tudi za vzorec AU smo dobili najvišje vrednosti pri uporabi baterijskega homogenizatorja (preglednica 3). Glede na rezultate lahko sklepamo, da je pri uporabi RT-RPA

metode za detekcijo viroida HLVD najučinkovitejša uporaba baterijskega homogenizatorja in plastičnega pestila. Težavo zagotovo predstavlja kontaminacija, katere vpliv bi lahko zmanjšali z dodatno optimizacijo celotnega postopka uporabe komercialno dostopnega kita AmplifyRP® XRT.



Slika 5: Rezultati primerjave RT-RPA za določanje viroida HLVD z različnimi homogenizatorji na vzorcih hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVD in HLVD. Podane so vrednosti fluorescence v različnih časovnih točkah za homogenizacijo v pufru GEB3 s plastičnim pestilom (S1-G3), kovinskim pestilom (S2-G3), baterijskim homogenizatorjem (S3-G3), kovinskimi kroglicami (S4-G3) in Bioreba vrečkami (B1-G3).

4 ZAKLJUČKI

Homogenizacija je proces, ki se mu navadno ne posveča veliko pozornosti. Vsak laboratorij proces izvaja po svojih najboljših zmožnostih, glede na izkušnje pridobljene med delom. Zaradi finančnih omejitev in posledično poenostavljenih načinov homogenizacije, ta del izolacije NA pogosto predstavlja ozko grlo in posledično časovno obremenitev procesa izolacije. Z izbiro ustreznega orodja, kemije in metode homogenizacije lahko optimiziramo proces in dobimo zanesljive rezultate. Z uporabo ročnih homogenizatorjev in ustreznih pufrov lahko izolacijo NA optimiziramo tudi za možnost uporabe na terenu.

V raziskavi smo primerjali pet različnih ročnih homogenizatorjev in tri pufre. Z namenom razvoja metode CRISPR/Cas12a-RT-RPA za hitro detekcijo viroida CBCVD smo želeli optimizirati metodo homogenizacije, ki bi bila primerna za uporabo na terenu. Pri uporabi različnih homogenizatorjev smo viroide v vzorcih hmelja uspešno potrdili pri vseh načinih, čeprav so bile Cq-vrednosti višje kot pri standardni izolaciji s CTAB reagentom. Za potrditev prisotnosti viroidov v vzorcih je zadostovala že manjša stopnja homogenizacije z uporabo kovinskih kroglic ali baterijskega homogenizatorja. V primeru uporabe različnih pufrov smo z RT-qPCR

in RT-RPA dobili najboljše rezultate pri uporabi pufra GEB3. Pri testiranju kita AmplifyRP® XRT so se rezultati RT-RPA za HLVD ujekali z RT-qPCR. Pri nekaterih homogenizatorjih smo z RT-RPA imeli težave z nespecifičnimi signali v zdravih vzorcih hmelja. V raziskavi smo s primerjavo različnih ročnih homogenizatorjev potrdili, da lahko z vsemi homogenizatorji z uporabo ustreznega pufra dobimo zanesljive rezultate s hitro izolacijo, kar lahko uporabimo pri detekciji viroidov na terenu.

Zahvala: Avtorica se za finančno podporo zahvaljujem Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077). Za pomoč pri tehnični izvedbi procesa se avtorica še posebej zahvaljujem Sabini Gobec, Silviji Žgajner in Mariji Grašinar Ašenberger.

5 VIRI

- BioCompare. 2024. Laboratory-Homogenizers. <https://www.biocompare.com/Protein-Biochemistry/12986-Laboratory-Homogenizers/>. Dostopano:10.10.2024
- Burden, D. 2012. Guide to the Disruption of Biological Samples. *Random Primers*, 25 (12): 1–25
- Drawell. 2023. [What Are Different Types of Homogenizers and How to Select the Appropriate Type](https://www.drawellanalytical.com/what-are-different-types-of-homogenizers-and-how-to-select-the-appropriate-type/). <https://www.drawellanalytical.com/what-are-different-types-of-homogenizers-and-how-to-select-the-appropriate-type/>. Dostopano: 10.10.2024
- Emaus, M. N., Varona, M., Eitzmann, D.R., Hsieh, S., Anderson, J.L. 2020, [Nucleic acid extraction: Fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors](#). Version of Record: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993620302144>
- Guček, T., Jakše, J., Matoušek, J., Radišek, S. 2019, One-Step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viroids from hop (*Humulus lupulus* L.), *European Journal of Plant Pathology*, 154: 273-286
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2023, Optimization and validation of singleplex and multiplex RT-qPCR for detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd), hop latent viroid (HLVd), and hop stunt viroid (HSVd) in hops (*Humulus lupulus* L.), *Plant Disease*, 10,1094/PDIS-11-22-2606-RE
- Guček, T. in Radišek, S. 2023a, Določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin: sanje ali realnost? *Hmeljarski bilten*, 30: 5-17
- Guček, T. in Radišek, S. 2023b, Validacija metode duRT-qPCR za določanje viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na hmelju z uporabo mRNA1192 interne kontrole. *Hmeljarski bilten*, 30: 26-39
- Ivanov, Aleksandr V, Irina V, Shmyglya, Anatoly V, Zherdev, Boris B, Dzantiev, and Irina V, Safenkova, 2020, [The Challenge for Rapid Detection of High-Structured Circular Rna: Assay of Potato Spindle Tuber Viroid Based on Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Tests](#), *Plants*, 9 (10): 1–11, <https://doi.org/10.3390/plants9101369>
- Kump, B., Javornik, B. 2016, Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers, *Plant Science*, 114: 149-158
- Pokorn T, 2017, Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.), doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 159 str
- Tan, S.C., Yiap, B.C. 2009, DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present, *J, Biomed, Biotechnol*, doi:10.1155/2009/574398

VALIDATION OF THE POTENTIAL OF HIGHLY EXPRESSED TRANSCRIPTS AS MARKERS OF EARLY STAGES OF CBCVD INFECTION OF HOPS

Helena VOLK¹, Sebastjan RADIŠEK², Andreja ČERENAK³ and Jernej JAKŠE⁴

Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Arrived / Prispelo: 24. 10. 2024

Accepted / Sprejeto: 7. 11. 2024

Abstract

This study evaluated the expression of two candidate transcripts (1902 and 94443) in response to Citrus Bark Cracking Viroid (CBCVd) infection in three hop cultivars: Celeia, Styrian Cardinal, and Styrian Wolf. A root grafting technique was used for plant inoculation, and leaf samples were collected before symptoms appeared. The transcripts were selected based on bioinformatic analysis of RNA-seq data, that suggested high transcript levels in CBCVd-infected plants. qPCR results did not fully confirm this in the early stages of infection, the highest transcript expression was observed in CBCVd-infected Styrian Wolf at 4 months past inoculation, but surprisingly, expression dropped by 5 months past inoculation. This initial analysis offers insights into transcript expression during CBCVd infection, but further research is needed to confirm these findings and explore the potential of these transcripts as early infection markers.

Key words: hops, viroid, CBCVd, qPCR

VALIDACIJA POTENCIALA MOČNO IZRAŽENIH TRANSKRIPTOV KOT POKAZATELJEV ZGODNJIH FAZ OKUŽBE HMELJA S CBCVD

Izveček

V tej raziskavi smo ocenjevali izražanje dveh kandidatnih transkriptov (1902 in 94443) kot odziv na okužbo z viroidom razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) pri treh sortah hmelja: Celeia, Styrian Cardinal in Styrian Wolf. Transkripte smo izbrali na podlagi predhodne bioinformacijske analize RNA-seq podatkov, ki so kazali na visoko raven teh dveh transkriptov v rastlinah, okuženih s CBCVd. Za inokulacijo brezvirusnih in brezviroidnih rastlin smo uporabili tehniko cepljenja korenin, vzorce listov pa smo odvzeli pred pojavom simptomov. Rezultati qPCR povišanega izražanja izbranih transkriptov se v zgodnjih fazah okužbe niso v celoti potrdili;

¹ Dr., Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani (BF), Oddelek za agronomijo, e-naslov: helena.volk@bf.uni-lj.si

² Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

³ Dr., IHPS, e-naslov: andreja.cerenak@ihps.si

⁴ Dr., BF, Oddelek za agronomijo, e-naslov: jerne.jakse@bf.uni-lj.si

najvišje izražanje izbranih transkriptov smo določili pri s CBCVd okuženi sorti Styrian Wolf po 4 mesecih po okuževanju, vendar je izražanje po 5 mesecih po okuževanju upadlo. Ta raziskava ponuja začetni vpogled v izražanje morebitnih markerskih transkriptov 1902 in 94443 med okužbo hmelja s CBCVd, vendar so za potrditev teh ugotovitev potrebne nadaljnje raziskave njunega potenciala kot zgodnjih označevalcev okužbe s CBCVd.

Ključne besede: hmelj, viroid, CBCVd, qPCR

1 INTRODUCTION

Hop is an important agricultural crop in Slovenia, primarily used in brewing. Suitable environmental conditions are necessary for the growth and development of hop plants and various pathogens and pests negatively affect the plant. Among the pathogens infecting hops, viroids play a significant role. These are small, non-coding, single-stranded, circular RNAs that exploit their host to reproduce (Flores et al., 2005). Symptoms vary and may be latent without symptoms or manifest as necrosis, stunting, leaf chlorosis, changes in flowering, and deformities of fruits and seeds. Four viroids have been confirmed in hops so far, including the citrus bark cracking viroid (CBCVd), which causes considerable damage to plant production (Jakše et al., 2015; Radišek et al., 2020). In Slovenia, since the first finding of the stunted plants in 2007, almost 500 ha of hop gardens have been affected of which approximately 300 ha were removed and destroyed in order to eradicate the viroid (EPPO, 2024).

Identifying viroids, such as CBCVd, and other pathogens before symptom onset can help prevent disease spread, minimize crop damage, and enable timely, targeted treatments to protect the health and yield of hops. An example of this approach is the study by Camps et al. (2013), where they identified grapevine (*Vitis vinifera*) genes that respond to *Eutypa lata* in the early stages of infection. The researchers analysed naturally and artificially infected plants, identifying ten candidate genes, five of which were confirmed as effective diagnostic markers through qRT-PCR tests. A similar strategy was used for the early detection of *Alternaria* spp. in nine different crop plants, where one marker gene was confirmed by qPCR (Chakdar et al., 2019).

The aim of this project was to select and evaluate candidate transcripts involved in the hop response to CBCVd infection that could be used as early markers of infection. We have used bioinformatic approaches to screen existing transcriptomic data and select candidate transcripts which showed high expression in hop latent viroid (HLVd), hop stunt viroid (HSVd) and citrus bark cracking viroid (CBCVd) infected hops. The candidate transcripts were evaluated with qPCR on hop plants in the early stages of infection in three cultivars: CBCVd-susceptible Celeia, presumably CBCVd-tolerant Styrian Cardinal, and presumably CBCVd-resistant Styrian Wolf (Radišek et al., 2022).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Selection of gene models

We screened a bioinformatic differential gene expression analysis of hop plants based on RNA-seq data obtained from previous studies on CBCVd and HLVd infection (Štajner et al., 2019) as well as unpublished data on HSVd infection. The analysis was performed using the CLC Genomics Workbench package (ver. 23.0.4). Our objective was to identify hop transcripts exhibiting significant upregulation post-infection, compared to their expression in viroid-free plants where these transcripts were either absent or minimally expressed.

Obtained transcripts were searched using blast algorithms against nucleotide and protein databases to reveal their possible identity using NCBI web blast tool. Primers were designed using [Primer3 web version 4.1.0 tool](https://primer3.ut.ee/) (<https://primer3.ut.ee/>) using default parameters (Untergasser et al., 2012) and validated with the CLC Genomics Workbench package using the Find Binding Sites and Create Fragments tool.

2.2 Plant propagation, DNA and RNA extraction

Hop plants were inoculated in April 2023 by grafting the rootstock of uninfected hop plants, specifically cultivars Celeia, Styrian Cardinal, and Styrian Wolf, onto CBCVd-infected Celeia rootstocks or uninfected Celeia rootstocks as control groups. Five biological replicates were prepared for each grafted plant, and each plant was potted in a 4L pot. The plants were maintained under quarantine conditions at the Research Station for Plant Protection (IHPS). They were treated according to good agronomic practices, using pesticides and fertilizers to protect against pests and diseases while ensuring proper nutrition. 3 to 5 young hop leaves were sampled before symptom onset, specifically at 4- and 5-months post-inoculation (MPI). The sampled leaves were snap-frozen on site in liquid nitrogen, ground to a fine powder, and stored at -80 °C. DNA was extracted from 100 mg of tissue using the CTAB protocol (Kump and Javornik, 1996), and the samples were stored at -20 °C. RNA was extracted from 100 mg of tissue using the Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs), following the manufacturer's protocol, and stored at -80 °C. The quantity and quality of DNA was evaluated using the NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare), while RNA was assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies).

2.3 RT-PCR for CBCVd detection

For viroid detection in grafted plants, we employed RT-PCR using the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) and CBCVd specific primers (Table 1; Guček et al., 2019), following the protocol developed by Jakše et al. (2015). RT-PCR products were analyzed by gel electrophoresis for 1 hour at 120 V, and viroid amplification was confirmed by identifying specific band sizes under a UV transilluminator GelScanner.

2.4 Reverse transcription and qPCR

cDNA was prepared from 1000 ng of RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) according to the manufacturer’s protocol. Quantitative PCR (qPCR) was performed in two technical replicates with 1 µl of 10-fold diluted cDNA samples using Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) and gene-specific primers (Table 1) in a total reaction volume of 6 µl. The qPCR was conducted using the QuantStudio 5 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) under the following thermocycling conditions: initial denaturation for 20 s at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95 °C and 30 s extension at 60 °C, concluding with a melt curve analysis. The qPCR data were normalized to the DRH1 housekeeping gene (Štajner et al., 2013) and analyzed using the Pfaffl method (Pfaffl, 2021). Due to the lack of biological replicates of the CBCVd-infected plants, we were unable to perform the Student t-tests.

Table 1: Primer used in this study

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Molarity
CBCVd*	GGGGAAATCTCTTCAGACTC	GGGGATCCCTCTTCAGGT	600 nM
Transcript 1902	ATCCTTTGCTCGTCCTTTGC	AAGCCTTCAAACCCGATT GC	100 nM
Transcript 94445	CACCTGGACAGAAAGACCCT	CCTTCTTCGCCTTCCACCT A	200 nM
Housekeeping gene DRH1**	CCAACCTACTGGGCTTCGAC	CAGAATGGGTATGATCGG GC	300 nM

*reference: Guček et al., 2019; **reference: Štajner et al., 2013

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Bioinformatic analysis identified two promising gene models

The bioinformatic analysis of RNA-seq data of CBCVd, HLVd, and HSVd infected hop has identified two promising transcripts: 1902 and 94445. Both transcripts demonstrated substantial upregulation upon infection with the CBCVd and HLVd viroids. Specifically, 1902 was not expressed under viroid-free conditions, whereas 94445 showed partial expression even in the absence of viroids. The differences in expression levels between infected and uninfected plants were statistically significant (p < 0.05). The sequences of these transcripts are presented below:

>1902
AAAGAAGTCTAGTAGTGTAGTAGTAATAAATCATTGATCTACGAAGCACCCCTCGGA
TACAGCATTGAAGACCTTCGCCCTGCCGGTGGAATCAAGAAATTCAGATCAGCTGC
ATACTCCAACTGCGTTCGCAAGCCATCCTGACTCTCCCGTGCTCTGATATAACCCCT
TGAGCTCGTTTAACTGCATCCAAACAATACTGTCTCTCTTTCTTTCTCCCTCTC
TCCCCCTCTTCTCTTGCTGTCTACTCTCTTTAACTCTCGTCTGTTTCACTTTCTGCA
TCCTTTGCTCGTCCTTTGCTCCTTTCAGCGTTTTTTTTATTTGTTTCGCTTAAAAATGGC
CGATCAAGTTTCTGCAATCGGGTTTGAAGGCTTTGAGAAGAGGCTCG

>94445

```
TGAAATAGACATGTCTGTGAAGATGCGGACTACCTGCACCTGGACAGAAAGACCCT
ATGAAGCTTCACTGTTCCCTGGGATTGGCTTTGGGCTTTTCCTGCGCAGCTTAGGTG
GAAGGCGAAGAAGGCCTCCTTCCGGGGGGGGCCCGAGCCATCAGTGAGATACCACTC
TGGAAGAGCTAGAATTCTAACCTTGTGTCAGGACCTACGGGCCAAGGGACAGTCTC
AGGTAGACAGTTTCTATGGGGCGTAGGCCTCCCAAAAGGTAACGGAGGCGTGCAAA
GGTTTCCTCGGGCCAGACGGAGATTGGCCCTCGAGTGCAAAGGCAGAAGGGAGCTT
GACTGCAAGACCCACCCGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGCCTTAGTGATCCGACGG
TGCCGAGTGGAAGGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAAGTTACTCT
```

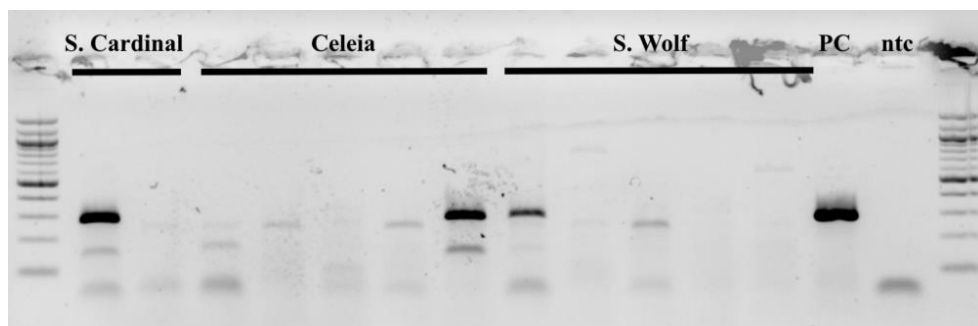
Both sequences have an open reading frame, indicating their coding potential. A comparison of these sequences with existing databases yielded the following results:

- BLASTX analysis (comparison with proteins) – S-adenosyl-l-methionine decarboxylase leader peptide (1902) and cell wall-associated hydrolase [*Phaseolus vulgaris*] (94445).
- BLASTN analysis (comparison with nucleotides, gene sequences) confirmed the same results as the BLASTX analysis.

Primers (Table 1) designed within this study were validated against hop genome with the CLC Genomics Workbench package using the Find Binding Sites and Create Fragments tool, which revealed one putative fragment (92 bp) for 1902 and six putative fragments (90 bp and 91 bp) for 94445, with sequence identities ranging from 90 % to 100 % and an average of 96 %, suggesting that the primers exhibit high specificity and binding efficiency across the target sequences. However, it remains unknown if the additional sequences are expressed and, if so, in what amounts.

3.2 Viroid infection rate in grafted plants

The grafted plants were exposed to outdoor conditions that added to the stress of grafting the plant and the infection transfer, as a result several grafted plants died-out prior to sampling. RT-PCR (Figure 1) revealed an infection rate of 20 % in all three grafted cultivars, meaning that one out of 5 plants grafted with CBCVd-infected variety Celeia was successfully infected with this viroid.



Ladder: 100 bp DNA Ladder (NEB); PC: positive control; ntc: no template control

Figure 1: CBCVd-infected grafted hop plants Styrian Cardinal, Celeia and Styrian Wolf at 5 MPI

3.3 Relative expression of transcript 1902 and it's putative biological role

Bioinformatic analysis of RNA-seq data suggests that 1902 was not expressed under viroid-free conditions and that it is highly expressed in viroid-infected hop plants. qPCR analysis of the relative expression of transcript 1902 in the early stages of infection (4 MPI and 5 MPI) did not confirm this observation (Figure 2) and the transcript was expressed in all three conditions, including in the non-inoculated viroid-free samples. Based on the RT-PCR results of CBCVd infection, the samples have been grouped in 3 categories: controls (mock), not infected and CBCVd-infected.

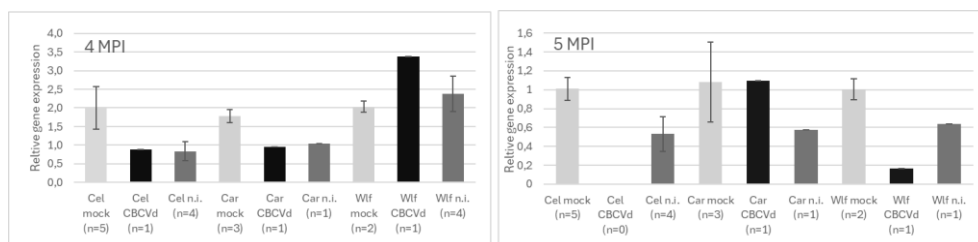


Figure 2: Relative expression of transcript 1902 at 4 and 5 MPI for cultivars Celeia (Cel), Styrian Cardinal (Car) and Styrian Wolf (Wlf) when not inoculated (mock, light gray), inoculated, but not infected (n.i., dark gray) and infected with CBCVd (CBCVd, black). Error bar demonstrate SD.

The highest relative expression was observed in CBCVd-infected Styrian Wolf at 4 MPI, but surprisingly the relative expression dropped at 5 MPI. A different trend was observed with cultivar Styrian Cardinal where relative expression of transcript 1902 reached highest values at 5 MPI. Unfortunately, due to low infection rate and low RNA quality, the analysis of CBCVd-infected Celeia cultivar could only be performed at 4 MPI. The relative expression of transcript 1902 was highest in the non-infected (mock) Celeia cultivars at 4 MPI.

According to BLASTX and BLASTN analysis, transcript 1902 shows similarity to the S-adenosyl-L-methionine decarboxylase leader peptide (SAMDC), an enzyme

involved in polyamine biosynthesis. Polyamines play an important role in many biological processes, including the plant's response to stress (Walden et al. 1997), therefore also SAMDC plays a crucial role in plant stress responses. SAMDC expression or SAMDC activity was increased in various abiotic stress conditions. Its expression in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) has been reported to be triggered by salt, drought, and cold stress, but not by wounding (Tian et al., 2004). But on the contrary, wounding induced the expression of SAMDC monocot *Tritordeum* (Dresselhaus et al, 1996). Although the literature on this topic presents conflicting findings, we speculate that the expression of transcript 1902 in the non-inoculated, viroid-free hop samples may result from the wounding caused by rootstock grafting.

In alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings SAMDC activity was increased under drought conditions (Wang et al., 2023). Various abiotic stresses (drought, water logging and salinity) significantly upregulated the expression of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Stevia rebaudiana* (Pal et al., 2023). Furthermore, the expression of SAMDC was induced by high salinity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Zhu et al., 2023) and low-temperature stress in apples (*Malus domestica*) (He et al., 2024). Drought stress resulted in increased SAMDC activity in maize (*Zea mays* L.) (Chen et al., 2023). All these findings suggest that the SAMDC gene is involved in the plant's response to a range of environmental stress factors, that could also include viroid infection. Interestingly, Mu et al. (2023) reported S-adenosylmethionine decarboxylase to have stable expression in *Uncaria rhynchophylla* under stress conditions (low temperature, treatment with methyl jasmonate and ethylene).

3.4 Relative expression of transcript 94445

Similarly to the transcript 1902 also for transcript 94445 bioinformatic analysis suggested high expression in viroid-infected hop plants. qPCR analysis of the relative expression of transcript 94445 in the early stages of infection (4 MPI and 5 MPI) did not confirm this observation (Figure 3).

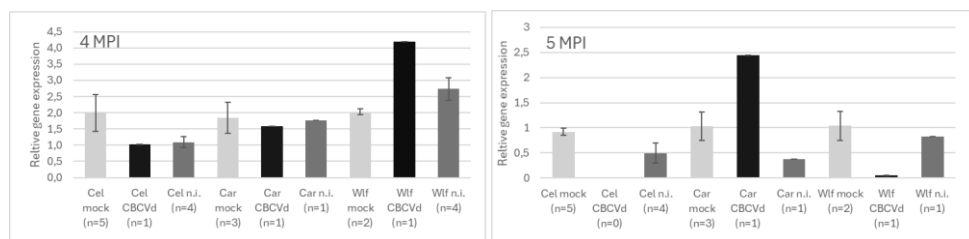


Figure 3: Relative expression of transcript 94445 at 4 and 5 MPI for cultivars Celeia (Cel), Styrian Cardinal (Car) and Styrian Wolf (Wlf) when not inoculated (mock, light gray), inoculated, but not infected (n.i., dark gray) and infected with CBCVd (CBCVd, black). Error bar demonstrate SD.

As observed for transcript 1902, the expression values of transcript 94445 were higher in CBCVd-infected Styrian Wolf at 4 MPI and the values dropped at 5 MPI. Also, for cultivars Celeia and Styrian Cardinal, a similar expression pattern was

observed as with transcript 1902. In both cases, the relative expression levels in cultivar Styrian Cardinal reached their peak at 5 MPI, showing the highest values at this time point. Likewise, for the Celeia cultivar, the analysis of transcript 94443, much like transcript 1902, could only be conducted at 4 MPI due to low infection rates and RNA quality in CBCVd-infected samples. In both transcripts, the non-infected (mock) Celeia cultivars exhibited the highest relative expression levels at 4 MPI. Thus, the overall trends for both transcripts were consistent across cultivars and MPI.

According to BLASTX and BLASTN analysis, transcript 94445 shows similarity to the cell wall-associated hydrolase from common bean (*Phaseolus vulgaris*). The expression of cell wall-associated hydrolase has not been studied in such depth as the previously described SAMDC and is limited to one relevant publication. Guček et al. (2005) reported downregulation of the expression of cell wall-associated hydrolase in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in cold temperature conditions.

4 CONCLUSIONS

In this study we aimed to evaluate the expression of two candidate transcripts (1902 and 94443) in response to CBCVd infection in hops, with a focus on three varieties: Celeia, Styrian Cardinal, and Styrian Wolf. Despite initial indications from bioinformatic analyses suggesting a high upregulation of these transcripts in CBCVd-infected plants, qPCR results did not fully confirm this in early stages of infection at 4 and 5 MPI. The highest relative expression levels for both transcripts were observed in CBCVd-infected Styrian Wolf at 4 MPI, but this expression decreased at 5 MPI. We speculate that grafting and environmental stressors, such as temperature fluctuations, humidity variations, and pest exposure, may have influenced transcript levels in both infected and control (mock) plants.

The low infection rate of 20 % in grafted plants highlights the need to increase the number of biological replicates to ensure robust results. Furthermore, the limited time points in the current study underscore the importance of validating more time points in the next growing season to capture the full dynamic range of transcript expression over time. Additionally, controlled experiments under stable environmental conditions may help isolate the specific effects of CBCVd infection on transcript expression.

In future studies, a broader selection of candidates could improve the chances of identifying reliable markers for early CBCVd infection in hops. As demonstrated in research on grapevines only five out of ten candidates were confirmed by RT-qPCR as suitable for an early diagnostic method of *E. lata* infection (Camps et al., 2013).

In conclusion, while the results of this study provide initial insights into the expression dynamics of transcripts 1902 and 94443 in response to CBCVd infection, further investigation with a more comprehensive experimental design is essential for confirming these findings and identifying early markers of CBCVd infection in hops.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by the ARIS project V4-2203 and the ARIS program P4-0077.

6 REFERENCES

- Camps, C., Kappel, C., Lecomte, P., Léon, C., Coutos-Thévenot, P., Delrot, S., & Gomès, E. (2013). [Identification of grapevine marker genes for early, non-destructive *Eutypa lata* infection diagnosis](https://doi.org/10.1111/ppa.12101). *Plant Pathology*, 63(2). <https://doi.org/10.1111/ppa.12101>
- Chakdar, H., Goswami, S.K., Singh, E. et al. [noxB-based marker for *Alternaria* spp.: a new diagnostic marker for specific and early detection in crop plants](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1779-4). *3 Biotech* 9, 249 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1779-4>
- Chen, B. X., Li, Y. B., Liu, H. P., & Kurtenbach, R. (2023). [Putrescine transformation to other forms of polyamines in filling grain embryos functioned in enhancing the resistance of maize plants to drought stress](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107654). *Plant Physiology and Biochemistry*, 197, 107654. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107654>
- Dresselhaus, T., Barcelo, P., Hagel, C., Lörz, H., & Humbeck, K. (1996). [Isolation and characterization of a *Tritordeum* cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated](https://doi.org/10.1007/BF00020812). *Plant Molecular Biology*, 30(5), 1021–1033. <https://doi.org/10.1007/BF00020812>
- EPPO (2024) Citrus bark cracking viroid. [EPPO datasheets on pests recommended for regulation](https://gd.eppo.int). <https://gd.eppo.int>
- Flores, R., Hernandez, C., Martinez del Alba, A. E., Daros, J. A., & Di Serio, F. (2005). [Viroids and viroid-host interactions](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243). *Annual Review of Phytopathology*, 43, 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Gulick, P. J., Drouin, S., Yu, Z., Danyluk, J., Poisson, G., Monroy, A. F., & Sarhan, F. (2005). [Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature](https://doi.org/10.1139/g05-039). *Genome*, 48(5), 913–923. <https://doi.org/10.1139/g05-039>
- Guček, T., Jakše, J., & Radišek, S. (2019). Preizkušanje različnih metod okuževanja rastlin s CBCVd. *Hmeljarski Bilten*, 26, 36–49.
- He, M., Zhou, J., Lyu, D., Xu, G., & Qin, S. (2024). [Exogenous spermidine alleviated low-temperature damage by affecting polyamine metabolism and antioxidant levels in apples](https://doi.org/10.3390/plants13081100). *Plants*, 13(8), 1100. <https://doi.org/10.3390/plants13081100>
- Jakše, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matoušek, J., & Javornik, B. (2015). [Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid \(CBCVd\) as a highly aggressive pathogen on hop](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2014.12734.x). *Plant Pathology*, 64(1), 831–842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2014.12734.x>
- Kump, B., & Javornik, B. (2016). [Evaluation of genetic variability among common buckwheat \(*Fagopyrum esculentum* Moench\) populations by RAPD markers](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04521-2). *Plant Science*, 114, 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04521-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04521-2)
- Mu, D., Shao, Y., He, J., Zhu, L., Qiu, D., Wilson, I. W., Zhang, Y., Pan, L., Zhou, Y., Lu, Y., & Tang, Q. (2023). [Evaluation of reference genes for normalizing RT-qPCR and analysis of the expression patterns of WRKY1 transcription factor and Rhynchophylline biosynthesis-related genes in *Uncaria rhynchophylla*](https://doi.org/10.3390/ijms242216330). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16330. <https://doi.org/10.3390/ijms242216330>
- Pfaffl, M. W. (2001). [A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45). *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Radišek, S., Guček, T., Dobrajc, M., Štajner, N., Matoušek, J., & Jakše, J. (2022). Symptomology of citrus bark cracking viroid on hop and impact to Slovenian hop production. In VIROID 2022: Abstracts of papers presented at the VIROID 2022 conference: Viroids, Viroid-like RNAs and RNA viruses: 14-16 September 2022 Crete, Greece (p. 16).

- Radišek, S., Guček, T., Kolenc, U., Friškovec, I., & Benko-Beloglavec, A. (2020). Stanje okuženosti hmeljišč s hudo viroidno zakrnelostjo hmelja v letu 2020. *Hmeljar*, 82(1), 52–53.
- Štajner, N., Cregeen, S., & Javornik, B. (2013). [Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop \(*Humulus lupulus* L.\) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068228). *PLoS ONE*, 8(7), e68228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068228>
- Štajner, N., Radišek, S., Mishra, A. K., Nath, V. S., Matoušek, J., & Jakše, J. (2019). [Evaluation of disease severity and global transcriptome response induced by citrus bark cracking viroid, hop latent viroid, and their co-infection in hop \(*Humulus lupulus* L.\)](https://doi.org/10.3390/ijms20133154). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms20133154>
- Tian, A. G., Zhao, J. Y., Zhang, J. S., Gai, J. Y., & Chen, S. Y. (2004). [Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean](https://doi.org/10.1007/s00122-003-1507-6). *Theoretical and Applied Genetics*, 108(5), 842–850. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1507-6>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug 1; 40(15): e115.
- Walden, R., Cordeiro, A., & Tiburcio, A. F. (1997). [Polyamines: Small molecules triggering pathways in plant growth and development](https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1009). *Plant Physiology*, 113(4), 1009–1013. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1009>
- Wang, W., Shi, S., Kang, W., & He, L. (2023). [Enriched endogenous free Spd and Spm in alfalfa \(*Medicago sativa* L.\) under drought stress enhance drought tolerance by inhibiting H2O2 production to increase antioxidant enzyme activity](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154139). *Journal of Plant Physiology*, 291, 154139. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154139>
- Zhu, M., Chen, G., Wu, J., Wang, J., Wang, Y., Guo, S., & Shu, S. (2023). [Identification of cucumber S-adenosylmethionine decarboxylase genes and functional analysis of CsSAMDC3 in salt tolerance](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1076153). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1076153. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1076153>

VIROIDI KOT INOVATIVNO BIOTEHNOLOŠKO ORODJE: KRATEK PREGLED IN ZGODNJI OBETI

Helena VOLK¹ in Jernej JAKŠE²

Pregledni članek / Review article

Prispelo / Arrived: 10. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 21. 10. 2024

Izvleček

Viroidi, najmanjši rastlinski patogeni, so v hmeljarstvu znani predvsem zaradi gospodarske škode, ki jo povzročata viroida zaknelosti hmelja (HSVd) in viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd). Poleg tega, da povzročajo resne rastlinske bolezni, so viroidi pomembno vplivali na razvoj številnih biotehnoloških metod in orodij, ki jih še danes uporabljamo v biotehnologiji. V tej pregledni objavi povzemamo najnovejše raziskave, ki viroide na inovativne načine izkoriščajo za razvoj biotehnoloških metod: i) za proizvodnjo krožnih RNA molekul in njihovo aplikativno uporabo za zatiranje škodljivcev; ii) kot orodje za transport RNA z namenom izražanja proteinov v rastlinskih organelih; iii) kot ribocime, ki omogočajo razgradnjo ciljanih RNA sekvenc v rastlinah; iv) za napovedovanje resnosti simptomov in preprečevanje širjenja visokosimptomatskih viroidnih variant in za v utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (VdIGS), ki ima potencial za široko uporabo v funkcionalnih študijah genov pri kmetijski pomembnih rastlinah. S temi napredki raziskave viroidov postavljajo temelje za nove biotehnološke aplikacije, ki bodo pomembno prispevale k razvoju izboljšanih pridelkov, boljši odpornosti rastlin na bolezni in novim metodam nadzora nad škodljivci.

Ključne besede: viroid, ELVd, krožna RNA, transport RNA, ribocimi, VdIGS biotehnologija

VIROIDS AS AN INNOVATIVE BIOTECHNOLOGICAL TOOL: A BRIEF OVERVIEW AND EARLY PROSPECTS

Abstract

Viroids, the smallest plant pathogens, are primarily known in hop growing for the economic damage caused by hop latent viroid (HSVd) and citrus bark cracking viroid (CBCVd). In addition to causing serious plant diseases, viroids have significantly influenced the development of numerous biotechnological methods and tools that are still widely used in biotechnology today. This review summarizes the latest research that innovatively exploits viroids for the development of

¹ Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (BF), Oddelek za agronomijo, e-naslov: helena.volk@bf.uni-lj.si

² Dr., BF, e-naslov: jerne.jakse@bf.uni-lj.si

biotechnological methods: i) for the production of circular RNA molecules and their application in pest control; ii) as a tool for RNA transport to express proteins in plant organelles; iii) as ribozymes, which enable the degradation of targeted RNA sequences in plants; iv) for predicting symptom severity and preventing the spread of highly symptomatic viroid variants; and v) for gene silencing through viroid-induced gene silencing vectors (VdIGS), which holds potential for broad use in functional gene studies in agriculturally important plants. With these advancements, viroid research is laying the foundation for new biotechnological applications that will contribute significantly to crop improvement, enhanced plant disease resistance, and new methods for pest control.

Key words: viroid, ELVd, circular RNA, RNA transport, ribozymes, VdIGS, biotechnology

1 O VIROIDIH KOT RASTLINSKIH PATOGENIH

Viroidi so najmanjši znani infektivni agensi, ki smo jih do nedavnega opisovali kot izključno rastlinske patogene. Te majhne, enoverižne krožne molekule RNA, velikosti od 246 do 401 nukleotidov, ki ne kodirajo proteinov, uspešno podvajajo svoje genome v celicah gostiteljske rastline. Novejše raziskave, ki so se oprle na moderne tehnike sekvenciranja naslednje generacije in moč bioinformatike nakazujejo na do nedavnega še nepoznano širino njihovih gostiteljev. Dokazali so, da se viroidi oz. viroidom podobne krožne RNA molekule nahajajo tudi v gostiteljih izven rastlinskega kraljestva, npr. pri glivah (Sun in Hadidi, 2022; Dong in sod. 2023; Forgia in sod., 2023), mnogih bakterijah in enoceličnih evkariontih (Lee in sod., 2023) ter celo pri bakterijah, ki so del humanega mikrobioma (Zheludev in sod., 2024). Na tem mestu lahko izpostavimo tudi že dlje časa poznane viroidom podobne riboziviruse. Mednje npr. spada humani hepatitis delta virus (HDV), ki je genetsko bolj soroden (rastlinskim) viroidom, kot virusom (Palukaitis in sod., 2008).

Navkljub fascinantnosti teh odkritij, se sedaj osredotočimo le na viroide v klasičnem pomenu besede, torej tiste krožne RNA molekule, ki so se sposobne podvajevati znotraj rastlin. To so gole RNA molekule, torej so brez proteinskega plašča, ki je sicer značilen za viruse (Daros, 2016), a so kljub temu zelo obstojne, tako v, kot tudi izven gostitelja (Volk, 2023). Obstojnost jim omogočajo enoverižne in dvoverižne regije, ki tvorijo stabilno lasnično strukturo te patogene RNA molekule (Daros, 2016).

Viroide taksonomsko razvrščamo v dve družini: Pospiviroidae in Avsunviroidae. Družina Pospiviroidae, kamor sodijo rodovi Pospiviroid, Hostuviroid, Cocadviroid, Apscaviroid in Coleviroid, vključuje viroide, ki se razmnožujejo v jedru rastlinskih celic po asimetričnem načinu in imajo značilno konservativno centralno regijo ter paličasto strukturo. Viroidi iz družine Avsunviroidae, ki vključuje rodove Avsunviroid, Pelamoviroid in Elaviroid, se razmnožujejo v kloroplastih po simetrični metodi in imajo razvejano strukturo (Hammond in Owens, 2006).

Za slovensko hmeljarstvo so pomembni predvsem trije viroidi iz družine Pospiviroidae: hmeljev latentni viroid (HLVd, angl. hop latent viroid) (Puchta in sod.,

1988), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd, angl. hop stunt viroid) (Sasaki in Shikata, 1977; Radišek in sod., 2022) in viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd, angl. citrus bark cracking viroid) (Jakše in sod., 2015). Slednja, HSVd in CBCVd, pri hmelju povzročata resne bolezenske simptome in hudo gospodarsko škodo, kar zahteva natančno spremljanje in ustrezne ukrepe za preprečevanje širjenja okužb. Predvidene sekundarne strukture za Slovenijo pomembnih viroidov so prikazane na spodnji sliki (slika 1).

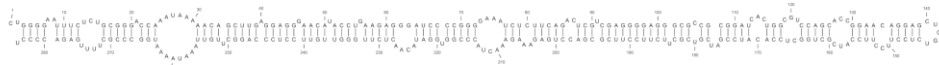
HLVd NC_003611



HSVd NC_001351



CBCVd KM211546.1



Slika 1: Predvidene sekundarne strukture viroidov HLVd (GeneBank NC_003611), HSVd (GeneBank NC_001351) in CBCVd (GenBank KM211546.1). Pripravljene so bile z orodjem "Predict Secondary Structure", ki je del CLC Genomics Workbench.

2 ZGODOVINSKI VPLIV RAZISKAV VIROIDOV NA RAZVOJ SODOBNIH BIOTEHNOLOŠKIH METOD IN SPOZNANJ

Od odkritja prvega viroida, viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd), leta 1971 (Diener, 1971) do danes, ko jim poznamo že 44 (Ma in sod., 2023), je bilo na področju raziskav viroidov objavljenih veliko publikacij. Samo v bazi PubMed jih lahko naštejemo preko 1400!

Nekatere izmed teh raziskav so neposredno vplivale na razvoj biotehnoloških metod in orodij, ki jih v biotehnologiji uporabljamo še danes. Tako so za potrebe strukturnih študij viroidov razvili metodo njihove izolacije s silicijevimi delci (Colpan in sod., 1983), ki so jo kasneje nadgradili in uporabili za izolacijo superzvite plazmidne DNA in danes predstavlja temelj delovanja komercialnih kompletov za izolacijo plazmidov (Steger in Riesner, 2018; Wang in sod., 2020). Poleg napredka v tehnikah čiščenja nukleinskih kislin je strukturna analiza viroidov v istem obdobju privedla do spoznanja o obstoju suboptimalnih struktur pri katerih določeni nukleotidni pari niso ustrezali strukturi z minimalno prosto energijo (Siger in sod., 1984). Ta koncept je postal ključna komponenta v računalniških programih za in silico napovedovanje sekundarnih struktur RNA, kar je bistveno povečalo zmogljivost in natančnost teh analiz (Wang in sod., 2020).

Posredno so raziskave viroidov vplivale tudi na razumevanje funkcije krožnih RNA molekul in njihovega potenciala za uravnavanje genskega izražanja (Wilusz, 2018), vplivale so tudi na razumevanje delovanja prionov in podprle hipoteze evolucijske teorije, ki povezujejo stopnjo mutacij z velikostjo genoma (Steger in Riesner, 2018). Raziskave viroidov so pomembno prispevale tudi k razvoju številnih najnovejših

raziskovalnih področij kot sta epigenetika in postranslacijsko utišanje genov (Wang in sod., 2020). V naslednjih poglavjih so opisana nova odkritja na področju raziskav viroidov, ki, kljub temu, da so viroidi najmanjše entitete življenja, prinašajo obetavna biotehnološka orodja prihodnosti in bodo lahko neposredno pripomogla k iskanju odgovorov na temeljna biološka vprašanja.

3 VIROIDI KOT INOVATIVNO BIOTEHNOLOŠKO ORODJE PRIHODNOSTI

Viroidi, najmanjši znani infektivni agensi, so v zadnjih letih pritegnili veliko pozornosti, ne samo zaradi njihove sposobnosti povzročanja bolezni pri rastlinah, temveč tudi zaradi izjemnega potenciala v biotehnologiji. Kot je prikazano v spodnji preglednici (preglednica 1), so različne viroide, še posebej viroid latentnosti jajčevca (ELVd, angl. eggplant latent viroid), uporabili za številne in predvsem zelo različne namene. V naslednjih poglavjih bomo te inovativne biotehnološke aplikacije viroidov podrobneje obravnavali. Predstavili bomo kako lahko viroide uporabimo za proizvodnjo krožnih RNA molekul, njihovo vlogo kot orodje za prenos RNA v celične organele, potencial viroidov kot ribocimov ter njihovo sposobnost utišanja genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (VdIGS). Poleg tega bomo nakazali, kako lahko viroidne različice uporabimo za preprečevanje širjenja bolj simptomatskih viroidnih sevov, kar dodatno poudarja njihovo vsestranskost in pomembnost tako v bazičnih raziskavah kot tudi njihov aplikativni potencial za uporabo v kmetijstvu.

Preglednica 1: Seznam viroidov, ki so jih do sedaj uporabili kot biotehnološko orodje

Viroid	Namen	Referenca
ELVd	Utišanje genov	Marquez-Molins in sod., 2022
ELVd	Proizvodnja krožnih RNA molekul	Daròs in sod., 2018; Consejo Superior De Investigaciones Científicas & Universitat Politècnica De València, 2015
ELVd	Vnos mRNA v kloroplaste	Gómez in Pallás 2010, 2012a, 2012b
ELVd	Ribocimska aktivnost	Carbonell in sod., 2006
PLMVd	Ribocimska aktivnost	Carbonell in sod., 2011
PSTVd	Napovedovanje simptomov	Sun in Matsushita, 2024

3.1 Uporaba viroidov za proizvodnjo krožnih RNA molekul

Daròs in sod. so razvili metodo proizvodnje rekombinantnih RNA z uporabo viroida ELVd, kot latentnega agensa jajčevca. V svojih raziskavah so preučevali interakcijo med viroidom ELVd in tRNA ligazo iz jajčevca, pri čemer so obe molekuli sočasno izrazili v bakteriji *Escherichia coli*. Opazili so, da so se ELVd RNA v transformiranih bakterijah kopičile v višjih količinah od ribosomalne RNA bakterije *E. coli*, hkrati pa so ugotovili, da do kopičenja ni prišlo na račun pomnoževanja viroida v celicah. Na

podlagi te ugotovitve so (Daròs in sod. 2018; Cordero in sod., 2018; Ortolá in Daròs, 2022) razvili in patentirali (Consejo Superior De Investigaciones Científicas & Universitat Politècnica De València, 2015) sistem za proizvodnjo rekombinantnih RNA v impresivnih koncentracijah: dosežejo lahko do več deset miligramov rekombinantne RNA na liter bakterijske kulture. Ta sistem so nato uporabili za proizvodnjo RNA, kot so: Spinach - RNA aptamer, ki posnema fluorescentne proteine; lasnične RNA, ki učinkovito inducirajo utišanje RNA; prekursorje CRISPR RNA (crRNA), ki usmerjajo nukleazo Cpf1 za urejanje genomov. V naslednjih letih so metodo razvijali naprej in usmerili v še bolj aplikativno smer ter pokazali, da lahko tako proizvedene dsRNA molekule preko mehanizma RNA interference delujejo insekticidno. Konkretnije, s pomočjo viroida proizvedeno RNA so v laboratorijih uspešno zatirali ličinke koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Ortolá in sod., 2020) in sadne muhe (*Ceratitis capitata*) (Ortolá in sod., 2023). V novejši pregledni objavi sta Ortolá in Daròs (2024) navedla, da lahko s proizvodnjo RNA molekul preko ELVd ali s sorodnimi sistemi ekspresije RNA v bakterijah dosežejo ceno 1 \$ na gram proizvedene RNA, ter ob tem izpostavila ekonomsko upravičenost uporabe RNAi za zatiranje škodljivcev v kmetijstvu.

3.2 Viroidi kot orodje za transport RNA

ELVd spada v družino viroidov Avsunviroidae za katere je značilno, da se razmnožujejo v kloroplastih svojega gostitelja (Hammond in Owens, 2006). Gómez in Pallás (2010, 2012a, 2012b) sta podrobneje preučila znotrajcelično lokalizacijo in znotrajcelični transport viroida ELVd in pokazala sta, da ob vstopu v citoplazmo viroid najprej potuje v celično jedro, nato pa v kloroplaste. Z manipulacijo sekvenčnega zaporedja ELVd sta mu uspela pripojiti mRNA molekulo proteina GFP in ga izraziti v kloroplastih tobaka (*Nicotiana benthamiana*). Njihova odkritja je med drugimi izpostavil tudi Daròs (2016), ki je prepoznal potencial ELVd za transport RNA v jedra in kloroplaste ter s tem tudi proizvodnjo zelenih proteinov v rastlinskih organelih.

3.3 Viroidi kot ribocimi

Za viroide iz družine Avsunviroidae, torej tudi za ELVd, je značilna ribocimska aktivnost, ki se kaže v njihovi sposobnosti samo-cepljenja (Fadda in sod., 2003). Ta lastnost se še bolj manifestira, če je ELVd minimalno sekvenčno spremenjen (mesto AUA je nadomeščeno z AUC ali GUC) (Carbonell in sod., 2006). Z ribocimi, ki izvirajo iz ELVd in PLMVd (Peach latent mosaic viroid, prav tako uvrščen v družino Avsunviroidae) so uspešno cepili viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd) na krajše RNA fragmente tako in vitro, kot tudi in vivo v modelni rastlini tobaka (*N. benthamiana*) (Carbonell in sod., 2011).

3.4 Uporaba manj patogenih variant viroidov za preprečevanje širjenja visokosimptomatskih variant

Že dlje časa je na primerih viroidov PSTVd, CChMVd (angl. chrysanthemum chlorotic mottle viroid) in PLMVd (angl. peach latent mosaic viroid) znano dejstvo,

da lahko okužba z manj patogeno varianto gostiteljski rastlini nudi zaščito pred bolj patogeno varianto istega viroida (Wu in Bisaro, 2024).

Nedavno sta Sun in Matsushita (2024) s pomočjo strojnega učenja z viroidom PSTVd razvila orodje s katerim lahko iz sekvenčnega zaporedja kateregakoli viroida napovejo resnost simptomov, ki jih bo povzročil pri neki gostiteljski rastlini. Poleg sekvenčnega zaporedja viroida, pa je potrebno upoštevati, da na njegovo infektivnost nezanemarljivo vpliva tudi njegova sekundarna struktura. Nie in sod. (2024) so s pomočjo in vitro proizvedenih transkriptov PSTVd preučili vpliv sekundarnih struktur na njegovo infektivnost. Ugotovili so da je, poleg pravilnega sekvenčnega zaporedja, tudi oblikovanje pravilne paličaste oblike PSTVd ključno za uspešno infekcijo modelne rastline *N. benthamiana*.

Predpostavljamo, da bi lahko strojno učenje uporabili za napovedovanje zaporedja viroida, ki v določeni rastlini, na primer pri hmelju, povzroča manj patogene simptome – kot je manj patogena varianta CBCVd. Pripravili bi in vitro transkripte, pri čemer bi upoštevali tudi, da se nastali transkripti oblikujejo v čim bolj naravno sekundarno strukturo. Eksperimentalno bi določili tako viroidno varianto, ki ne bi povzročala vidnih simptomov, vendar se še vedno učinkovito podvaja v rastlini. S tako izbrano varianto viroida bi poskusili pri gostiteljski rastlini (npr. hmelju) inducirati imunost na divji tip viroida.

3.5 Utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev

Utišanje genov s pomočjo virusnih ekspresijskih vektorjev (VIGS, angl. virus induced gene silencing) je metoda, ki je bistveno prispevala k funkcionalnim študijam genov pri številnih kmetijsko pomembnih rastlinah (Wang in sod. 2022). Ta tehnika temelji na manipulaciji virusnih genomov z deli DNA iz gostiteljskih genov, kar sproži utišanje komplementarnih genov gostiteljske rastline. Slabost te metode je, da virusni genomi vsebujejo zapise za več proteinov, ki lahko z vmešavanjem v endogene celične mehanizme motijo homeostazo rastline. Ta neželeni učinek omejuje funkcionalnost VIGS in spodbuja raziskovalce k iskanju alternativnih metod, ki bi bile manj invazivne (Marquez-Molins in sod., 2022).

V iskanju učinkovitejše metode utišanja genov so leta 2022 Marquez-Molins in sod. razvili novo tehniko utišanja genov, ki temelji na viroidih – najmanjših znanih avtonomno infektivnih nukleinskih kislinah, ki ne kodirajo proteinov. Viroidi zato s svojo majhnostjo in preprostostjo predstavljajo obetavno alternativo virusnim vektorjem.

V okviru te raziskave so Marquez-Molins in sod. (2022) uporabili genom viroida ELVd, ki je asimptomatičen viroid jajčevcev. Z namenom induciranja ciljnega utišanja specifičnih tarčnih genov v jajčevcu so v ELVd vstavili različne segmente RNA, dolge od 21 do 42 nukleotidov. Rezultati so pokazali, da lahko viroidi prenesejo tudi večje segmente zaporedij (42 nukleotidov), vendar je za stabilnost viroidnega genoma ključno ohranjanje njegove sekundarne strukture. Pokazali so, da so tako modificirane ELVd molekule sposobne povzročiti sistemsko okužbo in učinkovito utišati tarčne gene v jajčevcu, med drugim tudi gen PST, indikatorski gen za VIGS, ki ob utišanju povzroči značilen fenotip razbarvanja. Navdih za razvoj tega

pristopa so črpali iz zasnove umetnih mikroRNA (amiRNA, angl. artificial miRNA), kar je omogočilo razvoj enostavnega in standardiziranega postopka za vstavljanje stabilnih sekvenc v genom ELVd, ki so sposobne utišati specifične tarčne gene. Metodo so po vzoru VIGS poimenovali VdIGS: utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (angl. viroid induced gene silencing).

S to raziskavo se odpira novo poglavje v področju utišanja genov, ki temelji na viroidnih ekspresijskih vektorjih. Ortolá in Daròs v pregledni objavi iz leta 2023 priznavata VdIGS kot ključno orodje za razumevanje funkcij genov pri jajčevcu. Da je to področje resnično na začetku razvoja, priča tudi dejstvo, da do nastanka te pregledne objave v nam dostopni strokovni literaturi še nismo zasledili podobnih raziskav, ki bi temeljile na uporabi VdIGS za manipulacijo rastlin ali drugih organizmov. Menimo, da se lahko VdIGS v prihodnjih letih razvije v inovativno biotehnoško orodje za preučevanje funkcije genov in manipulacijo genov pri rastlinah in pripomore k izboljšanju našega razumevanja delovanja rastlin na nivoju celičnih in molekularnih mehanizmov. Potencial te metode sega daleč onkraj trenutnih aplikacij, saj lahko v prihodnosti prispeva k razvoju novih pridelkov z izboljšanimi lastnostmi, odpornostjo na bolezni ter prilagoditvijo na različne okoljske pogoje.

4 ZAKLJUČEK

Raziskave viroidov, ki so se začele z odkritjem viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd) leta 1971, so prinesle izjemen napredek na področju raziskav viroidov in biotehnologije. Skozi desetletja so raziskave viroidov vplivale na razumevanje molekularnih mehanizmov in spodbudile razvoj biotehnoloških orodij, kot so izolacija nukleinskih kislin, napovedovanje sekundarnih struktur RNA in raziskovanje krožnih RNA molekul. Poleg tega današnje, sodobne raziskave viroidov prispevajo k razvoju inovativnih in modernih biotehnoloških pristopov, kot je proizvodnja rekombinantnih RNA in utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (VdIGS).

