

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

# **Hmeljarski bilten**

# **Hop Bulletin**

**24(2017)**



**Žalec, 2017**

## 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

**Urednica /**  
**Editor** dr. **Barbara Čeh**

**Uredniški odbor /**  
**Editorial board** dr. **Barbara Čeh** (IHPS), doc. dr. **Andreja Čerenak** (IHPS), prof. dr. **Anton Ivančič** (Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru / Faculty of Agriculture and Life Sciences University of Maribor – FKBV UM), izr. prof. dr. **Jernej Jakše** (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani / University of Ljubljana, Biotechnical Faculty – BF UL), prof. dr. **Branka Javornik** (BF UL), doc. dr. **Iztok Jože Košir** (IHPS), dr. **Karel Krofta** (Hop Research Institute, Žatec, Czech Republic), doc. dr. **Rok Mihelič** (BF UL), prof. dr. **Martin Pavlovič** (IHPS in FKBV UM), dr. **Sebastjan Radišek** (IHPS), dr. **Elisabeth Seigner** (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft / Bavarian State Research Center for Agriculture, Freising, Germany), dr. **Siniša Srećec** (Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Hrvaška / College of Agriculture at Križevci, Croatia), prof. dr. **Anton Tajnšek** (redni profesor v pokoju / retired professor), prof. dr. **Dominik Vodnik** (BF UL)

**Naslov uredništva,**  
**politika /** Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija / Slovenia;  
**Editorial office and** e-pošta / e-mail: barbara.ceh@ihps.si  
**policy**

Člani uredniškega odbora so tudi recenzenti prispevkov. Prispevki so najmanj dvojno recenzirani. Za jezikovno pravilnost odgovarjajo avtorji. S poslanim člankom se avtorji strinjajo tudi za spletno objavo revije. /  
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:

**Janez Sušin** (Kmetijski inštitut Slovenije / Agricultural institute of Slovenia), doc. dr. **Anita Kušar** (Inštitut za nutricionistiko / Nutrition institute), dr. **Vesna Zupanc** (BF UL), dr. **Magda Rak Cizej**, dr. **Zala Kolenc** in **Miha Ocvirk** (IHPS)

**Domača stran /**  
**Home page** <http://www.ihps.si>

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

**Tisk / Printed by** Grenko tisk d. o. o.

**Avtorske pravice /** © 2017 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije /  
**Copyright** © 2017 Slovenian Institute of Hop Research and Brewing

**Izdajo sofinancira Agencija za raziskovalno dejavnost RS. /**

**The issue was financially supported by the Slovenian Research Agency.**

## VSEBINA / CONTENTS

- Tanja GUČEK, Jernej JAKŠE, Branka JAVORNIK in Sebastjan RADIŠEK  
**Razvoj metode umetnega okuževanja hmelja z monomerom in dimerom CBCVd**  
Development of a method for artificial inoculation of hop with monomeric and dimeric CBCVd .....5
- Barbara ČEH in Bojan ČREMOŽNIK  
**pH tal v hmeljišču skozi čas glede na vrsto apnenega gnojila**  
Soil pH through time related to liming material .....17
- Boštjan NAGLIČ, Rozalija CVEJIĆ in Marina PINTAR  
**Vodenje namakanja hmelja (*Humulus lupulus* L.): pregled**  
Irrigation scheduling of hop (*Humulus lupulus* L.): a review .....28
- Martin PAVLOVIČ in Mallorie KING  
**Hop survey of Slovene breweries**  
Analiza uporabe hmelja v slovenskih pivovarnah .....42
- Miha OCVIRK, Polona MEGUŠAR, Nataša POKLAR ULRIH in Iztok PRISLAN  
**Thermal characterization of hop extract by DSC and HPLC**  
Termična karakterizacija hmeljnih ekstraktov z DSC in HPLC .....53
- Miha OCVIRK in Tanja POTOČNIK  
**Validacija plinsko kromatografske metode za določanje sestave eteričnih olj hmelja**  
Validation of analytical method for determination of hop essential oil composition by gas chromatography .....62
- Tanja POTOČNIK, Miha OCVIRK, Doris POTOČNIK in Nives OGRINC  
**Pomen sterolov pri karakterizaciji bučnega olja**  
The importance of sterols for pumpkin seed oil characterization.....70
- Zala KOLENC, Tanja POTOČNIK in Iztok Jože KOŠIR  
**Validacija in uporaba metode za določanje sterolov v ričkovem olju**  
Validation of method for sterol determination and its use in Camelina oil .....80

Martin PAVLOVIČ, Andrej UDOVČ, Uroš RAJKOVIČ, Črtomir ROZMAN in Trajče NIKOLOSKI <b>Modelno vrednotenje preusmeritve dejavnosti kmetij</b> Model assessment of a farm activity rearrangement .....	88
Barbara ČEH, Bojan ČREMOŽNIK in Zala KOLENC <b>Sorte konoplje z EU sorte liste v Sloveniji – površina, pridelek stebel in vsebnost eteričnega olja v socvetju</b> Hemp varieties from the EU variety list in Slovenia – area, yield of stems and essential oil content in inflorescences.....	99
Marko FLAJŠMAN in Darja KOCJAN AČKO <b>Pridelek in morfološke lastnosti stebel 12 sort navadne konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.) v letu 2017</b> Yield and morphological characteristics of 12 hemp ( <i>Cannabis sativa</i> L.) varieties in 2017.....	109
Zala KOLENC in Andreja ČERENAK <b>Application of sex molecular markers in hemp plant (<i>Cannabis sativa</i> sp.)</b> Uporaba molekularskih markerjev za določanje spola pri konoplji ( <i>Cannabis sativa</i> sp.).....	121
Ivan PAHOLE, Matej PAL, Urban BELCA in Aleš BELŠAK <b>Tehnološke zahteve za kombajne na njivah s konopljo v Sloveniji</b> Technological requirements for combine harvesters for hemp in Slovenia .....	129
Roman ŠTUKELJ, Majda Barbara POVŠE in Tanja BAGAR <b>Navadna konoplja v prehrani</b> Hemp as food.....	138

## RAZVOJ METODE UMETNEGA OKUŽEVANJA HMELJA Z MONOMEROM IN DIMEROM CBCVd

Tanja GUČEK<sup>1</sup>, Jernej JAKŠE<sup>2</sup>, Branka JAVORNIK<sup>3</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>4</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Received / prispelo: 9. 11. 2017

Accepted / sprejeto: 20. 11. 2017

### Izveček

Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, sestavljeni samo iz krožne RNA molekule velikosti od 246-401 nukleotidov. Kljub enostavni strukturi lahko povzročajo zelo hude bolezni na večjem številu gostiteljskih rastlin, med katerimi so številne gospodarsko pomembne kmetijske rastline, okrasne rastline in celo nekatere drevesne vrste. Hmelj ni izjema; okužijo ga lahko hmeljev latentni viroid (HLVd), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in viroid grbavosti jabolk (AFCVd). Viroid CBCVd je na hmelju prisoten samo v Sloveniji; na njem povzroča bolezen hudo viroidno zakrnelost hmelja. Bolezen je zelo agresivna, saj povzroča hiranje in odmiranje rastlin s hitro dinamiko širjenja. V hmelju je CBCVd prisoten vedno v kombinaciji s HLVd, kar otežuje etiološke študije določanja vpliva CBCVd na rastline hmelja. V ta namen je bila razvita metoda umetnega okuževanja s CBCVd, v monomerni in dimerni obliki. Načrtovana monomer in dimer sta bila vstavljena v plazmid, ki je služil kot osnova za prepis v RNA. Viroidna RNA je bila uporabljena za umetno okužbo hmelja, paradiznika in kumar. Vsaka izmed gostiteljskih rastlin je bila okužena tako z monomerom in dimerom CBCVd, kot tudi s celokupnimi nukleinskimi kislinami, izoliranimi iz okuženega hmelja. Pri tem je dimer CBCVd izkazal visoko stopnjo infektivnosti in tako primernost za izvajanje umetnih okužb.

**Ključne besede:** hmelj, viroid, mehanska inokulacija, CBCVd, dimer

---

<sup>1</sup> Univ. dipl. biokem., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

<sup>2</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: branka.javornik@bf.uni-lj.si

<sup>4</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

## DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ARTIFICIAL INOCULATION OF HOPS WITH MONOMERIC AND DIMERIC CBCVd

### Abstract

Viroids are the smallest plant pathogens, consisting only of a circular RNA molecule, between 246 and 401 nucleotides in size. Despite the simple structure, they can cause very serious diseases on a wide range of hosts, among which there are many economically important agricultural plants, ornamental plants and even some tree species. Not even hops is an exception, which can be infected by hop latent viroid (HLVd), hop stunt viroid (HSVd), citrus bark cracking viroid (CBCVd) and apple fruit crinkle viroid (AFCVd). The CBCVd viroid is currently present on hops only in Slovenia, causing severe hop stunt disease. The disease is very aggressive, because it causes the degradation and dying of plants with a rapid dynamic of spread. CBCVd is always present in hops in combination with HLVd, which makes etiological study of the impact of CBCVd on hop plants difficult. A method of artificial inoculation with CBCVd was therefore developed, in monomer and dimer form. The designed monomer and dimer were inserted into the plasmid, which served as the basis for RNA transcription. Viroid RNA was used for artificial infection of hops, tomatoes and cucumbers. Each of the host plants was infected with both the monomeric and dimeric CBCVd, as well as total nucleic acids isolated from the infected hop. The CBCVd dimer showed a high degree of infectivity and thus suitability for performing artificial infections.

**Key words:** hop, viroid, artificial inoculation, CBCVd, dimer

### 1 UVOD

Viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) predstavlja krožna RNA molekula, velikosti od 283-286 nukleotidov (nt) (NCBI, GenBank), in je eden izmed številnih viroidov, ki lahko okužijo rastline iz rodu *Citrus*. Na dovzetnih sortah agrumov in trilstnem citronovcu (*Poncirus trifoliata*) povzroča pokanje skorje, medtem ko večje gospodarske škode zaradi njegove prisotnosti v pridelavi agrumov ni zaznati. Spada med manj razširjene viroide in se v večini primerov pojavlja v obliki mešanih okužb z drugimi viroidi iz skupine citrus (Verniere in sod., 2004; 2006). Za razliko od agrumov na hmelju CBCVd povzroča nevarno bolezen, imenovano hudo viroidno zakrnelost hmelja. Bolezenski znaki okužbe s CBCVd se pokažejo že 4 mesece po okužbi in obsegajo zaostajanje v rasti, deformacije storžkov in listov, pokanje trte, trohnenje koreninskega sistema in po 3-5 letih od okužbe propad rastline (Jakše in sod., 2015; Mishra in sod., 2016). V primeru hude viroidne zakrnelosti je v okuženih rastlinah poleg CBCVd vedno prisoten tudi hmeljev latentni viroid (HLVd) (Jakše in sod., 2015), ki je vsesplošno razširjen v

vseh svetovnih območjih pridelovanja hmelja. HLVd na večini sort ne povzroča vidnih bolezenskih znakov, vendar negativno vpliva na velikost storžkov, kvaliteto eteričnih olj in vsebnost alfa-kislin (Puchta in sod., 1988; Barbara in sod., 1990). Podobna bolezenska znamenja kot CBCVd lahko na hmelju povzroči tudi viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), katerega prisotnost je bila prav tako potrjena v Sloveniji (Radišek in sod., 2012). Bolezen, ki jo povzroča HSVd ni tako agresivna in hitra, saj se prvi bolezenski znaki pojavijo šele 3-5 let po okužbi, rastline pa preživijo tudi 10 let ali več (Sano, 2003; 2013). Huda viroidna zakrnelost hmelja ni ozdravljiva bolezen, zato je okužene rastline potrebno uničiti, hkrati pa z ustreznimi ukrepi poskrbeti, da se širjenje bolezni čim bolj omeji. Največji del širjenja CBCVd predstavlja mehanski prenos s sokom in ostanki okuženih rastlin hmelja (Jakše in sod., 2015), kar pri pogosti mehanski obdelavi v hmeljiščih povzroča hiter prenos in širjenje bolezni. Najbolj učinkovit ukrep za preprečevanje širjenja je uporaba razkužil in ustrezno ravnanje ob odkritju obolelih rastlin (Radišek in sod., 2017).

Rastline se lahko z viroidi mehansko okuži preko listov, z obrezovanjem ali injiciranjem inokuluma (Hadidi in sod., 2003). Na potek okužbe lahko negativno vplivajo inhibitorji, prisotni v rastlinskem soku, zato se za stabilizacijo inokuluma največkrat uporablja fosfatni pufer in ustrezen pH (Verhoeven in Roenhorst, 2000). Poleg rastlinskih ekstraktov lahko rastline okužujemo z ekstrakti celokupnih nukleinskih kislin, očiščeno viroidno RNA in prepisi viroidne cDNA ali RNA, največkrat z uporabo biolistike (Hadidi in sod., 2003; Matoušek in sod., 2004). Dimerna viroidna cDNA je bolj infektivna kot monomeri viroidov in se lahko uporablja pri umetni inokulaciji specifičnih viroidov, vendar se za okuževanje pogosteje uporabljajo *in vitro* RNA prepisi (Adkar-Purushothama in sod., 2015).

Vpliv CBCVd na hmelj je še vedno neraziskan, kajti v obolelih rastlinah v hmeljiščih je vedno prisoten v kombinaciji s HLVd, pogosto pa so rastline okužene tudi z virusi. Tako smo z namenom razvoja inokula, ki vsebuje samo CBCVd, razvili metodo umetnega okuževanja z uporabo monomerov in dimerov, ki je bila testirana tako na hmelju, kot tudi na paradižniku in kumarah. Na novo razvita tehnika bo omogočila neposredno določanje vpliva CBCVd na hmelju in ostalih gostiteljskih rastlinah in tako pomembno prispevala k proučevanju in razumevanju patogeneze in etiologije viroidnih obolenj.

## **2 MATERIAL IN METODE**

### **2.1 Rastlinski material**

Za umetno okužbo z monomerom in dimerom CBCVd ter celokupnimi nukleinskimi kislinami izoliranimi iz okuženega hmelja, smo uporabili rastline, za katere je bilo že predhodno dokazano, da so uspešni gostitelji viroida CBCVd (Guček in sod., 2015). Okužili smo hmelj sorte Celeia, ki je zelo dovzeten na

okužbo s CBCVd, paradižnik sorte Heinz 1370 in kumare sorte Pariški kornišon. Za okužbo smo potrebovali mlado tkivo, zato smo hmelj okužili v fazi 20-30 listov, paradižnik v fazi 4-5 listov, medtem ko so bile kumare v fazi 2-5 listov. Rastline so bile pred in po okužbi vzdrževane v rastlinjaku Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, pod naravno svetlobo in nihanjem temperature  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 Izolacija celokupnih nukleinskih kislin

Celokupne nukleinske kisline smo iz okuženih vzorcev hmelja, paradižnika in kumar izolirali z uporabo CTAB reagenta, kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami. Uporabili smo 100 mg listov, ki smo jih zmelili z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto (Meku).

## 2.3 Načrtovanje monomera in dimera viroida CBCVd

Monomer in dimere viroida CBCVd smo načrtovali, umetno sintetizirali (SGI-DNA, ZDA) in vnesli v plazmid pBluescript II SK (+) (Stratagene). Za monomer smo uporabili zaporedje viroida CBCVd iz hmelja (GenBank KM211546). Isto zaporedje smo uporabili tudi za dimer, le da smo v tem primeru načrtovali dve različni zaporedji dimera. V prvem primeru smo dvema zaporedjema viroida CBCVd dodali dodatne nukleotide in na ta način pridobili restriksijsko mesto za encim (dimer 2015), v drugem primeru pa smo samo združili dve zaporedji viroida (dimer 2016). Z uporabo programa RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) smo preverili strukturo monomera in dimerov. Načrtovani monomer in dimera so bili nato umetno sintetizirani in vneseni v plazmid pBluescript II SK (+) v območje z več mesti za kloniranje (ang. multiple cloning site, mcs), za T7-promotorjem.

## 2.4 Transformacija bakterij *Escherichia coli* s plazmidi

Z namenom določitve nukleotidnega zaporedja monomera in dimerov viroida CBCVd smo plazmide z umetno sintetiziranimi zaporedji najprej transformirali v bakterije *E. coli*. Uporabili smo bakterije *E. coli* DH5 $\alpha$  (200  $\mu$ l), dodali 1  $\mu$ l plazmida z monomerom/dimerom (1ng/ $\mu$ l), jih rahlo premešali in inkubirali na ledu 30 minut. Nato smo jih za 1 minuto postavili v vodno kopel na 42  $^{\circ}\text{C}$  ter jih takoj postavili na led za 5 min. V epice smo nato odpipetirali 900  $\mu$ l ogretega tekočega medija LB in jih 1 uro inkubirali pri 37  $^{\circ}\text{C}$  in 120 rpm. Po inkubaciji smo jih v treh različnih volumnih (10, 50 in 100  $\mu$ l) razmazali na plošče LB/Car/X-Gal/IPTG ter jih inkubirali preko noči pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Vse transformirane bakterije, ki so prejele plazmid, so pridobile tudi rezistenco na antibiotik ampicilin. Hkrati je potekla še dodatna selekcija z genom lacZ, kjer bakterije lahko izrabljajo X-Gal, ki se pretvori v modro obarvan produkt. V primeru, da je v plazmidu insert, se gen za lacZ prekine in take kolonije ostanejo bele (modro-bela selekcija). Naslednji dan smo



tako iz plošč izbrali bele kolonije, ki so prejele plazmide z monomerom/dimerom, in jih pripravili za gojenje v tekočem gojišču preko noči. V ta namen smo v tekoče LB gojišče dodali ampicilin (100 mg/ml) in vsaki epruveti dodali ustrezno kolonijo. Epruvete smo inkubirali preko noči pri 37 °C in 120 rpm.

## 2.5 Izolacija plazmidov iz bakterij *E. coli*

Plazmide smo iz transformiranih bakterij *E. coli* izolirali z uporabo kita High Pure plasmid isolation kit (Roche). Sledili smo navodilom proizvajalca in plazmide na koncu sprali z 100 µl Elution Buffer. Vzorce smo shranili pri -20 °C.

## 2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja plazmidov

Naš namen je bil določiti nukleotidno zaporedje plazmidom z umetno sintetiziranimi zaporedji monomera in dimerov, zato smo izolirane plazmide namnožili v PCR reakciji z uporabo kita BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Za PCR reakcijo smo vsak plazmid namnožili v dveh reakcijah, v prvi z uporabo začetnega oligonukleotida T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') in v drugi reakciji z uporabo začetnega oligonukleotida M13R (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'). Za PCR reakcijo smo uporabili 1,5 µl izoliranega plazmida, ki smo mu dodali reakcijsko mešanico z 200 nM začetnega oligonukleotida T7 oziroma M13R, 2 µl 5x BigDye Sequencing Buffer, 0,4 µl BigDye Terminator in ustrezen volumen deionizirane H<sub>2</sub>O do končnega volumna 10 µl. Program PCR reakcije je bil sledeč: 3 min pri 96 °C, 99 ciklov na 96 °C 10s, 10s pri 50 °C in 4 min pri 60 °C ter zadnji korak 7 min pri 72 °C in hlajenje pri 4 °C. Namnožen PCR produkt smo nato ustrezno očistili in ga poslali na določanje nukleotidnega zaporedja z uporabo avtomatskega sekvenatorja 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Oddelek za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Določena nukleotidna zaporedja smo analizirali z uporabo programa CodoneCode Aligner in jih z našimi zaporedji poravnali z uporabo programa Clustal Omega (EMBL-EBI). Za nadaljnje delo smo izbrali plazmide s 100 % ujemanjem glede na načrtovana zaporedja monomera in dimerov.

## 2.7 Merjenje koncentracije DNA in RNA

Zaradi linearizacije plazmidov, številnih korakov čiščenja in transkripcije vzorcev, smo koncentracijo DNA oziroma RNA izmerili večkrat. V ta namen smo za določanje koncentracije DNA uporabili fluorometer Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific), za določanje koncentracije RNA pa BioPhotometer D30 (Eppendorf).

## 2.8 Linearizacija in čiščenje plazmidov

Da smo lahko izvedli prepis monomera in dimerov CBCVd iz DNA v RNA, smo morali najprej plazmide rezati z ustreznimi restrikcijjskimi encimi. V ta namen smo

uporabili restriksijska encima *NotI* in *ApaI* (New England BioLabs). Pri dimeru 2015 smo zaradi dodanih nukleotidov zaporedje vnesli pred restriksijsko mesto za encim *NotI*, medtem ko smo za monomer in dimer 2016 zaporedji vnesli pred restriksijsko mesto za encim *ApaI*. V obeh primerih je bilo mesto vnosa in restrikcije izbrano tako, da smo lahko za prepis uporabili T7-polimerazo, torej za T7-promotorjem. Pri linearizaciji plazmidov z restriksijskimi encimi smo sledili navodilom proizvajalca, zaradi večjega končnega izkoristka po poteku čiščenja, pa smo v reakciji povečali končni volumen in posledično priporočeno količino začetne DNA, ki je bila namesto 0,5 -1 µg, v našem primeru 2 µg. Potek linearizacije smo preverili na 0,9 % agaroznem gelu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) pod UV lučjo. Vzorce smo očistili z mešanico kloroform:izoamilakohola (24:1) in precipitacijo na -20 °C preko noči (Kump in Javornik, 1996).

## 2.9 Prepis DNA v RNA s T7-polimerazo

Za prepis DNA v RNA smo uporabili komplet reagentov MEGAscript T7 Transcription Kit (Ambion, Life technologies) po navodilih proizvajalca. Glede na izmerjeno koncentracijo lineariziranega plazmida smo reakciji transkripcije s T7-polimerazo dodali 8 µl lineariziranega plazmida, tako da smo povečali končno količino plazmida iz predlagane 0,1-1 µg na ~ 2 µg. Kot kontrolo reakcije prepisa DNA v RNA smo uporabili priložen plazmid pTRI-Xef (Ambion, Life technologies). Da smo se prepričali ali je reakcija uspela, smo koncentracijo RNA vzorcev in kontrole izmerili z uporabo BioPhotometra D30 (Eppendorf).

## 2.10 Meritve koncentracije in kvalitete RNA z inštrumentom Bioanalyzer

Koncentracijo in kvaliteto RNA smo izmerili tudi z uporabo inštrumenta 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). V ta namen smo naredili direktno analizo vzorcev in hkrati tudi analizo 10 krat redčenih vzorcev sintetizirane RNA. Glede na dobljene rezultate smo vzorce ustrezno redčili v RNaze free H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich) in za umetno okuževanje uporabili vzorce s končno koncentracijo ~ 300 ng/µl.

## 2.11 Umetna okužba rastlin

Za umetno okužbo z monomerom in dimeroma CBCVd smo poleg hmelja sorte Celeia, uporabili paradižnik sorte Heinz 1370 in kumare sorte Pariški kornišon. Z injiciranjem v steblo smo okužili po 5 rastlin vsake rastlinske vrste glede na vrsto inokula. Za pozitivno kontrolo okužbe nam je služil vzorec celokupnih nukleinskih kislin, izoliran iz okuženega hmelja, medtem ko smo rastline negativne kontrole inokulirali s sterilno destilirano vodo. Vsako rastlino smo okužili s 40 µl RNA (300 ng/µl), ki smo jo v rastlino injicirali preko stebela, tako da smo s skalpelom v steblo naredili vzdolžno zarezo, v katero smo s pipeto odpipetirali po 10 µl oziroma 20 µl RNA. Na koncu smo vse zareze zavili s parafilnom in rastline postavili v rastlinjak. Inokulirane rastline smo testirali na prisotnost CBCVd 85 dni po okužbi

(dpi, ang. days post infection), v primeru hmelja pa smo testiranje ponovili po dormanci v časovni točki 370 dpi.

## 2.12 RT-PCR

Vzorci izolirane iz umetno okuženih rastlin hmelja, paradižnika in kumar smo analizirali z metodo RT-PCR za določanje viroida CBCVd v hmelju (Jakše in sod., 2015). V ta namen smo uporabili komercialni komplet One Step RT-PCR (Qiagen) in delno modificirane začetne oligonukleotide CVd-IV-F2 (5'-GGGGAAATCTCTTCAGACTC-3') in CVd-IV-R1 (5'-GGGGATCCCTCTTCAGGT-3') (Bernad in Duran-Vila, 2006). Izolirano RNA (~20 ng) smo skupaj s 4 µl začetnih oligonukleotidov (0,6 µM vsak) denaturirali pri 95 °C 5 min. Po denaturaciji smo mešanico ohladili na ledu in ji dodali 1x OneStep RT-PCR Buffer, 0.4 mM vsakega dNTP, 1x Q-Solution, 2 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix in sterilne vode (Sigma Aldrich), do končnega volumna 12 µl. Program RT-PCR reakcije je bil sledeč: 30 min pri 50 °C, 15 min pri 95 °C, 10 ciklov na 30 s pri 94 °C, 30 s pri 65 °C (-1 °C/cikel) in 1 min pri 72 °C, 35 ciklov na 30 s pri 94 °C, 30 s pri 55 °C in 1 min pri 72 °C, ter zadnji korak 10 min pri 72 °C in hlajenje na 4 °C. Namnožene produkte smo analizirali z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) pod UV lučjo.

## 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Namen laboratorijskega dela je bil razviti umetno okuževanje hmelja z inokulom na osnovi monomera in dimera CBCVd. Glede na dosedanje raziskave (Cress in sod., 1983; Adkar-Purushothama in sod., 2015; Verhoeven in sod., 2009) okuževanja rastlin s cDNA konstrukti monomerov in dimerov viroidov je bilo ugotovljeno, da so dimeri viroidov bolj infektivni. V našem primeru smo infektivnost primerjali tako med monomerom in dimerom viroida CBCVd, kot tudi med samimi dimeri, s poudarkom na vplivu strukture dimera. Hkrati smo razliko v infektivnosti testirali tudi na različnih gostiteljih, med katerimi smo poleg hmelja uporabili tudi paradižnik in kumare.

### 3.1 Načrtovanje monomera in dimera CBCVd


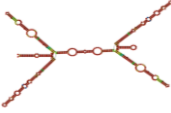

Strukturo monomera in dimerov viroida CBCVd smo določili z uporabo programa RNAfold web server in je bila v primeru monomera 2016 in dimera 2016 paličasta, v primeru dimera 2015 pa zelo razvejana, čeprav smo samemu zaporedju dodali samo nekaj nukleotidov (preglednica 1).

### 3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje plazmidov z monomerom oziroma dimerom smo analizirali z uporabo programa CodoneCode Aligner, poravnave pa izvedli s programom

Clustal Omega (EMBL-EBI). Poravnave analiziranih zaporedij so se 100 % ujemale z načrtovanimi zaporedji monomera in dimerov viroida CBCVd.

**Preglednica 1:** Zaporedje monomera in dimerov z ustrežno strukturo (RNAfold web server)

Zaporedje monomera/dimera CBCVd	RNAfold web server
<pre>&gt;CBCVd monomer 2016 CCC GGGGAAATCTCTTCAGACTCGTCGAGGGGAGGGCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGC ACCGGAACAGGAGCTCGTCTCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCTGCTTCT CCTTCGCGACCTGAGAAAAGAACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGG CTTGTTAAATAAAATGGCCCGCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGAC TAAAAACAGCTTGAGGAGGGAACATACCTGAAGAGGGATC</pre>	
<pre>&gt;CBCVd dimer_2015 ATCCCCGGGAAATCTCTTCAGACTCGTCGAGGGGAGGGCGCCGCGGATCACTGGCGTCC AGCACCGGAACAGGAGCTCGTCTCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCTGCT TCTTCTTTCGCGACCTGAGAAAAGAACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCC CAGGCTTGTTAAATAAAATGGCCCGCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGAC CAAATAAAACAGCTTGAGGAGGGAACATACCTGAAGAGGGATCGAAATCTCTTCAGACT CTTCGAGGGGAGGGCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCACCGGAACAGGAGCTCGTCTCC TTCCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCTTCTTCTTCGCGACCTGAGAAAAGAA ACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGGCTTGTTAAATAAAATGGCCCG CTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGACCAAATAAAACAGCTTGAGGAGGG AACATACCTGAAGAGGGATCCCCGGGAA</pre>	
<pre>&gt;CBCVd dimer 2016 CCC GGGGAAATCTCTTCAGACTCGTCGAGGGGAGGGCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGC ACCGGAACAGGAGCTCGTCTCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCTGCTTCT CCTTCGCGACCTGAGAAAAGAACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGG CTTGTTAAATAAAATGGCCCGCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGACCAA TAAAAACAGCTTGAGGAGGGAACATACCTGAAGAGGGATCCCCGGGGAATCTCTTCAG ACTCGTCGAGGGGAGGGCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCACCGGAACAGGAGCTCGTCT CCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCTTCTTCTTCGCGACCTGAGAAAAG AACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGGCTTGTTAAATAAAATGGCCCG GCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGACCAAATAAAACAGCTTGAGGAGG GAACATACCTGAAGAGGGATC</pre>	

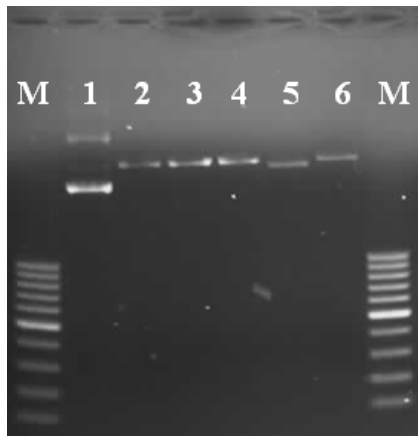
### 3.3 Linearizacija in čiščenje plazmidov

Uspešnost restrikcije encimov *NotI* in *Apal* smo preverili z vizualizacijo na 0,9 % agaroznem gelu (slika 1). Cel plazmid brez delovanja restrikcijskih encimov namreč zaradi krožne strukture v gelu potuje hitreje in se vizualno loči od lineariziranega plazmida, ki zaradi linearne strukture potuje počasneje. S slike 1 je tako razvidno, da je restrikcija uspešno potekla in da je plazmid primeren za uporabo pri prepisu DNA v RNA.

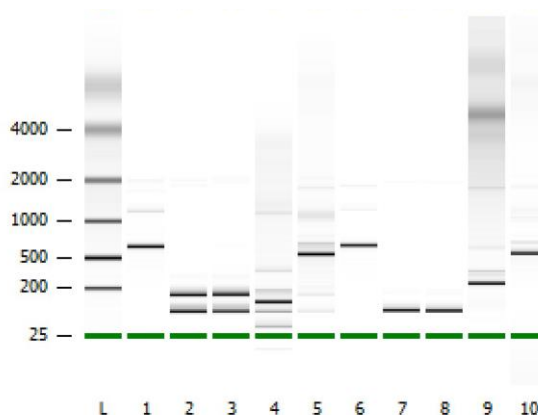
### 3.4 Prepis DNA v RNA s T7-polimerazo

Glede na mesto vnosa monomera in dimerov viroida CBCVd, usmerjenosti plazmida pBluescript SK II (+) in mesta restrikcije, smo za prepis DNA v RNA uporabili T7-polimerazo. Uspešnost prepisa smo preverili z uporabo kontrolnega plazmida pTRI-Xef, ki smo mu na koncu izmerili koncentracijo in oceno čistosti ( $A_{260/280}$ ). Ker je bila koncentracija in čistost kontrolnega plazmida in analiziranih vzorcev v okviru predvidene, smo vzorcem pred nadaljnjim delom še dodatno

določili koncentracijo in kvaliteto z uporabo inštrumenta 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).



**Slika 1:** Vizualizacija linearizacije plazmidov z restriksijskimi encimi na 0,9 % agaroznem gelu. Številka 1 predstavlja cel plazmid, številke od 2 do 6 pa linearizirane plazmide, od katerih je številka 5 monomer CBCVd, ostali pa so dimeri CBCVd. Na gelu je marker velikosti 100 bp (M).



**Slika 2:** Analiza velikosti monomera in dimerov CBCVd z uporabo inštrumenta 2100 BioAnalyzer. Vzorec številka 1 je dimer 2015, številka 4 je monomer 2016 in številka 5 je dimer 2016. Vzorec številka 6 je 10 krat redčen dimer 2015, številka 9 je 10 krat redčen monomer 2016 in številka 10 je 10 krat redčen dimer 2016. Vzorci številka 2, 3, 7 in 8 so dimer CBCVd narejen na Češkem. Marker je označen z L in predstavlja velikosti od 25 do 4000 nukleotidov.

### 3.5 Meritve koncentracije in kvalitete RNA z inštrumentom Bioanalyzer

Po prepisu DNA v RNA smo vzorcem določili kvaliteto in koncentracijo z uporabo inštrumenta 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Analizirali smo tako neredčene, kot 10 krat redčene vzorce monomera in dimerov viroida CBCVd in jim določili koncentracije (preglednica 2). Poleg kvalitete smo dobili tudi informacijo o velikosti RNA (preglednica 2, slika 2), iz katere lahko sklepamo ali je prišlo do razreza na ustreznem mestu ali ne.

Iz rezultatov pričakovane in videne velikosti RNA (preglednica 2) je razvidno, da je bil razrez uspešen. Hkrati smo analizirali še dva vzorca dimerov CBCVd, ki so jih naredili naši sodelavci na Češkem (slika 2, vzorci 2, 3, 7 in 8), ki smo jih želeli uporabiti za primerjavo, vendar je bilo glede na predvideno velikost, ki bi morala biti okrog 700 nt in ne manj kot 200 nt, razvidno, da do razreza na prišlo na pravem mestu. Vzrok za nepravilen razrez je bil v uporabi drugega plazmida in polimeraze.

**Preglednica 2:** Meritve koncentracije in velikosti RNA z uporabo inštrumenta 2100 BioAnalyzer

Vzorec	Koncentracija [ng/ $\mu$ l]	Pričakovana velikost [nt]	Videna dolžina [nt]
Dimer CBCVd 2015	560	674	657
Monomer CBCVd 2016	303	290	151
Dimer CBCVd 2016	393	574	555
Dimer CBCVd 2015, 10x redčitev	105	674	674
Monomer CBCVd 2016, 10x redčitev	21	290	251
Dimer CBCVd 2016, 10x redčitev	19	574	564

### 3.6 Rezultati umetnega okuževanja

Z injiciranjem RNA v steblo smo okužili rastline hmelja, paradižnika in kumar. Rastline smo testirali na prisotnost CBCVd na v časovni točki 85 dpi, hmelj pa dodatno še pri 370 dpi. Kot pozitivna kontrola okužbe nam je služil vzorec celokupnih nukleinskih kislin, izoliran iz okuženega hmelja, pri katerem je bila okužba tako paradižnika kot hmelja 100 % (preglednica 3). Kumare so se pokazale kot manj dovzetne za okužbo, kajti tako v primeru okužbe s celokupnimi nukleinskimi kislinami, kot tudi pri ostalih vzorcih, je bila stopnja okužbe nižja kot pri paradižniku in hmelju. V primeru kumar je skoraj četrtnina rastlin propadla še pred prvim vzorčenjem, najverjetneje zaradi prevelikih poškodb med okuževanjem.

Med analiziranimi vzorci monomera in dimerov se je kot najbolj infektiven paradižniku in hmelju pokazal dimer 2016, z enostavno paličasto strukturo, medtem ko na kumarah ni prišlo do okužbe. Tudi vzorec dimera 2015 je bil na hmelju 100 % uspešen, medtem ko je bila v primeru paradižnika in kumar okužbe uspešna samo na eni rastlini. To nakazuje, da bi lahko imela struktura dimera vlogo pri replikaciji CBCVd v različnih gostiteljih. Inokulum na osnovi monomera CBCVd se je izkazal kot najmanj infektiven, saj smo v točki 85 dpi okužbo potrdili le pri 2 rastlinah paradižnika in hmelja, medtem ko se z monomerom ni okužila nobena kumara. Pri hmelju smo v točki 370 dpi pozitiven signal zaznali še pri eni rastlini, vendar je bila glede na ostale vzorce okužba vseeno manj uspešna (preglednica 3). V primeru negativne kontrole so bile vse analizirane rastline brez viroida CBCVd. Pri primerjavi vseh treh gostiteljev rezultati kažejo, uspešno inokulacijo pri hmelju in paradižniku tako z monomerom kot z dimeroma, medtem ko so kumare glede na dobljene rezultate slabši gostitelj.

**Preglednica 3:** Rezultati RT-PCR po umetni okužbi z monomerom in dimeroma viroida CBCVd; število okuženih rastlin glede na število vseh rastlin za paradižnik, kumare in hmelj (85 dpi in 370 dpi)

Vzorec	Število okuženih rastlin/ število vseh rastlin			
	Paradižnik (Heinz 1370)	Kumare (Pariški kornišon)	Hmelj (Celeia)	Hmelj (Celeia)
	85 DPI*	85 DPI*	85 DPI*	370 DPI*
Dimer CBCVd 2015	1/5	1/3	4/5	5/5
Monomer CBCVd 2016	2/5	0/2	2/5	3/5
Dimer CBCVd 2016	5/5	0/4	4/5	5/5
Celokupne nukleinske kisline	5/5	2/5	5/5	5/5
Negativna kontrola	0/5	0/5	0/5	0/5

\*DPI= število dni po okužbi (ang. days post infection)

#### 4 ZAKLJUČEK

Huda viroidna zakrnelost hmelja je zelo agresivna bolezen, ki se pojavlja samo Sloveniji. Glavni povzročitelj bolezni je viroid CBCVd, ki se v okuženih rastlinah vedno pojavlja v kombinaciji z vsesplošno razširjenim viroidom HLVD, pogosto pa so v obolelih rastlinah prisotni tudi virusi. Ker gre za povsem nov viroid na hmelju in do sedaj nepoznano viroidno obolenje, je potrebno etiološko ovrednotiti vpliv CBCVd na hmelj v obliki samostojnih okužb in vpliv v obliki mešanih okužb s HLVD pa tudi z ostalimi viroidi in virusi. Vendar pri pripravi CBCVd inokula iz obolelih rastlin, ki ga potrebujemo za izvedbo teh raziskav, naletimo na težavo nezmožnosti eliminacije ostalih patogenov.

V ta namen smo razvili metodo umetnega okuževanja hmelja in ostalih gostiteljskih rastlin, kot je paradižnik, s sintetičnim monomerom in dimerom viroida CBCVd. Umetno sintetizirana cDNA v obliki monomera ali dimera je vstavljena v plazmid, ki omogoča prepis iz DNA v RNA. RNA nato služi kot inokulum v procesu umetnega okuževanja preko injiciranja v steblo. Pri tem smo potrdili višjo stopnjo infektivnosti dimerov in nakazali možnost vpliva strukture dimerov na uspešnost okuževanja različnih gostiteljev.

Razvita metoda tako omogoča okuževanje rastlin samo s CBCVd in predstavlja pomembno tehniko pri nadaljnjih etioloških in epidemioloških študijah hude viroidne zakrnelosti hmelja in ostalih viroidnih obolenj, kjer nastopa CBCVd.

**Zahvala.** Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (MR štipendija št. 36371, projekti: L4-6809, V4-1405, raziskovalni program: P4-0077). Hkrati se avtorji za nasvete pri izvedbi poskusa zahvaljujemo tudi prof. dr. Teruo Sano (Hirosaki University, Japonska) in dr. Jaroslav Matousek (Institute of Plant Molecular Biology, Česke Budějovice, Češka).

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Adkar-Purushothama C. R., Zhang Z., Li S., Sano T. Analysis and application of viroid-specific small RNAs generated by viroid-inducing RNA silencing. *Methods Mol Biol.* 2015; 1236:135-70.
- Barbara D.J., Morton A., Adams A.N., Green C.P. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK. *Annals of Applied Biology.* 1990; 117:359-366.
- Bernad L. in Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes.* 2006; 20 (2):105-13.
- Cress D. E., Kiefer M. C., Owens R. A. Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11 (19):6821-35.
- Guček T., Radišek S., Jakše J., Matoušek J., Javornik B. Comparison of different methods for viroid plant inoculation. *Viroid 2015 : book of abstracts*, International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015.
- Hadidi A., Flores R., Randles J., Semancik J. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 2003.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology.* 2015; 64 (4):831-842.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science.* 1996; 114:149-158.
- Matoušek J., Orctová L., Steger G., Riesner D. Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J Virol Methods.* 2004; 122 (2):153-64.
- Mishra A. K., Duraisamy G. S., Matoušek J., Radišek S., Javornik B., Jakše J. Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection. *BMC Genomic.* 2016; 17 (1):919. doi: 10.1186/s12864-016-3271-4.
- Puchta H., Ramm K., Sängner H. L. The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16 (10):4197-216.
- Radišek S., Majer A., Jakše J., Javornik B., Matoušek J. First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia. *Plant Disease.* 2012; 96 (4):592-593.
- Radišek S., Guček T., Leskošek G., Benko-Beloglavec A., Jakše J., Javornik B. *Huda viroidna zakrnelost hmelja*. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 2017.
- Sano T. Hop stunt viroid. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J., Semancik, J. (eds) *Viroids*. CSIRO Publishing. Cllingwood, Australia. 2003.
- Sano T. History, Origin, and Diversity of Hop Stunt Disease and Hop Stunt Viroid. *Acta Hort.* 2013; 1010, *ISHS*:87- 96.
- Verhoeven J.Th.J. in Roenhorst J.W. Herbaceous test plants for the detection of quarantine viruses of potato. *EPPO Bulletin.* 2000; 30: 463-467.
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C., Roenhorst J.W., Flores R., de la Pena M. Pepper chat fruit viroid: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research.* 2009; 144 (1-2):209-214.
- Verniere C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella L., Chabrier C., Bove J.M., Duran Vila N. Citrus viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Plant Disease.* 2004; 88:1189-1197.
- Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella, L. Chabrier C., Bové J. M., Duran Vila N. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Phytopathology.* 2006; 96 (4):356-68.



## pH TAL V HMELJIŠČU SKOZI ČAS GLEDE NA VRSTO APNENEGA GNOJILA

Barbara ČEH<sup>5</sup> in Bojan ČREMOŽNIK<sup>6</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2017

Sprejeto / accepted: 11. 12. 2017

### Izvleček

S poljskim poskusom, ki smo ga postavili v letu 2013 na IHPS (srednje globoka, evtrična rjava na peščeno prodnati osnovi, srednje skeletna, glinasta ilovica / peščeno glinasta ilovica, pH=5,3), smo želeli preveriti, ali naj bi za hmeljišča svetovali odmerke apnenca in hidratiziranega apna po preglednicah, ki jih je podprlo Združenje nemških kmetijskih analitskih in raziskovalnih inštitutov (VDLUFA). V poskus smo vključili tudi apnjenje s pripravkoma iz morskih alg in v moko zmetega apnenca s strani prodajalcev priporočenih odmerkih. Za razmere poskusa je bilo odmerjanje apnenca po smernicah VDLUFA ustrezno, če smo imeli material različne granulacije (41 % 0–1 mm, 22 % 1–2 mm, 23 % 2–5 mm in 14 % 5–8 mm), le drobna granulacija (0–1 m) se je odrazila v povišanju pH nad želeno za pridelavo hmelja. Celoten odmerek hidratiziranega apna, določen po teh preglednicah, bi bil v razmerah našega poskusa predvidoma prevelik. Vsakoletna aplikacija pripravka iz morskih alg v odmerku 0,3 t/ha ni značilno vplivala na pH tal, povečan letni odmerek na 0,5 t/ha se je nakazal kot ustrezen za vzdrževanje pH tal. V moko zmeti apnenec v odmerku 2,25 t/ha je bil premajhen za dvig pH nad 6,5 v štiriletnem obdobju. Apnjenje je pozitivno vplivalo na vsebnost prostih karbonatov in organske snovi v tleh ter na mikrobiološko aktivnost tal. Seštevek baz v tleh in kationska izmenjalna kapaciteta sta bila nakazana kot najvišja po uporabi apnenecv.

**Ključne besede:** apnjenje, kalcifikacija, pH tal, rodovitnost tal, apnenec, hidratizirano apno

## SOIL pH THROUGH TIME RELATED TO LIMING MATERIAL

### Abstract

With a field block trial, set up in autumn of 2013 in a hop field at the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (medium deep soil, medium skeletal, sandy/clay/loam to clay/loam, starting pH=5.3), we wanted to test whether or not to

<sup>5</sup> Dr., univ. dipl. inž. agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-pošta: barbara.keh@ihps.si

<sup>6</sup> Dipl. inž. agr. in hort., prav tam, e-pošta: bojan.cremoznik@ihps.si

advise hop growers to use the liming rates of limestone and hydrated lime shown in the tables provided by the Association of German Agricultural Analytical and Research Institutes (VDLUFA). The limestone rate was appropriate if the liming material contained a range of different granulations (41% 0-1 mm, 22% 1-2 mm, 23% 2-5 mm and 14 % 5-8 mm). However with material that contained only small granules (0-1 mm), it was too high. pH in the following 4 years was raised too high for the production of hops, namely. The rate of hydrated lime, as determined by these tables, would be too high for the conditions of our experiment. To provide useful comparisons, we also included in the experiment the application of a preparation based on marine algae, and limestone, ground in flour, in rates, suggested by the sellers. The annual application of marine algae preparation at a dose of 0.3 t/ha did not significantly affect the pH of the soil. In order to maintain soil pH this should be applied at an annual rate of 0.5 t/ha. Limestone flour in a rate of 2.25 t/ha was too low to raise pH above 6.5 in a four-year period. Liming had a positive effect on the content of free carbonates and organic matter in the soil and on the microbiological activity of the soil. The sum of base ions in the soil and cation exchange capacity were found to be highest after the use of calcium carbonate.

**Key words:** liming, calcification, soil pH, soil fertility, calcium carbonate, hydrated lime

## 1 UVOD

pH tal je dejavnik, ki ima velik vpliv na rast in razvoj rastlin. Večina posevkov, ki jih pridelujemo, ni prilagojena na preveč kislta tla. Nizka vsebnost kalcija v tleh ima za posledico slabšo strukturo tal, zmanjšan učinek mineralnih in organskih gnojil ter zakisanje tal (Grüne Hefte, 2017). Za povečanje rodovitnosti na prekislih kmetijskih tleh skrbimo z apnjenjem (Haynes in Naidu, 1998; Brady in Weil, 1996). V naših razmerah pride do zakisanja tal že po naravni poti, če ne apnimo, saj z rastlinskimi pridelki odvezujemo iz tal (tudi) poglavitna bazična kationa kalcij in magnezij, baze se iz tal tudi izpirajo, med rastno dobo se v tleh sproščajo kisline, večina gnojil, ki jih pri nas uporabljamo, deluje kislo (Mihelič in sod., 2010). Za sprotno nevtralizacijo v tleh nastajajočih kislin, če gnojimo s kislo delujočimi gnojili, potrebujemo letno 1 t/ha apnenca (Mihelič in sod., 2010). Odmerke apnenih gnojil določimo na osnovi izmerjenega pH tal, tipa tal ter vsebnosti organske snovi ob upoštevanju vrste in oblike apnenega materiala, vsebnosti apna (CaO) v njem in apnilnega učinka (VDLUFA, 2000; Mihelič in sod., 2010; Grüne Hefte, 2017).