Razvoj teh metod je šele na začetku, vendar že obljublja prebojna odkritja, ki bodo pripomogla k boljšemu razumevanju celičnih in molekularnih procesov ter prinesla pomembne prednosti tudi za prihodnje aplikativne raziskave in uporabo v kmetijstvu, biotehnologiji ter pri izboljšanju pridelkov in odpornosti na bolezni.

5 VIRI

- Beltrán, O. B., Urbaneja, A., Eiras, M., Pérez-Hedo, M., & Daròs, J. A. (2023). [RNAi-mediated silencing of Mediterranean fruit fly \(*Ceratitis capitata*\) endogenous genes using orally-supplied double-stranded RNAs produced in *Escherichia coli*](https://doi.org/10.1002/ps.7839). Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.7839>
- Carbonell, A., De la Peña, M., Flores, R., & Gago, S. (2006). [Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: Differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads](https://doi.org/10.1093/nar/gkl717). Nucleic Acids Research, 34(19), 5613-5622. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl717>

- Carbonell, A., Flores, R., & Gago, S. (2011). [Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: In vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA](#). *Nucleic Acids Research*, 39(6), 2432-2444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1051>
- Colpan, M., Schumacher, J., Brüggemann, W., Sanger, H. L., & Riesner, D. (1983). Large-scale purification of viroid RNA using Cs2SO4 gradient centrifugation and high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 131, 257–265.
- Consejo Superior De Investigaciones Científicas, & Universitat Politècnica De València. (2015). [Recombinant RNA production \(Patent No. WO2015177100A1\)](#). World Intellectual Property Organization. <https://patents.google.com/patent/WO2015177100A1/en>
- Cordero, T., Aragonés, V., & Darós, J. A. (2018). [Large-scale production of recombinant RNAs on a circular scaffold using a viroid-derived system in Escherichia coli](#). *Journal of Visualized Experiments* (141), e58472. <https://doi.org/10.3791/58472>
- Darós, J. A. (2016). [Eggplant latent viroid: A friendly experimental system in the family Avsunviroidae](#). *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1170-1177. <https://doi.org/10.1111/mpp.12358>
- Darós, J. A. (2016). [Viroids: Small noncoding infectious RNAs with the remarkable ability of autonomous replication](#). In A. Wang & X. Zhou (Eds.), *Current research topics in plant virology* (pp. 295–322). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2_13
- Darós, J. A., Aragonés, V., & Cordero, T. (2018). [A viroid-derived system to produce large amounts of recombinant RNA in Escherichia coli](#). *Scientific Reports*, 8(1), 1904. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>
- Diener, T. O. (1971). [Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA](#). *Virology*, 45(2), 11. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)
- Dong, K., Xu, C., Kotta-Loizou, I., Jiang, J., Lv, R., Kong, L., Li, S., Hong, N., Wang, G., Coutts, R. H. A., & Xu, W. (2023). [Novel viroid-like RNAs naturally infect a filamentous fungus](#). *Advanced Science*, 10(3), e2204308. <https://doi.org/10.1002/adv.202204308>
- Forgia, M., Navarro, B., Daghighi, S., Cervera, A., Gisel, A., Perotto, S., Aghayeva, D. N., Akinyuwa, M. F., Gobbi, E., Zheludev, I. N., Edgar, R. C., Chikhi, R., Turina, M., Babaian, A., Di Serio, F., & de la Peña, M. (2023). [Hybrids of RNA viruses and viroid-like elements replicate in fungi](#). *Nature Communications*, 14(1), 2591. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38301-2>
- Gómez, G., & Pallás, V. (2010). [Noncoding RNA mediated traffic of foreign mRNA into chloroplasts reveals a novel signaling mechanism in plants](#). *PLoS One*, 5(8), e12269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012269>
- Gómez, G., & Pallás, V. (2012a). [A pathogenic noncoding RNA that replicates and accumulates in chloroplasts traffics to this organelle through a nuclear-dependent step](#). *Plant Signaling & Behavior*, 7(7), 882-884. <https://doi.org/10.4161/psb.20463>
- Gómez, G., & Pallás, V. (2012b). [Studies on subcellular compartmentalization of plant pathogenic noncoding RNAs give new insights into the intracellular RNA-traffic mechanisms](#). *Plant Physiology*, 159(2), 558-564. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195214>
- Hammond, R. W., & Owens, R. A. (2006). [Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops](#). *APSnet Features*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>
- Jakšec, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matousek, J., & Javornik, B. (2015). [Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid \(CBCVd\) as a highly aggressive pathogen on hop](#). *Plant Pathology*, 64(1), 831–842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>
- Ma, J., Dissanayaka Mudiyansele, S. D., Hao, J., & Wang, Y. (2023). [Cellular roadmaps of viroid infection](#). *Trends in Microbiology*, 31(11), 1179-1191. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.05.014>
- Nie, Y., Zhang, Y., & Wu, J. (2023). [The secondary structure of potato spindle tuber viroid determines its infectivity in Nicotiana benthamiana](#). *Viruses*, 15(12), 2307. <https://doi.org/10.3390/v15122307>

- Ortolá, B., & Daròs, J. A. (2022). [Production of recombinant RNA in Escherichia coli using eggplant latent viroid as a scaffold](#). In A. L. N. Rao, I. Lavagi-Craddock, & G. Vidalakis (Eds.), *Viroids* (pp. 291-305). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1464-8_25
- Ortolá, B., Cordero, T., Hu, X., & Daròs, J. A. (2021). [Intron-assisted, viroid-based production of insecticidal circular double-stranded RNA in Escherichia coli](#). *RNA Biology*, 18(11), 1846–1857. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1872962>
- Palukaitis, P., Rezaian, A., & García-Arenal, F. (2008). [Satellite nucleic acids and viruses](#). In B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of virology* (3rd ed., pp. 526-535). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00500-8>
- Puchta, H., Ramm, K., & Sanger, H. L. (1988). [The molecular structure of hop latent viroid \(HLV\), a new viroid occurring worldwide in hops](#). *Nucleic Acids Research*, 16(10), 4197–4216. <https://doi.org/10.1093/nar/16.10.4197>
- Radišek, S., Majer, A., Jakše, J., Javornik, B., & Matousek, J. (2012). [First report of hop stunt viroid infecting hop in Slovenia](#). *Plant Disease*, 96(4), 592. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0640-PDN>
- Sasaki, M., & Shikata, E. (1977). [Studies on the host range of hop stunt disease in Japan](#). *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*, 53(3), 103–108. <https://doi.org/10.2183/pjab.53.103>
- Steger, G., & Riesner, D. (2018). [Viroid research and its significance for RNA technology and basic biochemistry](#). *Nucleic Acids Research*, 46(20), 10563-10576. <https://doi.org/10.1093/nar/gky903>
- Sun, J., & Matsushita, Y. (2024). [Predicting symptom severity in PSTVd-infected tomato plants using the PSTVd genome sequence](#). *Molecular Plant Pathology*, 25(7), e13469. <https://doi.org/10.1111/mpp.13469>
- Sun, L., & Hadidi, A. (2022). [Mycoviroids: Fungi as hosts and vectors of viroids](#). *Cells*, 11(8), 1335. <https://doi.org/10.3390/cells11081335>
- Volk, H. (2023). Ocena stabilnosti in dekontaminacije hmeljevih viroidov v laboratorijskih pogojih. *Hmeljarski bilten*, 30, 40-53.
- Wilusz, J. E. (2018). [A 360 degrees view of circular RNAs: From biogenesis to functions](#). *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(4), e1478. <https://doi.org/10.1002/wrna.1478>
- Wu, J., & Bisaro, D. M. (2024). [Potato spindle tuber viroid \(PSTVd\) loop 27 mutants promote cell-to-cell movement and phloem unloading of the wild type: Insights into RNA-based viroid interactions](#). *Virology*, 597, 110137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110137>
- Zheludev, I. N., Edgar, R. C., Lopez-Galiano, M. J., de la Peña, M., Babaian, A., Bhatt, A. S., & Fire, A. Z. (2024). [Viroid-like colonists of human microbiomes](#). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.01.20.576352>

POTENCIAL TEHNOLOGIJE SIGS ZA ZATIRANJE GLIVE *Verticillium nonalfalfae*

Taja JESENIČNIK¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 5. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 21. 10. 2024

Izvleček

Gliva *Verticillium nonalfalfae* je talni patogen hmelja (*Humulus lupulus* L.), ki povzroča bolezen verticilijsko uvelost, ki lahko ob pojavu visoko virulentnih izolatov v hmeljiščih popolnoma uniči pridelek. Nadzor bolezni je trenutno omejen zgolj na ustrezne fitosanitarne ukrepe ter vzgojo odpornih kultivarjev hmelja. S škropljenjem inducirano utišanje genov (angl. spray-induced gene silencing) ali strategija SIGS je tehnologija razvoja okolju prijaznih škropiv, ki temeljijo na uporabi dvoverzičnih RNA (dsRNA) ali malih RNA (sRNA), ki posredujejo tarčno utišanje genov v škodljivih organizmih. To vodi v znižano virulenco, slabšo rast ali celo propad škodljivca. Z namenom razvoja preparata SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalfae* smo z uporabo metode in vitro transkripcije sintetizirali dsRNA, katere tarčni komplementarni transkript je homolog gena kinaze TorA, ki je udeležena v osnovnih bioloških procesih, kot so biosinteza beljakovin, odziv na stres, celični cikel. Z in vitro inhibicijskim testom na gojišču smo dokazali, da lahko aplikacija nizkih količin čiste dsRNA zmanjša rast glive na petrijevi plošči, saj smo zabeležili od 18 do 37 % zmanjšan obseg rasti micelija glive. Omejujoči dejavnik pri aplikaciji SIGS je uspešen prevzem dsRNA iz okolja, ki se razlikuje med različnimi glivnimi vrstami, ki lahko zelo uspešno prevzemajo dsRNA molekule, medtem ko določene vrste čistih dsRNA sploh ne prevzamejo. Vnos dsRNA lahko povečamo z uporabo ustreznih nosilcev za dsRNA, kot so nanodelci, kar je naslednji korak pri razvoju preparata za zatiranje glive *V. nonalfalfae*.

Ključne besede: Interferenca RNA, SIGS, dsRNA, *Verticillium nonalfalfae*, hmelj

POTENTIAL OF SIGS TECHNOLOGY FOR SUPPRESSING THE *Verticillium nonalfalfae* FUNGUS

Abstract

The fungus *Verticillium nonalfalfae* (*V. nonalfalfae*) is a soil-borne pathogen of hops (*Humulus lupulus* L.), causing Verticillium wilt disease, that can lead to complete dyeback of plants, when highly virulent isolates appear in hop fields. Disease control is currently limited to appropriate phytosanitary measures and the cultivation of resistant hop cultivars. "Spray-induced gene silencing" (SIGS) is a technology for developing environmentally friendly pesticides with double-stranded

¹ Asist. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, e-naslov: taja.jesenicnik@bf.uni-lj.si

RNAs (dsRNA), that mediate targeted gene silencing in pests, leading to reduced virulence, slower growth, or even the death of the targeted pathogen. For the purpose of developing SIGS-based control of *V. nonalfalfae* we used in vitro transcription method to synthesize dsRNA, whose target complementary transcript is homologous to the kinase TorA gene, which is involved in essential biological processes, such as protein biosynthesis, stress response and cell cycle. In an in vitro inhibition test on growth media, we demonstrated that the application of low amounts of naked dsRNA can reduce the growth of the fungus on a petri dish where we detected 18 to 37 % reduction in mycelia growth. A limiting factor for the application of SIGS is the successful uptake of dsRNA from the environment, that varies strongly between different fungal species, from those who uptake large quantities of dsRNAs, to those who do not uptake any external dsRNAs. the dsRNA uptake can be enhanced by using appropriate carriers for dsRNA, such as nanoparticles, representing the next step in developing a formulation to control the fungus *V. nonalfalfae*.

Key words: RNA interference, SIGS, dsRNA, *Verticillium nonalfalfae*, hop

1 UVOD

Kmetijstvo se sooča s številnimi izzivi zaradi vse večje potrebe po zadostni pridelavi, ki izhaja iz naraščajočega števila svetovne populacije ter pojava škodljivih organizmov, ki povzročajo bolezni kulturnih rastlin. Ti organizmi, vključno z žužkami, glivami, virusi, bakterijami, ogorčicami in pleveli, lahko močno zmanjšajo količino in kakovost pridelka, kar neposredno ogroža prehransko varnost. Poleg tega tradicionalne metode zatiranja škodljivih organizmov, kot so kemični pesticidi, vse pogostejše ne zadostujejo zaradi razvoja odpornosti škodljivih organizmov in škodljivih vplivov na okolje (Lankinen in sod., 2024). Nedavna odkritja, kot je prenos molekul RNA med organizmi iz različnih kraljestev v interakcijah rastlina-škodljivi organizem, so omogočila razvoj sodobnih okolju prijaznih strategij za nadzor bolezni kmetijskih rastlin. Te metode izkoriščajo naravni mehanizem interference RNA, ki deluje med rastlinami, kjer modulira odziv na okužbo, in njihovimi škodljivimi organizmi, kar znatno prispeva h patogenosti (Rabuma in sod., 2022).

Interferenca RNA (RNAi) je evolucijsko ohranjeni mehanizem regulacije genov, ki specifično zavira izražanje genov. Deluje preko majhnih molekul RNA, ki se vežejo na specifične transkripte RNA (mRNA), kar preprečuje njihovo prevajanje v beljakovine (Agrawal in sod., 2003). Osnova utišanja izražanja genov so dvoverižne molekula RNA (dsRNA), ki jih prepozna ter cepi encim Dicer, ki jih pretvori v 20-25 nukleotidov dolge RNA, imenovane majhne interferenčne RNA (siRNA). Enoverižna siRNA se vgradi v kompleks za utišanje genov, katerega sestavni del je protein Argonavt, ki s svojo endonukleazno aktivnostjo cepi tarčni komplementarni transkript mRNA, kar vodi v njegovo razgradnjo ter posledično utišanje izražanja specifičnega gena (Sang in Kim, 2020). RNAi omogoča hitro in specifično uravnavanje bioloških procesov, kot so rast in razvoj organizmov, varuje integriteto genomov, saj nudi zaščito organizmov pred virusi in ponovljivimi elementi v

genomu, prav tako pa sodeluje v odzivih na biotske in abiotske spremembe v okolju ter v interakcijah med različnimi organizmi (Villalobos-Escobedo in sod., 2016). Mehanizem RNAi ima velik potencial v biotehnologiji in medicini, saj omogoča natančno raziskovanje funkcij genov in razvoj novih terapevtskih strategij za zdravljenje bolezni. Tehnologije, ki temeljijo na mehanizmu RNAi, predstavljajo močno orodje za napredek v kmetijstvu z zagotavljanjem natančnih in ciljno usmerjenih intervencij, ki lahko vodijo do bolj trajnostnih, produktivnih in odpornih kmetijskih sistemov. Še več, v zadnjih letih so se tehnologije RNAi izkazale kot izjemno pomembne in najprimernejše metode za učinkovito obvladovanje škodljivih organizmov, pa tudi za zaščito pred abiotskimi stres, kot so suša, slanost in ekstremne temperature (Bocos-Asenjo in sod., 2022).

Tehnologija SIGS (ang. spray-induced gene silencing) izrablja naravni mehanizem RNAi v škodljivem organizmu, kjer s foliarno aplikacijo eksogenih dsRNA ali siRNA dosežemo utišanje specifičnih genov v patogenu. Tovrstni pristopi ne vodijo v razvoj odpornosti ter so okolju prijazne in trajnostne alternative komercialnim fitofarmaceutskim sredstvom (Qi in sod., 2019). Sintetizirane biološko razgradljive molekule RNA imajo specifičen in selektiven učinek na posamezne škodljive organizme. Na tržišču je od nedavnega na voljo prvi tovrstni preparat, namenjen zatiranju koloradskega hrošča in povzroči propad več kot 82 % vseh ličink (Pallis in sod., 2023). Ključni korak v razvoju pripravka z dsRNA ali siRNA je identifikacija tarčnih genov v patogenih, katerih utišanje bo imelo negativne, celo smrtonosne učinke na škodljivi organizem, vendar brez učinkov na netarčne organizme, kot je gostiteljska rastlina. Sledi proizvodnja dsRNA ali siRNA molekul, kar je mogoče izvesti z in vitro transkripcijo z uporabo različnih komercialnih kompletov ali in vivo, večinoma z uporabo bakterijskih celic *Escherichia coli* (*E. coli*) celic kot produkcijskih enot (Hough in sod., 2022). S škropljenjem pripravkov lahko neposredno zatiramo škodljive organizme, prisotne na površini listov, ki prevzamejo učinkovino z dsRNA. Po drugi strani pa lahko dsRNA prevzamejo rastlinske celice, jih pretvorijo v majhne interferenčne RNA ter po modelu prenosa signalov med kraljestvi nato utišajo tarčne gene v patogenu, ki je v interakciji z rastlino (Cai in sod., 2019). Poleg uspešnega prevzema eksogenih dsRNA, ki je odvisen od škodljivca, je eden izmed najpomembnejših dejavnikov učinkovitosti tehnologije SIGS kratka razpolovna doba molekul RNA. Potrebno je zagotoviti, da dsRNA po nanosu ne razpadejo zaradi dejavnikov, kot so toplota, pH, UV svetloba, prisotnost encimov za razgradnjo RNA (Hough in sod., 2022) ter da se pripravek z dsRNA ne spere tekom postopka oziroma s padavinami (Hoang in sod., 2022). Obstaja več različnih načinov zaščite molekul dsRNA, ki celo pospešijo prevzem eksogenih dsRNA v celice. V uporabi so metode, ki temeljijo na vezavi dsRNA na biorazgradljive nanodelce ali enkapsulacijski sistemi, ki ovijejo dsRNA (Niño-Sánchez in sod., 2022).

Gliva *Verticillium nonalfalfae* je talna gliva rodu *Verticillium sensu stricto*, ki je povzročitelj vaskularne uvelosti pri številnih pomembnih kmetijskih rastlinah (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Gliva lahko v tleh preživi daljša obdobja v obliki melaniziranega trajnega micelija, ki kali ob prisotnosti koreninskih izločkov. Penetracijske hife okužijo korenine gostitelja, okužba pa se širi s kolonizacijo

ksilemskih žil, kar povzroči venenje prizadetih delov rastlin ali, v primeru hudih oblik bolezni, propad celotne rastline (Fradin in Thomma, 2006). Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je eden najbolj dovzetnih gostiteljev glive *V. nonalfalfae*, saj gliva povzroča izbruhe letalnih oblik bolezni v številnih hmeljarskih regijah v Evropi in drugod po svetu. Visoko virulentni patotipi povzročajo hude simptome verticilijske uvelosti hmelja, kar vodi v hitro propadanje rastlin, ki se hitro širi po celotnih hmeljiščih, povzroča obsežne izgube pridelka in vpliva na pridelavo hmelja več let (Radišek in sod., 2006). Do danes ni bil razvit noben specifičen način zdravljenja rastlin, okuženih z *V. nonalfalfae*. Obvladovanje bolezni temelji na vzgoji in gojenju odpornih sort hmelja, metodah sanacije tal ter zagotavljanju ustreznih fitosanitarnih ukrepov (Mahaffee in sod., 2009).

V okviru raziskave smo preverili potencial tehnologije SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalfae*. Uporabili smo pripravek z dsRNA, katere tarča je specifičen gen glive, da bi ovrednotili njegovo učinkovitost pri zaviranju rasti glive. Izvedli smo in vitro inhibicijski test, s katerim smo ocenili, ali in v kakšnem obsegu pripravke z dsRNA upočasnijo oziroma zmanjšajo rast *V. nonalfalfae*. Rezultati poskusa nakazujejo, da bi lahko tehnologija SIGS predstavljala inovativno in trajnostno rešitev za obvladovanje glive *V. nonalfalfae* v kmetijstvu.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izbor tarčnega gena

Z obsežno študijo literature, ki je temeljila na pregledu učinkov utišanja ali delecij genov na rast in patogenost različnih gliv, smo določili tarčni genski model v anotiranem genomu glive *V. nonalfalfae* VnT2_004162, ki je homolog proteina fosfatidilinozitol 3-kinaza TorA (TOR), katerega utišanje je v glivi *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) povzročilo letalne učinke na rast in preživetje glive. Protein TOR je udeležen v številnih osnovnih bioloških procesih, kot so biosinteza in razgradnja različnih beljakovin, odziv na stres, celični cikel, pa tudi v procesih v mitohondrijih, kot sta celično dihanje in presnova ornitina (Baldin in sod., 2015). katerega utišanje oziroma delecija ima pri sorodnih glivah letalne učinke (Baldin in sod., 2015). Proteinsko zaporedje tarčnega gena smo pridobili iz [podatkovne zbirke NCBI](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). S programskim paketom CLC Genomics Workbench (verzija 24.0.2) smo proteinsko zaporedje poravnali na anotiran genom glive *V. nonalfalfae* (neobjavljeno) ter na podlagi najvišje e-vrednosti ter pokritosti zaporedja identificirali genski model v genomu *V. nonalfalfae* kot homolog tarčnega gena. Zaporedje genskega modela (Slika 1) smo okarakterizirali s prosto dostopnim orodjem »[CD-Search](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)«, ki omogoča identifikacijo ohranjenih proteinskih domen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

[illegible]

Slika 1: Zaporedje eksona genskega modela VnT2_004162, ki je homolog kinazi TorA. Odebeljeno je označen del zaporedja, ki ne vsebuje ohranjenih proteinskih domen, ki smo ga uporabili za izdelavo začetnih oligonukletidov.

V naslednjem koraku smo s programskim paketom [Primer3](https://primer3.ut.ee/) (<https://primer3.ut.ee/>) izdelali par začetnih oligonukleotidov (smerni začetni oligonukleotid TOR_FOR CTTCAATTTCTTGTCGCGCT, obratno smerni začetni oligonukleotid TOR_REV GAAACCCAATTGCGCCTTGA) za pomnoževanje približno 200 bp dolgega odseka eksonske regije genskega modela, ki ne leži znotraj zaporedij ohranjenih proteinskih domen.

2.2 Izolacija in pomnoževanje in čiščenje DNA

Visoko kakovostno genomsko DNA smo izolirali iz protoplastov micelija izolata glive T2 *V. nonalfalae*, po protokolu Bagar in sod. (2009). Če povzamemo, micelij glive smo raztopili v pufru SP (0,8 % NaCl, 10 mM NaH₂PO₃, pH 6,0) in centrifugirali pri 700 rpm 5 minut. Protoplasti so bili pripravljani s tretiranjem micelija z 0,03 g/mL encimov za razgradnjo celičnih sten iz *Trichoderma harzianum* (Glucanex), raztopljenih v KMC pufru (1 M KCl, 25 mM CaCl₂, 10 mM MES, pH 5,8) 3,5 ure pri 30 °C. Protoplasti so bili zbrani s centrifugiranjem 5 minut pri 5000 rpm pri 4 °C in sprani z 1 mL STC pufra (1,2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 7,5). Nato smo DNA izolirali iz pridobljenih protoplastov po protokolu Moller in sod. (1992). DNA smo shranili v pufru TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 v 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Koncentracijo DNA smo določili z uporabo fluorometra r Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ZDA), kakovost DNA pa je bila ocenjena z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu po standardnih postopkih (Lee in sod., 2012). Izolirana DNA je bila shranjena pri – 20 °C.

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo izvedli s komercialnim kompletom FastGene® Taq DNA Polymerase (Nippon), po navodilu proizvajalca. V 50 µL reakciji PCR smo uporabili 200 ng izolirane genomske DNA ter 0,4 µM obeh začetnih oligonukleotidov. Začetni denaturaciji pri 95 °C 3 min je sledilo 35 ciklov pri 95 °C 30 sek, 60 °C 30 sek ter 72 °C 30 sek, čemur je sledilo končno pomnoževanje produktov pri 72 °C 10 min. Uspešnost pomnoževanja smo preverili z elektroforezo v 2 % agaroznem gelu po standardnih postopkih. Nato smo pomnožek PCR ustrezne dolžine izrezali iz gela ter ga očistili s komercialnim kompletom GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Cytiva), po protokolu proizvajalca.

2.3 Kloniranje produkta PCR ter transformacija bakterijskih celic

Odsek genskega modela, pomnožen v reakciji PCR, smo po navodilu proizvajalca vstavili v plazmidni vektor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). V standardni ligacijski reakciji smo uporabili 3 µL produkta PCR, 10 µL 2x ligacijskega pufra, 1 µL plazmidnega vektorja ter 1 µL ligaze T4. Ligacija je potekala čez noč na 4 °C.

Rekombinantne plazmidne vektorje smo vnesli v elektrokompetentne bakterijske celice *E. coli*, sev DH5α. Za transformacijo smo uporabili 50 µL na ledu odtaljene kulture celic, ki smo ji dodali 2 µL ligacijske reakcije, nato smo celice inkubirali na ledu 1 minuto. Mešanico celic *E. coli* in ligacijske reakcije smo s pipeto prenesli v ohlajeno kiveto. Sledila je transformacija z elektroporatorjem EasyjecT Prima (Equibio) pri 2.500 V za 5 ms. Mešanici smo dodali 950 µL tekočega Luria Bertani (LB) gojišča (L 1704, Duchefa) ter jih stresali eno uro na 37 °C in 120 rpm. Po 50, 100 in 150 µL bakterijskih kultur smo razmazali po trdnem gojišču LB (L 1706, Duchefa) ter plošče preko noči inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo bakterijske kolonije precepili v tekočega gojišča LB ter kulture preko noči gojili na 37 °C in 120 rpm.

2.4 Izolacija in linearizacija plazmidne DNA

Iz namnoženih transformiranih bakterijskih celic smo izolirali plazmidno DNA z uporabo komercialnega kompleta High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), po navodilu proizvajalca. Nato smo plazmidno DNA uporabili v dveh ločenih restrikcijskih reakcijah, ki sta vsebovali po en restrikcijski encim, da smo linearizirali plazmidno DNA. Uporabili smo restrikcijska encima Spel (NEB) ter NcoI-HF (NEB), pri čemer encim Spel reže dvo verižno DNA za mestom kloniranja, encim NcoI-HF pa pred mestom kloniranja. V 50 µL restrikcijskih reakcijah smo uporabili po 1000 ng plazmidne DNA ter 5 µL 10x restrikcijskega pufra cutSmart (NEB) in 1 µL restrikcijskega encima. Reakcije smo inkubirali na 37 °C 15 min, nato je sledila inaktivacija encimov na 80 °C 20 min. Uspeh linearizacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,4 % agaroznem gelu. Linearizirano plazmidno DNA smo očistili s komercialnim kompletom MEGAscript® Kit (ThermoFisher), po navodilu proizvajalca.

2.5 In vitro transkripcija in sinteza dsRNA

Plazmidno DNA, linearizirano z encimom SpeI, smo uporabili v reakciji in vitro transkripcije s komercialnim kompletom MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen), po protokolu proizvajalca. V reakciji smo uporabili 1000 ng linearizirane plazmidne DNA. Z encimom NcoI-HF linearizirano plazmidno DNA smo uporabili v drugi in vitro transkripcijski reakciji, kjer smo uporabili komercialni komplet MEGAscript™ SP6 Transcription Kit (Invitrogen), po priloženem navodilu. V reakcijo smo dodali 1000 ng linearizirane plazmidne DNA. Reakcije smo čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo vzorce tretirali z encimom TURBO DNase, ki je prav tako del komercialnega kompleta, da smo odstranili matrično plazmidno DNA. V obe in vitro transkripcijski reakciji smo dodali po 1 µL encima ter reakcije inkubirali na 37 °C 15 min. Nato smo pridobljene eno verižne RNA molekule očistili s komercialnim kompletom MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit (Invitrogen), po protokolu proizvajalca. Koncentracije sintetiziranih eno verižnih RNA smo določili s spektrofotometrom NanoVue (dDBioLab).

Očiščene eno verižne RNA, prepisane s polimerazo T7 ter SP6 smo razredčili na delovno koncentracijo 1000 ng/ µL (50 µL) ter združili enaka volumna obeh redčitev v novi mikrocetrifugirki. Nato smo vzorec v termobloku segreli na 95 °C ter ga postopno ohlajali do 4 °C (zniževanje temperature po eno stopinjo na minuto), pri čemer so se verige eno verižnih RNA povezale ter tvorile dsRNA. Tako pripravljene dsRNA, katerih tarča je izbrani genski model, smo uporabili kot pripravek za tretiranje glive po modelu SIGS.

2.6 In vitro test inhibicije rasti glive

Učinek dsRNA na rast glive smo preverili z in vitro inhibicijskim testom, kjer smo visoko virulentni izolat glive *V. nonalfalfae* T2 gojili na petrijevi plošči na trdnem gojišču Czapek Dox (45 g/L, Duchefa). Na več plošč smo po kapljicah dodajali različne količine dsRNA (500 ng, 1000 ng, 1500 ng in 2000 ng) ter na kapljico dodali 0,5 cm inokulum micelija visoko virulentnega izolata T2, ki smo ga izrezali s plutovrtom. Na ploščo smo inokulum micelija položili obrnjenega, da se je micelij dotikal raztopine dsRNA, v dveh bioloških ter treh tehničnih ponovitvah. V kontrolni skupini smo glivo gojili na gojišču brez dsRNA, kjer smo uporabili vodo. Kulture smo inkubirali na 25 °C v temi 10 dni. Deset dni po inokulaciji smo plošče s kulturami gliv fotografirali ter s prosto dostopnim programskim paketom [ImageJ](https://imagej.net/ij/) (<https://imagej.net/ij/>) izmerili premer in površino glivnih kultur ter določili obseg inhibicije rasti tretiranih kultur v primerjavi z netretiranimi.

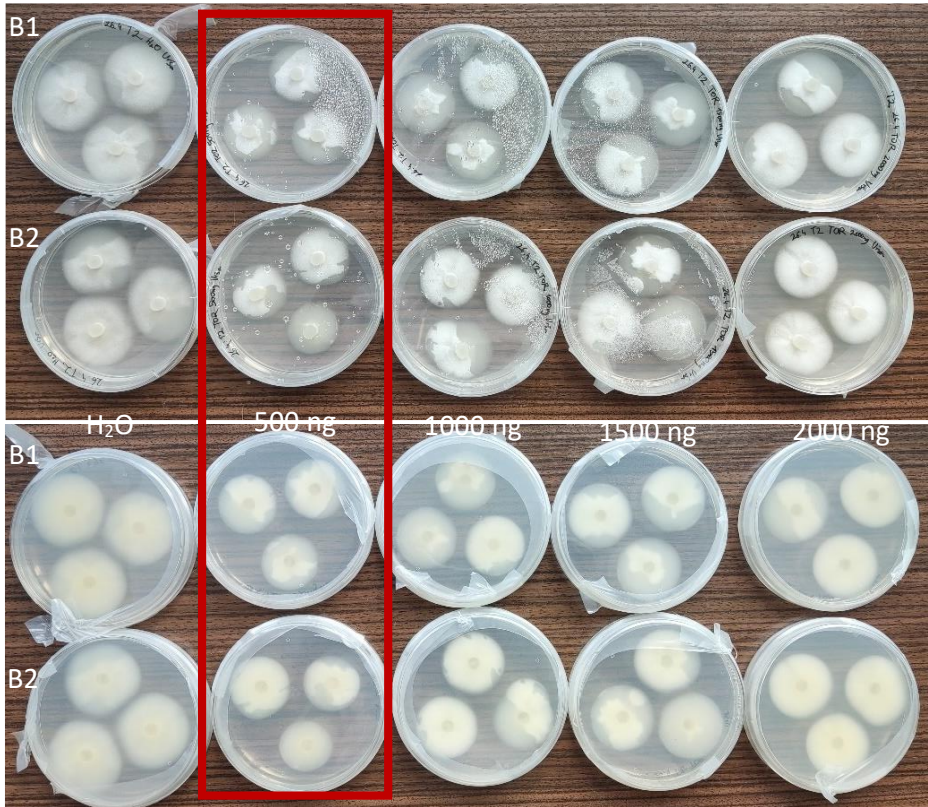
3 REZULTATI Z RAZPRAVO

V naši raziskavi smo na laboratorijskem nivoju preverili možnost tehnologije SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalfae*. Patogene glive namreč predstavljajo resno grožnjo pridelavi pomembnih poljščin, kot so riž, pšenica, koruza, soja ter korenovke in gomoljnice. Sodobno intenzivno kmetijstvo, ki temelji na genetsko uniformiranih rastlinah in uporabi kemičnih fungicidov, še dodatno spodbuja pojav novih, virulentnih in na fungicide odpornih sevov. Najpogosteje uporabljeni fungicidi, kot

so metil benzimidazol karbamati, strobilurini in azoli, imajo številne okoljske posledice, vključno z onesnaženjem tal in podtalnice ter škodljivimi učinki na netarčne organizme, kot so čebele (Rosa in sod., 2022). Ravno aplikacije tehnologije SIGS pa predstavljajo najobetavnejše orodje za učinkovit in okolju prijazen nadzor bolezni rastlin, ki sledi smernicam Evropske unije ter ne vključuje genskega spreminjanja rastlin. V SIGS preparatih uporabljene dsRNA imajo visoko specifičnost in so hitro razgradljive ter učinkovite že v nizkih količinah (Pallis in sod., 2023), kar jih skupaj z novimi strategijami dostave naredi primerne za sisteme preciznega kmetijstva (Das in sod., 2023).

V študiji smo preverili učinkovitost dsRNA, katere tarča je genski model VnT2_004162, ki je homolog kinaze TorA (TOR). Utišanje oziroma delecija gena TorA je povzročilo letalne učinke v glivi *A. fumigatus*. Po lastnem protokolu za sintezo dsRNA, ki vključuje kloniranje DNA ter *in vitro* transkripcijo, smo pridobili 243 bp dolgo molekulo dsRNA, ki je komplementarna genskemu modelu VnT2_004162 v regiji, ki ne obsega znanih ohranjenih proteinskih domen kinaze TorA in je zato specifična za glivo *V. nonalfalfae*.

V poskusu smo želeli določiti optimalno količino dsRNA TOR, ki zavre rast glive *V. nonalfalfae* v *in vitro* pogojih na plošči. Po 10 dneh gojenja tretiranih ter netretiranih kultur, ko smo še lahko jasno razločili posamezne kulture micelija glive treh tehničnih ponovitev na eni plošči, smo preverili rast glive ter določili, da je bil največji inhibicijski učinek na rast dosežen po tretiranju glive s 500 ng dsRNA (Slika 2), pri čemer so rezultati skladni med biološkima ter tehničnimi ponovitvami.



Slika 2: Rezultati in vitro inhibicijskega testa učinka različnih količin dsRNA na rast glive v primerjavi z netretiranimi kulturami (oznaka H2O). Izpostavljena je izbrana optimalna količina dsRNA, ki je v največjem obsegu zmanjšala rast glive na gojišču; B1 – 1. biološka ponovitev T2, B2 – 2. biološka ponovitev T2, vsaka biološka ponovitev je inokulirana v treh tehničnih ponovitvah na posamezno ploščo.

S programskim paketom ImageJ smo izmerili premer ter površino vseh tehničnih in bioloških ponovitev kultur izolata T2 ter izračunali obseg inhibicije rasti kot razliko med površino kulture, ki je bila tretirana z določeno količino dsRNA ter netretirano kulturo, ki je bila inokulirana na kapljico vode. V tabeli 1 so povzete povprečne meritve ter odstotek inhibicije rasti izolata T2 *V. nonalfalfae* po tretiranju z dsRNA.

Preglednica 1: Premeri in površine kultur ter odstotek inhibicije rasti izolata T2 na gojišču Czapek Dox po tretiranju z različnimi količinami dsRNA TOR

Vzorec	Količina dsRNA [ng]	Povprečen premer bioloških ponovitev [mm]	Povprečna površina bioloških ponovitev [mm ²]	Standardni odklon med ponovitvami [mm ²]	Odstotek inhibicije rasti [%]
T2	2000	36,9	1055,8	39,6	18,6

Vzorec	Količina dsRNA [ng]	Povprečen premer bioloških ponovitev [mm]	Povprečna površina bioloških ponovitev [mm ²]	Standardni odklon med ponovitvami [mm ²]	Odstotek inhibicije rasti [%]
T2	1500	36,7	1010,8	46,5	22,1
T2	1000	34,6	934,5	102,2	27,9
T2	500	32,1	808,6	100,5	37,7
T2	H2O	40,9	1297,0	58,5	/

Utišanje oziroma delecija kinaze TorA ima smrtonosne učinke na glivo *A. fumigates* (Baldin in sod., 2015). Ker smo v genomu glive *V. nonalfalfae* našli homologni genski model, smo podoben efekt pričakovali po tretiranju glive s sintetizirano dsRNA, ki pa ga z in vitro inhibicijskim testom nismo uspeli doseči. Največji delež inhibicije rasti je bil opažen pri kulturah gliv, ki so bile inokulirane na 500 ng dsRNA TOR, kjer je bila rast slabša za skoraj 38 % v primerjavi z netretiranimi kulturami. Povečevanje količine dsRNA ni imelo bistvenega učinka na rast glive, saj lahko opazimo, da je inhibicija rasti manjša oziroma celo najmanjša pri največji uporabljeni količini dsRNA (2000 ng). Menimo, da je omejujoči dejavnik pri uporabi dsRNA za zatiranje glive *V. nonalfalfae* prevzem čistih dsRNA iz okolja, saj je prav ta proces ključnega pomena in lahko močno omeji uporabo tehnologije SIGS za zatiranje specifičnih patogenov. Študija prevzema čistih dsRNA v celice različnih gliv je namreč dokazala, da se učinkovitost prevzema dsRNA med glivnimi vrstami močno razlikuje. Nekatere glive, kot je *Colletotrichum gloeosporioides*, ne morejo prevzeti dsRNA iz okolja, medtem ko imajo glive *Botritis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger* ter *Rhizobium solani* visoko učinkovitost prevzema RNA (Qiao in sod., 2021).

Poleg uspešnosti prevzema dsRNA pa je za razvoj preparata SIGS ključno, da imajo patogeni delujoč RNAi mehanizem. Gliva *V. nonalfalfae* vsebuje vse potrebne komponente delujočega mehanizma RNAi, to so Od RNA odvisna polimeraza RNA (RdRP), encimu Dicer podobna endonukleaza (DCL) ter protein Argonavt (AGO) (Jeseničnik in sod., 2019). DsRNA lahko v čisti obliki zaradi zunanjih dejavnikov hitro razpadejo oziroma so aktivne kratek čas (Qiao in sod., 2021), zato je, skupaj s specifično dsRNA, potrebno razviti tudi sistem za zaščito in stabilizacijo dsRNA oziroma ustrezno formulacijo, ki bo omogočala učinkovito in ciljno dostavo dsRNA. Ker gre za talno glivo, ki rastlino okuži preko korenin in se nato preko ksilema razširi po rastlini, je posebej pomembno, da formulacija omogoča ciljno dostavo v koreninski sistem oziroma zaščito dsRNA v tleh. Ena izmed možnosti je uporaba nanodelcev kot nosilcev čistih dsRNA, ki lahko povečajo celični prevzem dsRNA, izboljšajo UV-stabilnost ter adsorpcijo na površine in zagotovijo dolgoročno zaščito dsRNA (Rank in Koch, 2021). Po drugi strani pa lahko dostavo aktivne učinkovine zagotovimo tudi preko škropljenja nadzemnih delov gostiteljske rastline. Ko rastlinske celice pretvorijo dsRNA v sRNA, jih lahko izločijo v prevodni sistem, kjer pridejo v stik glivo. Rastlina preko svojega naravnega mehanizma RNAi ter

eksporta majhnih RNA omogoči, da sRNA dosežejo glivo, ki je prisotna v prevodnem sistemu. Ko sRNA vstopi v glivne celice, utiša specifične gene, ki so ključni za preživetje ali patogenost glive, s čimer prepreči nadaljnjo okužbo in propad rastline (Wang in Jin, 2017).

4 ZAKLJUČEK

Naša raziskava je preučila potencial tehnologije SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalae*, ki predstavlja grožnjo pomembnim kmetijskim pridelkom. Čeprav je utišanje gena TOR pri glivi *A. fumigatus*, povzročilo letalni efekt, podobnih rezultatov pri glivi *V. nonalfalae* nismo dosegli. Največji zaviralni učinek (38 %) smo opazili pri uporabi 500 ng dsRNA, vendar nadaljnje povečevanje količine dsRNA ni izboljšalo inhibicije rasti. Menimo, da je omejujoči dejavnik nizka učinkovitost prevzema dsRNA iz okolja, kar je ključno za uspešno uporabo tehnologije SIGS. Razvoj stabilnejših formulacij, na primer z uporabo nanodelcev, bi lahko povečal učinkovitost celičnega prevzema, izboljšal stabilnost in omogočil bolj ciljno usmerjeno zaščito pred patogeni. Na podlagi naših ugotovitev menimo, da ima tehnologija SIGS oziroma uporaba okolju prijaznih dsRNA zelo velik potencial za zatiranje glive *V. nonalfalae*, vendar je za uspešno uporabo SIGS potrebna optimizacija dostave in stabilnosti dsRNA, kar bomo v prihodnosti poskušali doseči z uporabo različnih vrst nanodelcev. Prav tako pa bomo s testi patogenosti na modelnih ter gostiteljski rastlini preverili tudi, ali je za uspešno obvladovanje glive *V. nonalfalae* dovolj zgolj znižana virulenca z uporabo dsRNA, ne nujno letalni efekt.

Zahvala. Avtorica se za finančno pomoč zahvaljujem Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077). Za podporo pri zasnovi poskusa se zahvaljujem prof. dr. Jerneju Jakšetu. Zahvala gre tudi dijakinjama Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana Baji Požar ter Lili Barborič ter študentki Urši Grohar za pomoč pri izvedbi poskusa.

5 VIRI

- Agrawal N., Dasaradhi P. V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K., Mukherjee S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67, 4:657-685.
- Bagar T., Altenbach K., Read N. D., Bencina M. Live-cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe. *Eukaryot Cell* 2009; 8: 703-712.
- Baldin C., Valiante V., Krüger T., Schafferer L., Haas H., Kniemeyer O., Brakhage A.A. Comparative proteomics of a tor inducible *Aspergillus fumigatus* mutant reveals involvement of the Tor kinase in iron regulation. *Proteomics* 2015; 15: 2230-2243.
- Bocos-Asenjo I. T., Niño-Sánchez J., Ginésy M., Díez J. J. New Insights on the Integrated Management of Plant Diseases by RNA Strategies: Mycoviruses and RNA Interference. *Int J Mol Sci.* 2022; 23, 16: 9236.
- Cai Q., He B., Weiberg A., Buck A. H., Jin H. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLoS Pathog.* 2019, 15, 12: e1008090.

- Das S., Ray M. K., Panday D., Mishra P. K. Role of biotechnology in creating sustainable agriculture. *PLOS Sustainability and Transformation* 2023; 2, 7: e0000069.
- Fradin E. F., Thomma B. P. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol* 2006; 7, 2: 71-86.
- Hoang B. T. L., Fletcher S. J., Brosnan C. A., Ghodke A. B., Manzie N., Mitter N. RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications. *Int J Mol Sci* 2022; 23, 12: 6639.
- Hough J., Howard J. D., Brown S., Portwood D. E., Kilby P. M., Dickman M. J. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 980592.
- Inderbitzin P., Subbarao K. V. Verticillium systematics and evolution: how confusion impedes Verticillium wilt management and how to resolve it. *Phytopathology* 2014; 104, 6: 564-74.
- Jeseničnik T., Štajner N., Radišek S., Jakše J. RNA interference core components identified and characterised in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops. *Sci Rep* 2019; 9, 1: 8651.
- Lankinen Å., Witzell J., Aleklett K., Furenhed S., Karlsson Green K., Latz M., Liljeroth E., Larsson R., Löfkvist K., Meijer J., Menkis A., Ninkovic V., Olson A., Grenville-Briggs L. Challenges and opportunities for increasing the use of low-risk plant protection products in sustainable production. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2024; 44, 21: 22 str.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012, 62:3923.
- Mahaffee W. F., Pethybridge S. J., Gent D. H. Compendium of Hop Diseases and Pests. American Phytopathological Society, APS Press, 2009: 93 str.
- Niño-Sánchez J., Sambasivam P. T., Sawyer A., Hamby R., Chen A., Czislawski E., Li P., Manzie N., Gardiner D. M., Ford R., Xu Z. P., Mitter N., Jin H. BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*. *J Integr Plant Biol.* 2022; 64, 11: 2187-2198.
- Pallis S., Alyokhin A., Manley B., Rodrigues T., Barnes E., Narva K. Effects of Low Doses of a Novel dsRNA-based Biopesticide (Calantha) on the Colorado Potato Beetle. *J Econ Entomol.* 2023, 116, 2:456-461.
- Qi T., Guo J., Peng H., Liu P., Kang Z., Guo J. Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. *Int J Mol Sci* 2019; 20, 1: 206.
- Qiao L., Lan C., Capriotti L., Ah-Fong A., Nino Sanchez J., Hamby R., Heller J., Zhao H., Glass N. L., Judelson H. S., Mezzetti B., Niu D., Jin H. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnol J* 2021; 19, 9: 1756-1768.
- Rabuma T., Gupta O. P., Chhokar V. Recent advances and potential applications of cross-kingdom movement of miRNAs in modulating plant's disease response. *RNA Biol.* 2022;19, 1:519-532.
- Radišek S., Jakše J., Javornik, B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Eur J Plant Pathol* 2006; 116: 301–314.
- Rank A. P., Koch A. Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications - How Far Are We? *Front Plant Sci* 2021; 12: 755203.
- Rosa S., Pesaresi P., Mizzotti C., Bulone V., Mezzetti B., Baraldi E., Masiero S. Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends Biotechnol* 2022; 40, 3: 320-337.
- Sang H., Kim J. I. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnol Rep* 2020; 14: 1–8.
- Villalobos-Escobedo J. M., Herrera-Estrella A., Carreras-Villaseñor N. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi. *Mycologia* 2016; 108, 3:556-571.
- Wang M., Jin H. Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends Microbiol.* 2017, 1:4-6.

REPRODUCTIVE POTENCIAL OF FEMALE EUROPEAN CORN BORER (*Ostrinia nubilalis* HBN.) - A USEFUL TOOL FOR BIOLOGICAL CONTROL IN HOPS (*Humulus lupulus* L.)

Magda RAK CIZEJ¹, Franček POLIČNIK² and Octave LACROIX³

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 11. 11. 2024

Sprejeto / Accepted: 10. 12. 2024

Abstract

The European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübner), ECB, is polyphagous. In Slovenia it causes the most damage to corn (*Zea mays* L.) and hops (*Humulus lupulus* L.) but it is also often found on vegetables (tomato, pepper) and ornamentals. ECB is a nocturnal moth whose flight can be effectively monitored using a classical light trap. Its population density varies from one microhabitat to another, depending on the presence of host plants. It is often difficult to predict the occurrence of the next generation based on the number of adult ECB caught. One method that can be used is to examine the fullness of the spermatheca – i.e. an ectodermal organ responsible for receiving, maintaining, and releasing sperm for egg fertilization – in female ECB caught in a classical light trap. We analysed 2 years of spermatheca fullness of ECB female and their population dynamic on two locations in Slovenia. Only in high ECB density field were we able to observe a correlation between peak of spermatheca fullness, adult flight peak and oviposition for the first generation of ECB.

Key words: Classical light trap, Degree Day model, *Humulus lupulus*, Lepidoptera, *Ostrinia nubilalis*, spermatheca

REPRODUKCIJSKI POTENCIAL SAMIC KORUZNE VEŠČE (*Ostrinia nubilalis* HBN.) – KORISTNO ORODJE ZA BIOTIČNO VARSTVO HMELJA (*Humulus lupulus* L.)

Abstrakt

Koruzna vešča (*Ostrinia nubilalis* Hübner) je polifagna vrsta, ki v Sloveniji povzroča največjo škodo na koruzi (*Zea mays* L.) in hmelju (*Humulus lupulus* L.). Pogosto jo najdemo tudi na vrtninah (paradižniku, papriki) in okrasnih rastlinah. Koruzna vešča je nočni metulj, zato za njeno učinkovito spremljanje uporabljamo klasično svetlobno vabo, ki zahteva vir električne energije. Ima preko 200 gostiteljskih rastlin. Gostota njene populacije se glede na prisotnost gostiteljskih rastlin

¹ PhD., Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS), e-mail: magda.rak-cizej@ihps.si

² MSc, IHPS, e-mail: franci.policnik@ihps.si

³ MSc, IHPS, e-mail: octave.lacroix@ihps.si

razlikuje na različnih mikrolokacijah. Velikokrat je težava napovedati glede na številčnost ulovljene odrasle populacije koruzne vešče, pojavnost naslednje generacije. Ena izmed metod, ki se je lahko poslužujemo je pregledovanje polnosti spermatek v ulovljenih samičkah, ki jih ulovimo s klasično svetlobno vabo. Spermateka je ektodermalni organ, odgovoren za sprejem, vzdrževanje in sproščanje spermijev za oploditev jajčec. V dvoletnem spremljanju smo analizirali stanje spermatek odraslih osebkov samic koruzne vešče in njihovo populacijsko dinamiko na dveh lokacijah. Pri spremljanju koruzne vešče v Žalcu in na Rojah pri Žalcu, kjer se pojavlja koruzna vešča smo lahko opazili korelacijo med vrhom polnosti spermatek, vrhom leta odraslih osebkov in odlaganjem jajčec prve generacije.

Ključne besede: *Humulus lupulus*, klasična svetlobna vaba, Lepidoptera, *Ostrinia nubilalis*, spermateka, vsota efektivnih temperatur

1 INTRODUCTION

The European corn borer (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hübner), is a species that feeds on a variety of agricultural and volunteer plants, which classifies it as a polyphagous pest. In Slovenia, it causes most damage to corn (*Zea mays* L.) and hops (*Humulus lupulus* L.), but is also commonly found on vegetables such as tomatoes and bell peppers, and on ornamental plants. The larva is responsible for the boring of the stem of its host, leading to the decay of the plant. Its presence in corn and hops in Slovenia has increased sharply over the last decade, resulting in a noticeable economic damage (Rak Cizej et al., 2010). ECB can harbor two strains (i.e., E and Z) (Anglade et al., 1984), told appart by a polytrophic pheromonal system (Pelozuelo et al., 2004). In central Slovenia, ECB is present with strain E on hops and corn. In addition to the two known strains, there are also three known ecotypes of ECB which differ in voltinism (univoltine, bivoltine and multivoltine ecotypes). In some areas, more than one ecotype and pheromone sex type occur sympatrically (Rak Cizej et al., 2010; Showers et al., 1976). Female fecundity is strongly correlated with species and ecotypes; females that have mated several times are much more fecund than those that mate only once (Fadamiro & Baker, 1999; Jiménez-Pérez et al., 2003). Eggs are usually deposited on the underside of leaves or directly on the fruit. In a healthy population, 95 % of fertile eggs hatch. Sex ratios are 1:1, and some authors have observed slight proterandry (i.e., males emerge a few hours or days before females) (Fadamiro & Baker, 1999).

Researchers also attribute the success of insect evolution to adaptations in the female reproductive organs. Female lepidopteran, ECB included, store the seminal fluid they obtain from the males in an organ called the spermatheca. The spermatheca is an ectodermal organ responsible for receiving, maintaining and releasing sperm to fertilise the egg. After mating, sperm migrate from the proximal part – i.e. the bursa copulatrix – of the female reproductive system, through the spermathecal duct into the spermatheca. Once the eggs are expelled from the ovary, the sperm repeats the journey and fertilises the eggs. The female genital system, including the spermatheca, is involved in the maturation or activation of

the sperm (Pascini & Martins, 2017). Pascini and Martins (2017) state that there is no correlation between the size of the spermatheca and the number of eggs laid by the female. Spermatheca volume was positively correlated with the number of eupyrene and apyrene sperm. However, the number of eggs hatched depended on the male with whom the female mated; fewer eupyrene sperm meant fewer hatched eggs (Muller et al., 2015).

Monitoring of nocturnal insects has been performed by the use of light traps for many years, proving its efficacy in population survey, and ECB in particular (Rak Cizej & Trematerra, 2017). Following of daily catch allow advisers and farmers to adapt their management methods to the current pest pressure of a field. Indeed, management methods such as *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) egg release is dependant of the presence of egg masses on leaves (Hoffmann et al., 2002, 2006; Mertz et al., 1995; Razinger et al., 2016). Eggs are laid by the ECB at ages 3 and 10 days. Researchers have also observed a five-day delay between the emergence of adults and their capture in light traps (Xingquan et al., 2004). Monitoring and surveying of ECB population and life stages can also be modelled thanks to the accumulation of average degree-days (DD) (Calvin & Song Ping Zhong, 1994; Ivezić et al., 2023; Maiorano, 2012).

In order to implement convenient and inexpensive practices in ECB oviposition forecasting, we have introduced spermatheca fullness evaluation in laboratory and population dynamic surveys in corn field in 2023 and 2024. After description of the variation of fullness of spermatheca and population of ECB over the two growing seasons and their offset with simplistic degree-day model (DD model, we aimed at connecting peak of spermatheca fullness, peak of adult flight and oviposition for ECB females.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Monitoring of the flight of the ECB with classical light trap in 2023 and 2024 at two locations, Roje pri Žalcu and Žalec

In 2023 and 2024, we monitored ECB in two locations in the hop-growing area Roje pri Žalcu (D48/GK; X:5123080, Y: 511464) and Žalec (D48/GK; X:122975, Y: 512459) with a classical light trap using a 160-W mercury (HBO) bulb. The bulb was lit at night from 9 p.m. to 6 a.m. The height of the classical light trap was 1 meter from the ground. The light trap was also equipped with a mechanism that adds 35 to 40 ml of chloroform in the evening (when the light is on) to stun the insects attracted by the light. The contents of the catch at the bottom of the trap were cleaned daily and identified in the laboratory. Chloroform was also added to the trap on a daily basis.

2.2 Weather data

Weather also plays a major role in the successful development of ECB from egg to imago. The combination of favourable temperatures (8.2 - 41.0 °C (Maiorano,

2012)), rainfall and, consequently, relative humidity, (70 - 80 %) enables the pest to mate successfully and a high proportion of eggs to develop successfully.

2.2.1 Year 2023

The year 2023 was a rather heavy rainfall year. 826.8 mm of precipitation fell between April and the end of September. The first decade of August is especially notable, with 49.2 mm of rainfall in just one day. A wet and warm weather in the second and third decades of July and early August, when the ECB lays its eggs, was observed.

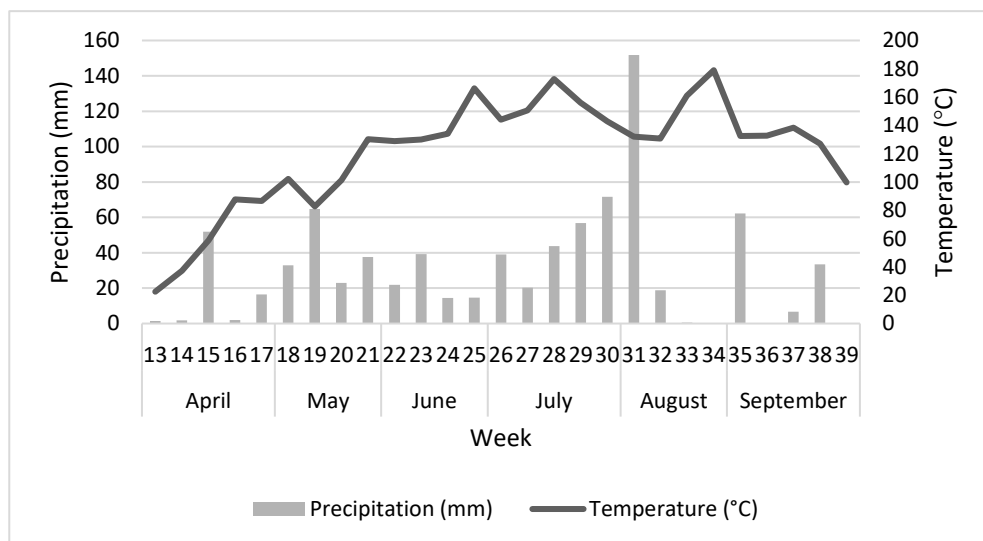


Figure 1: Data for temperature (°C) and precipitation (mm) by week from the beginning of April to the end of September in 2023, agrometeorological station of Žalec (Source: Agrometeorološki portal Slovenije, 2023).

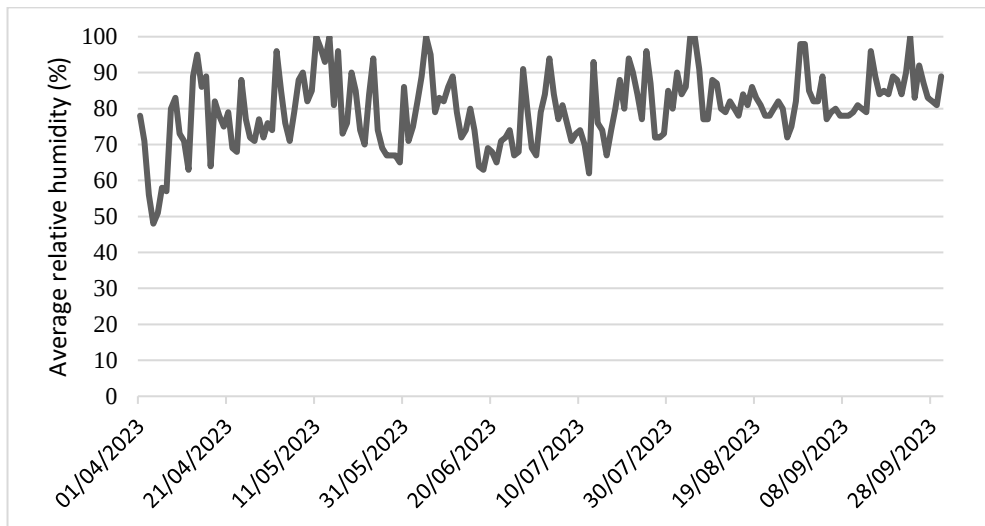


Figure 2: Average relative humidity data from the beginning of April to the end of September 2023, agrometeorological station of Žalec (Source: Agrometeorološki portal Slovenije, 2023).

2.2.2 Year 2024

The year 2024 was quite eventful from the beginning of April to the end of September. Total precipitation during this period was 739.6 mm. Most of the precipitation fell in the second decade of May, the second decade of July and the second decade of September.

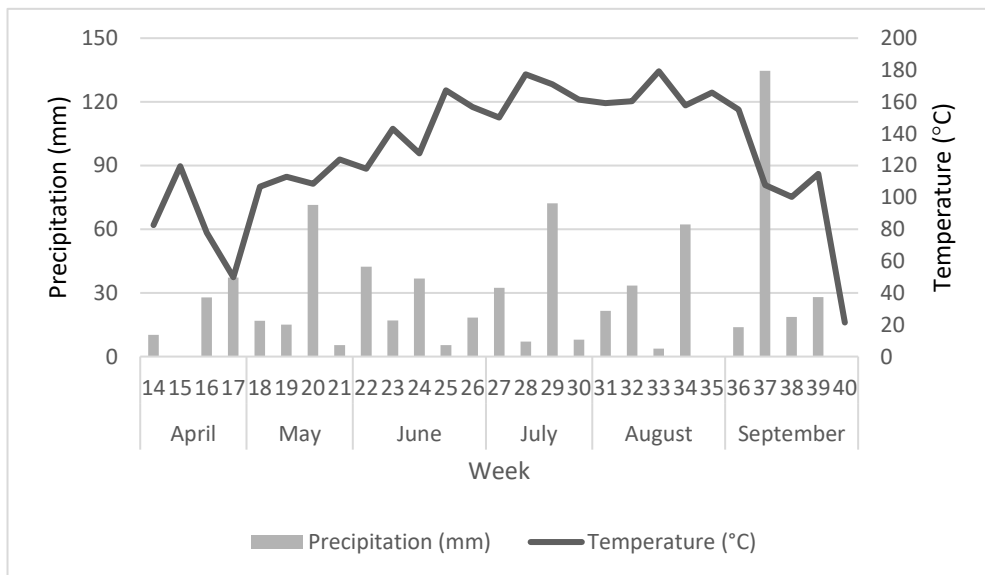


Figure 3: Data for temperature (°C) and precipitation (mm) by week from the beginning of April to the end of September in 2023, agrometeorological station of Žalec (Source: Agrometeorološki portal Slovenije, 2024).

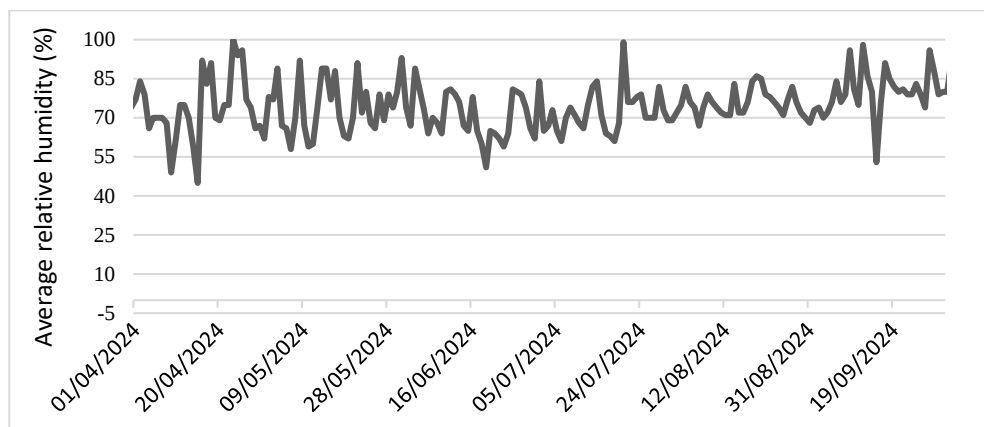


Figure 4: Average relative humidity data from the beginning of April to the end of September 2023, agrometeorological station of Žalec (Source: Agrometeorološki portal Slovenije, 2024).

2.3 Spermatheca examination

The contents of the catch from the light trap were then examined in the laboratory, where the sex of the captured ECB was determined. The females were stored in a prepared 10 % KOH solution. The stored females were then examined under a microscope for the presence of spermatophores in the bursa copulatrix of the female. Spermatheca fullness was determined as Empty when no spermatophore could be found, Half-full when one or more spermatophores were found but feeling only partially (10-70 % approximately). The spermatheca was determined as Full when one or more spermatophore were found feeling the entire spermatheca.

2.4 Degree-Day model

To predict the different life stages of ECB, we used a standard approach of the degree-day model averaging method accumulation (Arnold, 1960), with a base temperature of $T_{base} = 10^{\circ}\text{C}$ (Got et al., 1991; Ivezić et al., 2023), starting on 1st of January of 2023 and 2024:

$$D(d) = \frac{T_{max}(d) + T_{min}(d)}{2} - T_{base}$$

with

$$T_{min}(d) = T_{base}, \text{ if } T_{min}(d) < T_{base}$$

$$T_{max}(d) = T_{base}, \text{ if } T_{max}(d) < T_{base}$$

where $D(d)$ is the degree-day accumulated during the day d , $T_{min}(d)$ is the minimum temperature of the day, and $T_{max}(d)$ is the maximum temperature of the day (Maiorano, 2012). Values of accumulated degree-days (DD) necessary to reach the start of a life stage of ECB were taken from Bessin (2003) and translated from Fahrenheit to Celsius degrees.

3 RESULTS

3.1 Observation of spermatheca fullness

In 2023, the first ECB flight was recorded 9 and 11 days before the DD model estimate in Žalec and Roje pri Žalcu, respectively (Table 1). In 2024, the first ECB flight was this time delayed by 7 days compared with the DD model in Žalec, while in Roje pri Žalcu, the DD model estimated a first flight 2 days later than in the light trap (Table 2). Generations 1 and 2 are separated in 2023 by 45 and 47 days, and in 2024 by 34 and 45 days, at Žalec and Roje pri Žalcu, respectively. First female having full spermatheca is captured on average 7.3 days after first flight capture of ECB (shortest delay is 2 days, obtained in Žalec and Roje pri Žalcu for the 2nd generation in 2023, longest delay is 21 days, in Roje pri Žalcu for the 1st generation in 2023).

Table 1: Description of first occurrence of three life stages for modelled and caught ECB: adults, eggs and larvae of 1st and 2nd generation in 2023 in Roje pri Žalcu, according to date and accumulated degree-days (DD)

	Accumulated degree-days (DD) above 10 °C, 2023	
	Prediction of the occurrence of a stage - temperature threshold reached	Actual catch on classical light trap in Roje pri Žalcu
Start of the adult flight - 1st generation (last year's generation)	2.06.2023 (235 °C)	22. 5. 2023 (140 °C)
Emergence of 1st generation eggs	14.06.2023 (339 °C)	12. 6. 2023 (322 °C) (first female found with full spermatheca)
Emergence of 1st generation larvae	22.06.2023 (431 °C)	15. 6. 2023 (357 °C) (first larval record)
Emergence of 1st generation adults (usually referred to as 2nd generation)	31.07.2023 (906 °C)	8.7. 2023 (613 °C)
Emergence of 2nd generation eggs	7.08.2023 (969 °C)	10. 7. 2023 (641 °C) (first female found with full spermatheca)
Emergence of 2nd generation larvae	15.08.2023 (1043 °C)	21.07.2023 (810 °C)

Table 2: Description of first occurrence of three life stages for modelled and caught ECB: adults, eggs and larvae of 1st and 2nd generation in 2024 in Roje pri Žalcu, according to date and accumulated degree-days (DD)

	Accumulated degree days (DD) above 10 °C, 2024	
	Prediction of the occurrence of a stage - temperature threshold reached	Actual catch on classical light trap in Roje pri Žalcu
Start of the adult flight - 1st generation (last year's generation)	17.05.2024 (236 °C)	15. 5. 2024 (225 °C)
Emergence of 1st generation eggs	31.05.2024 (340 °C)	1. 6. 2024 (346 °C) (first female found with full spermatheca)
Emergence of 1st generation larvae	8.06.2024 (419 °C)	13. 6. 2024 (459 °C) (first larval record)
Emergence of 1st generation adults (usually referred to as 2nd generation)	17.07.2024 (909 °C)	29.6. 2024 (661 °C)
Emergence of 2nd generation eggs	22.07.2024 (976 °C)	6.07.2024 (741 °C) (first female found with full spermatheca)
Emergence of 2nd generation larvae	27.07.2024 (1040 °C)	24.07.2024 (989 °C)

3.2 Population dynamic and its relation to spermatheca fullness

Figure 5 shows the cumulative catch of ECB in two different locations in the years 2023 and 2024. A total of 957 (22 % of females) and 82 (26 % of females) adults, at Roje pri Žalcu and Žalec, respectively, for 2023; and 554 (24 % of females) and 208 (23 % of females), at Roje pri Žalcu and Žalec, respectively, for 2024. The low number of catches in Žalec in 2023 is due to the malfunctioning of the trap after 3rd of August caused by flooding. The first ECB capture in the light trap (adult flight for the 1st generation) is reached at 140 DD and 225 DD at Roje pri Žalcu in 2023 and 2024, respectively (Table 2 and 3), while the adult flight for the 2nd generation is captured at 613 DD and 661 DD, respectively. A one-week delay between 2024 and 2023 can be observed for the first ECB flight, as 2023 experienced colder temperatures and drier conditions in spring (Figure 1-4).

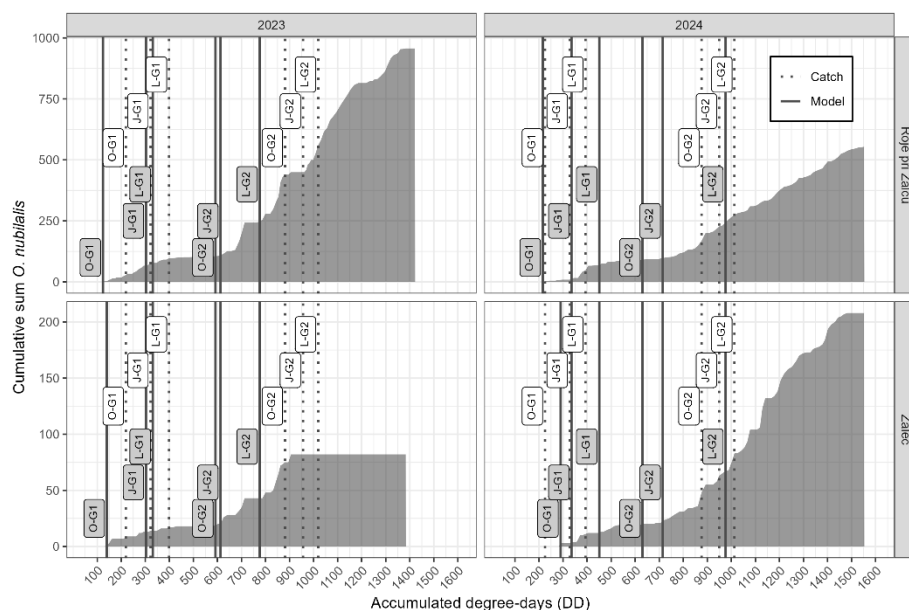


Figure 5: Occurrence of the individual developmental stages of the first and second generation of the ECB for the location Žalec and Roje pri Žalcu in 2023 and 2024 (O - G1 (1st generation adult), J - G1 (1st generation egg), L - G1 (1st generation larva), and G2 for 2nd generation individuals)

The peak capture of females with full spermathecae corresponds perfectly to the ECB flight peak in 4 of the 7 flight peaks (2 locations * 2 years * 2 generations per year (except one peak impossible to visualize)). The three unpaired flight peaks always occur for the second generation of adults, which also poorly matched the DD model estimates. 51.5 % and 12.7 % of overall captured female ECB had full and half-full spermathecae, respectively (Figure 6).

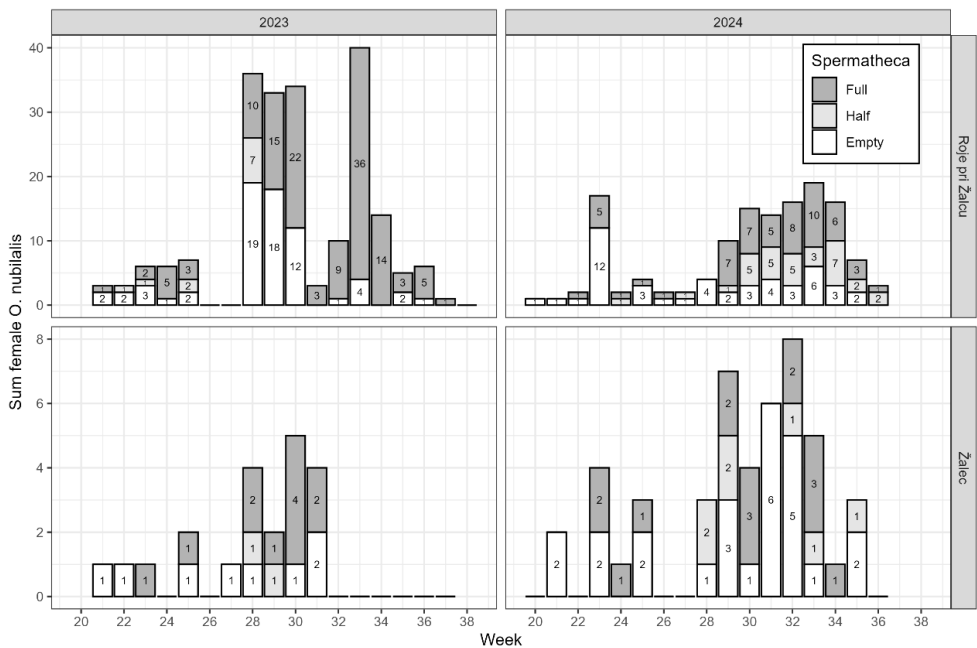


Figure 6: Weekly representation of the ratio of the number of full, half-full and empty female ECB spermathecae at locations Žalec in Roje pri Žalcu, in 2023 and 2024

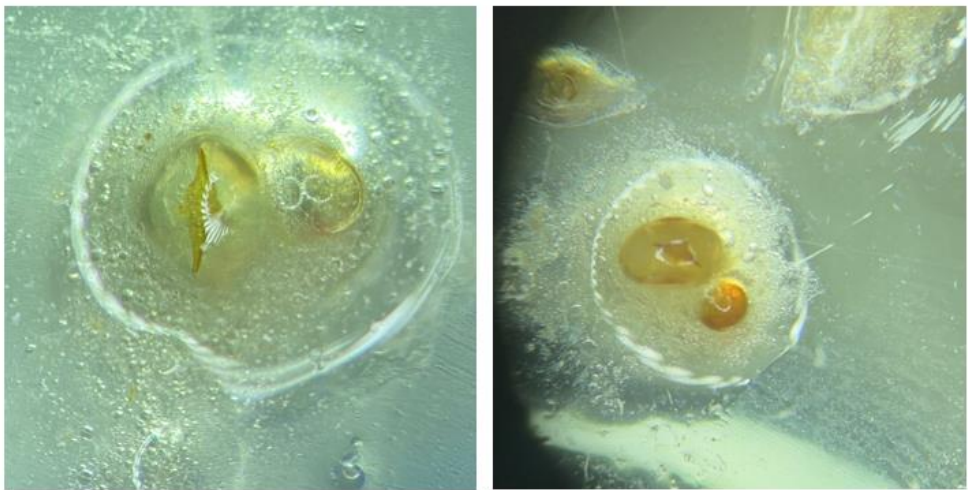


Figure 7: Left picture: Empty bursa copulatrix; right picture: Bursa copulatrix accumulated with spermatophores (Photo: M. Rak Cizej)

4 DISCUSSIONS

Spermatheca fullness status of female ECB during flight of first or second generation was successfully monitored with a daily checking of the content of the spermathecae of female. Location of the trap had a large influence on the number of captured female, however ratio of spermatheca fullness (Full:Empty spermathecae) was equivalent between Roje pri Žalcu and Žalec. Yet, peak of full spermatheca and peak of flight of adults of 1st and 2nd generation was easier to read when density of population was higher (i.e., Roje pri Žalcu). DD model estimates were reasonably matching our ECB catch (± 1 week) for their first generation. However, large delay was observed between model-estimated oviposition and the actual monitored ECB of the 2nd generation. Indeed, according to DD model, eggs are estimated to be laid 2 weeks earlier than our observation of full spermatheca peak. We can discuss that oviposition peak do not exactly match first laid eggs, however estimated and observed first flight for second generation was as well impacted by a 2-week delay in Roje pri Žalcu. As found by Ivezić et al. (2023), degree-day model does not always give a good estimation of the dynamic of population of ECB, with a high error of the estimated number of adults during the flight of the 2nd generation, due to numerous other factors (e.g., latitude, environment) (Onstad & Brewer, 1996).

In our results, we hypothesize that a full spermatheca found in the female is evidence of an upcoming oviposition period, as found by Showers et al. (1974). In their study, they described the mating status of females with an easy classification into 4 classes using spermatophores found in bursa copulatrix of ECB: Class 1 - unmated females, ovaries gravid; Class 2 - spermatophore full, ovaries gravid; Class 3 - spermatophore presumed partially sperm-depleted; and Class 4 - spermatophore presumed sperm-depleted, ovaries presumed egg-depleted. The authors found that a peak in egg-laying was observed precisely between the peak capture of class 2 females and class 3 females in light trap. However, for our study too, the peak capture of class 2 females (complete spermatophore) coincided with the peak capture of both male and female ECB, all classes combined, making the description of class or the study of spermatheca contents redundant.

In our study, we did not include the number of spermatophores found in bursa copulatrix, only spermatheca status (Empty, Half-full and Full). Yet, the number of spermatophores can be a valid indicator of mating success, fertility and fecundity rate of ECB. For ECB, Hinton and Andow (2003) found that 7.0 % to 15.1 % of captured females had more than one spermatophore (polyandry). Yet, higher fecundity (i.e., surface of egg mass) and fertility (i.e., number of hatched eggs) are observed in multiple-mated females than in single-mated ones (Fadamiro & Baker, 1999; Jiménez-Pérez et al., 2003). Spermatophore count is not the only relevant factor: five out of seven studies have shown an increase in fertility with increasing spermatophore size (Torres-Vila & Jennions, 2005). The males mating experience also seems to play a role, with female fecundity being higher when mating with virgin males. Indeed, subsequent spermatophores are smaller after the first mating (Jiménez-Pérez et al., 2003; Schlaepfer & McNeil, 2000). However, experienced males (3 matings or more) achieve higher mating success than virgin males,

despite a lower spermatophore volume (Schlaepfer & McNeil, 2000). In fact, the volume of ECB spermatophores decreases over time, resulting in lower fertility over the lifetime of successive partners of a given male (Royer & McNeil, 1993).

Here, for sake of simplicity we did not include the direct environment of the light trap. Yet, food resources are found to be highly relevant in the quality and quantity of spermatophores produced and exchanged. The amount of nitrogen in food, for example, has a positive impact on the lifetime fecundity of male and female ECB (Bonoan et al., 2015), and other lepidopterans (e.g., *Heliothis virescens* (Fabricius)) (Leahy & Andow, 1994). In organic corn and hop production, *Bacillus thuringiensis* (Bt) is often used as a method of controlling lepidopteran pests, particularly ECB. Crespo et al. (2010) showed that Bt-resistant adult ECB produced a smaller spermatophore volume and had a lower mating frequency, supporting the use of Bt also to reduce the potential for subsequent generations. We cannot therefore ignore that Bt treatments can have an impact on the study of the mating status of captured ECB. In a broader spectrum, climate change also has a negative impact on spermatophore production of lepidopteran (e.g., climate warming for the grape moth *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller) (Iltis et al., 2020)), which supposes a great impact on the mating status of ECB females that we have not taken into account here. However, impact should only be on the density of ECB population, which is not related to the forecast of oviposition period.

5 REFERENCES

- Anglade, P., Stockel, J., & I.W.G.O. Cooperators. (1984). [Intraspecific sex-pheromone variability in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. \(Lepidoptera, Pyralidae\)](#). *Agronomie*, 4(2), 183–187. <https://hal.science/hal-00884625v1>
- Arnold, C. Y. (1960). Maximum-minimum temperatures as a basis for computing heat units. *Proceedings. American Society for Horticultural Science*, 76, 682–692.
- Bessin, R. (2003). [Predicting European Corn Borer Development](#). University of Kentucky College of Agriculture, Entomology Web Page. <https://entomology.ca.uky.edu/ef106>
- Bonoan, R. E., Al-Wathiqui, N., & Lewis, S. (2015). [Linking larval nutrition to adult reproductive traits in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*](#). *Physiological Entomology*, 40(4), 309–316. <https://doi.org/10.1111/phen.12116>
- Calvin, D. D., & Song Ping Zhong. (1994). [Variability in Postdiapause Development Periods of Geographically Separate *Ostrinia nubilalis* \(Lepidoptera: Pyralidae\) Populations in Pennsylvania](#). *Environmental Entomology*, 23(2), 431–436. <https://doi.org/10.1093/ee/23.2.431>
- Crespo, A. L. B., Spencer, T. A., Yee Tan, S., & Siegfried, B. D. (2010). [Fitness Costs of Cry1Ab Resistance in a Field-Derived Strain of *Ostrinia nubilalis* \(Lepidoptera: Crambidae\)](#). *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1386–1393. <https://doi.org/10.1603/EC09158>
- Fadamiro, H. Y., & Baker, T. C. (1999). [Reproductive performance and longevity of female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: effects of multiple mating, delay in mating, and adult feeding](#). *Journal of Insect Physiology*, 45(4), 385–392. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00137-1)
- Got, B., Lacan, G., Smits, N., & Stephan, E. (1991). Validation d'un modèle de durée de développement larvaire de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hbn, Lepidoptera, Pyralidae, en France. *Agronomie*, 11, 45–57.

- Hinton, J. L., & Andow, D. A. (2003). [Mating frequency of European corn borer \(Lepidoptera: Crambidae\) in Minnesota, Kansas, and Texas](https://doi.org/10.22543/0090-0222.2089). The Great Lakes Entomologist, 36(3–4), 156–159. <https://doi.org/10.22543/0090-0222.2089>
- Hoffmann, M. P., Pitcher, S. A., Cheever, S. A., Gardner, J., Losey, J. E., Kuhar, T. P., Laub, C. A., & Youngman, R. R. (2006). [Efficacy of inoculative releases of Trichogramma ostriniae \(Hymenoptera: Trichogrammatidae\) against European corn borer Ostrinia nubilalis \(Lepidoptera: Crambidae\) in field corn](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.10.008). Biological Control, 36(3), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.10.008>
- Hoffmann, M. P., Wright, M. G., Pitcher, S. A., & Gardner, J. (2002). [Inoculative releases of Trichogramma ostriniae for suppression of Ostrinia nubilalis \(European corn borer\) in sweet corn: field biology and population dynamics](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00105-6). Biological Control, 25(3), 249–258. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00105-6](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00105-6)
- Ittis, C., Moreau, J., Pecharová, K., Thiéry, D., & Louâpre, P. (2020). [Reproductive performance of the European grapevine moth Lobesia botrana \(Tortricidae\) is adversely affected by warming scenario](https://doi.org/10.1007/s10340-020-01201-1). Journal of Pest Science, 93(2), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01201-1>
- Ivezić, A., Mimić, G., Trudić, B., Blagojević, D., Kuzmanović, B., Kaitović, Ž., & Petrović, K. (2023). [Development of a Predictive Model of the Flight Dynamics of the European Corn Borer, Ostrinia nubilalis Hübner, 1796 \(Lepidoptera: Pyralidae\), in the Vojvodina Region, Serbia—Implications for Integrated Pest Management](https://doi.org/10.3390/agronomy13061494). Agronomy, 13(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy13061494>
- Jiménez-Pérez, A., Wang, Q., & Markwick, N. (2003). [Remating Behavior of Cnephasia jactatana Walker Females \(Lepidoptera: Tortricidae\)](https://doi.org/10.1023/B:JOIR.0000018321.81949.25). Journal of Insect Behavior, 16(6), 797–809. <https://doi.org/10.1023/B:JOIR.0000018321.81949.25>
- Leahy, T. C., & Andow, D. A. (1994). [Egg Weight, Fecundity, and Longevity Are Increased by Adult Feeding in Ostrinia nubilalis \(Lepidoptera: Pyralidae\)](https://doi.org/10.1093/AESA/87.3.342). Annals of the Entomological Society of America, 87(3), 342–349. <https://doi.org/10.1093/AESA/87.3.342>
- Maiorano, A. (2012). [A physiologically based approach for degree-day calculation in pest phenology models: the case of the European Corn Borer \(Ostrinia nubilalis Hbn.\) in Northern Italy](https://doi.org/10.1007/s00484-011-0464-z). International Journal of Biometeorology, 56(4), 653–659. <https://doi.org/10.1007/s00484-011-0464-z>
- Mertz, B. P., Fleischer, S. J., Calvin, D. D., & Ridgway, R. L. (1995). [Field Assessment of Trichogramma brassicae \(Hymenoptera: Trichogrammatidae\) and Bacillus thuringiensis for Control of Ostrinia nubilalis \(Lepidoptera: Pyralidae\) in Sweet Corn](https://doi.org/10.1093/jee/88.6.1616). Journal of Economic Entomology, 88(6), 1616–1625. <https://doi.org/10.1093/jee/88.6.1616>
- Muller, K., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J. (2015). [Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild European grapevine moth \(Lobesia botrana\)](https://doi.org/10.1007/s00265-014-1815-7). Behavioral Ecology and Sociobiology, 69(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1815-7>
- Onstad, D. W., & Brewer, E. F. (1996). [Modeling Induction of Diapause in North American Ostrinia nubilalis \(Lepidoptera: Pyralidae\) Populations](https://doi.org/10.1093/ee/25.5.1140). Environmental Entomology, 25(5), 1140–1146. <https://doi.org/10.1093/ee/25.5.1140>
- Pascini, T. V., & Martins, G. F. (2017). [The insect spermatheca: an overview](https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.12.001). Zoology, 121, 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.12.001>
- Pelozuelo, L., Malosse, C., Genestier, G., Guenego, H., & Frérot, B. (2004). [Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer Ostrinia nubilalis in France](https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000017981.03762.ed). Journal of Chemical Ecology, 30(2), 335–352. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000017981.03762.ed>
- Rak Cizej, M., Kárpáti, Z., Leskošek, G., & Radišek, S. (2010). [Določitev rase koruzne večje \(Ostrinia nubilalis Hübner\) v Savinjski dolini](http://www.dlib.si). Hmeljarski Bilten, 17(1). <http://www.dlib.si>
- Rak Cizej, M., & Trematerra, P. (2017). Flight patterns of the European corn borer, Ostrinia nubilalis, in Slovenian hop gardens in 1999–2016. Bulletin of Insectology, 70(2), 299–305.
- Razinger, J., Vasileiadis, V. P., Giraud, M., Van Dijk, W., Modic, Š., Sattin, M., & Urek, G. (2016). [On-farm evaluation of inundative biological control of Ostrinia nubilalis \(Lepidoptera:](#)

- [Crambidae](#)) by *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in three European maize-producing regions. *Pest Management Science*, 72(2), 246–254.
<https://doi.org/10.1002/ps.4054>
- Royer, L., & McNeil, J. N. (1993). Male investment in the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): impact on female longevity and reproductive performance. In *Functional Ecology* (Vol. 7, Issue 2).
- Schlaepfer, M. A., & McNeil, J. N. (2000). [Are virgin male lepidopterans more successful in mate acquisition than previously mated individuals? A study of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* \(Lepidoptera: Pyralidae\)](#). *Canadian Journal of Zoology*, 78(11), 2045–2050.
<https://doi.org/10.1139/z00-147>
- Showers, W. B., Reed, C. L., & Oloumi-Sadeghi, H. (1974). [Mating Studies of Female European Corn Borers: Relationship Between Deposition of Egg Masses on Corn and Captures in Light Traps](#). *Journal of Economic Entomology*, 67(5), 616–619.
<https://doi.org/10.1093/JEE/67.5.616>
- Showers, W. B., Reed, G. L., Robinson, J. F., & Derozari, M. B. (1976). [Flight and Sexual Activity of the European Corn Borer](#). *Environmental Entomology*, 5(6), 1099–1104.
<https://doi.org/10.1093/ee/5.6.1099>
- Torres-Vila, L. M., & Jennions, M. D. (2005). [Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners?](#) In *Behavioral Ecology and Sociobiology* (Vol. 57, Issue 4, pp. 318–326). <https://doi.org/10.1007/s00265-004-0857-7>
- Xingquan, K., Calvin, D. D., Knapp, M. C., & Poston, F. L. (2004). [Female European Corn Borer \(Lepidoptera: Crambidae\) Ovarian Developmental Stages: Their Association with Oviposition and Use in a Classification System](#). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 828–835.
<https://doi.org/10.1093/jee/97.3.828>

SUPPLY CHANGES CAUSED BY PROPRIETARY HOP VARIETIES

Douglas MACKINNON¹ and Martin PAVLOVIČ²

Original scientific paper / Izvirni znanstveni članek

Arrived / Prispelo: 17. 10. 2024

Accepted / Sprejeto: 29. 11. 2024

Abstract

We used the Herfindahl-Hirschman Index (HHI) to evaluate changes of a hop industry concentration and global competitiveness related to the area and production changes in proprietary varieties of hops relative to public varieties. Using the HHI, the reduction of the land competitiveness in the U.S. hop industry due to increased proprietary variety acreage between 2000 and 2020 was analyzed. The HHI analysis of hop acreage and hop production illustrated that market concentration has risen rapidly between the year 2010 (0.0376 and 0.0729) and the year 2020 (0.4927 and 0.5394). This results in decreasing business competitiveness within the market during this period caused primarily by rapid proprietary variety acreage and production increases.

Key words: market concentration, hop varieties, intellectual property, prices

Lastniške sorte spreminjajo razmere v ponudbi hmelja

Izvilleček

Za analizo sprememb koncentracije kapitala v hmeljarstvu v povezavi z območji pridelave in spremembami v lastništvu sort hmelja (lastniške sorte – javne sorte) smo koristili Herfindahl-Hirschmanov indeks (HHI). Z uporabo HHI smo ovrednotili zmanjšanje podjetniške konkurenčnosti pridelave hmelja v ZDA zaradi povečanega deleža površin lastniških sortnih hmelja med letoma 2000 in 2020. HHI analiza površin in pridelave hmelja nakazuje, da je tržna koncentracija med letoma 2010 (0,0376 in 0,0729) in 2020 (0,4927 in 0,5394) hitro naraščala. Posledica tega je zmanjšanje poslovne konkurenčnosti na trgu v tem obdobju, predvsem zaradi hitrega povečanja deleža površin in pridelave lastniških sort hmelja.

Ključne besede: tržna koncentracija, sorte hmelja, intelektualna lastnina, cene

¹ PhD, MacKinnon Report. Hoppy, balanced and unfiltered, USA; e-mail:

doug@demackinnon.com

² Prof. dr., Slovenian Institute of Hop Research and Brewing and University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Sciences, e-mail: martin.pavlovic@ihps.si

1 INTRODUCTION

Hops (*Humulus lupulus* L.) are a perennial that grow vines requiring a trellis system capable of supporting the weight of the vines themselves as well as the many cones each vine may produce. Commercial production takes place in latitudes greater than 35 degrees in both the Northern and Southern Hemispheres. Hops, along with malt and water, are the basic raw materials used for beer production. The basic role of hops is to provide beer with a pleasantly bitter taste and a hoppy aroma (Pavlovič et al. 2011; Pavlovič, 2012; Štěrba et al. 2015; MacKinnon and Pavlovič, 2022). Between 2000 and 2020 the proportion of patented hop varieties increased. In the United States during that time, one variety development company, the Hop Breeding Company, grew to the point where its varieties enjoyed significant market share. The agglomeration of hop farms in the area of the Pacific Northwest (PNW) facilitates the exchange of information by reducing monitoring costs thereby increasing market transparency among participants (Gan and Hernandez, 2013). The increase of proprietary variety acreage and production has a causal effect upon hop prices (MacKinnon and Pavlovič, 2022). Tacit collusion results from competitors independently realizing their collective best interests to adjust prices or quantities (Devlin, 2007). The exchange of pest and disease related information including anticipated yields and current prices may lead to a similar outcome (Rees, 1993).

The United States Department of Agriculture (USDA) has collected and published statistical data regarding the U.S. hop industry since 1913. The publication of intellectual property (IP) necessitates the use of symbols for registered trademarks, unregistered trademarks, and copyright, (i.e. “®”, “™” and “©”) respectively, their ownership is publicly available. The USDA complies with these requirements. Proprietary variety ownership is publicly available through the U.S. Patent and Trademark Office (USPTO). The introduction of proprietary varieties, therefore, enabled the calculation of hop market share by acreage and production for the first time. Market share regarding sales of these varieties to brewers remained unavailable but was not important for calculating influence within the U.S. hop industry.

We used the Herfindahl-Hirschman Index (HHI) to measure changes in hop industry competitiveness by way of measuring market concentration. A similar methodological approach was used to measure market concentration in the airline industry (Johnston and Ozment, 2011). According to the 2020 U.S. Federal Register, HHI was used to evaluate the acquisition of the Craft Brew Alliance, Inc. (CBA) by Anheuser-Busch InBev SA/NV (“ABI”) and Anheuser-Busch Companies, LLC (“AB Companies”). The results of such analyses can provide insights into industry behavior. Markets with relatively high HHI values, market share inequality, and the presence of major firms were imperfectly competitive. Under such circumstances, market imperfections are vulnerable to exploitation (Rhoades, 1995).

The presence of IP introduced constraints into the market that had not previously existed. That affected planting decisions (Dixit and Stiglitz, 1977). Changes in

market concentration and price-cost margins can be used to determine the direction of competitiveness (MacAvoy, 1998). The greater degree of specificity, control and profit incentivized private hop breeding companies to invest further in the development of new intellectual property. Their owners are incentivized by the ability to protect and enforce their rights (Bugos and Kevles, 1992). Patent law also enabled IP owners to determine production and distribution via licensing agreements.

In 2020, Germany and the U.S. produced 38 and 39 percent of the global crop respectively so a comparison between the two hop producing countries was reasonable. The year 2020 represented peak proprietary in the United States with 70.19% of U.S. acreage and 73.44% of U.S. production regulated by some form of Intellectual property. Between 2009 and 2019, the annual farmgate value of American hops increased by 282% (USDA NASS, 2020). According to IHGC country reports of the International Hop Growers' Convention between 2009 and 2019, the 70 farmers in the Pacific Northwest (PNW) received approximately \$4.7 billion during that time, \$2.88 billion more than the \$1.87 billion the 1,087 German hop farmers received during the same period (MacKinnon and Pavlovič, 2019).

Between 1998 and 2020, USDA data reported U.S. proprietary variety acreage and production soaring from zero to over 70 percent. Publicly available information regarding proprietary variety ownership enabled us to calculate U.S. hop market share for the first time in history. One variety development company, the Hop Breeding Company (HBC), owned the varieties responsible for over 50 percent of U.S. acreage and production by 2020 (USDA NASS, 2020).

The objective of the study was to evaluate changes to hop industry area and production concentration and competitiveness with respect to the changes in proprietary varieties of hops relative to public varieties. Using the Herfindahl-Hirschman Index (HHI), the reduction of the land competitiveness in the U.S. hop industry due to increased proprietary variety acreage between 2000 and 2020 was quantified. This research analyzed publicly available industry data to determine the market effects resulting from the increased use of branded proprietary varieties by the craft brewing industry during this time and compared it with other periods possessing unique characteristics dating back to 1948.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Proprietary hop variety supply and market share

The United States Department of Agriculture list each branded proprietary variety together with their respective intellectual property symbols in their publications (Comi, 2020). The details of patents and trademarks are public information. By tracking the ownership of these varieties in patent and trademark records with the U.S. Patent and Trademark Office (USPTO) and through the Google Patent Search web site, we discerned the influence of individuals and entities over proprietary varieties. Data reported by the USDA included season average prices (SAP), inventory levels, production and acreage. Wright and Williams (USDA NASS, 2022)

suggest that when supply is elastic and demand inelastic (as is the case with hops), the accumulation of stocks is typically damped by a compensating production response. The hop industry suffers from something called the Delayed Surplus Response (DSR). Production is highly elastic when prices and demand increase, but there is a delay of several years when prices and demand decrease. This results in surplus production that negatively effects global prices for hops through recurring boom-and-bust cycles (Wright and Williams, 1982). Data published by the USDA enabled us to calculate the accumulation of aggregate stock levels and the annual market share of acreage by variety. We restricted our research to USDA National Hop Report (NHR) data between 1998-2022. That represented the period during which branded proprietary varieties were first reported by the USDA and included the most recently available industry data at the time of our calculations.

The companies that developed proprietary hop varieties own and license the production of multiple proprietary varieties to growers (for production) and sales and distribution of those varieties to merchants in their supply chain, thereby facilitating the management of production and distribution. We calculated the percentage for each proprietary variety produced within the Pacific Northwest (PNW) by the total acreage for the PNW i.e. the total market share. We calculated market share for each entity owning IP listed by the USDA NASS in the USDA National Hop Report (NHR) by grouping those with common ownership of patented and trademarked products (Comi, 2020).

We expanded the variety specific acreage market share calculations to group those varieties together that share common ownership to get a better picture of the influence of the five largest variety development companies. One company, the Hop Breeding Company LLC (HBC) enjoyed increased influence within the industry as its proprietary varieties increased to occupy 51% of acreage in the PNW. According to the [company's web site](http://www.hopbreeding.com) (www.hopbreeding.com), it is a joint venture between John I. Haas, Inc., a hop merchant company, and Yakima Chief Ranches LLC, a company owned by the Smith, Carpenter and Perrault families. These three families are also shareholders of Yakima Chief Hops Inc., a hop merchant company. This complicated ownership structure effectively created a duopoly through which the proprietary varieties of the HBC were processed and distributed. They were used to create a competitive advantage for the shareholders of the HBC and their other companies. These varieties were distributed worldwide via licensing agreements with select merchants. The influence over such substantial acreage afforded the individuals involved with the HBC a disproportionate amount of influence in the industry. Their patents enabled them to decide via licensing agreements who would produce and sell their varieties. The MacKinnon Report, a hop market report published on Substack.com detailed that in 2023 the patent owners must reduce proprietary variety acreage by as much as 8,328 acres (3,371 ha.) in response to a massive surplus that began in 2016. Those decisions have the power to make farms lose economies of scale. Some will be less efficient producers and not able to compete in the future market.

2.2 Calculating HHI

We used the Herfindahl-Hirschman Index (HHI) to evaluate changes to hop industry concentration and competitiveness with respect to the changes in proprietary varieties of hops relative to public varieties. A significant portion of PNW acreage, 7.54% according to USDA figures, were reported in two aggregate categories called “other” and “experimental”. The categories are used to report acreage and production for varieties that do not meet the three-independent-grower threshold set by the USDA. Based on historical data, we believe at least half of this acreage was proprietary.

The HHI is a method used also by the United States Department of Justice (USDOJ) to measure market concentration during mergers or acquisitions, to evaluate one competitor’s position relative to another and to uncover potentially anti-competitive practices. The HHI values of zero to 0.1500 mean a low market concentration. Values of 0.1500 to 0.2500 are considered moderate concentration. Values of 0.2500 and above count as high concentration. The HHI value will be low when market shares among participants are equal. The value will be high when one firm has a disproportionate share of the market (Anon., 2019). The value of the HHI decreases as the number of firms in the market increases. Market concentration is inversely proportional to competitiveness (Depken, 1999). The HHI is responsive to asymmetry of market shares and is used to evaluate changes in the competitiveness within a single industry over time or comparisons of one industry to another (Calkins, 1983). In our research we adopted this method for the first time in the hop industry for the measurement of its market concentration.

The HHI Formula

$$HHI = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \dots + S_n^2$$

Where:

- n refers to the number of varieties in the market
- S refers to the percent market share for a variety

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Acreage and production linked to proprietary hop varieties

Calculating the Herfindahl-Hirschman Index (HHI) of the U.S. hop industry based on the market share of hop sales to brewers was a hopeless endeavor as information regarding market share based on sales of hops by merchants to breweries was proprietary information and never shared. We discovered an alternative method for measuring market share. The USDA NASS restrictions related to the reporting of proprietary U.S. acreage and production (i.e. that three or more independent producers must list acreage or production for the corresponding statistics to be reported in aggregate form) to meet the needs of this research.

Acreage, and the infrastructure necessary to harvest that acreage, was the scarcest and most valuable commodity in the hop industry in 2020, not the hops

themselves. Acreage was the asset for which there was the greatest competition. The primary method for harvesting hops was via fixed picking machine facilities. Mobile combines exist that harvest cones from the vines in the field. Combines, when they were used, operated in conjunction with the more traditional fixed picking facilities that could process at least 600 acres (242 hectares) of hops in a season. Combines returned cones harvested in the field to the picking facility to separate leaves, twigs and foreign material from the cones themselves through the picking facility's recleaning equipment. Due to the time-sensitive nature of harvest, high ambient air temperatures, which could reach over 100 degrees Fahrenheit (37,78 degrees Celsius) in Washington and Idaho states during harvest, hop growers sought to grow hops on land that was in proximity (not more than 10-15 minutes driving time) to their fixed picking facilities to reduce the possibility of the hops drying en route to the picking facility.

Five companies such as HBC, Simon H. Steiner Hopfen, ADHA, VGF and CLS Farms covered approximately 70 percent of U.S. hop acreage and production in the Pacific Northwest in 2020 (Comi, 2020). These variety development companies can license hop merchant companies to sell their proprietary varieties. They can license hop farms to produce their varieties. In some cases, the variety development company ownership and the licensed merchants and farms shared had common ownership, but licenses extended beyond their ownership transforming previously independent farms into contract growers. The decision makers for the five largest variety development companies therefore enjoyed a disproportionate influence in the industry and upon the market. The acreage on which a company's proprietary varieties were produced represented the market share of influence of the owners of each variety development company. The market share of influence represented a new and significant measurement possible within the industry all made possible by the growing demand for and reporting of proprietary varieties of hops.

Calculating the market share for each ownership group based on their ownership of proprietary hop varieties enabled the calculation of the market share of influence over the scarcest resource in the hop industry, acreage. Branded proprietary varieties are products that enjoy monopoly control by their very nature as patented and trademarked products. Seventy percent of the acreage, therefore, was governed by the decision makers of five entities. Public varieties, on the other hand, are available for any grower to produce.

We calculated the market share for each proprietary variety production and acreage relative to total U.S. acreage for the years 2000 through 2020. During this time, market concentration moved from low to high according to the standards set by the U.S. Department of Justice when evaluating mergers and acquisitions between competitors. Higher market concentration as represented by higher HHI values are inversely proportional to the degree of competitiveness in the market, we can visualize the decreases in competitiveness.

Using the HHI market share data by variety, we calculated the market share for all proprietary varieties collectively as the U.S. hop industry resembles what is referred to as a complex monopoly in the U.K. (Depken, 1999). Using these data and the

HHI, we calculated the increase in market concentration between 2000 and 2020 of publicly reported U.S. proprietary hop varieties. The increasing HHI values between 2000 and 2020 demonstrated the changes in the degree of competitiveness in the industry (Table 1).

Table 1: HHI Values for U.S. Total Proprietary Varieties by Acreage and Production 2000 – 2020

Crop Year	HHI Values for Proprietary Varieties by Acreage	HHI Values for Proprietary Varieties by Production
2000	0.0376	0.0729
2001	0.0900	0.1474
2002	0.0961	0.1709
2003	0.0755	0.1416
2004	0.0898	0.1586
2005	0.0904	0.1425
2006	0.0948	0.1791
2007	0.1200	0.2100
2008	0.1533	0.2441
2009	0.1642	0.2593
2010	0.1393	0.1903
2011	0.1496	0.2050
2012	0.1149	0.1618
2013	0.2024	0.2882
2014	0.1822	0.2700
2015	0.1841	0.2500
2016	0.1832	0.2292
2017	0.2661	0.3170
2018	0.3094	0.3628
2019	0.4058	0.4371
2020	0.4927	0.5394

The U.S. proprietary hop varieties used to calculate market concentration relative to public varieties between 2000 and 2020 listed in alphabetical order: Ahtanum™, YCR 1, Amarillo® VGXP01, Apollo™, Azacca™ ADHA-483, Bravo™, Calypso™, Chelan®, HBC 394, Columbus/Tomahawk®/Zeus (AKA: C/T/Z®), Ekuanot™, HBC 366, El Dorado®, Eureka™, IDAHO 7™, Idaho Gem™, Jarrylo™, ADHA-881, Loral™, HBC 291, Millennium®, Mosaic®, HBC 369, Pahto™, HBC 682, Palisade®, YCR 4, Pekko™, ADHA-871, Sabro™, HBC 438, Simcoe®, YCR 14, Strata™ OR 91331,

Summit [™], Super Galena [™], Talus [®], Warrior [™], YCR 5, Zappa [®] (own study based on (USDA NASS, 2020).

The HHI analysis demonstrates that the market concentration due to the increasing proportion of proprietary varieties rose from low to moderate concentration between 2000 and 2010. It remained in the moderate zone until 2016 when it rapidly began to increase through 2020 as if a tipping point had been reached (Figures 1 and 2). Official government data documented that in 2017 proprietary varieties represented greater than 50% of U.S. hop acreage (USDA NASS, 2020).

3.2 Prices of hops linked to the intellectual property

In the measurement of the effects on price over time, it was necessary to adjust for inflation. No appropriate Producer Price Index existed that could be applied to the U.S. hop industry. Therefore, we decided to use the Consumer Price Index (CPI) as it reflects changes in the economy and the purchasing power of a U.S. dollar over time. Vermeulen (2012) suggests that U.S. producers adjust their prices as often as retailers. This suggested that the use of the CPI for adjusting prices for inflation would be an appropriate strategy.

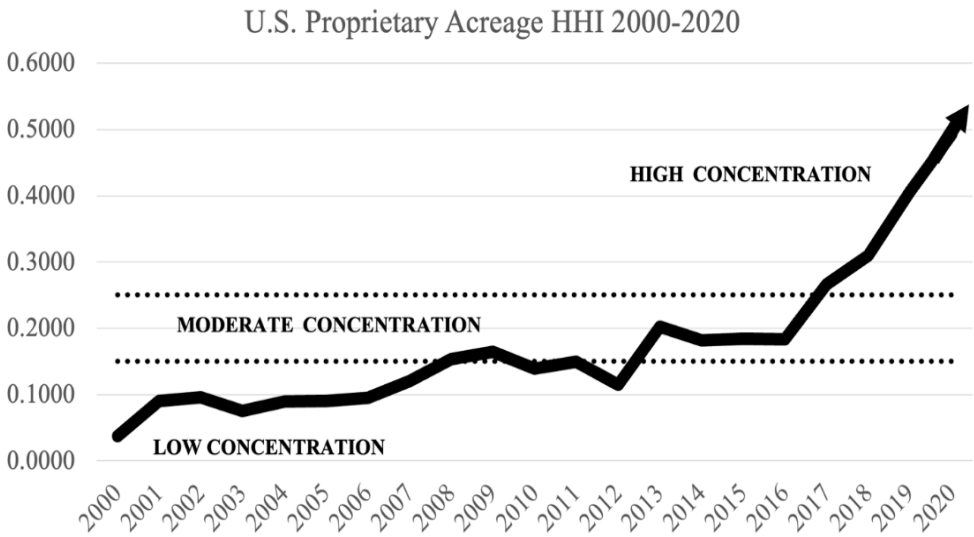


Figure 1: The HHI for total U.S. branded proprietary variety acreage 2000-2020 (own study based on (USDA NASS, 2020))

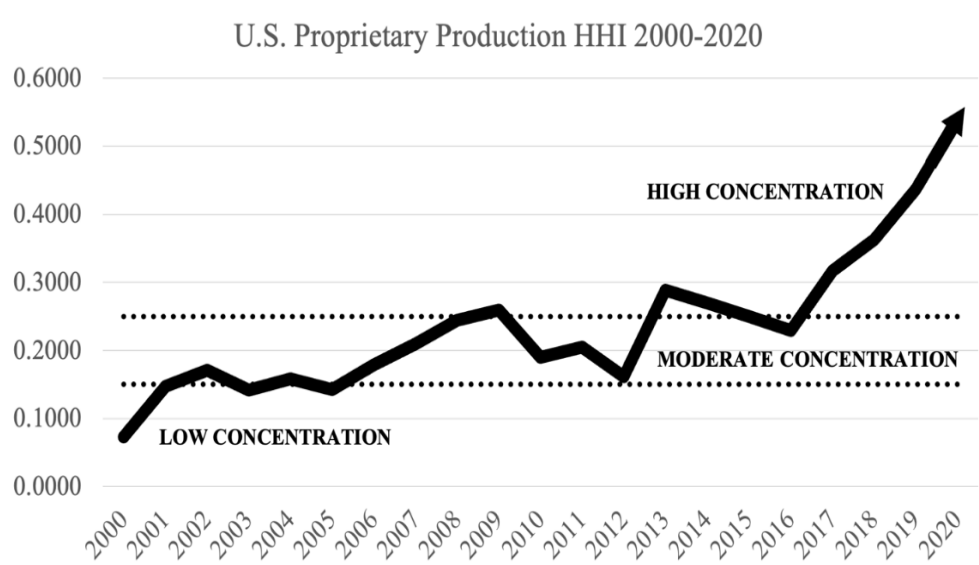


Figure 2: The HHI for total U.S. branded proprietary variety production 2000-2020 (own study based on (USDA NASS, 2020))

U.S. season average prices for hops as reported by the USDA have been affected by the tipping point achieved when acreage and production of proprietary varieties surpassed 50%. Prices when adjusted for inflation rose rapidly following 2016. The rapidly increasing HHI values post 2016 represented rapidly decreasing competitiveness. Reduced competitiveness was both a symptom and a consequence of the predominance of monopolistic products where five entities captured 70% market share. Rhoades (1995) concluded that the results of such analyses can yield useful insights into industry behavior. Concentration and the degree of competitiveness within an industry can impact price. MacAvoy (1998) identified a general hypothesis regarding changes in market concentration and price-cost margins used to determine the direction of competitiveness.