S poljskim poskusom, s katerim smo želeli primerjati učinkovitost različnih apnenih gnojil na pH tal, smo ugotovili, da odmerek apnenca (2,3 t/ha), tako geološko starejšega iz triasa kot geološko mlajšega iz miocena, določen po

preglednicah po Schachtschablu, ki so sedaj v veljavi v Sloveniji, ni imel zaznavnega vpliva na pH tal. Le-ta se je v dveh letih po aplikaciji z začetnih pH=5,8 celo znižal na 5,3 oziroma na 5,4, torej je bil na ta način določen odmerek očitno premajhen in zato neučinkovit (Čeh, 2014; Čeh in Čremožnik, 2015). Zato smo v nadaljevanju poskusa želeli preveriti, ali naj bi tudi v naših razmerah svetovali odmerke po nemških preglednicah, ki jih je podprlo Združenje nemških kmetijskih analitskih in raziskovalnih inštitutov (VDLUFA, 2000). Rezultate poskusa do vključno leta 2015 smo objavili v Čeh in Čremožnik (2015), v prispevku pa predstavljamo rezultate, pridobljene v času nadaljevanja poskusa v letih 2016 in 2017.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Tla

Poskus je bil postavljen na poskusnem posestvu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, v hmeljišču, zasajenim s hmeljem sorte Celeia, na srednje globokih, srednje skeletnih, evtričnih rjavih tleh na peščeno prodnati osnovi. Zgornji obdelovalni horizont uvrščamo v teksturni razred glinasta ilovica / peščeno glinasta ilovica (GI-PGI), kar uvršča tla med težka do srednje težka. Zgornji sloj tal (0–25 cm) je bil ob postavitvi poskusa optimalno preskrbljen s kalijem (24,6 mg K<sub>2</sub>O/100 g tal) in ekstremno preskrbljen s fosforjem (43,9 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g tal) (AL-metoda; Egner in sod., 1960), pH tal (v KCl) je bil 5,3, vsebnost organske snovi 2,3 %.

### 2.2 Postavitev in oskrba poskusa

Poskus smo zastavili kot nadaljevanje poskusa, predstavljenega v Čeh in Čremožnik (2015) jeseni leta 2013 kot bločni poljski poskus s šestimi obravnavanji (različna apnena gnojila v različnih odmerkih in kontrola - brez apnjenja) v štirih ponovitvah. Velikost osnovne parcele je bila 76 m<sup>2</sup>. Vključena apnena gnojila so bila:

- **apnec - trdi**: geološko starejši apnec iz triasa (86,7 % CaCO<sub>3</sub> oziroma preračunano 48,6 % CaO; 6,27 % MgCO<sub>3</sub> (Ecobeton, 2013); nevtralizacijska vrednost 90 %, reaktivnost v primerjavi s čistim apnencem 41 %; **velikost delcev: 0–1 mm**);
- **apnec - mehki**: geološko mlajši apnec iz miocena (>92 % CaCO<sub>3</sub> oziroma preračunano >52 % CaO; 2,5 do 4,0 % MgCO<sub>3</sub>; nevtralizacijska vrednost 91 %, reaktivnost v primerjavi s čistim apnencem 79 %; **velikost delcev: 41 % 0–1 mm, 22 % 1–2 mm, 23 % 2–5 mm in 14 % 5–8 mm**; Apnec IGM, 2012);
- **hidratizirano apno**: Ca(OH)<sub>2</sub> (70 % CaO, nevtralizacijska vrednost 132 % v primerjavi s čistim apnencem);

- **morske alge:** proizvod iz morskih kalcitnih alg - *Lithothamnium calcareum* (80 % CaCO<sub>3</sub>, 11 % MgCO<sub>3</sub> + alginati in elementi v sledovih: železo, baker, mangan, cink, molibden, kobalt, jod, bor, selen; nevtralizacijska vrednost 40 %, reaktivnost v primerjavi s čistim apnencem 13 %, oblika prašiva; Apnenec iz ..., 2015);
- **apnenec - moka;** > 92 % CaCO<sub>3</sub>, od tega: > 53 % CaO, fino mleta moka: do 1 mm (**100 % < 1 mm, od tega: 80 % < 0,3 mm**), nevtralizacijska vrednost 53 %, reaktivnost 80% (Apnena gnojila, 2017);
- **kontrola - brez apnjenja.**

**Preglednica 1:** Termini aplikacije in odmerki (t/ha) posameznih apnenih gnojil v poskusu od 2013 do 2017

Obravnavanje	Oznaka	Odmerek (t/ha)	Čas aplikacije	Količina apliciranega CaO v obdobju 2013-2017 (t/ha)
apnenec – trdi	A	19	novembra 2013	9,2
apnenec – mehki	B	19	novembra 2013	9,9
morske alge	C	0,3	novembra 2013	0,14
		0,3	novembra 2014	0,14
		0,3	novembra 2015	0,14
		0,5	novembra 2016	0,23
hidratizirano apno	D	2,5	novembra 2013	1,8
kontrola – brez apnjenja	E	0	0	0
apnenec – moka	F	2,25	marca 2014	1,2

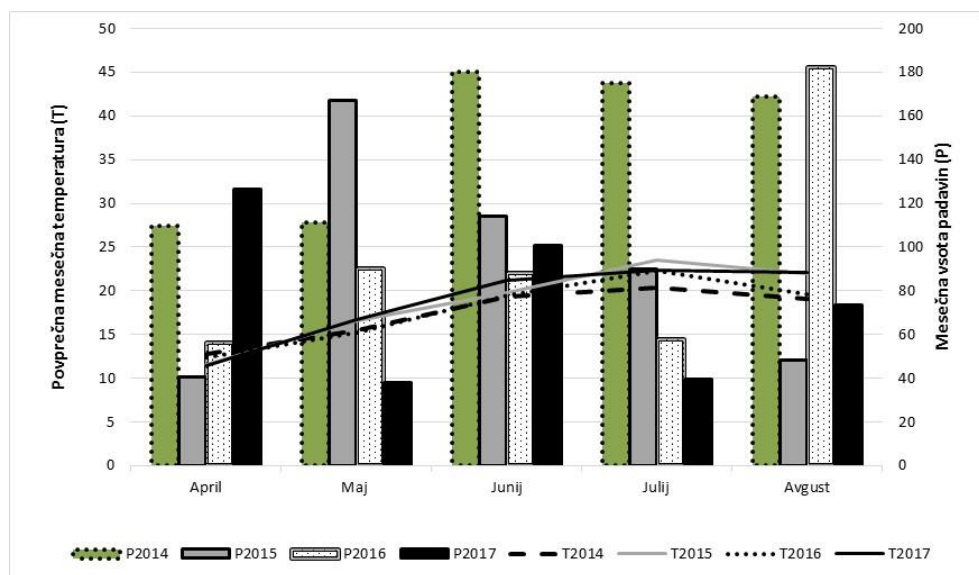
Odmerek *apnenec – trdi* in *apnenec – mehki* smo določili na podlagi preglednic po VDLUFA (2000) glede na izhodiščni pH=5,3, prav tako odmerek *hidratiziranega apna*. Slednjega naj bi aplicirali več kot 10 t/ha, a ker je to dokaj agresiven material, je priporočeno, da se ga aplicira v več obrokih. Zato smo novembra 2013 potrosili prvi obrok, in sicer 2,5 t/ha. Vsa tri navedena apnena gnojila smo potrosili po celotni površini parcel novembra 2013 in jih takoj zakultivirali v tla.

Pripravek iz *morskih alg* smo začeli jeseni 2013 aplicirati vsako jesen v količini 300 kg/ha – po navodilih prodajalca, marca 2014 pa smo aplicirali *apnenec – moka*, v enkratnem odmerku, priporočenem s strani prodajalca (preglednica 1), in takoj po aplikaciji apnena gnojila vdela v tla s kultiviranjem.

Vsi drugi agrotehnični ukrepi (gnojenje, varstvo pred boleznimi in škodljivci, obdelava tal), razen apnjenja, so bili enaki za celoten poskus in izvajani po načelih dobre kmetijske prakse. Hmeljišče ni bilo namakano.

### 2.3 Vremenske razmere v letih 2014 do 2017

Povprečne mesečne temperature in vsota padavin po mesecih v letih od 2014 do 2017 so prikazane na sliki 1 v obliki poenostavljenega Walter-Gausse-ovega klimadiagrama. Skala je izbrana tako, da 0 °C ustreza 0 mm, razmerje med °C in mm na skali pa je 1 °C : 4 mm. Obdobje, ko je padavinska krivulja pod temperaturno, je na ta način narisanim grafu opredeljeno kot obdobje suše. To je bilo v aprilu, juliju in avgustu 2015, v juliju 2016 ter v maju in juliju 2017. Vsota padavin od aprila do avgusta je bila največja v letu 2014 (745 mm), sledili sta leti 2016 in 2015 (474 mm oziroma 460 mm) in leto 2017 (378 mm). Povprečna mesečna temperatura obdobja april do avgust je bila 17 °C v letu 2014, 18 °C v letu 2016 in 19 °C v letih 2015 in 2017.



**Slika 1:** WALTER-GAUSSENov klimadiagram za rastne sezone hmelja v letih od 2014 do 2017; P=vsota padavin, T=povprečna temperatura, 2014, 2015, 2016 in 2017=preučevana leta (Žalec; Agrometeorološka ..., 2017)

### 2.4 Meritve

Vsako leto smo vzorčili tla do globine 25 cm v aprilu (v začetku rastne dobe hmelja), v prvi dekadi julija (tik pred tretjim dognojevanjem hmelja z dušikom) ter v zadnji dekadi septembra (po obiranju hmelja) in jih analizirali na pH (v KCl; metoda SIST ISO 10390). Posamezen vzorec smo vzeli tako, da smo se po parceli pomikali cik-cak ter vzeli podvzorce na dvajsetih do petindvajsetih mestih. Vzorčili smo v medvrstnem in vrstnem prostoru, pri tem smo se izogibali robovom

parcelic. Enkrat letno smo vzorce vzeli z vsake parcele posebej, kar dopušča statistično analizo rezultatov, dvakrat letno pa povprečno po obravnavanjih.

Maja 2016 smo vzorčili tla ob rastlinah po obravnavanjih, ko so bila le-ta vlažna, a ne mokra, za mikrobiološko analizo. Le-to so izvedli v laboratoriju IHPS po metodi SOP M16 (interna metoda, razvita po Larkin in sod. (1993)) in na vsebnost organske snovi (po spektrofotometrični metodi). Septembra 2016 smo vzorčili tla po obravnavanjih za standardno pedološko analizo; kationsko izmenjalno kapaciteto so določili po Melichovi metodi, modificirani po Peech in sod. (1962). Organski ogljik je izračunan tako, da so organsko snov (%) delili z 1,724. Elemente K, Ca, Mg in Na so določili na atomskem absorpcijskem spektrometru.

Rezultate smo obdelali s pomočjo računalniških paketov Excel in Statgraphics Centurion. Razlike med obravnavanji smo zaznavali z Duncanovim testom mnogoterih primerjav,  $p=0,05$ .

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

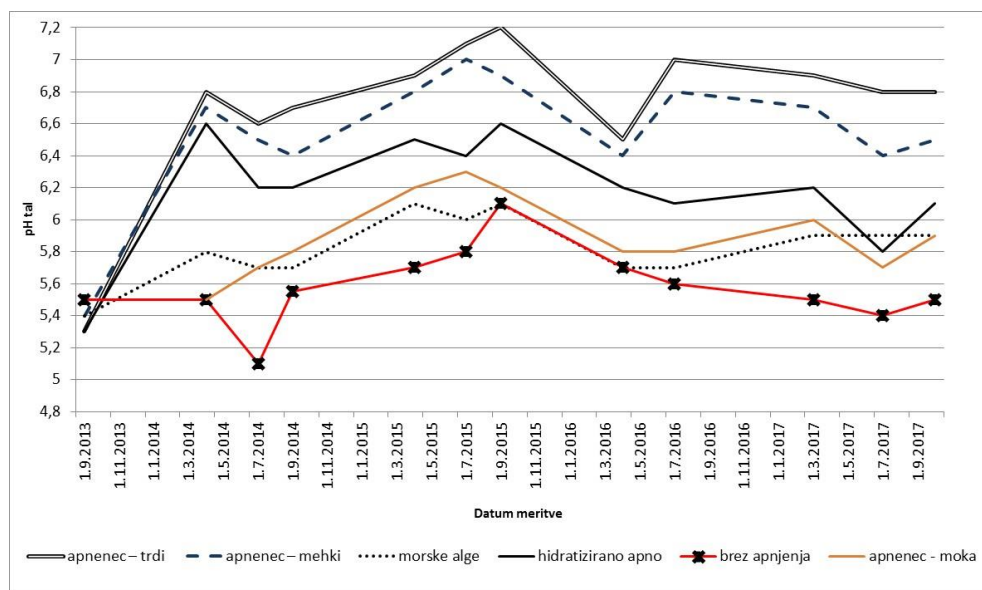
#### 3.1 pH tal

Na sliki 2 so prikazani rezultati meritev pH tal v poskusu glede na obravnavanje in termin vzorčenja. Tako 6. julija 2016 kot 3. julija 2017 je bil statistično značilno najvišji pH tal pri obravnavanju *apnenec - trdi*, značilno nižji pri obravnavanju *apnenec - mehki*, še značilno nižji pri obravnavanju *hidratizirano apno* (preglednica 2). pH tal je bil pri obravnavanju *apnenec - trdi* poleti 2016 nad ustreznim za pridelavo hmelja, do meritve poleti 2017 pa se je znižal na zgornjo mejo še ustrezne. Za težja tla naj bi bilo sicer po smernicah VDLUFA (2000) ustrezno pH območje tal od 6,9 do 7,5, a za hmelj tako visokega pH tal ne priporočamo. Za hmelj so primerna zmerno kislila s pH od 6,0 do 6,7 (Čeh, 2012). V Avstriji za hmelj navajajo kot ustrezen pH tal 6,0 do 6,5, na težjih tleh do največ 6,8 (tehnolog G. Pronegg, ustni vir). Po navodilih delovne skupine za hmelj iz Bavarskega državnega raziskovalnega centra za kmetijstvo, Inštituta za rastlinsko pridelavo in gojenje rastlin (Grüne Hefte, 2017) je optimalni pH tal v hmeljiščih za peščena tla 5,0 do 5,4, za ilovnato peščena tla 5,5 do 5,9, za srednje težka tla 6,0 do 6,4 in za težja tla 6,5 do 6,8. Ko je pH tal v tem območju, se vnašanje gnojil, ki vsebujejo kalcij, ne priporoča, ker bi to pomenilo manjšo dostopnost mikroelementov za hmelj (Grüne Hefte, 2017). Po izkušnjah strokovnjakov s tega inštituta je za hmelj dostopnost mikrohranil, kot sta cink in bor, bolj pomembna kot prednosti boljše strukture tal (J. Portner, ustni vir).

Pri odmerjanju apnenca za hmeljišča po smernicah VDLUFA je torej smiselna pazljivost pri granulaciji materiala, da nimamo le drobno mletega. Tudi Mihelič in sod. (2010) ter Comission (2013) navajajo, da sta pri apnencu pomembna dva

podatka: velikost delcev in narava (izvor) kamnine apnenca. Načeloma velja, da je delovanje hitrejše, bolj kot so delci drobni (Grüne Hefte, 2017). Različna granulacija materiala omogoča bolj enakomerno sproščanje kalcija skozi čas. V poskusu smo imeli namreč v primeru pri *apnenec – mehki* različno granulacijo materiala (0–8 mm) in je bil v letih 2016 in 2017 pH tal ves čas v optimalnem območju za pridelavo hmelja. V celotnem obdobju od aplikacije tega materiala v količini 19 t/ha je pH tal sicer poskočil nad to območje pri meritvah poleti in jeseni leta 2015, torej eno leto in pol do dve po aplikaciji.

Celoten svetovan odmerek hidratiziranega apna po smernicah VDLUFA bi bil za razmere našega poskusa predvidoma prevelik. Jeseni 2013 smo namreč aplicirali le del svetovanega odmerka glede na izhodiščni pH=5,3 (2,5 t/ha od svetovanih dobrih 10 t/ha), pa je bil v štiriletnem obdobju dosežen pH 6,0 do 6,6 (slika 2). Če se orientiramo po nemških navodilih na ciljno vrednost pH 6,5 do 6,8 za težka tla, potem bi v tem štiriletnem obdobju glede na rezultate meritev lahko aplicirali še en obrok hidratiziranega apna, vsekakor pa za ustrezen pH za hmelj ne celotno količino dobrih 10 t/ha.



**Slika 2:** pH tal glede na vrsto apnenega gnojila in datum vzorčenja (0-25 cm); odmerki in termini aplikacij glede na obravnavanje v preglednici 1

Vsakoletna aplikacija pripravka iz alg v odmerku 0,3 t/ha v poskusu ni bistveno vplivala na pH tal, zato smo jeseni 2016 aplicirali 0,5 t/ha tega pripravka. pH tal se je s tem dvignil s 5,7 v 2016 na 5,9 v naslednjem letu. Ker je bil pH tal pri *morske alge* v letu 2016 značilno enak kot pri *kontrola – brez apnjenja*, v letu 2017 pa

značilno višji kot pri *kontrola – brez apnjenja*, se ta odmerek nakazuje kot bolj ustrezen. Gre pa v bistvu bolj za vzdrževanje pH tal in ne za dvig pH v optimalno območje za pridelavo hmelja. V letu 2015 je sicer imelo obravnavanje *morske alge* značilno pozitiven vpliv na pridelek hmelja v primerjavi s *kontrola – brez apnjenja* (Čeh in Čremožnik, 2015), v letih 2016 in 2017 pa pridelka hmelja nismo vrednotili.

Apliciran odmerek *apnenec – moka* 2,25 t/ha bi bil lahko nekoliko večji, saj se je v letu po aplikaciji pH sicer dvignil na 6,3, a je bil že po dveh letih po aplikaciji 5,8. To obravnavanje je imelo kljub temu pozitiven vpliv na kationsko izmenjalno kapaciteto tal (preglednica 3).

**Preglednica 2:** Rezultati analize tal na pH (v KCl), organsko snov in proste karbonate po obravnavanjih ter testiranja mikrobiološke aktivnosti tal glede na datum vzorčenja

Obravnavanje	6. 7. 2016	3. 7. 2017	27. 5. 2016			
	pH v KCl	pH v KCl	Bakterije (CFU x 10 <sup>6</sup> /g tal)	Glive (CFU x 10 <sup>4</sup> /g tal)	Org. snov (%)	Karbonat (CaCO <sub>3</sub> ) (%)
A*	7,0 d**	6,8 d	6,6	4,2	2,9	0,6
B	6,8 c	6,4 c	5,4	4,7	3,2	0,5
C	5,7 a	5,9 b	8,4	6,7	2,6	0,4
D	6,1 b	5,8 b	14,0	5,3	2,5	0,3
E	5,6 a	5,4 a	8,3	3,5	2,6	0,3
F	5,8 a	5,7 b	15,3	2,7	2,5	0,3

\*Opis obravnavanj – legenda v preglednici 1.

\*\*Enaka črka v stolpcu pomeni, da med obravnavanjema razlika ni statistično značilna pri p=0,05 (Duncanov test).

### 3.2 Mikrobiološka aktivnost tal, vsebnost prostih karbonatov in organske snovi v tleh

Paradelo (2015) in VDLUFA (2000) navajata, da apnjenje poveča biološko aktivnost tal. Na osnovi analize tal po obravnavanjih smo pri *hidratizirano apno* in *apnenec – moka* zaznali povečano populacijo celokupnih bakterij. Pri ostalih obravnavanjih je bila populacija bakterij primerljiva s *kontrola – brez apnjenja*. Pri analizi celokupne populacije gliv smo zaznali najvišjo aktivnost pri obravnavanju *morske alge*. Tudi pri drugih obravnavanjih, razen pri *apnenec – moka*, je bila populacija gliv višja kot pri kontroli. Ob upoštevanju bakterijske in glivne populacije skupaj se nakazuje pozitiven vpliv pri obravnavanjih *hidratizirano apno*, *apnenec – moka* in *morske alge*. Ob tem je pomembno izpostaviti, da



rezultati temeljijo na analizah 1 vzorca/obravnavanje, zato statistična analiza in podajanje zaključkov o dejanskem vplivu posameznega pripravka ni možno.

Vsebnost prostih karbonatov in vsebnost organske snovi v tleh sta se nakazali kot nekoliko višja pri obravnavanjih *apnenec – trdi* in *apnenec – mehki*.

### 3.4 Standardna pedološka analiza

Po štirih letih od apnjenja je vsebnost dostopnega kalija v tleh med obravnavanji primerljiva, vsebnost dostopnega fosforja je pri obravnavanju *morske alge* padla v razred D, pri ostalih je ostala v razredu E (preglednica 3). Vrednost S (seštevek baz) je najvišji pri obravnavanju *apnenec – trdi*, sledi obravnavanje *apnenec – mehki*. Pri ostalih obravnavanjih je ta parameter nižji in primerljiv. Glede na vrednost V (zasičenost z bazičnimi kationi) vse vzorce tal uvrščamo med evtrična (nevtralna), je pa vrednost višja pri obravnavanjih *apnenec – trdi* in *apnenec – mehki*. Kationska izmenjalna kapaciteta (vrednost T; skupna vsota izmenljivih kationov, ki jih tla lahko adsorbirajo, odvisna tudi od pH, teksture, vsebnosti organske snovi) je v vseh vzorcih srednja. Kot najvišja se nakazuje pri obravnavanju *apnenec – trdi*, sledita *apnenec – mehki* in *apnenec – moka*.

**Preglednica 3:** Rezultati standardne pedološke analize 4. novembra 2016

Parameter	Obravnavanje*						Enota
	A	B	C	D	E	F	
pH v KCl	6,8	6,6	5,9	6,1	5,7	5,8	-
pH v vodi	7,6	7,6	7,0	7,2	6,9	6,9	-
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	45,2 (E)**	43,6 (E)	38,1 (D)	44,0 (E)	42,1 (E)	41,2 (E)	mg/100 g
K <sub>2</sub> O	28,1 (C)	27,5 (C)	27,0 (C)	29,0 (C)	28,2 (C)	28,1 (C)	mg/100 g
H <sup>+</sup> kation	7,90	7,40	9,20	8,90	10,45	10,50	mmol/100 g
Na <sup>+</sup>	0,0977	0,0879	0,0850	0,1153	0,1020	0,1074	mmol/100 g
K <sup>+</sup>	0,748	0,715	0,752	0,847	0,726	0,815	mmol/100 g
Ca <sup>++</sup>	23,37	20,39	14,34	15,30	14,09	15,22	mmol/100 g
Mg <sup>++</sup>	1,46	1,36	1,33	1,36	1,57	1,44	mmol/100 g
S vrednost	25,68	22,55	16,51	17,62	16,49	17,58	mmol/100 g
T vrednost	33,58	29,95	25,71	26,52	26,94	28,08	mmol/100 g
V vrednost	76,5	75,3	64,2	66,4	61,2	62,6	%
Organski C	1,4	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	%

\*Legenda za obravnavanja v preglednici 1.

\*\*Črke ob številčnih vrednostih označujejo stopnjo preskrbljenosti kmetijskih tal z določenim hranilom: A - siromašna tla, B - srednje preskrbljena tla, C - dobro preskrbljena tla, D - pretirano preskrbljena tla, E - ekstremno preskrbljena tla (Mihelič in sod., 2010)

#### 4 SKLEPI

Prikazani rezultati so pridobljeni iz enega večletnega poskusa, zato jih je pred uporabo v praksi potrebno preveriti še s kašnih poljskim poskusom, za razmere našega poskusa (srednje globoka, evtrična rjava na peščeno prodnati osnovi, srednje skeletna, glinasta ilovica - peščeno glinasta ilovica, hmeljišče, začetni pH=5,3) pa smo ugotovili:

- odmerjanje apnenca po smernicah VDLUFA se je pokazalo kot ustrezno, če smo imeli material različne granulacije (41 % 0–1 mm, 22 % 1–2 mm, 23 % 2–5 mm in 14 % 5–8 mm), le drobna granulacija materiala (0–1 mm) je pri tako velikem enkratnem odmerku povzročila zvišanje pH nad ustrezno pH območje za pridelavo hmelja;
- po VDLUFA preglednicah določeni odmerek hidratiziranega apna se je v razmerah poskusa nakazal kot previsok za pridelavo hmelja. Smiselno se je držati navodil o največjem enkratnem obroku tega materiala glede na teksturo tal, ki jih tudi te smernice priporočajo, in se o naslednjem obroku odločiti glede na kontrolno analizo tal;
- aplikacija 0,3 t/ha priprava iz morskih alg letno ni bistveno vplivala na pH tal, povečan letni odmerek na 0,5 t/ha se je nakazala kot dobrodošel postopek za vzdrževanje pH tal, še zlasti, ker je pri meritvi v letu 2015 vplivala značilno pozitivno na pridelek hmelja glede na ne apneno kontrolo (Čeh in Čremožnik, 2015). Ni pa aplikacija tega pripravka dvignila pH tal v zeleno območje za pridelavo hmelja;
- odmerek apnenca, zmletega v moko (2,25 t/ha), bi moral biti za razmere poskusa nekoliko višji, oziroma bi bila potrebna v štiriletnem obdobju še dodatna aplikacija, saj se je pH tal dvignil v dveh letih po aplikaciji na 6,3, a je v tretjem letu že padel na pH=5,8;
- apnjenje se je nakazalo s pozitivnim vplivom na vsebnost prostih karbonatov in organske snovi v tleh ter na mikrobiološko aktivnost tal;
- seštevke baz (vrednost S) v tleh in kationska izmenjalna kapaciteta sta se nakazala kot najvišja po aplikaciji apnenca.

#### 5 LITERATURA

Agrometeorološka postaja Adcon Telemetry, tip postaje A 740, lokacija Žalec (2017; arhiv IHPS)

Apnena gnojila. Agrosaat. Dostopno na: <https://www.agrosaat.si/sorte-hipridi-gnojila-fitofarmacevska-sredstva/apnena-gnojila/> (oktober 2017)

Apnenenc IGM. Prospekt IGM Zagorje, 2012

Apnenenc iz morskih alg. Dostopno na:

[http://meko.si/uploads/meko/public/\\_custom/litho\\_letak.pdf](http://meko.si/uploads/meko/public/_custom/litho_letak.pdf) (november 2015)

Brady NC, Weil RR. 1996. The Nature and Properties of Soils, eleventh ed. Prentice-Hall International, Inc., Upple Sadle River, NJ, USA: 739.

- Comission regulation (EU) No 463/2013 of 17 May 2013. Official Journal of the European Union. L 134/1-134/14.
- Čeh B, Čremožnik B. pH tal in pridelek hmelja (*Humulus lupulus*) glede na odmerek apnenih gnojil. *Hmeljarski bilten*. 2015; 22: 49-57.
- Čeh B. 2012. Hmelj od sadike do storžkov. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec: 66.
- Čeh B. 2014. Effect of different rates of liming material to a pH value of soil. V: *Posters*. [S. l.]: International Fertiliser Society. 2014; 5-6.
- Grüne Hefte. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Arbeitsbereich Hopfen. 2017; 30-31. Dostopno na: [https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ipz/dateien/gruenesheft\\_2017.pdf](https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ipz/dateien/gruenesheft_2017.pdf) (december 2017).
- Haynes RJ, Naidu R. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 1998; 51: 123–137.
- Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN. Effect of successive watermelon plantings on *Fusarium oxysporum* and other microorganisms in soils suppressive and conducive to Fusarium wilt of watermelon. *Phytopathology*. 1993; 83: 1097–1105.
- Mihelič R., Čop J., Jakše M., Štampar F., Majer D., Tojnko S., Vršič S. Smernice za strokovno utemeljeno gnojenje. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. 2010; 182 s.
- Paradelo R., Virto I., Chenu C. Net effect of liming on soil organic carbon stocks: A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2015; 202: 98–107.
- VDLUFA. Bestimmung des Kalkbedarfs von Acker- und Grünlandböden Anlage. Richtwerte für das Rahmenschema zur Kalkbedarfsermittlung in Deutschland. Standpunkt. 2000. Dostopno na: <http://www.vdlufa.de/joomla/Dokumente/Standpunkte/0-9-kalkanl.pdf> (november 2015)

## VODENJE NAMAKANJA HMELJA (*Humulus lupulus* L.): PREGLED

Boštjan NAGLIČ<sup>7</sup>, Rozalija CVEJIC<sup>8</sup> in Marina PINTAR<sup>9</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 11. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 11. 12. 2017

### Izveleček

Opravljen je pregled načinov vodenja namakanja hmelja v obdobju 1958–2017. Uporabljajo se štiri načini vodenja namakanja hmelja, ki temeljijo na: (i) spremljanju evapotranspiracije in vodne bilance, (ii) spremljanju tenzije ali vlažnosti tal na različnih globinah v tleh, (iii) meritvah stresa rastline, in (iv) simulacijskih modelih. Načina (iii) in (iv) sta primernejša za raziskave, medtem sta način (i) in (ii) primerna tudi podpora odločanju o namakanju na ravni namakalnega sistema.

**Ključne besede:** hmelj, *Humulus lupulus*, vodenje namakanja

## IRRIGATION SCHEDULING OF HOP (*Humulus lupulus* L.): A REVIEW

### Abstract

A review of hop irrigation scheduling in the period 1958–2017 reveals four basic principles to irrigation scheduling of hop that rely on (i) evapotranspiration and water balance, (ii) soil tension or soil moisture across the rooting depth, (iii) measurement of plant stress, and (iv) simulation methods. The methods (iii) and (iv) are more useful as research methods, while method (i) and (ii) are also suitable as a practical tool for irrigation scheduling.

**Key words:** hops, *Humulus lupulus*, irrigation scheduling

## 1 UVOD

Hmelj je rastlina z globokimi koreninami (2,4 m ali več), a se večina mase koreninskega sistema nahaja v vrhnjem delu tal (v zgornjih 120 cm). Za optimalno

---

<sup>7</sup> Dr., univ. dipl. inž. agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: bostjan.naglic@ihps.si

<sup>8</sup> Dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: rozalija.cvejic@bf.uni-lj.si

<sup>9</sup> Prof. dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marina.pintar@bf.uni-lj.si

količino in kakovost pridelka je treba ta del korenkega sistema v kritičnih obdobjih rasti ohranjati vlažnega, vendar ne preplavljenega (Dodds, 2017; Evans, 2003). Hmelj porablja 50 % vode iz zgornjih 60 cm tal, 37 % iz globine 60 do 130 cm, 10 % iz globine 130 do 180 cm in ostanek 3 % iz globine od 180 do 240 cm (Middleton, 1963). Sloj tal do 60 cm oz. 30-40 cm je cona najaktivnejšega odvzema vode in hranil oz. najaktivnejši sloj korenin in je zato primerna za ugotavljanje vlažnosti tal za določanje terminov namakanja (Filippov, 1958, cit. po Majer, 2000). Hmelj porablja manj vode na začetku rastne sezone, poraba se nato povečuje do polne razvitosti. Poraba vode je bolj odvisna od količine listne mase rastoče rastline hmelja, manj od vremenskih razmer (Middleton, 1963; Williams in Brown, 1959 (cit. po Majer, 2000)).

Dostop do zanesljive in bogate oskrbe z vodo za namakanje med rastno sezono je pomemben dejavnik pri izbiri lokacije pridelave hmelja (Dodds, 2017). V nekaterih regijah sveta je dovolj padavin za dobro preskrbljenost hmelja z vodo, drugod, v bolj suhih ali polsuhih regijah, pa namakanje predstavlja osnovo za nemoteno in učinkovito pridelavo hmelja (Neve, 1991). Osnovno vodilo v primeru pomanjkanja razpoložljivih vodnih virov je, da razpoložljivo vodo razporedimo strateško. Celotno potrebo rastlin po vodi je pomembno pokriti na začetku rastne sezone in spet v začetku julija in avgusta, kar naj bi bilo bolje kot enakomerno dodajanje majhnih obrokov skozi celotno sezono, ki ima večji negativni vpliv na količino in kakovost pridelka. Škoda v nenamakanih nasadih je še posebej značilna v mlajših nasadih ali v nasadih na plitkih tleh in tleh z majhno vodozadrževalno sposobnostjo (Evans, 2003).

Pomembno je tudi, da se vegetacijska sezona hmelja začne z dobro preskrbljenostjo tal z vodo, a izkušnje kažejo, da pretirano zgodnje namakanje lahko škoduje koreninam, saj lahko povzroča hmeljevo peronosporo in koreninske gnilobe (Evans, 2003; Zepp in sod., 1995). Prvo kritično obdobje je v času cvetenja (prva polovica julija) in drugo med rastjo storžkov (od druge polovice julija do prve polovice avgusta) (Rybaček, 1991). V primeru, da je gladina pozemne vode visoko (t.j. od 120 do 150 cm metrov pod površino tal) lahko med rastno sezono zadosti večini potreb hmelja po vodi in znatno zmanjša potrebo po namakanju (Evans, 2003; Kišgeci, 1974). Hmelj lahko nekaj vode sprejme tudi skozi liste oz. nadzemne dele, in sicer 5000 rastlin preko noči z roso sprejme 3465–8870 l vode in na ta način krije 20 % dnevnih potreb po vodi. Za 1 kg suhe snovi hmelj potrebuje 300-500 l vode (Kišgeci, 1974).

Mnoga območja po svetu in v Evropi se soočajo s pomanjkanjem vode za namakanje, prekomerno rabo vode za namakanje in ne-optimalnim odmerjanje vode za namakanje. Podnebne spremembe prištevamo med okoljske dejavnike, ki bodo pomembno vplivali na razvoj kmetijstva v prihodnosti (Blanco in sod., 2017). Potrebe po vodi za namakanje se bodo s podnebnimi spremembami povečale, kar

bi (že) ob nespremenjeni porabi vode pomenilo povečanje pritiska na vodne sisteme. Da bi spodbudili razvoj učinkovite rabe vode za namakanje, so se z uvedbo Okvirne Vodne direktive v mnogih državah EU cene vode za namakanje bistveno zvišale; na Cipru z 0,17 na 0,24 €/m<sup>3</sup>, v Grčiji z 0,0137 na 0,64 €/m<sup>3</sup> in v Italiji z 0,07 na 0,8 €/m<sup>3</sup> (Giannakis in sod., 2016).

Količina in kakovost pridelka sta v kompleksni povezavi s časom in količino dodane vode. Namakanje hmelja včasih da zelene rezultate (Slavik in Kopecky, 1997 (cit. po Svoboda in sod., 2008)), včasih pa ne (Thompson, 1967 (cit. po Majer, 2000); Zattler in Maier, 1968 (cit. po Majer, 2000); Brooks, 1961 (cit. po Majer, 2000)).

Ločimo štiri osnovne načine vodenja namakanja (angl. irrigation scheduling), ki temeljijo na: (i) spremljanju evapotranspiracije in vodne bilance, (ii) spremljanju tenzije ali vlažnosti tal na različnih globinah v tleh, (iii) meritvah stresa rastline, in (iv) simulacijskih modelih (Gu in sod., 2017).

Od kakovosti vodenja namakanja je odvisno, koliko vode porabimo za namakanje in kako učinkovita je raba te vode, npr. kakšne so izgube vode, koliko vode rastlina porabi na količinsko ali kakovostno enoto pridelka. Znanje na področju vodenja namakanja hmelja je razdrobljeno. Med pridelovalci in strokovnjaki se pojavlja nemalo dilem o tem, kdaj in koliko namakati za doseg optimalne kakovosti in količine pridelka in katero orodje za vodenje namakanja pri tem uporabiti. Namen prispevka je predstaviti trenutno razumevanje področja in izpostaviti vrzeli na področju vodenja namakanja hmelja.

## 2 MATERIALI IN METODE

Področje razvoja vodenja namakanja hmelja v Slovenji v obdobju 1968-2015 so podrobno analizirali Naglič in sod. (2016). Zimmermann (1981) je objavil obsežen popis angleških in tujih publikacij o hmelju v obdobju 1898-1970. Kot navaja, so bile znanstvene raziskave na hmelju izvedene že od poznega leta 1800, pri čemer je delo potekalo v mnogih državah, a kot izhaja iz popisa, se jih le majhen del nanaša na namakanje hmelja (4 publikacije v angleškem in 10 publikacij v drugih jezikih), ki nam v času nastajanja tega prispevka niso bile dostopne. Novejši sistematični popis objav s področja namakanja hmelja ne obstaja. Zato smo analizirali nam dostopne tuje objave s področja vodenja namakanja hmelja v obdobju 1958–2017.

Zbrali smo tuje strokovne prispevke, znanstvene prispevke, raziskovalne projekte, biltene ter povzetke s področja namakanja hmelja, objavljene v obdobju 1958-2017. Za pripravo nabora prispevkov smo uporabili podatkovno zbirko Web of Science (WoS) in iskalnik Google. Pri analizi literature s področja vodenja namakanja smo privzeli pristop Gu in sod. (2017). Vire smo razdelili v štiri

tematske kategorije: (i) spremljanje evapotranspiracije in vodne bilance, (ii) spremljanje tenzije ali vlažnosti tal na različnih globinah v tleh, (iii) meritve stresa rastline, in (iv) simulacijski modeli.

### 3 REZULTATI

Tehnologije namakanja hmelja se razvijajo. V ZDA in EU se je najprej razvilo namakanje v brazde (poplavno namakanje), ki se je priporočalo in uporabljalo v prvi polovici 20. stoletja. V drugi polovici 20. stoletja ga je nadomestilo namakanje z razpršilci (razpršilci, nameščeni nad rastlinami hmelja in rolomati), ki zahteva večje vložke energije (Rybaček, 1991; Zepp in sod., 1995). Vzporedno se je razvila praksa podzemnega kapljičnega namakanja hmelja (cevi položene 40 cm pod rastline) (Rybaček, 1991), pozneje pa še kapljično dodajanje vode z vrhu žičnice (Slavik in Kopecky, 1994), in dodajanja hranil s pomočjo fertigacije, kar je zvišalo izkoristljivost hranil (Wample in Farar, 1983).

#### 3.1 Spremljanje evapotranspiracije in vodne bilance

Poraba vode je bolj odvisna od količine listne mase rastoče rastline hmelja kot od vremenskih pogojev, zato so avtorji že zgodaj predpostavili, da se namakanje pri hmelju ne more pravilno uravnati s prvotno predlagano metodo merjenja evaporacije (Middleton, 1963). Rezultati 12-letne raziskave namakanja hmelja na Češkem, kjer so bile kapljične cevi napeljene na vrhu žičnice, kažejo, da ta način namakanja pozitivno pripomore k ugodnejši mikroklimi v nasadu hmelja. Temperatura se je zaradi namakanja znižala za 4 °C, kar ima, še posebej v vročih dneh, pozitiven vpliv na biokemične in fiziološke procese v rastlinah hmelja. Pridelek namakanega hmelja je bil v dvanajstletnem obdobju v povprečju višji za 22 %. V namakanem hmelju je bila višja tudi vsebnost alfa-kislin. Na osnovi teh rezultatov so zaključili, da namakanje nima negativnega vpliva na vsebnost alfa-kislin v storžkih hmelja. Prognozo namakanja so izvajali na podlagi tedenskih intervalov vodne bilance (Kopecky in Ježek, 2007). Na osnovi iste metode so namakanje izvajali v štiriletnem (1995-1998) poskusu na hmelju v Žatcu (Češka). Kapljično namakanje na vrhu žičnice je imelo pozitiven vpliv na pridelek suhe snovi hmelja, ki je bil pri namakanem hmelju v povprečju 1,27 t/ha, pri nenamakanem pa 0,88 t/ha (Fric in sod., 1999). Na Češkem so v 7 let trajajoči raziskavi na sorti K-31 primerjali uspešnost napovedi namakanja z uporabo meteorološkega in fiziološkega pristopa (osmotski potencial). Najboljše rezultate glede na potrebo in čas namakanja so dosegli s fiziološko metodo. Na vsebnost alfa-kislin je pomembno vplivalo leto pridelave, ne pa varianta namakanja (Sasin, 1990). Na podlagi raziskav, opravljenih v Vojvodini, so bili določeni kc (faktor rastline), ki se z rastjo hmelja povečujejo in znašajo v začetku rasti 1,2 (pri potencialni evapotraspiraciji 0,97 mm/dan) in v fazi rasti storžkov 2,1 (pri potencialni evapotranspiraciji 4,7 mm/dan) (Kišgeci, 1974). Po drugi strani

navajajo faktorje rastlin za hmelj, ki znašajo od 0,3 do 1,05 (Allen in sod., 1998). V literaturi so navedene tudi ostale metode napovedovanja namakanja na osnovi različnih tipov tal in klimatskih razmer. Avtor navaja, da je namakanje na osnovi te metode povečalo pridelok hmelja za 13,69 %, potreba po vodi pa je bila izražena kot zmnožek biološkega koeficienta hmelja in razlike med napetostjo in pritiskom vodne pare (Kopecky, 1987; cit. po Majer, 2000).

### 3.2 Spremljanje tenzije ali vlažnosti tal na različnih globinah v tleh

Raziskave, ki za vodenje namakanja hmelja temeljijo na spremljanju vode v tleh, vključujejo uporabo gravimetrične metode (Kišgeci in Vučić, 1979; Kišgeci, 1974), nevtronskih merilcev (Nakawuka, 2017), merjenje elektroprevodnosti (Watermark senzorji) (Graf in sod., 2016; Slavik in Kopecky, 1998) in TDR merilce (Naglič in sod., 2016). Vpliv treh načinov namakanja (kapljično, v brazdah, z razpršilci) na količino pridelka hmelja ni bil statistično značilen. Predvidevajo, da kapljično namakanje ni dalo boljših rezultatov zaradi omejene omočenosti tal okoli korenin hmelja, zaradi česar je ostajala cona najbolj aktivnih korenin (60 do 140 cm od korenin) nezadostno namočena (Kišgeci in Vučić, 1979). Izvedena je bila primerjava učinka različnih načinov vodenja namakanja (brez namakanja, namakanje na osnovi količine vode v zgornjih 60 cm tal, namakanje na osnovi kritičnih obdobj razvoja rastlin, namakanje na osnovi fizioloških pokazateljev) na količino in kakovost pridelka. Povečanje povprečne dnevne temperature za 1 °C je povečalo evapotranspiracijo za 1,8 m<sup>3</sup>/ha. Namakanje na osnovi kritičnih obdobj razvoja rastlin je imelo pozitiven vpliv na količino pridelka. Namakanje na osnovi vlažnosti tal je imelo pozitiven vpliv na vsebnost alfa-kislin. Namakanje na osnovi fizioloških pokazateljev je imelo negativen vpliv na kakovost pridelka (Kišgeci, 1974).

Raziskovalci so na težkih, ilovnatih tleh analizirali učinek deficitarnega namakanja na pridelok in kakovost hmelja. Vodo so v poskusu dodajali preko podzemnega kapljičnega namakanja. Dodajali so tri različne količine vode (60, 80 in 100 % ET<sub>hmelja</sub>). Rastline hmelja so se na pomanjkanje vode odzvale z zmanjšano količino pridelka. V primerjavi s 100 % namakanjem, je bil pridelok suhe snovi hmelja tekom 2 let pri 60 % količini dodane vode manjši za 30, 33, 25 in 19 % pri sortah Mt. Hood, Willamette Columbus in Chinok. 80 % namakanje je tekom dveh let zmanjšalo pridelok za 14, 10 in 3 % pri sortah Mt. Hood, Willamette in Chinok. Po drugi strani so rezultati pokazali, da učinek sušnega stresa ni imel statistično značilnega vpliva na kakovost pridelka hmelja. Čeprav zmanjšanje količine pridelka zaradi pomanjkanja vode za celoletno pridelavo ni bilo statistično značilno, je bila izguba prihodkov zaradi zmanjšane količine pridelka večja, kot so bili prihranki pri pridelovalnih stroških zaradi uporabe manj vode. Gospodarsko gledano zato deficitarno namakanje hmelja v dolini Yakima (Washington) ni priporočljivo orodje upravljanja namakanja v pridelavi hmelja (Nakawuka, 2017). Ne glede na to, da avtor navaja nevtronsko sondo kot sprejemljiv način merjenja



vode, za evropske razmere to ne velja. Uporaba tega inštrumenta je povezana z veliko administrativnih prepovedi in je brez zavarovanega prostora na prostem ne moremo uporabljati.

V poljskem poskusu, ki so ga, po navedbah Nakawuka (2013), v obdobju 1983–1986 opravili na poskusnem polju IAREC (Washington), so štiri sorte hmelja (L1, Galena, Eroica in Cascade) izpostavili sušnemu stresu, ki je znašal 25 % od maksimalnih potreb hmelja po vodi. Rastline so bile sušnemu stresu izpostavljene med tremi različnimi fenofazami, od cvetenja do obiranja. V vseh treh obravnavanjih so primerjali pridelok in kakovost storžkov in jih primerjali s kontrolo, kjer rastline niso bile izpostavljene sušnemu stresu. Rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik v pridelku in kakovosti storžkov med posameznimi obravnavanji in kontrolo pri vseh štirih sortah. Zaključili so, da so bile sorte hmelja odporne na sušni stres v vseh treh fenofazah.

Potekale so tudi raziskave na peščenih in ilovnatih tleh, kjer so primerjali količino in kakovost nenamakanega hmelja s količino in kakovostjo kapljično namakanega hmelja (po grebenu, podzemno poleg grebena in podzemno med dvema vrstama) (Graf in sod., 2016). Za namen pravičnega uravnavanja namakanja so ovrednotili dva pristopa: merjenje tenzije vode v tleh (mavčni bloki, Watermark senzorji na 30 cm globine) in beleženje vodne bilance. Spremljali so tudi neto fotosintezo, transpiracijo in učinkovitost porabe vode. Rezultati so pokazali, da je namakanje imelo vpliv na pridelok in kakovost hmelja le v najbolj sušnem letu 2015, kjer se je pri nadzemnem namakanju na površini tal po grebenu in podzemnem poleg vrste pridelok povečal za 35 %. Pri podzemnem namakanju med dvema vrstama hmelja so opazili 30 % povečanje pridelka hmelja. Vsebnost alfa-kislin se je značilno povečala v vseh treh primerih (Graf in sod., 2016).

Navajajo, da so najboljše rezultate dosegli pri izvedbi kapljičnega namakanja, kjer so cevi položene na površini tal vzdolž grebena. Navajajo, da so namakane rastline ob svetlobni saturaciji ( $1250 \mu\text{mol fotonov m}^2/\text{s}$ ) pokazale povišane vrednosti neto fotosinteze in transpiracije v 30 % primerov; večja učinkovitost porabe vode ni bila dokazana. Pri normalni svetlobni nasičenosti niso opazili nobenih razlik v transpiraciji in neto fotosintezi (Graf in sod., 2016).