Industry concentration reduced price competition as licensing agreements centralized decisions regarding production, sales and marketing. Standardized quality by controlling harvest timing by IP owners was another result (Pavlovič et al., 2013; Mikyška et al., 2017). Patents enabled similar monopoly control without government involvement or oversight. Quantity or volume regulation and producer allotments of hops through Federal Marketing Orders has previously led to monopolistic policies (Folwell, 1982).

3.3 Discussion

Reduced competitiveness within the hop industry during the period 2000 - 2020, enabled season average prices to remain at elevated levels for a prolonged period as they did between 2016 and 2020. The intrinsic homogeneous traits of branded proprietary varieties of hops such as oil production, which would typically result in symmetrical marginal costs, are overshadowed by extrinsic heterogeneous

characteristics such as brand value and scarcity. These characteristics create the perception of additional value for which the brewing industry is prepared to pay handsomely (Olšovská et al., 2015). The premium price and royalties warranted by proprietary varieties can be considered a deadweight loss ultimately born by the beer consumer.

We expanded the variety specific acreage market share calculations to group those varieties together that share common ownership to get a better picture of the influence of the five largest variety development companies. One company, the Hop Breeding Company, had a much greater share than the rest. Common ownership between the entities that create branded proprietary varieties, individual hop farms and hop merchant firms further increased market concentration in the market. The individuals who own the entities that create proprietary varieties have created a competitive advantage for the merchant companies and farms in which they share a financial interest. We concluded that branded proprietary varieties when their ownership is concentrated into few hands reduced competition within the market and encourage market segmentation.

According to data available between 2009 and 2020 from IHGC economic reports and the Hop Growers of America Statistical Packets, the farmgate value for American hops was \$2.88 billion greater than German growers. That does not represent the added value that processing, packaging and resellers add to the price paid by brewers and beer consumers. During this same period, the USDA reported that proprietary variety acreage increased from 40.52 percent to 70.19 percent in the PNW (USDA NASS, 2020).

4 CONCLUSIONS

The Herfindahl-Hirschman Index calculations offered a glimpse of changes in proprietary variety market share and the impact these changes have had upon market concentration and competitiveness within the U.S. hop industry between 2000 and 2020. During that short time, the industry has gone from one dominated by publicly available varieties to one controlled managed product controlled by a duopoly.

The most relevant of the consequences of increased market concentration of reduced competitiveness was the greater ability for proprietary variety owners to manage the supply of their proprietary products on the market. Through their efforts, they could reduce or eliminate surplus inventory thereby enabling sustained premium prices indefinitely. Additional data now suggested a surplus of proprietary varieties developed and grew between 2016 and 2020. Artificially high prices were sustained since free market forces were not allowed to act. In the face of oversupply, these higher prices artificially increased the cost of production not only for American brewers but for brewers around the globe. The effect of proprietary varieties on the DSR remains to be seen as it is underway in 2023. It appears at the time of this writing the additional opacity created by private management of approximately 70 percent of the U.S. crop also delayed the initial signaling period for the DSR to begin.

The effects of such supply management efforts affect not only proprietary U.S. varieties, but public varieties in the U.S. The relationship between hop varieties (i.e. hop varieties may be substituted with other varieties) extends the effects of proprietary variety management upon farmers in countries where they are not produced. Additional research regarding the complementary relationship between the U.S. and German production regions is recommended to understand price movements, the disparity of pricing and perceived value. The reduction in competitiveness within the U.S. industry this research provides is an important step in furthering the understanding of hop market dynamics and the interrelatedness of world markets. Further research might include an examination of the methods owners of proprietary varieties may use to cooperate with other related entities to alter supply to determine where the border exists for anti-trust violations. This research does not suggest or imply any impropriety by any members of the hop industry. Circumstantial evidence, however, suggests further investigation is warranted.

5 REFERENCES

- Brent, R. The meaning of 'Complex Monopoly'. *The Modern Law Review* 1993, 56, 812-831.
- Bugos, G.; Kevles, D. Plants as Intellectual Property. *Osiris* 1992, 7, 74-104.
- Calkins, S. The New Merger Guidelines and the Herfindahl-Hirschman Index. *California Law Review* 1983, 71, 402-429.
- Comi, M. Other agricultures of scale: Social and environmental insights from Yakima Valley hop growers. *J. Rural Stud.* 2020, 80, 543–552.
- Depken, C. Free-Agency and the Competitiveness of Major League Baseball. *Review of Industrial Organization* 1999, 14, 205-217.
- Devlin A. A proposed solution to the problem of parallel pricing in oligopolistic markets. *Stanford Law Review* 2007, 59, 1111-1151.
- Gan, L.; Hernandez, M.A. Making friends with your neighbors? Agglomeration and tacit collusion in the lodging industry. *The Review of Economics and Statistics* 2013, 95, 1002-1017.
- Folwell, R.J. *The U.S. Hop Marketing Order: The Price of Success is Misunderstanding*; Department of Agricultural Economics, Washington State University: Pullman, WA, USA, 1982.
- Johnston, A.; Ozment, J. Concentration in the airline industry: Evidence of economies of scale? *Journal of Transportation Management* 2011, 22, 59-74.
- MacAvoy, P. Testing for Competitiveness of Markets for Long Distance Telephone Services: Competition Finally? *Review of Industrial Organization* 1998, 13, 295-319.
- MacKinnon, D.; Pavlovič M. Global hop market analysis within the International Hop Growers' Convention. *Hop Bulletin* 2019, 26, 99-108.
- MacKinnon, D.; Pavlovič, M. The delayed surplus response for hops related to market dynamics. *Agricultural economics* 2022, 68, 293-298.
- Mikyška, A.; Olšovská, J.; Slabý, M.; Štěrba, K.; Čerenak, A.; Košir, I.J.; Pavlovič, M.; Kolenc, Z.; Krofta, K. Analytical and sensory profiles of Slovenian and Czech hop genotypes in single hopped beers. *Journal of the Institute of Brewing* 2018, 124, 209-221.
- Olšovská, J.; Štěrba, K.; Pavlovič, M.; Čejka, P. Determination of energy value of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 2015, 73, 165-169.
- Pavlovič, M.; Čerenak, A.; Pavlovič, V.; Rozman, Č.; Pažek, K.; Bohanec, M. Development of DEX-HOP multi-attribute decision model for preliminary hop hybrids assessment. *Computers and Electronics in Agriculture* 2011, 181-189.

- Pavlovič, M.; Production character of the EU hop industry. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2012, 233-239.
- Pavlovič, M.; Pavlovič, V.; Rozman, Č.; Udovč, A.; Stajko, D.; Wang, D.; Gavrić, M.; Srečec, S. Market value assessment of hops by modeling of weather attributes. *Plant, soil and environment* 2013, 59, 267-272.
- Rees, R. Tacit Collusion. *Competition Policy*. *Oxford Review of Economic Policy* 1993, 9, 27-40.
- Rhoades, S. Market Share Inequality, the HHI, and Other Measures of the Firm-Composition of a Market. *Review of Industrial Organization* 1995, 10, 657-674.
- Stiglitz, J.E.; Dixit, A.K. Monopolistic Competition and Optimum Product Diversity. *The American Economic Review* 1977, 67, 297-308.
- Šterba, K.; Pavel Čejka, P.; Čulík, J.; Jurková, M.; Krofta, K.; Pavlovič, M.; Mikyška, A.; Olšovská, J. (2015): Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2015, 73, 151-158.
- USDA NASS 2020. [National Hop Reports \(NHR\) for Years 2000–2020. \[Dataset\]. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service \(USDA NASS\)](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Hops/index.php). Available at [https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/ Washington/Publications/Hops/index.php](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Hops/index.php) (accessed July 18, 2022).
- USDA NASS. National Hop Reports (NHR) for Years 2000–2022. [Dataset]. [United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service \(USDA NASS\)](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Hops/index.php). 2022. Available online: [https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/ Washington/Publications/Hops/index.php](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Hops/index.php) (accessed on 22 December 2022).
- Vermeulen, F. The Narrative Advantage. *London Business School Review* 2012, 23, 55-57.
- Wright, B.; Williams, J. The Economic Role of Commodity Storage. *The Economic Journal* 1982, 92, 596-614.

VPLIV PODSEVKOV NA IZBRANE TALNE PARAMETRE

Barbara ČEH¹, Matej KNAPIČ², Igor ŠANTAVEC³, Ana KARNIČNIK KLANČNIK⁴,
Bojan ČREMOŽNIK⁵, Monika OSET LUSKAR⁶, Sebastjan RADIŠEK⁷, Jure FERLIN⁸ in
Boštjan NAGLIČ⁹

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Arrived: 11. 11. 2024

Sprejeto / Accepted: 11. 12. 2024

Izvleček

Ena od možnih rešitev za povečanje organske snovi v tleh hmeljišč, varovanje tal, povečanje biološke raznovrstnosti v tleh in varovanje voda je setev in zadelava podsevkov v medvrstni prostor hmeljišč. S tipalnimi poljskimi poskusi v treh različnih hmeljiščih smo želeli ugotoviti, katere rastlinske vrste oziroma njihove mešanice se najbolje obnesejo kot podsevki v hmeljiščih, v kolikšni meri zmanjšajo izgube dušika (N), koliko biomase proizvedejo in ali različno vplivajo na biotsko raznovrstnost v tleh. Poskuse smo zastavili kot bločne poljske poskuse s šestimi obravnavanji (5 različnih podsevkov in kontrola brez podsevka) v treh ponovitvah. Setev je potekala med 4. 7. in 8. 7. 2024 ob hkratni medvrstni obdelavi. V razmerah leta z nadpovprečno toplimi poletnimi meseci in nadpovprečno količino padavin v juliju se je izkazala za najboljšo izbiro na vseh treh lokacijah sudanska trava, ki je uspešno konkurirala plevelom, dosegla največji pridelek biomase in odvzem N. Na lokaciji z bolj odcednimi tlemi je bila obetavna tudi abesinska gizotija. Mešanica bela gorjušica + meliorativna redkev + krmna ogrščica je na bolj odcednih delih posestva in na lažjih tleh dobro uspevala, na težjih tleh jo je prerastel plevel. Vse druge variante v razmerah tega leta niso dobro konkurirale plevelom. Tik pred obiranjem hmelja se vsebnost dostopnega dušika v tleh med obravnavanji in kontrolo, ki jo je sicer prerastel plevel, ni razlikovala, vendar puščanje plevelne vegetacije v hmeljiščih ni priporočljivo zaradi povečanja plevelnih semen. V talni favni so prevladovali skakači (Collembola). Prve ugotovitve tako kažejo na nekatere spremembe mikrobne prisotnosti v tleh (bakterije in glive) v času aktivne rasti podsevkov.

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: barbara.ceph@ihps.si

² Mag., IHPS, e-pošta: matej.knapic@ihps.si

³ Asist. dr., Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, e-pošta: igor.santavec@bf.uni-lj.si

⁴ Mag. biotehnol., IHPS, e-pošta: ana.karnicnik@ihps.si

⁵ Dipl. inž. agr. in hort., IHPS, e-pošta: bojan.cremoznik@ihps.si

⁶ Univ. dipl. inž. kmet., IHPS, e-pošta: monika.oset-luskar@ihps.si

⁷ Dr., IHPS, e-pošta: sebastjan.radišek@ihps.si

⁸ Mag. inž. agr., IHPS, e-pošta: jure.ferlin@ihps.si

⁹ Dr., IHPS, e-pošta: bostjan.naglic@ihps.si

Ključne besede: podsevek, sudanska trava, mešanice kot podsevki, zajem dušika s podsevki, mineralni dušik v tleh, večspektralno slikanje, biotska raznovrstnost v tleh

IMPACT OF CATCH CROPS ON SELECTED SOIL PARAMETERS

Abstract

One of the possible solutions for increasing organic matter in the soil of hop fields, protecting the soil, increasing biodiversity in the soil and protecting water is sowing and cultivating catch crops in the inter-row space of hop fields. With conducting field trials in three different hop fields, we wanted to determine which plant species or their mixtures perform best as catch crops in hop fields, to what extent they prevent nitrogen (N) losses, how much biomass they produce and whether they have different effects on soil biodiversity. The experiments were set up as block field trials with six treatments (5 different catch crops and a control without catch crops) in three replications. Sowing took place between 4. 7. and 8. 7. 2024 with simultaneous inter-row cultivation. In the conditions of the year with above-average warm summer months and above-average rainfall in July, Sudan grass proved to be the best choice at all three locations, successfully competing with weeds, achieving the highest biomass yield and N removal. Abyssinian Guizotia was also promising at the location with better drained soils. Mixture of white mustard + melioration radish + fodder rape grew well on better drained parts of the estate and on lighter soils, but was overgrown by weeds on heavier soils. All other variants did not compete well with weeds in the conditions of this year. Just before the hop harvest, the content of available nitrogen in the soil between the treatments and the control, which was overgrown by weeds, did not differ, but leaving weed vegetation in hop fields is not recommended due to the increase in the weed seed bank. The soil fauna was dominated by springtails (Collembola). The first findings indicate some changes in soil microbial (bacteria and fungi) activity during the active growth of cover crop.

Key words: underplanting, catch crops, Sudan grass, mixtures as cover crops, nitrogen uptake by cover crops, mineral nitrogen in the soil, multispectral imaging, biodiversity in soil

1 UVOD

Trajnostni sistemi kmetovanja pridobivajo zaradi potrebe po zaščiti biotske raznovrstnosti in ohranjanju okoljskega ravnovesja veliko pozornosti. Ena od strategij vključuje uporabo dosevkov/podsevkov (Žuk-Gołaszewska et al., 2019). Ker imajo hmeljišča v Sloveniji v glavnem preskrbljenost z organsko snovjo na spodnji priporočeni meji (IHPS, rezultati meritev za naročnike), je potrebno z ustrežno agrotehniko poskrbeti, da se ta nivo vsaj ohranja oziroma počasi povečuje. Povečanje vsebnost humusa v tleh je dolgotrajen proces. Možna rešitev za povečanje organske snovi v tleh hmeljišč je setev in zadelava podsevkov. Drugi cilji vključevanja podsevkov v hmeljišča so povečanje biološke raznovrstnosti v tleh hmeljišč, varovanje podtalnice in drugih voda ob hkratnem ohranjanju velikosti

pridelka in njegove kakovosti. Podsevki nudijo habitate in vir hrane za široko paleto talnih organizmov: mikroorganizmov (gliv, bakterij, arhej, alg, praživali) in nevretenčarjev, ki skupaj tvorijo prehranjevalno verigo tal (Cole in sod., 2023). Posledično raznolikost talnih organizmov pomembno vpliva na rodovitnost tal, produktivnost in splošno odpornost ekosistema na spreminjajoče okoljske vplive (Gayan et al., 2023). Različne vrste podsevkov podpirajo raznolike mikrobne združbe s tem, da imajo različne izločke korenin, ki so koristni za talne mikroorganizme. Nadzemna biomasa služi tudi kot habitat in hrana za nadzemno biotsko raznovrstno favno (Cole in sod., 2023).

S tipalnimi poljskimi poskusi v treh različnih hmeljiščih smo želeli ugotoviti: katere rastlinske vrste oziroma njihove mešanice se najbolje obnesejo kot podsevki v hmeljiščih glede na vremenske razmere v določenem letu, kako zmanjšajo izgube dušika, koliko biomase proizvedejo in ali različno vplivajo na biološko pestrost v tleh.

Preglednica 1: Podatki o poskusnih lokacijah in zasnova poskusa glede na lokacijo

Lokacija	MVRH	Obnavljanje – vrsta podsevka in setvena norma (kg/ha)					
		A	B	C	D	E	F
a = Grajska vas, sorta hmelja Celeia	3 m 345 m ²	Sudanska trava (55 kg/ha)	Bela gorjušica (33kg/ha)	Mešanica Gorca*	Mešanica Wintergrün*** (90 kg/ha)	Navadni oves (75 %) + rdeča bilnica (25 %) (43 kg/ha)	Kontrola – brez podsevk a
b = Male Braslovče, sorta hmelja Aurora	2,8 m 420 m ²	Sudanska trava (45 kg/ha)	Bela gorjušica (90 %) + meliorativna redkev (10 %) (22 kg/ha)	Mešanica Gorca*	Abesinska gizotija 13 kg/ha	Jara pšenica + jari ječmen (175 kg/ha)	Kontrola – brez podsevk a
c = Ormož, sorta hmelja Aurora	2,4 m 600 m ²	Sudanska trava (56kg/ha)	Bela gorjušica (15 kg/ha)	Mešanica Jeruzalem* (20 kg/ha)	Mešanica Wintergrün*** (107 kg/ha)	Rdeča bilnica (10 kg/ha)	Kontrola – brez podsevk a

MRVH= Medvrstna razdalja (m) in velikost osnovnih parcel

* Mešanica Gorca = podzemna detelja (*Trifolium subterraneum* L.) 8 % + rdeča bilnica (*Festuca rubra rubra* L.) 41 % + trpežna ljuljka - zgodnja sorta, 2n (*Lolium perenne* L.) 24 % + trpežna ljuljka - srednje pozna sorta, 2n (*Lolium perenne* L.) 22 % + ovčja bilnica (*Feastuca ovina duriuscula*) 5 %

** Mešanica posestva Jeruzalem = meliorativna redkev (15 %) + bela gorjušica (75 %) + krmna ogrščica-sorta Starška (10 %)

*** Mešanica Wintergrün = ozimna rž (Antoninskie) 31 % + ozimna rž (Protector) 30 % + panonska grašica (Beta) 27 % + Inkarnatka (Heusers Ostsaat) 7,5 % + Inkarnatka (Tardivo) 2,5 % + Triticala (Trialgo) 2,0 %

2 METODE DELA

2.1 2.1 Postavitev poskusov

Na treh hmeljarskih kmetijah v dveh pridelovalnih območjih (Savinjska dolina in Ormož) smo v letu 2024 zasnovali tipalne poljski poskus s podsevky. Lokacije so se razlikovale glede sorte hmelja (lokacija a - sorta Celeia, lokaciji b in c - sorta Aurora), lastnosti tal in postavitve žičnic (različne medvrstne razdalje) (preglednica 1). Poskus smo na vsaki lokaciji zastavili kot bločni poljski poskus s šestimi obravnavanji (različni podsevky in kontrola brez podsevky) v treh ponovitvah. Velikost osnovnih parcel je bila ena medvrstna razdalja v hmeljišču po celotni dolžini žičnice (preglednica 1). Obravnavanja so predstavljala različne rastlinske vrste ter njihove mešanice; vključeni so bili običajni podsevky posameznih kmetij, variante glede na želje vključenih hmeljarjev in nove rastlinske vrste oziroma njihove mešanice. Setev smo izvedli od 4. do 8. julija 2024 pri optimalni vlažnosti tal. Obravnavanja in setvene norme so predstavljeni v preglednici 1. Na lokaciji a je bila setev izvedena 8. 7. 2024 z mehansko sejalnico, kjer količino semena uravnavamo z nastavitvijo širine odgrebal in hitrostjo vrtenja le teh. Seme pada po ceveh prosto. Na lokaciji b smo sejali 4. 7. 2024 s sejalnico z ventilatorjem, ki ima možnost nastavitve z menjavo odgrebalnega valja z različnimi velikostmi odprtín za zajem različne velikosti semena. Setvena količina se nastavi s spreminjanjem hitrosti vrtenja električno gnanega odgrebala preko elektronske krmilne naprave. Na lokaciji c je bila setev izvedena 5. 7. 2024 s sejalnico z ventilatorjem, pri kateri je količina izpadlega semena nastavljiva po stopnjah (od 1 do 10). Na vseh treh lokacijah so opisane sejalnice bile prigradjene na stroje za medvrstno obdelavo hmelja. Seme pada po ceveh pri vseh treh sejalnicah prosto pred letvasti valj.

2.2 Lastnosti tal, izvedena vzorčenja in analize

Tla na lokaciji a in c uvrščamo med obrečna rjava tla, oglejena na aluviju (meljasto ilovnate teksture), na lokaciji b pa med rjava tla, evtrična, plitva in srednje globoka (glinasto ilovnate teksture). Za tla na lokaciji a in c je značilno, da se v sušnih obdobjih pozneje soočajo s pomanjkanjem vode kot pa tla na območju lokacije b, kjer poleg globine tal, na slabšo vodno-zadrževalno kapaciteto tal vpliva večja skeletnost tal (Hillel, 1998; Naseri, 2019). Tla na vseh lokacijah so dobro oziroma celo prekomerno preskrbljena s fosforjem in kalijem, le vsebnost rastlinam dostopnega kalija je na lokaciji a srednje dobra (razred preskrbljenosti B). Reakcija tal v KCl je 7,1 na lokacijah a in c in 6,5 na lokaciji b.

Tik pred setvijo (začetek julija) smo na vseh treh lokacijah (a, b in c) na vseh parcelah - ponovitvah izvedli vzorčenje tal za hitri talni test na rastlinam dostopni dušik (nitratna in amonijska oblika dušika) s sondo do globine 25 cm v vrstnem (greben ob rastlinah hmelja narejen z osipanjem, ki fiksira rastline hmelja) in medvrstnem prostoru hmeljišča. Vsak vzorec je bil sestavljen iz 20 do 25 podvzorcev - vbodov v tla na vsaki parceli. Naslednje vzorčenje smo izvedli tik pred obiranjem (21. 8. 2024) in sicer na dveh globinah (0-30 cm in 30-60 cm) v medvrstnem prostoru vsake ponovitve obravnavanja na lokaciji a.

Zadnje vzorčenje za hitri talni test rastlinam dostopnih dušik smo izvedli 30. 9. 2024 na lokaciji a z namenom, da ugotovimo ali je potrebna podrobna ocena vsebnosti mineralnih oblik dušika na vseh lokacijah ob koncu poskusa. Namreč na lokaciji a je bila ob prvem vzorčenju največja vsebnost mineralnih oblik dušika, hkrati pa tekstura in struktura tal vplivata na manjši obseg izgub (Mahmud, 2021) kot na lokacijah b ali c. V kolikor bi bila vsebnost mineralnega dušika na lokaciji a majhna oz. zanemarljiva, potem na ostalih lokacijah ne bi nadaljevali z vzorčenjem. Na lokaciji a smo torej določili vsebnost mineralnih oblik dušika v dveh globinah, od 0-30 cm in 30-60 cm v 3 različnih obravnavanjih (B, E in F). Vsebnost nitratne in amonijske oblike dušika smo analizirali po interni metodi z RQ-flexom. Podatke smo obdelali s programom Statgraphics Centurion za dvofaktorski poskus (lokacija - hmeljišče a, b in c ter mest vzorčenja - v vrsti s hmeljem oz. v medvrstnem prostoru). Za zaznavanje razlik med obravnavanji smo uporabili Duncanov test, $p=0,05$.

Mikrobno prisotnost (MA) tal smo določali na osnovi analize splošne populacije gliv in bakterij. Na vsaki lokaciji smo v času tik pred setvijo izvedli vzorčenje v medvrstnem prostoru v obsegu treh vzorcev z namenom določitve začetnega stanja MA tal pred razvojem posameznih podsevkov. Naslednje vzorčenje smo izvedli na vseh 3 parcelah v času obiranja hmelja, ko so bili podsevki še v fazi aktivne rasti. Iz vsake parcele posameznega podsevka smo odvzeli po en vzorec, ki je bil združen iz treh pod-vzorcev v skupni količini tal približno 0,5 kg. Vsa vzorčenja smo izvedli z ročno lopatko na globini 5-20 cm. Vzorci so bili do nadaljnjega procesiranja hranjeni pri temperaturi 4°C, vendar ne več kot dva dni. Mikrobno prisotnost smo določali z metodo serijskih redčitev na specifičnih gojiščih. Za analizo celokupnih bakterij smo uporabili osnovo TSA (tryptic soy agar) gojišče, za določanje gliv pa PDA (krompirjev dekstrozni agar) gojišče z ustreznimi selekcijskimi dodatki (Larkin in sod., 1993). Inkubacija bakterijskih analiz je trajala 4 dni pri temperaturi 25°C, medtem ko pri glivah 7 dni pri sobni temperaturi. Rezultate analiz smo izrazili v enotah CFU (colony-forming units)/g tal.

Za analizo biodiverzitete tal smo pred setvijo izvedli vzorčenje zgornje plasti tal do globine 10 cm in odvzeli vzorce tal v velikosti 10x10 cm. Naslednje vzorčenje smo izvedli na vseh 3 lokacijah na vseh obravnavanih podsevkih v času obiranja hmelja, ko so bili podsevki še v fazi aktivne rasti. Iz vsake parcele posameznega podsevka smo odvzeli po en vzorec, ki je bil združen iz treh pod-vzorcev v skupni količini tal približno 0,5 kg. Vsa vzorčenja smo izvedli z ročno lopatko na globini 5-20 cm. Vzorci so bili do nadaljnjega procesiranja hranjeni pri temperaturi 4°C, vendar ne več kot 2 dni. Na dan ekstrakcije smo iz vrečke vzeli reprezentativen 200 g vzorec vsakega obravnavanja. Za ekstrakcijo organizmov iz vzorcev tal smo uporabili Berlese -Tullgren lijak, ki izkorišča negativno fototropno in pozitivno geotropno vedenje talnih živali. Živali se ob segrevanju zraka in sušenju tal pomikajo v spodnje plasti. Zemlja se suši od zgoraj navzdol. Živali se umikajo pred sušo v globlje plasti in na koncu padejo v lonček s fiksativom, ki smo ga pripravili iz 95 % alkohola. Vzorce smo v laboratoriju stekali in nasuli v posode, na katere smo predhodno namestili mrežico z odprtini (0,3 mm x 0,4 mm). Vzorce zemlje smo nežno razdrli, da smo jih bolje izpostavili sušenju. Pod vsak vzorec smo namestili

lijak, pod lijak pa posodico s fiksativom. Vzorce na mrežicah smo sušili 2 dni. Po končani ekstrakciji smo posodico s fiksativom, v katerem so bili po končani ekstrakciji nevretenčarji previdno odstranili in jo zaprli s pokrovčkom. Vzorce zemlje smo shranili v hladilniku do pregleda pod lupo. Organizme iz vzorca smo zlili v petrijevke in si jih ogledali pod povečavo pod stereomikroskopom Nikon SMZ 745T. Prešteli smo organizme v vzorcu in jih razporedili v taksonomske skupine. Izbrana obravnavanja s podsevky smo med seboj primerjali in ovrednotili na osnovi prisotnosti in pestrosti izbranih skupin talnih živali.

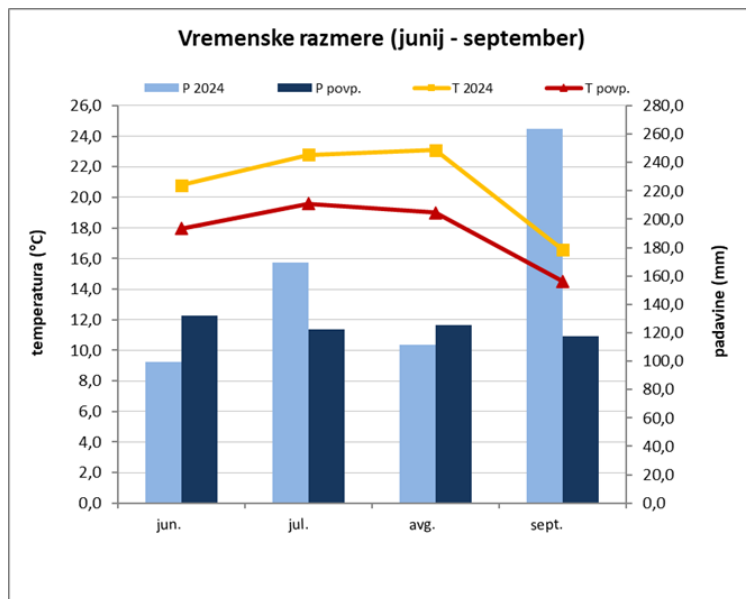
Ob koncu poskusa smo v mesecu oktobru izvedli še vzorčenje biomase podsevky in analizirali vsebnost skupnega dušika po modificirani ISO metodi 11261. Ker so se ostala obravnavanja zelo zaplevelila, smo vzorčili le kontrolno obravnavanje (F) ter nezapleveljene poskusne kombinacije podsevkov, in sicer sudansko travo, abesinsko gizotijo na lokaciji b, na lokaciji a pa le sudansko travo. Na lokaciji c zaradi zapleveljenosti podsevkov nismo vzorčili. Na vsaki parceli izbranih podsevkov smo v 3 ponovitvah na tla položili vzorčne okvirje (0,5 m²), iz katerih smo porezali vse rastline in jih stehali ter odvzeli povprečne vzorce za določitev vlage in analizo vsebnosti celokupnega dušika.

V podporo terenskim ocenam rasti podsevkov smo za oceno razvoja in rasti rastlin ter biomase podsevkov posameznega obravnavanja, poskusne lokacije posneli z brezpilotnim letalnikom z večspektralno kamero (DJI MAVIC 3M). Večspektralna kamera je beležila odboj svetlobe v štirih pasovih, in sicer v zelenem, rdečem, robno rdečem ter bližnje infrardečem delu. Slike smo ustrezno pripravili in obdelali s PIX4D programskim orodjem. Prostorske analize smo naredili s QGIS programsko opremo, kjer smo tudi izračunali ustrezne vegetacijske indekse (IDB - List of available Indices, no date) (NDVI, GNDVI, OSAVI, NDRE, MCARI - razmerja med odboji posameznega pasu valovne dolžine) ter podatke ustrezno vrednotili v Python programskem okolju.

2.3 Vremenske razmere v času poskusov

Meteorološko poletje (junij - avgust) je bilo ekstremno vroče, najtoplejše v zadnjih 20. letih in takoj za letom 2003. Na referenčni postaji Spodnje Savinjske doline so bile maksimalne temperature zraka kar 51 dni nad 30 °C, 60 dni pa so povprečne dnevne temperature zraka dosegale in presegle 22°C. Ekstremno visoke temperature zraka so se nadaljevale tudi v prvih dneh meseca septembra (slika 1). V celotnem obdobju rasti hmelja, od meseca aprila do septembra, smo na vremenski postaji Latkova vas zabeležili 868 mm padavin, na postaji Zgornji Kamenščak, ki je od Ormoža oddaljena okoli 10 km zračne linije, pa 598 mm padavin.

Setev poskusa smo izvedli tik pred začetkom obdobja vročinskega vala v mesecu juliju, ko so bila tla še primerno vlažna, da je bila setev izvedena ob optimalni vlažnosti tal. Po setvi je bilo v Spodnji Savinjski dolini v drugi dekadi julija 100 mm padavin. Do konca meseca je bilo še dodatnih 24 mm padavin. V mesecu avgustu je bilo 111 mm, v septembru pa 264 mm padavin. Na lokaciji Ormož oz. Zgornjem Kamenščaku je v mesecu juliju padlo 115 mm, v avgustu 58 mm in v septembru 165 mm padavin.



Slika 1: Primerjava mesečnih temperatur in višine padavin od junija do septembra 2024 s 30. letnim povprečjem (1981–2010) na postaji Medlog pri Celju (vir podatkov: ARSO) z referenčno postajo Spodje Savinjske doline (Latkova vas).

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

3.1 Opazovanja v poskusu - rast in razvoj podsevkov

Na hmeljišču lokacije a so tla zaradi visoke nivoja podtalnice nekoliko slabše odcedna, hmelj je v tem letu zaostajal v rasti zaradi nadpovprečno mokrega maja in julija. Slabšo rast hmelja lahko pripišemo tudi poplavljenosti hmeljišča v prejšnjem letu (2023). Podsevek sudanske trave je hitro vzniknil, bil že na začetku avgusta visok okrog 1 m in ostal vse do obiranja hmelja skoraj brez plevela. Tudi bela gorjušica je dobro vzniknila, vendar so jo do konca avgusta skoraj popolnoma prerasli termofilni pleveli - leto je bilo izjemno toplo; prevladali so navadna kostreba in različne vrste šiřrov. Kostreba je na takih tleh in pri takšnih vremenskih razmerah tudi sicer zelo konkurenčna in prevlada nad posejanimi rastlinami. V mešanici gorca prevladujejo nizke trave, predvsem rdeča bilnica, ki pa imajo počasno začetno rast; zaradi tega so medvrstni prostor hmeljišča popolnoma prerasli pleveli, tako da rastlin, ki so bile posejane, konec avgusta skoraj ni bilo zaznati. Tudi mešanica wintergrün je počasi vznikala, rastline pa so svojo konkurenčno sposobnost proti plevelom izgubile v drugi polovici avgusta. Tudi to varianto je plevel popolnoma prerasel. Enako je bilo tudi z mešanico rdeče bilnice in ovsa. Kontrola je bila močno zapleveljena, s prevladujočo kostrebo, ki je bila visoka več kot meter.

Na hmeljišču lokacije b so tla težje teksture (glinasto ilovnate), vendar zaradi manjše globine in večje skeletnosti dobro odcedna. Na lokaciji b se je sudanska

trava pokazala kot dober podsevek, saj je bil posevek skoraj brez plevelov in gost. Mešanico bele gorjušice in meliorativne redkve je do konca avgusta plevel popolnoma prerasel, posejanih rastlin skoraj ni bilo najti v visokem plevelu. Tudi mešanice gorca je na tem poskusnem mestu pokazala svojo slabo konkurenčno sposobnost v vremenskih razmerah tega leta; pred obiranjem hmelja so bile poskusne parcelice gosto preraščene s plevelom. Kot perspektiven lahko označimo podsevek abesinske gizotije, ki je ostal vse do obiranja hmelja skoraj brez plevela. Tudi mešanica jare pšenice in ječmena je do obiranja hmelja ostala skoraj nezapleveljena. V kontroli (brez podsevka) se je medvrstni prostor do konca avgusta močno zaplevelil, vegetacija je bila visoka do 40 cm. Prevladovali so ščiri, metlike, drobnocvetni rogovilček, od plevelnih trav pa so prevladovali muhviči in srakonje, ki rastejo na takih plitvih tleh.

Na lokaciji c je bil hmelj bolj razvit in je bil medvrstni prostori bolj senčen kot na lokacijah v Savinjski dolini (a in b). Na tej lokaciji ob obilnem deževju prihaja do zastajanja vode. Sudanska trava je tudi tu pokazala svojo prednost v toplih razmerah. Bela gorjušica je slabo vzniknila oziroma ni rasla v kolesnicah; zanj je značilno, da hitro zaostane v rasti in propade, če so tla močno zbita. Ob zgodnji julijski setvi bela gorjušica sicer hitro preide v generativno fazo, zato rastline ostanejo nižje in se posevek ob visokem pritisku plevela močno zapleveli. Tako je bilo tudi na tej lokaciji. Mešanica treh križnic, ki jo sicer sejejo kot običajno prakso na tem posestvu, se je prav tako zaplevelila, vendar je bilo opaziti, da pa je na bolj odcedni delih hmeljišča izven poskusa ta podsevek zelo dobro rasel po spravilu hmelja, vidno so bile prisotne rastline meliorativne redkve in krmne ogrščice. Redkev je tvorila tudi zelo dolge korene, ki so na rahlih delih hmeljišča dosegli dolžino 30 cm v globino tal. Mešanica wintergrün se je tudi na tej lokaciji zaradi svoje slabe konkurenčnosti hitro zaplevelila. Rdeča bilnica pa niti ni vzniknila, tako da se je površina hitro zaplevelila. Tudi tu je bila kontrola zapleveljena, vendar je bila višina plevelov nekaj nižja kot v Savinjski dolini.

3.2 Vsebnost mineralnega dušika v tleh

Vsebnost mineralnega dušika v tleh pred postavitvijo poskusa – setvijo podsevkov (to je bilo od 5. do 8. julija) se je značilno razlikovala med lokacijami in tudi glede na pozicijo v hmeljišču (v vrsti s hmeljem oziroma v medvrstnem prostoru). Vsebnost amonijske oblike dušik je bila značilno večja na lokaciji c v primerjavi z lokacijama a in b, obenem pa se ni značilno razlikovala v vrstnem in medvrstnem prostoru. Vsebnost nitratnega dušika v tleh in skupnega mineralnega dušika v tleh pa je bila značilno najmanjša na lokaciji b in značilno največja na lokaciji a, obenem je bila značilno večja v vrstah s hmeljem v primerjavi z medvrstnim prostorom (preglednica 2).

Tretje dognojevanje z dušikom je potekalo pred vzorčenjem tal, ki smo za izvedli tik pred setvijo v juliju, in sicer na lokaciji a 18. junija z gnojilom UREA v količini 78 kg N/ha, na lokaciji b 15. junija v količini 55 kg N/ha z gnojilom UREA in na lokaciji c 3. julija z gnojilom KAN v količini 43 kg N/ha.

Preglednica 2: Vsebnost mineralnega dušika (N) v tleh glede na lokacijo – hmeljišče in glede na pozicijo vzorčenja (v vrsti s hmeljem oziroma v medvrstnem prostoru) v začetku julija – pred setvijo podsevkov (vzorčenje na globini 0-25 cm)

Dejavnik		Nitratna oblika N (kg/ha)	Amonijska oblika N (kg/ha)	Skupaj mineralni N (kg/ha)
Lokacija	a	385 b*	7,2 a	392 b
	b	199 a	6,8 a	206 a
	c	276 ab	12,7 b	289 ab
Prostor vzorčenja na njivi	V vrsti	427 b*	7,3 a	435 b
	V medvrstnem prostoru	146 a	10,4 a	156 a

*Enaka črka v stolpcu znotraj istega dejavnika (Lokacija, Prostor vzorčenja na njivi) pomeni, da med obravnavanjema ni značilne razlike.

Tik pred obiranjem hmelja (21. 8. 2024) se na lokaciji a vsebnost nobene oblike mineralnega dušika ni značilno razlikovala ne glede na obravnavanje in ne glede na globino (preglednica 3). Tudi v kontroli (brez podsevka - obravnavanje F) ni bilo značilne razlike; obrazložitev je močna zapleveljenost tega obravnavanja, torej je plevel vezal dušik v svojo biomaso. Tega sicer ne želimo zaradi tega, ker bujnost plevelov omogoča njihovo boljše razmnoževanje, tako semenskih kot koreninskih plevelov in semensko banko plevela za vse okoliške površine, kar poveča potrebo po zatiranju plevela.

Preglednica 3: Vsebnost mineralnega dušika (N) v tleh glede na obravnavanje na lokaciji a in glede na globino vzorčenja (0-30 cm, 30-60 cm) pred obiranjem hmelja (21. 8. 2024) v medvrstnem prostoru

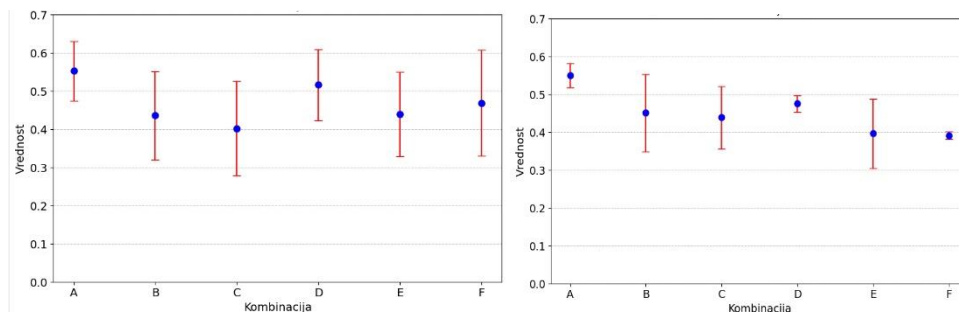
Dejavnik		Nitratna oblika N (kg/ha)	Amonijska oblika N (kg/ha)	Skupaj mineralni N (kg/ha)
Obravnavanje	A	32 a*	8 a	40 a
	B	34 a	8 a	42 a
	C	40 a	8 a	48 a
	D	37 a	8 a	45 a
	E	33 a	8 a	41 a
	F	40 a	8 a	48 a
Globina	0-30 cm	37 a*	8 a	45 a
	30-60 cm	35 a	8 a	43 a

* Enaka črka v stolpcu znotraj istega dejavnika (Lokacija, Prostor vzorčenja na njivi) pomeni, da med obravnavanjema ni značilne razlike.

Vzorčenje tal za določitev mineralnih oblik dušika na lokaciji a v dveh globinah pred koncem poskusa (30. 9. 2024), 0-30 cm in 30-60 cm, je bil na meji detekcije ali pod njo v vseh treh obravnavanjih (B, E in F), kjer so bili odvzeti vzorci. Ker je bila plevelna vegetacija še vedno prisotna in živa, lahko predvidevamo, da je sprejela dušik, ki je bil v tleh v avgustovskem vzorčenju. Kot je bilo že opisano v točki 2.2, zaradi tega nismo nadaljevali z vzorčenjem na drugih lokacijah poskusa.

3.3 Rezultati večspektralnega slikanja in odvzem dušika s podsevki

Prvo slikanje smo izvedli 31. julija 2024, ko so že bile opazne razlike v vzniku in razvoju rastlin med posameznimi obravnavanji. Na lokacijah a in b je bil razvoj hmelja nekoliko slabši in hmelj ni močno prekrival medvrstnega prostora, zato je bila analiza stanja rasti podsevkov neovirana, medtem ko je bil hmelj na lokaciji c nekoliko bolje razvit, hkrati pa smo morali zaradi daljnovoda leteti na večji višini. Oba dejavnika sta vplivala, da analize o razlikah podsevkih na lokaciji c nismo ovrednotili. Razlike v vzniku in razvoju podsevkov smo vrednotili z vegetacijskimi indeksi. Čeprav je večina njih podobno razvrščala uspešnost vznika in rast podsevkov, se je kot najprimernejši za razvrščanje izkazal vegetacijski indeks OSAVI. Med razvitostjo podsevkov, ki jo predstavlja fotosintetsko aktivna listna površina in smo jo vrednotili z vegetacijskim indeksom OSAVI, so bile na obeh lokacijah a in b, statistično značilne razlike (slika 2).



Slika 2: Povprečne vrednosti in standardne deviacije OSAVI indeksa v obravnavanjih - levo lokacija a in desno lokacija b

Kot je razvidno s slike 2, je bil na obeh lokacijah najbolj razvit podsevek sudanske trave. Na lokaciji b je bil le nekoliko manj razvit podsevek abesinske gizotije. Med lokacijama je opazna razlika v stanju kontrolnega obravnavanja, saj je bilo kontrolno obravnavanje že dokaj zapleveljeno na lokaciji b, medtem ko je bilo plevelne vegetacije na lokaciji a malo, saj je bila v vmesnem času od setve še enkrat obdelana.

Naslednje slikanje smo opravili pred koncem poskusa, 7. oktobra 2024, pred vzorčenjem biomase podsevkov na lokacijah a in b. Po snemanju smo v vsaki ponovitvi obravnavanja odvzeli tri vzorce biomase ter njihove lokacije natančno označili s GNSS (globalni navigacijski satelitski sistemi) sprejemnikom centimetrske natančnosti. Vzorce smo stehali ter odvzeli podvzorce za določitev suhe snovi in vsebnost dušika. Podobno kot v prvem primeru, ko smo z večspektralnim slikanjem ocenili rast in razvoj podsevkov, smo preizkusili, ali lahko z modelom, ki vključuje iste vegetacijske indekse, kot smo jih uporabili v prvem primeru, ocenimo obseg biomase na večji površini in na ta način morda bolj zanesljivo ocenimo variabilnost pridelka podsevka. Na lokaciji a je velikost površine za obdelavo večspektralnih podatkov posamezne ponovitve znašala 67 m² in na lokaciji b 79 m². Determinacijski koeficient modela (R^2) za oceno biomase plevelne vegetacije kontrolnega obravnavanja je na obeh lokacijah pojasnil večji del variance in sicer, 0,9 na lokaciji a in 0,86 na lokaciji b. Uspešnost modela za napovedovanje biomase podsevka sudanske trave je bil 0,7 na lokaciji a in 0,84 na lokaciji b, medtem ko je bil model za napoved biomase podsevka abesinske gizotije na lokaciji b nekoliko manj zanesljiv, $R^2=0,7$.

Kot je razvidno iz rezultatov modeliranja, je zanesljivost za napovedovanje biomase plevelne vegetacije zelo dobra na obeh lokacijah. Manjšo zanesljivost, a še vedno uporabno, daje modelna napoved za oceno biomase sudanske trave in abesinske gizotije. Iz podatkov modelne napovedi smo preračunali, kolikšna je masa podsevkov sudanske trave in abesinske gizotije ter plevelne vegetacije. Iz podatkov vsebnosti skupnega dušika v vzorcih biomase (iz vzročne ploskve 0,5 m²) smo preračunali skupni odvzem dušika s posameznim podsevkom ali plevelno vegetacijo. Rezultati so prikazani v preglednicah 4 in 5. Za tista obravnavanja, ki so se močno zaplevelila, smo si pri dovolili prevzeti podatke za plevelno vegetacijo, saj je bila le ta v teh obravnavanjih prevladujoča.

Kot je razvidno iz preglednic 4 in 5, je vsebnost dušika v biomasi večja na lokaciji a kot na lokaciji b, kar je po vsej verjetnosti odraz različne vsebnosti mineralnih oblik dušika v tleh v času setve; v začetku poskusa je bila vsebnost mineralnih oblik dušika na lokaciji a skorajda enkrat večja kot na lokaciji b. Po drugi strani talne lastnosti lokacije b (skeletnost, makroporoznost in plitvost tal) omogočajo večji obseg izpiranja, kar je najbrž prav tako pripomoglo k še manjšim količinam mineralnega dušika v tleh v času intenzivne rasti podsevkov.

Preglednica 4: Povprečna ocena pridelka biomase in odvzema dušika na lokaciji a

Obravnavanje	Pridelek (kg s.s./ha)	Vsebnost dušika (%)	Odvzem N (kg/ha)
A: Sudanska trava	8153	1,24	101
B: Bela gorjušica	3939	1,89	74
C: Gorca	4005	1,89	76
D: Wintergrün	3955	1,89	75
E: rdeča bilnica + oves	3907	1,89	74
F: Kontrola - brez podsevka	3994	1,89	76

Preglednica 5: Povprečna ocena pridelka biomase in odvzema N na lokaciji b

Obravnavanje	Pridelek (kg s.s./ha)	Vsebnost dušika (%)	Odvzem N (kg/ha)
A: Sudanska trava	2662 (11747)*	0,34	9 (40)
B: Bela gorjušica + meliorativna redkev	2667	0,74	20
C: Gorca	2666	0,74	20
D: Abesinska gizotija	5967	0,84	50
E: Jara pšenica + jari ječmen	2678	0,74	20
F: Kontrola - brez podsevka	3770	0,74	28

* Očitno napačna modelna ocena in je v oklepajih preračun iz vzorcev 0,5 m².

3.4 **Biotska raznovrstnost favne v tleh pred setvijo podsevkov in pred obiranjem hmelja glede na podsevek**

Tipalno vzorčenje tal za biotsko raznovrstnost v tleh je pokazalo, da sta bili najštevilčnejši taksonomski skupini mezofavne tal ne glede na obravnavanja in lokacije pršice (Acarina) in skakači (Collembola) (preglednica 6). Skakači so v vseh obravnavanih številčno najbolj zastopana skupina, kar kaže na njihov potencial kot ključnih bioindikatorjev tudi za nadaljnje raziskave vpliva podsevkov na talno favno v hmeljiščih. Na lokaciji a je bilo število skakačev največje in v vseh variantah podsevkov večje kot pred setvijo podsevkov. Na lokacijah b in c pa je bila številčnost skakačev v avgustu manjša kot pred setvijo dosevkov. Pri pršicah in ostalih te relacije niso enoznačne. Manj zastopane taksonomske skupine smo združili pod oznako "ostali". Bile so bile redke in so se pojavljale v manjšem številu. Tudi njihova dinamika med obravnavanji v avgustu pred obiranjem hmelja in stanjem pred setvijo podsevkov ni enoznačna. Za bolj natančno razlago povezav med podsevki in talno favno bomo v prihodnjih poskusih izvedli vzorčenja v več ponovitvah, da bomo lahko podatke statistično vrednotiti.

Preglednica 6: Mezofavna v 200 g vzorca. Vzorčeno v medvrstnem prostoru; legenda v preglednici 1.

LOKACIJA a		Število v avgustu glede na obravnavanje (A do F)					
TAKSONOMSKA SKUPINA	Pred setvijo podsevkov v začetku julija	A	B	C	D	E	F
Skakači (Collembola)	16	24	25	18	37	47	31
Pršice (Acarina)	4	8	1	1	5	5	2
Ostale	3	1	8	7	5	6	3
LOKACIJA b		Število v avgustu glede na obravnavanje (A do F)					
TAKSONOMSKA SKUPINA	Pred setvijo podsevkov v začetku julija	A	B	C	D	E	F
Skakači (Collembola)	15	4	14	9	2	10	3
Pršice (Acarina)	5	3	3	4	0	1	4
Ostale	2	1	1	0	0	0	0

* nadaljevanje preglednice na naslednji strani

LOKACIJA c		Število v avgustu glede na obravnavanje (A do F)					
TAKSONOMSKA SKUPINA	Pred setvijo podsevkov v začetku julija	A	B	C	D	E	F
Skakači (Collembola)	11	8	5	3	3	5	13
Pršice (Acarina)	1	2	3	2	2	1	4
Ostale	0	2	0	9	1	7	6

3.5 Mikrobna prisotnost v tleh pred setvijo podsevkov in pred obiranjem hmelja glede na podsevek

Analize so na vseh lokacijah pokazale primerljive vrednosti skupne zastopanosti gliv v tleh med posameznimi obravnavanji (preglednica 7), kar kaže na zelo stabilno stanje populacije gliv, ne glede na različne podsevke in kontrolo brez podsevka. Populacija gliv, določena v avgustu, je bila primerljiva tudi med posameznimi lokacijami.

Številčnost bakterij se je na lokacijah a in b v avgustu močno povečala v vseh proučevanih variantah in kontroli glede na stanje pred setvijo podsevkov v začetku julija. V primeru bakterij so bile na lokaciji a vrednosti bakterij povišane pri mešanici gorca, v primeru lokacije b pa pri mešanici bela gorjušica+meliorativna redkev+krmna ogrščica in mešanici wintergrün. Pri tem je potrebno poudariti, da uporabljena analitika določa celokupno zastopanost gliv in bakterij v tleh, ne pa spremembe v zastopanosti posameznih vrst ali rodov. Prve ugotovitve tako kažejo na nekatere spremembe mikrobne prisotnosti tal v času aktivne rasti podsevkov. Ker je MA odvisna tudi od gnojenja in vsebnosti organske snovi v tleh, pa bi lahko v primeru analiz, ki bi se izvedle po zadelanju podsevkov v tla, pričakovali razlike, predvsem v odvisnosti od količine biomase in rastlinske vrste ali mešanice vrst.

Ob tem je potrebno izpostaviti, da gre za rezultate enoletnega poskusa, katerega dolgoročne posledice na mikrofloro tal še niso popolnoma opredeljene. Za natančnejšo oceno vplivov pridelave dosevkov v medvrstnem prostoru hmelja so potrebna večletna opazovanja in analize, ki bodo omogočile bolj celostno razumevanje vpliva različnih vrst podsevkov na mikrobno sestavo tal.

Preglednica 7: Vrednosti celokupne populacije gliv in bakterij glede na lokacijo, izražene v enotah CFU X 10⁶/g tal; legenda za obravnavanja v preglednici 1.

LOKACIJA a							
Podsevek	Pred setvijo podsevkov v začetku julija	A	B	C	D	E	F: Kontrola - brez podsevka
BAKTERIJE	11*	38	31	82	49	46	43
GLIVE	0,066*	0,030	0,029	0,027	0,026	0,022	0,032
LOKACIJA b							
Podsevek	Pred setvijo podsevkov v začetku julija	A	B	C	D	E	F: Kontrola - brez podsevka
BAKTERIJE	4*	27	72	54	54	48	65
GLIVE	0,023*	0,010	0,026	0,020	0,025	0,025	0,0213
LOKACIJA c							
Podsevek	Pred setvijo podsevkov v začetku julija	A	B	C	D	E	F: Kontrola - brez podsevka
BAKTERIJE	32*	29	6	124	89	35	32
GLIVE	0,088*	0,031	0,022	0,030	0,032	0,033	0,0112

*CFU X 10⁶/G TAL

4 ZAKLJUČKI

Na vseh treh lokacijah se je v razmerah leta 2024 kot najbolj perspektivna za setev v medvrstne prostore v hmeljiščih pokazala sudanska trava. Na lokaciji b, kjer so tla bolj odcedna, se je kot perspektivna pokazala še abesinska gizotija. Mešanica treh križnic (bela gorjušica + krmna ogrščica + meliorativna redkev) je bila na lokaciji c preraščena s plevelom, vendar pa je na bolj odcednih delih poskusa in na parceli z lažjimi tlemi dobro rasla in bila nezapleveljena še pozno v oktobru. Tik pred obiranjem hmelja, v avgustu, se na lokaciji a vsebnost mineralnega dušika v tleh ni razlikovala med različnimi variantami podsevkov in kontrolo (brez podsevka). To lahko pripišemo močni zapleveljenosti kontrole, saj je plevel vezal

dušik v svojo biomaso. Kljub temu puščanje plevelne vegetacije v medvrstnem prostoru hmeljišč ni zaželen zaradi povečanja semenske banke plevelnih semen. Na lokacijah a in b smo s pomočjo večspektralnega slikanja potrdili opazovanja rasti podsevkov. Največji modeliran pridelek biomase in odvzema dušika je bil pri sudanski travi. Na lokaciji b izstopa po pridelku biomase in odvzemu dušika še abesinska gizotija.

V talni favni so povsod prevladovali skakači (Collembola). Z enoletnimi rezultati ne moremo natančno razložiti odnosov med podsevki in talno favno. Za natančnejšo oceno vplivov pridelave dosevkov v medvrstnem prostoru hmelja na mikrobno sestavo tal bodo potrebna večletna opazovanja in analize, ki omogočajo bolj celostno razumevanje vpliva različnih vrst podsevkov.