Ekstrapolacija porabe vode je pokazala, da ena rastlina hmelja porabi okoli 50 litrov vode na dan. Največji celoten prekoreninjen volumen tal je bil opažen pri nenamakani rastlini in je znašal okoli  $7,4 \text{ m}^3$ . Primerjava pristopov je pokazala, da je uravnavanje namakanja z uporabo senzorjev za meritve količine vode v tleh za hmelj manj primerno zaradi velikega volumna koreninskega sistema. Za ta namen avtorji (Graf in sod., 2016) priporočajo uporabo izračunov vodne bilance z uporabo FAO faktorjev rastlin. Kapljično namakanje hmelja v zmernih zemljepisnih širinah glede na njihova navajanja ni optimalna rešitev, saj je zaradi omejene omočenosti tal zmanjšana rast korenin in zmanjšana razpoložljivost hranil (Graf in sod., 2016).

Raziskovalca, ki sta primerjala kapljično namakanje in namakanje z mikrorazpršilci (Slavik in Kopecky, 1998), navajata, da je bilo dopolnilno namakanje potrebno v vseh letih trajanja poskusa (1995-1997). Rezultati so pokazali, da je bil pridelek suhe snovi hmelja ob uporabi kapljičnega namakanja višji za 0,31 t/ha v primerjavi z nenamakanim hmeljem, učinka mikrorazpršilcev v viru ne podajajo (Slavik in Kopecky, 1998).

Sirrine in sod. (2010) v razširjenem biltenu opisujejo pridelavo hmelja na območju The Great Lakes, kjer je namakanje hmelja enako pomembno kot v večini drugih hmeljarskih območij v ZDA. Avtorji navajajo, da so uspešno uporabili računalniško upravljani sistem za kapljični namakanje hmelja, v katerem s senzorji za vlažnost tal določajo, kdaj in koliko vode je potrebno dodati, da vlažnost tal vzdržujejo na optimalnih ravneh. Čeprav več podrobnosti o načinu merjenja količine vode v tleh ne podajo, zagovarjajo, da je prednost sistema vodenja namakanja na podlagi spremljanja gibanja vode v tleh v nižjih stroških obratovanja namakalnega sistema, ki se vklopi samo, kadar je vsebnost vode v tleh nizka.

### 3.3 Meritve stresa rastline

Odziv hmelja na sušo je zelo kompleksen (Kolenc in sod., 2014). Liste z vodo oskrbuje steblo, ki je lahko v dolžino meri tudi 12 m in je hkrati zelo ozko (do 10 mm). Večino vode dobijo rastline preko ksilema. Ta je sestavljen iz daljših trahej (do 1,2 m) s premerom do 300  $\mu\text{m}$  in tako zagotavljajo večjo hidravlično prevodnost (Jupa in sod., 2013; Jupa in sod., 2016). Veliko razmerje med prevodno površino stebela ter listno površino, skupaj s hidravlično prevodnostjo, prispeva k hitrejšemu ksilemskemu toku ter normalni oskrbi rastlin z vodo v njenih višjih delih (Andrade in sod., 2005). Suša povzroči anatomske spremembe v strukturi ali delovanju ksilema, saj pride do poškodb trahej, kar omeji preskrbo z vodo v zgornjem delu rastline hmelja. Ugotovili so, da se specifična prevodnost listov (razmerje med hidravlično prevodnostjo in listno površino) v sušnih razmerah zmanjša. Število nodijev pri hmelju, izpostavljenemu sušnemu stresu, se ne spremeni, vendar pa predvidevajo, da nodiji v zgornjih delih rastline pomagajo pri vzdrževanju neprekinjenega vodnega transporta pri tistih trahejah, ki so prizadete zaradi nastalih embolij (Jupa in sod., 2016).

Raziskave so pokazale, da med tremi češkimi sortami hmelja ni bilo večjih razlik v hidravličnih lastnostih ksilema. Glede na to sklepajo, da so v sušnih razmerah te sorte podobno izpostavljene težavam, ki nastanejo zaradi prekinitve transporta vode, kar je posledica nastalih embolij (Gloser in sod. (2011). Ugotovljene strukturne ter anatomske lastnosti hmelja, ki omejujejo transport vode med pomanjkanjem vode, se odražajo na zmanjšanem vodnem potencialu listov hmelja. Zaradi velikih hodov vodnega potenciala v dnevnem ciklu so hmelj označili kot anisohidro rastlino, t.j. rastlino, ki nima majhno kontrole nad vodnim potencialom in dopušča njegova velika nihanja (Kolenc in sod., 2014). Rezultati so pokazali, da

rastline zaradi zmanjševanja razpoložljive vode v tleh zmanjšajo stopnje transpiracije in vodnega potenciala poganjkov. Različne sorte hmelja se bistveno razlikujejo v nekaterih značilnostih, kot sta stopnja potencialne transpiracije in potencial vode v listih (Gloser in sod., 2013). Na odziv listnih rež pri hmelju imajo velik vpliv hidravlični ter kemični signali iz korenin ob zaznanem pomanjkanju vode. Med hidravlične signale prištevamo spremembe vodnega potenciala, med kemične pa abscizinsko kislino (ABA), spremembe pH ksilemske tekočine (ki se ob sušnem stresu poveča), spremembe v koncentraciji ionov mineralnih hranil (sulfat, nitrat), organskih kislin (malat, citrat), proteinov ter sladkorjev v ksilemski tekočini. Ugotovljeno je bilo, da se pri hmelju ob sušnem stresu transpiracija zmanjša skladno s povečevanjem pH ksilemske tekočine, kar je posledica zmanjšanja nitrata in fosfata. K povečanju pH ksilema prav tako vpliva tudi koncentracija malata, medtem ko povečana koncentracija sulfata kaže vpliv na delovanje ABA. Istočasno se namreč poveča tudi koncentracija ABA v listih, kar prispeva k zapiranju listnih rež ter zmanjšanju transpiracije (Korovetska in sod., 2014). Pomembno je delovanje ABA v odzivu hmelja na pomanjkanje vode v tleh. Vsi metaboliti, vključeni v delovanje ABA v listih ter ksilemskem soku (razen ABA glukozil estra v listih) so bili povečani ob sušnem stresu (med prevladujočimi sta bila fazeična kislina (ang. phaseic acid) ter dihidrofazeična kislina). Po drugi strani se je koncentracija ABA glukozil estra zmanjšala v primerjavi s povečano koncentracijo ABA. Zmanjšala pa se je tudi koncentracija jasmonatov, medtem ko povečane koncentracije hormona avksina nakazujejo njegovo vključenost v odgovor hmelja na sušni stres (Korovetska in sod., 2016).

Nekatere oblike namakanja imajo termoregulatorni vpliv na mikroklimo v nasadu. Temperatura znotraj nasada hmelja se je ob uporabi kapljično namakanje na vrhu hmeljske žičnice znižala za 4 °C (Kopecky in Slavik, 1997), ob uporabi mikrorazpršilcev za 5 °C (Slavik, 2000). Poskusi s kapljičnim namakanjem so pokazali značilen odziv hmelja na kapljično namakanje saj so bili grebeni namakanih rastlin manjši, drobne rosne korenine pa bližje koreniki kot pri nenamakanih rastlinah (Neve, 1991).

Raziskave, ki bazirajo na vodenju namakanja hmelja na podlagi stresnih kazalnikov, vključujejo merjenje osmotskega potenciala (Sasin, 1990), spremljanje fizioloških pokazateljev (koncentracija celičnega soka v listih hmelja) (Kišgeci, 1974), merjenje stopnje izmenjave plinov (Hniličkova in sod., 2009). Namakanje na osnovi fizioloških pokazateljev ima lahko negativen vpliv na kakovost pridelka (Kišgeci, 1974). Spremljanje osmotskega potenciala v primerjavi z uporabo meteorološkega pristopa daje boljše rezultate glede na potrebo in čas namakanja. Na vsebnost alfa-kislin pomembno vplivajo vremenske razmere v letu pridelave, ne pa način vodenja namakanja (Sasin, 1990). Opravljene so bile raziskave o vplivu vodnega deficita na stopnjo izmenjave plinov pri mladih rastlinah sorte Osvalduv klon 72 (Hniličkova in sod., 2009). Prvo skupino rastlin so namakali do polnega

nasičenja tal, druga skupina rastlin pa je bila izpostavljena sušnemu stresu. Rastline so bile izpostavljene stresu tako, da je bilo namakanje omejeno na 35 % poljske kapacitete in se je izvajalo tako, da 9 dni namakanja ni bilo, nato je sledila sedem dnevna rehidracija. Meritve so potekale v razvojnih fazah od BBCH 12 (razvit drugi par listov) do BBCH 25 (razvit peti par stranskih poganjkov). Potem, ko je namakanje bilo prekinjeno, so v rastlinah opazili zmanjšanje listne prevodnosti, transpiracije in fotosinteze. Na koncu poskusa je stopnja fotosinteze dosegla 55,64 % stopnje pred stresom. Listna prevodnost in transpiracija sta dosegli 49,54 % in 38 % stopnje pred stresom. Rezultati nakazujejo, da je merjenje stopnje izmenjave plinov lahko uporaben parameter pri ugotavljanju sušnega stresa rastlin (Hniličkova in sod., 2009).

### 3.4 Simulacijski modeli

Pri vodenju namakanj hmelja so se kot uporabni izkazali tudi simulacijski modeli. Tiso lahko v pomoč pri določitvi natančnejših kc rastline in povezavah med transpiracijo ter količino in kakovostjo pridelka (Fandino in sod., 2015), in simulacijah podnebnih sprememb na potencialno evapotranspiracijo in vsebnost alfa-kislin v hmelju (Barek in sod., 2009; Mozny in sod., 2009). Raziskovalci so na osnovi triletne raziskave (2012-2014), katere namen je bil umeriti in preveriti vodnobilančni model tal SIMDualKc za hmelj sorte Nugget, med drugim predlagali faktorje rastlin (kc) za tri rastna obdobja (začetek sezone, sredino sezone in konec sezone), in sicer 0,69, 1,02 oziroma 0,85. Ugotovili so, da je transpiracija hmelja predstavljala 92 % dejanske evapotranspiracije na sredini sezone rasti hmelja. Ocenili so vpliv rabe vode in transpiracije hmelja na količino in kakovost pridelka hmelja. Ugotovljen je bil pozitiven vpliv transpiracije hmelja na pridelek storžkov (koeficient determinacije  $r^2 = 0,92$ ) in koncentracijo alfa in beta-kislin (Fandino in sod., 2015). S pomočjo programa DAISY je bilo ocenjeno, da se bo do leta 2075, upoštevaje podnebna scenarija GISS<sub>prep</sub> in CCCM, potencialna evapotranspiracija hmelja na jugu Slovaške povišala za 34 % (Barek in sod., 2009). Hmelj se kaže kot posebej ranljiv na podnebne spremembe, saj je bilo z modelom CORAC ocenjeno, da se bo na Slovaškem, na sorti Saaz, do leta 2100 pridelek, ob nespremenjeni praksi namakanja, znižal za od 7 do 10 %, vsebnost alfa-kislin pa za od 13 do 32 % (Mozny in sod., 2009).

## 4 RAZPRAVA IN SKLEPI

Znani so torej številni načini vodenja namakanja hmelja, ki so različno zahtevni in po učinku neizenačeni. Nekateri pristop so bolj primerni za raziskave, medtem ko so drugi primerni tudi za podporo odločanja o namakanju na ravni namakalnega sistema ali kmetije.

#### 4.1 Spremljanje evapotranspiracije in vodne bilance

Številni avtorji so delovali na področju določanja potreb hmelja po vodi (Middleton, 1963; Kišgeci, 1974; Kopecky, 1987 (cit. po Majer, 2000); Sasin, 1990; Allen in sod., 1998; Fric in sod., 1999; Kopecky in Ježek, 2007; Naglič in sod., 2016). Izpeljani postopki določitve postopka izračuna parametrov namakanja in obroka namakanja so razmeroma enostavni, a ga kmetje v praksi ne uporabljajo. Slabosti tega pristopa so napake pri vrednosti kc rastline, referenčne evapotranspiracije, oceni lastnosti tal (lokalne specifičnosti glede na splošne lastnosti tal na nekem območju) in trenutni vsebnosti vode v tleh. To lahko vpliva na določitev premajhnega ali prevelikega namakalnega obroka, ki pa nam ne omogoča varčevanja z vodo in lahko pomeni, da dodajamo premalo ali preveč vode (Gu in sod., 2017). Čeprav imamo kc vrednosti relativno določene in imamo razmeroma dobre podatke o referenčni ET, pa predvsem za kapljično namakanje nimamo jasno določene najboljše metode določitve, koliko segajo rastline hmelja v medvrstno razdaljo in kako pri tem upoštevati »V« obliko nasada oz. projekcijo krošnje. Zato nimamo optimalno določene kapacitete namakanja oz. kapacitete kapljačev, ki je eden izmed potrebnih parametrov namakanja za določitev obroka namakanja. Prav tako je splošno priporočilo, da kapljičnega namakanja ne smemo izvajati brez spremljanja gibanja vode v tleh (Knapič, 2002). Ta pristop k vodenju namakanja lahko razumemo kot pristop, ki nam veliko pove o minimalnih in maksimalnih potrebah po vodi, na podlagi preteklih vremenskih razmer, saj lahko le tako preverjamo pravilnost ocene evapotranspiracije. Za vodenje namakanja v realnem času je potrebno kombinirati z ostalimi pristopi.

#### 4.2 Spremljanje tenzije ali vlažnosti tal na različnih globinah v tleh

Nekaj avtorjev navaja uporabo spremljanja vode v tleh (Kišgeci, 1974; Kišgeci in Vučić, 1979; Slavik in Kopecky, 1998; Graf in sod., 2016; Naglič in sod., 2016; Nakawuka, 2017). V splošnem so prednosti ostalih metod pred gravimetrično v časovno bolj natančnem spremljanju gibanja vode v tleh, a moramo za pravilno interpretacijo meritev določiti mejne vrednosti gibanja vode v tleh za rastlinsko vrsto v obravnavi. Za to so potrebne dodatne analize na terenu in dobro poznavanje heterogenosti tal. Spremljanje vodne bilance in spremljanje gibanja vode v tleh se osredotočata na količino razpoložljive vode v tleh, kar ni neposredno povezano s sušnim stresom rastline. Če so potrebe rastlin po vodi nizke zaradi visoke vlažnosti in nizke temperature zraka, rastlina najverjetneje ne bo trpela sušnega stresa, četudi je količina vode v tleh nizka (Gu in sod., 2017).

#### 4.3 Meritve stresa rastline

Poznavanje osnovnih procesov, ki nadzorujejo učinkovitost rabe vode na nivoju rastlin hmelja kot odziva hmelja na pomanjkanje vode v tleh, je nujno za uspešno izvajanje namakanja. Toda, za izvajanje namakanja so te metode relativno

neraziskane. Raziskave s področja fizioloških odzivov hmelja na sušo nakazujejo, da obstajajo povezave med vodnim potencialom hmelja in sušo, vendar se vse sorte hmelja ne odzivajo enako. Nekateri rezultati tudi nakazujejo, da je merjenje stopnje izmenjave plinov prav tako uporaben parameter pri ugotavljanju sušnega stresa rastlin. Sklepamo lahko, da manjkajo bolj široko zastavljene raziskave, ki bi preučevale več fizioloških parametrov naenkrat in na več kultivarjih hmelja. Le v tem primeru bi lažje videli povezave med posameznimi parametri in rastlino ter jih tako povezali z napovedjo namakanja (Kolenc in sod., 2014).

#### 4.4 Simulacijski modeli

Novejše publikacije s področja vodenja namakanja hmelja se nanašajo na uporabo simulacijskih modelov, ki so se izkazali kot uporabni za določitev natančnejših kc rastline, napovedovanje količine in kakovosti pridelka (Fandino in sod., 2015) in simulacije vplivov podnebnih sprememb na količino in kakovost pridelka hmelja (Barek in sod., 2009; Mozny in sod., 2009). Vsi uporabljeni simulacijski modeli (SIMDualKc, DAISY in CORAC) so bolj uporabni na raziskovalni ravni kot praktični pripomoček pri vodenju namakanja. Njihova prednost je v tem, da lahko delamo številne ponovitve izračunov potreb po vodi in odziva na sušo in spreminjamo vhodne podatke. Tako dobivamo podlage za strateško odločanje o potrebah rastlin po vodi in zagotavljanju vodnih virov za namakanje, ne samo za raven vodnega telesa, ampak tudi na ravni kmetije (Naglič in sod., 2016). Pri nas trenutno še ne beležimo uporabe nobenega od naštetih modelov, čeprav bi bila njihova uporaba smiselna, še zlasti v luči podnebnih sprememb.

**Zahvala.** Pripravo prispevka sta finančno podprli Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije in Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije v okviru ciljnega raziskovalnega projekta Natančnost napovedovanja namakanja (TriN, V4–1609).

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Allen R.G., Pereira L.S., Raes D., Smith M. Crop Evapotranspiration. Guidelines for Computing Crop Water Requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper 56, FAO, Rome, Italy; 1998.
- Andrade J. L., Meinzer F. C., Goldstein G., Schnitzer S. A. Water uptake and transport in lianas and co-occurring trees of a seasonally dry tropical forest. *Trees*. 2005; 19(3): 282-289.
- Bárek V., Halaj P., Igaz D. The influence of climate change on waterdemands for irrigation of special plants and vegetables in Slovakia. In: Strelcová, K. (Ed.), *Bioclimatology and Natural Hazards*. Springer, Netherlands, 2009: 271–282.
- Blanco M., Ramos F., Van Doorslaer B., Martínez P., Fumagalli D., Ceglar A., Fernández F. J. Climate change impacts on EU agriculture: A regionalized perspective taking into account market-driven adjustments. *Agricultural Systems*. 2017; 156: 52-66.

- Brooks S. N., Horner, C. E. Hop Production. U.S.D.A. Agric. Information Bulletin No. 240; 1961: 20-22.
- Delahunty K., Johnston J., Westfield M.E. An Experiment on the Effectiveness of Irrigation and Cover Cropping to Produce Sustainable Hops in Maine. USDA Northeast SARE Final Report: FNE11-711; 2011.
- Dodds K. Hops a guide for new growers. First edition, NSW department of Primary Industries. 2017.
- Evans R. Hop management in water-short periods. EM4816, Drought Advisory; 2003.
- Evans R.G.. Irrigation of hop. In Hop production in the Yakima Valley, Washington State University; 1985: 8-10.
- Fandino M., Olmedo J.L., Martínez E.M., Valladares J., Paredes P., Rey B.J., Mota M., Cancela J.J., Pereira L.S. Assessing and modelling water use and the partition of evapotranspiration of irrigated hop (*Humulus Lupulus*), and relations of transpiration with hops yield and alpha-acids. Ind. Crop Prod. 2015; 77: 204-217.
- Filippov L. A Simplified Soil Moisture Method for the Determination of Irrigational Terms. Naučine soobšenih i metodičeskie rabotni; 1958: 99-102.
- Fric V., Koren J., Kopecky J. Influence of trickle irrigation on yield stability and quality of hops in Zatec hop region in Czech Republic. International symposium New procedures in hop growing, 17. and 18. May in 1999 at Hopfenforschungsinstitut Hull, Proceedings; 1999: 63-65.
- Giannakis E., Bruggeman A., Djuma H., Jerzy K., Hammer J. Water pricing and irrigation across Europe: Opportunities and constraints for adopting irrigation scheduling decision support systems. Water Science and Technology: Water Supply. 2016; 16: 245-252.
- Gloser V., Baláž M., Jupa R., Korovetska H., Svoboda P. The response of *Humulus lupulus* to drought: the contribution of structural and functional plant traits. In: III International Humulus Symposium. Acta Hort. 2013; 1010: 149-154.
- Gloser V., Baláž M., Svoboda P. Analysis of anatomical and functional traits of xylem in *Humulus lupulus* L. stems. Plant, Soil and Environment. 2011; 57: 38-343.
- Graf T. Tröpfchenbewässerung im Hopfenbau - Feldversuche, Physiologie und Rhizosphäre, (Drip irrigation in hop production - field trials, physiology and rhizosphere), Doctoral dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan. 2016
- Graf T., Beck M., Mauermeier M., Ismann D., Portner J., Doleschel P., Schmidhalter U. *Humulus lupulus* – The Hidden Half. Brewing Science. 2014; 67: 161-166.
- Gu Z., Qi Z., Ma L., Gui D., Xu J., Fang Q., Yuan S., Feng G. Development of an irrigation scheduling software based on model predicted crop water stress. Computers and Electronics in Agriculture. 2017; 143: 208-221.
- Hniličková H., Hnilička, F., Svoboda P., Koren J. The impact of water deficit on selected physiological characteristics of juvenile hop plants (*Humulus lupulus* L.). Cereal Res. Commun. 2009; 37: 301-304.
- Jupa R., Baláž M., Svoboda P., Gloser V. Inherit variability in structural and functional traits of xylem among three hop varieties. Plant Soil Environ. 2013; 59: 273-279.
- Jupa R., Plavcova L., Flamiková B., Gloser, V. Effects of limited water availability on xylem transport in liana *Humulus lupulus* L. Environmental and Experimental Botany. 2016; 130: 22-32.
- Kišgeci J. Vodni režim biljaka hmelja u različitim uslovima navodnjavanja i mineralne ishrane. Doktorska disertacija, Novi Sad; 1974.

- Kišgeci J., Mijavec A., Adimovid M., Spevak P., Vučić, N., Hmeljarstvo, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad; 1984.
- Kišgeci J., Vučić N. Reduced tillage in combination with herbicide treatments in conditions of application of different irrigation methods. , The 8th Conference of the International Soil Tillage Research Organization, ISTRO, Bundesrepublik Deutschland, 1979: 217-221.
- Knapič M. Namakanje hmeljskih nasadov. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ed). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo, Žalec, 2002, str. 169-179
- Kolenc Z., Čerenak A., Vodnik D. Kako hmelj (*Humulus lupulus* L.) uravnava vodno bilanco in se odziva na sušo? = How does hop (*Humulus lupulus* L.) regulate its water balance and respond to drought?. Hmeljarski bilten. 2014; 21: 5-13.
- Kopecky J. Current methods of management of hop irrigation. Chmelarstvi. 1987; 60(6): 84-85.
- Kopecký J., Ježek J. Influence of weather conditions and irrigation on yield and quality of hops. Proceedings of the Scientific Commission of IHGC (International Hop Growers Convention). 2007.
- Kopecky J., Slavik L. Influence of trickle irrigation on the yield stability and quality of hops in Zatec hop region. Rostlinna Vyroba. 1997; 43(7): 337-341.
- Kopecky J., Slavik L., Ježek P. Production efficiency of trickle irrigation of hop, Rostlinna vyroba. 1998; 44(7): 299-303.
- Korovetska H., Novak O., Juza O., Gloser V. Signalling mechanisms involved in the response of two varieties of *Humulus lupulus* L. to soil drying: I. changes in xylem sap pH and the concentrations of abscisic acid and anions. Plant Soil. 2014; 380: 375-387.
- Korovetska H., Novak O., Turečkova V., Hajičkova M., Gloser V. Signalling mechanisms involved in the response of two varieties of *Humulus lupulus* L. to soil drying: II. changes in the concentration of abscisic acid catabolites and stress-induced phytohormones. Plant Growth Regul. 2016; 78(1): 13-20.
- Middleton J.E. Irrigation needs of hops. Washington Agricultural Experiment Stations, Institute of Agricultural Sciences, Washington State University, Stations Circular 417. 1963.
- Mozny M., Tolasz R., Nekovar J., Sparks T., Trnka M., Zalud Z. The impact of climate change on the yield and quality of Saaz hops in the Czech Republic. Agric. Forest Meteorol. 2009; 149: 913-919.
- Naglič B., Cvejič R., Pintar M. Pregled objav s področja namakanja hmelja (*Humulus lupulus* L.) na porečju Savinje = Irrigation of hop (*Humulus lupulus* L.) in Savinja catchment: a review. Hmeljarski bilten. 2016; 23: 41-55.
- Nakawuka P. Effect of Deficit Irrigation on Yield, Quality and Grower Returns of Native Spearmint and Hops in Washington State. Doctoral Dissertation. Washington State University. 2013.
- Nakawuka P., Peters T., Kenny S., Walsh D. Effect of deficit irrigation on yield quantity and quality, water productivity and economic returns of four cultivars of hops in the Yakima Valley. Washington State. Industrial Crops and Products. 2017; 98: 82-92.
- Neve R. Hops. London, Chapman and Hall; 1991: 62-64
- Pearce H. R. The Hop Industry in Australia. Melbourne Univ. Press, Carlton, Victoria. 1976.
- Rybacek V. Hop production. Developments in Crop Science Volume 16, Elsevier, Amsterdam, New York; 1991: 211-219.



- Sasin A. Evaluation and determination of irrigation requirements in the Piestany production region. *Chmelarstvi*. 1990; 63(5): 72-73.
- Sasin A. The effect of weather on hop yield. *Rostlinna Vyroba*. 1991; 37(11): 919-924.
- Sirrine J. R., Rothwell N., Lizotte E., Goldy R., Marquie S., Brown-Rytlewski D. E. Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region. Michigan State University Extension. Bul. E-3083. 2010.
- Slavik L, Utilization of trickle irrigation and microsprinkling of hop irrigation. *Rostlinna vyroba*. 2000; 46(10): 457-463.
- Slavik L., Kopecky J. Efficacy of hop irrigation under year with different precipitation levels. *Chmelarstvi*. 1997; 70: 44-46.
- Slavik L., Kopecky J. Influence of economical irrigation on the yield and quality of hops, *Rostlinna vyroba*. 1998; 44(7): 293-297.
- Slavik L., Kopecky J. The effect of trickle irrigation on the hop yield. *Rostlinna vyroba*. 1994; 40(1): 13-18.
- Svoboda P., Hniličková H., Hnilička F. Changes in yield and quality of hop depending on the irrigation. *Cereal Res. Commun*. 2008; 36: 891-894.
- Thomas G.G., Farrar R.F. Field Experimentation Section. Rep. Dept. *Hop Res.*, Wye Coll; 1975.
- Thompson F.C., The influence of various factors on the a-acid content of hop cones. University of London, Wye College, Department of Hop Research, Annual Report. 1967: 38-39.
- Wample R. L., Farar S. C. Yield and quality of furrow and t (*Humulus lupulus* L.) in Washington State. *Agricultural Water Management*. 1983; 7(4): 457-470.
- Williams H., Brown J.F. Hop irrigation. Progress report. University of London, Wye College, Department of Hop Research, Annual Report. 1959: 70-81.
- Zattler F., Maier J., Uber den Einfluss kiinstlicher Bodenbewasserung auf Ertrag und Qualitat des Hopfens. *Hopfen-Rundschau*. 1968; 6: 2-7.
- Zepp G, Smith S, Harwood J. Hops: an economic assessment of the feasibility of providing multiple-peril crop insurance - Prepared by the Economic Research Service, USDA, for the Consolidated Farm Service Agency, Office of Risk Management; 1995.
- Zimmermann C. E. English and foreign publications on hops. U.S. Dept. of Agriculture, Science and Education Administration, Washington, DC. 1981.

## HOP SURVEY OF SLOVENE BREWERIES

Martin PAVLOVIČ<sup>10</sup> and Mallorie KING<sup>11</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 7. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 1. 12. 2017

### Abstract

This hop survey was performed to strengthen communication between Slovene brewers and hop growers within Slovenia and worldwide. Amongst the test group (17 of 62 breweries in operation throughout 2016), 49 different varieties of hops were used. The number of hops used by each brewery ranged from one variety (Savinjski Golding) to 27 varieties. Brewery hopping rates ranged from 0.25 kg/hl to 2.71 kg/hl. Of 17 breweries, six cited shortfalls for specific varieties in 2016, all of which were imports. Only two breweries cited hop surpluses for 2016 and both were able to include those surpluses into 2017 production. The findings of this survey seek to incorporate and advance the past analyses of Slovene craft breweries.

**Key words:** hop use, hop balance, craft breweries, questionnaire survey, Slovenia

## ANALIZA UPORABE HMELJA V SLOVENSКИH PIVOVARNAH

### Izveleček

Raziskava o uporabi hmelja je namenjena krepitvi poslovnega sodelovanja med pivovarji in hmeljarji - v Sloveniji in globalno. Vzorec analize je obsegal konec leta 2016 17 od 62 aktivnih malih pivovarn, ki so uporabljale 49 različnih sort hmelja. Razpon uporabe števila sort hmelja v pivovarnah sega od 1 sorte (Savinjski Golding) do skupno 27 sort. Količina uporabljenega hmelja je znašala od 0,25 kg/hl do 2,71 kg/hl. 6 od 17 pivovarn je v 2016 uvozilo manjkajoče sorte hmelja. Le dve pivovarni sta poročali o presežkih hmelja, ki pa sta jih vključili v proizvodnjo 2017. Rezultati raziskave dopolnjujejo pretekla spoznanja sektorske analize malih pivovarn.

**Ključne besede:** uporaba hmelja, bilanca hmelja, male pivovarne, anketna raziskava, Slovenija

---

<sup>10</sup> Prof. dr., Slovenian Institute of Hop Research and Brewing, Žalec, Slovenia and University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Sciences, Hoče, Slovenia, e-mail: martin.pavlovic@ihps.si

<sup>11</sup> J. William Fulbright U.S. Student Program, 2016 - 2017, e-mail: mallorie.a.king@gmail.com

## 1 INTRODUCTION

Slovenia accounts for a sizeable and unique contribution to the global hop industry, with total acreage representing 3% of the world's supply. From 2002 to 2012, Slovenia's acreage decreased 36%. Since 2014, however, the total cultivated area has increased due to global brewing industry demands. In 2016, Slovenia's hop industry was comprised of 112 farms growing a total of 1,484 ha (3,667.04 ac) of hops. Slovenia's traditional hops are largely aroma varieties (IHPS, 2017). Alpha varieties and new aroma, "flavor" varieties are being grown to a lesser extent, though flavor variety acreage is rising incrementally while alpha is decreasing (IHGC, 2017). Historically, Slovenia's industry is reliant on global demand, as about 95% of the harvested hops are exported, predominantly to EU countries (80%). Furthermore, Slovenia is also experiencing rapid growth within the brewing sector. According to the Association of Slovene Breweries, there were 62 breweries producing in the country by the end of 2016 (Združenje Pivovarn Slovenije, 2017). This is an 11.29% increase from 55 breweries in 2015 and, as of October 2017, there are already about 90 breweries, which indicates a 63.64% increase in number of breweries over just two years time (Brewers of Europe, 2016; PivoMan, 2017). This does not include the unknown number of unregistered breweries.

The objective of this survey is to strengthen communication between Slovene brewers and hop growers, both within Slovenia and worldwide (Pavlovič, 2014). Historically, hop sourcing was standardized based on the general uniformity of hop market offering (ie. varieties, annual production, etc.) and brewery type (ie. size, dosage standards, class of brewery, etc.). As the market shifts towards an increasingly diverse brewing industry, hop growers must understand and negotiate the sourcing practices needed to meet transitioning demands.

The first version of this survey was issued by the Brewers Association of USA (BA) in 2008, following hop shortages in 2007 - 2008. As the not for profit trade group dedicated to supporting American craft brewers, their intent was to encourage member breweries to develop stronger relationships with their hop merchants and hop growers. Survey findings are presented to suppliers at Hop Growers of America's annual American Hop Convention. Over the course of the survey's nine years, the BA has tracked significant changes in U.S. craft brewer usage, leading to hop production changes at unprecedented rates. "In 2010, U.S. aroma hop acreage stood at 3,278 ha (8,100 ac), or around 26% of the total 12,662 ha (31,289 ac), with alpha acres accounting for the majority. The aroma hop acreage in 2016 was five times higher than it was in 2010 with aroma acres – all 40,000+ accounting for roughly 80% of all-time high total U.S. acres under trellis - 20,639 ha (51,000 ac) (Brewers Association, 2016). These changes are in response to the aroma hop needs of craft brewers and can largely be accredited to efforts like

those of the BA to facilitate communication between suppliers and brewers, as well as the increasing rate of brewers engaging in forward hop contracting.

Additionally, the findings of this survey seek to incorporate and advance the analyses of Slovene breweries initiated in 2016, outlined within Marketing Analysis of Small Breweries in Slovenia (Pavlovič and Budna, 2016). This study confirmed an increased demand for various types of beer in Slovenia, their supply growth and additional possibilities of employment in agribusiness, catering industry and tourism". The collected data, however, only included details about malt and yeast use. Given the study's conclusion that there was an increased demand for different styles of beer (ie. greater diversity of hop use) and that the analyzed microbreweries...increased their own production by 50% in the period from 2011 to 2015, further analysis of Slovene breweries' hop use was needed.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

As many aspects of BA's original hop use survey were preserved in this version as possible in order to provide better cross comparative analysis. Changes were only made to improve the survey's relevance to the Slovene brewing industry.

### **2.1 Survey Participants, Questions and Procedures**

Participating breweries were required to produce in Slovenia and start brewery operations on or before January 1, 2016 in order to effectively document hop use for the entire 2016 production year. There are multiple existing naming conventions for Slovene breweries, including the terms boutique breweries (butične pivovarne), micro breweries (mikropivovarne), restaurant breweries (gostilniške pivovarne), amateur breweries (ljubiteljske pivovarne), macro breweries (makropivovarne), and contract breweries (nomadske pivovarne); however, these conventions differ from source to source and aren't tied to formal definitions that take specific aspects of the business (ie. ownership, production size, ingredient use, etc.) into consideration (Colarič and Mišmaš, 2017; PivoMan, 2017). Instead, 17 of 62 breweries in this study are analyzed by their production volume, years in operation, and/or styles of beers produced.

Breweries were asked to answer questions regarding all hops, by variety, used during the 2016 production year. This also included information about sourcing, contracting and alternative hop formats, such as CO<sub>2</sub> extract and aroma oils.

The survey was carried out by a combination of in-person interviews and electronic submissions using the online survey tool Typeform. Follow-up to clarify entries was done by email. Results were analyzed and presented using Apple Numbers, Google Sheets, and Tableau Public.

## 2.2 Estimating Procedures

Several methods were used to estimate submitted survey data to provide more accurate findings. First, all hop products used were converted to their nearest pelletized T-90 hop equivalent, in kilograms. This was done using the hop shortages cited by each participating brewery (see 3.4). These weights were then added to the overall weights and counts for each variety. Second, one brewery began production in January 2017, rather than 2016. This brewery's hop use was estimated for the remainder of 2017 and substituted for 2016. Lastly, in a few categories of analyses, data for Pivovarna Laško Union (Heineken International) was excluded as the variance in their production size and, therefore, volume of hop use made it an outlier from the other 16 breweries. Exclusion of this data is noted when relevant.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Hop Varieties Used

Amongst the test group, 49 different varieties of hops were used, with 67.35% of those consisting of imports. For the purposes of this study, a single hop variety coming from two different origins is considered two unique varieties (ie. Cascade grown in the United States is categorized differently than Cascade grown in Slovenia). Parentheses indicating hop origin were included in the survey, as well as in this analysis.

Due to the large variation in production size and, therefore, hop use of the breweries included in this survey, aggregated brewer hop use was evaluated by numerical count (frequency of use), as well as volume (kilograms of hops used). The top 10 most frequently used varieties were Aurora (SI), Amarillo (US), Citra (US), Cascade (US), Chinook (US), Simcoe (US), Savinjski Golding (SI), Mosaic (US), CTZ (US), Styrian Gold (SI). Of these 10 varieties, seven were also listed in the top 10 most used varieties by American craft brewers (Table 1) (Brewers Association, 2016).

Including macro brewers usage, the five varieties used in the highest quantities (kg) were Aurora (SI), Celeia (SI), Savinjski Golding (SI), Citra (US), Cascade (US) and, excluding macro usage, Aurora (SI), Cascade (US), Simcoe (US), Galaxy (AUS), and Amarillo (US). Chinook (US) and Citra (US) were very close behind Amarillo (US). All of the varieties used in the highest quantities were dual-purpose or aroma hops.

The discrepancy between frequency of use and quantity used is due to the fact that the majority of surveyed breweries were using imported hops, even if in small

doses. As in the United States, aroma hops have become increasingly popular globally. All but two of the 17 surveyed brewers used imported aroma hops in 2016. Potential reasons that these imported aroma varieties are being used often and by many Slovene brewers, albeit sometimes in very small quantities, are: production capacity and/or demand, present or perceived issues with availability, high prices, usage being relegated to one-time beers, higher availability of beer recipes using imported hop varieties, or any combination of these reasons. Another possible factor was the limited availability of domestic hop varieties meeting the desired characteristics of new Slovenian brewers (see below).

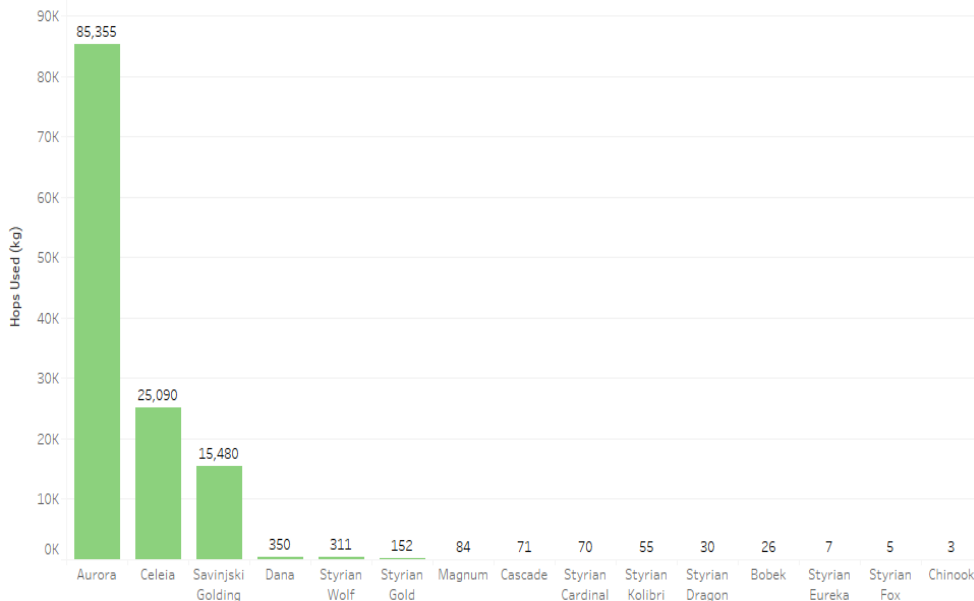
**Table 1:** *Most frequently used hop varieties in Slovenia as compared to U.S. craft brewers in 2016 beer production.*

Slovenia	U.S.
1. Aurora (SLO)	1. Cascade (US)
2. Amarillo (US)	2. Centennial (US)
3. Citra (US)	3. Chinook (US)
4. Cascade (US)	4. Simcoe (US)
5. Chinook (US)	5. Citra (US)
6. Simcoe (US)	6. Amarillo (US)
7. Savinjski Golding (SLO)	7. Mosaic (US)
8. Mosaic (US)	8. Crystal (US)
9. CTZ (US)	9. Hallertauer Mittelfrüh (GR)
10. Styrian Gold (SLO)	10. CTZ (US)

The five most used Slovene varieties were Aurora (11 of 17 breweries), Savinjski Golding (8 of 17), Styrian Gold (5 of 17), Bobek (5 of 17), and Celeia (4 of 17), whereas the least used by Slovene brewers were Styrian Eagle (0 of 17), Styrian Fox (1 of 17), Styrian Eureka (2 of 17), Styrian Kolibri (2 of 17), and Styrian Dragon (3 of 17). The most used Slovene varieties by weight were Aurora, Celeia, and Savinjski Golding (Figure 1). When brewers used aroma hop varieties, they were typically imports rather than new Slovenian “flavor hop” breeding lines. These breeding lines were developed to meet the perceived demands of craft brewers. Amongst these new breeding lines, the variety used most by all brewers, as well as the hop used in the highest quantities, was Styrian Wolf (311 kg).

Important to note is that the supply of these new breeding lines was limited in 2016, as various new lines were first introduced to Slovenian growers in 2015 (IHPS, 2015). All certified trial varieties harvested in 2015 combined, including Styrian Wolf, Styrian Cardinal, Styrian Eagle, Styrian Fox, Styrian Dragon, and Styrian Kolibri, amounted to 12,322.87 kg (27,167.28 lbs). In 2016, 18,902.73 kg (41,673.39 lbs) of Styrian Wolf alone was harvested. These higher yields would only have been available to brewers in the latter half of 2016 (September through

December), if at all. From 2015 to 2017, hops from these varieties or rather new breeding lines were predominantly sold outside of Slovenia in Europe and the United States.



**Figure 1:** Varieties and quantities (kg) of domestic hops used by Slovene craft brewers involved in research, in 2016

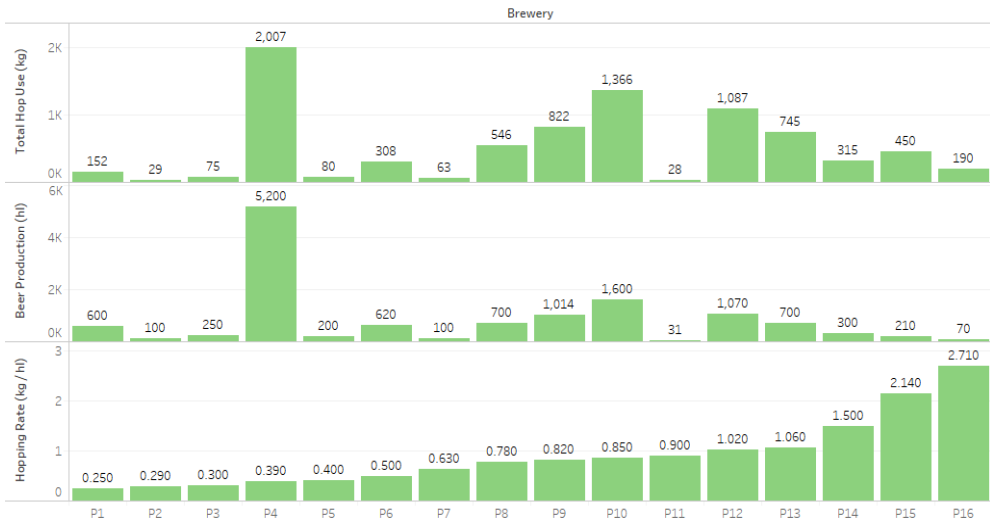
There were some notable hop use differences between breweries. Largely, the longer a brewery had been in production, the more domestic hops they used in 2016. Younger breweries (ie.  $\leq 10$  years), tend to use more imported varieties of hops, particularly those referred to as “New World” (US) or “Oceania” (NZ, AUS) hops. Breweries older than 10 years predominantly used domestic varieties. Notable exceptions were breweries that used small quantities of imported varieties in 2016, with plans to increase use of these varieties in 2017. The beers produced with these varieties were typically test brews, specialty beers, or seasonal batches. The exception was Aurora, which was used in varying quantities by all but five breweries.

### 3.2 Hop Dosing Rates

The number of hops used by each brewery ranged from one variety (Savinjski Golding) to 27 varieties. Breweries largely used either whole cone or pelletized hops, with a few also using either CO<sub>2</sub> extract or aroma oils (see 3.4). The breweries regularly using dried, whole cone hops all had direct relationships to

growers since additional hop processing (ie. pelletizing) was unnecessary for their use (see 3.6).

Brewery hopping rates (kg hops per hl) ranged from 0.25 kg / hl (0.14 lbs / US bbl) to 2.71 kg / hl (7.02 lbs / US bbl) (Figure 2). Data from Pivovarna Laško Union was determined to be an outlier and excluded from this section of analysis. The average hopping rate for the group was 0.96 kg / hl (2.12 lbs / US bbl). This is considerably higher than the 0.68 kg / hl (1.50 lbs / US bbl) average the BA obtained for U.S. brewers in 2016 (Brewers Association, 2017), though a higher number of breweries with, on average, higher production volumes were included in the BA’s survey of U.S. brewers.

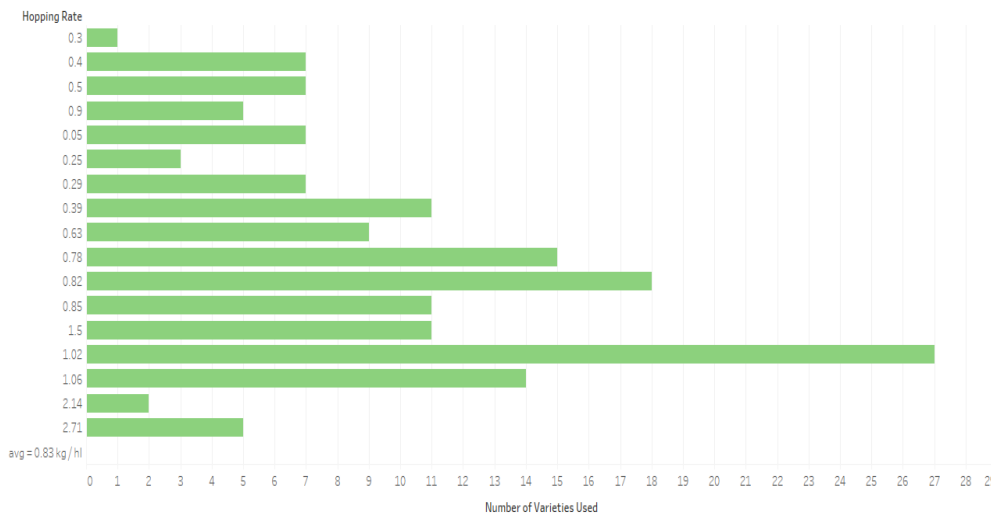


**Figure 2:** Hop dosage rates relative to hop use (kg) and beer production (hl).

Participating breweries (excluding Pivovarna Laško Union) are represented anonymously by each column. Row 1 (top) shows each brewery’s total hop use (in kg). Row 2 (middle) shows annual production (in hl). Row 3 (bottom) shows hopping rate (kg hops / hl production).

Results did not show a strong correlation between hopping rate and brewery size. There was, however, a tendency for breweries predominately using Slovenian hops to have lower hopping rates than the group average. There was also a tendency for the breweries with hopping rates above the average rate to use a larger variety of different hops (Figure 3).





**Figure 3:** Average hopping rates (kg / hl) in relation to total number of hop varieties used.

### 3.4 Hop Shortages

Of 17 breweries, six cited shortfalls for specific varieties in 2016, all of which were imports. Most notably, these included Citra (212 kg combined shortfall) and Amarillo (135 kg combined shortfall). These shortages are consistent with 2016 shortages in the U.S. and are most likely due to both varieties' proprietary status, the patents for which will expire in the next few years. Additionally, in the case of Citra, it is a lower yielding variety and "[purchasing Citra] will come at a premium to other varieties, since its yield is relatively lower. This also serves to illustrate the agronomic reality that in poorer crop years with lower yield, the cost per pound will increase." (Brewers Association, 2017; Washington State University, 2010). For this reason, there could be shortages based on supply (real or perceived) as well as price constraints despite Citra production increasing more than 20 times (1,169 ha) between 2010 - 2015 and being the fifth most highly produced hop in the U.S. in 2016 (Barth-Haas Group, 2016; Barth-Haas Group, 2017). Only half of the breweries who experienced Citra shortages contracted for hops in 2016 (see 3.6).

According to the survey results, the remaining shortages were Columbus (US), Simcoe (US), Centennial (US), Azacca (US) and Northdown (UK). There were no shortages for Slovenian varieties. Breweries using the largest amounts of Slovene hops either had contracts with merchants, or direct relationships to growers. The brewers with direct relationships to domestic growers worked without contracts, which meant that preferred varieties were sometimes unavailable; however, most

voiced that the advantages of not engaging in a contract (ie. flexibility, lower prices, etc.) outweighed having to make hop substitutions. To rectify shortages, brewers either changed recipes, substituted similar hop varieties, or used hop oil extract in lieu of whole cone or pelletized hop availability.

### **3.5 Hop Surpluses**

Only two breweries cited hop surpluses for 2016 and both were able to incorporate those surpluses into 2017 production. Both breweries source hops under contract. Interesting to note is that one of these breweries cited an intentional surplus in Citra as a safeguard against shortage. Citra was the culprit of the largest numbers of hop shortfalls by Slovene brewers in 2016 (see 3.4).

The most common method for dealing with hop surpluses was asking the dealer or grower to hold a portion of the contract for the following year. Several brewers also sold surplus hops to homebrewers; however, each instance was as a favor rather than to rectify their surplus.

### **3.6 Sourcing and Contracting**

Of the 17 breweries surveyed, six breweries contracted hops for the 2016 season. All breweries that produced 600 hl or less in 2016 (52.94% of test group) were without hop contracts and the largest brewery without a contract produced 1,014 hl in 2016. The main reasons the remaining 11 cited for not contracting were size (ie. too small for contracts), unpredictability of needs due to uncertain growth potential, and that it was unnecessary based on the amount of hops used, close relationships with growers/merchants, and/or ability to change recipe based on hop variety availability from season to season.

A brewer engaged in three-year contracts voiced similar concerns, stating they would prefer to contract for just one year. Contracting beyond one year restrains the brewery from adapting to global beer industry trends, especially those marked by frequently changing hop profiles.

## **4 CONCLUSIONS**

With 82.35% of surveyed breweries using hops from outside of Slovenia, there is a clear trend amongst Slovene brewers to offer styles consistent with those popular in the global beer market. In fact, seven of the top 10 varieties used in Slovenia are also amongst the top 10 most highly used by American craft brewers. Given this demand and the previously mentioned supply shortages for these hop varieties, it will be increasingly important for Slovenian brewers to communicate their needs to the global hop growing community.

Alternatively, there's potential for Slovenian brewers to take advantage of increasing domestic aroma and flavor hop acreage. As previously mentioned, Slovenian aroma and flavor hop acreage is increasing following a decade-long 38% decrease in cultivated hop areas. As of 2016, acreage was still about 20% below the 1,856 ha (4,586.28 ac) peak of 2002, meaning cultivated areas could continue to increase given vocalized, sufficient demand.

With just 85% of Slovenian hops contracted for 2017 and 2018 (and even less in projections for 2019 - 2022), there will also be adequate domestic access to these varieties, pending the current predicted yields. Additionally, the estimated average domestic aroma hop prices were between 7.5 Euro / kg (spot market) and 5.2 Euro / kg in 2016 (contract) (IHGC, 2017). Considering that the average price for American hops was 11.60 Euro / kg in 2016, with the most popular imported aroma varieties reaching small quantity prices of approximately 40 Euro / kg on the spot market, there could be both financial and operational advantages for Slovenian brewers who source domestic hops rather than imported varieties (Lupulin Exchange, 2017).

## 5 REFERENCES

- Barth S., Meier, H. The Barth Report: Hops 2015 - 2016. Barth-Haas Group website. <http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/412/barthreport20152016en.pdf>. July 2016. p. 24 - 25.
- Barth S., Meier, H. The Barth Report: Hops 2016 - 2017. Barth-Haas Group website. <http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/412/barthbericht20162017en.pdf>. July 2017. p. 24.
- The Brewers of Europe, Združenje Pivovarn Slovenije. Key Figures 2015: Slovenia. The Brewers of Europe website. [http://www.brewersofeurope.org/site/countries/figures.php?doc\\_id=664](http://www.brewersofeurope.org/site/countries/figures.php?doc_id=664). 2016.
- The Brewers of Europe, Združenje Pivovarn Slovenije. Key Figures 2016: Slovenia. The Brewers of Europe website. [http://www.brewersofeurope.org/site/countries/figures.php?doc\\_id=664](http://www.brewersofeurope.org/site/countries/figures.php?doc_id=664). 2017.
- Colarič A., Mišmaš D. Slovenske pivovarne map. Pivopis website. <http://pivopis.si/slovenske-pivovarne/>. Accessed October 2017.
- IHPS. Hop Growing - Introduction. IHPS website. <http://www.ihps.si/en/hop-growing/introduction/>. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec. Accessed October 2017.
- IHPS. Annual Report of the Institute for 2015. IHPS website. [http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/08/letno\\_porocilo\\_ihps\\_2015.pdf](http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/08/letno_porocilo_ihps_2015.pdf). Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec. May 2016.
- Lesjak A. Združenje Pivovarn Slovenije, data provided by personal email correspondence, October 2017.

Lupulin Exchange. Lupulin Exchange website.

<https://lupulinexchange.com/listings?page=3&q=citra&SortBy=1>. Accessed October 2017.

Pavlovič M., Hop industry. Quality management, decision support modeling. Verlag, Dr. Kovač, Hamburg. 2014. 106 p.

Pavlovič M., Budna P. Marketing analysis of small breweries in Slovenia (In Slovenian). Hmeljarski bilten. Slovenian institute of Hop research and brewing, Žalec. 2016. p. 56.

IHGC. Economic Commission - Summary Reports. International Hop Growers' Convention (IHGC). Yakima, WA. August 2017.

PivoMan. Slovenske pivovarne. PivoMan website. <http://pivo-man.blogspot.si/search/label/Seznam%20Pivovarn>. Accessed October 2017.

Roth B. Trend Watching: 2016 Hop Production and the Rise of Citra. This Is Why I'm Drunk website. <https://thisiswhyimdrunk.blog/2016/12/20/trend-watching-2016-hop-production-and-the-rise-of-citra/>. September 23, 2016. Accessed October 2017.

Swersey C. Help Hop Growers Help You. Brewers Association website.

<https://www.brewersassociation.org/news/help-hop-growers-help/>. August 1, 2016. Accessed October 2017.

Swersey C. Hop Industry and Craft Brewing Market Update. Brewers Association website. <https://www.brewersassociation.org/archived-power-hour/hop-industry-craft-brewing-market-update/>. February 16, 2017. Accessed October 2017.

## THERMAL CHARACTERIZATION OF HOP EXTRACT BY DSC AND HPLC

Miha OCVIRK<sup>12</sup>, Polona MEGUŠAR<sup>13</sup>, Nataša POKLAR ULRIH<sup>14</sup> and Iztok PRISLAN<sup>15</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 20. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 11. 12. 2017

### Abstract

One of the main chemical reaction in beer brewing is isomerization reaction of hop  $\alpha$ -acids, and these compounds are responsible for the beer bitterness and its characteristic flavour. With its complex chemistry, hop has been the subject of deepened investigations for decades. The aim of this study was to use the differential scanning calorimetry as an alternative technique which can give use further information on thermal behaviour of hop extracts during brewing.

**Key words:** hop, *Humulus Lupulus* L., differential scanning calorimetry, high pressure liquid chromatography, isomerization

## TERMIČNA KARAKTERIZACIJA HMELJNIH EKSTRAKTOV Z DSC IN HPLC

### Izvleček

Ena izmed najpomembnejših kemijskih reakcij v pivovarstvu je izomerizacija hmeljnih  $\alpha$ -kislin v izo- $\alpha$ -kislino. Pivu dajejo značilno grenčico in okus. Hmelj je zaradi svoje kompleksne sestave in številnih kemijskih reakcij med komponentami že desetletja predmet poglobljenih raziskav z namenom razumevanja njegovega obnašanja med varjenjem piva. Namen raziskave je bil z uporabo diferencialne dinamične kalorimetrije in tekočinske kromatografije pridobiti dodatne informacije o obnašanju hmeljnih ekstraktov med simuliranjem procesa varjenja piva.

**Ključne besede:** hmelj, *Humulus lupulus* L., diferencialna dinamična kalorimetrija, tekočinska kromatografija, Izomerizacija

---

<sup>12</sup> B.Sc., Institute of Hop Research and Brewing, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenia, e-mail: miha.ocvirk@ihps.si

<sup>13</sup> M. Sc., Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: polona.megusar@bf.uni-lj.si

<sup>14</sup> Prof., PhD., Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: natasa.poklar@bf.uni-lj.si

<sup>15</sup> Assist. Prof., PhD., Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: iztok.prislan@bf.uni-lj.si

## 1 INTRODUCTION

Hops, the inflorescences of the female hop plant (*Humulus lupulus* L.), are a very valuable raw material applied in many industrial branches. Even though they have been reported to have many health benefits (Yayima et al., 2004; Nozawa et al., 2005; Van Cleemput et al., 2009; Colgate et al., 2007, Morimoto-Kobayashi et al., 2016), the most frequent industrial application is still found in the brewing industry. During the brewing process  $\alpha$ -acids in hops are converted by isomerization into iso- $\alpha$ -acids as the major bitter components in beer (Steenackers et al., 2015). Instead of adding dried hops directly to the kettle during boiling, hop extracts are used in the modern brewing process which increases the level of utilization of  $\alpha$ -acids and isomerization into iso- $\alpha$ -acids (Kostrzewa et al., 2016). The growing importance of hop extracts has generated an increasing interest in improving the quality control of hop extracts by brewing industry.

Different analytical methods are used to characterize compounds from hops, their products, and extracts. High pressure liquid chromatography (HPLC) is traditionally used to analyze hop extracts, especially to determine the amount of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids (Ocvirk et al., 2016). Because hop extracts undergo temperature changes during brewing process, it is essential to gain insight into their thermal behavior. Differential scanning calorimetry (DSC) is commonly used to investigate thermal processes of different materials, including material of plant origin (Fernandes et al., 2013; Martinez et al., 1998). DSC allows us to identify glass transition temperatures, investigate the phase transitions, follow crystallization processes and calculate enthalpy changes during thermally induced processes.

The aim of this study was to investigate basic thermodynamic properties of supercritical carbon dioxide hop extracts using DSC, particularly to identify phase transitions. HPLC on the other hand was used as a testing analytical technique to investigate potential isomerization reactions.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Materials

The experiments were conducted using a six different supercritical CO<sub>2</sub> hop extract from the different hop cultivars produced by Nateco2 (Germany). The extract 1 – ICE3, contained 44.6 % of  $\alpha$ -acids and 24.3 % of  $\beta$ -acids. The extract 2 – AHA1, contained 54.5 % of  $\alpha$ -acids and 17.2 % of  $\beta$ -acids. The extract 3 – AHA2, contained 27.8 % of  $\alpha$ -acids and 8.7 % of  $\beta$ -acids. The extract 4 ICE4#1, contained 48.8 % of  $\alpha$ -acids and 24.9 % of  $\beta$ -acids. The extract 5 – ICE4#2, contained 41.9 % of  $\alpha$ -acids and 25.8 % of  $\beta$ -acids. The extract 6 – ICE4#3 contained 42.1 % of  $\alpha$ -acids and 27.0 % of  $\beta$ -acids.

Extracts 1, 2 and 3 were prepared from the variety Herkules, extract 4 was prepared from the variety Hallertauer Magnum, extract 5 was prepared from the variety Northern Brewer and extract 6 was prepared from the variety Perle.

## 2.2 Apparatus and procedures

Differential Scanning Calorimetry. DSC measurements were performed with TA Instruments differential scanning calorimeter, model DSC 2500 (TA Instruments, UK) and the data were evaluated using TA instruments TRIOS software. Temperature and cell constant calibration of the instrument were done with Indium reference samples and specific heat capacity -  $C_p$  calibration was done with sapphire crystal, provided by TA Instruments. Samples ( $m \approx 10$  mg) were placed in hermetically sealed Tzero Aluminium pans and identical empty pan was used as a reference.

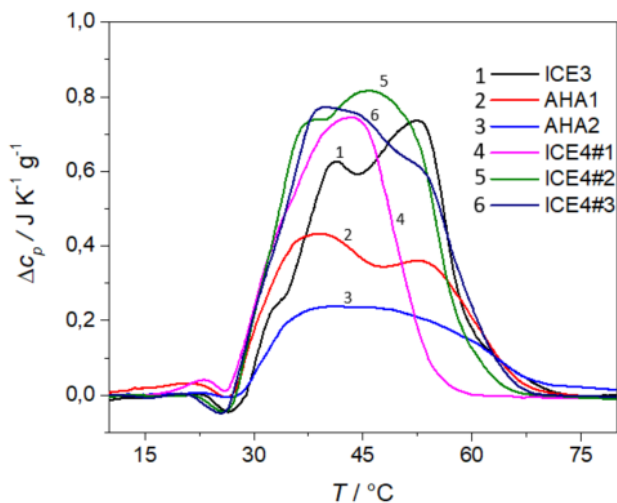
Different heating/cooling cycles were used to analyze samples. Hop 1-6 were first cooled to 0 °C, heated to 95 °C, cooled to 0 °C and heated to 95 °C again at rate of 5 °C  $\text{min}^{-1}$ . Three samples of hop extract ICE3 were prepared and heated/cooled at heating rates of 1, 5 and 10 °C  $\text{min}^{-1}$ . The observed heat effects were characterized by subtracting baseline, calculating the change in enthalpy as the area under experimental curve and determining transition temperature as the curve peak position.

High pressure liquid chromatography. With intent to determine  $\alpha$ -acids and iso- $\alpha$ -acids in extracts, high pressure liquid chromatography was performed with an Agilent 1200 HPLC (Agilent technologies, USA). Prior the analysis, samples were temperate at room temperature and homogenized. The exact amount of 0.5 g was weighted into 50 mL volumetric flask and dissolved in HPLC grade methanol (J.T. Baker, USA) using sonication for 30 s in an ultrasonic bath. 5 mL of the stock solution was pipetted into a 50 mL volumetric flask and diluted up to volume with methanol. The sample solution was than filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  PET filters into 2 mL glass vials. Injection was made on an auto sampler, using methanol, water and ortophosphoric acid (Sigma Aldrich, Germany) as a mobile phase. Separation was performed on a 150 mm long Nucleodur C18 Column (Macherey Nagel, Germany), according to the Analytica EBC method 9.47 (European Brewery Convention, 2010). Iso- $\alpha$ -acids were measured at a wavelength of 270 nm, while  $\alpha$ -acids were measured at 314 nm.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Differential Scanning Calorimetry

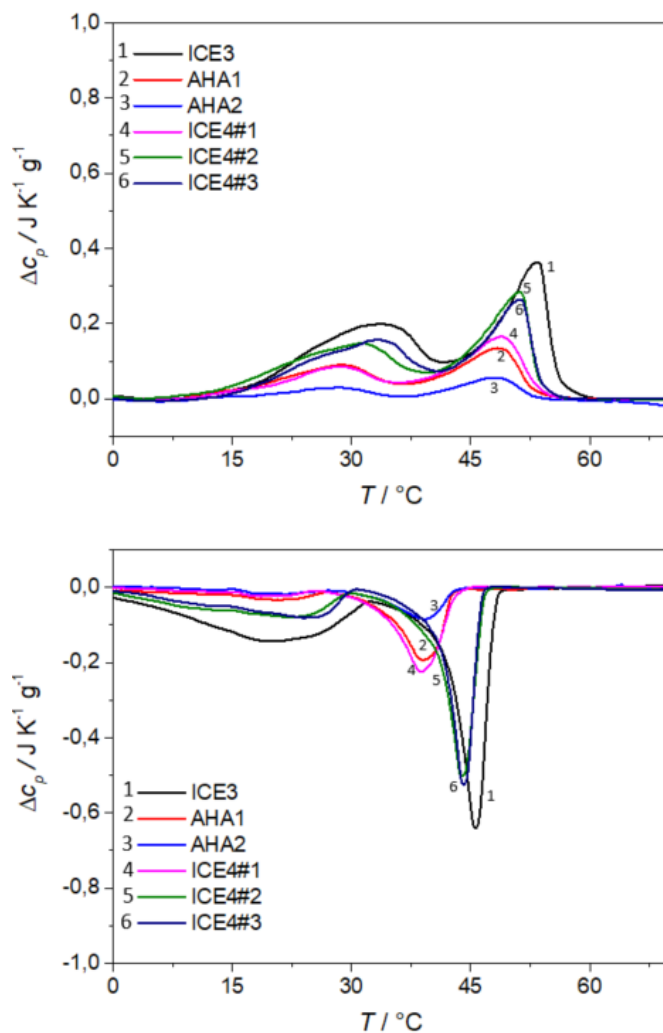
DSC curves obtained for different hop extracts are shown in Figure 1. Upon first heating all samples undergo several endothermic transitions between 20 °C and 70 °C. Analyzed hop extracts are a condensed form of  $\alpha$ -acids,  $\beta$ -acids, fatty acids and other resins found in hops. Even though hop extracts consist of around 70 % of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids, the distribution and intensity of peaks do not reflect  $\alpha$ - and  $\beta$ -acid composition/content. Therefore the observed endothermic transitions could correspond to thermal behavior of oils and resins. Since resins do not undergo a phase change at temperatures below 100 °C (Bisanda et al., 2003, Walter et al., 1966) it is our strong belief that observed transitions correspond to thermal behavior of fatty acids. Results show that changing the parameters of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process influences not only  $\alpha$ - and  $\beta$ -acid composition/content but also fatty acid composition/content in hop extracts.



**Figure 1:** Thermally induced changes in heat capacity of hop extracts 1- 6 during the first heating. Samples were first cooled to -20 °C and then heated to 95 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>

To further investigate thermal behavior of hop extracts, two cooling and another two heating runs were performed for all samples. Figure 2 shows the results of just first cooling and second heating runs since the shapes of second cooling and third heating thermograms remained unchanged (data not shown). Cooling curves exhibit two exothermic transitions at around 44 °C and 27 °C whereas second heating thermograms show two endothermic transitions at around 50 °C and 30 °C.





**Figure 2:** Thermally induced changes in heat capacity of hop extracts 1 - 6 during cooling (top) and second heating (bottom). After heating the samples to 95  $^\circ\text{C}$  (Figure 1), the samples were cooled to -20  $^\circ\text{C}$  at 5  $^\circ\text{C min}^{-1}$  (top) and then heated to 95  $^\circ\text{C}$  at 5  $^\circ\text{C min}^{-1}$  (bottom).

Several differences can be observed when comparing thermograms of first and second heating thermograms of the same sample. All second heating runs show two transitions. First transition with a broad and endothermic peak occurs at lower ( $\approx 30$   $^\circ\text{C}$ ) temperatures while the second one with a sharper peak occurs at higher temperature ( $\approx 50$   $^\circ\text{C}$ ). The number of transitions, corresponding changes in heat capacity and onset temperatures are lower than in the first heating runs. Because the transitions in the first heating run differ from transitions in the second heating

run and the third heating run is the same as second, we may conclude that thermal transitions observed during the first heating runs are not reversible whereas thermal transitions observed during the second and subsequent heating runs are reversible. It has been shown that solid-liquid transition for fatty acids and size of dispersed particles depend on parameters during supercritical CO<sub>2</sub> extraction (Kokot and Knez, 1999). We speculate that thermal transitions observed in the first heating run are result of phase transitions/particle formation during supercritical CO<sub>2</sub> extraction whereas thermal transitions observed during cooling/second heating curves correspond to solidification/melting of fatty acids.

The transition enthalpies accompanying all observed transitions from heating and cooling experiments were calculated and the results are shown in Table 1. Transition enthalpies corresponding to the first heating scan,  $\Delta H_{i,h1}$ , are much higher than transition enthalpies corresponding to the second heating scan,  $\Delta H_{i,h2}$ . Furthermore, the extracts ICE3, AHA1 and AHA2 which were obtained from the same variety of hops yielded significantly different transition enthalpies. This confirms our observations that parameters of supercritical CO<sub>2</sub> extraction influence thermal behavior of hop extracts. Similarly to the observed discrepancies in peak temperatures (Figure 2), transition enthalpies corresponding to cooling scan,  $\Delta H_{i,c}$ , are not the same as  $\Delta H_{i,h2}$ . These observations may indicate that solidification and melting of fatty acids is kinetically governed process (Desgupta et al., 2016).

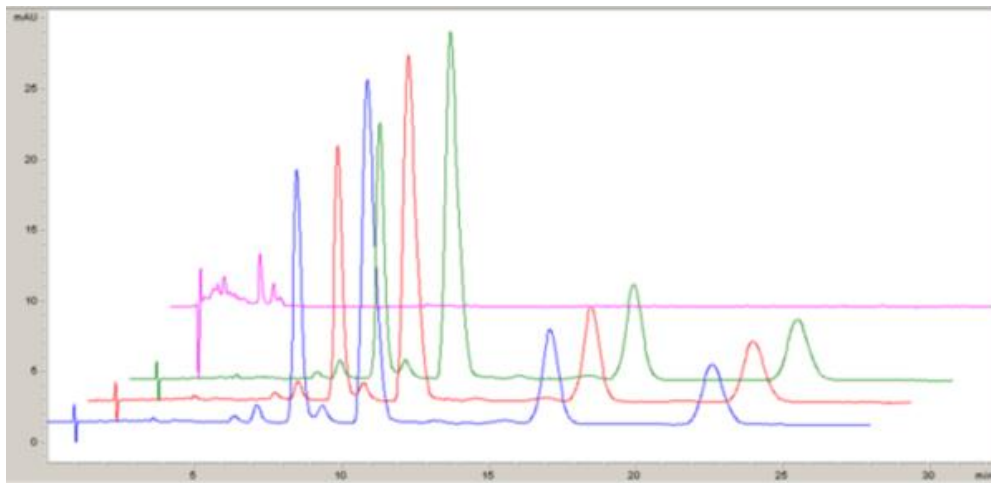
**Table 1:** Calculated enthalpies of observed thermally induced changes in hop extracts. Three enthalpies were calculated for each sample corresponding to first melting curve, cooling curve and second melting curve

<i>i</i>	Sample	$\Delta H_{i,h1}$ (1 <sup>st</sup> heating) / J g <sup>-1</sup>	$\Delta H_{i,c}$ (cooling) / J g <sup>-1</sup>	$\Delta H_{i,h2}$ (2 <sup>nd</sup> heating) / J g <sup>-1</sup>
1	ICE3	15,7±0,2	-6,4±0,2	6,5±0,2
2	AHA1	11,6±0,2	-2,0±0,2	2,8±0,2
3	AHA2	7,2±0,2	-0,9±0,2	0,6±0,2
4	ICE4#1	13,4±0,2	-1,9±0,2	2,9±0,2
5	ICE4#2	18,7±0,2	-4,2±0,2	4,9±0,2
6	ICE4#3	18,5±0,2	-3,7±0,2	4,5±0,2

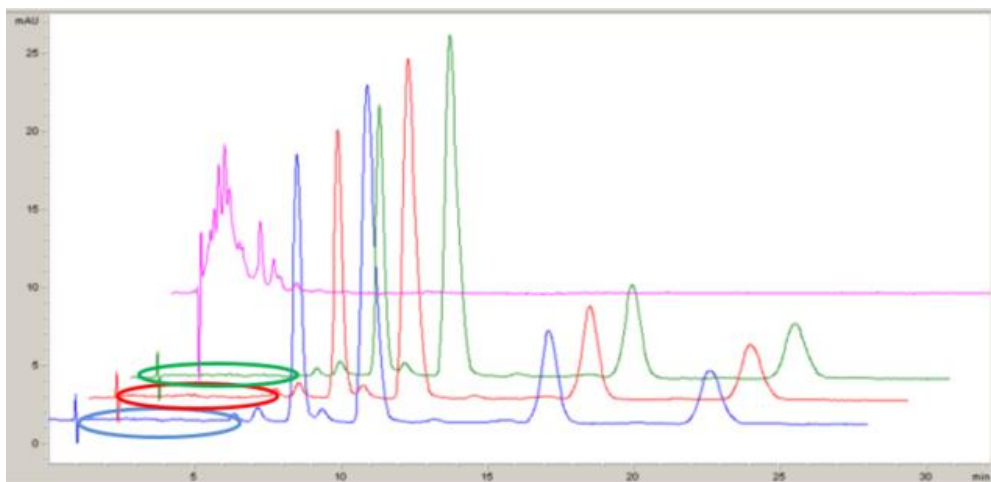
### 3.2 HPLC

HPLC was used to determine the exact  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids contents in hop extracts before and after heating. Chromatograms in Figure 1 show that heating has only minor impact on  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids levels. After first cycle of heating and cooling, relative % of  $\alpha$ -acids was decreased from 44.46 to 42.39 %, while the relative % of

$\beta$ -acids was decreased from 24.28 to 22.07 %. The final relative % of  $\alpha$  and  $\beta$ -acids in investigated extract was 41.82 % and 20.69 % (Table 2).



**Figure 3:** HPLC chromatogram of hop extract 1 at the wavelength of 314 nm before heating, after the first and after the second heating to 95°C. The samples were cooled to 20 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and then heated to 95 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. Flat line represents the chromatogram of distilled water after heating as a blank



**Figure 4:** HPLC chromatogram of hop extract 1 at the wavelength of 270 nm before heating, after the first and after the second heating to 95°C. The samples were cooled to 20 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and then heated to 95 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. Flat line represents the chromatogram of distilled water after heating as a blank

After processing the chromatograms for determination of iso- $\alpha$ -acids and iso- $\beta$ -acids, we discovered, that in all three samples, isomerized products of  $\alpha$ -acids and  $\beta$ -acids were not detected – marks on Fig.2 (LOD =0,001 mg/L).

**Table 2:** Relative % of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids in the hop extract 1 before and after heating

Extract 1	Rel. %	Rel. % after first heating	Rel. % after second heating
$\alpha$ -acids	44.64	42.39	41.82
cohumulone	13.88	13.44	12.90
n+adhhumulone	30.76	28.95	28.92
$\beta$ -acids	24.28	22.07	20.69
colupulone	13.44	12.04	11.52
n+adlupulone	10.84	10.03	9.17

#### 4 CONCLUSIONS

We have followed thermally induced transition of different hop extract. Even though hop extracts consist of around 70 % of  $\alpha$ -acids and  $\beta$ -acids, it has been shown by HPLC analysis that  $\alpha$ -acids and  $\beta$ -acids are not responsible for observed thermal transitions. We believe that observed thermally induced transitions correspond to solidification/melting of fatty acids and that this is kinetically governed process. Further analyses are required to confirm this.

**Acknowledgement.** Research program no. 020-2/2011-3 was financially supported by the Slovenian Research Agency from the government's funding. Authors would like to thank to the Arbeitsgruppe Hopfenanalyse and to dr. M. Biendl and dr. R. Schmidt for agreeing to use hop extract samples from AHA rings and accompanied information.

#### 5 REFERENCES

- Bisanda ETN., Ogola WO., Tesha JV. Characterisation of tannin resin blends for particle board applications. *Cement & Concrete Composites*, 2003; 25: 593–598
- Colgate EC., Miranda CL., Stevens JF., Bray TM., Ho E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappa B activation in prostate epithelial cells, *Cancer Letters*. 2007; 246: 201–209
- Desgupta S., Florian R., Ay P. Nucleation Kinetics during Melt Crystallization of Plant Based High Oleic and Linoleic Polyunsaturated Fatty Acid Mixtures. *Crystal Growth and Design*, 2016; 16: 861–866
- European Brewery Convention, Method 9.47, section Hops, *Analytica EBC*; 2010
- Fernandes FHA., Santana CP., Santos RL., Correia LP., Conceicao MM., Macedo RO., Medeiros ACD. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC

- and analytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2013; 113:443–447
- Kokot K., Knez., Bauman D. S-L-G (solid-liquid-gas) phase transition of Cocoa butter in supercritical CO<sub>2</sub>. *Acta Alimentaria*, 1999; 28: 197-208.
- Kostrzewa D., Dobrzyńska Inger A., Rój E., Grzęda K., Kozłowski K. Isomerization of hop extract  $\alpha$ -acids. *Journal of the institute of brewing*, 2016; 122: 493–499
- Martinez D., Revilla MA, Espina A, Jaimez E, Garcia JR. Survival cryopreservation of hop shoot tips monitored by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 1998; 317: 91-94
- Morimoto-Kobayashi Y., Ohara K., Ashigai H., Kanaya T., Koizumi K., Manabe F., Kaneko Y., Taniguchi Y., Katayama M., Kowatari M., Kondo S. Matured hop extract reduces body fat in healthy overweight humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group study. *Nutrition Journal*. 2016; 15: 1-15
- Nozawa H, Nakao W, Zhao F, Kondo K. Dietary supplement of isohumulones inhibits the formation of aberrant crypt foci with a concomitant decrease in prostaglandin E2 level in rat colon. *Molecular nutrition and food research*, 2005; 49: 772–8
- Ocvirk, M., Košir IJ, Grdadolnik J., Determination of the botanical origin of hops (*Humulus lupulus* L.) using different analytical techniques in combination with chemometric methods. *Journal of the institute of brewing*, 2016; 122: 452-462
- Schuller WH., Conrad CM. Thermal Behavior of Certain Resin Acids. *Journal of Chemical and Engineering data*, 1966; 11: 89-91
- Steenackers B, De Cooman L, De Vos D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food Chemistry*. 2015; 172: 742–56
- Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., and Heyerick, A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds, *Journal of Natural Products*. 2009; 72: 1220–1230
- Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, , Tsuboyama- Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S, Kondo K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  and reduce insulin resistance. *Journal Biological Chemistry*, 2004; 279: 33456–62

## VALIDACIJA PLINSKO KROMATOGRAFSKE METODE ZA DOLOČANJE SESTAVE ETERIČNIH OLJ HMELJA

Miha OCVIRK<sup>16</sup> in Tanja POTOČNIK<sup>17</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 7. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 1. 12. 2017

### Izveček

Eterično olje hmelja ima pomembno vlogo v pivovarstvu, saj vpliva na okus in aromo piva. Od sestave eteričnega olja je odvisno, kateri tip arome prevladuje. Za pivovarje je pomembno, da vedo, kakšna je sestava eteričnega olja posamezne sorte hmelja, z namenom doseganje želene arome, zato na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije redno opravljamo kvalitativne in kvantitativne analize eteričnih olj hmelja. Z namenom optimizacije in skrajšanja analize ter pridobitve dodatnih validacijskih podatkov smo obstoječo metodo predstavili na novejši plinski kromatograf, ki omogoča hitrejšo analizo posameznega vzorca. Validacijski postopek je zajemal preverjanje selektivnosti, linearnosti, točnosti, natančnosti, določitev meje zaznavnosti in meje določanja.

**Ključne besede:** validacija, hmelj, eterično olje, plinska kromatografija

## VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF HOP ESSENTIAL OIL COMPOSITION BY GAS CHROMATOGRAPHY

### Abstract

Hop essential oils are of crucial importance for brewing industry, because they give beer its specific flavour and aroma. With intent to achieve desired aroma in beer, brewers need to know the composition of hop essential oils. At the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing all analyses of hop essential oils are performed according to the Analytica-EBC regularly. With intent to optimise and shorten the time of analysis, and to obtain confirmation of the validation data we moved our method to a newer GC instrument. Determination of validation parameters such as selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of determination was performed.

**Key words:** validation, hop, essential oil, gas chromatography

<sup>16</sup> Univ. dipl. inž. kem. tehnol. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

<sup>17</sup> Univ. dipl. inž. živ. tehnol., prav tam, e-pošta: tanja.potočnik@ihps.si

## 1 UVOD

Eterično olje hmelja ima v pivovarstvu pomembno vlogo, saj daje pivu značilno hmeljno aromo. Eterično olje se nahaja v storžkih hmelja, natančneje v lupulinskih zrnih (Ocvirk in Košir, 2014). Z različno kombinacijo sort hmelja lahko v pivu dosežemo sadno, cvetlično, citrusno, zeliščno ali tipično hmeljno aromo (Čerenak s sod., 2011).

Suhi storžki hmelja vsebujejo med 0,5- 4,0 % eteričnih olj. Komponente olja glede na kemijsko strukturo delimo na ogljikovodike (75 %), spojine s kisikom (24 %) in žveplo vsebujoče spojine (1 %) (Fix, 1999; Šterba in sod., 2015).

S separacijsko tehniko, imenovano plinska kromatografija, je bilo zaznanih že več kot 1000 različnih komponent eteričnega olja, identificiranih pa 440 (Roberts, 2004; Almaguer in sod. 2014). Analiza se izvaja na aparatu, imenovanem plinski kromatograf, in temelji na ločbi komponent zaradi različne hlapnosti in polarnosti preiskovanih spojin. Vzorec injiciramo v zato predvideno mesto, ki je ogreto na določeno temperaturo, pri tem pa se vzorec upari. Nosilni plin, ki mora biti inerten, ponese uparjen vzorec skozi kolono v termostahirani pečici do detektorja. Najpogosteje uporabljen detektor je plamensko ionizacijski detektor. Ob prihodu iona na detektor naraste tok sorazmerno s koncentracijo analita v vzorcu. Detektor torej ne samo zazna komponente, ki se izločajo iz kolone in jih pretvarja v električni signal, ampak izmeri tudi intenziteto signala, ki je sorazmerna z množino neke spojine. Električni signal pretvorimo in vodimo na rekorder oz. integrator. Rezultati analize so podani v grafični obliki in se imenujejo kromatogrami. Vsak kromatografski vrh predstavlja določen analit iz vzorca.

Namen raziskave je predstavitev analizne metode iz starejšega plinskega kromatografa HP 5890A, ki ne podpira avtomatskega injiciranja vzorcev in interpretacije rezultatov, na novejšo napravo Agilent GC 6890. S tem smo želeli skrajšati čas, potreben za kvantitativno določitev sestave eteričnega olja hmelja, saj poteka interpretacija dobljenega kromatograma z računalniško opremo veliko hitreje. Metoda je bila na tej napravi uporabljena prvič, zato je bila potrebna celotna validacija analizne metode.

Validacija je postopek, ki temelji na določanju različnih parametrov, s katerimi zagotovimo zanesljivost metode. Parametri, ki jih pri validaciji določamo, so selektivnost, natančnost, točnost, linearnost, meja zaznavnosti in meja določljivosti (Rutnik, 2017). Validacijo smo izvedli na petih pomembnejših komponentah eteričnega olja hmelja: mircenu, geraniolu,  $\alpha$ -humulenu, borneolu in linalolu, ki so pokazatelji kvalitetne arome piva (Ocvirk in Košir, 2014).

## 2 METODE DELA

Pri delu smo uporabili homogeniziran povprečni vzorec petih vzorcev hmeljnega kultivarja Aurora, zbranih med vzorčenjem hmelja letnika 2016.

Pred kromatografsko analizo smo s parno destilacijo po metodi Analytica- EBC 7.10. (Analytica-EBC, 2007) pripravili eterično olje vzorca hmelja, ki smo ga skozi celoten čas izvajanja analiz hranili v hladilniku. Pred kromatografsko analizo na GC aparaturi je bilo potrebno eterično olje hmelja (0,1 mL) redčiti s heksanom (2 mL) analitske čistosti (Honeywell, Poljska). 2  $\mu$ L redčenega vzorca eteričnega olja smo pod specifičnimi pogoji (Analytica EBC, 2007) injicirali v injektor, segret na 180°C. Uporabili smo nepolarno kapilarno kromatografsko kolono HP-1 (25 m  $\times$  0,2 mm  $\times$  0,11  $\mu$ m) (Hewlett Packard, ZDA), prevlečeno z dimetilpolisiloksanom. Temperaturni program termostatisirane pečice je bil nastavljen na 1 min pri 60 °C, dvig temperature 2,5 °C/min do 190 °C, 1 min pri 190 °C, dvig temperature 70 °C/min do 240 °C in 11 min pri 240 °C. Pretok nosilnega plina je bil nastavljen na 25 mL/min.

Za obdelavo kromatogramov smo uporabili računalniško opremo GC ChemStation (Agilent Tehnologies, ZDA). Osnovna statistika, opravljena na šestih ponovitvah, s katero smo obdelovali dobljene rezultate, je bila narejena s programom MS Excel (Microsoft, ZDA).

Standardi eteričnih olj, uporabljeni v validaciji, so bili kupljeni pri podjetju Sigma-Aldrich (Švica) in so bili vsi analitske čistosti, razen mircena, ki je bil tehniške čistosti  $\geq 95$  %.

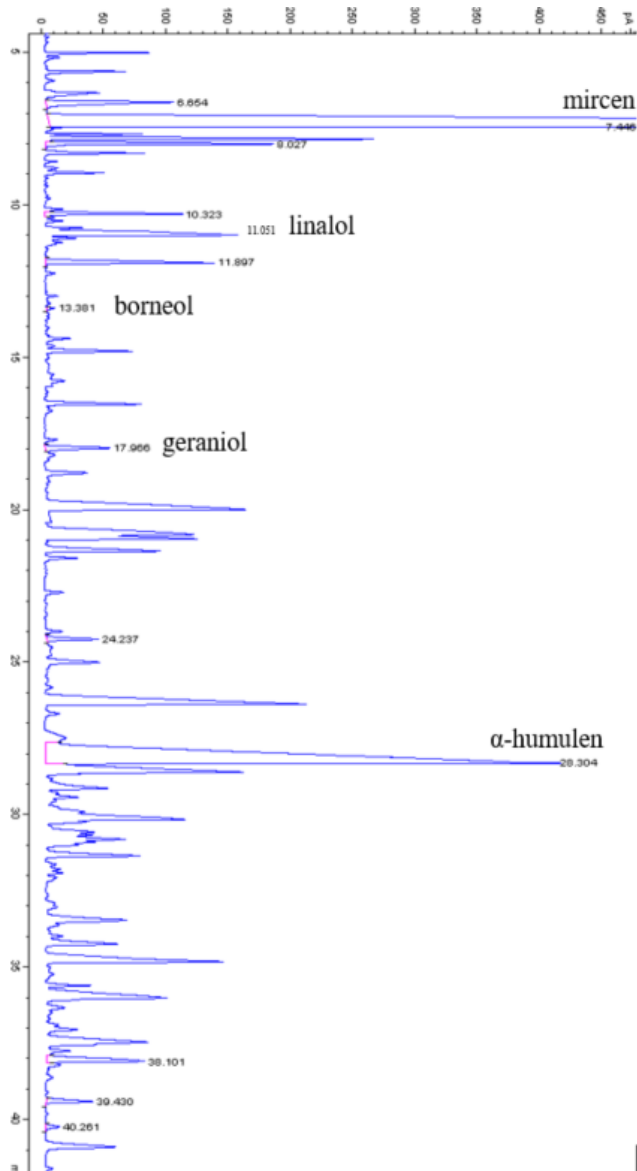
## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Selektivnost. Da lahko metodo označimo za selektivno, mora biti izpolnjen pogoj, da so kromatografski vrhovi pri določenih retencijskih časih dobro ločeni. Če ta pogoj ni izpolnjen, je metoda neselektivna (Aslanyan in sod., 2016). Dobljene kromatograme smo primerjali z referenčnimi kromatogrami. Kromatografski vrhovi so bili simetrični in na kromatogramu dobro ločeni (slika 1), zato smo metodo opredelili za selektivno.

Natančnost. Vsaka izmerjena meritev se od prave vrednosti navadno vsaj malo razlikuje ali navzgor ali navzdol. Nihanje rezultatov podajamo s standardnim odmikom *s* oz. relativnim standardnim odmikom RSD, ki je izražen v odstotkih. Natančnost meritve je obratno sorazmerna s standardnim odmikom. Rečemo lahko tudi, da manjši kot je RSD, bolj natančna je analizna metoda. Natančnost je povezana z naravo meritve, lastnostmi aparature in sposobnostmi analitika, homogenostjo vzorca ter ponovljivimi parametri v okolju (Zupan, 2009; Rutnik,



2017). Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri enakih pogojih opisuje *ponovljivost*. Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri različnih pogojih opisuje *obnovljivost*.



**Slika 1:** Kromatogram preiskovanega eteričnega olja hmelja Aurora, posnet na novem plinskem kromatografu Agilent 6890.

Analize izvajamo z različnimi analitiki, v različnih delih dneva in letnega časa, uporabljajo se štiri grelnе kalote za vodno destilacijo itd ... Zato smo z vidika vsakodnevnе uporabe analize natančnost metode preverili z obnovljivostjo. Izvedli smo sedem destilacij z vodno paro ter kvantitativno in kvalitativno analizo dobljenega eteričnega olja. Definirali smo, da je metoda natančna, če je RSD manjši od 20 %. Pri mircenu metoda tega pogoja ne izpolnjuje, saj je RSD 31,76 %, a je zaradi zelo velikega relativnega deleža v olju in njegove velike hlapnosti to vseeno dober rezultat, zato potrjujemo, da je naša metoda pri pogojih obnovljivosti natančna tudi za mircen (preglednica 1). RSD za ostale analite so bili med 3,54 in 4,85 %, kar je sprejemljivo.

Točnost. Podamo jo kot razliko med pravo in izmerjeno vrednostjo (Zupan, 2009). Točnost podamo kot izkoristek metode. Znani koncentraciji komponente smo z metodo standardnega dodatka povečali in z umeritveno krivuljo izračunali koncentracijo. Sprejemljiv kriterij za točnost metode je bil, da so vsi izkoristki med 70 % in 120 %. Rezultati izkoristka metode za posamezne komponente so predstavljeni v preglednici 2. Vsi izkoristki so med 80,2 % in 102,3 %, zato lahko zaključimo, da je metoda točna.

**Preglednica 1:** Povprečna koncentracija analita v vzorcu, standardni odmik in relativni standardni odmik, izračunani na šestih ponovitvah

Komponenta eteričnega olja	Povprečna koncentracija (mg/kg)	s (mg/kg)	RSD (%)
mircen	618,6	196,5	31,76
linalol	112,8	4,00	3,54
geraniol	33,26	1,26	3,80
borneol	3,15	0,15	4,85
$\alpha$ -humulen	588,75	12,35	2,10

**Preglednica 2:** Izkoristek metode in standardni odmik za preiskovane analite

Komponenta eteričnega olja	Izkoristek (%)	s (%)
mircen	102,3	2,4
linalol	92,7	13,9
geraniol	80,2	9,4
borneol	94,2	7,8
$\alpha$ -humulen	100,6	4,6

Linearnost. Linearnost metode je sposobnost, da v določenim območju dobimo linearno proporcionalne odzive detektorja v odvisnosti od koncentracije vzorca

(Zupan, 2009; Rutnik, 2017). V praksi se lahko zgodi, da umeritvena krivulja ni linearna v celotnem koncentracijskem območju. Takrat jo lahko razdelimo na več manjših in tam preizkusimo linearnost, če je korelacijski faktor premice večji ali enak 0,99.

Za določanje linearnosti metode smo pripravili mešanico standardov različnih koncentracij v pričakovanem koncentracijskem območju. Pričakovane masne koncentracije so izračunane iz baze podatkov o relativnem deležu (%) komponent v eteričnem olju hmelja pri metodi MIN-MAX za določanje sortne čistosti hmelja (Kač in Kovačevič, 2000). V preglednici 3 so predstavljene pripravljene koncentracije. Iz rezultatov linearnosti (preglednica 4) vidimo, da so korelacijski faktorji vseh komponent večji od 0,99, kar potrjuje linearnost metode v območju predvidenih koncentracij.

**Preglednica 3:** Različne koncentracije standardnih raztopin preiskovanih komponent

Komponenta eteričnega olja	1. konc. $\gamma$ (g/L)	2. konc. $\gamma$ (g/L)	3. konc. $\gamma$ (g/L)	4. konc $\gamma$ (g/L)	5. konc $\gamma$ (g/L)
mircen	5,44	10,89	13,62	16,34	21,79
linalol	0,24	0,47	0,59	0,71	0,94
geraniol	0,16	0,32	0,40	0,48	0,64
borneol	0,02	0,05	0,06	0,07	0,09
$\alpha$ -humulen	-	9,36	11,70	14,04	18,72

**Preglednica 4:**  $R^2$  vrednosti in območje linearnosti preiskovanih komponent

Komponenta eteričnega olja	$R^2$	Območje linearnosti
mircen	0,9996	2,70 – 27,20
linalol	0,9994	0,24 – 1,18
geraniol	0,9986	0,16 – 0,81
borneol	0,9940	0,02 – 0,12
$\alpha$ -humulen	0,9946	9,36 – 23,40

Meja zaznavnosti (Limit of detection - LOD). Najnižjo koncentracijo analita v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, ne moremo pa je kvantitativno ovrednotiti, imenujemo meja zaznavnosti. Določimo jo iz odseka in napake umeritvene krivulje (Tevž, 2014). Meje zaznavnosti so predstavljene v preglednici 5.

Meja določljivosti (Limit of quantification - LOQ). Najmanjša možna koncentracija analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo, imenujemo meja določljivosti. Izračuna se iz umeritvene krivulje in standardnega odmika (Tevž,

2014). Meje detekcije so predstavljene v preglednici 5. Vse meje zaznavnosti in določljivosti so zadovoljivo nizke, razmeroma visoka je le meja določljivosti  $\alpha$ -humulena.

**Preglednica 5:** Meja zaznavnosti in meja detekcije preiskovanih komponent

Komponenta eteričnega olja	Meja zaznavnosti (g/L)	Meja določljivosti (g/L)
mircen	0,55	1,85
linalol	0,03	0,09
geraniol	0,03	0,09
borneol	0,01	0,02
$\alpha$ -humulen	2,37	7,91

#### 4 ZAKLJUČEK

S tem, ko je bila metoda ponovno uvedena na novejšem instrumentu, smo prepolovili čas, potreben za interpretacijo rezultatov. Na novo smo določili vrednosti validacijskih parametrov, ki so izpolnjevali predhodno postavljene zahteve. Rezultati le teh dokazujejo, da je metoda lahko uporabna za nadaljnje analize eteričnih olj sort hmelja v posodobljeni različici.