5 VIRI

- Beltrán, O. B., Urbaneja, A., Eiras, M., Pérez-Hedo, M., & Daròs, J. A. (2023). [RNAi-mediated silencing of Mediterranean fruit fly \(*Ceratitis capitata*\) endogenous genes using orally-supplied double-stranded RNAs produced in *Escherichia coli*](https://doi.org/10.1002/ps.7839). Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.7839>
- Cole L., Dromph K., Boaglio V, Bardgett R. 2003. [Effect of density and species richness of soil mesofauna on nutrient mineralisation and plant growth](https://doi.org/10.1007/s00374-003-0702-6). Biology and Fertility of Soils, 1, 39: 337–343, <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0702-6>
- Gayan A., Borah P., Nath D., Kataki R. Chapter 4 - Soil microbial diversity, soil health and agricultural sustainability. Sustainable Agriculture and the Environment, 2023, Pages 107-126
- Hillel D. 1998. Environmental soil physics. San Diego, Academic Press
- IDB - [List of available Indices](https://www.indexdatabase.de/db/i.php) (no date). Dostopno na: <https://www.indexdatabase.de/db/i.php> (Dostopano: 4. december 2024).
- Larkin, R. P., Hopkins, D. L., and Martin, F. N. 1993. Ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soils suppressive and conducive to *Fusarium* wilt of watermelon. Phytopathology 83:1105-1116.
- Mahmud, K., Panday, D., Mergoum, A., & Missaoui, A. 2021. [Nitrogen Losses and Potential Mitigation Strategies for a Sustainable Agroecosystem](https://doi.org/10.3390/su13042400). Sustainability, 13(4), 2400. <https://doi.org/10.3390/su13042400>
- Naseri, M., Iden, S.C., Richter, N. and Durner, W. 2019. [Influence of Stone Content on Soil Hydraulic Properties: Experimental Investigation and Test of Existing Model Concepts](https://doi.org/10.2136/vzj2018.08.0163). Vadose Zone Journal, 18: 1-10 180163. <https://doi.org/10.2136/vzj2018.08.0163>
- Žuk-Golaszewska K., Wanic M., Orzech K. 2019. The role of catch crops in field plant production – A review. J. Elem., 24(2) 575-587. DOI: 10.5601/jelem.2018.23.3.1662

VPLIV DODATKA AROMAZYME NA GLUKOZIDAZNO AKTIVNOST

Gašper KORAT¹, Petra TERPINC², Iztok Jože KOŠIR³ in Miha OCVIRK⁴

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Arrived: 24. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 28. 11. 2024

Izvleček

Med fermentacijo piva ima uporabljen kvas sposobnost proizvajati encim glukozidazo, kot enega izmed stranskih produktov fermentacije. Encim glukozidaza iz glikozidno vezanih aromatičnih spojin v pivu lahko sprosti določene monoterpenke alkohole, kar vodi v spremembo arome piva. Količina proizvedenega encima glukozidaze se močno razlikuje glede na sev uporabljenih kvasovk, različne temperature fermentacije in druge variabilne parametre fermentacije. Namen raziskave je bil dobiti vpogled v glikozidazno aktivnost v pivu ob dodatku encima glukozidaze. Ugotovili smo, se ob dodatku ABV Aromazyme poveča glukozidazna aktivnost v pivu, kar lahko ima za posledico povišan izkoristek ekstrakcije aromatičnih spojin iz hmelja v pivo.

Ključne besede: fermentacija, ABV Aromazyme, beta-glukozidaza, Fluorescenčna spektroskopija

EFFECT OF AROMAZYME ADDITION ON GLUCOSIDASE ACTIVITY

Abstract

During beer fermentation, the yeast used itself has the ability to produce the enzyme glucosidase, as one of the fermentation byproducts. The enzyme glucosidase from the glycosidically bound in aromatic compounds in beer can release certain monoterpene alcohols, resulting in a change in beer aroma. The amount of glucosidase enzyme produced in fermentation varies greatly depending on the yeast strain used, different fermentation temperatures and other variable fermentation parameters. We found out, that the addition of ABV Aromazyme increases the glucosidase activity in beer, which can result in an increased efficiency of extraction yield of aromatic compounds from hops into beer.

Key words: fermentation, ABV Aromazyme, beta-glucosydase, Fluorescence Spectrophotometry

¹ Mag. inž. živil., Biotehniška Fakulteta (BF), Univerza v Ljubljani

² Doc.dr. univ. dipl. inž. živil., BF, e-pošta: petra.terpinc@bf.uni-lj.si

³ Dr. univ. dipl. kem. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

⁴ Dr. univ. dipl. inž. kem. tehnol., IHPS, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

1 UVOD

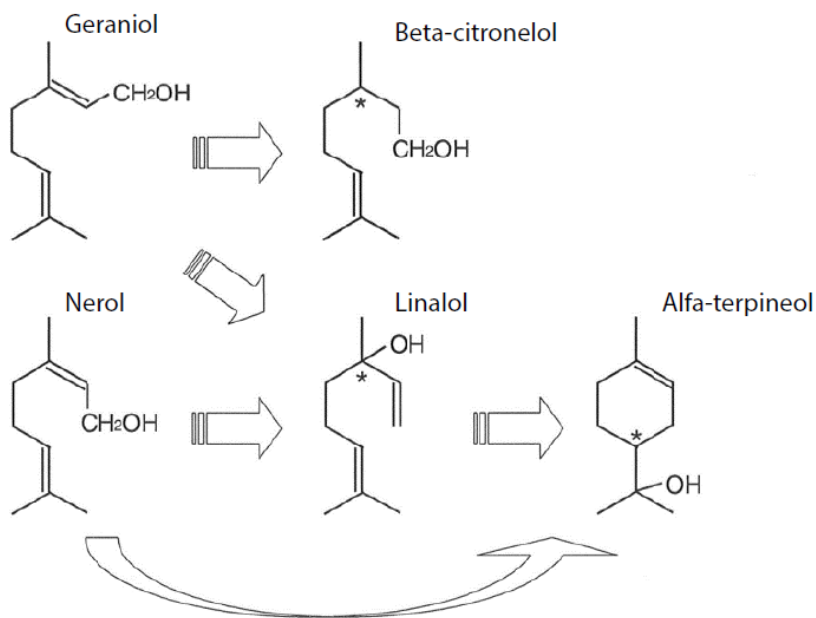
Hmeljna aroma velja za kompleksno aromo, ki jo predstavljajo majhne koncentracije več kot tisoč različnih aromatičnih spojin (Roberts in sod., 2004). Te spojine med sabo delujejo sinergistično, kar pomeni da morajo biti komponente eteričnega olja v določenih razmerjih ena proti drugi (Korat, 2024). Pivovar lahko na končno aromo piva vpliva tudi z različnimi tehnikami in režimi hmeljenja piva (Keukeleire in sod., 2000). Močno hmeljena piva zgornjega vrenja, kot sta npr. pale ale in indian pale ale, so v zadnjem desetletju postala med najbolj priljubljenimi pivi malih pivovarjev. V pivovarstvu se je ravno zaradi teh stilov piva uveljavila nova metoda hmeljenja piva, t.i. hladno hmeljenje, kjer gre za dodajanje hmelja med ali po fermentaciji, ne pa med varjenjem sladice (Cisowska in sod., 2019). To omogoča izločanje aromatičnih spojin na drugačen način in posledično prinaša edinstvene bolj poudarjene, aromatične značilnosti piva. Sorta hmelja in njen specifični aromatični profil pa ni edini dejavnik, ki vpliva na končno aromo piva (Roberts, 2016). Drugi ključni dejavniki, ki imajo vpliv na aromo piva so tudi izbira kvasa, temperatura fermentacije, čas hladnega hmeljenja, oblika hmeljnih pripravkov in souporaba novejših pripravkov oz. dodatkov, ki se uporabljajo z namenom izboljšanja arome.

Pripravek ABV Aromazyme, (Lallemand, Kanada) pridobljen iz izbranega seva glive *Aspergillus niger* vsebuje encim glukozidazo, ki ima pomembno vlogo v procesu hladnega hmeljenja (Technical data sheet, 2020). Pivovarski kvas je sicer sam sposoben med fermentacijo proizvajati encim glukozidaze, kot stranski produkt, vendar ker se količina encima razlikuje glede seva kvasovk, različne temperature fermentacije. Zato je otežen nadzor nad vsebnostjo encima in stopnjo biotransformacij aromatičnih spojin, kjer gre za kemijske spremembe spojin v njihove derivate, ki imajo drugačne lastnosti (Korat, 2024). Takšna tehnika izboljšanja arome, je že vrsto let običajna praksa vinarjev, kjer se dodaja encim pektinaze, z močno aktivnostjo beta-glukozidaze. Uporabljajo se pri vinih, za sproščanje vezanih arom (sekundarnih arom) v mladem vinu.

Biotransformacije so z vidika pivovarstva lahko zanimive iz več razlogov, eden najpomembnejših je povečanje koncentracije aromatičnih spojin v pivu. Te komponente se pred biotransformacijo največkrat pojavljajo vezane na osnovno surovino, torej hmelj. S sprostitvijo teh komponent preko biotransformacije dobimo nove arome in pa prekursorje za nadaljnjo biotransformacijo (Svedlund in sod., 2022). Ker predstavlja hmelj velik del stroška osnovnih surovin piva, so biotransformacije lahko zanimive tudi iz ekonomskega in ekološkega vidika (Korat, 2024).

Beta glukozidaza iz glikozidno vezanih aromatičnih spojin v pivu lahko sprosti določene monoterpenske alkohole, kar spremeni aromo piva, predvsem v smislu nesorazmerja med vsebnostjo in sestavo komponent eteričnega olja v hmelju in potem v končnem pivu, kar pomeni, da določeni monoterpenški alkoholi, ki so prisotni v pivu ne izvirajo iz hmelja uporabljenega v procesu varjenja piva, ampak so posledica biotransformacij med fermentacijo piva (Klimczak in Cioch-Skoneczny, 2022). Glikozid je komponenta, ki je kemijsko vezana z molekulo

sladkorja s t.i. glikozidno vezjo. V hmelju so hmeljne aromatične spojine z glikozidno vezjo vezane na proste sladkorje v pivu. Proces sprostitve teh spojin, ki v t.i. glikozidu niso hlapne se imenuje hidroliza. Med takšne monoterpenske alkohole spadajo linalol, geraniol, beta-citronelol in tudi alfa-terpineol (Xiayou in sod., 2023). Poleg encima beta-glukozidaze se v pivu pojavlja še veliko drugih encimov, katerih vir so večinoma metabolični produkti kvasovk. Ti encimi katalizirajo druge reakcije in biotransformacije, katerih vpliv na aromo piva še ni povsem raziskan. V zadnjem obdobju obstaja več raziskav, kjer so ugotovili, da se biotransformacije terpenov kot stranski produkt alkoholnega vrenja dogajajo v mitohondrijskih kvasovk in je tesno povezana s presnovo leucina. (Carrau in sodelavci, 2005, Forster in sodelavci, 2014, Haslbeck in sodelavci 2018). Ena bolj znanih takšnih biotransformacij je pretvorba geraniola v beta-citronelol in naprej v linalol ter alfa-terpineol (Slika 1) (King in Dickinson, 2000) s pomočjo encima geraniol dihidrogenaza (Singh-Sangwan in sodelavci, 1993). Biotransformacije so torej poleg izomerizacije alfa-kislin ena najpomembnejših kemijskih reakcij v pivovarstvu saj imajo odločujoč vpliv ne samo na končno aromo piva, ampak tudi na potrošnikovo sprejemanje določenega tipa piva



Slika 1: Biotransformacijske poti geraniola (Takoi in sod., 2016)

Namen raziskave je bil preveriti vpliv koncentracije encimskega pripravka na skupno beta-glukozidazno aktivnost vzorca piva in s tem ugotoviti smiselnost uporabe pripravka Aromazyme.

2 METODE DELA

Izvedli smo pet modelnih fermentacij, pri katerih smo preko fluorimetrične analize določali aktivnost encima beta-glukozidaze.

2.1 Priprava piva

Osnovno pivino smo zvarili v pivovarni Omnivar (Ljubljana, Slovenija) po njihovem receptu, zato zaradi zaščite interesov podjetja, posamezne podrobnosti v predstavljenem delu ne bodo predstavljene. Vsi poskusi in analize so bili izvedeni na isti šarži osnovne pivine. Pivina je bila odvzeta neposredno po hlajenju in zamrznjena do začetka eksperimenta. Pred začetkom poskusa smo jo odmrznili in shomogenizirali. Steklene fermentacijske posode (500 mL) smo pred uporabo razkužili z uporabo razkužila. V vsako fermentacijsko posodo smo z merilnim valjem odmerili 450 mL pivine in namestili vrelo veho, s čimer smo onemogočili vstop mikroorganizmom in omogočili prost izhod CO₂. V dve ločeni laboratorijski čaši smo na analitski tehtnici AB204-S (Mettler Toledo) zatehtali 11 g liofiliziranih kvasovk po navodilih proizvajalca. Uporabili smo liofilizirane kvasovke BRY-97™ (Lallemand, Kanada). Po 3 dneh fermentacije smo dodali encimski pripravek Aromazyme (Lallemand, Kanada). Slednjega smo najprej aktivirali tako, da smo ga razredčili v 10-kratni količini vnaprej pripravljene, prevrete in ohlajene vode in ga nato dodali v fermentacijske posode v štirih različnih koncentracijah: 0 g/hL, 2,5 g/hL, 5 g/hL, 7,5 g/hL oz 10 g/hL piva (priporočeno 5 g/hL). Med fermentacijo smo iz vsake vrele steklenice v treh rednih intervalih, takoj ob dodatku pripravka ter po 24 h in 48 h odvzeli 0,5 mL vzorca piva in ga shranili v zamrzovalniku do izvedbe analiz določanja beta-glukozidazne aktivnosti (Korat, 2024).

2.2 Določanje Beta-glukozidazne aktivnosti

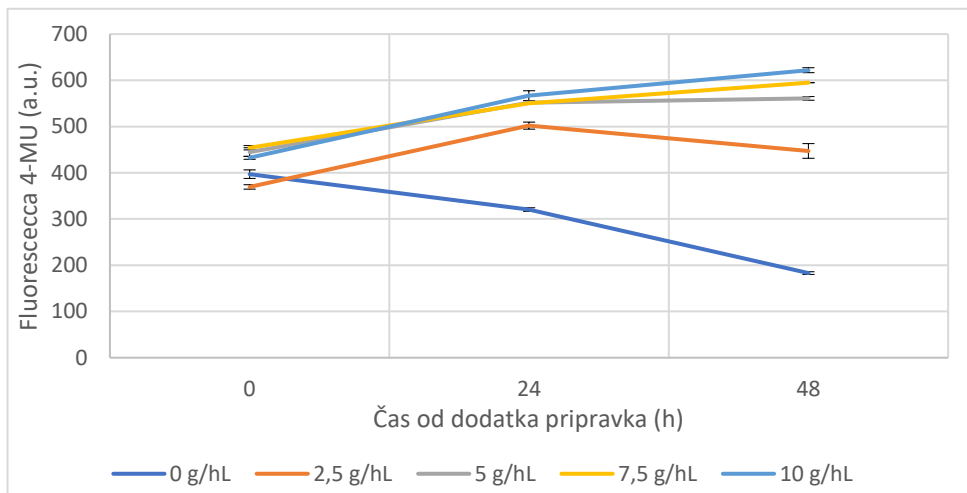
Pripravljene vzorce – skupaj 15, smo najprej temperirali na sobno temperaturo. Med tem smo pripravili reagent, 1 mM raztopino 4-metilumbeliferil β-D-glukopiranozid (4-MUG) (Sigma-Aldrich, Nemčija), ki je služil kot substrat za encim beta-glukozidazo. S pomočjo encima se 4-MUG pretvori v fluorescirajoč produkt 4-metilumbeliferil (4-MU), ki ga lahko detektiramo s fluorimetrom. Večja kot je beta-glukozidazna aktivnost, višja je fluorescenca vzorca, ker je nastalo več produkta (Caymanchem, 2024).

Za zaustavitev reakcije smo uporabili 0,5 M natrijev karbonat (Na₂CO₃, Merck, Nemčija). V vsako epico z 0,5 mL vzorca smo dodali 0,5 mL reagenta 4-MUG in reakcijsko zmes 1 h inkubirali pri 37 °C v vodni kopeli WB - 30 (Kambič, Slovenija). Po 1 h smo v vse epice dodali 0,5 mL Na₂CO₃, da smo zaustavili delovanje encima. Vzorec smo nato centrifugirali 5 min pri 15000 vrt./min. na centrifugi Eppendorf 5424 R (Eppendorf, Nemčija). Odpipetirali smo 1 mL supernatanta v fluorimeterske kivete, v katere smo pred meritvijo dodali še 1,5 mL miliQ vode.

Fluorescenco smo merili na fluorescenčnem spektrofotometru Cary Eclipse (Varian, ZDA). Meritve smo izvedli pri napetosti 500 V in vzbujevalni valovni dolžini 365 nm ter emisijski valovni dolžini 445 nm. Vsako meritev smo izvedli v 2 paralelakah.

3 REZULTATI

V poskusu smo želeli preveriti vpliv koncentracije encimskega pripravka na skupno beta-glukozidazno aktivnost vzorca, pri čemer je večja učinkovitost encima sovpadala z večjo fluorescenco vzorca. Vir encima so predstavljale tako kvasovke kot pripravek Aromazyme. Iz slike 2, lahko vidimo, da so si znotraj vzorcev, fermentiranih z istimi kvasovkami začetne vrednosti fluorescenc takoj ob dodatku encima podobne. Po 24h in 48h od začetka vzorčenja opazimo pri vzorcih brez dodatka encima padec glukozidazne aktivnosti. Razlog za takšno obliko diagrama je, da je fermentacija potekala že 3 dni pred vzorčenjem in se je ob prvem vzorčenju - točka 0h najverjetneje že začela upočasnjevati. Iz predstavljenega lahko sklepamo, da kvasovke več encima beta-glukozidaze izločajo v prvem delu fermentacije, tj. v fazi, ko se število kvasnih celic eksponentno povečuje, torej v tako imenovani log fazi, ko je njihova aktivnost na vrhuncu (Zhang in sod., 2021). Takrat je tudi poraba sladkorja in posledično tvorba etanola, CO₂ in aromatičnih (estri in ostali višji alkoholi) spojin najbolj intenzivna (Klimzcak in Cioch, 2022).



Slika 2: Grafični prikaz časovne odvisnosti in koncentracije dodanega pripravka Aromazyme na intenziteto fluorescence 4-MU s standardnim odmikom.

Po 24 h od dodatka 2,5 g/hL encima, intenziteta izmerjene fluorescence (a.u. - arbitrary units) ne sledi trendu vzorcev z višjim dodatkom encima Aromazyme, ampak trendu vzorcev brez dodatka le tega, tako se glukozidazna aktivnost vzorcev z najnižjim dodatkom encima po 48h celo zniža v primerjavi z glukozidazno aktivnostjo izmerjeno po 24h. Polovičen dodatek priporočene količine pripravka ima torej manjšo vlogo kot lastna proizvodnja encima s strani kvasovk. Ob večjem dodatku pripravka se aktivnost čez 24 h poveča, vendar je

relativna razlika med dodatkom 5 g/hL ali 10 g/hL priprava le okoli 10 %. Nekoliko večji relativni porasti aktivnosti so opazni pri vzorcih, kjer je 1 hL piva vseboval 5 g Aromazyme-a je bila ta 70 % (primerjava 0 g/hL in 5 g/hL) (Korat, 2024).

Preglednica 1: Tabelarni prikaz spreminjanja fluorescence 4-MU v odvisnosti od količine ABV Aromazyme in časa izpostavljenosti.

količina encima	fluorescenca 4-MU (a.u.)		
	0h	24h	48h
0 g/hL	396,9 ± 9,1	320,4 ± 3,8	183,0 ± 2,9
2,5 g/hL	369,4 ± 4,7	502,1 ± 7,6	447,2 ± 15,8
5 g/hL	444,7 ± 9,4	551,4 ± 0,9	560,9 ± 3,9
7,5 g/hL	454,1 ± 4,9	550,6 ± 0,3	594,9 ± 0,6
10 g/hL	432,4 ± 3,3	566,7 ± 10,1	621,8 ± 5,4

Po 48 h se razlike med dodatkom različnih količin encima le opazijo. Večji dodatek vodi v nadaljnjo rast aktivnosti, medtem ko se pri manjšem dodatku aktivnost začne počasi nižati. Aktivnost pri BRV-97 kvasovkah po 48 h so bile pri vseh dodatkih nad 5 g/hL višje kot pri 24h. uporaba encimskega pripravka pri koncentraciji 10 g/hL ne nakazuje 2-krat večje aktivnosti kot 5 g/hL, porast je zgolj minimalen (Slika 2).

4 ZAKLJUČEK

Iz poskusa smo ugotovili, da dodatek pripravka ABV Aromazyme dejansko poveča glukozidazno aktivnost, vendar pa je aktivnost močno pogojena z vrsto kvasovk in samim potekom fermentacije Kumar in sod. (2023), kar ima lahko za posledico povečan izkoristek fermentacije in s tem tvorbo aromatičnih spojin, ki lahko imajo odločujoč vpliv na aromo piva. Iz predstavljenih rezultatov sledi, da višji kot je dodatek pripravka Aromazyme v pivo, višja je glukozidazna aktivnost. Kot nadaljevanje predstavljenega eksperimenta imamo v planu v obstoječih vzorcih piva posneti t.i. aromagrame z uporabo plinske kromatografije sklopljene z masno selektivnim detektorjem (GC-MS), z namenom ugotoviti ali višja vsebnost dodatka ABV Aromazyme vpliva na višje koncentracije hmeljnih eteričnih olj v pivu in posledično na aromo piva.

5 VIRI

- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., & Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 107–115
- Caymanchem. 2024. 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucopyranoside, ZDA, Cayman chemicals
- Cisowska K. J., Powalowska D. S., Szczepaniak O., Kmiecki D., Przeor M., Michalowska A. G., Piontek J. C., Kogut M. S., Szulc P. (2019). Composition and in vitro effects of cultivars of *Humulus lupulus* L. hops on cholinesterase activity and microbial growth. *Nutrients*, 11, 1377

- Forster, A., Gahr, A., & Opstaele, F. (2014). On the transfer rate of geraniol with dry hopping. *BrewingScience*, 67, 60
- Haslbeck, K., Bub, S., von Kamp, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., & Coelhan, M. (2018). The influence of brewing yeast strains on monoterpene alcohols and esters contributing to the citrus flavour of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 403–415
- Keukeleire D. D. Fundamentals of beer and hop chemistry. Belgija, Fakulteta za farmacija. 2000
- King A. J., Dickinson R. (2003). Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Research*, vol 3, 53-62
- Klimczak K., Cioch S. M. (2022). Application of Kveik yeasts for beer production. *Advances in Food Processing Technology*: 200-206
- Klimczak K., Cioch S. M. (2022). Biotransformation of hops-derived compounds in beer – a review, *Acta universitatis cibiniensis series e: food technology 1*: Vol. 26, 1-13
- Kumar A., Warburton A., Silcock P., Bremer P. J., Eyres G. T. (2023). Yeast strain influences the hop-derived sensory properties and volatile composition of beer. *Foods*, 12, 5: 1064
- Pangzhen Z., Ruige Z., Sameera S., Renyou G., Zhongxiang F.(2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review, *Food Microbiology*, vol 100
- Roberts T.R. (2016). Hops. V: Brewing materials and processes. Bamforth C. W. ZDA. Academic Press, 47-75
- Roberts, M.T., Dufour J.P., Lewis A.C., (2004). Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC/GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *Journal of Separation Science*, 27, 473-478
- Svedlund N., Evering S., Gibson B., Krogerus K. (2022). Fruits of their labour: biotransformation reactions of yeasts during brewery fermentation. *Appl Microbio Biotechnol*, 106: 4929-4944
- Takoi K., Itoga Y., Takayanagi J., Matsumoto I. and Nakayama Y. (2016). Control of hop aroma impression of beer with blend-hopping using geraniol-rich hop and new hypothesis of synergy among hop-derived flavour compounds. *Brewing Science*, 69: 85-93
- Technical Data Sheet. ABV Aromazyme. Montreal, Lallemand Inc.: 2 str, 2020.
- Xiaoyu H., Qiuxing Q., Chenyu L., Xiaoxuan Z., Fangxu S., Mengjiao A., Ying C., Xiuqin W., Weidong H., Jicheng Z., Yilin Y. (2023). Application of non-Saccharomyces yeasts with high β -glucosidase activity to enhance terpene-related floral flavor in craft beer. *Food Chemistry*, 404, B: 134726

VSEBNOST KANABINOIDOV V RAZLIČNIH FENOTIPIH KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.) CARMAGNOLA SELECTED IN SELEKCIJE FINOLA

Marjeta ERŽEN¹, Iztok Jože KOŠIR², Miha OCVIRK³, Samo KREFT⁴ in Andreja ČERENAK⁵

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 4. 11. 2024

Sprejeto / Accepted: 4. 12. 2024

Izvleček

Konoplja vsebuje zanjo specifične sekundarne metabolite kanabinoide, ki imajo veliko pozitivnih učinkov na zdravje ljudi in živali. Zaradi dvodomnosti in tujeprašnosti vrste ter populacijskih sort pogosto prihaja do pojava različnih fenotipov znotraj sorte. V naši raziskavi smo glede na vizualne lastnosti znotraj sorte Carmagnola selected (CS) in selekcije Finola odbrali različne fenotipe ter pri odbranih vzorcih analizirali kanabinoidni profil, kjer smo določili vsebnost 10 različnih kanabinoidov s tehniko HPLC. Podatke smo statistično obdelali ter ugotovili, da je bila najvišja vsebnost kanabinoida CBD-A pri fenotipih selekcije Finola (6,36–6,59 %), najvišja vsebnost CBG-A je bila pri fenotipu CI (1,62 %) najvišja vsebnost THC-A pa prav tako pri fenotipu CI (0,91 %). Z analizo PCA smo ugotovili, da se sorta CS in selekcija Finole med sabo ločita, medtem ko se na podlagi povprečij fenotipov in analiziranih kanabinoidov znotraj sorte ločita le fenotipa sorte CS. Z izračunom celokupnih vsebnosti kanabinoidov in razmerja med kanabinoidoma THC in CBD smo ugotovili, da lahko fenotip CI uvrstimo v kemotip II, vse ostale kemotipe pa v kemotip III. Fenotipi selekcije Finola so imeli daleč najvišjo celokupno vsebnost kanabinoida CBD (6,18–6,42 %).

Ključne besede: konoplja, kanabinodi, fenotipi, *Cannabis sativa*, CBD, THC

CANNABINOIDS CONTENT IN DIFFERENT HEMP (*Cannabis sativa* L.) PHENOTYPES OF CARMAGNOLA SELECTED AND FINOLA SELECTION

Abstract

Hemp contains specific secondary metabolites, the cannabinoids, which have numerous positive effects on human and animal health. Due to the dioecious nature and cross-pollination of the species as well as population varieties, different

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: marjeta.erzen@ihps.si

² Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

³ Dr., IHPS, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

⁴ Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, e-pošta: samo.kreft@ffa.uni-lj.si

⁵ Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

phenotypes often occur within a variety. In our study, different phenotypes were determined based on visual traits within the selected variety Carmagnola selected (CS) and the Finola selection. The cannabinoid profile in the selected samples was determined based on 10 different cannabinoids using HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) technology. The data were statistically analyzed and it was found that the highest content of the cannabinoid CBD-A was found in the phenotypes of the Finola selection (6.36 – 6.59%), the highest CBG-A content was in the CI phenotype (1.62%) and the highest THC-A content was also in the CI phenotype (0.91%). Using principal component analysis (PCA), we found that the CS variety and the Finola selection differed from each other. However, based on the average phenotypes and analyzed cannabinoids within the variety, only CS phenotypes were distinguishable. According to the total cannabinoid content and the ratio between THC and CBD, it was concluded that the CI phenotype can be classified as chemotype II, while all other chemotypes can be classified as chemotype III. The Finola selection phenotypes had the highest overall CBD content (6.18 – 6.42%).

Key words: Hemp, cannabinoids, phenotypes, *Cannabis sativa*, CBD, THC

1 UVOD

Kanabinoidi so sekundarne spojine, ki se značilne predvsem za konopljo. Spadajo v skupino terpenofenolnih snovi. Največ kanabinoidov se tvori v neoplojenih ženskih socvetjih (do 30 %), natančneje v glandularnih trihomih (do 60 %). V oplojenih cvetovih se nahaja do 13 % kanabinoidov, v listih do 0,06 % in v steblih do 0,02 %. V semenih in koreninah konoplje se kanabinoidi ne nahajajo (Russo in Marcu, 2017). Seveda pa je njihova vsebnost odvisna od številnih dejavnikov, kot so sorta, starost rastline, rastnih razmer (medvrstna razdalja, vlaga, prehrana, svetloba, čas spravila) (Andre in sod., 2016).

Kanabinoidi nastajajo po dveh biosintetskih poteh, in sicer po poliketidni poti, ki vodi do olivetolne kisline, in po plastidni 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfatni poti, ki vodi do geranil pirofosfata. Preko obeh prekurzorjev se tvori kanabinoid CBG-A, ki je prekurzor za kanabinoide THC, CBD in CBC. THC-A nastaja, ko sintaza THC-A pretvori kanabinoid CBG-A v THC-A, CBD-A nastane, ko sintaza CBD-A pretvori CBG-A v CBD-A, CBC-A nastane, ko sintaza CBC-A pretvori CBG-A v CBC-A (Andre in sod., 2016).

Konopljo lahko glede na njen kanabinoidni profil in razmerje med kanabinoidi uvrstimo v 5 različnih kemotipov. V kemotip I spadajo rastline konoplje, katerih vsebnost CBD ni višja od 0,5 %, vsebnost THC pa je višja od 0,5 %, vsebnost THC je lahko v takšnih primerih tudi višja kot 20 %, kemotip II oz. mešani kemotip, kjer je razmerje med kanabinoidoma THC in CBD približno enako (1 : 1), kemotip III, kjer vsebnost THC ne presega 0,3 % vsebnost CBD pa je višja od 0,5 % (Small in Beckstead, 1973), kemotip IV, kjer je vsebnost kanabinoida CBG višja od 0,3 %, vsebnost CBD pa nižja od 0,3 % ter kemotip V, v katerem kanabinoidov ni mogoče zaznati (Fournier in sod., 1987). Kemotip se v rastlini določi že zelo zgodaj v rastni dobi in se s starostjo rastline ne spreminja (Vogelmann in sod., 1988). Kemotipa I

in II lahko poimenujemo indijska konoplja, kemotipe III, IV in V pa navadna konoplja (Schilling in spod., 2020).

Kanabinoidi imajo številne pozitivne učinke na zdravje ljudi in živali. Vplivajo na zdravljenje bolezni, kot so Huntingtonova, Parkinsonova, Alzheimerjeva bolezen, epilepsija, multipla skleroza, lajšanje bolečin, zdravljenje diabetesa, vnetij, motenj prehranjevanja (Namdar in sod., 2018).

Zaradi dvodomnosti in tujeprašnosti rastlin konoplje lahko prihaja do navzkrižnega križanja med dvema različnima sortama (Clarke in Merlin, 2013). Pri konoplji imamo populacijske sorte, kar pogosto pomeni heterozigotnost in neizenačenost sorte. Vse to so razlogi za genetsko nestabilnost sort, segregacije in pogostega pojava različnih fenotipov znotraj sorte (Barcaccia in sod., 2020). Tako so si rastline lahko različne tako po videzu kot po kemijskem profilu sekundarnih metabolitov, kot so komponente eteričnega olja ali kanabinoidi.

Na podlagi zgoraj naštetih razlogov za neizenačenost sort konoplje smo v naši raziskavi preučevali različne fenotipe znotraj sorte Carmagnola selected (CS) in selekcije Finola, ki smo jih odbrali glede na vizualne lastnosti rastlin, saj smo želeli opredeliti njihov kemijski oz. kanabinoidni profil teh fenotipov in odkriti, ali se na kemijskem nivoju tudi razlikujejo tako kot se razlikujejo glede na morfološke lastnosti.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Rastlinski material in zasnova poskusa

V raziskavi smo poskus izvedli na dveh različnih sortah industrijske konoplje, in sicer na sorti Carmagnola selected (CS) in na selekciji Finole. Sorta CS je bila posejana na lokaciji Ljubno ob Savinji (koordinate: 46.341626, 14.843405). Njiva je bila velika 1080 m². Setev smo izvedli s poskusno sejalnico Wintersteiger v mesecu juliju leta 2019. Medvrstna razdalja je bila 75 cm. Selekcijo Finola smo posejali na lokaciji Žalec (koordinate: 46.248241, 15.160317). Njiva je bila velika 3 ha. Setev je potekala konec maja leta 2019 na medvrstni razdalji 75 cm. Na njivi smo dvakrat v sezoni (dokler rastline niso bile dovolj visoke) mehansko zatirali plevel, in sicer enkrat ročno ter enkrat z motokultivatorjem. Da smo v posevku ohranjali samo ženske rastline, smo v času cvetenja posevek skozi celotno rastno dobo enkrat do dvakrat tedensko pregledovali in odstranjevali moške rastline. S tem smo preprečili oprašitev ženskih rastlin. Proti koncu rastne dobe smo znotraj vsake sorte na podlagi vizualnih lastnosti (velikost rastline, barva rastline, razvejanost rastline, dolžina in kompaktnost socvetij, velikost listov in antociansko obarvanje listnih pecljev) določili končne fenotipe. Pri sorti CS smo določili dva različna fenotipa (CI in CII), znotraj selekcije Finola pa štiri različne fenotipe (FI, FII, FIII, FIV). Rastline so zacvetele konec avgusta, vzorčenje socvetij je potekalo konec septembra oz. v začetku oktobra. Med rastno dobo posevka nismo dodatno gnojili ali namakali, prav tako nismo uporabili fitofarmacevtskih sredstev.

Pred samo setvijo smo izvedli analizo tal. pH njive je bil 5,7, preskrbljenost tal s fosforjem kot P_2O_5 93,1 mg/100 g tal in preskrbljenost s kalijem kot K_2O 28,9 mg/100 g tal. Njiva je vsebovala 4,8 % organske snovi.

2.2 Priprava vzorcev

Socvetja smo po vzorčenju pripravili za sušenje v sušilnici tako, da smo okrog socvetij odstranili večje liste ter socvetja razrezali na manjše dele. Sušili smo jih v sušilnih omarah pri 30 °C. Po sušenju smo socvetja zapakirali v plastične vrečke ter jih zamrzili v skrinji na -20 °C. Pred izvedbo analiz smo socvetja zmleli s kavnim mlinčkom.

2.3 Določanje vsebnosti kanabinoidov

Za določanje vsebnosti kanabinoidov smo uporabili 5 rastlin na fenotip. Vsebnost kanabinoidov smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z napravo Agilent Series 1200, opremljenim z DAD detektorjem (Agilent Technologies Inc., ZDA), kjer smo analizirali 10 različnih kanabinoidov. Za ekstrakcijo smo v 50 mL centrifugirke zatehtali 200 ± 9 mg zmeltega socvetja. Dodali smo 25,0 mL 80 % etanola (J. T. Baker, ZDA) ter zmes vrtinčili 30 s. Vzorce smo nato dali v ultrazvočno kopel (15 minut), saj smo želeli pospešiti ekstrakcijo. Vzorce smo med ekstrakcijo v ultrazvočni kopeli vrtinčili na vsake 5 minut (Mudge in sod., 2017). Vzorce smo injicirali v HPLC in komponente ločili na kolonijo Rapto ARC-18 (oktadecilsilan) velikosti 2,7 μ m, 150 mm $\times$ 4,6 mm ID (Restek, ZDA). Za mobilno fazo A smo uporabili 5 mM amonijevega dormata (Sigma Aldrich, ZDA) in 0,1 % mravljinčne kisline (Scharlau, Španija) redčene v deionizirani vodi s končnim pH 3,1. Za mobilno fazo B smo uporabili acetonitril (sigma Aldrich, ZDA) in 0,1 % mravljične kisline. Razmerje med mobilnima fazama je bilo 25 % mobilne faze A in 75 % mobilne faze B (Mudge s sod., 2017). Pri čemer smo uporabili pretok 1,5 mL/min. Za mobilni fazi smo uporabili izokratsko elucijo. Kalibracijska krivulja za standarde je bila pripravljena pri naslednjih koncentracijah: 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL in 250 μ g/mL, pri čemer je bil korelacijski koeficient višji od 0,9975. Pripravljene vzorce smo filtrirali skozi filter PTFE (0,45 μ m) (Macherey Nagel AG, Nemčija), volumen injiciranja je bil 5 μ L, detekcija je potekala pri valovni dolžini 228 nm. Identifikacijo komponent smo izvedli v programu ChemStation za LC (Agilent Technologies, ZDA).

Za umeritveno krivuljo smo vsak standard sedemkrat redčili, standarde v kislini obliki smo redčili v acetonitrilu, standarde v nekislini obliki pa v metanolu. Delež kanabinoidov (%) in relativno standardno deviacijo (RSD %) smo izračunali iz umeritvene krivulje.

2.4 Statistična analiza

Osnovno statistično analizo (povprečja, standardni odklon, relativno standardno deviacijo) smo izvedli v programu MS Excel, multifaktorsko analizo ANOVA z Duncanovim testom smo izvedli v programu Statgraphics Centurion Software 19.4.04 (Statgraphics Technologies, Inc. ZDA), analizo PCA pa smo izvedli v

programu OriginPro 2021 (OriginLab, ZDA), pri čemer smo podatke prikazali v ravnini prvih dveh osi.

2.5 Izračun celokupne vsebnosti kanabinoidov

Za kanabinoide Δ9-THC, CBD in CBG smo izračunali celokupne vsebnosti kanabinoidov. Za izračun smo uporabili sledeče enačbe (Glivar in sod., 2020):

- 1) % celokupnega Δ9-THC = % Δ9-THC + (% Δ9-THC-A x 0.877),
- 2) % celokupnega CBD = % CBD + (% CBD-A x 0.877),
- 3) % celokupnega CBG = % CBG + (% CBG-A x 0.878).

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

3.1 Določanje vsebnosti kanabinoidov

V socvetjih šestih različnih fenotipov smo analizirali 10 različnih kanabinoidov (CBD, CBD-A, CBG, CBG-A, Δ9-THC, Δ9-THC-A, CBC, CBC-A, CBN, Δ8-THC). Vsebnosti le-teh so predstavljene v preglednici 1. Zaradi vsebnosti CBN in Δ8-THC pod mejo detekcije je v preglednici prikazanih samo 8 kanabinoidov.

Preglednica 1: Povprečna vsebnost kanabinoidov (%) pri 6 različnih fenotipih sorte Carmagnola selected in selekcije Finola z izračunanim standardnim odklonom (SD) in razlikami med fenotipi na podlagi kanabinoidov določenih z analizo ANOVA in Duncanovim testom

	CI	SD	CII	SD	FI	SD	FII	SD	FIII	SD	FIV	SD
CBD	0,05 ^a	0	0,10 ^a	0	0,60 ^b	0,1	0,78 ^c	0,1	0,61 ^b	0,1	0,64 ^b	0,2
CBD-A	1,70 ^a	1,5	3,78 ^b	0,9	6,48 ^c	0,4	6,41 ^c	0,4	6,36 ^c	0,3	6,59 ^c	0,2
CBG	0,04 ^{bc}	0	0,04 ^{bc}	0	0,05 ^{cd}	0	0,05 ^{cd}	0	0,06 ^d	0	0,06 ^d	0
CBG-A	1,62 ^b	2,4	0,44 ^a	0,2	1,00 ^{ab}	0,4	0,63 ^{ab}	0,2	0,91 ^{ab}	0,2	1,11 ^{ab}	0,3
Δ9-THC	0,05 ^{abc}	0,1	0,04 ^{abc}	0,1	0,08 ^{cd}	0	0,11 ^d	0	0,08 ^{cd}	0	0,08 ^{cd}	0
Δ9-THC-A	0,91 ^{ab}	1,8	0,75 ^{ab}	1,3	0,50 ^{ab}	0,1	0,46 ^{ab}	0,1	0,47 ^{ab}	0,1	0,51 ^{ab}	0,1
CBC	0,01 ^{ab}	0	0,02 ^a	0	0,05 ^c	0	0,06 ^d	0	0,05 ^c	0	0,05 ^c	0
CBC-A	0,20 ^a	0,1	0,27 ^a	0,1	0,62 ^b	0,1	0,59 ^b	0,1	0,64 ^b	0,1	0,64 ^b	0,1

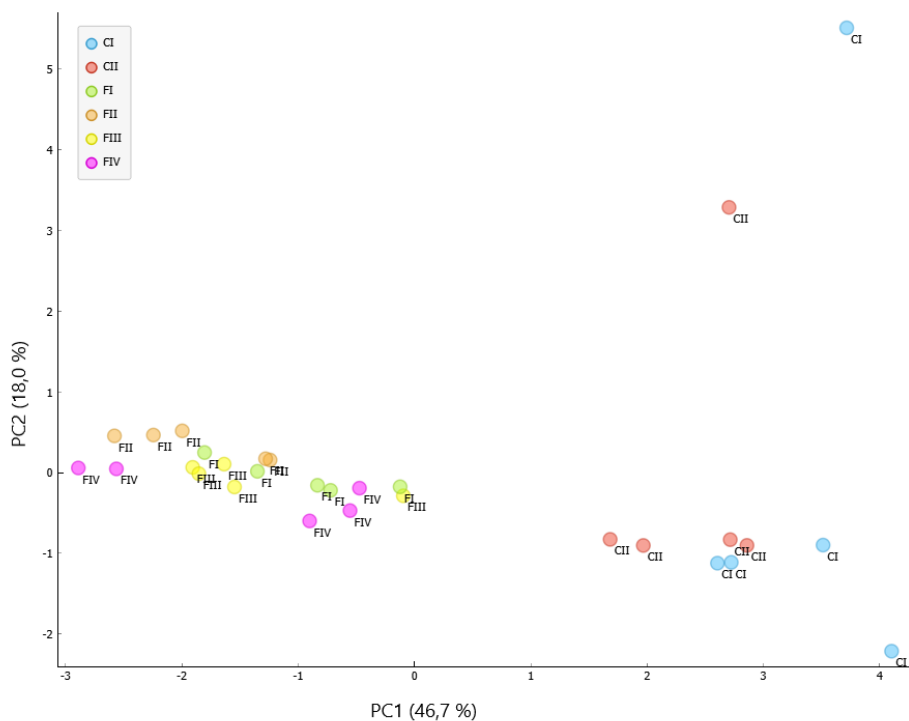
Iz preglednice 1 je razvidno, da je bila najvišja vsebnost kanabinoida CBD pri fenotipu FII (0,78 %), pri čemer se je ta fenotip tudi statistično razlikoval od ostalih fenotipov. Najnižja vsebnost pa je bila pri fenotipu CI (0,05 %). Najvišja vsebnost CBD-A je bila pri fenotipih selekcije Finola (6,36 % - 6,59 %), najnižja pa pri fenotipu CI (1,70 %). Fenotipa sorte CS sta se glede na vsebnost CBD-A statistično

razlikovala med sabo. Vsebnosti CBG so bile v istem rangju pri vseh fenotipih, in sicer od 0,04 % do 0,06 %, pri čemer sta se fenotipa CI in CII statistično razlikovala od fenotipov FIII in FIV. Najvišja vsebnost CBG-A je bila pri fenotipu CI (1,62 %), najnižja pa pri fenotipu CII (0,44 %), pri čemer sta se ta dva fenotipa tudi med seboj statistično razlikovala. Najvišja vsebnost THC je bila pri fenotipu FII (0,11 %), najnižja pa pri fenotipu CII (0,04 %). Najvišja vsebnost THC-A je bila pri fenotipu CI (0,91 %), najnižja pa pri fenotipu FII (0,46 %). Najvišja vsebnost CBC je bila pri fenotipu FII (0,06 %), najnižja pa pri fenotipu CI (0,01 %). Najvišja vsebnost CBC-A je bila pri fenotipih FIII in FIV (0,64 %), najnižja pa pri CI (0,20 %). Fenotip FII se je znotraj sorte na podlagi CBC-A statistično razlikoval od ostalih fenotipov. Fenotipa CI in CII sta se značilno razlikovala pri kanabinoidih CBD-A in CBG-A.

Vsebnost različnih kanabinoidov v braktejah pri 15 različnih sortah industrijske konoplje so preučevali Glivar in sod. (2020), kjer so pri sorti Carmagnola ugotovili višje vsebnosti pri kanabinoidih, ki smo jih preučevali tudi v naši raziskavi, razen pri kanabinoidu THC-A, ki pa je imel v našem primeru višjo vsebnost. Ker Carmagnola selected izvira iz sorte Carmagnola, smo lahko primerjali njune vsebnosti.

Vsebnosti pri selekciji Finole pa so bile pri vseh kanabinoidih višje v naši raziskavi kot pa vsebnosti pri sorti Finola v raziskavi Glivar in sod. (2020).

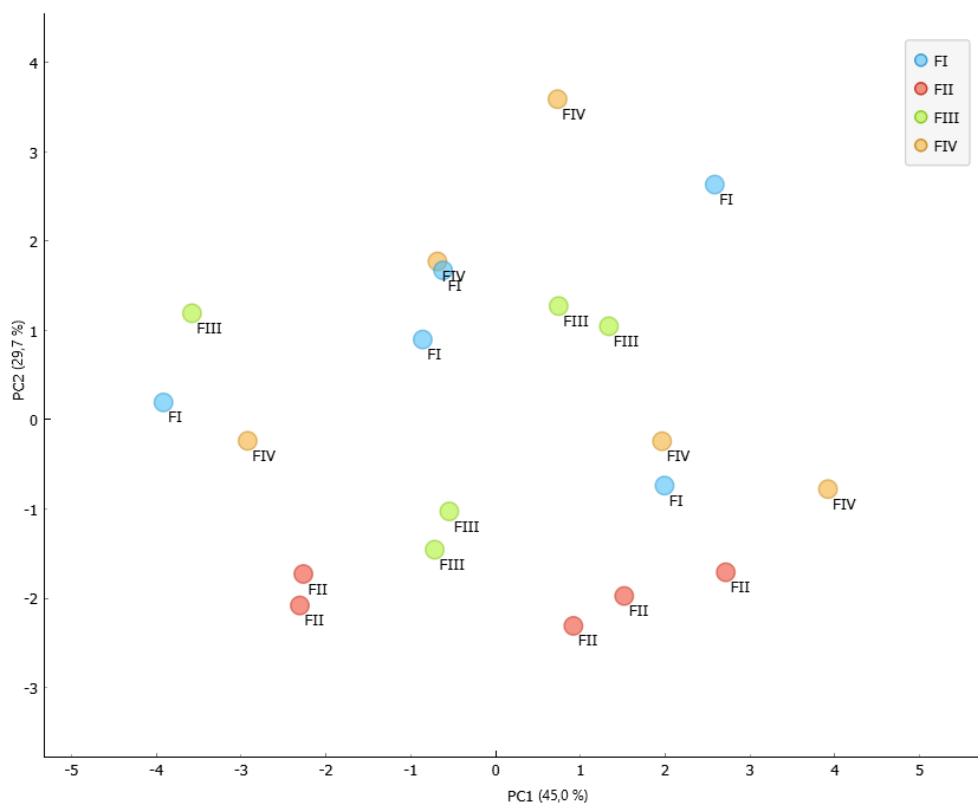
Razliko med povprečji fenotipov na podlagi kanabinoidov smo preverili še z analizo PCA, pri čemer smo kot vhodni podatek uporabili vseh 10 analiziranih kanabinoidov, določenih pri fenotipih sort CS in selekcije Finola. Na sliki 1 je prikazan graf analize PCA glede na povprečja vseh fenotipov na podlagi 10 analiziranih kanabinoidov.



Slika 1: Graf metode glavnih osi (PCA) izrisan na podlagi posameznih povprečij fenotipov in povprečnih vrednosti kanabinoidov pri sorti Carmagnola selected in selekciji Finole. Graf prikazuje razporeditev vzorcev v ravnini prvih dveh osi (PC1 pojasni 46,7 %, PC2 pojasni 18,0 %). Skupna varianca je bila 64,7 %.

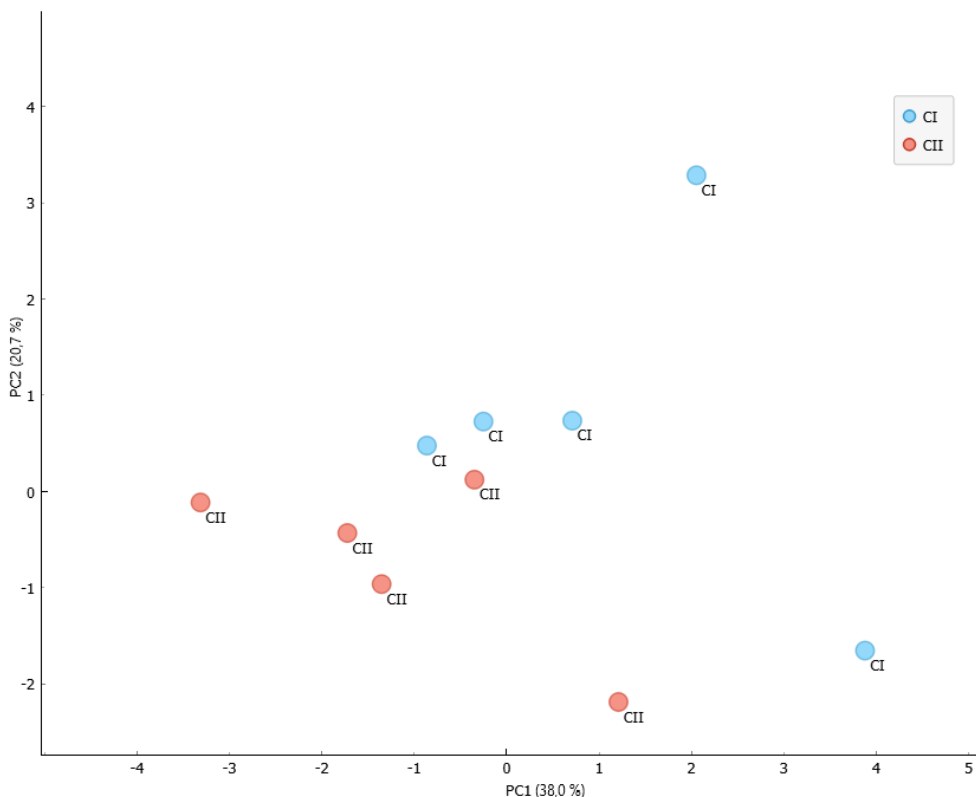
S slike 1 je razvidno, da se sorti glede na povprečja kanabinoidov ločita med sabo. Prav tako se med sabo ločita fenotipa sorte CS, medtem ko fenotipov znotraj selekcije Finola ni bilo mogoče ločiti.

Analizo PCA smo izvedli še za vsako sorto posebej, kjer smo prav tako za vhodne podatke izbrali 10 kanabinoidov določenih pri fenotipih vsake sorte. S slike 2 je razvidno, da tudi z analizo samo selekcije Finola fenotipov ni bilo mogoče ločiti med sabo.



Slika 2: Graf metode glavnih osi (PCA) izrisan na podlagi posameznih povprečij fenotipov in povprečnih vrednosti kanabinoidov pri selekciji Finola. Graf prikazuje razporeditev vzorcev v ravni prvih dveh osi (PC1 pojasni 45,0 %, PC2 pojasni 29,7 %). Skupna varianca je bila 74,7 %).

Analizo PCA smo izvedli še za sorto CS (slika 3), kjer smo prav tako za vhodne podatke uporabili 10 analiziranih kanabinoidov določenih pri fenotipih. Tukaj pa je mogoče, tako kot pri sorti Finola (slika 1), znotraj sorte razlikovati med posameznima fenotipoma.



Slika 3: Graf metode glavnih osi (PCA) izrisan na podlagi posameznih povprečij fenotipov in povprečnih vrednosti kanabinoidov pri sorti Carmagnola selected. Graf prikazuje razporeditev vzorcev v ravni prvih dveh osi (PC1 pojasni 38,0 %, PC2 pojasni 20,7 %). Skupna varianca je bila 58,7 %).

Primerjava med posameznimi fenotipi in preučevanima sortama je pokazala, da je selekcija Finole bolj uniformna kot sorta CS, čeprav ta sorta izvira iz stare italijanske sorte Carmagnola, katero s pridom uporabljajo pri žlahtnjenju novih sort (Ranalli, 2004).

Našo raziskavo smatramo kot eno prvih raziskav, kjer se preučuje vsebnost kanabinoidov v različnih fenotipih znotraj sorte.

3.2 Celokupna vsebnost kanabinoidov CBG, CBD in $\Delta 9$ -THC

Zaradi visoke temperature prihaja do dekarboksilacije karboksilne oblike kanabinoidov v ne-kislinsko obliko. Večina rezultatov, ki jih podajajo forenzični laboratoriji, je podana kot skupna vsota kislinske in ne-kislinske oblike kanabinoidov (Wang in sod., 2016), zato je bilo smiselno tudi v naši raziskavi izračunati celokupne vsebnosti teh kanabinoidov. Preglednica 2 prikazuje celokupne vsebnosti kanabinoidov CBG, CBD in $\Delta 9$ -THC za vsak posamezen fenotip obeh preučevanih sort.