**Zahvala.** Raziskovalni program št. 020-2/2011-3 je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

#### 5 VIRI IN LITERATURA

- Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt EK, Becker T. Humulus Lupulus – a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of brewing and Distilling*. 2014; 120: 289-314.
- Analytica-EBC. Section 7 – Hops, Method 7.10 in 7.12; Carl, Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 2007.
- Aslanyan M.A., Bobritskaya L.A., Nazarova E.S., Mirnaya T.A., in Zborovskaya T.V. Development and validation of a gas chromatography method for quantitative determination of lavender oil in lavaflam preparation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016; 50: 200-204.
- Čerenak M., Pavlovič M., Oset Luskar M. in Košir IJ. Characterization of Slovenian hop (*Humulus lupulus* L.) varieties by analysis of essential oil. *Hop Bulletin*. 2011; 18: 27-32
- Fix G. Principles of brewing science – a study of serious brewing issues 2nd edition; Brewers publication, Boulder, USA, 1999.
- Kač M., Kovačevič M. Presentation and determination of hop (*Humulus Lupulus* L.) cultivars by a min-max model on composition of hop essential oil. *Monatsschr. Brauwissenschaft*. 2000; 53: 180-184.

- Ocvirk M., Košir I.J. Pomen linalola v pivovarstvu = Importance of linalool in brewing. *Hmeljarski bilten*. 2014; 21: 68-73.
- Roberts M.T., Dufour J.P., Lewis A.C. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC6GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *Journal of Separation Science*. 2004; 27: 473-478.
- Rutnik K. Optimizacija in validacija metode za določanje sestave eteričnih olj hmelja s plinsko kromatografijo - diplomsko delo, Univerza v Mariboru, 2017.
- Štěrba K, Čejka P, Čulík J, Jurková M, Krofta K, Pavlovič M, Mikyška A and Olšovská J, Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection, *Journal of American brewing society for brewing chemistry*. 2015; 73: 151–158.
- Tevž D. Validacija plinsko kromatografske metode za določanje vsebnosti ogljikovodikov C10-C40 v tleh in odpadkih. Diplomsko delo, Univerza v Maribor, 2014.
- Zupan J. Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. *Inštitut nove revije, zavod za humanistiko in kemijski inštitut*, Ljubljana, 2009.

## POMEN STEROLOV PRI KARAKTERIZACIJI BUČNEGA OLJA

Tanja POTOČNIK<sup>18</sup>, Miha OCVIRK<sup>19</sup>, Doris POTOČNIK<sup>20</sup> in  
Nives OGRINC<sup>21</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 7. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 12. 11. 2017

### Izveleček

Namen raziskave je bil preveriti geografsko poreklo in botanično pristnost bučnih olj s pomočjo določanja sterolne sestave s plinsko kromatografijo v kombinaciji s kemometrijo. Zbrali smo 37 vzorcev bučnih semen iz trinajstih držav in iz njih ekstrahirali čisto olje. Bučno olje vsebuje več  $\Delta^7$ -sterolov kot  $\Delta^5$ -sterolov, s čimer se razlikuje od drugih jedilnih olj. Določili smo pet  $\Delta^7$ -sterolov, in sicer v slovenskih vzorcih spinasterol (8,64 g/L), stigmastatrienol (6,29 g/L), stigmastadienol (8,88 g/L), avenasterol (5,73 g/L) ter stigmastenol (0,17 g/L). Skupina slovenskih, hrvaških in avstrijskih vzorcev bučnih olj se je s pomočjo kemometrije razlikovala od skupine vzorcev bučnih olj iz drugih držav. Za določitev avtentičnosti smo bučnemu olju dodali sojino, sončnično ter olje oljne ogrščice, ki pripadajo različnim botaničnim družinam, v različnih utežnih deležih (1-10 %). Dosegli smo 100 % točno klasifikacijo botanične pristnosti za vsa dodana olja v vseh količinah dodatka s pomočjo kemometrije.

**Ključne besede:** bučno olje, steroli, geografsko poreklo, botanična pristnost, kemometrija

## THE IMPORTANCE OF STEROLS FOR PUMPKIN SEED OIL CHARACTERIZATION

### Abstract

The aim of our study was to verify the geographical origin and botanical authenticity of pumpkin seed oil by sterol content using gas chromatography

---

<sup>18</sup> Univ. dipl. inž. živ. tehnol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za agrokemijo in pivovarstvo, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: tanja.potocnik@ihps.si

<sup>19</sup> Univ. dipl. kem., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za agrokemijo in pivovarstvo, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: miha.ocvirk@ihps.si

<sup>20</sup> Dr., Inštitut Jožef Stefan, Odsek za znanost o okolju, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: doris.potocnik@ijs.si

<sup>21</sup> Prof.dr., Inštitut Jožef Stefan, Odsek za znanost o okolju, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: nives.ogrinc@ijs.si

coupled with chemometrics. Thirty-seven pumpkin seed samples from thirteen countries were collected and pure oils were extracted. Pumpkin seed oil contains more  $\Delta^7$ -sterols than  $\Delta^5$ -sterols, which makes it different from other edible oils. We identified five  $\Delta^7$ -sterols, in slovenian samples these were spinasterol (8,64 g/L), stigmastatrienol (6,29 g/L), stigmastadienol (8,88 g/L), avenasterol (5,73 g/L) and stigmastenol (0,17 g/L). The group of Slovenian, Croatian and Austrian pumpkin seed oil samples distinguished from the group of samples from other countries by the use of chemometrics. To determine adulteration, rapeseed, sunflower and soybean oil, that belong to different botanical families, were added to pumpkin seed oil in varying percentages (1-10 %). We achieved a 100% correct classification of botanical authenticity based on sterol content for all added oils in all added quantities.

**Keywords:** pumpkin seed oil, sterols, geographical origin, botanical authenticity, chemometrics

## 1 UVOD

Bučno olje je jedilno, nerafinirano rastlinsko olje, proizvedeno s stiskanjem praženih bučnih semen, katera so pridobljena iz buč (*Cucurbita pepo* L.). Olje je značilne temno zelene barve in posebnega, prijetnega okusa, ki spominja na pražene orehe. Bučno olje ima visoko prehransko vrednost (visoka vsebnost nenasičenih maščobnih kislin, vitamina E, karotenoidov, fitosterolov) in pozitiven vpliv na zdravje (deluje proti raku na prostati, artritisu, znižuje holesterol) (Procida in sod., 2012; Fruhwirth in Hermetter, 2008; Murkovič in sod., 2004, Potočnik in sod., 2016). Bučno olje ima v Sloveniji velik ekonomski pomen, oljne buče so bile posajene na 4.500 hektarjev kmetijskih površin v letu 2017 (SURs). Požlahtnjene so bile številne nove sorte oziroma hibridi z namenom izboljšanja pridelka, povečanja vsebnosti semen ali izboljšanja odpornosti na škodljivce (Fruhwirth in Hermetter, 2008). Bučno olje se večino uporablja za hladne jedi zaradi svoje barve, arome ter maščobnokislinske sestave (Procida in sod., 2012). Prevladujoče maščobne kisline so palmitinska (9,5-14,5%), stearinska (3,1-7,4%), oleinska (21,0-46,9%) in linolna kislina (35,6-60,8%) (Murkovič in sod., 2004).

Bučno olje ima specifično sestavo sterolov, na osnovi katere lahko določamo njegovo pristnost. V primerjavi z večino preostalih rastlinskih olj, ima bučno olje značilno visoko vsebnost  $\Delta^7$ -sterolov (spinasterol,  $\Delta^{7,25}$ -stigmastadienol,  $\Delta^{7,22,25}$ -stigmastatrienol,  $\Delta^7$ -stigmastenol,  $\Delta^7$ -avenasterol), medtem ko je vsebnost  $\Delta^5$ -sterolov nizka ( $\beta$ -sitosterol). Steroli so kristalinični, nevtralni, neumljivi alkoholi z visokimi tališči in lastnostmi, ki so podobni holesterolu. Po kemijski sestavi so steroli visokomolekularni ciklični alkoholi – derivati ciklopentanofenantrena. Rastlinske sterole lahko glede na strukturo C-4 in na osnovi poteka biosinteze razdelimo v 4-desmetil sterole, 4 $\alpha$ -monometil sterole in 4,4-dimetil sterole. 4-

desmetil sterole nadalje delimo glede na pozicijo dvojnih vezi v obroču B na  $\Delta^5$ -sterole in  $\Delta^7$ -sterole (Makovšek, 2003).

Zaradi pozitivnega vpliva bučnega olja na zdravje ter visokih stroškov pridobivanja dosega bučno olje visoko ceno. Posledično je pogosto potvarjanje bučnega olja z drugimi cenejšimi rastlinskimi olji, kot sta to sončnično ali olje oljne ogrščice (Butinar in sod., 2010, Mandl in sod., 1999). Intenzivna temno zelena barva bučnega olje ter njegov značilen vonj še bolj otežujeta potrošniku, da bi zaznal dodatek drugega olja (Mandl in sod., 1999). Potrošnikom je pomembno, da dobijo pričakovano kvaliteto, hkrati jim postaja tudi poznavanje izvora hrane vedno pomembnejše. Zaradi specifične sestave sterolov v bučnem olju je za določanje geografskega porekla, kot tudi za določanje botanične pristnosti, uporabna metoda določanja sterolne sestave, sklopljena s kemometrijo.

Namen raziskave je bil določiti sterolno sestavo vzorcem bučnega olja različnega geografskega porekla ter vzorcem, potvorjenim s sojinim, sončničnim in oljem oljne ogrščice, dodanim v različnih količinah. S pomočjo statistične obdelave podatkov smo želeli dokazati možnost določanja pristnosti bučnega olja glede na geografsko in botanično poreklo na osnovi sterolne sestave, določene s plinsko kromatografijo, ter z določanjem razmerij stabilnega izotopa ogljika sterolov.

## **2 MATERIALI IN METODE**

### **2.1 Vzorci**

Zbrali smo 37 vzorcev posušenih bučnih semen (*Cucurbita pepo*) iz 13 držav. Iz njih smo s pomočjo kemijske ekstrakcije pridobili pristna bučna olja. Sončnično, sojino in repično olje, ki pripadajo različnim botaničnim družinam, smo pridobili od tovarne olj. Bučnemu olju, pridobljenemu iz bučnih semen s območja Prekmurja, smo dodali sončnično, sojino ter olje oljne ogrščice v količinah od 1 do 10 ut% (1, 2, 3, 4, 5 ter 10 %).

### **2.2 Ekstrakcija bučnega olja**

Bučna olja smo ekstrahirali iz vzorcev bučnih semen različnega geografskega porekla s pomočjo metode, povzete po Hrastar in sod. (2009). Zmleta semena (1g) ekstrahiramo s topilom dvakrat po 5 ml, enkrat z 0.17 M NaCl v metanolu in heptanu (1:3) pri 80 °C z dodatkom butilhidroksitoluena, ter še enkrat s heptanom pri sobni temperaturi. Topilo smo odstranili z rotacijsko evaporacijo z namenom pridobitve čistega bučnega olja v količini okrog 300 mg.

### **2.3 Ekstrakcija sterolne frakcije**

Metoda je bila povzeta po Wenzl in sod. (2002). Za pridobitev raztopine internega standarda smo 2,5 mg holesterola (Sigma-Aldrich, Nemčija) raztopili v 10 ml 1,4-



dioksana. 50  $\mu$ l bučnega olja in 100  $\mu$ l internega standarda odpipetirali v 10 ml viale skupaj z 2 ml saponifikacijske mešanice (2 g kalijevega hidroksida raztopimo v 1,2 ml deionizirane vode). Saponifikacija je potekala pri 70 °C 2 uri. Po saponifikaciji smo dodali 2 g predkondicionirane alumine (aluminium oxide 90 standardized, Merck, Darmstadt, Nemčija) ter odparili topila. Za ekstrakcijo in čiščenje sterolne frakcije smo uporabili 10 cm dolgo stekleno kolono, napolnjeno s stekleno volno, prekrito z 1 g natrijevega sulfata in 2 g predkondicionirane alumine. Na alumino smo nanесли alumino z analitom. Dodatno smo na kolono dodali 1g natrijevega sulfata, 15 ml topila za izpiranje (1 del 1,4-dioksana in 2 dela *tert*-butilmetileter), ga zbrali v bučki ter ga odparili. Preostanek smo raztopili z 950  $\mu$ l t-BME (*tert* butilmetil eter) in 50  $\mu$ l derivatizacijskega reagenta (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamid, Sigma-Aldrich, Nemčija). Derivatizacija je potekala čez noč pri sobni temperaturi, nato je bila mešanica pripravljena za analizo na plinskem kromatografu s plamensko ionizacijskim detektorjem in plinskim kromatogramu sklopljenem z masnim spektrometrom za analizo izotopskih razmerij.

#### 2.4 Plinska kromatografija

Za analizo sterolov smo uporabili plinski kromatograf (GC Agilent 6890 Series, Hoofddorp, Nizozemska) opremljen s plamensko ionizacijskim detektorjem in ZB-35 kapilarno kolono (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija). Nosilni plin je bil helij (čistost 5.0) s pretokom 1 ml/min. Injicirali smo 1  $\mu$ l vzorca, pri temperaturi injektorja 260 °C in temperaturi detektorja 300 °C. Program je bil sledeč: 1 min pri 180 °C, nato 9 °C/min do 300 °C, kjer je temperatura ostala konstantna za deset minut. Kromatogrami so bili obdelani s pomočjo Agilent Chemstation programske opreme. Kvantifikacija je potekala s pomočjo internega standarda.

#### 2.5 Analiza razmerij stabilnih izotopov ogljika

V vzorcih, v katerih smo izmerili vsebnost sterolov, smo določili še izotopsko sestavo ogljika z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov, sklopljenim s plinskim kromatografom preko sežigne enote (*ang.* Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry - GC-C-IRMS; Isoprime GV, UK). Analize smo izvajali na kapilarni koloni DB-1MS dimenzije 60 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m, kot nosilni plin smo uporabili He (pretok 1,5 mL/min). Injicirali smo 1 mL vzorca, raztopljenega v izooktanu pri temperaturi 120 °C (zadrževalni čas 1 min), nato smo temperaturo v pečici postopoma dvigali za 3 °C/min do 300 °C, ter 20 min vzdrževali pri tej temperaturi. Temperatura injektorja je bila 280 °C. Ponovljivost in natančnost meritev smo spremljali z uporabo referenčnih materialov mešanice *n*-alkanov C1 (Indiana University, USA) z definirano  $\delta^{13}\text{C}$  vrednostjo in s pomočjo maščobne kisline C19:0 (nanodekanojska

kislina, Restek), različnih koncentracij, z  $\delta^{13}\text{C}$  vrednostjo  $-29,8 \text{ ‰}$ , ki smo jo predhodno določili z elementnim analizatorjem sklopljenim z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (EA-IRMS; Europa Scientific 20-20 s preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce ANCA-SL). Napaka meritev, določena na podlagi treh različnih paralelnih meritev vzorca, je bila med  $0.3$  in  $1.0 \text{ ‰}$ . Meritve izotopske sestave C v sterolih izražamo s tako imenovano  $\delta$ -vrednostjo v  $\text{‰}$  preko naslednje enačbe:

$$\delta^{13}\text{C}_{V-PDB}(\text{‰}) = \left[ \left( \frac{R_{VZ}}{R_{ST}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (1)$$

kjer je R razmerje izotopov  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v vzorcu (vz) oziroma standardu (st). Za ogljik je privzet karbonatni standard V-PDB.

## 2.6 Statistična analiza

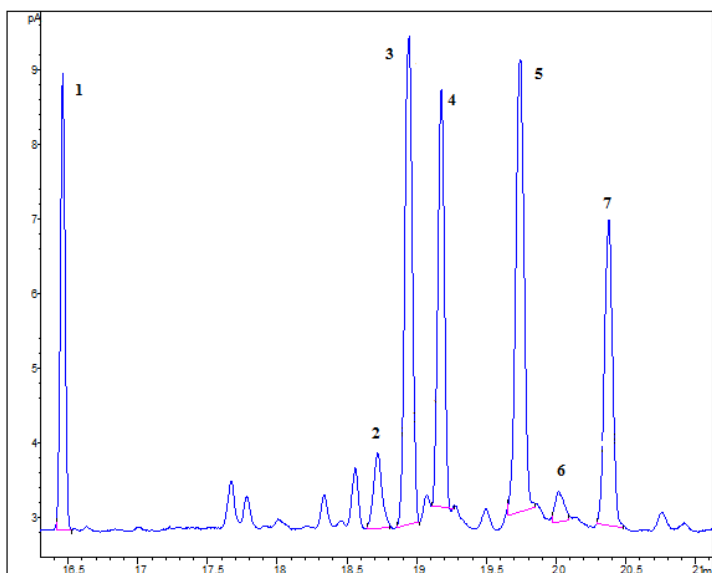
Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili kemometrijski analizi PCA (metoda glavnih osi) in RDA (regularizirana diskriminantna analiza) s pomočjo programa SCANWIN (Minitab Inc, PA, USA).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

S pomočjo plinske kromatografije smo analizirali vzorce bučnega olja ter identificirali šest sterolov:  $\beta$ -sitosterol, spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol, stigmastenol, avenasterol (slika 1).

### 3.1 Geografska delitev

Povprečne koncentracije  $\beta$ -sitosterola znašajo  $1,29 \text{ g/L}$  za vzorce iz Slovenije,  $1,97 \text{ g/L}$  za vzorce iz Avstrije,  $2,91 \text{ g/L}$  za vzorce iz Hrvaške in kar  $7,53 \text{ g/L}$  za vzorce iz preostalih držav, iz katerih smo pridobili bučna semena (preglednica 1). Tudi koncentracije spinasterola so najnižje pri vzorcih iz Slovenije ( $6,93 \text{ g/L}$ ), najvišje pa pri hrvaških vzorcih ( $18,96 \text{ g/L}$ ). Enako velja za vrednosti stigmastatrienola, stigmastadienola, stigmastenola ter avenasterola. Koncentracije vseh detektiranih in identificiranih sterolov so najnižje pri vzorcih iz Slovenije. Medtem ko slovenski in hrvaški vzorci vsebujejo največ stigmastadienola izmed detektiranih sterolov, vsebujejo avstrijski vzorci največ spinasterola. Koncentracije vseh detektiranih sterolov so precej višje v vzorcih iz Hrvaške in preostalih držav, medtem ko slovenski in avstrijski vzorci bučnega olja vsebujejo precej manj identificiranih sterolov.



**Slika 1:** Tipičen kromatogram sterolov v vzorcu bučnega olja. 1, holesterol; 2,  $\beta$ -sitosterol; 3, spinasterol; 4, stigmastatrienol; 5, stigmastadienol; 6, stigmastenol; 7, avenasterol. Kromatogram je v skladu z že objavljenimi podatki (Wenzl, 2002; Mandl, 1999)

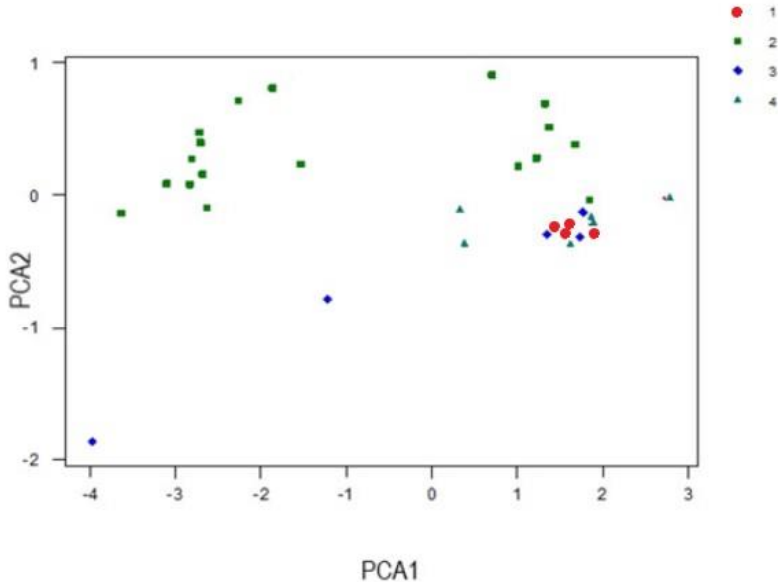
**Preglednica 1:** Povprečne koncentracije sterolov in pripadajočih standardnih odklonov za vrednosti vzorcev bučnega olja, zbranih iz različnih držav

Država	Vsebnost sterolov (g/L)					
	$\beta$ sitosterol	spinasterol	stigma- statrienol	stigma- stadienol	stigma- stenol	avenasterol
Slovenija (n=6)	1,3 (0,5)	6,9 (2,3)	6,3 (1,7)	7,6 (2,7)	0,3 (0,1)	4,8 (1,9)
Hrvaška (n=4)	2,9 (1,8)	19,0 (10,8)	17,7 (12,6)	19,2 (14,3)	0,8 (0,7)	12,0 (9,5)
Avstrija (n=6)	2,0 (1,4)	9,0 (4,3)	8,1 (3,7)	7,8 (3,5)	0,4 (0,3)	6,2 (3,8)
Sk* (n=19)	7,5 (3,3)	17,7 (8,9)	16,6 (8,3)	19,3 (10,0)	0,4 (0,3)	12,3 (7,1)

Sk\*, skupina različnih držav: Sk\*: n=3 (Rusija, Makedonija, Turčija, Španija), n=2 (Sirija), n=1 (Nizozemska, Grčija, Švedska, Ukrajina, Moldavija);

Vsi ti podatki nakazujejo možnost uspešnega geografskega razlikovanja vzorcev na podlagi vsebnosti sterolov. Na sliki 2 je prikazana kemometrična porazdelitev vseh vzorcev s pomočjo metode PCA. Dobro so ločeni vzorci bučnega olja iz skupine različnih držav, ki se nahajajo v zgornjem delu diagrama. Pod njimi se nahajajo vzorci iz Avstrije, Slovenije in Hrvaške, ki pa se deloma prekrivajo. Torej samo s

sterolno sestavo bučnega olja, navkljub velikemu naboru vzorcev, ni možno ločiti vzorcev z geografskim poreklom blizu skupaj. Zatorej sklepamo, da je sterolna sestava preveč podobna in je genetski vpliv močnejši od okoljskega.



**Slika 2:** Porazdelitev 37ih vzorcev bučnih olj iz Slovenije (+), Hrvaške (◆), Avstrije (▲) in ostalih držav (■), upoštevajoč 6 spremenljivk (identificirani steroli) na podlagi PCA analize

Pri nekaterih vzorcih različnega geografskega porekla smo preliminarno določili vrednosti izotopskega razmerja ogljika posameznih sterolov (preglednica 3). Vrednosti za vzorce iz Makedonije, Savinjske ter Kozjanskega so višje in zajemajo vrednosti med -27,3 ter -29,9 ‰. Nižje vrednosti smo izmerili v vzorcih iz Madžarske, Prekmurja, Švedske, Španije ter Združenih držav Amerike in sicer med -30,7 ter 32,5 ‰.

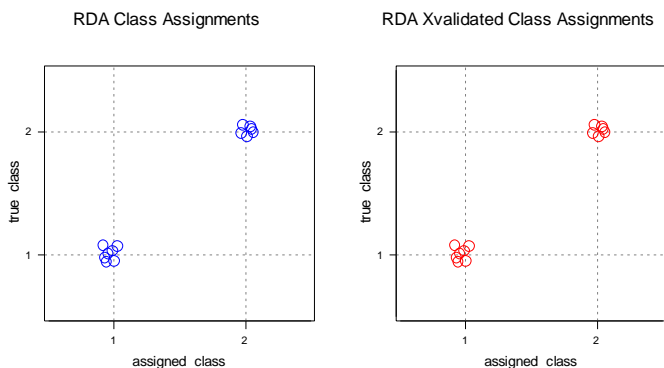
**Preglednica 3:**  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) vrednosti vzorcev bučnih olj za posamezne sterole

Poreklo vzorca	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
	stigmastatrienol	spinasterol	stigmastadienol	avenasterol
Slovenija, Kozjansko	-27,3	-27,8	-28,3	-28,5
Slovenija, Savinjska	-28,6	-28,5	-29,9	-28,9
Slovenija, Prekmurje	-31,8	-31,1	-31,4	-30,9
Švedska	-31,3	-31,2	-31,8	-31,8
Španija	-31,3	-31,5	-31,6	-32,5
Madžarska	-31,2	-31,8	-28,4	-30,3
Makedonija	-27,5	-28,2	-27,6	-27,5
ZDA	-31,0	-30,7	-31,0	-29,6

### 3.2 Botanična pristnost

Bučnemu olju smo dodali cenejša olja, ki pripadajo različnim botaničnim družinam, v utežnem deležu od 1 do 10 %. Sončnica spada v družino nebinovk, soja med stročnice, repica med križnice ter buče med buče. Ta raznolikost ima za posledico tudi različno sterolno sestavo. Kot že omenjeno, v bučnem olju, kot posebnost med rastlinskimi olji, prevladujejo  $\Delta^7$ -steroli, in sicer ta vsebuje dosti več spinasterola, stigmastatrienola, stigmastadienola ter avenasterola kot druga čista olja, uporabljena v raziskavi. Vsebuje pa precej manj  $\beta$ -sitosterola, ki spada med  $\Delta^5$ -sterole. Olje oljne ogrščice vsebuje izmed identificiranih  $\Delta^7$ -sterolov le stigmastatrienol (0,35 g/L). Le-tega je precej manj kot v bučnem olju (6,29 g/L). Medtem ko pa vsebuje olje oljne ogrščice bistveno več  $\beta$ -sitosterola kot bučno olje. Posledično mešanje bučnega in repičnega olja vodi k zmanjšanju vseh raziskanih  $\Delta^7$ -sterolov v pripravljenih mešanica v primerjavi s čistim bučnim oljem. Večji dodatek olja za potvarjanje torej pomeni linearno znižanje vsebnosti  $\Delta^7$ -sterola. Sojino olje poleg stigmastatrienola (2,76 g/L) vsebuje še stigmastadienol (0,96 g/L) izmed  $\Delta^7$ -sterolov. Sončnično pa sicer vsebuje vse identificirane  $\Delta^7$ -sterole, razen avenasterola, le da so njihove koncentracije precej nižje kot v bučnem olju (preglednica 2).

Vsa uporabljena olja za potvarjanje se med seboj razlikujejo glede prisotnosti in koncentracije posameznih  $\Delta^7$ -sterolov, hkrati pa so te vrednosti razlikujejo tudi od sterolov v bučnem olju. Zaradi vseh teh razlik smo pričakovali, da bo statistična obdelava podatkov ločila čista bučna olja od potvorjenih. Na sliki 3 lahko vidimo, da uporaba RDA analize jasno loči skupino čistih bučnih olj od skupine vzorcev potvorjenih olj.



**Slika 3:** Razvrstitev čistih bučnih olj (skupina 2) in bučnih olj, potvorjenih z oljem oljne ogrščice (skupina 1), določeno s 6 spremenljivkami (identificirani steroli), na podlagi izračunanega RDA modela

**Preglednica 2:** Sterolna sestava čistih in potvorjenih bučnih olj

Vzorec	Vsebnost sterolov (g/L)					
	$\beta$ -sitosterol	Spina sterol	Stigmasta trienol	Stigmasta dienol	Stigma stenol	Avena sterol
SO	7,88	0,00	2,76	0,96	0,00	0,00
RO	7,45	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00
SfO	11,43	0,21	2,64	2,43	0,21	0,00
BO	1,64	8,64	6,29	8,88	0,17	5,73
10% Sf	4,33	6,23	2,79	5,16	0,18	3,01
5% SfO	3,57	7,51	5,86	7,50	0,18	3,35
4% SfO	3,27	7,76	5,98	7,66	0,18	3,38
3% SfO	3,02	8,00	6,14	7,89	0,18	4,44
2% SfO	2,88	8,22	6,23	8,11	0,17	4,49
1% SfO	2,80	8,98	6,25	8,89	0,17	5,35
10% RO	7,26	7,60	5,44	7,02	0,04	4,81
5% RO	5,47	8,01	6,01	7,89	0,08	5,13
4% RO	4,87	8,21	6,18	8,05	0,09	5,25
3% RO	2,50	8,33	6,31	8,31	0,11	5,31
2% RO	2,50	8,50	6,47	8,44	0,12	5,48
1% RO	2,30	8,54	6,58	8,54	0,12	5,56
10% SO	5,18	7,73	5,30	5,91	0,01	3,45
5% SO	3,44	7,99	6,10	8,59	0,10	4,08
4% SO	3,05	8,07	6,15	8,87	0,11	5,00
3% SO	2,58	8,26	6,20	8,90	0,12	5,25
2% SO	2,10	8,44	6,22	8,90	0,12	5,30
1% SO	1,61	8,52	6,28	8,92	0,14	5,56

SO, sojino olje; RO, repično olje; SfO, sončnično olje; BO, bučno olje

#### 4 SKLEPI

V raziskavi smo vzorcem bučnega olja iz različnih držav s pomočjo plinske kromatografije določili sterolno sestavo. Prevladujejo  $\Delta^7$ -steroli, izmed njih smo detektirali in identificirali 6 sterolov, in sicer  $\beta$ -sitosterol, spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol, stigmastenol ter avenasterol. Višje vrednosti sterolov dosežejo vzorci iz Hrvaške in iz drugih držav, v primerjavi s slovenskimi in avstrijskimi. Z uporabo kemometrije je razvidno, da so se ločili vzorci iz drugih držav od skupine, ki je zajemala slovenske, avstrijske in hrvaške vzorce. Medtem ko se slednji med sabo samo na podlagi sterolne sestave niso jasno ločili.

Bučno olje je pogosto tarča potvarjanj z drugimi rastlinskimi olji. V raziskavi smo za potvarjanje uporabili sojino, sončnično in repično olje v utežnem deležu od 1 do 10 %. Med uporabljenimi olji so velike razlike v sterolni sestavi. Olja za potvarjanje vsebujejo precej manj  $\Delta^7$ -sterolov v primerjavi z bučnim oljem. Zatorej

smo s pomočjo kemometrije jasno ločili skupino bučnih olj s skupino potvorjenih vzorcev za vse vrste dodanih olj, vključno z dodatkom 1 % tujega olja.

Z določanjem sterolne sestave bučnega olja sklopljenim s kemometrijo lahko uspešno ugotovimo botanično pristnost olja, celo do dodatka tujega olja v višini 1%, medtem ko za določanje geografskega porekla metoda ni najbolj primerna oz. bi jo bilo potrebno dopolniti z merjenjem drugih komponent v olju.

**Zahvala.** Raziskovalni program št. 110-74/2012-2 je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Butinar B., Bučar-Miklavčič B., Valenčič V., Raspor P. Stereospecific analysis of ariacylglycerols as a useful means to evaluate genuineness of pumpkin seed oils: lesson from virgin olive oil analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 5227-5234.
- Fruhvirth G.O., Hermetter A.. Production technology and characteristics of Styrian pumpkin seed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; 110: 67-644.
- Hrastar R., Petrišič M.G., Ogrinc N., Košir I.J. Fatty acid and stable carbon isotope characterization of *Camelina sativa* oil: implications for authentication. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 579-585.
- Makovšek K. Določanje sterolov v bučnih oljih s plinsko kromatografijo. Diplomsko delo. 2003: 42 str.
- Mandl A., Reich G., Lindner W. Detection of adulteration of pumpkin seed oil by analysis of content and composition of specific  $\Delta^7$ -phytosterols. *European Food Research and Technology*. 1999; 209: 400-406.
- Murkovič M., Piironen V., Lampi A.M., Kraushofer T., Sontag G. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chem.* 2004; 84: 359-365.
- Procida G., Stancher B., Cateni F., Zacchigna M. Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil. *J. Sci. Food Agric.* 2012; 93: 1035-1041.
- Potočnik T., Ogrinc N., Potočnik D., Košir I.J. Fatty acid composition and  $\delta^{13}\text{C}$  isotopic ratio characterisation of pumpkin seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016; 53: 85-90.
- SURS. Površine poljščin, Slovenija, 2017. Citirano dne: 15. november, 2017: <http://www.stat.si/StatWeb/News/Index/6960>
- Wenzl T., Prettnner E., Schweiger K., Wagner F.S. An improved method to discover adulteration of Styrian pumpkin seed oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2002; 53: 193-202.

## VALIDACIJA IN UPORABA METODE ZA DOLOČANJE STEROLOV V RIČKOVEM OLJU

Zala KOLENC<sup>22</sup>, Tanja POTOČNIK<sup>23</sup> in Iztok Jože KOŠIR<sup>24</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 6. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 23. 11. 2017

### Izvleček

Ričkovo olje ima ugodne prehranske in zdravstvene učinke zaradi svoje sestave maščobnih kislin, tokoferolov in glukozinolatov, kot tudi zaradi edinstvene sterolne sestave. V vzorcih ričkovega olja smo določili vsebnost sterolov s plinsko kromatografijo ob uporabi internega standarda (betulin). Ekstrakcija sterolov je potekala tako, da smo vključili saponifikacijo ter v nadaljevanju tudi ekstrakcijo na trdnem nosilcu (C18-E-SPE). Metodo smo validirali in rezultati kažejo, da je metoda specifična, selektivna, ponovljiva ter obnovljiva. Rezultati kažejo zelo visoko točnost (85 do 98 %) ter linearnost s korelacijskim koeficientom več kot 0,99 (tako za posamezne sterole kot betulin). Določili smo povprečne vsebnosti sterolov v vzorcih ričkovega olja, ki izvirajo iz Slovenije in določili, da so povprečne koncentracije brasikasterola 21,4 mg/100g olja, kampesterola 153,6 mg/100g olja, stigmasterola 3,9 mg/100g olja in  $\beta$ -sitosterola 447,0 mg/100g ričkovega olja.

**Ključne besede:** ričkovo olje, steroli, določanje sterolov, plinska kromatografija

## VALIDATION OF METHOD FOR STEROL DETERMINATION AND ITS USE IN CAMELINA OIL

### Abstract

Camelina oil has appropriate nutritional and health properties due to fatty acids, tocopherols and glucosinolates content and especially because of unique sterol composition. Sterols in camelina oil samples were determined by gas chromatography using internal standard (betulin). The method includes saponification step followed by solid phase extraction on C18-E-SPE. The method was validated and the results proved that the chosen method is specific, selective, repeatable and reproducible. Furthermore, results confirmed very good recovery (85% to 98 %) and linearity with the correlation coefficient of more than 0,99 for

<sup>22</sup> Dr. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: zala.kolenc@ihps.si

<sup>23</sup> Dipl. inž. živ. teh., prav tam, Slovenija e-pošta: tanja.potocnik@ihps.si

<sup>24</sup> Dr., prav tam, e-pošta: izok.kosir@ihps.si



all sterols used and betulin as well. The quantitatively assessed average contents of sterols in camelina oil samples of Slovenian origin were 21.4 mg/100g for brassicasterol, 153.6 mg/100g for campesterol, 3.9 mg/100g for stigmasterol and 447.0 mg/100g for  $\beta$ -sitosterol.

**Keywords:** camelina oils, sterols, sterol determination, gas chromatography

## 1 UVOD

Riček (*Camelina sativa* (L.) Crantz) je v Sloveniji uveljavljen kot alternativna oljna poljščina z visoko prehransko vrednostjo semen (ali olj). Botanično spada riček v skupino *Brassicaceae* in je v Sloveniji imenovan tudi nepravi lan ("false flax") ali zlato radosti ("gold of pleasure") (Bavec, 2001). Rode (2002) navaja, da naj bi v Sloveniji imenovali navadni riček tudi "toter". Ričkovo olje je v zadnjem času vedno bolj popularno, saj ga uvrščamo med potencialna funkcionalna živila zaradi njegovih pozitivnih lastnosti na zdravje in ugodne kemijske sestave. Za funkcionalna živila se namreč lahko štejejo živila, za katera je dovolj trdno dokazano, da imajo razen svoje hranilne vrednosti še poseben vpliv na zdravje človeka, njegovo fizično in psihično storilnost ter na počutje. Po drugi strani se ričkovo olje ne uporablja le za prehrano, ampak tudi za proizvodnjo biodizla (z nižjimi proizvodnimi stroški kot oljna ogrščica) ter v kozmetični industriji za izdelke namenjene negi kože.

Posušena semena navadnega rička vsebujejo 30 – 40 % olja v suhi snovi, pri zimskih sortah se vsebnost olja v suhih semenih lahko dvigne tudi do 45 % (Zubr in Matthäs, 2002). Postopek proizvodnje ričkovega olja poteka tako, da najprej semena dobro zdrobimo in nato tako pridobljeno maso stiskamo pri temperaturi 100 °C. Tako dobimo ričkovo olje, ki je lepe rumene barve z značilnim vonjem in močnim okusom. Če olje uporabljamo v prehrani ljudi ali v kozmetične namene, se na koncu opravi še postopek deodorizacije.

Ričkovo olje vsebuje približno 50 % večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), delež linolne kisline (LA) je približno 15 %, delež  $\alpha$ -linolenske kisline (ALA) pa približno 40 % (Zubr in Matthäus, 2002). Olje navadnega rička vsebuje 15 - 20 % oleinske kisline in tudi 15 - 20 % linolenske kisline, 10 - 15 % gondojske kisline in 3 % eruka kisline (Hrastar, 2011). Idealno razmerje n:6/n:3 maščobnih kislin v oljih za uživanje znaša 5:1. Ker ima ričkovo olje visoko vsebnost n:3 maščobnih kislin, lahko zelo pozitivno vpliva na izboljšanje razmerja n:6/n:3. Ričkovo olje je bogato tudi z visoko vsebnostjo antioksidantov kot je tokoferol, ki ga je v povprečju 700 mg/kg ričkovega olja. Visoka vsebnost glukozinolatov je tudi značilna za ričkovo olje, kar je pomembno za povečanje oksidativne stabilnosti (García-Llatas in Rodríguez-Estrada, 2011).

Rastlinski steroli (fitosteroli) so prehransko zelo pomembni lipidi kot neumiljive komponente olj. Fitosteroli imajo veliko pozitivnih učinkov, zaradi česar lahko živila, ki imajo večjo vsebnost le-teh, štejejo med funkcionalna živila. Fitosteroli naj bi v optimalni kombinaciji z drugimi rastlinskimi metaboliti kazali antikancerogene učinke (Cañabate-Díaz in sod., 2007). Fitosteroli so po kemijski strukturi zelo podobni holesterolu, razlike so pri sintezi, intestinalni absorpciji in metabolizmu. Ravno zaradi tega fitosteroli "tekmujejo" za vezavo na iste receptorje v prebavnem traktu človeka kot holesterol, kar se kaže v zmanjšanju vsebnosti skupnega holesterola in LDL (low density) holesterola v krvi (Moghadasian in sod., 1999). Na takšen način lahko s povečanim uživanjem fitosterolov (2 g na dan uživanja sterolov in stanolov) zmanjšamo LDL holesterol do 10 %, medtem ko se uživanje večjih količin sterolov ne kaže v dodatnem znižanju vsebnosti LDL holesterola v krvi človeka.

Rastlinska olja so kompleksne mešanice neumiljivih komponent v lipidih ter kompleksnih matriksih, zato je določanje koncentracije sterolov zahtevno. Analitske tehnike za določanje sterolov tako vključujejo procese ekstrakcije, izolacije, separacije, purifikacije, detekcijske in kvantifikacije. V več raziskavah se je kombinacija ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) v kombinaciji s plinsko kromatografijo (GC) izkazala za najbolj primerno metodo za določanje koncentracije sterolov v oljih (Toivo in sod., 2001; Lagarda in sod., 2006; Al-Ismael in sod., 2010).

Namen raziskave je bil validirati metodo za določevanje koncentracije sterolov v ričkovem olju in jo preizkusiti na vzorcih ričkovega olja slovenskega izvora.

## **2 MATERIAL IN METODE**

Uporaba GC kot analitične metode za določanje sterolov se kaže kot bolj natančna in občutljiva v primerjavi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (Abidi, 2001). Tako smo v naši raziskavi opravili najprej saponifikacijo sterolov (tako smo sterole sprostili), nato ekstrakcijo na trdni fazi, da smo sterole ločili iz vzorca. Sledila je analiza (detekcija) sterolov na GC (Povše, 2012).

### **2.1 Vzorci v analizi**

Uporabili smo vzorce ričkovega olja, katerih semena so bila nabrana pri pridelovalcih po Sloveniji. Olje iz tako pridobljenih semen je bilo iztisnjeno v laboratoriju Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

## 2.2 Reagenti

Uporabljeni reagenti etanol (99,8 %), betulin (97,5 %), kloroform (99,0 – 99,4 %), metanol (99,9 %), stigmasterol (95 %), kampesterol (65 %), brasikasterol (98 %),  $\beta$ -sitosterol (90 %) so bili vsi proizvodi podjetja Sigma-Aldrich (Nemčija), kalijev hidroksid pa podjetja Riedel-de-Haën (Švica). Standardi so bili pripravljene v raztopini metanol/kloroform (5 % v/v). Delovne raztopine standardov so bile v koncentracijah: kampesterol (1 mg/mL),  $\beta$ -sitosterol (5 mg/mL), stigmasterol (10 mg/mL) in brasikasterol (5 mg/mL).

## 2.3 Priprava vzorca

Priprava vzorca je eden kritičnih korakov v analizi. V naši raziskavi smo uporabili 0,74 g vzorca ričkovega olja, ki smo mu dodali 10 mL 0,5 M KOH v etanolu. Tako raztopino smo dobro premešali in za 20 minut pri 77 °C segrevali. Po ohlajanju smo dodali 10 mL 0,22 mg/mL betulina (interni standard) v kloroformu in mešali 5 minut. Nato smo pustili, da se je usedlina posedla in tekočo fazo prefiltrirali ter filtrat uporabili za nadaljnjo ekstrakcijo. Sledila je ekstrakcija na trdi fazi z nosilcem (cartridges condition strata) C18-E-SPE (55  $\mu$ m, 70A, Phenomenex). Nosilce smo pred ekstrakcijo izpirali z metanolom (5 mL), nato s kloroformom (5 mL), zatem pa smo dodali 1 mL saponificiranega vzorca z dodanim internim standardom. Sterole smo izprali z metanolom v kloroformu (5 % v/v). Zbran ekstrakt smo evaporirali (pri 35 °C) do suhega, sterolno frakcijo pa raztopili v 1 mL istega topila.

## 2.4 Plinska kromatografija

Plinsko kromatografijo smo opravili na napravi Agilent 6890 gas chromatograph (Santa Clara, USA), opremljenim s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Uporabili smo kapilarno kolono HP-5 (J&W Scientific, ZDA) dolžine 30 m, premera 0,32 mm in filmom debeline 0,25  $\mu$ m s stacionarno fazo 5 %fenil-metil polisiloksan, 95 % dimetil poliksiloksan. Konstantni pretok nosilnega plina - helija smo nastavili na 1 mL/min, uporabljena temperatura injiciranja je bila 320 °C, temperatura detektorja pa 300 °C. Temperaturni program je naraščal od 220 °C do 350 °C in sicer za 3 °C/min, na koncu pa se je temperaturni profil ustavil pri temperaturi 350 °C za 6 minut. Za GC analizo smo injicirali 2  $\mu$ l vzorca. Identifikacija sterolov (brasikasterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, kampesterol) je bila opravljena s primerjavo retenzijskih časov ( $t_r$ ) standardov omenjenih sterolov glede na retenzijski čas internega standarda (betulina).

## 2.5 Validacija metode

Da smo metodo validirali smo najprej določili ponovljivost in obnovljivost metode. Tako smo v prvem delu optimizirali pogoje priprave vzorca in GC analize, nato smo z določenimi pogoji analizirali posamezne standarde, da smo jim določili  $t_r$ , nato pa smo analizirali tudi mešanico vseh standardov in poskrbeli, da smo dobili popolno ločljivost posameznih kromatografskih vrhov. Na takšen način smo določili specifičnost in selektivnost. Določili smo tudi ponovljivost in časovno obnovljivost metode tako, da smo dva zaporedna dni naredili 6 meritev na istem vzorcu ričkovega olja. Za določanje točnosti (recovery) smo v vzorec ričkovega olja dodali standardno mešanico sterolov (16,7 mg brasikasterola, 3,6 mg stigmasterola, 81,2 mg kampesterola in 16,6 mg  $\beta$ -sitosterola). Za določanje linearnosti metode smo izračunali korelacijski koeficient za posamezen sterol v delovnih koncentracijah. In sicer za betulin 0,058 – 0,220 g/L, za brasikasterol 0,00154 – 0,15 g/L, za kampesterol 0,00544 – 0,6 g/L, za stigmasterol 0,00307 – 0,3 g/L in za  $\beta$ -sitosterol 0,0082 – 0,8 g/L.

## 2.6 Analiza vzorcev

V analizo smo vključili 21 vzorcev ričkovega olja (kot je opisano v točki 2.1) slovenskega porekla. Izračunali smo povprečne vrednosti, standardno deviacijo ter relativno standardno deviacijo za posamezen sterol.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za validacijo metode, smo najprej določili  $t_r$  za vse standarde, ki smo jih v analizi uporabili, vključno z betulinom, ki nam je služil kot interni standard. Tako smo pridobili vrednosti za brasikasterol (6,03 min), kampesterol (6,23 min), stigmasterol (6,33 min),  $\beta$ -sitosterol (6,65 min) in betulin (8,19 min). Rezultati kažejo, da je metoda specifična in selektivna, saj smo dosegli popolno ločbo kromatografskih vrhov.

V nadaljevanju smo določali ponovljivost in obnovljivost metode, rezultati so prikazani v preglednici 1. Meritve so bile izvedene v 6. ponovitvah. Nobena izmed meritev ni bila mimobežnik. Rezultate meritev prvega in drugega dne smo primerjali s t-testom in ugotovili, da so med sabo primerljivi (preglednica 1). Relativni standardna deviacija meritev za posamezen sterol je bil 4,9 % za brasikasterol, 6,6 % za kampesterol, 38,1 % za stigmasterol in 7,0 % za  $\beta$ -sitosterol. Iz rezultatov lahko zaključimo, da je metoda ponovljiva in obnovljiva.

**Preglednica 1: Rezultati za določanje ponovljivosti in obnovljivosti metode**

Sterol	Vsebnost sterolov 1. dan (mg/100 g)*	Vsebnost sterolov 2. dan (mg/100 g)*	F- izračunan	t- izračunan
Brasikasterol	18,3 <sup>a</sup> ± 0,9 <sup>b</sup>	18,8 ± 0,9	0,861	1,02
Kampesterol	175,2 ± 11,5	179,8 ± 12,4	0,849	0,66
Stigmasterol	5,5 ± 2,1	4,8 ± 2,4	0,802	0,45
β-sitosterol	501,7 ± 35,6	540,4 ± 26,1	1,862	2,15

<sup>a</sup>povprečje; <sup>b</sup>standardna deviacija; za primerjavo F-testa in t-testa izračunanih vrednosti uporabimo teoretične (F- teoretična vrednost je 5,829 in t-teoretična vrednost je 2,23).