Preglednica 2: Celokupna vsebnost kanabinoidov CBG, CBD in Δ^9 -THC pri fenotipih sorte Carmagnola selected in selekcije Finola ter prikaz razmerja med kanabinoidoma Δ^9 -THC in CBD

Vzorec	Celokupni CBG	Celokupni CBD	Celokupni Δ^9 -THC	Razmerje Δ^9 -THC : CBD
CI	1,453	1,538	0,844	1 : 2
CII	0,426	3,421	0,704	1 : 5
FI	0,928	6,283	0,518	1 : 12
FII	0,605	6,398	0,510	1 : 13
FIII	0,851	6,185	0,494	1 : 13
FIV	1,040	6,422	0,522	1 : 13

Najvišja celokupna vsebnost kanabinoida CBG je bila pri fenotipu CI (1,45 %), najnižja pa pri fenotipu CII (0,43 %). Najvišja celokupna vsebnost CBD je bila pri fenotipih selekcije Finola (6,19–6,42 %), najnižja pa pri fenotipu CI (1,54 %). Najvišja celokupna vsebnost THC je bila pri fenotipu CI (0,84 %), najnižja pa pri fenotipu FIII (0,49 %). Velika razlika se vidi tudi pri celokupni vsebnosti CBD, kjer imajo precej visoko vsebnost vsi fenotipi selekcije Finola. Če pogledamo razmerja med THC in CBD, vidimo, da skoraj vsi fenotipi spadajo v kemotip III, se pravi, da imajo višjo vsebnost CBD kot THC, medtem ko ima fenotip CI skoraj enako razmerje med kanabinoidoma THC in CBD (1 : 2), ta fenotip lahko uvrstimo v kemotip II, kjer je razmerje med THC in CBD približno enako. Fenotipi selekcije Finola imajo približno enako razmerje med THC in CBD (1 : 12 oz. 1 : 13).

Glede na vsebnosti kanabinoidov in njihovih razmerij bi lahko določene fenotipe uporabili za nadaljnje žlahtnjenje za medicinske namene in uporabo v farmaciji. Fenotipi selekcije Finola imajo visoko celokupno vsebnost kanabinoida CBD, ki ima protivnetne, antipsihotične, antioksidativne učinke. Deluje pri zdravljenju bolezni, kot so Parkinsonova, Huntingtonova in Alzheimerjeva bolezen, epilepsija, multipla skleroza. Po drugi strani pa zmanjšuje negativne učinke kanabinoida THC, ki lahko povzročajo tesnobo, lakoto in tahikardijo (Bhattacharyya in sod., 2010; Russo in Marcu, 2017). Fenotip CI je imel najvišjo celokupno vsebnost CBG ter razmerje med kanabinoidoma THC in CBD 1 : 2. Kanabinoid CBG zmanjšuje vpliv bolečine, vnetij in občutljivosti na vročino ter deluje protiglivično. Deluje tudi pozitivno na zdravljenje raka prostate, okužbe z MRSA in zdravljenje psoriaze (Russo in Marcu, 2017).

4 ZAKLJUČEK

Zaradi populacijskih sort pri konoplji pogosto prihaja do nestabilnosti sort in pojava fenotipov znotraj sorte. V naši raziskavi smo med sabo primerjali različne fenotipe sorte CS in selekcije Finole glede na vsebnost 10 različnih kanabinoidov. Gre za eno prvih študij, kjer se določa vsebnost kanabinoidov v različnih fenotipih sort. Ugotovili smo, da so fenotipi znotraj selekcije Finola bolj uniformni, saj jih med sabo glede na vsebnosti merjenih kanabinoidov ni mogoče ločiti, medtem ko se fenotipa pri sorti CS razlikujeta med sabo. Glede na posamezne kanabinoide se

fenotipi med sabo razlikujejo, zato bi bilo v nadaljevanju smiselno fenotipe z določenimi višjimi vsebnostmi nekaterih kanabinoidov selekcionirati za nadaljnje zlahtnjenje.

5 VIRI

- Andre, C.M., Hausman, J.F., Guerriero, G., 2016. [Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019). Front Plant Sci 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Barcaccia, G., Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozzi, A., Borin, M., Bona, S., 2020. [Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573299). Front Plant Sci. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573299>
- Bhattacharyya, S., Morrison, P.D., Fusar-Poli, P., Martin-Santos, R., Borgwardt, S., Winton-Brown, T., Nosarti, C., O'Carroll, C.M., Seal, M., Allen, P., Mehta, M.A., Stone, J.M., Tunstall, N., Giampietro, V., Kapur, S., Murray, R.M., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Atakan, Z., McGuire, P.K., 2010. [Opposite effects of \$\delta\$ -9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology](https://doi.org/10.1038/npp.2009.184). Neuropsychopharmacology 35, 764–774. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.184>
- Clarke, R.C., Merlin, M.D., 2013. Cannabis: Evoluton and Ethnobotany, 1st ed. University of California Press.
- Fournier, G., Richez-Dumanois, C., Duvezin, J., Mathieu, J.P., Paris, M., 1987. [Identification of a new chemotype in Cannabis sativa: Cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects](https://doi.org/10.1055/s-2006-962705). Planta Med 53, 277–280. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962705>
- Glivar, T., Eržen, J., Kreft, S., Zagožen, M., Čerenak, A., Čeh, B., Tavčar Benkovič, E., 2020. [Cannabinoid content in industrial hemp \(Cannabis sativa L.\) varieties grown in Slovenia](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112082). Ind Crops Prod 145. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112082>
- Mudge, E.M., Murch, S.J., Brown, P.N., 2017. [Leaner and greener analysis of cannabinoids](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3). Anal Bioanal Chem 409, 3153–3163. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3>
- Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., Koltai, H., 2018. [Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.060). Ind Crops Prod 113, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.060>
- Ranalli, P., 2004. [Current status and future scenarios of hemp breeding](https://doi.org/10.1007/s10681-004-4760-0). Euphytica 140, 121–131. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4760-0>
- Russo, E.B., Marcu, J., 2017. [Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads](https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004), 1st ed, Advances in Pharmacology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>
- Schilling, S., Dowling, C.A., Shi, J., Ryan, L., Hunt, D., O'Reilly, E., Perry, A.S., Kinnane, O., McCabe, P.F., Melzer, R., 2020. [The Cream of te Crop: Bology, Breeding and Applications of Cannabis sativa](https://doi.org/10.22541/au.160139712.25104053/v2). Authorea. <https://doi.org/10.22541/au.160139712.25104053/v2>
- Small, E., Beckstead, H.D., 1973. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis. Lloydia 36, 144–165.
- Vogelmann, A.F., Turner, J.C., Mahlberg, P.G., 1988. [Cannabinoid composition in seedlings compared to adult plants of cannabis sativa](https://doi.org/10.1021/np50060a004). J Nat Prod 51, 1075–1079. <https://doi.org/10.1021/np50060a004>
- Wang, M., Wang, Y.H., Avula, B., Radwan, M.M., Wanas, A.S., Van Antwerp, J., Parcher, J.F., Elsohly, M.A., Khan, I.A., 2016. [Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry](https://doi.org/10.1089/can.2016.0020). Cannabis Cannabinoid Res 1, 262–271. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0020>

VSEBNOST KOMPONENT ETERIČNEGA OLJA V RAZLIČNIH FENOTIPIH NAVADNE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)

Marjeta ERŽEN¹, Iztok Jože KOŠIR², Miha OCVRK³, Samo KREFT⁴ in Andreja ČERENAK⁵

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 25. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 4. 12. 2024

Izvleček

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je glede na humano uporabo ena najstarejših rastlin na svetu. Poleg glavne skupine sekundarnih metabolitov - kanabinoidov vsebuje tudi drugo pomembno skupino, in sicer komponente eteričnega olja, katerih sinteza se vrši v glandularnih trihomih večinoma v ženskih socvetjih rastlin konoplje. V naši raziskavi smo preučevali enajst različnih fenotipov znotraj treh različnih sort navadne konoplje (CS, Tiborszallasi in selekcija Finole) na podlagi vsebnosti eteričnega olja (EO). Fenotipe smo določili na podlagi vizualnih lastnosti posameznih rastlin. Z metodo GC-FID smo določili osem glavnih komponent EO in na podlagi analize izvedli statistično analizo ANOVA in analizo PCA. Fenotipa CI in CII sorte CS sta se značilno razlikovala po vsebnosti monoterpenov in seskviterpenov, vsebnost mircena je bila najvišja pri fenotipu TI (29,9 rel. %), vsebnost α -pinena je bila najvišja pri fenotipu TIV (11,9 rel. %). Najvišjo vsebnost β -kariofilena je imel fenotip CI (21,3 rel. %), najvišjo vsebnost α -humulena pa je imel fenotip CI (8,8 rel. %). Z analizo PCA smo lahko glede na povprečne vsebnosti komponent eteričnega olja na podlagi vseh treh sort ločili posamezne sorte med seboj ter fenotipa znotraj sorte CS. Z analizo posameznih sort smo lahko znotraj sorte ločili le fenotipa sorte CS, medtem ko fenotipov znotraj ostalih dveh sort ni bilo mogoče ločiti.

Gljučne besede: konoplja, kanabinoidi, eterična olja, fenotipi, *Cannabis sativa*

COMPONENTS OF ESSENTIAL OILS IN DIFFERENT HEMP (*Cannabis sativa* L.) PHENOTYPES

Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.), one of the oldest plants used by humankind in the world, in addition to the main group of secondary metabolites - cannabinoids, also contains the second most important group, namely components of essential oil.

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: marjeta.erzen@ihps.si

² Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

³ Dr., IHPS, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

⁴ Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, e-pošta: samo.kreft@ffa.uni-lj.si

⁵ Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

The synthesis of these components occurs in glandular trichomes, mostly in the female flowers of hemp plants. In our research, we examined 11 different phenotypes within three different varieties of industrial hemp (CS, Tiborszallasi, and Finola selection), based on the content of essential oil (EO). Phenotypes were determined based on the visual characteristics of individual plants. Using the GC-FID method, we identified 8 main EO components and conducted statistical analysis ANOVA and PCA. The CI and CII phenotypes of CS variety differed significantly in the content of monoterpenes and sesquiterpenes. The content of myrcene was highest in the TI phenotype (29.9 rel. %), the content of α -pinene was highest in the TIV phenotype (11.9 rel. %), the highest content of β -caryophyllene was in the CI phenotype (21.3 rel. %), and the highest content of α -humulene was in the CI phenotype (8.8 rel. %). Through PCA analysis, we were able to separate individual varieties based on the average contents of component of essential oils across all three varieties and distinguish phenotypes within the CS variety. Analyzing individual varieties, we could also distinguish only the phenotypes of the CS variety, while phenotypes within the other two varieties could not be separated.

Key words: Hemp, cannabinoids, essential oils, phenotypes, *Cannabis sativa*

1 UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je znana zaradi svoje vsestranske uporabnosti, saj se jo uporablja tako v prehrani ljudi in živali kot tudi v medicini ter gradbeništvu, kot vir vlaknin za vrvi. Je enoletna, dvodomna rastlina, lahko pa se pojavijo tudi enodomne sorte (Hillig, 2005). Rastlina konoplje lahko zraste tudi do 5 m v višino, njeni rastni pogoji pa so močno okoljsko pogojeni (Raman in sod., 2017). Konoplja je najbolj znana predvsem zaradi vsebnosti kanabinoidov in komponent eteričnega olja (EO), ki se večinoma nahajajo v neoplojenih ženskih socvetjih, natančneje v glandularnih trihomih, ki so primarne strukture za sintezo teh sekundarnih metabolitov (Raman in sod., 2017).

EO so druga najbolj zastopana skupina sekundarnih metabolitov v konoplji in skupaj s kanabinoidi delujejo sinergistično (Namdar in sod., 2018). Komponente EO dajejo rastlini aromo, jo ščitijo pred patogeni in škodljivci, imajo vlogo privabljanja opraševalcev ter imajo pozitivne učinke na zdravje (Nuutinen, 2018a).

Sestava EO je fenotipsko pogojena in se v različnih sortah različno sintetizira. V trihomih se nahaja od 2 % do 20 % EO, z žlahtniteljskimi pristopi pa se ta odstotek lahko še poveča (Potter, 2009).

Terpene, ki predstavljajo večino komponent EO, delimo na dve glavni skupini, in sicer na monoterpene in seskviterpene. Monoterpeni nastajajo preko prekursorja geranil pirofosfat (GPP) in metileritritol fosfatne poti (MEP), seskviterpeni pa nastajajo po mevalonatni poti (MEV) s prekursorjem farnezil pirofosfatom (FPP) (Booth in sod., 2017; Booth in Bohlmann, 2019). Najpogostejši monoterpeni v konoplji so limonen, β -mircen, α -pinen in linalol, najpogostejši seskviterpeni pa E-kariofilen, kariofilen oksid, E- β -farnezen in β -kariofilen (Sommano in sod., 2020).

Mircen ima antioksidativni in antikarcenogen učinek, rastlini pa daje vonj po hmelju, α -pinen in β -pinen pozitivno delujeta na kognitivne zmožnosti, ki jih povzroča

negativni učinek THC (tetrahidrokanabidiol) ter delujeta antiseptično, rastlini pa dajeta vonj po borovcu. Limonen deluje protistresno in zvišuje vsebnost serotonina in dopamina, β -kariofilen pa deluje protivnetno, protibolečinsko, antikarcenogeno, protiglivično, gastroprotektivno, antibakterijsko, antioksidativno, neuroprotektivno, antiproliferativno in kot antidepresant (Sommano in sod., 2020).

Pojav različnih fenotipov znotraj sort konoplje je pogost pojav, zlasti ker so sorte večinoma dvodomne in prihaja do večje heterogenosti znotraj populacije (Small and Antle, 2003).

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali na kemijskem nivoju, natančneje na podlagi vsebnosti EO, obstajajo razlike, ki so vidne na fenotipskem nivoju. V ta namen smo analizirali enajst različnih fenotipov pri treh različnih sortah navadne konoplje. Poleg fenotipizacije sort na podlagi EO, smo želeli preučiti, ali kateri od 11 fenotipov vsebuje statistično višjo vsebnost enega izmed preučevanih komponent EO in je zaradi tega lahko bolj zanimiv za uporabo v zdravstvu.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Rastlinski material in zasnova poskusa

V raziskavi smo uporabili tri različne sorte konoplje in sicer sorti Carmagnola selected (CS) in Tiborszallasi ter selekcijo Finole. Sorti CS in Tiborszallasi sta bili posejani na lokaciji Ljubno ob Savinji na njivi velikosti 1080 m². Setev je potekala v začetku meseca julija leta 2019. Seme je bilo posejano s poskusno sejalnico Wintersteiger na medvrstno razdaljo 75 cm. Selekcijo Finole smo konec maja 2019, prav tako s poskusno sejalnico Wintersteiger, posejali na lokaciji Žalec na parceli velikosti 3 ha, z medvrstno razdaljo 75 cm. Rastline konoplje smo spremljali skozi celotno rastno dobo, odstranjevali moške rastline ter ob koncu rastne dobe (v času tehnološke zrelosti socvetij) na podlagi vizualnih lastnosti (velikost rastline, barva rastline, razvejanost rastline, dolžina in kompaktnost socvetij, velikost listov in antociansko obarvanje listnih pecljev) znotraj vsake sorte določili fenotipe. Pri sorti CS smo določili dva fenotipa (CI in CII), pri sorti Tiborszallasi pet fenotipov (TI, TII, TIII, TIV, TV) in pri selekciji Finole štiri fenotipe (FI, FII, FIII, FIV). Rastline so zacvetele konec avgusta, vzorčili pa smo jih konec septembra oz. v začetku oktobra, ko se je večina pestičev obarvala rjavo). Na posamezen fenotip smo vzorčili socvetja desetih rastlin (5 - 8 socvetij na rastlino). Med rastno dobo smo dvakrat mehansko zatirali plevela (ročno in z motokultivatorjem), posevek ni bil dodatno gnojen in namakan, prav tako ni bilo uporabe fitofarmacevtskih sredstev.

2.2 Priprava vzorcev

Vzorčena socvetja smo sušili v sušilnici pri temperaturi 30 °C. Pred začetkom izvedbe kemijskih analiz smo zmrznjene vzorce zmleli s kavnim mlinčkom (30 – 50 g).

2.3 Določanje vsebnosti in sestave eteričnega olja

Socvetja fenotipov (27 – 30 g) smo parno destilirali z nastavki po Clevengerju. Destilacija je potekala 3 ure v 1 L destilirane vode. Pri vsakem fenotipu smo analizirali 5 različnih rastlin. Količino EO smo odčitali iz Clevengerjeve aparature. Sestavo EO pa smo določili s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID) (Agilent Technologies Inc., serija 6890, ZDA). Zbrano EO smo redčili z 1 mL heksana (Sigma Aldrich, ZDA). Za GC- FID smo uporabili HP 1 kapilarno kolono velikosti 25 m × 0,2 mm × 0,1 µm (Hewlett Packard, ZDA). Pretok nosilnega plina (helij 5,0 (GTG plini, Slovenija)) je bil 0,5 mL/min. 1 µL raztopine smo injicirali v injektor s temperaturo 180 °C, pri temperaturnem programu detektorja 3,5 minute pri 60 °C, 3,5 °C/min do 155 °C in 30 °C/min do 300 °C. Detekcija je potekala na plamensko ionizacijskem detektorju pri 300 °C. Celoten temperaturni program je trajal 42 min in 47 s. Komponente smo identificirali na podlagi primerjave retencijskih časov standardov. Podatke smo obdelali v programu ChemStation za GC (Agilent Technologies, ZDA). Določili smo skupno osem različnih komponent EO. Vsebnosti komponent smo podali kot relativni delež (rel. %).

2.4 Statistična analiza

Statistično analizo podatkov vsebnosti in sestave EO smo izvedli s tremi programi. Metodo glavni osi EO smo izvedli v programu OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, ZDA), podatke smo razvrstili glede na prvi dve osi. Za izvedbo multifaktorske ANOVA-e z uporabo Duncanovega testa smo uporabili program Statgraphics Centurion Software 19.4.04 (Stataphics Technologies, Inc. ZDA). Povprečja, standardni odkloni in druge osnovne statistične analize smo izvedli v programu Microsoft Excel.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

3.1 Vizualno razlikovanje fenotipov konoplje

Pri vseh treh sortah smo skupno odbrali 11 različnih fenotipov. V preglednici 1 so prikazani posamezni fenotipi ter razlike med njimi na podlagi vizualnih lastnosti.

Preglednica 1: Izbrani fenotipi treh različnih sort konoplje (CS, Tiborszallasi in selekcija Finole) ter razlike med njimi na podlagi šestih različnih vizualnih lastnosti. Za vsako sorto je dodan referenčni tip.

Fenotip	Velikost	Barva rastline	Velikost listov	Socvetje	Antociansko obarvanje listnega peclja	Razvejanost
Carmagnola selected (CS)						
CI	Visoka	Svetla	Velika	Majhno	Ne	***
CII	Visoka	Temna	Majhna	Majhno	Da	*****
Referenca po UPOV	Visoka	Temna	Srednja	-	Srednje	-
Tiborszallasi						
TI	Visoka	Srednje	Srednja	Majhno	Ne	*****
TII	Srednje	Temna	Srednja	Srednje	Da	***
TIII	Majhna	Temna	Majhna	Srednje	Da	**
TIV	Srednje	Temna	Velika	Velika	Ne	***
TV	Majhna	Srednje	Majhna	Srednje	Da	*
Referenca po UPOV	Visoka	Temna	-	-	-	*****
Selekcija Finole						
FI	Visoka	Temna	Srednje	Velika	Ne	*****
FII	Srednje	Srednje	Srednje	Velika	Ne	***
FIII	Srednje	Svetla	Srednje	Srednje	Da	*****
FIV	Srednje	Temna	Srednje	Velika	Da	*****
Referenca po UPOV	Majhna	Srednje	Majhna-srednja	-	Ne	***

Legenda: Velikost: primerjava višine znotraj fenotipov za vsako sorto posebej; Barva rastline: svetla, srednje zelena ali temno zelena; Razvejanost: *-zelo malo razvejana, *****-zelo razvejana

Iz preglednice 1 je razvidna razlika med posameznimi fenotipi na podlagi vizualnih lastnosti. Konoplja je ena od rastlinskih vrst, pri kateri se znotraj posamezne sorte lahko pojavijo številni fenotipi, kar je vzrok tujeprašnosti vrste ter populacijskih sort. Konoplja se oprašuje navzkrižno, kar je lahko pogosto vzrok za pojav genetsko neizenačenih sort, kot posledica heterozigotnosti pa se pojavijo številni fenotipi (Barcaccia in sod., 2020). Zaradi vseh teh lastnosti so danes novejšje sorte večinoma razmnožene s klonsko selekcijo (Sawler in sod., 2015), žlahtnjenje konoplje pa je vse bolj ciljno usmerjeno v določene lastnosti, kot so višja vsebnost

določenega kanabinoida ali terpena, kombinacije določenih komponent ipd., saj s tem pridobimo večjo homogenost sort (Ranalli, 2004). S tem lahko tudi lažje razvrščamo različne sorte v skupino glede na določene lastnosti, kot so: uporabnost konoplje, taksonomska opredelitev ter opredelitev glede na domestifikacijo sort (Pieracci in sod., 2021).

3.2 Določanje vsebnosti in sestave eteričnega olja

V preglednici 2 so predstavljene vsebnosti EO pri posameznih fenotipih, podane so v mL/100 g suhega socvetja. Najvišje vsebnosti EO smo določili pri fenotipih selekcije Finola (2,59 – 3,11 mL/100 g suhega socvetja), najnižjo vsebnost pa pri fenotipu CI pri sorti CS (0,23 mL/100 g suhega socvetja).

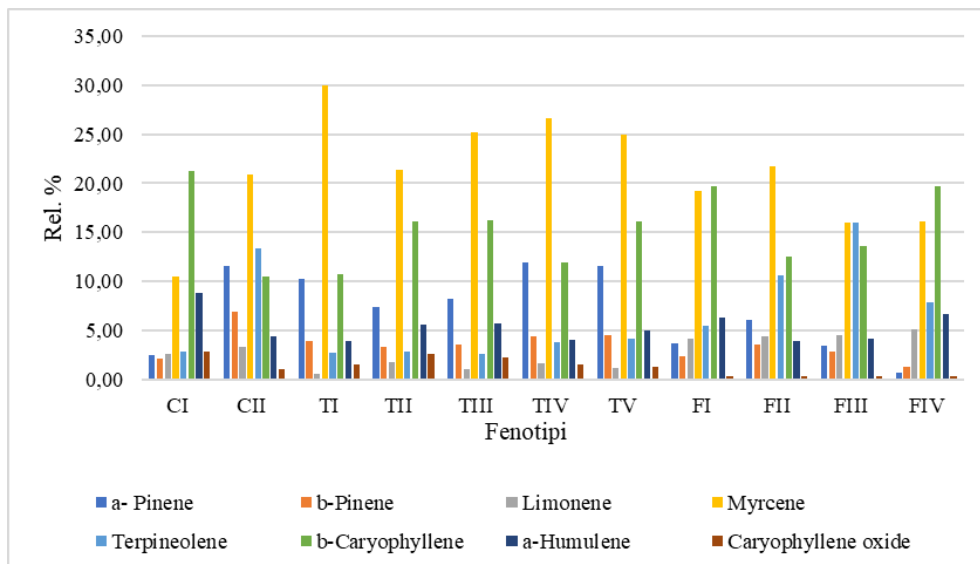
Preglednica 2: Vsebnost eteričnega olja (mL/100 g suhega socvetja) pri različnih fenotipih sort CS, Tiborszallasi in selekcije Finola, vrednosti standardnega odklona ter p-vrednosti med posameznimi fenotipi.

Fenotip	Vsebnost eteričnega olja (mL/100 g suhega socvetja)	SD (mL/100 g suhega socvetja)
CI	0,23 ^a	0,10
CII	0,53 ^b	0,16
TI	0,58 ^{ab}	0,23
TII	0,39 ^a	0,00
TIII	0,52 ^{ab}	0,16
TIV	0,64 ^b	0,22
TV	0,56 ^{ab}	0,17
FI	2,75 ^{ab}	0,33
FII	3,11 ^b	0,23
FIII	2,82 ^{ab}	0,41
FIV	2,59 ^a	0,38

Z analizo ANOVA smo ugotovili, da se na podlagi vsebnosti EO znotraj sorte razlikujeta fenotipa sorte CS, fenotipa TII in TIV ter fenotipa FII in FIV.

Na vsebnost EO vplivajo različni dejavniki: genotip, fenofaza v času spravila, enodomnost/dvodomnost, procesni postopek, gostota rastlin, agrotehnika, skladiščne razmere (Pieracci in sod., 2021). V naši raziskavi smo uporabili sorte, ki so bile dvodomne. Bertoli in sod. (2010) so ugotovili, da imajo dvodomne sorte višje vsebnosti EO kot enodomne.

Na sliki 1 so prikazane vsebnosti osmih najbolj zastopanih komponent EO v vseh preučevanih fenotipih.



Slika 1: Vsebnost osmih najbolj zastopanih komponent EO (rel. %) v različnih fenotipih konoplje sort Carmagnola selected (CI in CII), Tiborszallasi (TI, TII, TIII, TIV, TV) in selekcije Finola (FI, FII, FIII, FIV).

Pri vseh treh sortah so bile najbolj zastopane komponente EO mircen, β -kariofilen, α -pinen in α -humulen. Vsebnost monoterpenov je bila pri vseh treh sortah višja kot vsebnost seskviterpenov. Znano je, da so tudi pri drugih rastlinskih vrstah monoterpeni bolj zastopani od seskviterpenov (Bertoli in sod., 2010). Vsebnost mircena je bila najvišja pri fenotipu TI (29,9 rel. %), najvišja vsebnost α -pinena je bila pri fenotipu TIV (11,9 rel. %), najvišjo vsebnost β -kariofilena je imel fenotip CI (21,3 rel. %), najvišjo vsebnost α -humulena pa je imel fenotip CI (8,8 rel. %). Glede na druge študije so bile ugotovitve zastopanosti najpogostejših komponent EO podobne. Nissen in sod., 2010 so ugotovili najvišje vsebnosti mircena (12,5–29,2 %), α -pinena (15,1 – 17,0 %), β -pinena (6,4–9,3 %), β -kariofilena (10,6–14,0 %) in α -humulena (4,8–6,7 %). Vuerich in sod. (2019) navajajo pri sortah Fedora, Futura in Ferimon višje vsebnosti seskviterpenov z najvišjimi vsebnostmi β -kariofilena (20,8–21,6 %), α -pinena (10,1–11,5 %) in α -humulena (8,7–9,1 %), Bertoli in sod. (2010) pa so ugotovili najvišje vsebnosti mircena (16,0–22,0 %), terpineolena (10,3–11,7 %) in β -kariofilena (15,2–22,9 %).

Fenotipa znotraj sorte CS sta se razlikovala na podlagi več komponent. Fenotip CII je dosegel višjo vsebnost glavnih monoterpenov, medtem ko je imel fenotip CI višjo vsebnost glavnih seskviterpenov. Prav tako sta se razlikovala na podlagi vsebnosti naslednjih komponent: α -pinena, β -pinena, β -kariofilena, α -humulena in kariofilen oksida. Fenotipi sorte Tiborszallasi so se najbolj razlikovali pri vsebnosti kariofilen oksida. Med sortami pa imajo fenotipi selekcije Finola višje vsebnosti limonena v primerjavi z ostalimi sortami.

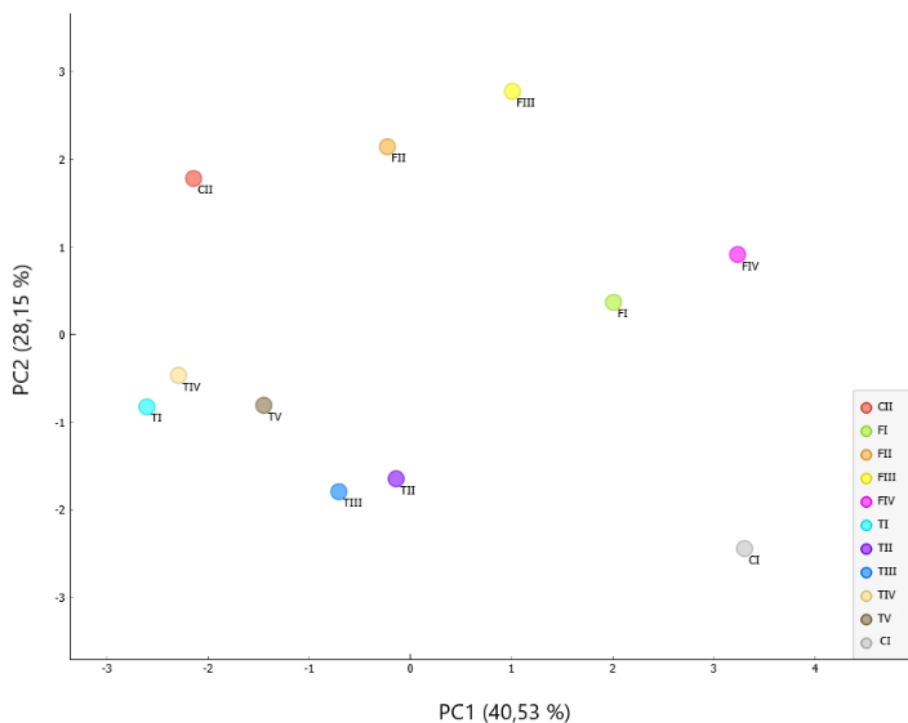
Komponente EO kot podskupina sekundarnih metabolitov imajo številne pozitivne učinke na zdravje. Med drugimi komponente, kot so mircen, β -kariofilen, kariofilen

oksid, α -humulen, α -pinen, linalol, limonen, terpineolen, γ -terpinen, nerolidol, borneol, fenhol in β -eudesmol delujejo protivnetno, β -kariofilen, pozitivno delujejo pri zdravljenju raka. Prav tako ima β -kariofilen skupaj z α -humulenom sinergističen učinek pri zdravljenju raka. Iso-kariofilen, α -humulen, α -pinen in linalol imajo pozitivne učinke pri zdravljenju tumorjev (Lewis in sod., 2018; Russo and Marcu, 2017).

V naši raziskavi imajo visoko vsebnost kariofilen oksida fenotipi sort CS in Tiborszallasi, ta pa ima pozitivne učinke na zdravljenje kardiovaskularnih bolezni, hipertenzije in diabetesa tipov I on II (Mudge in sod., 2019; Nuutinen, 2018b). Na zdravljenje diabetesa prav tako pozitivno vpliva β -pinen, poleg tega pa ima pozitivne učinke za zdravljenje debelosti, raka in drugih kroničnih bolezni.

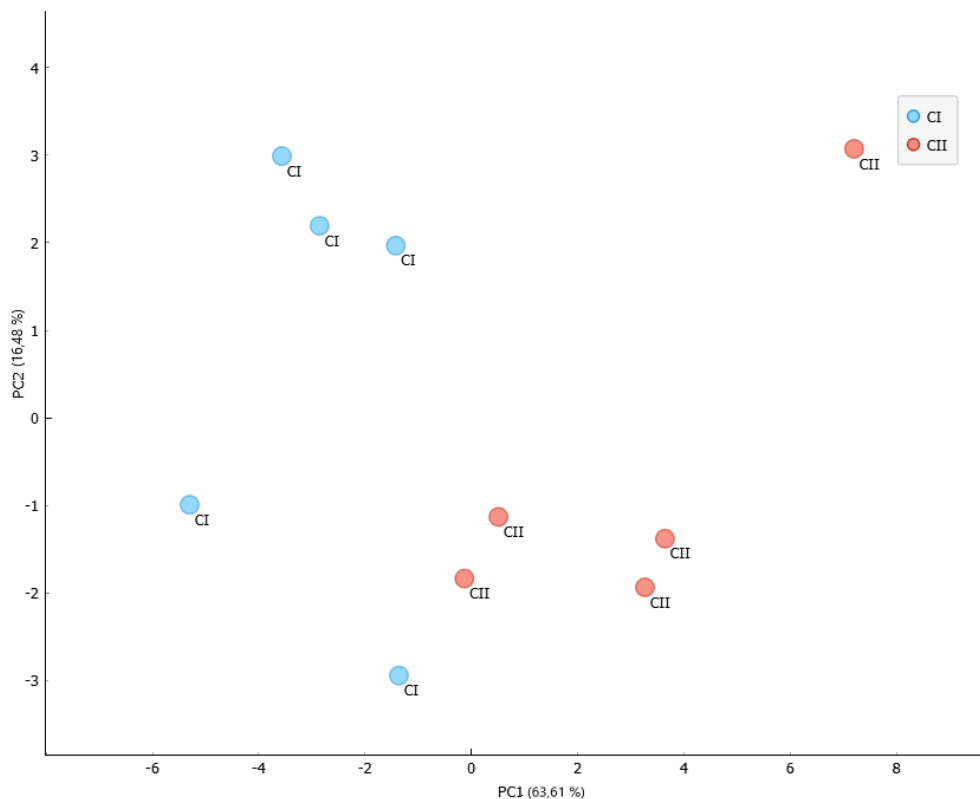
Najvišjo vsebnost β -pinena je imel v naši raziskavi fenotip CII. Linalol, terpineolen in mircen delujejo sedativno, humulen in limonen imata pozitiven učinek na zdravljenje depresije, β -eudesmol pa pozitivno vpliva na povečanje apetita (Nuutinen, 2018b). Komponente EO pozitivno vplivajo tudi na zdravljenje bolezni COVID-19 (Orlando in sod., 2021).

Za ugotavljanje razlik med fenotipi na podlagi vsebnosti komponent EO smo z metodo PCA primerjali povprečja posameznih fenotipov, pri čemer smo kot vhodne podatke uporabili osem različnih komponent EO pri vseh treh preučevanih sortah v naši raziskavi. S slike 2 je razvidno, da glavna os PC1 pojasni 40,53 %, glavna os PC2 pa 28,15 % variance. Skupna varianca je 68,68 %. Z analizo PCA smo ugotovili, da se sorte na podlagi komponent EO med sabo razlikujejo, medtem ko se fenotipa znotraj sort razlikujeta le pri sorti CS, fenotipov pri ostalih dveh sortah ni bilo mogoče ločiti med sabo, kar nakazuje na večjo uniformnost vsebnosti EO pri omenjenih dveh sortah.



Slika 2: Graf metode glavnih osi (PCA) glede na posamezna povprečja fenotipov in povprečne deleže komponent eteričnega olja pri sortah CS, Tiborszallasi in selekciji Finole. Graf prikazuje razporeditev vzorcev v ravnini prvih dveh osi (PC1 pojasni 40,53 %, PC2 pojasni 28,15 %). Skupna varianca je 68,68 %.

Vsako preučevano sorto smo z metodo PCA analizirali še posamezno. Dokazali smo, da se znotraj sorte, kljub analizi posamezne sorte razlikujeta le fenotipa sorte CS (slika 3), medtem ko fenotipov pri sortah Tiborszallasi in selekcije Finola ni bilo mogoče ločiti med sabo.



Slika 3: Graf metode glavnih osi (PCA) glede na posamezna povprečja fenotipov in povprečne deleže komponent eteričnega olja pri sorti CS. Graf prikazuje razporeditev vzorcev v ravnini prvih dveh osi (PC1 pojasni 63,61%, PC2 pojasni 16,48 %). Skupna varianca je 80,09 %.

4 ZAKLJUČEK

V raziskavi smo primerjali različne fenotipe znotraj treh različnih sort na podlagi osmih različnih komponent EO. Po našem vedenju gre za prvo takšno študijo do sedaj, kjer se preučuje različne fenotipe sort glede na EO. Ugotovili smo, da se znotraj sort med sabo razlikujeta le fenotipa sorte CS, medtem ko fenotipov znotraj sorte Tiborszallasi in selekcije Finola ni bilo mogoče razlikovati. Pri sorti CS sta se fenotipa na podlagi analize ANOVA razlikovala tudi v skupni vsebnosti monoterpenov in seskviterpenov. Selekcija Finole se je od ostalih dveh sort razlikovala po višji vsebnosti limonena. Glede na vsebnosti EO pri posameznih kanabinoidih bi bilo v nadaljevanju smiselno selekcionirati fenotipe, ki imajo željene višje vsebnosti določenih komponent EO ter v kombinaciji s kanabinoidi pridobiti novo sorto, ki bi imela primerno razmerje za zdravljenje določenih bolezni.

5 VIRI

- B Barcaccia, G., Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozzi, A., Borin, M., Bona, S., 2020. [Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573299). Front Plant Sci. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573299>
- Bertoli, A., Tozzi, S., Pistelli, L., Angelini, L.G., 2010. [Fibre hemp inflorescences: From crop-residues to essential oil production](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.012). Ind Crops Prod 32, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.012>
- Booth, J.K., Bohlmann, J., 2019. [Terpenes in Cannabis sativa – From plant genome to humans](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022). Plant Science 284, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022>
- Booth, J.K., Page, J.E., Bohlmann, J., 2017. [Terpene synthases from Cannabis sativa](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173911). PLoS One 12, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173911>
- Hillig, K.W., 2005. [Genetic evidence for speciation in Cannabis \(Cannabaceae\)](https://doi.org/10.1007/s10722-003-4452-y). Genet Resour Crop Evol 52, 161–180. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-4452-y>
- Lewis, M.A., Russo, E.B., Smith, K.M., 2018. [Pharmacological Foundations of Cannabis Chemovars](https://doi.org/10.1055/s-0043-122240). Planta Med 84, 225–233. <https://doi.org/10.1055/s-0043-122240>
- Mudge, E.M., Brown, P.N., Murch, S.J., 2019. [The Terroir of Cannabis: Terpene Metabolomics as a Tool to Understand Cannabis sativa Selections](https://doi.org/10.1055/a-0915-2550). Planta Med 85, 781–796. <https://doi.org/10.1055/a-0915-2550>
- Mudge, E.M., Murch, S.J., Brown, P.N., 2017. [Leaner and greener analysis of cannabinoids](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3). Anal Bioanal Chem 409, 3153–3163. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3>
- Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., Koltai, H., 2018. [Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.060). Ind Crops Prod 113, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.060>
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., Monti, A., 2010. [Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties \(Cannabis sativa L.\)](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.11.010). Fitoterapia 81, 413–419. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.11.010>
- Nuutinen, T., 2018a. [Medicinal properties of terpenes found in Cannabis sativa and Humulus lupulus](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.076). Eur J Med Chem. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.076>
- Orlando, G., Adorisio, S., Delfino, D., Chiavaroli, A., Brunetti, L., Recinella, L., Leone, S., D'antonio, M., Zengin, G., Acquaviva, A., Antico, M., Angelini, P., Angeles Flores, G., Venanzoni, R., Tacchini, M., Di Simone, S.C., Menghini, L., Ferrante, C., 2021. [Comparative investigation of composition, antifungal, and anti-inflammatory effects of the essential oil from three industrial hemp varieties from Italian cultivation](https://doi.org/10.3390/antibiotics10030334). Antibiotics 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030334>
- Pieracci, Y., Ascrizzi, R., Terreni, V., Pistelli, L., Flamini, G., Bassolino, L., Fulvio, F., Montanari, M., Paris, R., 2021. [Essential oil of cannabis sativa I: Comparison of yield and chemical composition of 11 hemp genotypes](https://doi.org/10.3390/molecules26134080). Molecules 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26134080>
- Potter, D., 2009. The propagation, characterisation and optimisation of cannabis sativa I as a phytopharmaceutical. Doctoral dissertation, King's College London.
- Raman, V., Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A., Elsohly, M.A., 2017. [Morpho-Anatomy of Marijuana \(Cannabis sativa L.\)](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6), in: Cannabis Sativa L. - Botany and Biotechnology. Springer, Cham, pp. 123–136. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>
- Ranalli, P., 2004. [Current status and future scenarios of hemp breeding](https://doi.org/10.1007/s10681-004-4760-0). Euphytica 140, 121–131. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4760-0>
- Russo, E.B., Marcu, J., 2017. [Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads](https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004), 1st ed, Advances in Pharmacology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>

- Sawler, J., Stout, J.M., Gardner, K.M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L., Page, J.E., Myles, S., 2015. [The genetic structure of marijuana and hemp](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133292). PLoS One 10, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133292>
- Small, E., Antle, T., 2003. [A preliminary study of pollen dispersal in cannabis sativa in relation to wind direction](https://doi.org/10.1300/J237v08n02_03). Journal of Industrial Hemp 8, 37–50. https://doi.org/10.1300/J237v08n02_03
- Sommano, S.R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., Jantrawut, P., 2020. [The Cannabis Terpenes](https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245792). Molecules. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245792>

IZZIVI PRI PRENOSU PROSTORASTOČIH ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN V PRIDELAVO

Dunja BANDELJ¹, Matjaž HLADNIK² in Alenka BARUCA ARBEITER³

Pregledni članek / Review article

Prispelo / Arrived: 27. 8. 2024

Sprejeto / Accepted: 10. 11. 2024

Izvleček

Zdravilne in aromatične rastline so dragocen vir biološko aktivnih spojin s specifičnim delovanjem, ki so uporabne v farmaciji, kozmetiki, prehranski industriji in fitofarmaciji. Rastline omogočajo zamenjavo sintetičnih sestavin z naravnimi, kar prispeva k razvoju inovativnih 'zelenih' izdelkov in prinaša pomembne ekonomske priložnosti za pridelovalce, nabiralce in predelovalno industrijo. Nabiranje prostorastočih rastlin ni trajnostno, zlasti pri ogroženih vrstah. Zaradi tega se spodbuja pridelava zdravilnih in aromatičnih rastlin, kar omogoča stabilnejšo preskrbo z rastlinskim materialom želene kakovosti. Prenos prostorastočih rastlin v pridelavo prinaša številne izzive. Na prvem mestu so identifikacija reprezentativnih vzorcev in ustrezen odvzem iz naravnih rastišč (upoštevajoč nacionalno in mednarodno zakonodajo) ter izbira primernih načinov pridelave. Sledi opazovanje in vrednotenje posameznih genotipov ter odbira superiornih rastlin z želenimi lastnostmi (pridelek, kakovost, odpornost). Nenadzorovan prenos rastlin iz naravnih habitatov je lahko nevaren zaradi morebitnih prikritih patogenov, ki se lahko pokažejo šele pri pridelavi, zato je med postopkom prenosa rastlin zelo pomembna tudi kontrola njihovega zdravstvenega stanja. Pri pridelavi so zato ključne agronomske raziskave in ustrezni žlahtniteljski pristopi, ki omogočajo razvoj sort z novimi kombinacijami lastnosti. Pri aromatičnih rastlinah pa tako raziskave kot žlahtnjenje močno zaostajajo v primerjavi z drugimi, tradicionalnimi kmetijskimi rastlinami.

Ključne besede: zelišča, nabiralništvo, pridelava, rastlinski genski viri, agronomske raziskave, žlahtnjenje, ogrožene vrste

CHALLENGES IN THE TRANSFER OF WILD MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS INTO AN AGROECOSYSTEM

Abstract

Medicinal and aromatic plants are a valuable source of biologically active compounds with specific effects that are useful in pharmacy, cosmetics, the food

¹ Dr., Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije (UP FAMNIT), e-naslov: dunja.bandelj@upr.si

² Dr., UP FAMNIT, e-naslov: matjaz.hladnik@upr.si

³ Dr., UP FAMNIT, e-naslov: alenka.arbeiter@upr.si

industry and phytopharmacy. These plants make it possible to replace synthetic ingredients with natural ones, what contributes to the development of innovative 'green' products and offers significant economic opportunities for growers, collectors and the processing industry. Harvesting naturally growing plants is often not sustainable, especially in the case of endangered species. Therefore, the transfer of medicinal and aromatic plants into controlled agroecosystems is encouraged to ensure a more stable supply of plant material of the desired quality. The transfer of these plants into agroecosystems is associated with numerous challenges. Firstly, the identification of representative samples and the collection from natural habitats in accordance with national and international legislation, as well as the selection of suitable agroecosystems. The observation and evaluation of individual genotypes is necessary in order to select superior plants with the desired traits (yield, quality, resistance). The uncontrolled transfer of plants from their natural habitats can be risky due to possible latent infections with pathogens that may only manifest themselves later during cultivation. Agronomic research and appropriate breeding approaches are therefore essential for cultivation and for the development of cultivars with new trait combinations, but they lag considerably behind those of other traditional agricultural crops.

Key words: herbs, foraging, cultivation, plant genetic resources, agronomic research, breeding, endangered species

1 UVOD

Vrednost zdravilnih in aromatičnih rastlin temelji na vsebnosti sekundarnih metabolitov, biološko aktivnih molekul, ki imajo blagodejni vpliv na zdravje človeka. Sekundarni metaboliti se v rastlini sintetizirajo kot odgovor na različne okoljske dejavnike. Običajno nastanejo z biosintezo in modifikacijo primarnih metabolitov (ogljikovi hidrati, polisaharidi, aminokisline, sladkorji, beljakovine, lipidi). Na osnovi biosinteze se rastlinske sekundarne metabolite razvršča v tri večje skupine; fenoli, terpeni in steroidi ter dušik vsebujoče spojine (npr. alkaloidi) (Twaij in Hasan, 2022). Zaradi antioksidativnih lastnosti preprečujejo oksidativni stres, ki nastane zaradi različnih vplivov okolja (Bhattacharya, 2019). Mnoge spojine zavirajo procese vnetja, delujejo proti raku ali imajo kakšno drugo farmakološko funkcijo. Zaradi tega bi lahko rastline opredelili kot naravne 'biotovarne' za pridobivanje številnih učinkovin, uporabnih v farmaciji, kozmetični prehranski industriji ter fitofarmaciji. Hao in Xiao (2015) navajata, da več kot tretjina kliničnih zdravil izvira prav iz izvlečkov rastlin. K večjemu povpraševanju po zdravilnih in aromatičnih rastlinah prispeva večje zaupanje potrošnikov v naravne sestavine.

Rastline omogočajo zamenjavo sintetičnih sestavin z naravnimi ter tako prispevajo k razvoju novih 'zelenih' proizvodov. V Evropi je trend rastočega trga za razvoj prehranskih dopolnil ter funkcionalne hrane, kar predstavlja pomembno priložnost za pridelovalce, lokalne nabiralce, upravitelje virov, predelovalno industrijo in distributerje. Surovine, pridobljene iz zdravilnih in aromatičnih rastlin, imajo tako pomembno ekonomsko vrednost in se vključujejo v inovativne proizvode, s katerimi se večja tudi vrednost teritorijev (EIP-AGRI Focus Group, 2020).

Namen prispevka je pregled obstoječih praks prenosa prostorastočih rastlin iz narave v kmetijski prostor ter predstavitev nekaterih bistvenih korakov, ki jih velja pri tem upoštevati.

2 NABIRANJE PROSTO RASTOČIH RASTLINSKIH VRST

Uporaba rastlin v ljudski medicini in nabiranje prosto rastočih rastlinskih vrst imata v Evropi dolgo tradicijo. V prid temu govori dejstvo, da je bilo na območju Slovenije v času pred osamosvojitvijo razvito nabiranje zelišč in sušenje ter zbiranje posušenih zelišč v odkupnih centrih za potrebe živilske in farmacevtske industrije (MKGP, 2016). Prednosti nabiranja zelišč v naravi so, da ne potrebujemo infrastrukture ali posebnih finančnih vlaganj, zato je z ekonomskega vidika ugodno ter v primeru majhnega povpraševanja tudi edino upravičeno (Lubbe in Verpoorte, 2011). Pri nabiranju rastlin v naravi pa se pojavljajo številni izzivi. Pomembno je načrtovati trajnostno nabiranje ter se usmeriti v lokalno ohranjanje populacij, vrst in biotske raznovrstnosti. Največji izziv predstavljajo pomanjkljivo znanje o trajnostnih praksah nabiranja, neopredeljene pravice do uporabe zemljišč in dostopa do njih ter pomanjkljiva zakonodaja na tem področju.

Od leta 1998 so na voljo neobvezne Smernice za izvajanje dobre kmetijske in nabiralne prakse za zdravilne in aromatične rastline, ki jih je oblikovalo Evropsko združenje pridelovalcev zelišč (European Herb Growers Association ali EUROPAM). Smernice so bile posodobljene leta 2022 in med drugim predvidevajo standardizacijo nabiranja v naravi, katere namen naj bi bilo zagotavljanje pravilne botanične klasifikacije rastlinskega materiala visoke kakovosti, pridobivanje vseh potrebnih dovoljenj in soglasij ter trajnostna praksa nabiranja (EUROPAM, 2022).

Kot navajata Čeh in Eržen (2023), je v Sloveniji nabiranje zelišč v naravi urejeno v okviru zakonodaje, ki se nanaša na gozdove ter varovanje in ohranjanje narave in bi jo bilo z vidika zagotavljanja trajnostnega nabiralništva smiselno dopolniti in urediti.

Nabiranje in prodaja zelišč v njihovi osnovni obliki spada v seznam del, ki se pod določenimi pogoji (Pravilnik o osebem dopolnilnem delu, 2015; Zakon o preprečevanju dela in zaposlovanja na črno, 2014) lahko opravljajo kot osebno dopolnilno delo. Po zadnjih podatkih (na dan 10.07.2024) je na Seznamu posameznikov, ki opravljajo osebno dopolnilno delo, ki ga vodi Agencija Republike Slovenije za javnopravne evidence in storitve, vpisanih 1.019 subjektov. A zelišč v naravi ne nabirajo le registrirani nabiralci, temveč tudi številni ljubitelji zelišč. Kljub razmeroma strogi zakonodaji je nabiranje velikokrat nestrokovno in nekontrolirano. Omeniti velja, da od leta 2023 poteka v Sloveniji v začetku junija Festival nabiralništva, v okviru katerega se zvrstijo različne delavnice in predavanja, ki so namenjena ozaveščanju širše javnosti o trajnostnem nabiralništvu, s poudarkom na varovanju naravnih habitatov in ohranjanju biotske raznovrstnosti (Festival nabiralništva, b. d.).

Schippman in sod. (2006) poudarjajo, da raziskave o ohranjanju in trajnostni rabi zdravilnih rastlin in njihovih habitatih močno zaostajajo. Vsaka vrsta ima namreč edinstvene ekološke, družbenoekonomske, zdravstvene in kulturne povezave, ki jih

je treba razumeti, zato modelni raziskovalni pristopi običajno niso primerni. Mnoge proročaste rastline so zaradi povečanega povpraševanja in pomanjkanja ustreznih upravljalnih strategij populacij prekomerne izkoriščane, kar ogroža rastlinske vrste in naravne habitate ter lahko vodi v zmanjševanje raznolikosti populacije ali celo do izgube celotne populacije in uničevanje naravnih rastišč (Schippman in sod., 2006). Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic (2015) navajata, da je v svetovnem merilu 21 % flore oziroma 15.000 vrst zdravilnih rastlin ogroženih. V Italiji denimo so zaradi prekomernega nabiranja ogrožene populacije rožmarina na Sardiniji, na Hrvaškem poročajo o ogroženosti vsaj 17 vrst, podobno je tudi v Grčiji, kjer je ogroženih 30 % redkih vrst (Grigoriadou in sod., 2020). Tudi v Sloveniji se zmanjšuje biodiverzitetna zdravilnih in aromatičnih rastlin. Prosto rastoče populacije so najbolj ogrožene zaradi zaraščanja, neustrezne rabe tal (paša in prepogosta košnja, ki onemogočata naravno obnovo populacij) in prekomernega nabiranja.

Poleg prekomernega nabiranja, predstavlja ključno težavo pri ohranjanju zdravilnih rastlin tudi izguba ali fragmentacija habitatov, ki je posledica različnih, običajno antropoloških dejanj (na primer spremembe rabe zemljišč, pozidava, urbanizacija), onesnaževanje in neprimerne prakse nabiranja. Nabiranje pred fenofazo semenjenja na primer preprečuje razmnoževanje s semeni v naravi. Puljenje rastlin s koreninskim sistemom pa ogroža nadaljnje razraščanje in krepitev rastlin ter veča nezmožnost za vegetativno razmnoževanje. Mnoge rastline se počasi razvijajo in neprestano odnašanje iz naravnega habitata ovira naravne procese nastajanja in ohranja populacij. Težavo predstavljajo tudi omejene informacije o zdravilnih rastlinah, njihovih sorodnikih, razširjenosti in morebitni ogroženosti.

Pri nabiranju v naravi je potrebno omeniti tudi možnost zamenjave rastlinskih vrst s podobnimi vrstami, kar lahko vpliva na spremenjeno vsebnost biološko aktivnih spojin. Slednje je pogostejše pri vrstah, ki so morfološko podobne, zato je botanična identifikacija lahko problematična (Lubbe in Verpoorte, 2011). Na trgu se lahko pojavi tudi poneverjanje glede botanične identitete, ki je običajno ekonomsko motivirano; na primer zaradi visoke cene surovine ali omejene ponudbe (Appendino in sod., 2015). Kljub omenjenim izzivom ostaja nabiranje prosto rastočih rastlin v naravi pomembna aktivnost, ki omogoča lokalnim skupnostim določen vir dohodka in prispeva k razvoju ruralnih območij (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015). Grigoriadou in sod. (2020) menijo, da bo nabiranje v naravi tudi v prihodnosti prevladovalo zaradi premalo izkušenj in nezadostnih raziskav na področju domestikacije, žlahtnjenja in razvoja sort ter postopkov pridelave zdravilnih rastlin.

2.1 Nabiranje prosto rastočih rastlin v tuji državi

Pridobivanje rastlinskega materiala brez ustreznih soglasij v tuji državi se lahko tretira kot nelegalna pridobitev ali biopirastvo (Bourdy in sod., 2017; Volenzo in Odiyo, 2020). Pri nabiranju rastlin v naravnih habitatih je potrebno upoštevati Nagojski protokol (The Nagoya Protocol on Access and Benefit-sharing, 2010), ki regulira dostop do genskih virov in tako izpolnjuje tretji cilj Konvencije o biološki raznovrstnosti (The Convention on Biological Diversity, 1992).

Cilj Nagojskega protokola je poštena in pravična delitev koristi, ki izhajajo iz uporabe genskih virov, vključno z ustreznim dostopom do genskih virov in

primernim prenosom ustreznih tehnologij ob upoštevanju vseh pravic nad navedenimi viri in do tehnologij kot tudi s primernim financiranjem, s čimer se prispeva k ohranjanju biotske raznovrstnosti in trajnostni uporabi njenih sestavnih delov. Genske vire predstavljajo rastline ali njeni deli, ki imajo dejansko ali potencialno vrednost in jih različne inštitucije uporabljajo pri raziskavah in razvoju novih zdravil, kozmetičnih preparatov, parfumov ali drugih produktov. Konvencija o biološki raznovrstnosti priznava suverene pravice držav do njihovih naravnih virov. Pogodbenice protokola so pristojne za odločanje o tem, ali želijo urediti dostop do svojih genskih virov in določiti pogoje za delitev koristi. Običajno so potrebna medsebojna dogovarjanja in predhodna obveščanja (Dostop do genskih virov in delitev koristi, ki izhajajo iz njihove uporabe (Nagojski protokol), 2020).

Konvencijo o biološki raznovrstnosti je Slovenija ratificirala leta 1996. Nagojski protokol h konvenciji je podpisala leta 2011, vendar ga še ni uradno ratificirala. To pomeni, da se ga izvaja samo delno, in sicer tisti del, ki ureja področje izpolnjevanja obveznosti uporabnikov genskih virov in je predpisan za vse države članice EU. EU je kot pogodbenica Nagojskega protokola sprejela Uredbo (EU) št. 511/2014 o ukrepih in izpolnjevanju obveznosti uporabnikov iz Nagojskega protokola, ki je v veljavi od oktobra 2015 (Uredba (EU) ..., 2014). Skladno z uredbo je bila še istega leta v Sloveniji ustanovljena Medresorska delovna skupina, ki je zadolžena za nadzor izpolnjevanja obveznosti uporabnikov, sodeluje v procesih registracije zbirk in priznavanja dobrih praks, vodi evidence ter poroča Evropski komisiji (Bolješić, 2022; Bolješić, 2023).

2.2 Nabiranje ogroženih vrst zelišč

Posebno področje predstavljajo ogrožene vrste rastlin. V EU okoli 14 % gospodinjstev uporablja za prehrano prosto živeče rastlinske vrste, kar lahko resno ogrozi njihovo biotsko raznovrstnost in obstoj. Za ohranjanje prosto živečih rastlinskih genskih virov so na voljo različni pristopi: omejitev nabiranja in trajnostno nabiranje prosto živečih vrst, obnovitev naravnih rastišč, regeneracija poškodovanih ali opustošenih populacij, ohranjanje na kmetijah ter *ex situ*, *in situ* in *in vitro* ohranjanje (Ferant in sod., 2023). V večini držav je uporaba ogroženih rastlinskih vrst regulirana z zakonodajo, oziroma je njihovo nabiranje v naravi prepovedano (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015). V skladu z Zakonom o ohranjanju narave (ZON) (1999) so v Sloveniji prosto rastoče rastlinske vrste pod posebnim varstvom države, zato vlada predpiše podrobnejše načine varstva, dovoljene količine nabiranja ter postopke v zvezi z odvzemom iz narave za namene gojenja, raziskovanja ali reintrodukcije. Upoštevati je potrebno, da lahko za rastlinske vrste, ki so zavarovane po predpisih Evropske unije in ratificiranih mednarodnih pogodb, veljajo dodatna pravila. V Sloveniji so uporabniki genskih virov dolžni kontaktirati pristojne nacionalne organe in preveriti ali so njihove predvidene dejavnosti (pridobivanje rastlinskega materiala iz narave ali iz virov *ex situ*, prenašanje in trgovanje z rastlinskim materialom) v skladu z nacionalno zakonodajo in drugimi regulatornimi zahtevami po mednarodnih sporazumih. Dovoljenje za odvzem genskega materiala iz narave je torej potrebno pridobiti samo v primeru, ko gre za zavarovane prosto živeče rastlinske vrste. V Sloveniji so

ogrožene prosto živeče rastlinske vrste zavarovane z Uredbo o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah (2004), katere sestavni del je tudi priloga, v kateri so določene vse ogrožene in mednarodno varovane rastlinske vrste. Ta uredba opredeljuje pravila ravnanja, ukrepe varstva in smernice za ohranjanje habitatov teh vrst. Obstaja tudi Konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prosto živečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami - CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 1973), ki jo je podpisalo 180 držav in narekuje, da je pred vsakim transportom potrebno pridobiti ustrezen CITES dokument, sam nadzor pa izvajajo mejni ali drugi nadzorni organi (Bolješić, 2023).

3 PRIDELAVA ZELIŠČ

Rastlina običajno vzbudi pozornost, ko odkrijejo posebne učinkovine, uporabne v farmaciji ali drugi industriji. Prehod od nabiralništva do pridelave lahko traja več desetletij in gre čez različne faze. V fazi odkritja (i) povpraševanju zadostuje nabiranje v naravi, ki se izvaja lokalno. V naslednji fazi širjenja (ii) je potencial uporabnosti rastline že jasno izražen, zato se bo najverjetneje povpraševanje po njej povečalo. Običajno se nabiranje v naravi razširi na lokalni oziroma regionalni ravni ter na mednarodne trge. V fazi stabilizacije (iii) cena in ponudba ostajata enaki, rastlina še ne bo zanimiva za pridelavo, razen v primeru, če bodo cene na trgu visoke in bodo njeni viri v naravi omejeni. V fazi upada (iv) razpoložljivosti rastlinskega materiala, zaradi prekomernega izkoriščanja naravnih rastišč, so na trgu količine omejene in cena se posledično zviša. To pa je priložnost, ko rastlina postane zanimiva za gojenje. Sledi faza gojenja (v), ko rastline postanejo del kmetijskega ekosistema (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015; Schippmann in sod., 2002). Ob izraženem interesu uporabe rastline v industriji, je smiselno vlagati v žlahtniteljske programe in razvoj novih sort s tarčnimi lastnostmi.

Zaradi pretirane rabe prostorastočih rastlin, številne agencije celo svetujejo prenos rastlin iz narave v pridelavo (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015; Volenzo in Odiyo, 2020). To potrjuje tudi navedba Schippman in sod. (2006), ki poročajo, da je študija, ki jo je izvedla organizacija Rainforest Alliance pokazala, da večina podjetij v svoje produkte vključuje rastlinski material gojenega izvora (60-90 %), preostali del pa izvira iz narave. Slednje sicer velja za bolj zastopane vrste (v Nemčiji denimo, od 1.543 le 50-100 vrst (3- 6 %) izvira iz gojenja). V Evropi je približno 10 % zdravih rastlin gojenih (Vines, 2004), medtem ko v svetovnem merilu manj kot 1 % zdravih in aromatičnih rastlin izvira iz gojenja (Schippman in sod., 2006).

Tudi z vidika trga in industrije s kontinuiranim povpraševanjem po uniformnem rastlinskem materialu sodi gojenje rastlin med pomembne strategije za zadostitev potreb po zdravih in aromatičnih rastlinah (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015; Schippman in sod., 2006). Poleg zmanjšane pritiska na prosto rastoče rastline in ohranjanje populacij in vrst, so prednosti gojenja sledeče (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015; Lubbe in Verpoorte, 2011; Schippman in sod. 2006;): a) možna napoved pridelka, ki je običajno zanesljiv (vpliva na stabilizacijo cene na trgu), b) lažje načrtovanje dela in uporaba strojne opreme, c) pridelava surovin z znano kemijsko sestavo in standardno kakovostjo, d) pričakovana manjša kemijska variabilnost, ker rastline uspevajo v izenačenih, kontroliranih

pogojih ter e) možnost kontrole v celotni dobavni verigi - vsakem koraku pridelave in predelave, vodenje dokumentacije. Prednost kontrolirane pridelave je tudi zmanjšana možnost za zamenjavo rastlinskega materiala oziroma napačne identifikacije rastlinske vrste ali celo poneverjanja v primerih, ko gre za omejene količine določene vrste na trgu. Zaradi kontrole pridelave in predelave lahko pridelovalci pridobijo certifikate kakovosti, kar poveča zaupanje potrošnikov v pridelke oziroma izdelke iz zelišč. Ker so nekatera zelišča prilagojena na siromašna in manj rodovitna tla, je pridelava ekonomsko upravičena na območjih, ki niso primerna za druge kmetijske rastline (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015). Lubbe in Verpoorte (2011) med pomanjkljivosti pridelave uvrščata višje stroške zaradi potrebnih investicij pred in v pridelavi, mnoge rastline pa tudi ni možno ali je težko gojiti, zato je gojenje ekonomsko vprašljivo. Zaradi gojenja se lahko pojavi tudi zmanjšanje iniciativ za nabiralništvo v lokalni skupnosti Schippman in sod. (2006). Pregled pomembnejših prednosti in pomanjkljivosti pri nabiranju v naravi in gojenju zdravilnih rastlin je povzet v preglednici 1.

Z vidika potrošnika velja omeniti prepričanje, da je zdravilni učinek pri gojenih rastlinah slabši v primerjavi z rastlinskim materialom, nabranim v naravi (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015) oziroma, da pri gojenih zeliščih niso dosežene ustrezne organoleptične lastnosti in se potrošniki pritožujejo nad izgubo tipičnih okusov in arom (Grigoriadou in sod., 2020). Pri ginsengu (*Panax sp.*) so na Kitajskem denimo bolj cenjene korenine divjega ginsenga, v Botsvani pa so gojena zelišča nesprejemljiva, ker naj ne bi imela primerljivega učinka z rastlinami, nabranimi v naravi. Kot navajajo Schippman in sod. (2006), znanstvene študije le delno potrjujejo te trditve. Kot omenjeno, so pozitivni učinki zdravilnih rastlin večinoma povezani s sekundarnimi metaboliti, ki jih rastlina sintetizira kot odgovor na okoljske razmere, v gojenem okolju so lahko ti dejavniki manj izraziti, zato se v rastlini lahko sintetizira manjša količina sekundarnih metabolitov. Na tem področju ni bilo opravljenih veliko primerjalnih raziskav.

Preglednica 1: Primerjava nabiranja zdravilnih in aromatičnih rastlin v naravnih habitatih in kmetijskem prostoru, povzeto po Schippman in sod. (2006)

Nabiranje rastlin v naravnih habitatih	Gojenje rastlin
✓ omogoča kontinuirano zanimanje za naravne populacije rastlin v lokalni skupnosti ✓ omogoča iniciative za ohranjanje naravnih populacij, njihovih habitatov in genetske raznolikosti rastlin ✓ nabiranje je cenejše, ni potrebna infrastruktura in finančni vložki ✓ povpraševanje po nekaterih vrstah je majhno in ne opravičuje investicij za pridelavo	✓ omogoča natančno in zanesljivo botanično identifikacijo ✓ genotipi so standardizirani in izboljšani ✓ zagotavlja neprekinjeno dobavo surovine ✓ možno je določiti standarde kakovosti ✓ spravilo je možno nadzorovati ✓ količine in ceno pridelka je možno je dogovoriti za daljše obdobje
✓ ni uporabe pesticidov	✓ zaradi nadzorovane pridelave je možna certifikacija ekološke pridelave

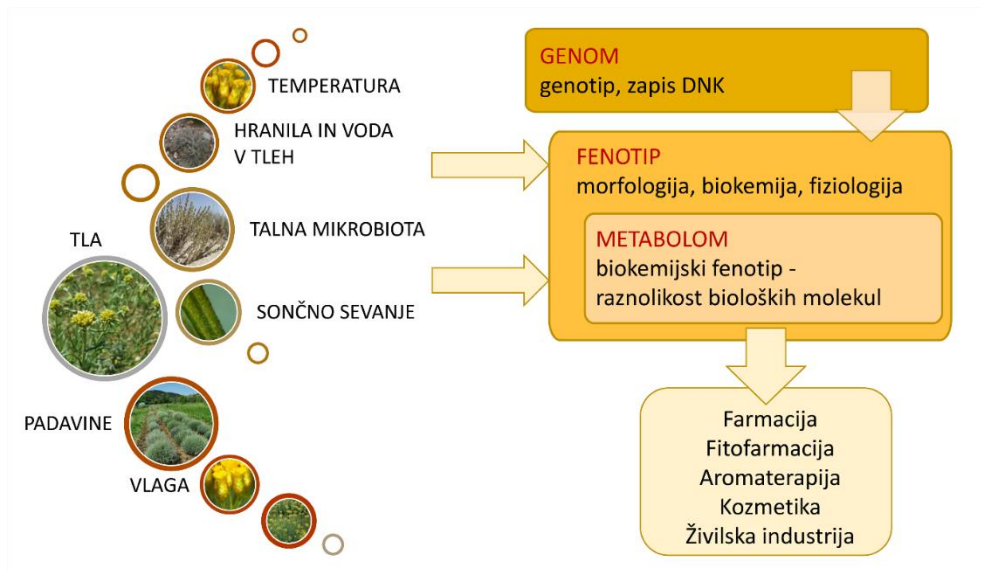
Nabiranje rastlin v naravnih habitatih	Gojenje rastlin
✓ prevladuje prepričanje, da imajo prostorastoče rastline 'močnejše' učinkovine X nenadzorovana žetev lahko povzroči izumrtje ekotipov in celo vrste X prost dostop do rastlin otežuje spoštovanje in kontrolo količin nabranega materiala X pomanjkljivo znanje o biologiji rastlin X ni kontrole nad letnim prirastom rastlin in kakovostjo X ni programov upravljanja rastlin X obstaja tveganje za zamenjavo rastlin (poneverba, namenska/nenamenska) X obstaja tveganje za kontaminacije zaradi nehigijskih pogojev žetve ali po žetvi	✓ cena pridelka je relativno stabilna X razvrednoti pomen prostorastočih rastlin in njihovih habitatov, kar posledično zmanjša zanimanje/iniciative za ohranjanje ekosistemov X zmanjša genetsko raznolikost X rastline lahko postanejo invazivne in imajo negativne vplive na ekosisteme

3.1 Izzivi pri izbiri genskih virov in prenosu prostorastočih zdravilnih rastlin v pridelavo

V naravnih rastiščih se nahajajo genetsko raznoliki genotipi vrste/populacije z različnimi potenciali sinteze bioloških molekul in odpornosti. Običajno genetske raznolikosti ne poznamo, zato se najprej soočimo z vprašanjem kateri genotip v množici zelo variabilnih posameznikov izbrati, da bo zadovoljil potrebe industrije oz. potrošnikov.

Najpogostejša praksa pri prenosu prostorastočih rastlin v kmetijski prostor je nabiranje semen ali vegetativnih delov rastlin, iz katerih ljudje vzgojijo sadike. V primeru, da izberemo posamezne rastline in jih nato klonsko razmnožimo, bomo zožili genetski material in s tem lahko izgubimo 'tipičnost' produktov, v primerjavi s produkti iz rastlinskega materiala iz naravnih rastišč, po drugi strani pa s tem pridobimo populacijo rastlin, ki so med seboj enake. Če pa so rastline vzgojene iz semena, lahko pričakujemo večjo variabilnost in neizenačenost rastlin v nasadu, saj ima vsako seme edinstveno kombinacijo genov. Temu se izognemo, v kolikor zberemo seme znotraj neke populacije, torej večjega števila rastlin iste vrste. Raznolikost genov se odraža v njihovem izražanju, zaradi česar je fenotip vsake rastline (morfologija, fiziologija in biokemija rastlin) različen. K izražanju genov pa pomembno prispevajo tudi neživi (temperatura, padavine, vlaga, tla, voda v tleh, veter, svetloba) in živi dejavniki okolja (prisotnost koristnih in patogenih organizmov, mikroorganizmov, plevelov), ki kompleksno in v interakciji delujejo na rastlino (Slika 1). Če povzamemo, imamo opravka z dvema komponentama, ki skupaj določata lastnosti rastline: genetika rastline in dejavniki okolja. Zelo pomembno je, da te interakcije razumemo in proučimo, na katere lastnosti ima okolje manjši vpliv in na katere večji. Slednje je nujno pri procesih žlahtnjenja, ko želimo določene lastnosti genskih virov izboljšati. Z vidika gojenja pa nas zanima

končni produkt; zdrava, odporna rastlina s čim večjo sposobnostjo sinteze tarčnih, biološko pomembnih molekul na površino.



Slika 1: Shematični prikaz vpliva dejavnikov okolja na fenotip rastline.

Večina študij, ki poroča o kakovosti in kemijski sestavi izvlečkov, se osredotoča prav na vpliv okolja, med tem ko je vpliv genetike rastline oziroma raznolikost v populacijah določene vrste/podvrste v večini primerov zanemarljiv. Razlog je najverjetneje, da za mnoge aromatične rastline ni razpoložljivih vrstno specifičnih markerjev DNA, oziroma razvoj le teh močno zaostaja v primerjavi s kmetijskimi rastlinami. Ne glede na to je potrebno selekcijo oz. odbiro genetskega materiala za nadaljnje gojenje skrbno načrtovati. V Maroku so na primer Yousif in sod. (2021) proučevali spremembe v kemijski sestavi eteričnega olja prosto rastočih in gojenih rastlin vrste *Origanum compactum* (Benth). V analizo so vključili prosto rastoče rastline iz različnih regij, nabrali seme in potaknjence ter jih nato prenesli v pridelavo. Analizirali so količine eteričnega olja v prostorastoči populaciji, v skupini rastlin, razmnoženih s semeni ter v rastlinah, ki so jih vzgajali s potaknjenci. Ugotovili so, da se je v večini primerov količina eteričnega olja nekoliko znižala v pridelavi, le v eni regiji so zaznali povečanje pri gojenih rastlinah. Podobno so odstopanja odkrili pri proučevanju določenih spojin. Količina timola se je pri gojenih rastlinah zvišala (podatki za eno od lokacij: 0.81 % prosto rastoče, 23,10 % rastline iz semena, 29,92 % klonske rastline) in podoben trend je bil opažen tudi za spojine p-cimen, γ-terpinen in karvakrol. Kot omenjeno, je bila med posameznimi lokacijami in skupinami rastlin prisotna precejšnja variabilnost in tako izrazite spremembe niso bile ugotovljene pri vseh lokacijah. Pomanjkljivost študije je da, so avtorji izvedli študijo na genetsko heterogenih rastlinah ter na ločenih lokacijah z različnimi pedo-klimatskimi razmerami.

Preden se odločimo za gojenje rastline na večji površini, je torej nujno predhodno preizkušanje v poljskih poskusih, s katerimi dobimo informacije o potencialu rastline in odpornosti, kar omogoča nadaljnji izbor točno določenih genotipov s pričakovanim kemotipom in s tem tudi uspešnost pridelave.

Pri prenosu v kmetijski prostor se srečamo še z izzivi glede tolerance na abiotske dejavnike (odpornost na nizke ali visoke temperature, sončno obsevanje, pomanjkanje ali preveč vode, zasoljena, degradirana tla...) ter biotske dejavnike (na primer pojav novih bolezni in škodljivcev). Fitopatogeni so prisotni tudi v naravi, vendar so populacije organizmov v naravnem ekosistemu običajno v ravnovesju, v kmetijskem prostoru pa se zaradi spremenjenih ekoloških razmer lahko pojavijo številčnejše in povzročijo gospodarsko škodo. Nenadzorovan prenos rastlin iz narave je lahko zelo nevaren, saj rastline morda ne kažejo znamenj okužb in se le te pokažejo šele kasneje v pridelavi. Zato je zelo pomembno, da rastline pregleda pristojna oseba oz. fitopatolog in da se opravi določene teste in kontrole. Pri razmnoževanju nekontroliranih rastlin, lahko okužbe prenesemo v nasad. Eden od perečih problemov je denimo bakterija *Xylella fastidiosa*, ki gostuje na več kot 50-ih vrstah med njimi pa so tudi številne aromatične rastline, kot na primer sivka, laški smilj, mirta, pelin, lovor, trpotec. Bakterija velja za karantenski organizem, saj povzroča propad številnih rastlin, med njimi citrusov, oljk (bakterijski ožig oljk), trte. Do leta 2010 se je pojavljala samo v severni in južni Ameriki, v Aziji (Tajvan) so jo odkrili v 2013, na sredozemskih vrstah in urbanem okolju pa so jo v Evropi odkrili v Španiji, Italiji, Franciji in na Portugalskem (EPPO, 2020). Iz tega vidika je torej zelo pomembno, da rastlinskega materiala ne prenašamo iz okuženih območij. Novi patogeni se na aromatičnih rastlinah lahko pojavijo tudi zaradi predhodne intenzivne rabe tal ter neprimerne strukture (na primer težka, slabo odcedna tla). Posebej problematične so talne glive, ki jih praktično ne moremo zatirati, zato je pomembno, da zdravilne rastline sadimo samo v zanje primerna tla ter okolje z ustreznimi ekološkimi dejavniki.

Prenos prostorastočih rastlin v kmetijsko pridelavo ni vedno enostaven, včasih tudi nemogoč. Največjo oviro predstavljajo posebni ekološki pogoji, ki jih v kmetijski pridelavi ne moremo zagotoviti (na primer posebna zahteva glede tal, interakcije med oprasovalci in rastlinami) ter same biološke značilnosti rastlin (na primer počasna rast, nizka stopnja kalivosti semen, neodpornost na patogene). Nujna sta tudi določen časovni in finančni vložek, povezana z dolgotrajnim proučevanjem odziva rastlin v novem ekosistemu, selekcijo in žlahtnjenjem za razvoj sort, ki ustrezajo zahtevam industrije.

3.2 Pomen agronomskih raziskav in žlahtnjenja zdravilnih in aromatičnih rastlin

Gojenje zelišč zahteva interdisciplinarni pristop različnih strok, od agronomije, botanike, žlahtnjenja, fiziologije rastlin, fitopatologije in entomologije do medicinskega in biokemijskega znanja. Vse dejavnosti bi morale biti znanstveno podprte in potrebno bi bilo uvajati inovativne postopke, saj še vedno prevladujejo tradicionalne izkušnje in prakse pridelave. Zhang in sod. (2021) poudarjajo, da so strokovnjaki potrebni za zagotavljanje tehnoloških smernic za izbiro lokacij

zemljišč, tehnologij gojenje, za žlahtnjenje, izbor vrst in sort. Poseben poudarek je potrebno nameniti sadilnemu materialu, obvladovanju bolezni in škodljivcev, vrednotenju kakovosti, razvoju strojev za pridelavo in predelavo ter optimalni žetvi glede na čas in razvoj rastlin. Okrepljeno povezovanje med pridelavo, izobraževanjem in raziskovanjem ima pomembno vlogo za doseganje visokih pridelkov in kakovosti.

Agronomske raziskave, skupaj z žlahtnjenjem, imajo pomembno vlogo pri izboljšanju gojenja in genskih virov zdravilnih rastlin. Pomembno je pridobiti genotipe, ki bodo ustrezali določeni uporabi oziroma bodo imeli natanko tiste lastnosti, ki jih želimo. Podobno kot pri vodilnih kmetijskih rastlinah lahko s tradicionalnimi metodami žlahtnjenja in novejšimi postopki biotehnologije izboljšamo genske vire. V primerjavi s kmetijskimi rastlinami, je žlahtnjenje zdravilnih rastlin šele v začetni fazi. Osrednji cilji žlahtnjenja zdravilnih rastlin so običajno povečanje in stabilnost pridelka, sprememba vsebnosti bioloških spojin s farmakološkim učinkom, izločanje neželenih spojin, toleranca na abiotske in biotske dejavnike, doseganje izenačenosti rastlin, visoka vsebnost suhe snovi (Lakshman Chandra, 2017; Lohwasser in Weise, 2021). Kot navajata Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic (2015) so superiorni genotipi izjemno pomembni za profitno pridelavo visoko kakovostnega rastlinskega materiala. Pri tem pa je nujno slediti farmakologiji, da bi dosegli standardizirane produkte za farmacevtsko industrijo.

Prednost zdravilnih rastlin je, da v naravi uspevajo genetsko zelo heterogene, variabilne populacije, kar je predpogoj za žlahtnjenje. To je tudi eden od razlogov, da so bili pri žlahtnjenju zdravilnih rastlin večinoma uporabljeni klasični žlahtniteljski pristopi. Najbolj enostaven pristop vključuje spremljanje genetsko različnih rastlin v populaciji in odbiro najuspešnejših rastlin, ki jih nato razmnožimo vegetativno. Druge možnosti so tudi načrtna križanja izbranih staršev in ustvarjanje genotipov z novimi kombinacijami lastnosti, vendar je ta postopek precej daljši. Za selekcijo lahko žlahtnitelji, poleg naravnih populacij, uporabijo tudi genske vire hranjene v genskih bankah, botaničnih vrtovih ali pa stare sorte. Zaradi začetne velike variabilnosti je mogoče pridobiti visoko selekcijsko odzivnost (razlika v povprečnih vrednostih potomcev odbranih rastlin in celotne populacije iz katere so bile odbrane starševske rastline) v relativno kratkem času, zato so selekcijski postopki lahko krajši in hitreje privedejo do identifikacije željenih genotipov in razvoja sort (Carlen, 2012). Najbolj tradicionalen primer žlahtnjenja vključuje pregled in selekcijo obstoječih, razpoložljivih genskih virov rastline in uporaba odbranih virov za morebitne nadaljnje žlahtniteljske pristope. O uspešnem primeru tovrstne prakse poročajo za poprovo meto (*Mentha x piperita* L.) pri selekciji na večji pridelek, kemijsko sestavo in senzorično kakovost pri grenkem komarčku (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* var. *vulgare*) ter pri poletnem šetraju (*Satureja hortensis* L.) na vsebnost eteričnega olja (Lohwasser in Weise, 2021). Tudi pri rožmarinu (*Rosmarinus officinalis*) so na Sardiniji z masovno selekcijo naravnih populacij izbrali 20 rastlin, ki so jih klonsko razmnožili in testirali njihove lastnosti (morfološke, fenološke in kemijske) in tako registrirali 6 različnih sort (Hammer in Junghanns, 2020).

V primeru, da variabilnosti rastlin ni, jo je potrebno ustvariti umetno s križanjem izbranih starševskih rastlin in ustvarjanjem križancev. Možno je tudi mutacijsko žlahtnjenje z uporabo sevanja ali drugih mutagenih dejavnikov, s katerim so ustvarili sorto poprove mete 'Multhimenta', ki jo odlikuje visoka vsebnost eteričnega olja (Lakshman Chandra, 2017). Za ohranitev genotipa izbranih superiornih rastlin uporabljajo vegetativno razmnoževane. Slednje je zelo pomembno pri tujeprašnih rastlinah (ali samoprašnih heterozigotnih rastlinah), saj bi lahko nadaljnjo generativno razmnoževanje s semeni privedlo do izgube želenih lastnosti oziroma do novih kombinacij lastnosti, ki niso nujno uporabne.

Kljub prej omenjeni variabilnosti prostorastočih populacij, ki pri razvoju novih sort predstavlja prednost, so žlahtniteljski postopki še vedno dolgotrajni, kar je verjetno tudi eden od razlogov, da je bilo malo zeliščnih vrst deležnih udomačitve in postopkov selekcije, ki bi prispevali k razvoju in registraciji novih sort (Dajic-Stevanovic in Pljevljakusic, 2015). Lakshman Chandra (2017) v preglednem prispevku o žlahtnjenju zdravilnih in aromatičnih rastlinah povzema vrste, pri katerih so žlahtnitelji razvili izboljšane sorte: svetli indijski trpotec (*Plantago ovata* Forssk.), vrtni mak (*Papaver somniferum* L.), aleksandrijska sena (*Cassia angustifolia* Mill.), madagarskarski zimzelen (*Catharanthus roseus* G. Don), golostebelni sladki koren (*Glycyrrhiza glabra* L.), ašvaganda (*Withania somnifera* (L.) Dunal), velikocvetni jasmin (*Jasminum grandiflorum* L.), palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.), vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash), limonska trava (*Cymbopogon pendulus* Will. Watson), kamilica (*Matricaria chamomilla* L.), njivska meta (*Mentha arvensis* L.), poprova meta (*Mentha x piperita* L.), klasasta meta (*Mentha spicata* L.), južnoazijski kačji koren (*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz), volnatodlakavi naprstec (*Digitalis lanata* Ehrh.), dolgi poprovec (*Piper longum* L.), pačuli (*Pogostemon cablin* Benth.), aloe vera (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)... Vendar pa je le manjše število vrst, predvsem tiste, ki lahko s prodajo semen ali sadik povrnejo vložek v žlahtnjenje, vključenih v neprekinjene žlahtniteljske programe žlahtniteljskih podjetij (Novak in Blüther, 2020). Med slednje sodijo konoplja, koriander, sivka, kamilica, vodna kreša, tobak, bazilika, majaron, origano, itd.

V nadaljevanju predstavljamo nekaj primerov žlahtnjenja zdravilnih rastlin. Enoletni pelin (*Artemisia annua* L.) je pomemben vir artemizina, seskviterpena v listih, ki ga uporabljajo v zdravilu proti malariji. Z žlahtnjenjem so že uspeli vzgojiti križance z vsebnostjo več kot 1 % artemizina (sorta 'Artemis') (Delabays in sod., 2001), sedaj pa se osredotočajo na razvoj novih sort, ki bi imeli še višjo vsebnost artemizina ter bi bili prilagojeni za gojenje v tropskem podnebju, kjer se malarija tudi pojavlja. V poskusnem polju so testirali več sto klonov, pri čemer so spremljali vsebnost spojine, pridelavo suhe snovi in fotoperiodo cvetenja. Za nadaljnja križanja med genotipi so izbrane rastline ohranili in razmnoževali *in vitro*. Preizkusili so 45 kombinacij križanj in identificirali 5 potencialno dobrih genotipov, ki so jih ponovno testirali v poljskem poskusu. Vsebnost artemizina so tako uspeli dvigniti na 1,6 – 1,95 %. Pri selekcijskem postopku je bila v ospredju koncentracija artemizina, pri odločanju o potencialu genotipov so upoštevali še sposobnost produkcije zelene

mase (listov), zahteve za cvetenje, toleranco na bolezni in škodljivce ter možnost gojenja v različnih vremenskih razmerah. Žlahtnjenje enoletnega pelina je podprto tudi s QTL (lokusi kvantitativnih lastnosti), ki so povezani s kontrolo vsebnosti artemizina (Carlen, 2012).

Šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.) je cenjena zaradi protivirusnega delovanja in se uporablja tudi za preprečevanje depresije. Zaradi neodpornosti na atraknozo so proučevali komercialne sorte 'Topas', 'Hypermed', 'Elixir' ter 21 divjih akcesij iz različnih držav ter jih med seboj primerjali. Raziskave so potekale v Švici na treh lokacijah, kjer se običajno pojavljajo okužbe. Populacije so se na okužbe zelo različno odzvale. Razlike so opazili tudi v času cvetenja, morfologiji rastline in cvetov ter v fitokemijskih profilih. Zaradi nizke dovzetnosti za okužbe so odbrali akcesijo P7, ki je imela tudi podoben kemijski profil kot sorta 'Topas' in zato ustrezala zahtevam industrije. Seme pa je zaradi naravno prisotnega načina razmnoževanja, t.j. pseudogamno apomiktično razmnoževanje (seme se razvije iz nereducirane jajčne celice in so zato potomci kloni materine rastline) mogoče pridobiti relativno enostavno. Odbrano akcesijo so registrirali kot novo sorto 'Hyperivo' (Carlen, 2012).

Vrtni timijan (*Thymus vulgaris* L.) vsebuje eterično olje, ki je cenjeno zaradi protimikrobnega in antioksidativnega delovanja. Za doseganje homogenosti in standardizirane kakovosti, se je kot primeren pristop pokazal razvoj hibridov s križanjem moško sterilnih z moško fertilnimi rastlinami. V poskusu so ustvarili 56 križancev ter identificirali enega, ki so ga registrirali kot novo sorto 'Varico 3', z visoko vsebnostjo eteričnega olja (4,9 %), ki je presegla vrednosti obstoječe sorte 'Varico 2' (3,5 %) (Carlen, 2012). V Iranu so Mohammadi in sod. (2020) raziskovali ekotipe različnih vrst rodu *Thymus* (*T. daenensis*, *T. kotschyanus* in *T. lancifolius*) ter jih primerjali s sortami *T. vulgaris* (tj. 'Varico 3' in 'Deutscher', Zima) v izenačenih pogojih. Najvišji delež eteričnega olja (7,83 %) so odkrili pri ekotipu llam vrste *T. daenensis*, ta vrsta je imela tudi najvišji delež timola (>75 %). Avtorji so poročali o raznolikosti kemotipov in znotraj ekotipov identificirali elitne genotipe, ki bi jih lahko uporabili za nadaljnje žlahtnjenje.

Kamilica (*Matricaria recutita* L.) je ena najbolj poznanih zdravilnih rastlin, ki jo v zgodovini v svojem delu omenja Hipokrat. V naravi obstajajo populacije z različnimi kemotipi, ki so povezani z genotipom. Populacije se razlikujejo v vsebnosti bisabololoksidov (tip A in B) v eteričnem olju. Danes je na razpolago veliko število sort, ki so večinoma krajevne populacije, stare sorte, mešane populacije. V Nemčiji prevladujeta sorti 'Manzana' in 'Mabamille' z visoko vsebnostjo alfa-bisabolola in kamazulena, požlahtnili pa so tudi tetraploidno sorto 'Bodegold', ki se je izkazala v izjemnih senzoričnih lastnostih. Večinoma so bile sorte žlahtnjene s fokusom na določene aktivne spojine, vendar pa imajo pomanjkljive gospodarske pomembne lastnosti, kot denimo nehomogen čas cvetenja. V zadnjem desetletju žlahtniteljski programi potekajo na Slovaškem in v Rusiji (Albrecht in Otto, 2020). V Grčiji so Tsivelika in sod. (2018) proučevali fenotipske značilnosti in kemijsko raznolikost enajstih divjih populacij kamilice, da bi izbrali najprimernejše za pridobivanje kakovostnega eteričnega olja. Pri tem so se osredotočili na kemični spojini a-bisabolol in kamazulen. Med populacijami so izbrali dve obetavni, katerih

karakteristike so primerjali s petimi komercialnimi sortami. Vsebnosti spojin a-bisabolol-a (32.6 %) in kamazulena (15.3 %) so presegle vrednosti pri komercialnih sortah, zato so populacije prostorastočih rastlin perspektivne za nadaljnji žlahtniteljski program za razvoj sort z ustrezno kemijsko sestavo eteričnega olja. Glavne lastnosti rastlin kamilice, ki jih želijo doseči pri žlahtnjenju so velika socvetja, enakomerna višina, visok pridelek droge in visoka vsebnost eteričnega olja (0.7–1.0 % ali več), visoka vsebnost a-bisabolola (>50 %) in kamazulena (>25 %) ter odpornost na biotske in abiotske razmere (Albrecht in Otto, 2020).

Osrednji cilji žlahtnjenja sivke so izboljšati in povečati pridelek cvetov in eteričnega olja, pridobiti ustrezen kemijski profil eteričnega olja ter odpornost na biotski in abiotski stres (Gallotte in sod., 2020). Pravo sivko (*Lavandula angustifolia* Mill. = *Lavandula officinalis* Chaix) so večinoma žlahtnili s klasičnimi metodami znotraj prosto rastočih in gojenih populacij. Pridobljeno je bilo tudi nekaj novih virov variabilnosti s križanjem rastlin in uporabo mutacijskega žlahtnjenja (izzivanje mutacij z uporabo gama žarkov ali kemijskih spojin). V vzhodni Evropi so tako vzgojili kar nekaj produktivnih klonov z dobro kakovostjo eteričnega olja. Klonski material je izenačen in ima stabilne lastnosti, zaradi česar je pridelava lažja in bolj predvidljiva, vendar pa parfumska industrija išče kompleksnejše kemijske profile s posebnimi senzoričnimi lastnostmi eteričnega olja, ki ga je možno doseči le z različnimi genotipi. Tako so se v Franciji odločili za razvoj sintetičnih sort. Kot izhodiščni material za razvoj novih sort so uporabili rastline, sejance, ki so jih na polju odbrali glede na različne stopnje tolerantnosti na bolezen, ki jo povzročajo fitoplazme iz rodu *Candidatus*. V prvi selekciji so odbrali 400 klonov, ki so jih razmnožili in proučili kemijske profile eteričnega olja, kakovost ter količino pridelka. Po letih selekcije so izbrali 60 superiornih klonov, ki so jih nato križali med seboj za testiranje kombinacijske sposobnosti. Prva sintetična sorta iz tega žlahtniteljskega programa je bila 'Rapido', sledila ji je sorta 'Carla'. Starševske klone teh dveh sort so nato testirali glede tolerance na sušo. Nadaljnja selekcija je tako privedla do izbora sorte 'Salaria', ki je bila izboljšana verzija sorte 'Carla', prilagojena na sušne razmere. Sorta 'Salaria' je postala popularna zaradi kakovosti eteričnega olja, izboljšanega kemotipa in senzoričnih lastnosti, izboljšanega pridelka, in tolerance na fitoplazmo. V Franciji na 70 % vseh površin uspeva vegetativno razmnožena sivka, na preostalih 30 % pa sivka razmnožena s semeni. Med temi slednjimi pa kar 80 % sivke predstavljajo sorte 'Rapido', 'Carla' in 'Salaria' (Gallotte in sod. 2020). Pri lavandinu, ki je nastal spontano s križanjem *Lavandula angustifolia* Mill. in *Lavandula latifolia* ter je sterilen, je genetska variabilnost v naravi zelo omejena. Tradicionalno gojeni kloni so večinoma pridobljeni z masovno selekcijo genskih virov iz narave. Klon 'Abrial' se je v Franciji razširil med petdesetimi in šestdesetimi leti 20. stoletja, vendar so bile rastline precej neoporne in so množično propadale. Ta klon je nato nadomestil klon 'Grosso', ki je odpornejši, vendar z drugačnim kemijskim profilom. Za povečanje variabilnosti so uporabili različne metode. Z indukcijo poliploidov s kolhicinom so ustvarili tetraploide, ki so jih nato križali s pravo sivko in pridobili triploidne rastline med katerimi so izbrali 9 klonov, ki jih sedaj proučujejo in še niso komercialno dostopni. Različne raziskovalne skupine so poskusile tudi križanja rastlin *Lavandula angustifolia* Mill. in *Lavandula latifolia*.

Število dobljenih medvrstnih križancev je nizko, prav tako s tem pristopom niso dosegli boljšega potenciala. Poskusili so še biotehnoške pristope, vendar večji premiki na tem področju niso bili doseženi. Začela so se tudi proučevanja genoma ter razvoj novih genomskih orodij, s katerimi si obetajo selekcijo s pomočjo markerjev (MAS), opozarjajo pa, da bo potrebno še veliko dela predvsem na lavandinu, saj je njegova genetska raznolikost precej nizka (Gallotte in sod. 2020).

3.3 Pomembnejši koraki prenosa prostorastočih rastlin v pridelavo

Pri odločanju za gojenje zdravilnih in aromatičnih rastlin je pomemben cilj pridelave. V Sloveniji prevladujejo manjši nasadi, pridelovalci zdravilne in aromatične rastline gojijo za lastne potrebe in lokalno okolje. Opazen je tudi trend razvoja in trženja lastnih izdelkov (naravna kozmetika, čaji, začimbe), s katerimi pridelovalci dosežejo večjo dodano vrednost. Odločitev za gojenje na večjih pridelovalnih površinah mora biti zelo premišljena, saj se bodo stroški pridelave s površino večali. V tem primeru je izjemno pomembno, da zagotovimo odjemalca pridelanega rastlinskega materiala. Odlično prakso na tem področju so vzpostavili v kozmetičnem podjetju L'Occitane v Franciji, ko so leta 2001 na Korziki odkrili laški smilj (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil.). Laški smilj vsebuje neril acetat, zelo iskano molekulo za kozmetične izdelke zaradi delovanja proti staranju. Korziški smilj dosega visoke koncentracije te spojine, kar pa je povezano z genotipi ter posebnostmi rastišča (tla, podnebje). L'Occitane daje prednost kratkim, trajnostnim dobavnim verigam surovin, ki temeljijo na zaupanju, sledljivosti in kakovosti. Z namenom, da bi preprečili pritisk na naravna rastišča laškega smilja, so se povezali s pridelovalci, jim zagotovili sadilni material ter se z večletnimi pogodbami obvezali za odkup surovin. V 2004 so tako vzpostavili prve nasade na 50 ha površine, prve pridelke pa so pospravili 2007. V 2016 je pridelava obsegala več kot 100 ha pri več kot 10 pridelovalcih (Groupe L'Occitane, 2016).

Poleg poznavanja bioloških lastnosti rastlin, je pri vzpostavitvi pridelave pomembno, da natančno proučimo agroekološke zahteve. Ključna je izbira sadilnega materiala, saj bo od genotipa odvisna sinteza bioloških molekul – učinkovin zaradi katerih rastlino pridelujemo. Pred dobavo sadilnega materiala se je potrebno informirati o pravilni identiteti zelišča, izvora, zdravstvenega stanja ter karakteristikah kot so odpornost, potencial za sintezo bioloških učinkovin, posebnih zahtevah pri gojenju, itd.



Slika 2: Shematski prikaz prenosa prostorastočih rastlin v kmetijski prostor.

V primeru prenosa rastlin iz narave, je obvezno predhodno testiranje rastlin na manjših površinah preden jih sadimo na večjih. Z naključnim izbiranjem sadilnega materiala v naravi tvegamo izgubo 'tipičnosti' metabolnih profilov. Prav tako je pomembno predhodno poznavanje odpornosti rastlin. Metode selekcije, vključno s testiranjem za prisotnost patogenih mikroorganizmov, lahko po oceni Carlena (2012) trajajo od 5 do 15 let in več. Priporočljivi osnovni koraki pri prenosu so sledeči (Slika 2):

- 1) pregled in izbira genskih virov, nabiranje reprezentativnih vzorcev na osnovi morfoloških ali drugih variabilnih lastnosti,
- 2) razmnoževanje sadilnega materiala (semena, potaknjenci),
- 3) sajenje/saditev različnih genotipov v nasad,
- 4) opazovanje in vrednotenje lastnosti posameznih genotipov: odpornost, zelena masa, cvetenje, morfološke in kemijske značilnosti, opazovanja naj se vršijo vsaj tri leta, na več lokacijah,
- 5) odbira superiornih rastlin (glede na pridelek, kakovost, odpornost),
- 6) ponovno razmnožimo perspektivne genotipe za ponovno testiranje ali za gojenje na večjih površinah.

V primeru, da gre za rastlinsko vrsto, po kateri je povpraševanje industrije veliko, je smiselno rastlino vključiti v žlahtniteljski program. Predstavljeni koraki pri prenosu dejansko predstavljajo množično selekcijo za izločitev manj zanimivih oziroma izbor bolj zanimivih genotipov. Zaradi velike variabilnosti prosto rastočih populacij zelišč je možno že v tem koraku s ciljnim kriterijem identificirati rastline z željenimi

kombinacijami. V kolikor množična selekcija ni dala želenih rezultatov, pa so na voljo ostale žlahtniteljske metode.

4 ZAKLJUČEK

Zdravilne in aromatične rastline presegajo zgolj uporabo v prehrani, saj so pomemben vir surovin za razvoj produktov različnih industrij z ekonomsko vrednostjo. V ospredju so oskrba z zelišči v kulinariki/gastronomiji, razvoj zdravil in fitofarmaceutskih pripravkov naravnega izvora, naravnih kozmetičnih izdelkov, prehranska dopolnila rastlinskega izvora in uporaba v sektorju dobrega počutja (velnes) in aromaterapiji. Njihova pridelava prispeva k trajnostnem razvoju območij, diverzifikaciji kmetijstva, ohranjanju biotske raznovrstnosti ter podpira biogospodarstvo in kmečki turizem. Kot navaja EIP-AGRI fokusna skupina za zdravilne rastline (EIP-AGRI Focus Group, 2020) je stalno oskrbo z zelišči v Evropi moč zagotoviti z udomačitvijo in gojenjem ter tako preprečiti prekomerno izkoriščanje rastlinskih vrst v naravi. Glede na dejstvo, da je v Evropi pridelava majhna in je večina zelišč nabranih v naravi oziroma uvoženih, predstavlja pridelava številne poslovne priložnosti.

Ko prosto rastoče rastline preidejo v kmetijsko pridelavo, je njihova pridelava bolj predvidljiva in stabilnejša z vidika velikosti, kakovosti in kemijske sestave pridelka, kar je ključno za nadaljnjo uporabo. Izzivi, s katerimi se soočajo ljubiteljski in profesionalni pridelovalci pri gojenju zelišč, so lahko omejen in reguliran odvzem rastlin iz narave, zagotavljanje kakovostnega sadilnega materiala, problem nepoznavanja izvora sadilnega materiala, pravilna taksonomska klasifikacija vrst in podvrst, primernost okoljskih razmer pridelovalnega območja, izbira ustreznih tehnologij pridelave in predelave, slabše poznavanje in nepredvidljivost bolezni in škodljivcev. Tudi doseganje standardov kakovosti zahteva znanje in poznavanje nacionalne in evropske zakonodaje, ki urejajo varno uporabo zdravilnih rastlin. Uspeh pri gojenju zelišč si torej lahko ometamo le ob širokem, interdisciplinarnem znanju s podporo znanosti ter svetovalnih inštitucij.

Zahvala. Delo je nastalo v okviru Ciljno raziskovalnega projekta V4-2207 »Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji« (2022 - 2024), financiranega s strani Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS ter Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost RS.

5 VIRI

- Albrecht, S. in Otto, L.G. (2020). [Matricaria recutita L.: True Chamomile](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_7). V J. Novak in W. D. Blüthner (ur.), *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants* (str. 313-331). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_7
- Appendino, G., Tagliabue, S., Scafati, O., Minassi, A., Pollastro, F., Ballero, M., Maxia, A., in Sanna, C. (2015). *Helichrysum italicum*: The Sleeping Giant of Mediterranean Herbal Medicine. *HerbalGram*, 105, 34–45.
- Bhattacharya A. (2019). [Chapter 5 - High-Temperature Stress and Metabolism of Secondary Metabolites in Plants](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817562-0.00005-7). V A. Bhattacharya (ur.), *Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules* (str. 391-484). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817562-0.00005-7>.

- Bolješić R. (2022). [Zagotavljanje skladnosti uporabe genskih virov z Nagojskim protokolom v Evropski uniji](#). V Z. Luthar (ur.), [6. Posvet o ohranjanju in trajnostni rabi rastlinskih genskih virov "Samonikle rastline"](#) (str. 10-12). Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. <https://www.gov.si/assets/ministrstva/MKGP/PODROCJA/KMETIJSTVO/RASTLINSKA-PRIDELAVA/RASTLINSKI-GENSKI-VIRI/2023/Izvlecki-predavanj-12.9.2022.pdf>
- Bolješić, R. (2023). [Prosto živeče rastlinske vrste kot genski vir - regulatorni okvir](#). V A. Čerenak (ur.), [7. Posvet o ohranjanju in trajnostni rabi rastlinskih genskih virov \(str. 10-11\)](#). Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. https://www.ihips.si/wp-content/uploads/2016/08/Izvlecki_predavanj_koncna_brocura_2023-1.pdf
- Bourdy, G., Aubertin, C., Jullian, V. in Deharo, E. (2017). [Quassia "biopiracy" case and the Nagoya Protocol: A researcher's perspective](#). Journal of Ethnopharmacology, 206, 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.030>
- Carlen, C. (2012). [Breeding and Cultivation of Medicinal Plants](#). V G. Bagetta, M. Cosentino, M. T. Corasaniti in S. Sakurada (ur.), *Herbal Medicines: Development and Validation of Plant-derived Medicines for Human Health*. (1. izd.) (str. 79-91). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/b11208>
- [Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora](#). (1973). <https://cites.org/eng/disc/text.php>
- Čeh, B. in Eržen, M. (2023). Nabiralništvo zelišč in okolje. Hmeljarski bilten, 30, 119-126.
- Dajic-Stevanovic, Z. in Pljevljakusic, D. (2015). [Challenges and Decision Making in Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants](#). V Á. Máthé (ur.), *Medicinal and Aromatic Plants of the World* (Vol. 1, str. 145-164). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9810-5_8
- Delabays, N., Simonnet, X. in Gaudin, M. (2001). [The genetics of artemisinin content in Artemisia annua L. and the breeding of high yielding cultivars](#). Current Medicinal Chemistry, 8(15), 1795-801. <https://doi.org/10.2174/0929867013371635>
- Dostop do genskih virov in delitev koristi, ki izhajajo iz njihove uporabe (Nagojski protokol). (2020). [Povzetki zakonodaje EU](#). <https://eur-lex.europa.eu/SL/legal-content/summary/access-to-genetic-resources-and-sharing-of-benefits-arising-from-their-utilisation-nagoya-protocol.html>
- EIP-AGRI Focus Group. (2020). [EIP-AGRI Focu Group Plant-based medicinal and cosmetic products. Final report](#). <https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/publications/eip-agri-focus-group-plant-based-medicinal-and.html> (dostop: julij 2024)
- EPPO. (2020). [Xylella fastidiosa](#). <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/datasheet>
- EUROPAM. (2022). [Guidelines for Good Agricultural and Wild Collection Practices for Medicinal and Aromatic Plants \(GACP-MAP\)](#). <https://www.europam.net/wp-content/uploads/2022/11/EUROPAM-GACP-2022.pdf>
- Ferant, N., Baričević, D., Šircelj, H. (2023). [Zdravilne in aromatične rastline: ohranjanje in uporaba](#). V A. Čerenak (ur.), [7. Posvet o ohranjanju in trajnostni rabi rastlinskih genskih virov](#). Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. https://www.ihips.si/wp-content/uploads/2016/08/Izvlecki_predavanj_koncna_brocura_2023-1.pdf
- Festival nabiralništva. (b. d.). <https://festivalnabiralnistva.si> (29. junij 2024)
- Gallotte, P., Fremondière, G., Gallois, P., Bouverat Bernier, J. P., Buchwalder, A., Walton, A., Piasentin, J. in Fopa-Fomeju, B. (2020). [Lavandula angustifolia Mill. and Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel: Lavender and Lavandin](#). V J. Novak in W. D. Blüthner (ur.), *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants* (str. 303-313). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_6
- Grigoriadou, K., Krigas, N., Lazari, D. in Maloupa, E. (2020). [Chapter 4 - Sustainable use of mediterranean medicinal-aromatic plants](#). V P. Florou-Paneri, E. Christaki in I. Giannenas (ur.), *Feed Additives* (str. 57-74). Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00004-2>

- Groupe L'Occitane. (2016). [Immortelle from Corsica Supply Chain report](https://group.loccitane.com/sites/default/files/2017-11/2016-Immortelle%20Sourcing%20Report-EN.pdf).
<https://group.loccitane.com/sites/default/files/2017-11/2016-Immortelle%20Sourcing%20Report-EN.pdf>
- Hammer, M. in Junghanns, W. (2020). [Rosmarinus officinalis L.](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_15): Rosemary. V J. Novak in W. D. Blüthner (ur.), Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants (str. 501-521). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_15
- Hao, D. C. in Xiao, P. G. (2015). [Genomics and Evolution in Traditional Medicinal Plants: Road to a Healthier Life](https://doi.org/10.4137/EBO.S31326). Evolutionary Bioinformatics, 11, 197-212. <https://doi.org/10.4137/EBO.S31326>
- Lakshman Chandra, De. (2017). Breeding of Medicinal and Aromatic Plants – an overview. International Journal of Botany and Reserch, 7(2), 25-34.
- Lohwasser, U. in Weise, S. (2021). [Genetic Resources of Medicinal and Aromatic Plants](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_1). V J. Novak in W. D. Blüthner (ur.), Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants (str. 1-205). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_1
- Lubbe, A. in Verpoorte, R. (2011). [Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019). Industrial Crops and Products, 34 (1), 785-801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>
- MKGP. (2016). [Smernice razvoja lokalne samooskrbe z zelišči za obdobje 2016-2021](https://www.gov.si/assets/ministrstva/MKGP/PODROCJA/KMETIJSTVO/RASTLINSKA-PRIDELAVA/VRTNARSTVO/Zelisca-Smernice.pdf).
<https://www.gov.si/assets/ministrstva/MKGP/PODROCJA/KMETIJSTVO/RASTLINSKA-PRIDELAVA/VRTNARSTVO/Zelisca-Smernice.pdf>
- Mohammadi, S., Tabrizi, L., Shokrpour, M., Hadian, J., Schulz, H. in Riewe, D. (2020). [Morphological and phytochemical screening of some Thymus ecotypes \(Thymus spp.\) native to Iran in order to select elite genotypes](https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.023). Journal of Applied Botany and Food Quality, 93, 186-196. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.023>
- Novak, J. in Blüthner, W. D. (ur.). (2020). [Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants \(Vol. 12\)](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1>
- Pravilnik o osebnem dopolnilnem delu. (2015). [Uradni list RS, št. 94/14](https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=PRAV12251).
<https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=PRAV12251>
- Schippmann, U., Leaman, D. in Cunningham, A. B. (2006). A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. Frontis, 17, 75-95.
- Schippmann, U., Leaman, D. J., Cunningham, A. B. (2002). Impact of cultivation and gathering of medicinal plants in biodiversity: global trends and issues. In: Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry, and fisheries (str. 142-167).
- [The Convention on Biological Diversity](https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf). (1992). <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>
- [The Nagoya Protocol on Access and Benefit-sharing](https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf). (2010).
<https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>
- Tsivelika, N., Sarrou, E., Gusheva, K., Pankou, C., Koutsos, T., Chatzopoulou, P. in Mavromatis, A. (2018). [Phenotypic variation of wild Chamomile \(Matricaria chamomilla L.\) populations and their evaluation for medicinally important essential oil](https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.06.001). Biochemical Systematics and Ecology, 80, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.06.001>
- Twaij, B. M. in Hasan, M. N. (2022). [Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses](https://doi.org/10.3390/ijpb1301000). International Journal of Plant Biology, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijpb1301000>
- Uredba o zavarovanju prosto živečih rastlinskih vrstah. (2004). [Uradni list RS, št. 46/04, 110/04, 115/07, 36/09 in 15/14](https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=URED3192). <https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=URED3192>
- [Uredba \(EU\) št. 511/2014 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. aprila 2014 o ukrepih za izpolnjevanje obveznosti uporabnikov iz Nagojskega protokola o dostopu do genskih virov ter poštenu in pravični delitvi koristi, ki izhajajo iz njihove uporabe, v Uniji](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2014/511/oj?locale=sl). 2014. Uradni list Evropske unije. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2014/511/oj?locale=sl>
- Vines, G. (2004). Herbal harvests with a future: Towards sustainable sources for medicinal plants. Plantlife International.