Za določanje točnosti (recovery) smo vzorcu ričkovega olja (s predhodno določeno koncentracijo sterolov) dodali znano količino sterolov, jih ponovno pomerili in določili izkoristek. Rezultati kažejo zelo dober izkoristek in sicer za brasikasterol 85,7 %, za kampesterol 90,0 %, za stigmasterol 85,1 % in za β-sitosterol 98,1 % (preglednica 2).

**Preglednica 2: Rezultati meritev izkoristka za posamezne sterole s standardnim dodatkom vzorcu ričkovega olja**

Ime vzorca	Koncentracija sterolov (mg/100 mL)			
	Brasikasterol	Kampesterol	Stigmasterol	β-sitosterol
Vzorec brez dodatka	22,2	134,7	5,0	474,9
Vzorec z dodatkom*	33,3	146,4	7,3	482,3
Standardni dodatek (%)	85,7	90,0	85,1	98,1

\*dodana je bila znana koncentracija sterolov (16,7 mg brasikasterola, 3,6 mg kampesterola, 1,2 mg stigmasterola in 16,6 mg β-sitosterola )

Linearnost metode smo določali v območju, ki smo da uporabljali v metodi. Rezultati kažejo, da je metoda linearna v delovnih koncentracijah, ki smo jih uporabili, s korelacijskimi koeficienti med 0,991 in 0,997. V preglednici 3 so podani rezultati določanja linearnosti, s korelacijskimi koeficienti in enačbami umeritvenih krivulj.

Na podlagi vseh pridobljenih rezultatov smo opisano in validirano metodo za določanje sterolov uporabili za določitev sterolov v realnih vzorcih ričkovega olja. V preglednici 4 so prikazane povprečne vrednosti posameznih sterolov, standardni in relativni standardni odmik in minimalne ter maksimalne vsebnosti posameznih sterolov.

**Preglednica 3:** Rezultati določitve linearnosti s pripadajočim korelacijskim koeficientom, umeritveno krivuljo in koncentracijskim območjem

	<b>Korelacijski koeficient (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Linearna enačba</b>
Betulin	0,993	$y = 2719x + 6,890$
Brasikasterol	0,994	$y = 1827x - 6,345$
Kampesterol	0,997	$y = 2588x - 19,050$
Stigmasterol	0,991	$y = 2381x - 3,831$
β-sitosterol	0,996	$y = 2181x - 32,730$

**Preglednica 4:** Povprečna vsebnost posameznih sterolov v vzorcih ričkovega olja

<b>Sterol</b>	<b>Povprečje (mg/100g)*</b>	<b>SD (mg/100g)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>min-max (mg/100g)</b>
Brasikasterol	21,4	4,5	21,0	15,9 – 34,5
Kampesterol	153,6	21,1	13,7	121,8 – 199,4
Stigmasterol	3,9	1,7	43,6	1,4 – 6,9
β-sitosterol	447,0	68,2	15,3	324,1 – 552,8

\*n= 21, SD= standardna deviacija, RSD= relativna standardna deviacija

Povprečna vrednost vsebnosti brasikasterola v ričkovem olju je 21,4 mg/100 g, kar je primerljivo z raziskavo Schwartz in sod. (2008), ki so koncentracijo brasikasterola v ričkovem olju določili 27 mg/100 g. Vsebnost kampesterola smo določili v ričkovem olju v povprečju 153,6 mg/100g, medtem ko so v raziskavi Schwartz in sod. (2008) vsebnosti kampesterola 117 mg/100 g. Prav tako smo primerljivo določili tudi vsebnost stigmasterola v ričkovem olju in sicer smo določili povprečno vrednost 3,9 mg/100 g, medtem ko so Schwartz in sod. (2008) določili 5,6 mg/100 g vsebnost kampesterola. Povprečna koncentracija β-sitosterola je bila v naši raziskavi določena 447,0 mg/100 g, medtem ko so Schwartz in sod. (2008) določili vsebnost istega sterola v malo nižji koncentraciji in sicer 300 mg/100 g, vendar še vedno primerljivo.

#### 4 ZAKLJUČEK

Rezultati raziskave kažejo, da je mogoče opisano metodo (kombinacija ekstrakcije na trdnem nosilcu in plinske kromatografije) primerno validirati. Poleg tega smo ugotovili tudi, da lahko to metodo uporabljamo za določitev vsebnosti sterolov v ričkovem olju, kjer dobimo primerljive rezultate z drugimi že objavljenimi študijami.

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Abidi S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in food and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 2001; 935(1–2): 173–201.
- Al-Ismail K.M., Alsaed A.K., Ahmad R., Al-Dabbas M. Detection of olive oil adulteration with some plant oils by GLC analysis of sterols using polar column. *Food Chemistry*. 2010; 121: 1255–1259.
- Bavec M. Ekološko kmetijstvo. *Kmečki glas*. 2001; 210–213.
- Cañabate-Díaz B., Carretero S, Fernández-Gutiérrez A., Belmonte Vega A., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L., Duran Martos J. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 2007; 102: 593–598.
- García-Llatas G., Rodríguez-Estrada M.T. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem Phys Lipids*. 2011. 164: 607–624.
- Hrastar R. Karakterizacija, deodorizacija in ugotavljanje pristnosti ričkovega olja (*Camelina sativa* (L.) *crantz*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 2011: 78 str.
- Lagarda M. J., García-Llatas, Farré R. Analysis o phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006; (41) 5: 1486–1496.
- Moghadasian M. H., Frolich J. J. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence. *American Journal of Medicine*. 1999; (107)6: 588–594.
- Povše R. Določanje sterolne sestave olja navadnega rička (*Camelina sativa* (L.) *Crantz*). Magisterska naloga, Ljubljana, Buotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 2012. 85 s.
- Rode J. Study of autochthon *Camelina sativa* (L.) *Crantz* in Slovenia. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2002; (9)4: 313–318.
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.-M. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; (21)2: 152–161.
- Toivo J., Phillips K., Lampi A.M., Piironen V. Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2001; 14: 631–643.
- Zubr J., Matthäus B. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*. 2002; (15) 2: 155–162.

## MODELNO VREDNOTENJE PREUSMERITVE DEJAVNOSTI KMETIJ

Martin PAVLOVIČ<sup>25</sup>, Andrej UDOVČ<sup>26</sup>, Uroš RAJKOVIČ<sup>27</sup>, Črtomir  
ROZMAN<sup>28</sup> in Trajče NIKOLOSKI<sup>29</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 20. 10. 2017

Sprejeto / accepted: 28. 11. 2017

### Izvleček

Strukturne spremembe predstavljajo v kmetijstvu velik izziv vse od ravni države do ravni posamezne kmetije. V ta okvir uvrščamo tudi preusmeritev individualnih kmetij. Kam in kako preusmeriti dejavnost kmetije je odvisno od številnih dejavnikov. V prispevku je predstavljen model za oceno primernosti preusmeritve kmetij v vrtnarsko (hortikulturno) dejavnost. Upoštevane so naravne danosti, demografski, ekonomski in socialni dejavniki. Izbor kriterijev, njihova struktura in pomembnost medsebojnega vpliva kriterijev v modelu slonijo na razpoložljivih statističnih podatkih o kmetijah, podatkih, ki smo jih dobili iz anketne raziskave in mnenju ekspertnega tima. Model je realiziran v skladu z metodologijo DEX z uporabo programa DEXi in je kritično ocenjen na izbranem vzorcu kmetij. Dodana vrednost tega pristopa je v transparentni razlagi ocene primernosti, ki jo uporabimo za pomoč pri odločanju o preusmeritvi dejavnosti kmetij.

**Glavne besede:** vrtnarstvo, preusmeritev kmetije, večkriterijsko odločitveno modeliranje, metoda DEX

## MODEL ASSESSMENT OF A FARM ACTIVITY REARRANGEMENT

### Abstract

Structural changes in farming present serious challenges on all levels from state level to the level of an individual farm. Rearrangement of a farm is one of these challenges. There are many factors influencing the decision for reorientation. In this contribution, a model for assessing potential of a farm for its transformation to

---

<sup>25</sup> Prof. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, UM, e-naslov: martin.pavlovic@ihps.si

<sup>26</sup> Prof. dr., Biotehniška fakulteta, UL, e-naslov: andrej.udovc@bf.uni-lj.si

<sup>27</sup> Prof. dr., Fakulteta za organizacijske vede, UM, e-naslov: uros.rajkovic@fov.uni-mb.si

<sup>28</sup> Prof. dr., Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, UM, e-naslov: crt.rozman@um.si

<sup>29</sup> Dr., Biotehniška fakulteta, UL, e-naslov: nikotraj@gmail.com



a horticultural one is presented. The model takes in account criteria such as: natural resources, demographic, economic and social factors. Criteria selection, their structure and importance of their interrelations in the model are based on statistical data about farms, data gathered by survey research and expert group opinion. The model was developed with the DEX methodology, implemented by the program DEXi, and was critically evaluated on chosen set of farms. The added value of the approach is a transparent assessment picture of the potential of a farm as a vital support for making decision about its rearrangement.

**Keywords:** horticulture, farm rearrangement, multi-criteria decision modelling, method DEX

## 1 UVOD

Če želimo odgovoriti na vprašanje: »V katero dejavnost in kako preusmeriti kako kmetijo?« moramo, ob poznavanju panoge, ustrezno analizirati kmetijo samo ter njeno širše in ožje okolje. Opazujemo številne parametre, jih ocenjujemo v danih razmerah in skušamo priti do zaključkov in napotkov. Gre za široko znanje, ki ga je potrebno pregledno predstaviti in znati utemeljiti odločitev oziroma priporočilo. V našem primeru smo del tega znanja prelili v večkriterijski ocenitveni model za pomoč pri odločanju o primernosti preusmeritve dejavnosti kmetije.

Kot primer možne preusmeritve kmetije smo izbrali panogo vrtnarstva. V tej panogi gre za pridelavo zelenjadnic, zelišč, cvetja in okrasnih rastlin. Vrtnarstvo spada med najintenzivnejše kmetijske panoge. Zanj so značilne relativno majhne obdelovalne površine, ki so intenzivno obdelane. V tem segmentu ima slovensko kmetijstvo lepe možnosti razvoja (Nikoloski, 2009; Hudina, 2011).

Večkriterijsko odločitveno modeliranje, kot eno izmed področij operacijskih raziskav, obsega različne metode, ki jih praviloma podpirajo pripadajoče programske rešitve (Figueira in sod., 2005; Ishizaka in Nemery, 2013). Njihov skupni imenovalac je ocena vsake alternative po izbranih kriterijih. Ocene posamezne alternative po kriterijih se nato združi v skupno oceno. Na tej osnovi se alternative primerjajo, razvrščajo in analizirajo. Uporabo tovrstnih metod pogosto zasledimo tudi v kmetijstvu (Žnidaršič in sod., 2008; Pavlovič in sod., 2011; Rozman in sod., 2013).

V tem prispevku najprej predstavimo uporabljeno večriterijsko metodo DEX (Bohanec in Rajkovič, 1990; Bohanec in sod., 2013) in način verifikacije in validacije znanja v modelih. Prikazan je model za oceno regije in model za oceno kmetije same. Za tem je uporaba modelov predstavljena s konkretnimi ocenami izbranih regij in kmetij. V zaključkih osvetlimo možnosti za tovrstno modeliranje in ocenjevanje, tudi ko gre za druge panoge in dejavnosti na kmetijah.

## 2 METODE

Metodološki pristop k razvoju modela za preusmerjanje kmetij sloni na kvalitativnem večkriterijskem modeliranju odločitvenega znanja po metodi DEX, ki je uporabljena v dveh korakih. Razvita sta dva modela. S prvim modelom najprej ocenimo primernost regije, v kateri se nahaja kmetija, z drugim pa ocenimo posamezno kmetijo. Poseben poudarek je na verifikaciji in validaciji modelov, ki slonita na statističnih podatkih, anketnih raziskavah in mnenju posebne ekspertne skupine.

### 2.1 DEX – metoda za kvalitativno večkriterijsko modeliranje

DEX (Decision EXpert) (Bohanec in sod., 2013; Bohanec in sod., 2015) je večkriterijska, hierarhična, kvalitativna metoda za modeliranje odločitvenega znanja. Kot vse druge večkriterijske odločitvene metode ocenjuje in analizira potencialno neskončno množico alternativ  $A=\{a_1, a_2, \dots, a_m, \dots\}$ , v našem primeru kmetij. Alternative so opisane s končno množico spremenljivk  $X=\{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ , ki jih v splošnem imenujemo atributi. Vsak atribut predstavlja opazovano oz. ocenitveno lastnost alternative. Kriterij pa imenujemo tisti atribut, po katerem določimo, kaj je slabo in kaj dobro (Figueira in sod., 2005). V našem primeru imamo opravka s kriteriji, na primer *starost gospodarja*, *izobrazba gospodarja*, *nasledstvo kmetije* pa tudi *demografski dejavniki*, kot njihov agregat.

Hierarhičnost metode DEX pomeni, da so atributi organizirani hierarhično. Gledano od zgoraj navzdol, hierarhija predstavlja dekompozicijo odločitvenega problema na podprobleme. Gledano od spodaj navzgor, so višje ležeči atributi odvisni od nižje ležečih, ki so bolj elementarni. Najbolj elementarne attribute imenujemo osnovni atributi. To so končni vozli v hierarhiji in predstavljajo osnovne karakteristike opazovanih alternativ. Višje ležeči atributi, ki so odvisni od nižje ležečih, se imenujejo agregirani atributi in predstavljajo ocene alternativ. Običajno se na vrhu hierarhije nahaja en sam atribut, ki se imenuje koren in predstavlja končno oceno alternativ.

V našem primeru predstavljajo atributi: *starost gospodarja*, *izobrazba gospodarja* in *nasledstvo kmetije* osnovne kriterije. Višje nivojski kriterij *demografski dejavniki* je agregirani kriterij, ki ga določajo prej omenjeni trije atributi. Koren drevesa pa je ocena primernosti kmetije za preusmeritev.

Za razliko od večine večkriterijskih odločitvenih metod, ki uporabljajo numerične vrednosti, je metoda DEX kvalitativna. Vsak atribut  $x_i \in X$  ima zalogo vrednosti  $D_i=\{v_{i1}, v_{i2}, \dots, v_{ik_i}\}$ , kjer je  $v_{ij}$  kaka navadna beseda, kot je 'slabo', 'dobro' ali 'odlično'. Zaloge vrednosti so večinoma majhne. Vsebujejo od 2 do 5 vrednosti in

so običajno preferenčno urejene. To pomeni, da je vsaka predhodna vrednost iz zaloge vrednosti manj ali enako zaželena od naslednje.

V metodi DEX je agregacija vrednosti, s katerimi so podane alternative in poteka po hierarhiji od spodaj navzgor, podana z odločitvenimi pravili. Ta pravila določijo odločevalca in so praviloma predstavljena v obliki odločitvenih tabel. Predpostavimo, da je  $x_{(0)} \in X$  agregirani atribut in da so  $x_{(1)}, x_{(2)}, \dots, x_{(r)} \in X$  neposredni nasledniki v hierarhiji, potem je funkcija agregacije  $f$ , ki določa vrednost agregiranega atributa  $x_{(0)} = f_{(0)}(x_{(1)}, x_{(2)}, \dots, x_{(r)})$ , definirana kot množica odločitvenih pravil oblike:

če je  $x_{(1)} = v_{(1)}$  in  $x_{(2)} = v_{(2)}$  in ... in  $x_{(r)} = v_{(r)}$ , potem je  $x_{(0)} = v_{(0)}$ ,  
kjer je  $v_{(i)} \in D_{(i)}$ ,  $i = 0, 1, \dots, r$ .

Metoda DEX je implementirana kot DEXi. Je prosto dostopna programska oprema, ki omogoča razvoj in uporabo modelov za ocenjevanje in odločanje v skladu s predstavljeno metodo DEX. Na razpolago je tudi ustrezen priročnik za uporabo (Bohanec, 2014; DEXi, 2015).

## 2.2 Zajemanje in preverjanje odločitvenega znanja

Znanje v modelih za odločanje o preusmeritvi kmetije je z metodo DEX predstavljeno s kriteriji, njihovimi zalogami vrednoti, strukturo in agregacijskimi funkcijami v obliki odločitvenih tabel. To znanje smo verificirali in validirali z dvema anketama in ekspertno delavnico. Prva anketa je zajela 305 vrtnarskih kmetij, ki so odgovorile na 30 vprašanj o vplivu socio-ekonomskih dejavnikov na (pre)oblikovanje teh kmetij. Z drugo anketo smo s 15 vprašanji iskali odgovore na podobna vprašanja na kmetijah, ki se ukvarjajo z drugimi dejavnostmi. Dobili smo 68 odgovorov, ki smo jih primerjali rezultati prve ankete. Na tej osnovi smo določili kriterije, njihovo strukturo in zalogo vrednosti, ki smo jih preverjali in potrjevali na delavnici, kjer je sodelovalo 9 ekspertov s področja kmetijstva. Ob tem so eksperti ocenjevali tudi pomembnost oziroma vplivnost posameznih kriterijev pri ocenjevanju kmetije za prehod na vrtnarsko dejavnost. Zato smo uporabili metodo ocenjevanja, ki jo uporablja metoda AHP (Saaty, 1990). Tako pridobljene uteži smo uporabili za osnovo pri oblikovanju funkcij koristnosti v obliki odločitvenih pravil.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1 Predstavitev modelov

Drevo kriterijev prvega modela za oceno primernosti regije za preusmeritev kmetij v vrtnarstvo podaja slika 1. Primernost regije ocenjujemo po treh sklopih: **tla**,

**klima in energetski viri.** V okviru sklopa **tla** ocenjujemo primernost reliefa, sestave tal in števila vodnih izvirov, pri oceni klimatskih danosti pa povprečno letno temperaturo in povprečno letno količino padavin. Energetske danosti ocenjujemo glede na sončno in geotermalno energijo. Zaloge vrednosti kriterijev so kvalitativne in preferenčno urejene. Njihova vrednost narašča od nižje vrednosti k višji. Primer vrednosti za kriterij *Relief* podaja preglednica 1.

Atribut	Opis
<b>Primernost regije</b>	Primernost regije za preusmeritev kmetije
<b>Tla</b>	Danosti tal
Relief	Primernost reliefa
Sestava tal	Primernost sestave tal
Vodni izviri	Primernost števila vodnih izvirov na 100 km <sup>2</sup> površine
<b>Klima</b>	Klimatske danosti
Temperatura	Povprečna letna temperatura
Padavine	Povprečna letna količina padavin
<b>Energetski viri</b>	Energetske danosti
Sonce	Sončna energija
Geotermalna	Geotermalna energija

*Slika 1: Drevo kriterijev za oceno primernosti regije*

*Preglednica 1: Vrednosti ki jih lahko zavzame kriterij relief*

### Relief

1. **Slabo** Hribovit, nad 700 mnv
2. **Dobro** Gričevnat, do 700 mnv
3. **Odlično** Ravnina, do 700 mnv

V tem modelu imamo štiri agregirane kriterije: **tla, klima, energetski viri** in kot koren **primernost regije**, kot končno oceno. Za vsak agregirani kriterij so funkcije agregacije podane s tabelo odločitvenih pravil. Tabela odločitvenih pravil za oceno primernosti tal podaja preglednica 2. Prvo pravilo pravi, da so **tla** ocenjena **slabo**, če sta kriterija **relief** in **sestava tal** ocenjena **slabo**, ne glede na kriterij **vodni viri** (simbol »\*« pomeni katerokoli vrednost). Zadnje, 15. pravilo pa pravi, da je ocena tal **odlično**, če je **odlična** ocena **reliefa** in **sestave tal**, pri tem pa mora biti ocena **vodni izviri** vsaj **dobro**. Odstotki, prikazani v preglednici 1, predstavljajo pomembnost vsakega kriterija, ki je določena z linearno aproksimacijo odločitvenih pravil (Bohanec, 2014). Kot je razvidno iz preglednice 1, sta **sestava tal** in **vodni viri** enako pomembna kriterija, **relief** pa ima manjšo utež.

Slika 2 prikazuje drevo kriterijev drugega modela za oceno posamezne kmetije. Kmetijo ocenjujemo v okviru štirih sklopov. Prvi sklop vsebuje demografske dejavnike, kot so starost gospodarja, njegova izobrazba in nasledstvo kmetije.

Drugi sklop obravnava osnovno dejavnost kmetije, njen tip in lego. Tretji sklop danosti vsebuje oceno zemljišča, trga in primernost regije za vrtnarsko dejavnost. Oceno slednjega nam da prvi model. V četrtem sklopu ocenjujemo proizvodne dejavnike, kot so kmetijska mehanizacija na kmetiji, struktura sredstev za investicije in delež dohodka od kmetovanja. Tudi tu imamo kvalitativne zaloge vrednosti, ki vsebujejo od dve do štiri vrednosti. Imamo 8 agregiranih kriterijev, vključno s korenem, ki jim vrednosti določa 8 pripadajočih tabel odločitvenih pravil.

**Preglednica 2: Odločitvena pravila za oceno primernosti tal**

	<b>Relief</b>	<b>Sestava tal</b>	<b>Vodni izviri</b>	<b>Tla</b>
	27%	36%	36%	
1	<b>Slabo</b>	<b>Slabo</b>	*	<b>Slabo</b>
2	<b>Slabo</b>	<=Dobro	<=Dobro	<b>Slabo</b>
3	<=Dobro	*	<b>Slabo</b>	<b>Slabo</b>
4	*	<b>Slabo</b>	<=Dobro	<b>Slabo</b>
5	<b>Slabo</b>	>=Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro
6	*	Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro
7	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>	>=Dobro	Dobro
8	<=Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro
9	>=Dobro	<=Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro
10	Dobro	>=Dobro	Dobro	Dobro
11	>=Dobro	Dobro	>=Dobro	Dobro
12	<b>Odlično</b>	Dobro	*	Dobro
13	<b>Odlično</b>	>=Dobro	<b>Slabo</b>	Dobro
14	>=Dobro	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>
15	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>	>=Dobro	<b>Odlično</b>

### 3.2 Uporaba modela z razpravo

S prvim modelom smo ocenili 10 slovenskih regij z ozirom na primernost za vrtnarsko proizvodnjo (preglednica 3). Te ocene smo pri oceni primernosti posamezne kmetije vnesli kot enega izmed osnovnih kriterijev z ozirom na to, v kateri regiji se kmetija nahaja. Slika 3 prikazuje grafično predstavitev ocen štirih izbranih regij.

Pobljše si oglejmo ocene za Celjsko, Koprsko, Mariborsko in Ljubljansko regijo (preglednica 3). Celjska je ocenjena z '*odlično*', Koprška in Ljubljanska imata oceno '*dobro*', Mariborska pa '*zelo dobro*'. Kaj je vplivalo na razliko v končnih ocenah? Ocene po posameznih regijah so podane v preglednici 3. Za lažjo interpretacijo razlik, lahko izberemo le nekatere kriterije in jih prikažemo grafično (slika 3). Celjska regija je dobila najvišje možne ocene (*odlično*) v pogledu **tal** in

**energetskih virov.** **Klima**, ki jo sestavljata kriterija temperatura in padavine, pa je ocenjena z '*dobro*'. Koprška regija ima kriterij **klima** ocenjen z '*odlično*', kriterij '**tla**' pa s '*slabo*', kar z ostalimi ocenami, po mnenju ekspertne skupine, ki je določala pomembnost (uteži) kriterijev in je izražena v tabelah odločitvenih pravil, vodi v oceno '*dobro*'. Oceno '*dobro*' je dobila tudi Ljubljanska regija, ki je v primerjavi s Koprsko, boljša v pogledu kriterija '**tla**', slabša pa v pogledu kriterijev '**klima**' in '**energetski viri**'. Mariborska regija ima končno oceno '*zelo dobro*'. V pogledu kriterija 'padavine', je celo boljše ocenjena kot Koprška regija.

Atribut	Opis
<b>Ocena primernosti</b>	Ocena primernosti kmetije za preusmeritev
<b>Demog. dej.</b>	Demografski dejavniki
Starost	Starost gospodarja
Izobrazba	Izobrazba gospodarja
Nasledstvo	Nasledstvo kmetije
<b>Kmetija</b>	
Dejavnost	Osnovne dejavnosti kmetije
Tip	Tip kmetije
Lega	Lega kmetije
<b>Danosti</b>	
<b>Zemljišče</b>	
Lastništvo	Lastninski odnos
Raba	Raba zemljišča
<b>Trg</b>	
Bližina	Bližina trga
Prodaja	Način prodaje
Primernost regije	Primernost regije za vrtnarsko pridelavo
<b>Proizvod. dej.</b>	Proizvodni dejavniki
<b>Stroji</b>	Kmetijska mehanizacija na kmetiji
Izrabljenost	Stopnja povprečne izrabljenosti kmetijske mehanizacije
Obdelava	Stopnja opravljenih del s stroji
Investicije	Struktura sredstev za investicije
Dohodek	Delež dohodka od kmetovanja

*Slika 2: Drevo kriterijev za oceno primernosti kmetije*

Z drugim modelom, kjer ocenjujemo primernost posamezne kmetije za vrtnarsko proizvodnjo, smo ocenjevali 68 kmetij. Oglejmo si ocene primernosti štirih izbranih kmetij, ki jih podaja preglednica 4. Grafične predstavitev ocen štirih kmetij po izbranih kriterijih prikazuje slika 4.

Kmetija z zaporedno številko 28 ima odlično oceno primernosti za preusmeritev v vrtnarsko dejavnost. Nekaj rezerve za izboljšavo je še v stopnji opravljenih del s stroji in v sklopu '**trg**', s poudarkom na načinu prodajaje. Pri kmetiji s številko 58,

ki je ocenjena z 'dobro', je neugodna 'starost gospodarja', je pa obetavno 'nasledstvo kmetije'. Z oceno 'zadovoljivo' je ocenjena kmetija 36. S 'slabo' je ocenjena glede '**demografskih dejavnikov**' pa tudi glede dejavnosti in lege kmetije. Z 'odlično' pa je ocenjena glede možnosti prodaje, investicij in dohodka. Kmetija 53 ima skupno oceno 'slabo'. Na to vplivata predvsem kriterija 'nasledstvo' in 'lega kmetije'. Z oceno 'slabo' je ocenjen tudi sklop 'zemljišče'.

**Preglednica 3: Ocene primernosti 10 slovenskih regij za vrtnarsko proizvodnjo**

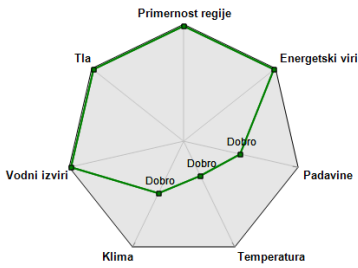
Kriterij	CELJE	KOPER	MARIBOR	LJUBLJANA	KRANJ
<b>Primernost regije</b>	<b>Odlično</b>	Dobro	Zelo dobro	Dobro	Dobro
<b>Tla</b>	<b>Odlično</b>	<b>Slabo</b>	Dobro	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>
Relief	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>
Sestava tal	<b>Odlično</b>	Dobro	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>
Vodni izviri	<b>Odlično</b>	<b>Slabo</b>	Dobro	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>
<b>Klima</b>	Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro	Dobro
Temperatura	Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro	Dobro
Padavine	Dobro	Dobro	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro
<b>Energetski viri</b>	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro	<b>Slabo</b>	<b>Slabo</b>
Sonce	<b>Odlično</b>	<b>Odlično</b>	Dobro	<b>Slabo</b>	Dobro
Geotermalna	<b>Odlično</b>	<b>Slabo</b>	Dobro	<b>Slabo</b>	<b>Slabo</b>

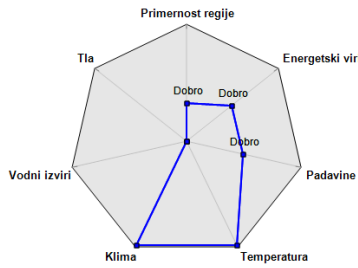
Kriterij	KOČEVJE	N. GORICA	N. MESTO	METLIKA	M. SOBOTA
<b>Primernost regije</b>	<b>Slabo</b>	Dobro	Zelo dobro	<b>Slabo</b>	Zelo dobro
<b>Tla</b>	<b>Slabo</b>	<b>Slabo</b>	Dobro	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>
Relief	Dobro	Dobro	Dobro	Dobro	<b>Odlično</b>
Sestava tal	<b>Slabo</b>	Dobro	Dobro	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>
Vodni izviri	Dobro	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>
<b>Klima</b>	Dobro	Dobro	Dobro	Dobro	Dobro
Temperatura	Dobro	Dobro	Dobro	Dobro	Dobro
Padavine	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro	Dobro	Dobro
<b>Energetski viri</b>	<b>Slabo</b>	Dobro	Dobro	<b>Slabo</b>	Dobro
Sonce	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>	Dobro	Dobro	Dobro
Geotermalna	<b>Slabo</b>	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>	<b>Slabo</b>	<b>Odlično</b>

Na tak način analiziramo vsako posamezno kmetijo. Razmišljamo o posameznih kriterijih in proučujemo možnosti za izboljšanje ocene primernosti. Kaj lahko in česa ne moremo spremeniti, da bi bila kmetija primernejša za preusmeritev?

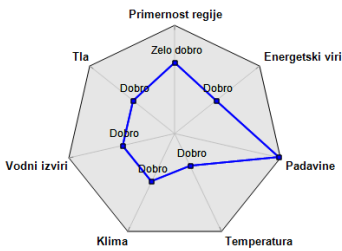
CELJE



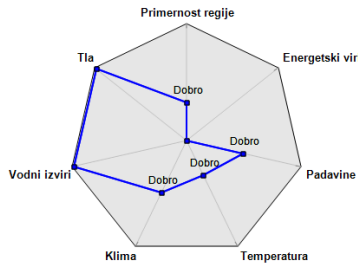
KOPER



MARIBOR

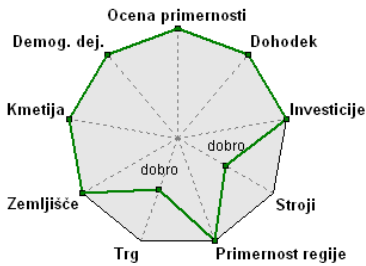


LJUBLJANA

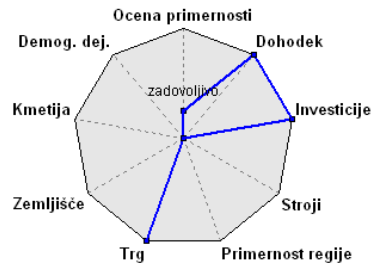


Slika 3: Grafična predstavitev ocen štirih regij z izbranimi kriteriji

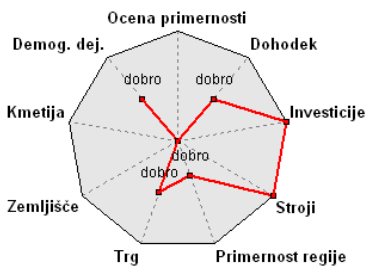
Kmetija 28



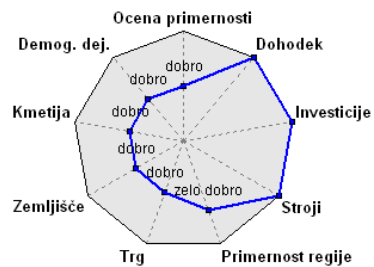
Kmetija 36



Kmetija 53



Kmetija 58



Slika 4: Ocene primernosti štirih kmetij za preusmeritev v vrtnarsko proizvodnjo



**Preglednica 4:** Ocena primernosti štirih izbranih kmetij

Atribut	Kmetija 28	Kmetija 36	Kmetija 53	Kmetija 58
<b>Ocena primernosti</b>	<i>odlično</i>	zadovoljivo	<b>slabo</b>	dobro
<b>Demog. dej.</b>	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	dobro	dobro
Starost	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	dobro	<b>slabo</b>
Izobrazba	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	dobro	dobro
Nasledstvo	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	<b>slabo</b>	<i>odlično</i>
<b>Kmetija</b>	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	<b>slabo</b>	dobro
Dejavnost	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	dobro	dobro
Tip	<i>odlično</i>	dobro	dobro	<i>odlično</i>
Lega	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	<b>slabo</b>	<i>odlično</i>
<b>Danosti</b>	<i>odlično</i>	dobro	<b>slabo</b>	dobro
<b>Zemljišče</b>	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	<b>slabo</b>	dobro
Lastninštvo	<i>odlično</i>	dobro	dobro	<i>odlično</i>
Raba	<i>odlično</i>	dobro	dobro	dobro
<b>Trg</b>	dobro	<i>odlično</i>	dobro	dobro
Bližina	dobro	<b>slabo</b>	dobro	dobro
Prodaja	dobro	<i>odlično</i>	dobro	dobro
Primernost regije	<i>odlično</i>	<b>slabo</b>	dobro	zelo dobro
<b>Proizvod. dej.</b>	dobro	dobro	dobro	<i>odlično</i>
<b>Stroji</b>	dobro	<b>slabo</b>	<i>odlično</i>	<i>odlično</i>
Izrabljenost	<i>odlično</i>	<b>slaba</b>	<i>odlično</i>	<i>odlično</i>
Obdelava	<b>slabo</b>	dobro	dobro	<i>odlično</i>
Investicije	<i>odlično</i>	<i>odlično</i>	<i>odlično</i>	<i>odlično</i>
Dohodek	<i>odlično</i>	<i>odlično</i>	dobro	<i>odlično</i>

#### 4 ZAKLJUČEK

S predstavljenim pristopom želimo prispevati k boljši presoji o primernosti preusmeritve dejavnosti kmetij v različne gospodarske usmeritve. Predlagali smo sistematičen in transparenten model ocenjevanja primernosti, ki temelji na večkriterijski odločitveni analizi. Odločili smo se za kvalitativno modeliranje, s čemer prispevamo k razumljivosti ocene in omogočamo enostavno razgradnjo končne ocene na njene sestavne dele. Pri nas je ocena kvalitativna, npr. **ocena primernosti** = *zadovoljivo*. Pri numeričnih metodah je ocena izražena s številko, na primer na intervalu od 0 do 100. Teže pa na razumljiv način razgradimo številčno oceno na njene sestavine in si razložimo, zakaj je ocena taka, kot je. Ločljivost med numeričnimi ocenami, npr. razvrščanje, je enostavnejše, saj imamo več možnosti kot na lestvici petih vrednosti. Vprašanje pa je, če tako z modelom kot tudi razpoložljivimi podatki, lahko dosežemo zanesljivost večje ločljivosti, ki jo nudi številski pristop. V prikazanem modelu je samosvoja tudi agregacija kriterijev. V numeričnih modelih je ta izvedena z utežmi posameznih kriterijev. Uteži so praviloma fiksne. V praksi pa vemo, da je pomembnost (utež) kakega

kriterija odvisna od vrednosti, ki jo kriterij zavzame. Če se kriterij približuje kritični vrednosti, se njegov pomen praviloma povečuje. To na razumljiv način povemo z odločitvenimi pravili.

Na podoben način lahko zgradimo modele za ocenjevanje možnosti preusmeritev v različne kmetijske dejavnosti. Namen in kontekst vrednotenja določa kriterije, njihovo strukturo in medsebojne povezave. V računalniški model vgradimo del našega, človeškega znanja, ki ga lahko dosledno in pregledno uporabljamo ter tako zmanjšamo možnost napake. Nobeno znanje, niti v računalniku niti v naših glavah, pa ni popolno. Zato so ocene le orientacijske. Možnost njihove razlage pa predstavlja pomemben pripomoček k razumevanju ocen. Gre za sinergijo med računalnikom in človekovimi miselnimi procesi.

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Bohanec M. DEXi: Program for Multi-Attribute Decision Making, User's Manual, Version 4.01. Report IJS DP-11739. Ljubljana: Jožef Stefan Institute. 2014.
- Bohanec M., Rajkovič V. DEX: An expert system shell for decision support. *Sistemica*. 1990; 1: 145–157.
- Bohanec M., Rajkovič V., Bratko I., Zupan B., Žnidaršič M. DEX methodology: Three decades of qualitative multi-attribute modelling. *Informatica*. 2013; 37: 49–54.
- Bohanec M., Trdin N., Kontić B. A Qualitative Multi-Criteria Model for the Evaluation of Electric Energy Production Technologies in Slovenia. Proc. of 13th International Symposium on Operational Research. Zadnik Stirn, L. et al. (ur.). Ljubljana: Slovenian Society Informatika. 2015.
- DEXi: A program for qualitative multi-attribute decision modelling (1999-2015): version 5.01. Ljubljana: Jožef Stefan Institute. <http://kt.ijs.si/MarkoBohanec/DEXi/html/DEXiNew501.htm> (pridobljeno 22.12.2015).
- Figueira J., Greco S., Ehrgott M. Multi criteria decision analysis: State of the art surveys. London: Springer. 2005.
- Hudina M. Osnove vrtnarstva. V: Osnove hortikulture. Rusjan, D. in Jakše, M. (ur.). Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2011.
- Ishizaka A., Nemery P. Multi-criteria decision analysis: Methods and software. Somerset: Wiley. 2013.
- Nikoloski, T. Človeški viri in konkurenčnost vrtnarskih podjetij v Sloveniji. Magistrsko delo. Koper: Univerza na Primorskem, Fakulteta za Management. 2009.
- 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. V: Computers and Electronics in Agriculture. 2011; 75(1): 189.
- Rozman Č., Unuk T., Pažek K., Lešnik M., Prišenk J., Vogrin A., Tojnko S. Multi criteria assessment of zero residue apple production. *Der Erwerbs-Obstbau*. 2013; 55, 2: 51–62.
- Saaty, T.L. The Analytical Hierarchy Process. New York: McGraw-Hill. 1990.
- Žnidaršič M., Bohanec M. in Zupan B. Modelling impacts of cropping systems: Demands and solutions for DEXI methodology. *Eur. J. Oper. Res.* 2008; 189: 594–608.

## **SORTE KONOPLJE Z EU SORTNE LISTE V SLOVENIJI – POVRŠINA, PRIDELEK STEBEL IN VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA V SOCVETJU**

Barbara ČEH<sup>30</sup>, Bojan ČREMOŽNIK<sup>31</sup> in Zala KOLENC<sup>32</sup>

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 16. 10. 2017

Sprejeto / accepted: 29. 11. 2017

### **Izvleček**

V Slovenijo so prišle različne tuje sorte konoplje, ki do zdaj niso bile vključene v uradno introdukcijo. Na prvih treh mestih po površini pridelave od leta 2015 do leta 2017 so Fedora 17, USO 31 in KC Dora. Na četrtem mestu je bila v letih 2015 in 2016 sorta Finola, v letu 2017 pa Futura 75, na petem mestu sorta Tiborszallasi, sorta Finola je bila na šestem mestu. Omenjenih šest sort je v letu 2017 pokrivalo 260 ha njiv, to je 88 % vseh njiv s konopljo. Sorte, ki prihajajo iz različnih evropskih žlahtniteljskih hiš in z različnih geografskih območij, so različne v morfoloških, fizioloških in gospodarsko pomembnih lastnostih ter se lahko nepričakovano odzovejo v drugačnih rastnih razmerah. Na poskusnem posestvu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije smo zato v letu 2017 postavili ogledni sortni poskus, v katerega smo vključili 12 sort konoplje z EU sortne liste, z namenom ugotoviti njihov odziv v naših rastnih razmerah. Sorte so se razlikovale v višini rastlin, v pridelku stebel in v vsebnosti eteričnega olja v socvetju ter v pridelku eteričnega olja na enoto površine.

**Ključne besede:** konoplja, pridelek stebel, vsebnost eteričnega olja

## **HEMP VARIETIS FROM THE EU VARIETY LIST IN SLOVENIA – AREA, YIELD OF STEMS AND ESSENTIAL OIL CONTENT IN INFLORESCENCES**

### **Abstract**

Various foreign hemp varieties have come to Slovenia, which until now have not been included in the official introduction. In the first three places with regard to the surface of production from 2015 to 2017 are varieties Fedora 17, USO 31 and KC Dora. In years 2015 and 2016 variety Finola was on the fourth place, while variety Futura 75 was in the fourth place in 2017. On the fifth place in 2017, there was

<sup>30</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310, Žalec, e-pošta: barbara.ceh@ihps.si

<sup>31</sup> Dipl. inž. agr. in hort., prav tam, e-pošta: bojan.cremoznik@ihps.si

<sup>32</sup> Dr., prav tam, e-pošta: zala.kolenc@ihps.si

variety Tiborszallasi while variety Finola was in the sixth place. The aforementioned six varieties covered 260 ha of fields in 2017, which is 88% of all fields with hemp. Varieties that come from different European breeding houses and from different geographical areas differ in morphological, physiological and economically important characteristics, and can unexpectedly respond in different growing conditions. In the experimental field of the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing, a variety experiment was set up in 2017, in which we included 12 varieties of hemp from EU variety list, in order to determine their response in our growing conditions. The varieties differed in the height of the plants, in the stem production and in the content of essential oil in the inflorescence and in the yield of essential oil per unit area.

**Key words:** hemp, stem yield, essential oil content

## 1 UVOD

Šele s spremembo Pravilnika o pogojih za pridobitev dovoljenja za gojenje konoplje in maka (Uradni list RS, št. 40/11 in št. 36/15) se konoplja, poleg pridelave semena za nadaljnje razmnoževanje, za pridobivanje olja, za pridelavo vlaken, za krmo živali in za industrijske namene, v Sloveniji lahko goji tudi za prehrano, kuhanje ter za pekovske in slašičarske namene. Dovoljeno je gojiti in za živila uporabljati sorte vrste *Cannabis sativa*, pri katerih vsebnost tetrahidrokanabinola (THC) ne presega 0,2% v suhi snovi rastline. Tako se je konoplja začela zopet pojavljati na slovenskih njivah v obdobju pred vstopom v Evropsko unijo, še posebej pa po letu 2004. Pri njenem uvajanju v pridelavo, predelavo in uporabo pa so deležniki soočeni z vrsto dilem. Eden od njih je, da nimamo lastnih sort, ki bi bile že po svoji osnovi prilagojene na naše pridelovalne razmere. V zadnjih letih so prišle k nam različne tuje, pri nas nove sorte konoplje. V letu 2015 je bilo na primer v pridelavi kar 18 sort konoplje iz različnih evropskih držav, ki pa do zdaj niso bile vključene v uradno introdukcijo sort. Sorte, ki prihajajo iz različnih evropskih žlahtniteljskih hiš in z različnih geografskih območij, so različne v morfoloških, fizioloških in gospodarsko pomembnih lastnostih. Ker menimo, da nekatere od njih bolje uspevajo v naših ravnih razmerah od drugih, jih je treba pred uvajanjem v prakso preizkusiti. Le z večletnimi poskusi v naših ravnih razmerah lahko ugotovimo njihove morfološke lastnosti in agrotehnične posebnosti.

Na poskusnem posestvu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) smo v letu 2017 postavili ogledni sortni poskus, v katerega smo vključili 12 sort konoplje z EU sorte liste, z namenom ugotoviti njihov odziv v naših ravnih razmerah. Sorte se razlikujejo glede na predlagan namen uporabe, nekatere so enodomne druge dvodomne. Bistven podatek pa je, da so požlahtnjene v različnih državah, nekatere od njih tudi v takšnih, ki imajo zelo drugačne ravnne razmere, kot

so pri nas. Tako je lahko njihov odziv na naše rastne razmere drugačen od odziva v sorti znanih rastnih razmerah in se katera od njih lahko pokaže kot celo neprimerna za gojenje pri nas.

## **2 MATERIAL IN METODE**

### **2.1 Površina po sortah konoplje in letih pridelave**

Zbrali smo podatke Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) o površinah po posameznih sortah konoplje v Sloveniji v obdobju med letoma 2013 in 2017 in jih primerjali med seboj po sortah in letih pridelave.

### **2.2 Postavitev poskusa**

Na poskusnem posestvu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) smo 3. maja 2017 posejali ogledni sortni poskus z 12 sortami konoplje z EU sorte liste, od katerih se že vse pridelujejo v Sloveniji. Tri tedne pred setvijo smo tla pobranali, da so vzniknili pleveli, ki smo jih z brananjem uničili tik pred setvijo, ko smo obenem vdelali gnojilo KAN, v količini 70 kg/ha dušika (N). S fosforjevimi in kalijevimi gnojili nismo gnojili. Količina semena za setev (60 kg/ha) je bila enaka za vse sorte, kakor tudi vsa ostala agrotehnika. Parcele so bile velike 3x3 m. Po setvi smo posevek povaljali in ga pokrili s kopreno do vznika konoplje zaradi nevarnosti, da jih pozobljejo ptiči, saj smo imeli z golobi resne težave v letu prej. Prejšnji posevek so bile oljne buče. Poskus ni bil namakan.

### **2.3 Tla v poskusu**

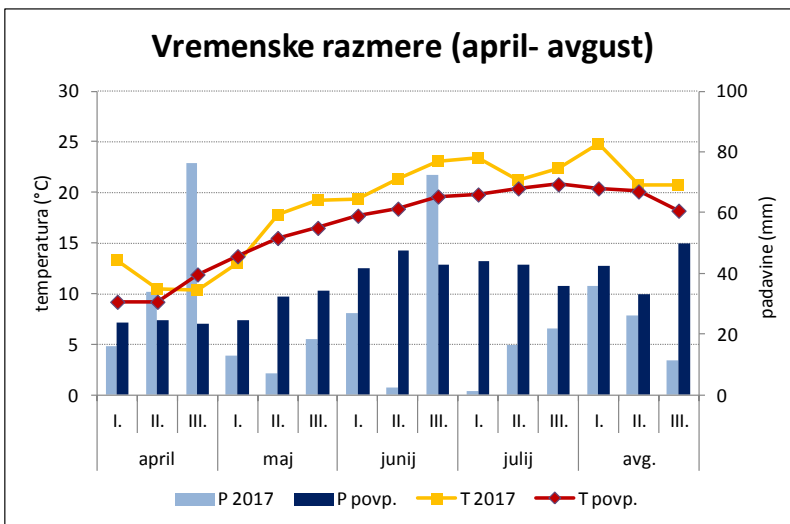
pH tal na poskusu je bil 6,7, preskrbljenost s fosforjem pretirana (36,7 mg/100 g), preskrbljenost s kalijem dobra (29,6 mg/100 g), vsebnost organske snovi dobra (3,8 %). Glede na vrednost V (nasičenosti z bazičnimi kationi) se tla uvrščajo med evtrična (nevtralna) tla. Kationska izmenjalna kapaciteta (vrednost T - skupna vsota izmenljivih kationov, ki jih lahko tla absorbirajo) je bila visoka (44,6).

### **2.4 Vreme v letu 2017**

Pozimi je bilo v Žalcu relativno malo padavin (v januarju 26 mm, februarju 58 mm, marcu 22,8 mm). Od aprila do junija jih je bilo 266 mm; največ v aprilu, 126 mm, v maju 38 mm, v juniju 102 mm. Pomanjkanje padavin je bilo tudi v juliju in avgustu, ko je padlo 39 mm oziroma 73 mm dežja (slika 1). V treh poletnih mesecih je bilo le 214 mm dežja, kar je 166 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje. Pomanjkanje padavin se je iz zimskih mesecev tekom vegetacije še stopnjevalo, le-to so spremljale še visoke temperature.

Prva dekada maja je bila sicer nekoliko hladnejša od dolgoletnega povprečja (v Žalcu za 0,7 °C), druga in tretja dekada maja pa sta bili zelo topli. Povprečna dnevna temperatura druge dekade maja je bila 17,8 °C, kar je za 2,3 °C višje od dolgoletnega povprečja. Dežja je padlo 32,2 mm. Zadnja dekada maja je bila še toplejša, s povprečno dnevno temperaturo 19,2 °C, dežja pa je padlo 34,3 mm.

Meteorološko poletje je zaznamovalo več vročinskih valov s kratkimi osvežitvami. Vsi trije poletni meseci so bili znatno toplejši od dolgoletnega povprečja. V Žalcu je v juniju in avgustu povprečna dnevna temperatura za 2,6 °C odstopala od dolgoletnega povprečja, v juliju za 1,9 °C. To je bilo eno najtoplejših poletij v obdobju od leta 1961. Obenem je bilo v tem poletju kar 34 vročih dni, ko je temperatura zraka preseгла 30 °C (junija 6 dni, julija 16 dni in avgusta 12 dni) ter pet vročinskih valov.



**Slika 1:** Primerjava povprečnih dekadnih mesečnih temperatur in višine padavin v času od aprila do avgusta v letu 2017 s 30. letnim povprečjem (1981 – 2010; postaja Medlog pri Celju; vir podatkov: ARSO, Izpis iz podatkovne zbirke maj, 2017) za postajo v Žalcu

## 2.5 Vrednotenje poskusa

11. avgusta smo poželi nadzemni del parcel zgodnejših sort: Fedora 17, KC Dora, USO 31, Finola in Santhica 27, 18. avgusta pa sorte: Monica, Tiborszallasi, Tisza, Kompolti hibrid TC, Férimon, Carmagnola in Antal, in sicer ko so bile sorte v razvojni fazi začetek tvorjenja semen. Konoplja za vlakna se namreč običajno pospravlja z njive, ko je v razvojni fazi med začetkom cvetenja in tvorjenjem

semen, odvisno od zelene kakovosti vlaken oziroma načina uporabe. Da se ohranijo dolga vlakna za izdelke najvišje kakovosti, je treba stebila požeti tako, da se ne prelomijo ali celo razrežejo (Kaiser in sod., 2017). Poželi smo cele rastline z vsake parcele brez zunanjih robov. Izmerili smo površino požetega dela parcele. Potem smo odrezali socvetja, prešteli število ženskih, moških in enodomnih, posebej stehali socvetja in stebila ter od vsake frakcije vzeli vzorec za analizo na vsebnost vlage. Vzeli smo tudi vzorce socvetij za analizo na vsebnost eteričnega olja. Vzorce za kemijske analize smo dostavili v laboratorij IHPS. Vlago so določili po metodi Analytica EBC 7.2. /1998/, vsebnost eteričnega olja pa po metodi ISO 6571:1984, Spices, condiments and herbs – Determination of volatile oil content. Rezultate smo obdelali s pomočjo računalniškega paketa Excel.

### **3 REZULTATI IN RAZPRAVA**

#### **3.1 Površina pod konopljo v Sloveniji glede na sorto in leto pridelave**

Na sliki 2 je predstavljena površina pod konopljo v Sloveniji glede na sorto in leto pridelave (podatki MKGP). Vidimo, da so na prvih treh mestih po površini pridelave od leta 2015 do leta 2017 iste tri sorte, in sicer Fedora 17, USO 31 in KC Dora. Na četrtem mestu je bila v letih 2015 in 2016 sorta Finola, v letu 2017 pa Futura 75, katere površina se je med vsemi sortami v tem času najbolj povečala; s 6 ha v letu 2015 na 42 ha v letu 2017. Na petem mestu je bila v letu 2017 sorta Tiborszallasi, katere površina se je prav tako povečala; in sicer za 28 ha med letoma 2016 in 2017. Pridelovalec Dejan Rengeo sorti pohvali zaradi dobrega pridelka semena in kvalitetnega socvetja za različne namene (eterično olje, čaj). Sorta Finola je bila na šestem mestu v letu 2017. Omenjenih šest sort je v letu 2017 pokrivalo 260 ha njiv, to je 88 % vseh njiv s konopljo. Vse druge sorte so se v teh letih sejale na manjši površini, manjši od 20 ha oziroma celo od 10 ha. V letu 2017 je bila sorta Monoica na 15 ha, ostale sorte pa so bile posejane na največ 3 ha.

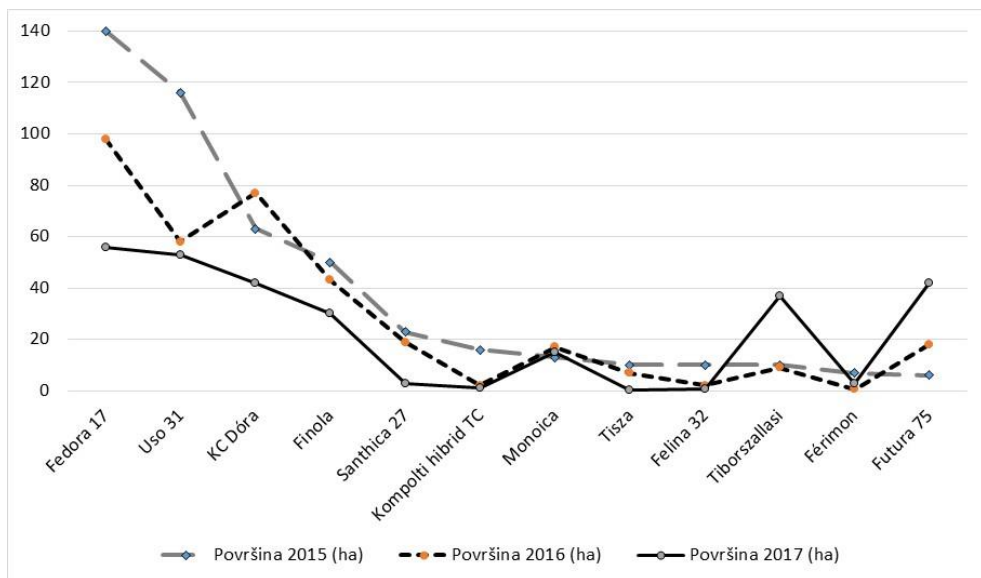
Najbolj popularna je torej sorta Fedora 17, ki je bilo posejane 140 ha v letu 2015, 98 ha v letu 2016 in 56 ha v letu 2017. Povprečna njiva s konopljo je v letu 2017 merila manj kot pol hektarja. Največji posevek je bil 1 ha, najmanjši na 0,1 ha.

#### **3.2 Višina rastlin**

Po višini rastlin so se sorte dokaj razlikovale (preglednica 1). Najvišji sta bili v končni fazi sorti Carmagnola in Antal, visoki do 3,4 m. Po deklaraciji je lahko sorta Carmagnola visoka od 2,5 do kar 6,5 m, požlahtnjena pa je za proizvodnjo biomase. Zelo zgodnja sorta Finola je bila najnižja med vsemi vključenimi sortami; dosegla je le največ 0,9 m v višino. To je sicer ugodno za kombajniranje semena, vendar je bila obenem to edina sorta, ki jo je (močno) prerasel plevel kljub popolnoma enaki agrotehniko na poskusu. Pri vseh ostalih sortah so bile v končni

fazi najvišje rastline višje od 2 m in najnižje od 1,0 do 1,4 m glede na sorto (preglednica 1). Tudi v poskusu Flajšmana in sod. (2016) je bila v letu 2016 v Ljubljani sorta Finola visoka le 74 cm, sorta Monoica je dosegla 186 cm, sorta Kompolti hibrid TC 151 cm, sorta KC Dora 144 cm, sorta Santhica 27 140 cm, in sorta Fedora 17 119 cm. Primerljiva višina posamezne sorte v našem poskusu je bila le pri sorti Finola, ostale sorte so bile v našem poskusu dosti višje. Razlika v agrotehniko je bila v 16 dni kasnejši setvi ter gnojenje z dušikom dva tedna po setvi, 60 kg/ha N, v poskusu v Ljubljani, v našem primeru smo dušikovo gnojilo zabranili ob setvi, v količini 70 kg/ha N. Sicer pa je bila razlika tudi v vremenskih razmerah (preučevano leto) in tleh.

Zelo neenakomerno dolga so bila tudi socvetja znotraj iste sorte, in tudi podatki o višini spodnjega dela najnižjih in najvišjih socvetij kažejo, kako neenakomerna je konoplja glede teh parametrov in s tem zelo neugodna za strojno žetev za seme. Zaradi velike razlike v višini je zelo težko določiti višino reza, ki bi pomenil zajetje čim več semen in čim manj primesi v pridelku. Najmanjšo razdaljo med spodnjimi in zgornjimi socvetji je imela nizka sorta Finola, sledili pa sta sorti USO 31 in Fedora 17. Tudi v letu 2016 je bil posevek konoplje na isti njivi zelo neizenačen znotraj iste sorte; pri sorti USO 31 so bile rastline visoke od 130 cm do 280 cm, pri sorti Fedora 17 pa od 135 cm do 300 cm (Čeh in Čremožnik, 2016).



**Slika 2:** Površina pod konopljo v Sloveniji glede na sorto in leto pridelave (v ha v letih 2015, 2016 in 2017)



**Preglednica 1:** Višina rastlin konoplje v poskusu glede na čas in datum merjenja (v cm v letu 2017, IHPS Žalec)

	Povp. ob cvetenju (v cm)	Ob zrelosti semena (od do v cm)	Višina spodnjega dela najnižjega socvetja ob zrelosti semena (v cm)	Višina spodnjega dela najvišjega socvetja ob zrelosti semena (v cm)	Dolžina socvetij (od do v cm)	Pridelek stebel (t/ha suhe snovi)
Fedora 17	190	110-252	100	185	10-60	8,0
KC Dora	210	130-300	115	230	12-70	14,1
USO 31	210	100-230	85	160	13-60	4,6
Finola	80	55-90	45	60	10-35	0,5
Santhica 27	200	130-280	118	210	12-70	6,3
Monoica	200	140-285	125	227	15-58	8,6
Tiborszallasi	200	100-290	85	240	15-50	8,8
Tisza	200	105-267	97	210	10-57	8,7
Kompolti hibrid TC	180	115-285	95	220	15-65	11,7
Férimon	230	110-270	100	240	10-60	9,6
Carmagnola	220	130-340	115	300	15-80	18,1
Antal	220	105-340	95	280	10-60	17,0

### 3.3 Pridelek stebel

Pridelek stebel je bil največji pri sorti Carmagnola, 18 t/ha suhe snovi (indeks glede na povprečje vseh sort 174), sledili sta sorti Antal (17,0 t/ha; indeks 163) in KC Dora (14 t/ha; indeks 135) (preglednica 1). Sorta Kompolti hibrid TC je dosegla 11,5 t/ha (indeks 112), medtem ko so ostale sorte imele manjše pridelke od 10 t/ha in indekse nižje od 100. V raziskavah Kocjan Ačko in sod. (2002) v okviru CRP V4-0298-99 *Pridelovanje in predelava navadne konoplje* so v Prekmurju v letih 2000 in 2001 primerjali pridelek stebel petih sort konoplje s tedanje sortne liste in potrdili, da je bil značilno odvisen od sorte. Pri količini semena za setev 70 do 80 kg/ha je bil v letu 2000 od 6,7 do 9,4 t/ha glede na sorto, pri 35 do 40 kg/ha pa od 4,6 do 7,5 t/ha. V letu 2001 z izrazito sušnim poletjem so bili pridelki stebel manjši v primerjavi z letom prej. V našem poskusu so bili pridelki stebel bolj primerljivi večji količini semena za setev v njihovem poskusu, tudi količina semena za setev je bila v našem poskusu slednji bolj podobna (60 kg/ha), a je bil pri sortah Carmagnola, Antal in KC Dora pridelek stebel v našem poskusu dosti večji (preglednica 1). Kot navaja Gabrielová (2017) je potencialni pridelek slame francoskih sort USO 31, Férimon, Fedora 17, Santhica 27 in Futura 75 s 16-

odstotno vlago 17,0 t/ha, 19,9 t/ha, 20,2 t/ha, 20,8 t/ha oziroma 22,8 t/ha. Glede na ta vir je pridelek stebel pri Tiborszallasi povprečen, velik pri sortah Lipko, Monoica in KC Dora ter zelo velik pri sortah Kompolti hibrid TC in Tisza. V našem primeru je bil med največjimi od teh omenjenih sort pri KC Dora, je ne omenjajo kot z zelo visokim pridelkom stebel, torej se je v našem poskusu odzvala bolje. Sorta Kompolti hibrid TC je v obeh primerih omenjena kot sorta z zelo visokim pridelkom stebel. Prav tako se rezultati skladajo glede sorte Tiboszallasi, ki je v obeh primerih omenjena kot sorta s povprečnim pridelkom stebel.

V sortnem poskusu Flajšmana in sod. (2016) v letu 2016 v Ljubljani je bil pridelek stebel istih sort kot v našem poskusu skoraj le polovičen v primerjavi z našim poskusom (KC Dora 2,6 t/ha, Santhica 27 2,3 t/ha, Monoica 2,0 t/ha, Fedora 17 1,6 t/ha in Kompolti hibrid TC 1,3 t/ha), je pa prav tako pozitivno izstopala sorta KC Dora. Razlika med poskusoma, poleg prej navedenih (v poglavju 3.3), je bila tudi v količini semena za setev, ki je bila polovico manjša v poskusu v Ljubljani (25 oziroma 35 kg/ha).

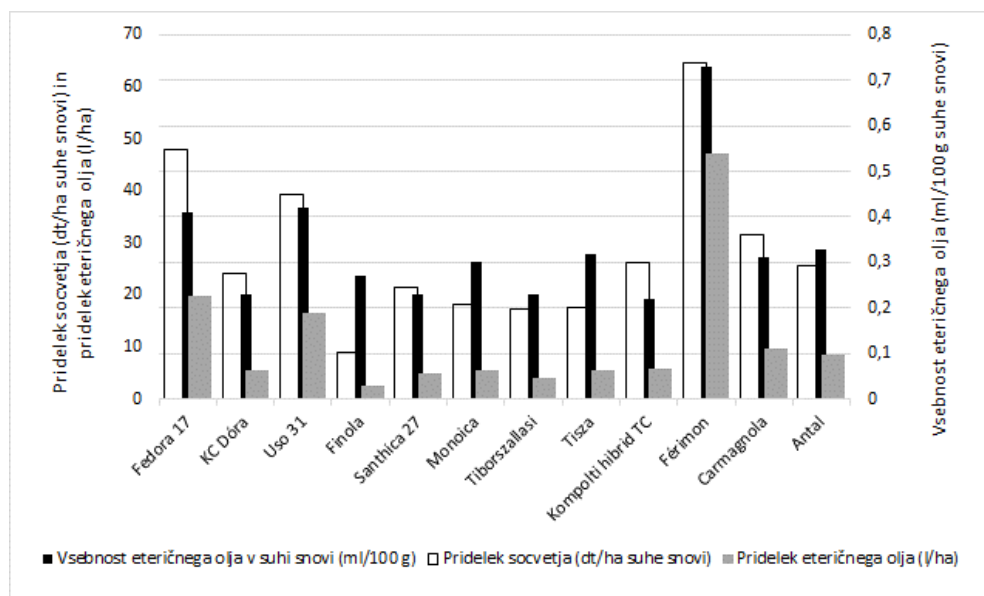
### **3.4 Pridelek socvetja in vsebnost eteričnega olja v socvetju**

V pridelku socvetja je najbolj izstopala sorta Férimon (6,5 t/ha suhe snovi; indeks glede na povprečje vseh sort 236), sledili sta sorti Fedora 17 (4,8 t/ha; indeks 175) in USO 31 (3,9 t/ha; indeks 143) (slika 3). Pridelek socvetja sort Fedora 17 in USO 31 je bil na isti njivi enkrat večji od lanskega povprečja (Čeh in Čremožnik, 2016), kar na prvi pogled kaže na velik odziv tega parametra na vremenske razmere, a je bila razlika v agrotehniki ta, da v letu 2016 posevek po setvi nismo prekrili s kopreno in so seme iz tal zobali golobi, ki so se takrat pojavili takoj po setvi v velikem številu. Indeks, glede na povprečje, je imela večji od 100 le še sorta Carmagnola (3,2 t/ha; indeks 115). Najmanjši pridelek socvetja je imela sorta Finola (0,9 t/ha; indeks 33), ki jo je prerasel plevel. Ta sorta je bila edina, ki jo je prerasel plevel tudi v sortnem poskusu Flajšmana in sod. (2016) v letu 2016 na lokaciji Ljubljana.

Tudi v vsebnosti eteričnega olja je prednjačila sorta Férimon (0,73 ml/100 g vzorca; indeks glede na povprečje vseh sort kar 219), sledili sta sorti USO 31 in Fedora 17 z 0,42 oziroma 0,41 ml/100 g vzorca (indeks 126 oziroma 123) (slika 3). Ostale sorte so imele indeks manjši od 100. V letu 2016 je bila vsebnost eteričnega olja v socvetju konoplje na isti njivi pri sorti USO 31 0,34 ml/100 g, pri sorti Fedora 17 pa 0,31 ml/100 g (Čeh in Čremožnik, 2016), torej nekoliko manjša kot v letu 2017.

Izračunali smo še pridelek eteričnega olja, ki se je med sortami zelo razlikoval in je bil od 2,5 l/ha pri sorti Finola do kar 47 l/ha pri sorti Férimon. Tudi v tem parametru je torej prednjačila sorta Férimon, kar je logična posledica tega, da je

imela največji pridelek socvetja in tudi največjo vsebnost eteričnega olja. Ostale sorte so imele v primerjavi z njo polovičen ali še manjši pridelek eteričnega olja. Sorti Férimon sta sledili sorti Fedora 17 in USO 31 z 19,7 oziroma 16,5 l/ha. Zanimivo je tudi dejstvo, da smo v predhodni raziskavi (Kušar in sod., 2017), v kateri smo preučevali hranilno sestavno semena različnih sort konoplje, pridelane v Sloveniji, ugotovili nadpovprečno vsebnost beljakovin in olja (v primerjavi z drugimi preučevanimi sortami v tej raziskavi) tudi pri sorti Férimon. Sorte, ki so se že pridelovale v Sloveniji in so se pokazale v raziskavi s prehranskega vidika kot najbolj obetavne glede na preučevana parametra, so bile Férimon, Kompolti Hibrid TC in Lipko. Ker pa so te sorte primarno namenjene pridelavi vlaken, je sicer še potrebno preučiti ali je pridelek semen, kljub ugodni hranilni sestavi, dovolj velik za ekonomsko upravičenost pridelave za ta namen.



**Slika 3:** Pridelek socvetja (kg/ha suhe snovi), vsebnost eteričnega olja v socvetju (ml/100 g) in izračunan pridelek eteričnega olja (l/ha) (IHPS Žalec, 2017)

#### 4 ZAKLJUČKI

Podatki so enoletni in jih moramo kot takšne tudi razumevati. Želeli smo pridobiti osnovne informacije o odzivu sort z EU sortne liste v naših rastnih razmerah. Smiselno bo poskus v naslednjem letu ponoviti, da se dobijo podatki še enega leta. Posebno pozorni bomo na sorto Férimon, ki se je nakazala v dosedanjih raziskavah kot zelo zanimiva za naše rastne razmere glede prehranske vrednosti semen in količine eteričnega olja v socvetju. Če se bodo pri ponovitvi poskusa pokazali pri

tej sorti podobni rezultati, kot v predstavljenem poskusu, bomo lahko sklepali, da naše klimatske in talne razmere kot tudi agrotehnični ukrepi tej sorti ustrezajo. V letu 2017 je bila sicer v Sloveniji posajena le na 3 ha.

**Zahvala.** Ogladni sortni poskus je bil postavljen v okviru ciljnega raziskovalnega projekta V4-1611 Pridelava industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) v Sloveniji. Financerjema MKGP in Agenciji za raziskovalno dejavnost RS se najlepše zahvaljujemo. MKGP se zahvaljujemo tudi za posredovanje podatkov o površini posejane konoplje.

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Čeh B., Čremožnik B. Vpliv sorte in količine semena za setev na pridelek vršičkov in stebel navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.). *Hmeljarski bilten*. 2016; 23: 80-87.
- Flajšman M., Jakopič J., Košmelj K., Kocjan Ačko D. Morfološke in tehnološke lastnosti sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) iz poljskega poskusa Biotehniške fakultete v letu 2016. *Hmeljarski bilten*. 2016; 23: 88-104.
- Gabrielová H. Overview of hemp varieties in Europe, Hempoint s.r.o., Czech Republic. Dostopno na: <https://hempoint.cz/wp-content/uploads/2017/09/hemp-varieties-in-europe.pdf> (cit. okt. 2017)
- Kaiser C., Cassady C., Ernst, M. Industrial Hemp Production. Cooperative Extension Service University Of Kentucky College Of Agriculture, Food And Environment. 2015: 6. Dostopno na: <https://www.uky.edu/Ag/CDBREC/introsheets/hempproduction.pdf> (cit. okt. 2017)
- Kocjan Ačko D., Baričevič D., Rengeo D., Andrešek S. Gospodarsko pomembne lastnosti petih sort konoplje (*Cannabis sativa* L. var. *sativa*) iz poljskih poskusov v Markišavcevi pri Murski Soboti. *Zbornik Biotehniške fakultete univerze v Ljubljani, Kmetijstvo*. 2002; 79(1): 237-252.
- Kušar A., Čeh B., Flajšman M., Kocjan Ačko D., Pravst I. Raznolikost hranilne sestave navadne konoplje (*Cannabis sativa* L. var. *sativa*) V: ČEH, Barbara (ur.) in sod. *Novi izzivi v agronomiji 2017 : zbornik simpozija, Laško, 2017*. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo. 2017; 82-87.

## PRIDELEK IN MORFOLOŠKE LASTNOSTI STEBEL 12 SORT NAVADNE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.) V LETU 2017

Marko FLAJŠMAN<sup>33</sup> in Darja KOCJAN AČKO<sup>34</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 16. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 8. 12. 2017

### Izvleček

Poljski poskus na Biotehniški fakulteti v Ljubljani v letu 2017 je obsegal setev 12 sort navadne konoplje za namene pridelave za stebela. Ugotavljali smo število rastlin po vzniku in ob žetvi, višino rastlin in premer stebel, fenofazo po CPVO-TP/276/1, sestavo posevka ob žetvi glede na spol ter pridelke sveže biomase (steblo in listi), svežih stebel ter suhih stebel. Sejali smo na gostoto posevka 300 - 400 kalivih semen/m<sup>2</sup>. Ob žetvi je bilo od 218 do 366 rastlin na m<sup>2</sup>. Največjo povprečno višino (170 cm) in premer stebel (4,63 mm) je dosegla sorta Kompolti hibrid TC. Žetev smo opravili v fazah polnega cvetenja (fenofaze 2101, 2102, 2103, 2202) in zrelosti prvih semen (fenofazi 2203, 2305). V skupino z največjim pridelkom suhe snovi stebel so prišle sorte Antal (9885 kg/ha suhe snovi), Futura 75 (8799 kg/ha), Tiborszallasi (8710 kg/ha), Monoica (8502 kg/ha) in Fedora 17 (8002 kg/ha). Najnižji pridelek sta dosegli sorti Santhica 27 (5636 kg/ha) in USO 31 (5193 kg/ha). V poskus so bile vključene še sorte Marina, KC Dora, Tisza in Helena.

**Ključne besede:** navada konoplja, *Cannabis sativa*, sorta, vlakna, pridelek stebel

## YIELD AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF 12 HEMP (*Cannabis sativa* L.) VARIETIES IN 2017

### Abstract

The field trial at the Biotechnical Faculty in Ljubljana in 2017 included the sowing of 12 varieties of hemp for the purpose of stem production. We estimated the number of plants per m<sup>2</sup> after emergence and at the harvest, plant height and diameter of stems. At harvest time we determined phenophase according to CPVO-TP / 276/1, the gender composition of the crop and yields of fresh biomass (stem with leaves), fresh stems and dry stems (dry matter). Regarding the laboratory germination rate of the seed and its 1000-seed weight, 65 to 150 kg/ha of seed was

<sup>33</sup>Asist. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marko.flajsman@bf.uni-lj.si

<sup>34</sup>Doc. dr., prav tam, e-pošta: darja.kocjan.acko@bf.uni-lj.si

sown, depending on the variety, in order to achieve targeted density of 300 seeds/m<sup>2</sup>. Due to high field emergence and relatively favorable weather conditions during the growing season, there were 218 to 366 plants per m<sup>2</sup> at harvest. The biggest average height (170 cm) and diameter of the stems (4.63 mm) was achieved by the variety Kompolti hybrid TC. Harvesting was carried out in stages of full flowering (phenophases 101, 2102, 2103, 2202) and at the maturity of the first seeds (phenophases 203, 2305). Varieties with the largest yield of dry matter of the stems are Antal (9885 kg/ha), Futura 75 (8799 kg/ha), Tiborszallasi (8710 kg/ha), Monoica (8502 kg/ha) and Fedora 17 (8002 kg/ha). The lowest yields reached Santhica 27 (5636 kg/ha) and USO 31 (5193 kg/ha). In filed trial were also included varieties Marina, KC Dora, Tisza and Helena.

**Key words:** hemp, *Cannabis sativa* L., variety, fiber, stem yield

## 1 UVOD

Stebila navadne konoplje se tradicionalno uporabljajo za pridobivanje vlaken za proizvodnjo tehničnega tekstila, na primer za vrvi, vrvice ponjave, podloge, preproge, vrvaste preproge in vreče (Kocjan Ačko, 1999). Toda dobre lastnosti vlaken (natezna trdnost, velik pretržni raztezek in druge) so uporabo le-teh razširile tudi v avtomobilsko industrijo, izdelavo visokokakovostnega papirja, kompozitnih in drugih materialov (Schäfer in Honermeier, 2006). Pezdir, ki je ostanek pri osnovni predelavi stebel, se uporablja kot zastirka in živalska stelja, v zadnjem času pa vedno več kot izolacijska masa in pri izdelavi betonskih kompozitov (Kocjan Ačko, 2015).

Steblo sestavlja več plasti. Stržen je v jedru stebila in je obdan z olesenelim predelom v obliki kolobarja, nad katerim je v ličju (skorji) razporejena primarna in sekundarna plast nezvezno razporejenih vlaken (McDougall in sod., 1993). Primarnih vlaken je več, okoli 70 odstotkov, in so daljša od sekundarnih vlaken. Vsebujejo veliko celuloze (60–65 utežnih odstotkov) in malo lignina (7–8 utežnih odstotkov) ter so bistveno bolj uporabna od sekundarnih, ki so srednje dolžine in vsebujejo več lignina (Cosentino in sod., 2012). Največjo gostoto vlaken vsebuje spodnji del stebila, višje proti vrhu stebila pa se količina vlaken zmanjšuje (Amaducci in sod., 2008).

Za pridelavo stebel je smiselno uporabiti sorte z daljšo rastno dobo (Struik in sod., 2000). Pri nas prevladujejo francoske in madžarske sorte (MKGP, neobjavljen vir, 2017). Francoske sorte so običajno enodomne s kritično fotoperiodo 14 do 15,5 ur, kar pomeni, da se cvetenje prične, ko je dnevna osvetlitev krajša od omenjene dolžine (Struik in sod., 2000). Zaradi tega lahko ima ista sorta v različnih geografskih širinah različno število dni do cvetenja in s tem rastno dobo. Na primer v severnejših geografskih širinah vse sorte zaradi daljših dni bolj pozno cvetijo

(Bennett in sod., 2006). Madžarske sorte so običajno dvodomne in pretežno požlahtnjene za pridelavo vlaken. Genetski potencial dvodomnih sort je 38 do 40 % vlaken v stebelu (Berenji in sod., 2013).

Sestava stebela in kakovost vlaken sta sortni lastnosti. Pridelek vlaken je produkt deleža vlaken v skorji in pridelka stebel, zato sta ti dve lastnosti glavna kriterija pri žlahtnjenju sort za uporabo stebel (Berenji in sod., 2013). Sorte konoplje v Skupnem katalogu poljščin EU (Skupni ..., 2017), v katerem je 62 sort navadne konoplje, še niso razvrščene po namenu uporabe na sorte za vlakna ali sorte za seme. Kljub temu se na spletu vendarle oblikujejo sezname, ki so jih sestavili bodisi strokovnjaki ali ljubiteljski poznavalci konoplje, predvsem pa prodajalci semen (Ihemp ..., 2017).

Številne raziskave so obravnavale vpliv sorte, temperature, agrotehnik in drugih dejavnikov na pridelek stebel, ki je v neposredni povezavi s pridelkom vlaken (Hennik, 1994). Ugotovljeno je bilo, da na količino in kakovost vlaken najbolj vplivata gostota posevka rastlin ter čas žetve (Amaducci in sod., 2008). V tej študiji smo preučili vpliv 12-ih sort navadne konoplje na pridelek stebel pri gostoti posevka po setvi 300–400 rastlin/m<sup>2</sup>.

## **2 MATERIALI IN METODE**

### **2.1 Zasnova in izvedba sortnega poljskega poskusa**

V poskus na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani v letu 2017 je bilo vključenih 12 sort, od tega 7 dvodomnih (Kompolti hibrid TC, Antal, Monoica, Marina, KC Dora, Tiborszallasi in Tisza) in 5 enodomnih (Futura 75, Fedora 17, USO 31, Santhica 27 in Helena). Poskus smo izvedli v zasnovi blokov v treh ponovitvah. Velikost osnovne parcelice je bila 18 m<sup>2</sup> (dolžina 6 m in širina 3 m). Sejali smo na gostoto 300–400 rastlin/m<sup>2</sup>.

Predposevek v letu 2016 je bila soja. Jeseni 2016 so bila tla preorana do globine 25 cm. Tla na eksperimentalnem polju so srednje globoka, meljasto-glinasta, psevdoglejna in meliorirana. Na tleh ob močnejšem deževju zastaja voda. Analiza tal pred sejanjem poskusa je pokazala, da je na globini od 0 do 25 cm preskrbljenost s fosforjem dobra (C razred), preskrbljenost s kalijem pa srednje dobra (B razred). Izmerjen pH tal je bil 6,6, delež organske snovi 3,6 %.

Pred dopolnilno obdelavo tal spomladi 2017 smo opravili založno gnojenje s 500 kg/ha NPK 0-14-28. Pred setvijo je bila njiva dopolnilno obdelana z vrtavkasto brano do globine 5 cm in pognojena z 260 kg/ha KAN-a. Setev smo opravili 4. 5. 2017 s parcelno sejalnico Wintersteiger, ki je prirejena za strnjeno setev. Medvrstna razdalja je bila 12,5 cm. Takoj po setvi smo poskus pokrili s kopreno in

ga tako zaščitili pred ptiči. Po 12 dneh od sejanja smo kopreno umaknili s polja. 14 dni po sejanju smo ugotavljali poljski vznik na način, da smo prešteli rastline znotraj okvirja 50 cm x 50 cm, po 3 ponovitve na eno osnovno parcelico.

Posevka med rastjo nismo dognojevali, plevelov nismo zatirali. Vzorčenje stebel (žetev) smo izvedli ročno 17. in 18. avgusta 2017. Vzorčili smo po metodologiji iz raziskave Tanga in sod. (2016), z nekaj spremembami: na vsaki parcelici smo svežo biomaso ovrednotili tako, da smo rastline iz 4 m<sup>2</sup> iz sredine parcelice porezali tik nad zemljo in jih takoj stehali, vsak m<sup>2</sup> smo tehtali ločeno. Za nadaljnje vrednotenje smo uporabili samo rastline iz prvega kvadratnega metra. Najprej smo odstranili plevel, nato pa rastline ločili po spolu, prešteli ter ponovno stehali. Tako smo dobili delež rastlin konoplje v sveži biomasi brez plevela. Pri enodomnih sortah smo ločevali po spolu na način, da smo ločili moške, med ženskimi in enodomnimi rastlinam pa nismo ločevali, zato smo vse rastline z ženskimi socvetji pri enodomnih sortah poimenovali kot enodomne rastline. Nato smo odbrali podvzorce 25 reprezentativnih rastlin, ločeno glede na spol, jim izmerili višino in premer ter jih stehali. Če pri enodomnih sortah na posamezni ponovitvi ni bilo vsaj 25 moških rastlin, potem smo pri teh sortah v analizi višine in premera obravnavali samo enodomne rastline (brez moških), vseeno pa smo število najdenih moških rastlin zabeležili ter upoštevali samo pri podatkih o številu rastlin na m<sup>2</sup> ob žetvi. V nadaljevanju smo rastlinam iz podvzorca odstranili liste in socvetja ter jih ponovno stehali; na ta način smo pridobili podatek o deležu stebel. Podvzorec smo nato sušili pri temperaturi 55 °C do konstantne mase, ponovno stehali in določili delež suhe snovi. Pri enodomnih sortah, kjer je bilo moških rastlin premalo za podvzorec, smo vseeno pri vseh najdenih moških rastlinah določali delež suhe snovi ter to upoštevali pri podajanju pridelka skupne suhe mase, ki smo jo preračunali v kg na ha. Za statistično analizo rezultatov smo uporabili program R (R Core Team).

Fenofaze smo določili po deskriptorjih iz Mediavilla in sod. (1998). Na vsaki osnovni parcelici smo določili fenofazo 20-im rastlinam. Fenofaza posamezne sorte oz. spola je bila določena na podlagi trenutka, ko je vsaj 50 % rastlin že doseglo določeno fenofazo.

## 2.2 Vremenske razmere v času poskusa

Mesec maj je bil glede na dolgoletno povprečje nekoliko hladnejši, tudi padavin je bilo manj, zato setev ni bila otežena. V juniju je bila povprečna mesečna temperatura nadpovprečna, prav tako količina padavin, ki so bile zelo neenakomerno razporejene. V predzadnjem dnevu v juniju je padla dobra tretjina padavin tega meseca, kar je povzročilo tudi zastajanje vode ponekod na površini tal v poskusu. Julij je bil za 1,6 °C toplejši od dolgoletnega povprečja, količina padavin pa je bila precej nižja, samo 73 mm. Vseeno manjša mesečna količina



padavin ni imela vidnega negativnega učinka na rast rastlin zaradi razporeditve padavin, saj je bilo najdaljše obdobje brez dežja 8 dni, ko pa najvišje povprečne dnevne temperature niso presegle 27 °C. Začetek avgusta je zaznamovalo suho in vroče vreme, vendar je večja količina padavin sledila 7. avgusta, ko je padlo 33 mm dežja, kar je omogočilo neovirano rast rastlin do žetve. V povprečju je bil avgust več kot 2 °C toplejši od dolgoletnega povprečja, padlo pa je manj kot polovica povprečnih padavin (samo 60 mm) (preglednica 1).

**Preglednica 1:** Povprečne mesečne temperature in vsote padavin za mesece v času izvedbe poljskega poskusa v 2017 ter za obdobje 1985 - 2015 v Ljubljani (ARSO, 2017)

Leto/ obdobje	Povprečna mesečna temperatura (°C)				Vsota padavin v mesecu (mm)			
	maj	junij	julij	avgust	maj	junij	julij	avgust
2017	16,9	21,7	23,2	23,2	72	150	73	60
1985-2015	17,2	19,5	21,6	21	105	131	121	131

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

#### 3.1 Povprečno število rastlin na m<sup>2</sup> po vzniku in ob žetvi konoplje

Do žetve se je število rastlin zmanjšalo, in sicer odvisno od sorte; največ pri sorti Kompolti hibrid TC, pri kateri je bilo zmanjšanje za 28,3 % in je bilo ob žetvi 218 rastlin/m<sup>2</sup>, kar je tudi najmanj med vsemi sortami. Največjo gostoto ob žetvi je imela sorta Helena, ki je imela tudi največjo gostoto po vzniku (preglednica 2). Korelacija med gostoto rastlin ob vzniku in številom rastlin ob žetvi ni bila statistično značilna (preglednica 5). Navadna konoplja je znana kot vrsta, kjer pri veliki gostoti prihaja do propadanja rastlin, kar se je potrdilo že v več študijah (Amaducci in sod., 2002; van der Werf in sod., 1995; de Meijer in sod., 1995; Cromack, 1998; Čeh in Čremožnik, 2016). Kot optimalno gostoto rastlin konoplje za namene pridobivanja vlaken, ne glede na sorto, v srednji Evropi Mediavilla in sod. (2001) omenjajo 170 rastlin/m<sup>2</sup>. Če so stebela namenjena za predelavo za uporabo v tekstilstvu, naj bi bila optimalna gostota 100 rastlin/m<sup>2</sup> (Amaducci in sod., 2002), vendar pa tudi večja gostota (250–300 rastlin/m<sup>2</sup>) kažejo pozitivne indikacije (Martinov in sod., 1996).

#### 3.2 Fenofaze rastlin ob žetvi

Vse gospodarsko pomembne poljščine (npr. koroza, žita, oljna ogrščica, metuljnice, krompir, itd.) imajo številčni ali pa črkovni sistem za opis fenofaz. Podobno je pri navadni konoplji, kjer pa je uporaba kode zaradi spolnega dimorfizma nekoliko bolj zapletena. S poznavanjem ustrezne fenofaze so povezani številni agrotehnični ukrepi, tudi žetev. Pridelki stebel, pezdirdja in vlaken so v tesni korelaciji s fenofazo posevka, zato samo žetev v času tehnične zrelosti omogoča

največji pridelek (Mediavilla in sod., 2001). V preglednici 3 so navedene in obrazložene fenofaze, v katerih so bile sorte v poljskem poskusu.

**Preglednica 2:** Povprečno število rastlin na  $m^2$  po vzniku in ob žetvi konoplje na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani v letu 2017

Sorta	Število rastlin po vzniku	Število rastlin ob žetvi			Zmanjšanje št. rastlin do žetve (%)
		Skupaj	Odstotek M R <sup>I</sup>	Odstotek ŽR/ER <sup>II</sup>	
Fedora 17	426	310	3,2	96,8	27,2
Helena	404	366	23,6	76,4	9,4
Antal	395	354	46,9	53,1	10,4
Tisza	388	323	48,8	51,2	16,8
Monoica	385	286	44,9	55,1	25,7
KC Dora	382	291	41,2	58,8	23,8
Santhica 27	380	329	0,7	99,3	13,4
Futura 75	373	272	1,2	98,8	27,1
Tiborszallasi	351	325	41,5	58,5	7,4
USO 31	327	285	8,5	91,5	12,8
Marina	315	263	46,6	53,4	16,5
Kom. hib. TC	304	218	42,0	58,0	28,3

M R<sup>I</sup> - moške rastline

ŽR/ER<sup>II</sup> - ženske rastline oz. enodomne rastline

Enodomne sorte za pridelavo stebel dosežejo tehnično zrelost v času polnega cvetenja, to je takrat, ko je že oblikovanih večina braktej na ženskih socvetjih (Mediavilla in sod., 2001). Vsem enodomnim sortam smo ob žetvi določili fenofazo 2305. Enodomne sorte so bile požlahtnjene za hkratno pridelavo tako semena kot tudi stebel (Salentijn in sod., 2015). Pri pridelavi za stebila je časovno okno, ko so rastline primerne za spravilo, nekoliko širše, saj pri enodomnih sortah (skoraj) ni moških rastlin, ki bi prej dozorevale. Zato je pridelek stebel po zrelosti bolj izenačen (Struik in sod., 2000).

Pri dvodomnih sortah Tisza, KC Dora in Kompolti hibrid TC smo moške rastline poželi v fenofazi 2102 in ženske v 2202. Pri sortah Antal in Monoica smo moške rastline poželi v fenofazi 2102 in ženske v 2203. Pri sorti Tiborszallasi so bile moške rastline v fenofazi 2103 in ženske v 2202, pri sorti Marina pa so bile moške rastline v fenofazi 2101 in ženske v 2202. Dvodomne sorte so glede žetve pri pridelavi, ki je namenjena izključno za stebila, bolj občutljive zaradi neenakega dozorevanja rastlin glede na spol. Mediavilla in sod. (2001) so ugotovili, da so najvišje pridelke pri dvodomni sorti Kompolti dosegli tedaj, ko so moške rastline nehale s cvetenjem (fenofaza 2103), hkrati pa so bile ženske rastline v polnem cvetenju (fenofaza 2202), kar so imenovali tehnična zrelost. Po tem se je pričela masa pridelka stebel zmanjševati zaradi pojava staranja najprej moških in nato ženskih rastlin.

**Preglednica 3:** *Nekatere razvojne faze pri konoplji (povzeto po Razvojne ..., 2012)*

Razvojna faza	Oznaka fenofaze	Opis
<b>Moška rastlina</b>		
Začetek cvetenja	2101	Prvi odprti moški cvetovi
Cvetenje	2102	50 % odprtih moških cvetov
Konec cvetenja	2103	95 % odprtih ali posušenih moških cvetov
<b>Ženska rastlina</b>		
Cvetenje	2202	Na 50 % ženskih cvetov so vidni vratovi pestičev
Začetek zorenja semen	2203	Prva zrela (trda) semena
<b>Dvospolna – enodomna rastlina</b>		
Začetek zorenja semen	2305	Prva zrela (trda) semena
<b>Staranje</b>		
Sušenje listov	3001	Listi suhi
Sušenje stebela	3002	Listi odpadejo
Razgradnja stebela	3003	Steblo se razgrajuje / že delno razgrajeno

### 3.3 Povprečna višina in premer rastlin konoplje ob žetvi

10 sort v poskusu, med katerimi je bila najvišja sorta Kompolti hibrid TC (170 cm), se glede na povprečno višino med sabo ni statistično razlikovalo (preglednica 4). Statistično značilno najnižja sorta je bila sorta Santhica 27 (111 cm). Povprečna višina rastlin je bila lastnost, ki je bila neodvisna od gostote posevka (preglednica 5). Razlika med spoloma je bila statistično značilna samo pri sorti Marina, medtem ko je bila pri sortah Antal, Monoica in Tiborszallasi mejno statistično značilna. Pri drugih sortah razlik med spoloma ni bilo. Čeprav je višina sorte genetsko determinirana lastnost, je v veliki meri odvisna tudi od okoljskih razmer, predvsem od preskrbljenosti tal s hranili in dostopnostjo vode ter tudi od časa setve (Cosentino in sod., 2012). Manjše količine padavin v mesecu juliju in na začetku avgusta so najbrž vzrok, da vse sorte niso dosegle višin, navedenih v literaturi (van der Werf in sod., 1995; Amaducci in sod., 2008) ali na spletni strani enega izmed evropskih prodajalcev (Ihemp ..., 2017). Enodomne sorte (razen Future 75) so bile nižje od dvodomnih (razen Tisze).

Tudi v premeru stebel se istih 10 sort statistično ni razlikovalo med sabo, vendar pa je bila variabilnost nekoliko večja (preglednica 4). Kompolti hibrid TC je imel največji povprečni premer (4,63 mm), medtem ko je imel USO 31 najmanjšega (3,16 mm). Povprečen premer stebel ni bil odvisen od gostote posevka, povezava je statistično neznačilna (preglednica 5). Premer stebel je lastnost, ki je v velikem deležu odvisna od agrotehnike, predvsem od gostote setve (Amaducci in sod., 2008). V poljskem poskusu Flajšmana in sod. (2016) se je pokazalo, da so bili

povprečni premeri rastlin pri vseh testiranih sortah (razen pri Finoli) bistveno večji, to je od 5,01 mm do 6,28 mm, saj je bila količina semena za setev manjša (25–35 kg/ha), zaradi česar je bila tudi gostota posevka manjša. Opazili smo, da se je statistično značilna razlika v premeru stebel med spoloma pojavila samo pri sorti Marina.