- Volenzo, T. in Odiyo, J. (2020). [Integrating endemic medicinal plants into the global value chains: the ecological degradation challenges and opportunities](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04970). Heliyon, 6(9), e04970. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04970>
- Yousif, L., Belmehti, O., Abdelhakim, B., Skali Senhaji, N. in Abrini, J. (2021). [Does the domestication of *Origanum compactum* \(Benth\) affect its chemical composition and antibacterial activity?](https://doi.org/10.1002/ffj.3641) Flavour and Fragrance Journal, 36(2), 264–271. <https://doi.org/10.1002/ffj.3641>
- Zakon o ohranjanju narave (ZON). 1999. [Uradni list RS, št. 56/99](https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=ZAKO1600). <https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=ZAKO1600>
- Zakon o preprečevanju dela in zaposlovanja na črno (ZPDZC-1). 2014. [Uradni list RS, št. 32/2014](https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=ZAKO6765). <https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=ZAKO6765>
- Zhang, R., Zhang, MX., Chen, Y., Wang, C., Zhang, C., Heuberger, H., Li, H. in Li, M. (2021). [Future development of Good Agricultural Practice in China under globalization of traditional herbal medicine trade](https://doi.org/10.1016/j.chmed.2021.09.010). Chinese Herbal Medicines, 13(4), 472-479. [https://doi: 10.1016/j.chmed.2021.09.010](https://doi.org/10.1016/j.chmed.2021.09.010).

POSKUS EKOLOŠKE PRIDELAVE KURKUME (*Curcuma longa*) V SLOVENIJI

Tamara KOROŠEC¹, Mojca HRIBERNIK² in Barbara ČEH³

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Arrived: 25. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 5. 12. 2024

Izvleček

V projektu evropskega partnerstva za inovacije smo preučevali, ali bi lahko kurkumo (*Curcuma longa*) vključili v kmetijsko pridelavo v Sloveniji in pod kakšnimi pogoji. Praktični preizkusi so bili izvedeni na treh ekoloških kmetijah in na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS). Preizkušali smo pridelavo v rastlinjaku z mikrorazpršilci (KMG 1), v rastlinjaku s kapljičnim namakanjem (KMG 2), v rastlinjaku z zalivanjem (KMG 3), na prostem pod odprtim tunelom (IHPS), na prostem v dvignjeni gredi (KMG 3), v loncih v rastlinjaku (IHPS) in v loncih na prostem (KMG 3). Največji pridelek smo zabeležili na KMG 1, v povprečju 1106 g svežih rizomov na rastlino. Sledi KMG 2 s 733 g in IHPS pod odprtim tunelom s 514 g. Poskusi so imeli dve obravnavanji – z zastirko iz miskantusa in brez nje; leta na nobeni kmetiji ni značilno vplivala na pridelek rizomov. Glavna razlika v pridelku med lokacijami je bila v mikroklimatskih razmerah (temperatura, vlažnost) med rastlinjaki (simulacija razmer v deželah, kjer se kurkuma sicer prideluje) in razmerami na prostem. Ugotovitve kažejo, da je najboljše razmere mogoče ustvariti v rastlinjaku z večjim volumnom zraka in z uporabo mikrorazpršilcev, s katerimi zagotavljamo visoko zračno vlažnost. V takih razmerah v rastlinjakih lahko pridelamo nadpovprečne pridelke.

Ključne besede: kurkuma, *Curcuma longa*, pridelava, zmerni temperaturni pas, pridelava v rastlinjaki, pridelava v loncih, pridelava na prostem

POTENTIALS FOR ORGANIC PRODUCTION OF TURMERIC (*Curcuma longa*) IN SLOVENIA

Abstract

At the initiative of organic farms, we tested for the first time, under what conditions turmeric (*Curcuma longa*) can be included in agricultural production in Slovenia. Practical trials of turmeric cultivation were conducted on three organic farms and at the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS). We tested cultivation in a greenhouse with micro-sprinklers (Farm 1), a greenhouse with drip irrigation (Farm 2), a greenhouse with manual watering (Farm 3), a tunnel (IHPS),

¹ Dr., Kmetijsko gozdarski zavod Maribor, e-pošta: tamara.korosec@kmetijski-zavod.si

² Kmetijsko gozdarski zavod Maribor, e-pošta: mojca.hribernik@kmetijski-zavod.si

³ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: barbara.keh@ihps.si

an outdoor raised bed (Farm 3), pots in a greenhouse (IHPS), and pots outdoors (Farm 3). The highest yield was recorded at Farm 1, averaging 1106 g fresh rhizomes per plant across all sampled plants. This was followed by Farm 2 with 733 g and IHPS with 514 g of fresh rhizomes per plant. Miscanthus mulch did not affect rhizome yield on any farm. The main difference among the growers was in the microclimatic conditions (temperature, humidity) that could be established in the greenhouse or tunnel. We can conclude that the best conditions can be achieved in a greenhouse with a larger air volume and the use of micro-sprinklers. Above-average yields can be achieved in ideal greenhouse conditions.

Key words: turmeric, *Curcuma Longa*, cultivation, moderate temperate regions, production in greenhouses, production in pots, outdoor production

1 UVOD

Kurkumo (*Curcuma longa* L.) najbolj poznamo kot tradicionalno začimbnico daljnega vzhoda, ki je ob uporabi v kuhinjariki vir naravnih pigmentov in bioaktivnih snovi za kozmetično, prehransko, tekstilno in farmacevtsko industrijo. Je trajnica in uspeva v tropskem in subtropskem podnebjju pri temperaturah med 20 in 30 °C in relativni zračni vlagi nad 70 %. Pridelujejo jo tudi do 1500 m n.v., zahteva vsaj 1500 mm padavin letno ali namakanje. Rastna doba do tehnološke zrelosti je 7 do 10 mesecev, odvisno od sorte. Najbolj razširjena je v Aziji, intenzivno proizvodnjo pa najdemo tudi v Afriki, na Karibih in v Ameriki (Prasad in Aggarwal, 2011; Prasath in sod., 2018). Na svetovni ravni je Indija največja proizvajalka, porabnica in izvoznica (~90 %) kurkume in obvladuje več kot 60 % svetovne trgovine (Anandaraj in sod., 2014).

Čeprav slovenska kuhinja te začimbnice tradicionalno ne vključuje v svoje jedi, je globalizacija v kuhinjariki tudi pri nas povečala povpraševanje po kurkumi, ki se v prahu dodaja azijskim jedem, pa tudi kot popestritev tradicionalnih jedi - bodisi za doseganje lepe barve, večje okusnosti ali povečanja zdravilnih učinkov. Zaradi njenih antioksidativnih, protivnetnih, antimikrobnih in antikancerogenih lastnosti se popularnost njene uporabe še dodatno povečuje (Cozmin in sod., 2024; Menon in Sudheer, 2007; Prasath in sod., 2018; Zoi in sod., 2021). Uporablja se predvsem kot prehranski dodatek za zmanjšanje vnetnih procesov in blaženje infekcij, ljudje jo vključujejo v smoothije in pijače.

Zaradi velikega ogljičnega odtisa, ki ga ima globalna distribucija hrane, je uporaba začimb in hrane iz čezmorskih držav danes pri okoljsko ozaveščenih ljudeh pogosto ni odobravana. Slogan »jejmo lokalno« ali termin »trajnostno prehranjevanje« tako izključuje uporabo živil, ki imajo za seboj tisoče kilometrov. Raziskava, ki jo je naročilo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP), je pokazala, da potrošniki v Sloveniji prednostno izbirajo ekološke izdelke lokalnega porekla pred uvoženimi (MKGP, 2019). Tako so se nekatere slovenske kmetije že preizkusile v pridelavi manj poznanih rastlin iz tretjih dežel, kot je na primer ingver. Tudi na Nizozemskem in v Belgiji za proizvodnjo naravnih pigmentov pilotno uvajajo lokalno pridelavo kurkume po ekoloških načelih (Dendauw in Van Mullem, 2023).

Posebnost pri lokalni pridelavi je to, da potrošniki lahko kupijo sveže, mlade rizome, kar ni običajna praksa, če vemo, da se kurkuma pretežno uporablja posušena in zmleta v prah. V postopku pridelave kurkume v državah tretjega sveta pa so rizomi prekuhani in nato posušeni. Sveže izkopani rizomi kurkume, pridelane v Sloveniji, še nimajo zaščitne kožice in se lahko v celoti takoj porabijo. V kolikor želimo, da rizomi dobijo kožico za povečano obstojnost pri skladiščenju, rizome pustimo v zemlji, zgornje dele rastline pa odrežemo (Dendauw, 2023). Mlade sveže rizome je možno tudi liofilizirati ali klasično posušiti.

Na pobudo ekoloških kmetij smo v projektu evropskega inovacijskega partnerstva preučevali, ali lahko kurkumo vključimo tudi v kmetijsko pridelavo v Sloveniji, pod kakšnimi pogoji, in kakšen potencial ima kurkuma kot dodatna kultura na kmetiji. V zmernem podnebнем pasu srednje Evrope moramo kurkumi zagotoviti čim bolj podobne razmere, kot jih ima v naravnem okolju, da bi lahko pričakovali količinsko zadovoljiv pridelek. Glede na predhodne raziskave to lahko dosežemo s pridelavo v tunelih, neogrevanih ali ogrevanih rastlinjakih (Dendauw, 2023). Prednost pridelave v plastičnem tunelu s folijo je, da rastline lahko uspevajo v precej vročem in vlažnem okolju z minimalnimi vložki. Z odpiranjem in zapiranjem vrat je mogoče nadzorovati rastne razmere, kot sta temperatura in relativna vlažnost (RV). Vendar je ta nadzor omejen. Ogrevan rastlinjak ima prednost, da je mogoče natančneje nadzorovati več parametrov, predvsem temperaturo in RV. Med pridelavo se lahko okna zaprejo, da se ohrani optimalna RV. V sušnih mesecih je mogoče uporabiti mikrorazpršilce za vlaženje zraka. Če temperatura pade pod 19 °C, je mogoče rastlinjak ogrevati. Ogrevalni sistem, ki se uporablja za pridelavo plodovk in je sestavljen iz grelnih cevi pod in med posevki, se je izkazal za primernega, možni pa so tudi drugi sistemi ogrevanja (Dendauw, 2023). V južni in srednji Evropi (Organic..., 2021) pa posamezni pridelovalci kurkumo pridelujejo tudi na prostem.

S poskusi smo želeli ugotoviti, ali se pridelava kurkume lahko izvaja v naših rastnih razmerah. Predstavljamo rezultate poskusne pridelave v Sloveniji v rastlinjakih in na prostem. Primerjali smo večji in manjši plastenjak z različnimi načini namakanja, pridelavo v loncih v plastenjaku in na prostem, odprti tunel na prostem in pridelavo na prostem v dvignjenih gredah.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Postavitev praktičnih preizkusov

Praktični preizkusi pridelave kurkume so bili izvedeni na treh ekoloških kmetijah na Štajerskem in Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS). Preizkušali smo pridelavo v rastlinjaku z mikrorazpršilci (KMG 1), v rastlinjaku s kapljičnim namakanjem (KMG 2), v rastlinjaku z zalivanjem (KMG 3), na prostem v odprtem tunelu (IHPS), na prostem v visoki gredi (KMG 3), v loncih v rastlinjaku (IHPS) in loncih na prostem (KMG 3). Podatki o lokacijah in razmere pri pridelavi so predstavljene v preglednici 1. Sajenje v rastlinjakih in tunelu je potekalo na grebenih z medvrstno razdaljo 60 cm. Razdalja v vrsti je bila 30 cm. KMG 1, KMG 2 in IHPS so na polovici poskusa za primerjavo uporabljali zastirko iz miskantusa z namenom boljšega zadrževanja vlage v tleh in zaščito pred pleveli.

Na osnovi kemijske analize tal je bil za vsako izmed kmetij pripravljen nasvet o gnojenju. Na KMG 1 je bila površina jeseni pognojena z gnojem, analiza spomladi je pokazala 4,8 % humusa, pretirano preskrbljenost s fosforjem in ustrezno s kalijem. Svetovana je bila uporaba domačega komposta pri izdelavi grebenov, dodatek Nemakil in Organik K. Rastline se je po sajenju v rastlinjak škropilo s pripravkom Amalgerol essence za izboljšanje odpornosti, saj so bile zaradi nizkih temperatur (<10 °C) v stresu. Podobno je analiza pokazala prekomerno preskrbljenost s fosforjem in kalijem na površini pod tunelom na IHPS. Tla s pH 6,6 so vsebovala 4,3 % humusa. Svetovalo se je gnojenje z dušičnim gnojilom Fertorganico® 11 (30 kg/ha) ob izdelavi grebenov in dognojevanje čez 2-3 mesece z enako količino. Na KMG 2 je bila površina pripravljena na sveže zoranem travniku s pH tal 5,7, z dobro preskrbljenostjo s fosforjem in srednje dobro preskrbljenostjo s kalijem. Dognojilo se je z govejo gnojevko. Na KMG 3 je bila v tleh dobra preskrbljenost s fosforjem in siromašna s kalijem. Kmetiji je bila svetovana uporaba domačega komposta pri izdelavi gredic, kalijevega sulfata in dodatka Nemakil 330 in Organik K v odmerkih glede na analizo.

Sajenje je potekalo od 19. aprila do konca maja glede na vremenske razmere, temperaturo tal in dorečen način pridelave za posamezno kmetijo. Sadike smo sadili v tla, ogreta na 20 °C. V rastlinjaki se je temperatura zraka skušala vzdrževati med 20 in 30 °C z odpiranjem stranic. Dodatnega ogrevanja ni bilo. V rastlinjaki so bili nameščeni termometri zraka in tal ter vlage. Kmetije so vodile evidenco temperature tal in zraka, zračne vlage, monitoringa rasti ter morebitne prisotnosti bolezni in škodljivcev.

Preglednica 1: Podatki o lokacijah in načinu pridelave kurkume na treh ekoloških kmetijah in IHPS v letu 2024

	Lokacija	Nadm. višina (m)	Način pridelave	Datum sajenja	Datumi vzorčenja	Število sadik
KMG 1	46°27'23.8" N 15°35'06.5" E	600	Rastlinjak (5x8 m), mikro-razpršilci, grebeni, razdalja 30x60, gnojenje s hlevskim gnojem, polovica tal zastrtih z miskantusom.	19.4.	27.9. 10.10. 25.10.	150
KMG 2	46°21'34.2" N 15°24'06.4" E	322	Rastlinjak (3x6 m), kapljično namakanje, grebeni, sadilna razdalja 30x60; gnojenje z gnojevko 1x (11.6.), polovica tal zastrtih z miskantusom.	30.4.	7.9. 11.10.	100

	Lokacija	Nadm. višina (m)	Način pridelave	Datum sajenja	Datumi vzorčenja	Število sadik
KMG 3	46°19'00.0" N 15°28'22.4" E	280	Rastlinjak (4x8 m), ročno zalivanje, grebeni, sadilna razdalja 30x60; gnojenje z Nemakil Visoka greda (3x2) Lonci (R=30 cm, višina 20 cm)	Lonci: 16.5. Rastlinjak 17.5. Visoke grede: 25.5.	11.10. 11.10. 25.10.	100 (40 rastlinjak, 40 visoka greda, 20 lonci)
IHPS*	46°14'55.5" N 15°09'42.7" E	255	Odperti tunel, grebeni, razdalje sajenja 30x60; gnojenje s Fertorganico; Polovica tal zastrtih z miskantusom. Lonci v rastlinjaku (R 40 cm, višina 30 cm)	Odpri tunel: 14.5. Lonci: 26.4.	15.10. do 17.10.	90 (80 tunel, 10 lonci)

*Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Rastlinski material (sadike; slika 1) so bile italijanskega izvora, vzgojene pri podjetju Cooperazione agricola Braccianti Giulio Bellini in dobavljene 9. 4. 2024 v velikosti 15-20 cm. Gre za tip kurkume imenovan Madras, ki izvira iz Indije, vendar ga že 15 let selekcionirajo v Italiji. Sadike so bile testirane na prisotnost karantenske bakterije *Ralstonia Solanacearum* na Nacionalnem inštitutu za Biologijo v Ljubljani. Izvidi testiranja so bili negativni. Z dobavo sadik smo prihranili čas kaljenja rizomov in začetne rasti in tako skrajšali čas rasti na kmetijah, se izognili izpadu pridelka zaradi morebitnih težav pri kalivosti rizomov in dodatni porabi elektrike za ogrevanje.



Slika 1: Sadike kurkume italijanskega izvora so bile dobavljene preko avstrijskega dobavitelja (levo), pridelava kurkume v rastlinjaku na KMG 2 (v sredini) in rizomi ene rastline kurkume (desno)

2.2 Vzorčenje

Vzorčenje smo izvajali v več terminih po prvi občutni ohladitvi. Prvo vzorčenje je bilo izvedeno 27. 9. 2024 na KMG 1 in KMG 2, kjer je bila kurkuma tudi najbolj zgodaj posajena in je imela najboljše razmere za rast (rastlinjaki). Nato smo vzorčili ponovno čez 14 dni, da smo videli, ali kljub nižjim temperaturam kurkuma še vedno napreduje v rasti rizomov. Na KMG 3 smo z vzorčenjem začeli z zamikom, in sicer 10. 10. 2024 zaradi kasnejšega sajenja. Na KMG 1 in KMG 3 so bila opravljena tri vzorčenja s po šestimi rastlinami na obravnavanje, na KMG 2 smo vzorčili dvakrat v razmiku 14 dni. Posamezne rastline smo vzorčili naključno po obravnavanjih, na vsak termin po 6 rastlin na obravnavanje (na kmetijah). Na IHPS se je vsa obravnavanja vzorčilo v istem terminu, vrednotili smo vse rastline v poskusu (15. 10. do 17. 10. 2024).

Pri vzorčenju smo za vsako rastlino določili: višina rastline, skupno maso svežih opranih rizomov, maso zelenega dela rastline, število poganjkov, število listov, število primarnih stranskih rizomov, povprečno dolžino primarnih stranskih rizomov, število fingerjev oz. sekundarnih stranskih rizomov na en primarni stranski rizom. Previdno izruvane rastline smo očistili zemlje in rizome oprali. Vzorec rizomov in zelenega dela rastlin smo posušili za določanje suhe snovi v vzorcih.

2.3 Vremenske razmere

Vremenske razmere v času sajenja sadik niso bile ugodne zaradi nizkih temperatur, ki so letu 2024 nastopile aprila. Tako je bila 25. 4. 2024 minimalna temperatura zraka izmerjena na meteorološki postaji Letališče Edvarda Rusjana Maribor le 3,9 °C, najvišja pa 8,2 °C. Na KMG 1 je bil rastlinjak prve dni delno ogrevan, saj je zaradi vlažnosti nenehno prihajalo do težav z grelnimi telesi. Na drugih kmetijah ni bilo možnosti ogrevanja. Izven rastlinjakov so bile sadike posajene šele, ko se je sredi maja povprečna zunanja temperatura dvignila nad 15 °C. Poletje je bilo vroče, z najvišjimi temperaturami v drugi polovici avgusta. Visokim temperaturam je sredi septembra sledil močan padec temperatur na okrog 7 °C, zaradi česar smo se odločili, da začnemo s postopnim vzorčenjem.

2.4 Statistična analiza

Statistična analiza je bila izvedena z uporabo programske opreme SAS STAT za primerjavo srednjih vrednosti skupin. Z uporabo N-Way ANOVA in Tukey-Kramerjevega testa smo vrednotili razlike v masi svežih rizomov med kmetijami, med uporabo zastirke iz miskantusa ali brez zastirke, med pridelavo v rastlinjaku, visoki gredi in v loncih na KMG 3. Analiza je vključevala stopinje svobode in pripadajoče p-vrednosti. Pred izvedbo so bile preverjene številne predpostavke, vključno z normalnostjo porazdelitve podatkov, homogenostjo varianc in neodvisnostjo opazovanj.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Vpliv vremena

Zaradi nizkih temperatur so sadike kazale znake stresa in v rastlinjakih do srede maja le počasi napredovale. V odprtem tunelu so temperature počasneje dosegle temperature v rastlinjakih, rastline so počasneje štartale v rasti, dovolj visoke relativne vlage ni bilo mogoče vzpostaviti. Rastline na prostem so poleti utrpeli velik stres zaradi sončne pripeke in nizke vlažnosti. Tudi na južnem robu manjšega rastlinjaka na KMG 2 je bilo opaziti zastoj v rasti in sončne ožige. V vseh rastlinjakih je bil očiten robni učinek, pri čemer predpostavljamo, da kurkuma ne mara prepiha, direktnega sonca (rob na južni strani) in zmanjšane vlage.

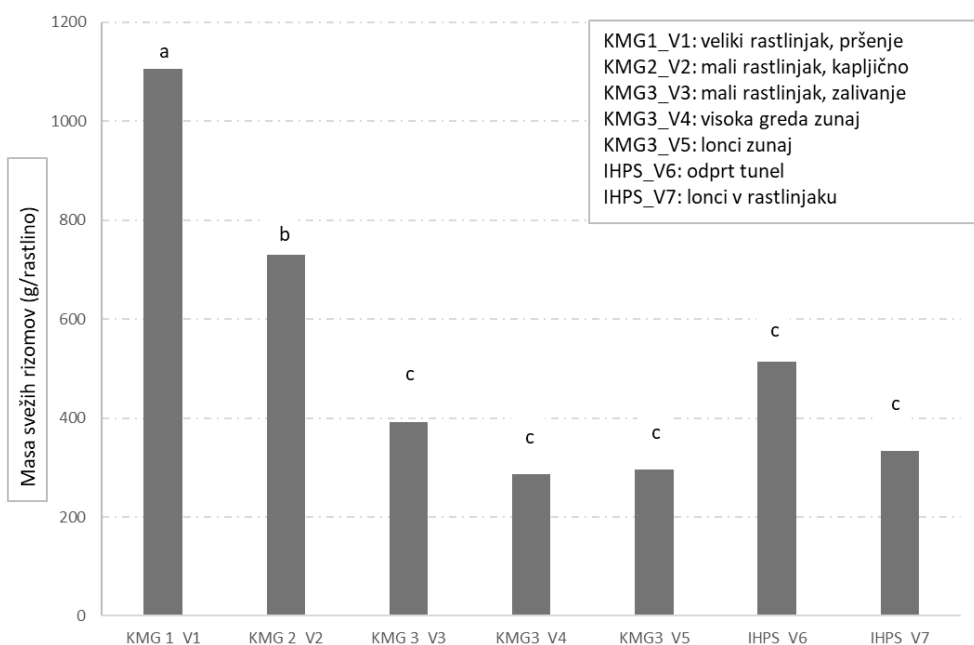
3.2 Pridelek svežih rizomov in drugi proizvodni parametri na posameznih kmetijskih gospodarstvih

V preizkušanju nas je prvenstveno zanimal pridelek svežih rizomov, ki so edini tržni del rastline. Največji pridelek smo zabeležili na KMG 1, v povprečju 1106 g na rastlino ob upoštevanju vseh vzorčenih rastlin neglede na zastirko (slika 2). Sledi KMG 2 z 733 g rizomov na rastlino in IHPS s 514 g rizomov na rastlino. Zastirka iz miskantusa na nobeni kmetiji ni vplivala na pridelek rizomov. Glavna razlika med omenjenimi pridelovalci je bila v mikroklimatskih razmerah (temperatura, vlažnost) med rastlinjaki in odprtim tunelom. Glede na opazovanja in meritve lahko ugotovimo, da je najboljše razmere mogoče ustvariti v rastlinjaku z večjim volumnom zraka in z uporabo mikrorazpršilcev, s katerimi zagotavljamo visoko zračno vlažnost. V majhnih rastlinjakih je nihanje temperature večje, zaradi uporabe kapljičnega sistema ali zalivanja je bila relativna vlažnost zraka nižja. Rezultati poskusov Dendauw (2023) kažejo, da je pridelek v zaprtim tunelu približno 20 % nižji kot v ogrevanem rastlinjaku. Prav tako je vsebnost kurkumina v korenikah v tunelu za približno 50 % nižja kot v ogrevanem rastlinjaku.

Na KMG 3 smo v rastlinjaku dosegli najmanjši pridelek, če primerjamo pridelavo v zavarovanih prostorih na grebenih (slika 2). Le 392 g svežih rizomov na rastlino lahko pripišemo poznemu sajenju, zalivanju (nizka relativna vlaga v zraku in nihanje vlage v tleh) in težkim, zbitim tlom.

Pridelek svežih rizomov je bil najmanjši v dvignjeni gredi na prostem, obrnjeni na južno stran. Rastline so bile nizko rastoče, vendar lepo izenačene pri višini okoli 85 cm. O podobnih višinah poročajo tudi Lal in sod. (2022), ki so preizkušali vpliv različnih razdalj sajenja na pridelek kurkume. Pridelek svežih rizomov na prostem na grebenih pri razdalji 30 x 50 cm je bil 24 t/ha, kar je podobno kot na KMG 3 v dvignjeni gredi (20 t/ha). Podobne pridelke kot KMG 3 (267-428 g/rastlino) so dosegali tudi v poskusu pridelave na prostem na Šri Lanki (Vidanapthirana in sod., 2021). Tajska študija poroča o najboljšem pridelku pri kurkumi, gnojeni z organskimi in mineralnimi dušičnimi gnojili, vendar je pridelek dosegal le 13,75 t/ha po petih mesecih rastne dobe (Kulpapangkorn in Mai-leang, 2012). V Bangladešu so v poljskih poskusih pridelali 265 g svežih rizomov na rastlino oz. 29 t/ha (Kamal in Yousuf, 2012.).

Rastna doba kurkume na prostem glede na pregled literature je od 5 do 7 mesecev. Pridelki v pridelavi na prostem v Aziji so kljub boljšim naravnim razmeram kot v Evropi podobni, vendar precej manjši kot pridelki v Evropi v rastlinjaki. Visoke pridelke, kot v našem poskusu rastlinjakih na KMG 1 in KMG 2, poročajo tudi v okviru projekta Interreg Severozahodna Evropa CurCol, v katerem so v Belgiji in na Nizozemskem pridelovali lokalno kurkumo za izdelavo naravnih barvil iz kurkumina. Pridelki v različnih razmerah pridelave v ogrevanih rastlinjaki so bili najvišji na grebenih pri gnojenju s 100 kg N, 50 kg P₂O₅ in 250 kg K₂O na hektar in so se gibali okoli 1000 g na rastlino. Pri pridelavi v tunelu, kjer so primerjali različne sorte, pa so sorte Next Garden, PCG in Claus dosegle pridelke svežih rizomov na rastlino 201, 456 in 508 g.



N: 12 rastlin/obravnavanje

KMG: kmetijsko gospodarstvo

IHPS: Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

a,b,c – obravnavanja označena z različno črko se med seboj statistično značilno razlikujejo, P<0,05

Slika 2: Masa svežih rizomov kurkume (g) na posameznem kmetijskem gospodarstvu

Rastline v loncih na prostem so bile najšibkeje rasti, vendar pa so presenetljivo dale podoben pridelek kot rastline v visoki gredi na prostem in le nekoliko manjši kot rastline v loncih v rastlinjaku, ki so imele precej višji nadzemni del. Za primerjavo navajamo nekaj podatkov pridelave kurkume v različnih razmerah po svetu. Na Japonskem so pri pridelavi v loncih v steklenjakih po sedmih mesecih pridelave pridelali okoli 30 g suhih rizomov na rastlino (Hossain in Ishimine, 2005),

kar je podobno, kot smo dosegli v preizkušanju na KMG 3 in pol manj, kot je bil pridelek na KMG 1. Suha snov rizomov, vzgojenih v Sloveniji, je bila 65 g/kg.

Če ne upoštevamo uporabe zastirke, je bila masa rizomov, pridelanih v rastlinjaku na KMG 1, statistično značilno večja od vseh ostalih načinov pridelave ($P < 0,001$). V rastlinjaku na KMG 2 je bila pridelana značilno večja masa rizomov kot v dvignjeni gredi, odprtem tunelu ali v loncih. Med pridelavo v tunelu, dvignjeni gredi, rastlinjaku na KMG 3, loncih v rastlinjaku in loncih zunaj ni bilo statistično značilnih razlik. Pri primerjavi samo prostora pridelave (rastlinjak, odprt tunel, dvignjena greda in lonci), brez upoštevanja vpliva kmetije, se je v rastlinjaku pridelala statistično značilno večja masa rizomov kot pri ostalih načinih pridelave. Ostali načini pridelave se med seboj statistično niso razlikovali. Lahko rečemo samo, da se nakazuje trend ($P = 0,18$), da smo s pridelavo v odprtem tunelu pridelali večjo maso rizomov kot s pridelavo na prostem (podatki niso tabelarično prikazani), vendar zaradi različnih tal in načina zalivanja tega iz enoletnega poskusa ne moremo posplošiti.

Ker zastirka ni imela značilnega vpliva na rast rastlin in pridelek, predstavljamo ostale podatke združene za vse rastline posameznega obravnavanja (z in brez zastirke, $N = 12$). Rastline kurkume so zrastle najvišje na KMG 1, kjer je bil tudi največji pridelek na rastlino. Povprečno so bile visoke 175 cm, pri čemer so rastline v notranjosti rastlinjaka dosegale višine tudi čez 2 m, na robu pa so bile precej manjše (robni vpliv). Najnižje rasti so bile rastline v plitkih loncih na prostem na KMG 3 (58,8 cm). Če smo upoštevali vse podatke na vseh kmetijah, je korelacija med višino rastlin in maso svežih rizomov 0,70. Nižja je zaradi upoštevanja rastlin v loncih, kjer so zelo nizke rastline dale relativno veliko maso rizomov.

Spremljali smo tudi zeleno maso nadzemnega dela, saj smo pričakovali, da več kot je zelene mase večja je fotosinteza in s tem tudi več rizomov. Tezo lahko potrdimo pri vseh načinih pridelave, razen ponovno ne pri loncih zunaj na KMG 3. Pri upoštevanju vseh podatkov je bila korelacija med maso nadzemnega dela in maso rizomov 0,83. Sveža masa zelenega dela je bila na KMG 1 v povprečju 2,6 kg na rastlino, na KMG 2 1,5 kg na rastlino in na KMG 3 0,55 kg na rastlino. Sveža masa zelenega dela rastline v dvignjeni gredi na KMG 3 je bila 0,48 kg, v tunelu na IHPS 0,99 kg, v loncih v rastlinjaku 0,51 kg in v loncih zunaj 0,16 kg na rastlino.



Slika 3: Pidelava kurkume v dvignjeni gredi na KMG 3 (levo) in pridelava kurkume pod tunelom na IHPS (desno)

Razlike med načini pridelave so bile tudi v številu poganjkov, ki jih je bilo največ pri rastlinah, ki so rastle na prostem v dvignjeni gredi (14,4) in odprtem tunelu (13,4). Najmanj stranskih poganjkov so imele rastline v loncih v rastlinjaku (2,1). Rastline na prostem so bile nižje in bolj čokate (več stranskih poganjkov). Korelacije med številom stranskih poganjkom in skupno maso rizomov ni bilo.

Na rastlinah nismo opazili prisotnosti bolezni ali škodljivcev. Mlada kurkuma je sicer privlačna za polže, zato je le-te potrebno odstranjevati. Pri vzgoji kurkume ni posebnosti v primerjavi z drugimi rastlinami, ki jih pridelujemo v zaščiteneih prostorih. Kot smo ugotovili, za nadpovprečno pridelavo ni potrebno ogrevati rastlinjakov, je pa potrebno pršenje z mikrorazpršilci za doseganje primerne RV. Ali bi bilo ogrevanje rastlinjakov ekonomsko upravičljivo, pa bi bilo potrebno še raziskati.

4 ZAKLJUČEK

Prvo preizkušanje pridelave kurkume za komercialne namene v Slovenji kaže, da je to tropsko rastlino mogoče pridelovati tudi pri nas. S pridelavo na prostem dosežemo nekoliko nižje pridelke kot na prostem v tropih, pri pridelavi v rastlinjakih pa so bili pridelki nadpovprečni. V prihodnje bo potrebno preučiti še vpliv tehnologij pridelave pri nas na vsebnost kurkuminoidov, tehnologije optimizirati, narediti analizo trga in izpopolniti možnosti skladiščenja in predelave.

Zahvala. Članek in poskusi so bili izvedeni v okviru pilotnega projekta Slovenska ekološka kurkuma, ki poteka pod okriljem ukrepa 16.2 Podpora za pilotne projekte ter za razvoj novih proizvodov, praks, procesov in tehnologij za projekte EIP. Avtorji se za tehnično izvedbo poskusov zahvaljujemo kmetijam Mumelj, Jutrič in Temnik ter Tanji Kumer z Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

5 VIRI

- Anandaraj, M., Prasath, D., Kandiannan, K., Zachariah, T. J., Srinivasan, V., Jha, A. K., Singh, B. K., Singh, A. K., Pandey, V. P., Singh, S. P., Shoba, N., Jana, J. C., Kumar, K. R., & Maheswari, K. U. (2014). Genotype by environment interaction effects on yield and curcumin in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Industrial Crops and Products*, 53, 358–364.
- Cozmin, M., Lungu, I. I., Gutu, C., Stefanache, A., Duceac, L. D., Șoltuzu, B. D., Damir, D., Calin, G., Bogdan Goroftei, E. R., Grierosu, C., & Boev, M. (2024). [Turmeric: From spice to cure. A review of the anti-cancer, radioprotective and anti-inflammatory effects of turmeric sourced compounds](#). *Frontiers in Nutrition*, 11.
- Dendauw E. in Van Mullem J., 2023. Cultivation of turmeric in NW-Europe. CurCol final event, 2.2.2023. <https://data.maglr.com/171/issues/39888/520022/assets/downloads/pcg-cultivation-of-turmeric-in-nweurope.pdf>
- Hossain, Md. A., & Ishimine, Y. (2005). [Growth, Yield and Quality of Turmeric \(*Curcuma longa* L.\) Cultivated on Dark-red Soil, Gray Soil and Red Soil in Okinawa, Japan](#). *Plant Production Science*, 8(4), 482–486. <https://doi.org/10.1626/pps.8.482>
- Kamal, M. Z. U., & Yousuf, M. N. (n.d.). [Effect of Organic Manures on Growth, Rhizome Yield and Quality Attributes of Turmeric \(*Curcuma longa* L.\)](#). *The Agriculturists*, 2012(10), 16–22.
- Kulpapangkorn, W., & Mai-leang, S. (2012). Effect of plant nutrition on turmeric production. *ISEEC*, 32, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1252>

- Lal, J., Tirkey, J., Naugraiya, M., & Jaiswal, M. (2022). Effect of Spacing on Growth and Yield Performance of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Vertisols of Chhattisgarh.
- Menon V.P, Sudheer A.R., 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595:105-125.
- MKGP, [EKO ponudba, povpraševanje in potrošnja](https://www.nasasuperhrana.si/clanek/raziskave-o-eko-potrosnji-in-potencialu-eko-proizvodnje-v-sloveniji/). 2019.
<https://www.nasasuperhrana.si/clanek/raziskave-o-eko-potrosnji-in-potencialu-eko-proizvodnje-v-sloveniji/>
- [Organic Turmeric from Styria](https://www.hortidaily.com/article/9367088/organic-turmeric-from-styria/), 2021. Horty daily, 25.10.2021
<https://www.hortidaily.com/article/9367088/organic-turmeric-from-styria/>, 21.11.2024
- Prasad S, Aggarwal BB, 2011. [Turmeric, the Golden Spice: From Traditional Medicine to Modern Medicine](#). In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92752/>
- Prasath, D., Kandiannan, K., Leela, N., Aarthi, S., Sasikumar, B., & Babu, K. N. (2018). Turmeric: Botany and production practices. *Horticultural Reviews*, 46, 99–184.
- Vidanapthirana, N., Subasinghe, S., Sunil, K., Ketipearachchi, K., Siriwardana, M., & Bandusekara, B. (2021). Growth and yield performances of turmeric (*curcuma longa*) grown in dry zone of Sri Lanka as affected by planting space, growing media and shade. *Journal of Agro-Technology and Rural Sciences*, 1, 27.
- Zoi, V., Galani, V., Lianos, G. D., Voulgaris, S., Kyritsis, A. P., & Alexiou, G. A. 2021. The Role of Curcumin in Cancer Treatment. *Biomedicines*, 9(9), 1086.

MODEL ZA OCENO EKONOMIKE PRIDELAVE ZELIŠČ

Martin PAVLOVIČ¹, Monika OSET LUSKAR² in Nataša FERANT³

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Arrived: 27. 9. 2024

Sprejeto / Accepted: 1. 12. 2024

Izvleček

Pridelava zelišč je niša v kmetijskih usmeritvah in pretežno dopolnilna dejavnost na družinskih kmetijah. Referenčni viri s področja ekonomike kmetijske pridelave vključujejo različne kmetijske usmeritve, nobeden od njih pa ne analizira tehnološko-ekonomskih podatkov pridelave zelišč. Projektni prispevek CRP V4-2207 z zasnovo spletno-dostopnega modela za kalkulacijo stroškov pridelave zelišč STRO-ZEL 1.1[®] vključuje tabelarične simulacijske različice treh pod-modelov za oceno stroškov pridelave zelišč. Uporabnik lahko koristi model samostojno ali v okviru panožnega krožka. Z oceno prihodka svojega primera pa lahko izračuna tudi finančni rezultat proizvodnje.

Ključne besede: pridelava zelišč, tehnološko-ekonomski model, kmetijsko podjetništvo

A MODEL FOR AN ASSESSMENT OF ECONOMICS IN PRODUCTION OF HERBS

Abstract

A cultivation of herbs is a niche in agricultural production and is mainly a supplementary activity on family farms. Reference sources in agricultural economics include various agricultural sectors, but none of them analyzes the technological-economic data of herb production. The V4-2207 project contribution embraces the design of a web-accessible production costs model for herbs. The model STRO-ZEL 1.1[®] includes simulation versions of the three sub-models for estimating the costs of herb production. The user can have a benefit of the model independently or as a member of a so-called industry circle. By estimating the income of a case analyzed, the model calculates also a financial result of the production.

Key words: production of herbs, technological-economic model, farm management

¹ Izr. prof. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: martin.pavlovic@ihps.si

² Univ. dipl. inž. kmet., IHPS, e-pošta: monika.oset-luskar@ihps.si

³ Mag., IHPS, e-pošta: natasa.ferant@ihps.si

1 UVOD

Analitično spremljanje in preverjanje uspešnosti poslovanja je potrebno za učinkovito upravljanje in načrtovanje razvoja tržno usmerjenih kmetij. Pridelava zelišč je niša v kmetijskih usmeritvah in je na kmetijah pretežno dopolnilna dejavnost. Obstoječi referenčni viri s področja ocene ekonomike kmetijske pridelave vključujejo sicer najrazličnejše kmetijske usmeritve, noben od njih pa ne obravnava tehnološko-ekonomskih podatkov za pridelavo zelišč. V prispevku zapolnimo to vrzel na področju ekonomike pridelave zelišč.

2 ZASNOVA MODELA

Model vključuje tabelarične simulacijske različice treh pod-modelov za oceno stroškov pridelave izbranih zelišč. Tehnološko-ekonomske podatke smo projektno pridobili s terenskih obiskov izbranih podjetniško-usmerjenih pridelovalcev zelišč, ki so bili pripravljeni deliti informacije zabeležk pridelovalnih izkušenj in lastnih ocen obsega porabe materiala ter strojnega in ročnega dela ter s kataloško in lastno oceno neposrednih spremenljivih stroškov dela, storitev in uporabe morebitno koriščene mehanizacije.

Ker imamo v Sloveniji pridelavo zelišč na manjših površinah, je ta tudi neposredno težko primerljiva za ekonomsko analizo na ravni ostalih tržno usmerjenih kmetijskih usmeritev. V stroškovno oceno pridelave zelišč smo vključili 10 najpogostejše navedenih zelišč – kot npr. poprova meta (po oceni 80 % pridelovalcev), melisa (po oceni 75 % pridelovalcev), ognjič, laški smilj, ožeppek, timijan, citronka, dobra misel, ameriški slamnik in pegasti badelj.

V prvem primeru spletne modelne kalkulacije so stroški pridelave skupine večletnih zelišč prikazani na pridelovalni površini 10 arov. V preostalih dveh modelnih kalkulacijah pa so modelni stroški pridelave zelišč prikazani na hektar.

3 VSEBINA IN RABA MODELA

Glede na razpoložljive podatke o pridelavi zelišč smo v projektu CRP V4-2207 zasnovali spletno aplikacijo modelnih kalkulacij v računalniškem generatorju MS Excel za tri skupine zelišč (večletna zelišča, ameriški slamnik in enoletna zelišča). Vse kalkulacije modelnih stroškov pridelave vključujejo izračun spremenljivih stroškov pridelave s postavkami za različne stroškovne skupine (material, strojno delo, ročno delo, storitve, skupaj).



IHPS
Inštitut za hmeljarstvo
in pivovarstvo
Slovenije

MODEL KALKULACIJE STROŠKOV PRIDELAVE ZELIŠČ

Cilj aplikacije: Modelni izračun finančnega rezultata pridelave zelišč

M. Pavlovič in sod.

STRO-ZEL 1.1[©]

Model omogoča:

- kalkulacijo stroškov pridelave enoletnih zelišč
- kalkulacijo stroškov pridelave večletnih zelišč
- izračun finančnega rezultata, glede na oceno prihodka in stroškov proizvodnje

Navodila za uporabo modela [Spletna stran projekta CRP V4-2207](https://www.ihps.si/zdravilne-in-aromaticne-rastline/crp-v4-2207-moznosti-razvoja-zeliscarstva-v-sloveniji/)

Slika 1: Maska spletnega modela kalkulacije stroškov pridelave zelišč

Uporabnik modela prične z vnosom oz. dopolnjevanjem tehnološko-ekonomskih podatkov za posamezne modelne postavke (list 'input-vnos podatkov'). Z zeleno barvo označene celice lista spletne aplikacije omogočajo rabo predlaganih vrednosti oz. njihovo ustrezno spreminjanje za potrebe posamične rabe izračunov. Ostala barvna polja celic ostanejo za spletnega uporabnika nespremenjena.

List vsebuje predlagane vrednosti za stroške dela, materiala, storitev in podatek o dobi trajanja nasadov. Predlog cenovnih postavk za strojne ure (Sh – delovni stroj in upravljalec stroja), traktorske ure (Th – traktorska ura in priključek) in ure ročnega dela (Rh) omogoča tudi ustrezno rabo skupnega faktorja smiselne simulacije višine cenovnih postavk Sh, Th in Rh. Npr. za 10 % povečanje vseh treh urnih postavk, spremenimo faktor simulacije z 1 na 1,1, itd. Pri ostalih parametrih je predviden neposredni vnos, oz. popravek predlagane vrednosti.

Za individualno kalkulacijo variabilnih stroškov pridelave zelišč je možno vsako izmed zeleno obarvanih tehnološko-ekonomskih postavk tudi spremeniti glede na dejanske razmere spletnega uporabnika.

Ob poznavanju dela z računalniškim generatorjem MS Excel omogoča uporabniku model tudi poljubno dodajanje manjkajočih vrstic in s tem dopolnitev podatkov za razširjen obseg kalkulacije.

Spletna verzija simulacijskega modela za kalkulacijo stroškov in finančnega rezultata pridelave zelišč z navodili za delo je za uporabnike dosegljiva na [spletni povezavi IHPS](https://www.ihps.si/zdravilne-in-aromaticne-rastline/crp-v4-2207-moznosti-razvoja-zeliscarstva-v-sloveniji/) (https://www.ihps.si/zdravilne-in-aromaticne-rastline/crp-v4-2207-moznosti-razvoja-zeliscarstva-v-sloveniji/). S tem pa bo možno model tudi vsebinsko in podatkovno dinamično posodabljati.

3.1 Kalkulacija stroškov pridelave večletnih zelišč

Kalkulacija stroškov pridelave večletnih zelišč je prikazana v EUR /10 ar (103 m²). Model zajema kalkucijo (i) stroškov naprave nasada (material, strojno delo, ročno delo, skupaj) in (ii) stroškov pridelave zelišč (material, strojno delo, ročno delo, skupaj) v izbranem obdobju let, ko je nasad polno-roden. Sledi primer modelne kalkulacije stroškov s terensko-zbranimi podatki (Preglednici 1 in 2).

Z zeleno barvo označene celice lista v spletni aplikaciji omogočajo rabo predlaganih vrednosti oz. ustrezno spreminjanje teh vrednosti za potrebe posamične rabe izračunov – tako za napravo nasada, kot tudi za pridelavo zelišč v rodnem obdobju. Ostala barvna polja celic modelne kalkulacije ostajajo za uporabnika nespremenjena.

Preglednica 1: Modelna kalkulacija stroškov naprave nasada večletnih zelišč (primer)

NAPRAVA NASADA IN PRIDELAVA ZELIŠČ npr.: meta, melisa, sivka, ožeppek, citronka, timijan, dobra misel, laški smilj	enota	količina enot	EUR/enoto	skupaj EUR
površina nasada	ar	10,0		
NAPRAVA NASADA ZELIŠČ				
1. Material				3.269,96
sadike	kom	6.000	0,50	3.000,00
folija (npr. širine 1,25 m)	tekoči meter	0,00	0,00	0,00
prekrivka (npr. širine 10,50 m)	t.m.	0,00	0,00	0,00
zastirka (seno, lubje, miskantus...)	vreča	20	12,00	240,00
NPK (npr. 7:20:30)	vreča	0	0,00	0,00
kompost, briketi	vreča	4	7,49	29,96
ostalo				0,00
2. Strojno delo				140,50
priprava tal	ur	1,0	35,00	35,00
predsajenje (jarkanje)	ur	0,5	25,00	12,50
polaganje folije in sajenje	ur	0,0	25,00	0,00
prevozi (tovorno vozilo, kombi)	ur	3,0	9,50	28,50
prevoz materiala (sadike, zastirka)	km	150,0	0,43	64,50
ostalo	ur	0,0	25,00	0,00
3. Ročno delo				190,00
priprava sadik in sajenje	ur	15,0	9,50	142,50
priprava zastirke	ur	3,0	9,50	28,50
gnojenje	ur	2,0	9,50	19,00

NAPRAVA NASADA IN PRIDELAVA ZELIŠČ npr.: meta, melisa, sivka, ožepok, citronka, timijan, dobra misel, laški smilj	enota	količina enot	EUR/enoto	skupaj EUR
ostalo	ur	0,0	9,50	0,00
4. Skupaj				3.600,46

Preglednica 2: Modelna kalkulacija stroškov naprave nasada večletnih zelišč (primer)

PRIDELAVA ZELIŠČ	enota	količina enot	EUR/enoto	skupaj EUR
1. Material				164,25
kompost, briketi	vreča	0,00	7,49	0,00
sredstva za varstvo rastlin	kg/l	0,00	0,00	0,00
sredstvo proti polžem	kg	0,50	28,50	14,25
zastirka (dopolnitev)	vreča	5,0	12,00	60,00
sadike	kom. (3 %)	180,0	0,50	90,00
ostalo				0,00
2. Strojno delo				200,00
obdelava tal 2x (frezanje)	ure	8,0	25,00	200,00
ostalo	ure	0,0	25,00	0,00
3. Ročno delo				525,00
dosajanje sadik	ure	5,0	9,50	47,50
namakanje	ure	6,0	9,50	57,00
urejanje zastirke okoli sadik	ure	3,0	9,50	28,50
košnja plevla	ure	2,0	25,00	50,00
okopavanje (2x)	ure	6,0	9,50	57,00
spravilo pridelka (2x)	ure	30,0	9,50	285,00
ostalo	ure	0	9,50	0,00
4. Stroški naprave nasada - letno	št. let	5		720,09
5. Skupaj - letno				1.609,34

3.2 Kalkulacija stroškov pridelave enoletnih enoletnih zelišč

Kalkulacija modelnih stroškov pridelave enoletnic (npr. pegasti badelj - *Silybum marianum* L.) v EUR/ha vključuje izračun spremenljivih stroškov pridelave s postavkami stroškovnih skupin (material, strojno delo, storitve in skupaj). V Preglednici 3 predstavljamo podatke s terenskega obiska na tržno usmerjeni kmetiji v Prekmurju.

Tudi v tem podmodelu so v spletni aplikaciji z zeleno barvo označene celice tabele, ki omogočajo rabo predlaganih vrednosti oz. ustrezno spreminjanje teh vrednosti za potrebe posamične rabe izračunov za napravo nasada in pridelavo zelišč. Ostala barvna polja celic modelne kalkulacije ostajajo za uporabnika nespremenjena. Lahko pa jih spreminjamo na listu z osnovnimi input podatki.

Preglednica 3: Modelna kalkulacija stroškov pridelave enoletnih zelišč (primer)

NAPRAVA NASADA IN PRIDELAVA (EUR/ha) pegasti badelj (enoletnica)	enota	količina enot	EUR/enoto	skupaj EUR
	ha	1,00		
1. Material				482,50
seme	kg	25,0	2,00	50,00
Ca granulat	kg	600,0	0,33	198,00
NPK 15:15:15	kg	350,0	0,67	234,50
ostalo				0,00
2. Strojno delo				815,75
oranje tal	ur	3,0	35,00	105,00
branje tal	ur	2,0	35,00	70,00
sejanje	ur	2,0	35,00	70,00
obdelava tal (3x)	ur	6,0	35,00	210,00
čiščenje pridelka semena (> 500 kg/ha)	ur	12,0	25,00	300,00
prevozi (kombi...)	ur	3,0	9,50	28,50
dovoz materiala	km	75,0	0,43	32,25
ostalo				0,00
3. Storitve				180,00
spravo pridelka (storitev)				180,00
ostalo				0,00
4. Skupaj (EUR/ha)				1.478,25

4 EKONOMIKA PRIDELAVE ZELIŠČ

Finančni rezultat predstavlja razliko med prihodki in odhodki obravnavane gospodarske dejavnosti. Pozitivna vrednost predstavlja dobiček, negativna - izgubo. Za izračun finančnega rezultata pridelave zelišč sledi uporabnik priloženim navodilom. V tabeli lista 'ekonomika' je primer izračunanih prihodkov prodaje zelišč na pridelovani površini, glede na različno količino pridelka (kg) in doseženo prodajno ceno (EUR/kg). Prikazan je primer izračuna finančnega rezultata pridelave zelišč za obravnavano površino. Preglednica 4 pa omogoča še dva primera

izračunov, kjer vnese uporabnik za svoj izračun podatke o (i) prihodku od prodaje in (ii) vseh neposrednih stroških pridelave.

Preglednica 4: Izračun finančnega rezultata za obravnavano površino (primer)

	PRIMER_01	PRIMER_02	PRIMER_03
Prihodek (EUR):	4.500,00	0,00	0,00
Stroški pridelave (EUR):	1.609,00	0,00	0,00
Ostali stroški (EUR):	1.365,00	0,00	0,00
Finančni rezultat (EUR):	1.526,00	0,00	0,00

5 RABA MODELA V PANOŽNEM KROŽKU PRIDELAVE ZELIŠČ

Smisel vseh neposredno uporabniških raziskav je prenos znanja iz strokovnih krogov različnih ravni na končne uporabnike – v tem primeru zainteresirane tržno usmerjene pridelovalce zelišč. Model lahko uporabimo za poslovne odločitve na posamezni kmetiji. Med sodobne pristope pri svetovanju pa sodi delo v podjetniških oz. panožnih krožkih. Glavni namen panožnih krožkov je podrobna analiza lastnih knjigovodskih in drugih podatkov posameznih kmetijskih gospodarstev, primerjava doseženih tehnološko-ekonomskih rezultatov ter ugotavljanje vzrokov za razlike med njimi. Ključna prednost je v interaktivnem pristopu izvajanja, saj udeležence spodbuja k premisleku o pomenu posameznega podatka, kot tudi izračunu določenega tehnološkega ali ekonomskega kazalnika.

Panožni krožki predstavljajo obliko skupinskega svetovalnega dela v kmetijstvu. V panožni krožek bi se lahko prostovoljno vključili tržno usmerjeni pridelovalci zelišč, pripravljeni za sodelovanje in izmenjavo lastnih izkušenj. Za vodenje, uspešno izvedbo dveh delavnic panožnega krožka letno in potrebno analitično obdelavo podatkov so primerni strokovnjaki s področja pridelave zelišč in agrarne ekonomike. Glede na interes za tovrstno sodelovanje pa je možno projektno zasnovan model ocene stroškov pridelave in finančnega rezultata - po spletni uporabi - še dodatno nadgrajevati, skladno z odzivi zainteresiranih uporabnikov.

V Sloveniji imajo panožni krožki rejcev mleka najdaljšo tradicijo. Od leta 2021 dalje pa sta aktivna še dva panožna krožka - v sadjarstvu in hmeljarstvu. Katera kmetijska usmeritev bo naslednja?

6 VIRI

- Čeh B. in sod. (2024). [Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji](https://www.ihips.si/zdravilne-in-aromaticne-rastline/crp-v4-2207-moznosti-razvoja-zeliscarstva-v-sloveniji/). Projektno gradivo CRP V4-2207. Dostopno na: <https://www.ihips.si/zdravilne-in-aromaticne-rastline/crp-v4-2207-moznosti-razvoja-zeliscarstva-v-sloveniji/> [27.9.2024].
- Pavlovič M., Jerič D., Trpin Švikart D., Friškovec I. (2021). Panožni krožek v hmeljarstvu. Hmeljar. 83(1-12): 17.
- Pavlovič M. (2022). Analiza stroškov pridelave hmelja v okviru panožnega krožka. Hmeljarske informacije. 39(1): 2.
- Pavlovič M., Avberšek M., Friškovec I., Jerič D. (2023). Ekonomsko svetovanje kmetijam v panožnem krožku. Hmeljarske informacije. 40(9): 5-7.

Žgajnar J., Tomšič M., Kavčič S., Pavlovič M., Jerič D., Čop T. [Priročnik za izvajanje empirično podprtih panožnih krožkov](https://www.kgzs-ms.si/wp-content/uploads/2023/09/Prirocnik-za-izvajanje-panoznih-krozkov.pdf). 1. izd. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 2023. 77 str., Dostopno na: <https://www.kgzs-ms.si/wp-content/uploads/2023/09/Prirocnik-za-izvajanje-panoznih-krozkov.pdf> [27.9.2024].