**Preglednica 4:** Povprečna višina (cm) in premer (mm) stebel rastlin konoplje ob žetvi na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani v letu 2017

Sorta	Povprečna višina (cm)				Sorta	Povprečen premer (mm)			
	Vse rast.	M R <sup>I</sup>	Ž/E R <sup>II</sup>	RmS		Vse rast.	M R <sup>I</sup>	Ž/E R <sup>II</sup>	Rm S
Kom. hib.TC	170 <sup>a</sup>	186	155	ns	Kom. hib. TC	4,63 <sup>a</sup>	4,47	4,79	ns
Antal	169 <sup>a</sup>	187	152	0,078	Marina	4,55 <sup>a</sup>	4,64	4,45	*
Monoica	164 <sup>a</sup>	183	144	0,059	Fedora 17	4,37 <sup>a</sup>	/	4,37	/
Marina	162 <sup>a</sup>	185	140	*	Monoica	4,24 <sup>ab</sup>	4,21	4,26	ns
Futura 75	162 <sup>a</sup>	/	162	/	Futura 75	4,21 <sup>ab</sup>	/	4,21	/
KC Dora	157 <sup>a</sup>	171	143	ns	Antal	4,19 <sup>ab</sup>	4,01	4,38	ns
Tiborszallasi	154 <sup>a</sup>	172	136	0,070	KC Dora	4,15 <sup>ab</sup>	4,07	4,23	ns
Helena	153 <sup>a</sup>	157	148	ns	Helena	3,97 <sup>abc</sup>	3,43	4,51	ns
Tisza	149 <sup>ab</sup>	165	133	ns	Tisza	3,91 <sup>abc</sup>	3,77	4,04	ns
Fedora 17	143 <sup>abc</sup>	/	143	/	Tiborszallasi	3,8 <sup>abc</sup>	3,81	3,97	ns
USO 31	113 <sup>bc</sup>	119	107	ns	Santhica 27	3,32 <sup>bc</sup>	/	3,32	ns
Santhica 27	111 <sup>c</sup>	/	111	/	USO 31	3,16 <sup>c</sup>	2,89	3,43	ns

RmS - Razlika med Spoloma, t-test; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ;  $0,05 < p < 0,1$

Vrednosti, označene z različnimi črkami, so statistično značilno različne (Duncan,  $p < 0,05$ )

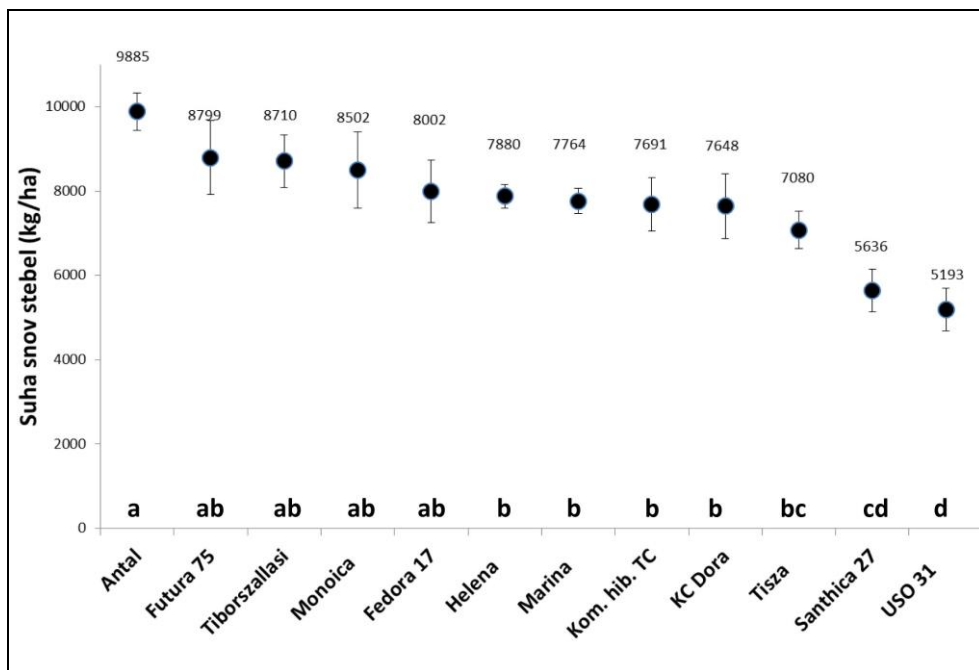
M R<sup>I</sup> – pov. višina/premer moških rastlin; Ž/E R<sup>II</sup> – pov. višina/premer ženskih oz. enodomnih rastlin

### 3.4 Pridelek stebel konoplje

Zaradi sistematičenega načina vzorčenja smo lahko v požetem vzorcu določili več frakcij. V celotni biomasii, ki je obsegala od nekaj več kot 16 t/ha (USO 31) do nekaj nad 31 t/ha (Futura 75), smo določili od 14,4 % (USO 31) pa do 4,3 % (Futura 75) plevela (rezultati niso prikazani), preostala biomasa so bile rastline konoplje. Število rastlin ob žetvi ni imelo statistično značilnega vpliva na delež plevela v posevku (preglednica 5). Po odstranitvi listov in socvetja so v podvzorcii ostala samo sveža stebila, katerih sveža masa je bila od 10,6 t/ha (USO 31) do skoraj 22 t/ha (Antal) (rezultati niso prikazani). Samo stebila (brez listov in socvetja) so v skupni masii rastlin konoplje predstavljala od 68,7 % (Futura 75) do 79,0 % (Marina in Kompolti hibrid TC) (rezultati niso prikazani). Največji pridelek suhe snovi stebel je imela sorta Antal (9558 kg/ha), medtem ko je najmanjšega imela sorta USO 31 (5193 kg/ha) (slika 1). V skupino z največjim pridelkom suhe snovi stebel so spadale še sorte Futura 75 (imela največji pridelek celih rastlin

konoplje), Tiborszallasi, Monoica in Fedora 17. Delež suhe snovi v steblih je znašal od 39,7 % (Santhica 27) pa do 48,8 % (USO 31) (rezultati niso prikazani).

V poljskem poskusu iz leta 2016 je šest sort (Monoica, KC Dora, Futura 75, Kompolti hibridi TC, Santhica 27 in Fedora 17) na isti lokaciji dalo veliko manjši pridelek stebel, na primer sorta z največjim pridelkom Futura 75 je dosegla 3248 kg/ha suhe snovi (v letu 2017 pa 8799 kg/ha) (Flajšman in sod., 2016). Poleg vremenskih razmer, ki so bile v letu 2016 manj ugodne (suša v juliju, avgustu in septembru), so k večjim pridelkom stebel v letu 2017 botrovali predvidoma zgodnejša in gostejša setev ter zgodnejša žetev.



**Slika 1:** Povprečen pridelek suhe snovi stebel konoplje glede na sorto (kg/ha) na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani v letu 2017. Črke označujejo razlike med sorta-mi (Duncan,  $p < 0,05$ ).

Cosentino in sod. (2012) so preučevali vpliv časa setve na pridelek stebel dveh dvodomnih in dveh enodomnih sort navadne konoplje v južni Evropi (Italija). Ugotovili so, da je setev 16. maja v letu 2003 in 20. maja v letu 2004 imela najbolj ugoden vpliv na pridelek suhe snovi stebel, medtem ko je bolj zgodnja in bolj pozna setev negativno vplivala na pridelek. Sorta Futura 75 je dosegla pridelek okoli 5 t in 9 t/ha SS (suhe snovi) stebel v letih 2003 in 2004, medtem ko je sorta Tiborszallasi dosegla pridelka 9 t/ha in 8 t/ha SS stebel v teh dveh letih. Pridelki

suhe snovi stebel obeh sort so primerljivi s pridelki istih sort v naši raziskavi.

Po začetku cvetenja se kopičenje suhe snovi v steblih izrazito zmanjša (Struik in sod., 2000), zato je za zgodnje enodomne sorte značilna manjša količina nadzemne biomase (Cosentino in sod., 2012). To pomeni, da zgodnje sorte dosežejo ne samo manjšo višino, ampak tudi manjši pridelek stebel. To se je v naši raziskavi potrdilo predvsem za enodomni sorti Santhica 27 in USO 31, ki sta zgodnji sorti; imeli sta najnižji pridelek suhe mase stebel, poleg tega sta bili tudi najnižji od vseh sort.

Do nekoliko drugačne ugotovitve glede enodomnih sort so prišli Tang in sod. (2016), ki so testirali več sort na več lokacijah v Evropi (Italija, Češka, Francija in Latvija). Ugotovili so, da se je pridelek stebel pri enodomnih sortah na lokacijah v Italiji in na Češkem povečal, če so žetev opravili šele ob zrelosti semen in ne že v fazi polnega cvetenja. Obratno (razen za lokacijo v Italiji) pa so ugotovili za dvodomne sorte, kjer se je pridelek stebel ob žetvi v času zrelosti semen v primerjavi z žetvijo v polnem cvetenju močno zmanjšal. V naši raziskavi smo ugotovili, da ima večina dvodomnih sort večje pridelke stebel od enodomnih sort (povprečje za 7 dvodomnih sort je bilo 8260 kg/ha SS, povprečje za 5 enodomnih sort je bilo 7102 kg/ha SS). Izjema je francoska sorta Futura 75, ki se je z velikimi pridelki stebel izkazala tudi v nekaterih drugih študijah (Amaducci in sod., 2008; Cosentino in sod., 2012; Tang in sod., 2016; Flajšman in sod., 2016).

### **3.5 Analiza vpliva števila rastlin ob žetvi na nakatere merjene parametre**

Ker se je število rastlin ob žetvi med sortami močno razlikovalo, smo naredili korelacijske teste, kjer smo ugotavljali povezave med naslednjimi spremenljivkami: povezava med številom rastlin ob vzniku ter številom rastlin ob žetvi, povezave med številom rastlin ob žetvi ter povprečno višino rastlin, povprečnem premeru stebel, deležem plevela in pridelkom stebel (suha snov). Torej nas je hkratno zanimalo pet korelacijskih koeficientov, rezultate podaja preglednica 5. Za vsako povezavo podajamo oceno Pearsonovega korelacijskega koeficienta  $r$  ter  $p$ -vrednost dobljeno z Bonferronijevo korekcijo za hkratno testiranje petih testov.

Ob hkratni analizi vseh petih povezav statistično značilnih rezultatov ne dobimo (Bonferronijeva  $p$ -vrednost je vedno nad 0,05). Ugotovili smo, da večja gostota rastlin ob vzniku ne pomeni, da bo večja gostota rastlin tudi ob žetvi. Prav tako število rastlin ob žetvi ni statistično značilno vplivalo na povprečno višino rastlin (negativna korelacija;  $r = -0,2691$ ), povprečen premer stebela (negativna korelacija;  $r = -0,3653$ ), delež plevela v posevku in na pridelek stebel (suha snov) konoplje. Ta ugotovitev kaže na to, da je v našem poljskem poskusu, kjer je bilo ob žetvi 218 do 366 rastlin/m<sup>2</sup>, imela gostota setve v danih pedoklimatskih pogojih statistično neznačilen vpliv na omenjene parametre.

**Preglednica 5:** Ocena Pearsonovega korelacijskega koeficienta  $r$  ter Bonferronijev popravek  $p$ -vrednosti za testiranje vseh domnev korelacije med številom rastlin ob žetvi in nekaterimi merjenimi parametri

		Število rastlin po vzniku	Povprečna višina rastlin	Povprečni premer stebel	Delež plevela	Pridelek stebel (SS)
Število rastlin	Pear- sonov $r$	0,3575	-0,2691	-0,3653	0,0530	0,0516
ob žetvi	Bonferron- ijev $p$	n.z. ( $p=0,1615$ )	n.z. ( $p=0,5620$ )	n.z. ( $p=0,1425$ )	n.z. ( $p=1,000$ )	n.z. ( $p=1,000$ )

n.z. – ni statistično značilnega vpliva ( $p > 0,05$ )

#### 4 ZAKLJUČKI

Vznik posevka je bil dober, saj smo ugotovili poljski vzniki 300 do 430 rastlin/m<sup>2</sup>. Zato predvidoma tudi med rastjo posevka ni bilo težav s pleveli. Enodomne sorte so bile ob žetvi, ki je potekala 105 dni po setvi, to je 17. in 18. avgusta, glede fenofaze izenačene, saj so povsod semena že zorela (fenofaza 2305). Pri dvodomnih sortah pa je bilo več razlik - moške rastline so cvetele (fenofaza 2102) ali že zaključevale s cvetenjem (fenofaza 2103), ženske pa so bile v polnem cvetenju (fenofaza 2202) ali so prva semena že dozorevala (fenofaza 2203). Sorta Kompolti hibrid TC je dosegla največjo višino kot tudi največji premer stebela. Razlog je verjetno tudi v številu rastlin, ki smo ga določili na m<sup>2</sup> ob žetvi – ta sorta je imela najmanj rastlin na m<sup>2</sup>, kar pomeni, da so imele rastline več prostora za rast. Največji pridelek suhe snovi stebel je dosegla dvodomna madžarska sorta Antal (9885 kg/ha SS), najmanjšega pa enodomni sorti Santhica 27 in USO 31 (5636 oziroma 5194 kg/ha SS).

**Zahvala.** Poljski poskus je bil narejen v okviru CRP V4-1611 »Pridelava industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) v Sloveniji«, ki ga financirata ARRS in MKGP.

#### 5 VIRI IN LITERATURA

- Amaducci S., Errani M., Venturi G. Response of hemp to plant population and nitrogen fertilisation. *Italian journal of agronomy*. 2002; 6(2): 103-112.
- Amaducci S., Zatta A., Pelatti F., Venturi G. Influence of agronomic factors on yield and quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibre and implication for an innovative production system. *Field Crops Research*. 2008; 107(2): 161-169.
- ARSO. Agencija Republike Slovenije za okolje. 2017.  
<http://www.arsp.gov.si> (okt. 2017)
- Bennett S. J., Snell R., Wright D. Effect of variety, seed rate and time of cutting on fibre yield of dew-retted hemp. *Industrial crops and products*. 2006; 24.1: 79-86.
- Berenji J., Sikora V., Fournier G., Beherec O. Genetics and selection of hemp. V: Bouloc P., Allegret S., Laurent A., ur. *Hemp: industrial production and uses*. CABI, Wallingford, Boston; 2013: 48-71.

- Cosentino S. L., Test G., Scordia D., Copani V. Sowing time and prediction of flowering of different hemp (*Cannabis sativa* L.) genotypes in southern Europe. *Industrial crops and products*. 2012; 37.1: 20-33.
- Cromack H. T. H. The effect of cultivar and seed density on the production and fibre content of *Cannabis sativa* in southern England. *Industrial crops and products*. 1998; 7(2): 205-210.
- Čeh B., Čremožnik B. Vpliv sorte in količine semena za setev na pridelek vršičkov in stebel navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.). *Hmeljarski bilten*. 2016; 23: 88-104.
- Flajšman M., Jakopič J., Košmelj K., Kocjan Ačko D. Morfološke in tehnološke lastnosti sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) iz poljskega poskusa Biotehniške fakultete v letu 2016. *Hmeljarski bilten*. 2016; 23: 88-104.
- Ihemp Farms LTD, Milevtsi 25, 5350 Gabrovo, Bulgaria. 2017  
<http://www.ihempfarms.com/Default> (nov. 2017)
- Hennik S. Optimisation of breeding for agronomic traits in fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) by study of parent-offspring relationships. *Euphytica*. 1994; 78.1-2: 69-76.
- Razvojne faze pri konoplji (prevod iz: CPVO-TP/276/1 končni; 28/11/2012, str.: 15)  
[http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/11/Razvojne-faze-pri-konoplji\\_prevod-dokumenta-CPVO-kon%C4%8Dna.pdf](http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/11/Razvojne-faze-pri-konoplji_prevod-dokumenta-CPVO-kon%C4%8Dna.pdf) (okt. 2017)
- Kocjan Ačko D. Poljščine, pridelava in uporaba. Kmečki glas, Ljubljana. 2015: 187 str.
- Kocjan Ačko D. Pozabljene poljščine. Kmečki glas, Ljubljana. 1999: 187 str.
- Martinov M., Marković D., Tešić M., Grozdanić N. Hemp harvesting mechanization. *Agricultural Engineering*. 1996; 2.1-2: 21-36.
- McDougall G. J., Morrison I. M., Stewart D., Weyers J. D. B., Hillman J. R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1993; 62.1: 1-20.
- Mediavilla V., Jonquera M., Schmid-Slembrouck I., Soldati A. Decimal code for growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Journal of the international hemp association*. 1998; 5.2: 68-74.
- Mediavilla V., Leupin M., Keller A. Influence of the growth stage of industrial hemp on the yield formation in relation to certain fibre quality traits. *Industrial Crops and Products*. 2001; 13.1: 49-56.
- Meijer W. J. M., van der Werf H. M. G., Mathijssen E. W. J. M., van den Brink P. W. M. Constraints to dry matter production in fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *European Journal of Agronomy*. 1995; 4(1): 109-117.
- Salentijn E.M., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L. M. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. 2015; 68: 32-41.
- Schäfer T., Honermeier B. Effect of sowing date and plant density on the cell morphology of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. 2006; 23(1): 88-98.
- Skupni katalog sort poljščin. 2017  
<http://eur-lex.europa.eu/homepage.html> (nov. 2017)
- Struik P. C., Amaducci S., Bullard M. J., Stutterheim N. C., Venturi G., Cromack H. T. H. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*. 2000; 11(2): 107-118.
- Tang K., Struik P. C., Yin X., Thouminot C., Bjelková M., Stramkale V., Amaducci S. Comparing hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars for dual-purpose production under contrasting environments. *Industrial Crops and Products*. 2016; 87: 33-44.
- van der Werf H. M., Wijlhuizen M., de Schutter J. A. A. Plant density and self-thinning affect yield and quality of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Field Crops Research*. 1995; 40(3): 153-164.



## APPLICATION OF SEX MOLECULAR MARKERS IN HEMP PLANT (*Cannabis sativa* sp.)

Zala KOLENC<sup>35</sup> and Andreja ČERENAK<sup>36</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 9. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 27. 11. 2017

### Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* sp.) is important annual crop plant with increasingly developing market. It is predominantly dioecious, but the varieties intended for fiber production are bred to be monoecious. Sex expression is considered to be one of the important factors for practical implications during cultivation and during the breeding process. In this study, the three already developed markers have been tested on seven different hemp varieties grown in Slovenia in 2017. The performed Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses indicated that the molecular marker MADC2 enables us the most reliable identification of sex in hemp plants. On the other hand, the molecular markers SCAR119 and SCAR323 are also very useful in practice. To conclude, the application of sex molecular markers in hemp plants was successful, we anticipate it for practical use during our future experiments.

**Keywords:** hemp, sex determination, molecular markers

## UPORABA MOLEKULSKIH MARKERJEV ZA DOLOČANJE SPOLA PRI KONOPLJI (*Cannabis sativa* sp.)

### Izvleček

Konoplja (*Cannabis sativa* sp.) je pomembna enoletna kmetijska rastlina s hitro rastočim trgom. Je predvsem dvodomna rastlina, vendar so sorte, namenjene za pridelavo stebel, žlahtnjene na enodomnost. Izražanje spola je ena pomembnejših lastnosti rastlin pri pridelavi ali med samim procesom žlahtnjenja. V naši raziskavi smo preizkusili tri že objavljene molekulske markerje pri sedmih različnih sortah konoplje, ki so rastle na isti parceli v Sloveniji v letu 2017. Opravljene analize verižne reakcije s polimerazo (PCR) so pokazale, da je molekulski marker MADC2 zelo primeren za določanje spola pri konoplji. Po drugi strani sta molekulska markerja SCAR119 in SCAR323 prav tako zelo uporabna za praktično uporabo. Aplikacija molekulskih markerjev pri konoplji je bila uspešna, v prihodnje pa predvidevamo uporabo preizkušenih markerjev v nadaljnjih poskusih.

**Ključne besede:** konoplja, določanje spola, molekulske markerje

<sup>35</sup> Dr. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: zala.kolenc@ihps.si

<sup>36</sup> Doc. dr., prav tam, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

## 1 INTRODUCTION

Hemp is a herbaceous, wind-pollinated annual crop, which is commonly cultivated to gain long and strong fibers or qualitative seeds (Salentijn et al., 2015). Hemp and marijuana are both strains of the same species (*Cannabis sativa* L.), despite the fact that they exhibit different  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) content (Aiello et al., 2016). The market of hemp products is increasingly developing, considering the multi-purpose use of the plant. Hemp is used for stalk (for textiles, building materials, paper ...) or for seed production (for food purposes - seed cake is rich with proteins, energy (ethanol production) and environment purposes (phytoremediation), seed oil and cosmetics). Hemp leaves and inflorescences are useful as well because of their medical indications, anti-microbe purposes, agro-chemical effects, etc. (Vonapartis et al., 2015; Salentijn et al., 2015).

It is generally dioecious plant, but hemp varieties intended for fiber production have been bred to be monoecious (Srivastava and Yadav, 2013). Monoecious hemp varieties are also used when both seed production and stem harvesting are performed. On the other hand, there is the disadvantage of monoecious hemp varieties because of the occurrence of self-pollination, which could result in a lower stem yield and in the slower rate of genetic progress (Mandolino et al., 1999). So far it is known that flowering and senescence of male plants occur faster compared to female plants. As a consequence, it is difficult to make the harvesting for fiber in optimal time. In contrast, harvesting for fiber is much easier when we use monoecious varieties. To take into account all these knowledge, sex expression is considered to be one of the important factors for practical implications not only during cultivation but also during breeding process (Faux et al., 2016). During the breeding process it is essential to determine sex before flowering, to prevent unwanted pollination of female plants.

Hemp is diploid ( $2n=20$ ) species with heteromorphic sex chromosomes and is characterized by sexual dimorphism. In dioecious hemp, the male plants have XY chromosomes and the female hemp plants have XX sex chromosomes, and monoecious hemp has homomorphic sex chromosomes (XX) as well (Faux et al., 2016). Molecular markers linked to male sex in hemp were identified using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technology. From molecular marker OPA8, developed by RAPD technology, the primer MADC2 (Male-Associated DNA from Cannabis) was obtained with a total length of 371 bp. The obtained molecular marker should be sustainable for a precise, early and rapid identification of male plants during breeding programs of dioecious and monoecious hemp (Mandolino et al., 1999). The abundant number of potential molecular markers was obtained with amplified fragment length polymorphism (AFLP) technology for sex determination in hemp (Flachowsky et al., 2001). Subsequently, a research by testing 20 decamer RAPD primers, obtained from different species and linked to male sex, was applied. The results obtained 2 novel

male-specific molecular markers (MADC5 and MAD6) which were converted into sequence-characterized amplified region (SCAR) markers (SCAR 119 and SCAR 323) and were successfully correlated with male sex (Törjék et al., 2002). Besides of those obtained molecular markers, three of them have been tested in the latest published study (Mendel et al., 2016). This study was performed on different varieties of industrial hemp and medical cannabis and results show that primers should be successfully used for sex determination in both subspecies. So far, genetic mapping has also been carried out by using AFLP markers and genetic determination of sex expression has been investigated with quantitative trait loci (QTL) analysis (Faux et al., 2016).

Heretofore, molecular markers for sex determination in dioecious plants have been developed in *Humulus lupulus* (Poley et al., 1997; Jakše et al., 2008; Čerenak et al., 2015), *Carica papaya* (Deputy et al., 2002), *Asparagus officinalis* (Gao et al., 2007), *Calamus guruba* Buch.-Ham. (Sinha et al., 2017), *Simmondsia chinensis* (Heikrujam et al., 2014), *Garcinia gummi-gutta* (Joseph et al., 2014), *Ficus fulva* (Parrish et al., 2004) by RAPD-derived SCAR markers, sequence tagged site (STS) markers, Simple Sequence Repeats (SSRs), Diversity Arrays Technology (DArT) or AFLP markers.

The objective of presented study was testing three developed molecular markers for sex determination in different hemp varieties, grown in 2017 on the same field of Slovenian Institute of Hop Research and Brewing at the same technology.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant material

Hemp samples from 7 genotypes (4 from EU Variety List: Kompolti hibrid TC, KC Dora, Tiborszallasi, Carmagnola and 3 Slovenian selections) (Table 1) were obtained in the fields of Slovenian Institute of Hop Research and Brewing. The hemp leaves were sampled and total genomic DNA was extracted from fresh plant material. The extraction was done according to the Kump and Javornik (1996) with minor modifications. The concentration of DNA was measured with the fluorometer (Qubit 3.0) and the DNA was diluted to 4 ng/μl.

### 2.2 PCR reaction

In PCR reaction 20 ng of diluted DNA was used in 10 μl PCR solution containing 1 x PCR buffer, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 U of KAPA3G Plant DNA polymerase and primers in the concentration of 0.5 μM (Table 2). According to the used primer, the PCR amplifications were carried on as it is described in Table 2. All PCR products were separated on 2 % agarose gel in TBE buffer and electrophoresis (Biometra) lasted for 1 hour at 165 V.

**Table 1:** *Hemp genotypes involved in research.*

<b>Hemp genotype</b>	<b>Sex*</b>	<b>DNA concentration (ng/μl)</b>	<b>Label**</b>
Kompolti hibrid TC	M	171	1
Kompolti hibrid TC	Ž	95	2
KC Dora	M	80	3
KC Dora	Ž	107	4
Tiborszallasi	M	123	5
Tiborszallasi	Ž	152	6
Carmagnola	M	160	7
Carmagnola	Ž	126	8
Fukal	M	154	9
Fukal	Ž	100	10
Gorička Simba	M	102	11
Gorička Simba	Ž	133	12
Helena	M	138	13
Helena	Ž	147	14

\* phenotypic sex determination in the field

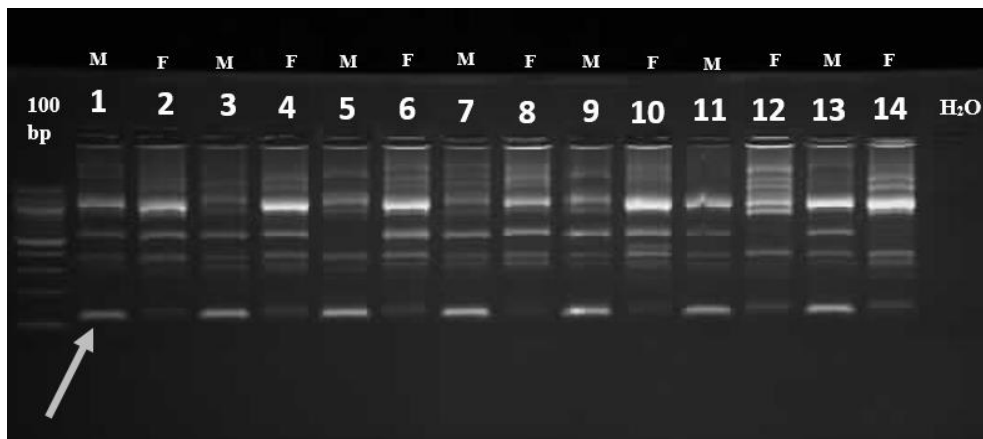
\*\* label on the gel electrophoresis figures

**Table 2:** *Primers used, their concentrations, and PCR conditions.*

<b>Primer</b>	<b>Amplification product</b>	<b>Reference</b>	<b>PCR conditions</b>
SCAR119_F SCAR119_R	The product of male sex-linked DNA is 113 bp long.	Törjék et al., 2002	95 °C for 15 minutes, 40 cycles on 94 °C for 30 seconds, 55 °C for 1.5 minute, 72 °C for 1.5 minutes and the reactions were completed by incubating at 72 ° for 8 minutes
SCAR323_F SCAR323_R	The product of male sex-linked DNA is 323 bp long.	Törjék et al., 2002	95 °C for 15 minutes, 10 cycles on 94 °C for 30 seconds, 67 °C – 1 °C for 30 seconds, 72 °C for 1.5 minutes, following by 30 cycles on 94 °C for 30 seconds, 57 °C for 30 seconds, 72 °C for 1.5 minute and the reactions were completed by incubating at 72 ° for 8 minutes
MADC2_F MADC2_R	The product of male sex-linked DNA is 390 bp long.	Mandolino et al., 1999	95 °C for 15 minutes, 40 cycles on 94 °C for 30 seconds, 60 °C for 1.5 minutes, 72 °C for 1.5 minutes and the reactions were completed by incubating at 72 ° for 8 minutes

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The method validation was carried out for each used primer. The tested primer SCAR119 was applied on hemp sample set and the presented band 119 bp was absolutely linked to male sex (Figure 1).



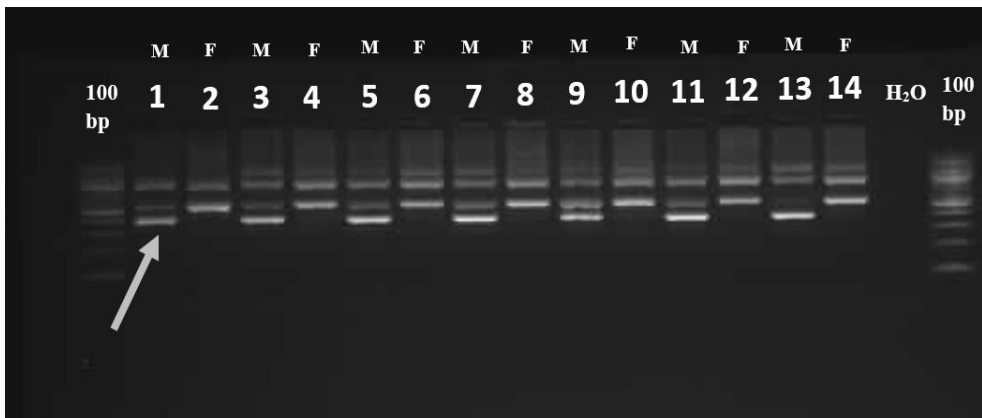
**Figure 1:** The agarose gel with the marked band of molecular marker SCAR119. The numbers on the picture are described in Table 1 (label). M is mark for male and F for female plants, both determined as phenotypic traits.



**Figure 2:** The agarose gel with the marked band of molecular marker SCAR323. The numbers on the picture are described in Table 1 (label). M is mark for male and F for female plants, both determined as phenotypic traits.

The results of PCR amplification in case of SCAR119 are partly in accordance to result of Mendel et al. (2016) who wrote that the molecular marker SCAR119 is the most reliable to detect male plants in species *Cannabis sativa*. Results of PCR amplification with the SCAR119 molecular marker are also in correlation to data of Törjék et al. (2002) who revealed that in male plants the band 119 bp was presented. In our case, the marker was amplified also in female plants, but the presence of 119 bp long band was less intensive and the sex could be easily determined and completely coincided with phenotypic results. On the other hand, in the Figure 1 longer non – specific fragments, compared to molecular marker SCAR119 (119 bp), were multiplied as well.

The tested primer SCAR323 was applied on the same hemp sample set and the presented band 323 bp was linked to male sex. When primer SCAR323 was used the presence of the band 323 bp was also multiplied in samples of female plants, but it was much less intensive (Figure 2) comparing to the male plants.



**Figure 3:** The agarose gel with the marked band of molecular marker MADC2. The numbers on the picture are described in Table 1 (label). M is mark for male and F for female plants, both determined as phenotypic traits.

Mandolino et al. (1999) developed primer MADC2 and results of their research revealed that band at 390 bp is presented in male plants, while in female plants there is no evidence of the 390 bp band. Mandolino et al. (1999) concluded that MADC2 is probably non-coding genome region but they could not confirm if the sequence is a part of the genes for sex determination or not. Our results are in contrast to the Mendel et al. (2016) results, who concluded that MADC2 sequence is not located on the male chromosome because in their multiplication 390 bp band multiplied besides in male plants also in phenotypically female plants. On the other hand, in our case, the primer MADC2 gave us the clearest results from all 3 tested

markers (Figure 3) with no amplifications in female plant samples. On the other hand, there are also some non-specific bands, which are longer than MADC2.

#### 4 CONCLUSIONS

All three used primers (SCAR119, SCAR323, MADC2) were applied on same hemp sample set, including 7 different genotypes with male and female plants. The results confirm that all primers are reliable and results completely coincide with phenotype scores. In our case, the MADC2 marker appeared to be the most reliable, because the band appears only in male plants, without any less intensive amplification in female plants, as it is possible for SCAR119 and SCAR323 markers. Our study confirmed that developed markers are useful tool to distinguish male and female hemp plants. We plan to use tested markers in further research on hemp plant.

#### 5 REFERENCES

- Aiello G., Fasoli E., Boschin G., Lammi C., Zanoni C., Citterio A., Arnoldi A. Proteomic characterization of hempseed (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Proteomics*. 2016; 147: 187-196.
- Čerenak A., Jakše J., Kolenc Z., Škof S., Koutoulis A., Whittock S., Javornik B. Determination of sex in hop seedlings by using male-specific molecular markers. *New challenges in agronomy* 2015. 2015: 157-161.
- Deputy J., Ming R., Ma H., Liu Z., Fitch M., Wang M., Manshardt R., Stiles, J. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2002; 106(1): 107-111.
- Faux A., Draye X., Flamand M., Occre A., Bertin, P. Identification of QTLs for sex expression in dioecious and monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica*. 2016; 209(2): 357-376.
- Flachowsky H. E., Schumann W.E., Peil W.A. Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding*. 2001; 120(4): 305-309.
- Gao, W., Li, R., Li, S., Deng, C. and Li, S. Identification of two markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007; 54(6): 816-821.
- Heikrujam M., Sharma K., Kumar J., Agrawal V. Generation and validation of unique male sex-specific sequence tagged sites (STS) marker from diverse genotypes of dioecious *Jujube-Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. *Euphytica*. 2014; 199(3): 363-372.
- Jakše J., Stajner N., Kozjak P., Čerenak A., Javornik B. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*. 2008; 21(2): 139-148.
- Joseph K., Murthy H., Ravishankar K. Development of SCAR marker for sex identification in dioecious *Garcinia gummi-gutta*. *Trees*. 2014; 28(6): 1645-1651.

- Kump B., Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 144: 149-158.
- Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., Ranalli P. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1999; 98(1): 86-92.
- Mendel P., Lalge A. B., Vyhnanek T., Trojan V., Kalousek P., Maassen H., Havel L. Progress in early sex determination of cannabis plant by DNA markers, *Mendelnet*. 2016: 731-735.
- Parrish, T., Koelewijn, H. and van Dijk, P. Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulva* Reinw. ex Bl. (Moraceae). *Sexual Plant Reproduction*. 2004; 17(1): 17-22.
- Polley, A., Seigner, E., Ganai, M.W. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*. 1997; 40: 357-361.
- Salentijn E., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. 2015; 68: 32-41.
- Sinha P., Nanda S., Joshi R., Panda P. Development of a sequence-tagged site (STS) marker for sex identification in the dioecious rattan species *Calamus guruba* Buch.-Ham. *Molecular Breeding*, 2017; 37: 3.
- Srivastava A., Yadav VK, Microscopical and Chemical Study of *Cannabis sativa*. *Journal of Forensic Research*. 2013; 5: 1.
- Törjék O., Bucherna N., Kiss E., Homoki H., Finta-Korpelová Z., Bócsa I., Nagy I., Heszky L. E. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. *Euphytica*. 2002; 127: 209-218.
- Vonapartis E., Aubin M., Seguin P., Mustafa A., Charron J.. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015; 39: 8-12.



## TEHNOLOŠKE ZAHTEVE ZA KOMBAJNE NA NJIVAH S KONOPLJO V SLOVENIJI

Ivan PAHOLE<sup>37</sup>, Matej PAL<sup>38</sup>, Urban BELCA<sup>39</sup> in Aleš BELŠAK<sup>40</sup>

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 25. 10. 2017

Sprejeto / accepted: 11. 12. 2017 2017

### Izvleček

Ena izmed novejših kultur, ki v zadnjem času najdejo mesto na njivah, je konoplja za industrijske namene. Gre za rastlino, ki jo je možno uporabiti pravzaprav v celoti. Zaradi nehomogenosti tal na njivah, na katerih je posejana, žilavosti stebel v času zrelega semena, neenakomerne višine in majhnih površin predstavlja izziv predvsem spravilo njenega semena. Način spravila glede na tehnološke zahteve je z vidika obstoječega načina spravila žit še poseben izziv. Zaradi posebnih lastnosti strukture rastline je pri spravilu treba upoštevati mnogo zahtevnejše pogoje spravila z obstoječo strojno tehniko. Pri tem je treba ustrezne konstrukcijsko-tehnološke parametre kombajna še posebej ovrednotiti, da se pri spravilu ne pojavljajo težave. Pri tem je ugotovljeno, da višina reza in drugi tehnološki parametri pri obdelavi določajo uspešnost spravila brez zastojev.

**Ključne besede:** konoplja, spravilo semena, kombajn

## TECHNOLOGICAL REQUIREMENTS FOR COMBINE HARVESTERS FOR HEMP IN SLOVENIA

### Abstract

Hemp for industrial purposes belongs to field crops, the cultivation of which has started in Slovenia only recently. The entire plant can be used. Due to different growing potentials of the surface where it grows, the plant is adequately rich in seeds and leaf area, whereas, when it grows in smaller fields, it is required to face the challenge of how to harvest the industrial hemp. In view of technological requirements, the method of harvesting represents a large challenge from the aspect of the existing methods of harvesting cereals. Owing to special properties of the

<sup>37</sup> Izr. prof., dr, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru, Smetanova 17, 2000 Maribor, e-pošta: ivan.pahole@um.si

<sup>38</sup> Mag. inž. str., Kmetija Pal, Pal Marjan, Zlatoličje 96, Zlatoličje, 2205 Starše, e-pošta: matej.pal@gmail.com

<sup>39</sup> Študent, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru, Smetanova 17, 2000 Maribor, e-pošta: belca.urban@gmail.com

<sup>40</sup> Doc. dr, Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru, Smetanova 17, 2000 Maribor, e-pošta: ales.belsak@um.si

plant structure, it is necessary to take very demanding conditions of harvesting with the existing machinery into consideration. Primarily, it is required to evaluate the relevant design- and technology-related parameters of machinery in order not to encounter problems during harvesting.

**Key words:** hemp, seed harvesting, combine harvester

## 1 UVOD

Konoplja je rastlina, ki ponuja množico različnih možnosti uporabe. Tako predstavlja velik potencial kot nadomestna ali dopolnilna kultura tudi na zemljiščih, za katera ustrezno pridelavo kmetijskih rastlin morda ne bi pričakovali. Še posebej zato, ker se nizajo možnosti ustrezne predelave različnih delov rastline v posebne produkte (Robinson, 2000; Robinson, 2016). V svetu lahko danes zasledimo velike in zelo zmogljive kombajne za žetev konoplje. Tako imajo na primer širino žetve tudi šest metrov in več. Večina teh strojev sploh ni izdelana tako, da bi vozili po cestah od njive do njive. V taki obliki seveda niso primerne za majhne in raztresene njive, posejane s konopljo v Sloveniji.

V prispevku je prikazan delni pregled strojne opreme za spravilo semen konoplje v svetu in rezultati raziskav, ki potekajo v okviru projekta CRP: V4-1611 Pridelava industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) v Sloveniji.

## 2 OPIS KONOPLJE S STALIŠČA SPRAVILA SEMENA

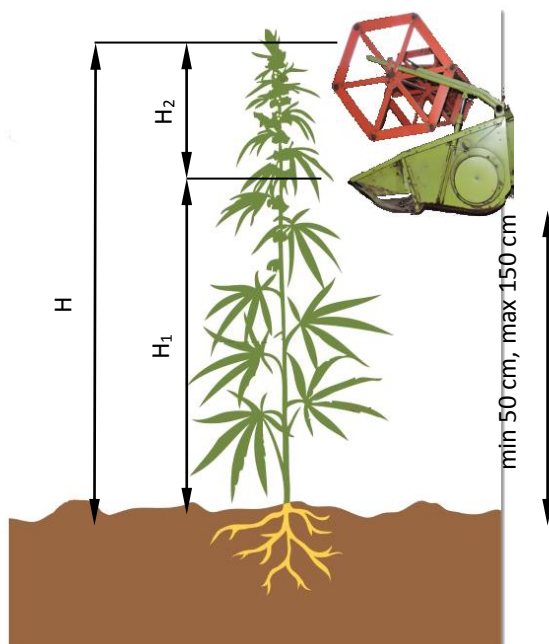
Navajamo glavne značilnosti konoplje, ki so ključnega pomena pri zasnovi kombajnov za spravilo semena konoplje. Struktura rastline je podana na sliki 1. Pri tem je razvidno, da je višina rastline glede na kulture, ki jih pogosteje srečujemo na naših njivskih površinah, znatno večja. Steblasta pokončna oblika z omejenimi stranskimi poganjki predstavlja obliko, ki uspeva v vrstni postavitvi z zamikom ali brez. Struktura stebela z usmerjenimi vlakni omogoča mehanske lastnosti, kot so večja trdnost in žilavost glede na druge rastline. Nekatere sorte konoplje lahko ob ugodnih rastnih razmerah zrastejo tudi 300 cm visoko. Vsi nadzemni deli konoplje so uporabni, čeprav posamezne dele rastline vrednotimo različno (Schreiber, 2002).

Glavne posebnosti pri spravilu industrijske konoplje so njena višina, neenakomerna višina rastlin istega posevka in izredno žilavo steblo, ki se navija okrog vseh vrtečih se delov kombajnov za spravilo konoplje v času zrelega semena.

Osnovna cilja pri žetvi semena pa sta:

- pobrati vso seme in
- v mlatilnico stroja (kombajna) spraviti čim manj stebel. Tako preprečimo veliko količino mase rastlin v mlatilnici in posledično manjšo možnost navijanja vlaken.

Na sliki 1 je prikazana izmerjena višina konoplje glede na sorto v oglednem sortnem poskusu s konopljo na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v letu 2017. Iz preglednice 1 pa je razvidno, da lahko konoplja zraste višje od 2,5 metra, kot navaja tudi Schreiber (2002), in ima zelo neenakomerno višino, zato je potrebno višino reza pri kombajnu nastavljanjati, da dosežemo optimalno višino žetve semena.



**Slika 1:** Povprečna višina konoplje v času tehnološke zrelosti semena

Ugotovimo lahko, da je povprečna višina konoplje zelo različna glede na sorto. To pomeni, da mora kombajn zagotavljati višino rezanja vsaj 1,5 metra (Konoplja.net, 2017), pri nekaterih nižjih sortah pa mora biti omogočena možnost reza tudi že na višini 45 cm. Nujno potrebno pa je, da ima stroj možnost nastavljanja višine reza žetve brezstopenjsko med delom. Potrebno je poudariti, da pri tako različnih višinah rastlin konoplje ne moremo uporabljati strojev (kombajnov), ki bi imeli večjo širino vstopnega žetvenega dela, na primer štiri, pet ali celo šest metrov. Pri žetvi lahko namreč prihaja do primerov, ko imamo v smeri vožnje na eni strani vstopnega dela zelo nizke rastline na drugi strani pa visoke rastline.

**Preglednica 1:** Višina konoplje, izmerjena 14. 9. 2017 na lokaciji Žalec (vir: IHPS, ogledni sortni poskus s konopljo)

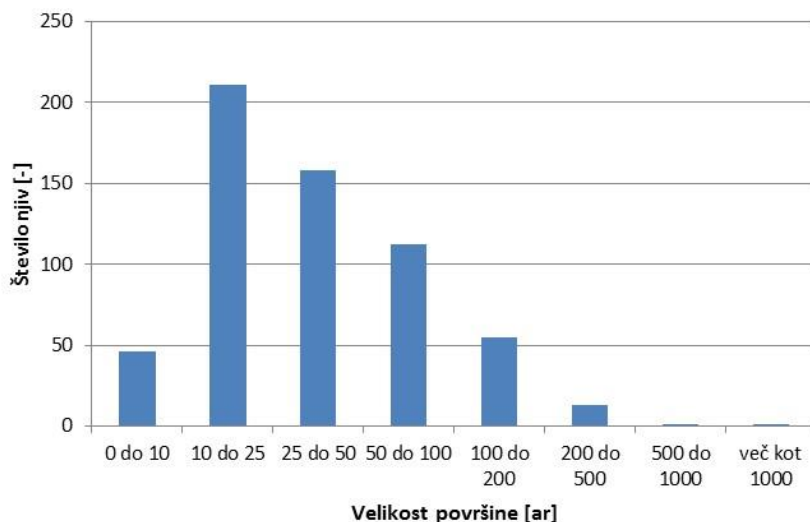
Sorta	Višina rastlin H (v cm)	Višina spodnjega dela najnižjega socvetja H <sub>isp</sub> (v cm)	Višina spodnjega dela najvišjega socvetja H <sub>1zg</sub> (v cm)
Gorička Simba	115–240	100	180
Fedora 17	110–252	100	185
KC Dóra	130–300	115	230
Uso 31	100–230	85	160
Finola	55–90	45	60
Santhica 27	130–280	118	210
Monoica	140–285	125	227
Tiborszallasi	100–290	85	240
Tisza	105–267	97	210
Kompolti hibrid TC	115–285	95	220
Férimon	110–270	100	240
Carmagnola	130–340	115	300
Helena	112–300	106	260
Antal	105–340	95	280
Fukal	112–330	102	290

### 3 OPIS IN LOKACIJA NJIV, POSAJENIH S KONOPLJO V SLOVENIJI

#### 3.1 Rزتresenost njiv s konopljo po Sloveniji

Pridelava konoplje v Sloveniji je še vedno v poskusni fazi. Prevladujejo predvsem manjše njive s konopljo. Po podatkih Ministrstva za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije je imela največja površina, posejana z konopljo v Sloveniji, v letu 2017 površino 1087 arov in se nahaja v Ormožu. Le pet njiv je imelo večjo površino kot 3 ha. Najmanjša dovoljena površina je 10 arov. Povprečna velikost s konopljo posajenih njiv v Sloveniji je bila v letu 2017 52 arov. Skupna površina konoplje v letu 2017 je bila 286 hektarjev (Čeh, 2017). Na sliki 2 je prikazano število posevkov konoplje v Sloveniji glede na velikost njive.

Iz navedenih virov in ugotovitev lahko sklepamo, da v Sloveniji prevladujejo manjše površine, posejane s konopljo. Velikost le-teh je od 10 do 70 arov. Zato so primerni za spravilo semen konoplje manjši kombajni.



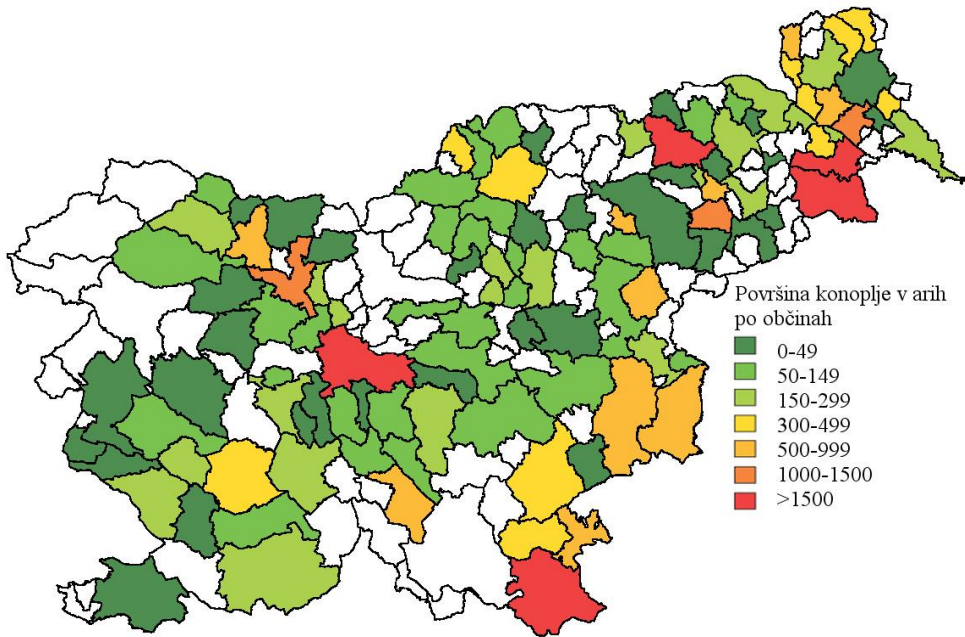
**Slika 2:** Število njiv, posejanih s konopljo, glede na velikost v Sloveniji v letu 2017 (podatki MKGP)

Na sliki 3 je prikazana razpršenost posevkov konoplje v Sloveniji po občinah. Z nje lahko razberemo, da se le-ti nahajajo po vsej Sloveniji, vendar v večini občin površina posevkov ne preseže 150 arov. Največ konoplje gojimo na območju Prekmurja, Novega mesta in Črnomlja. Nekoliko večje površine so še na območju občin Ljubljana, Maribor, in Kranj.

### 3.2 Postavitev koncepta o velikosti in številu kombajnov

Kombajni se lahko gibljejo v radiju 10 km (15 km novejši tipi kombajnov). Podatek je dobljen na osnovi praktičnih izkušenj, ki jih imajo lastniki kombajnov za žetev žit. Premik kombajna se običajno izvede od parcele do parcele po javnih poteh in cestah. Težava nastopi, ko imamo majhne parcele in je do sosednje parcele velika razdalja. Take razdalje pomenijo tako časovno kakor tudi gospodarsko tvegano žetev. Premik stroja predstavlja večji delež stroškov in časa kot žetev sama.

Stroji za žetev konoplje imajo večjo širino kot 2,5 metra. To pa pomeni, da mora imeti kombajn pri premiku spremstvo, kar prispeva k zvišanju stroškov premika. Za premagovanje večjih razdalj med parcelami je mogoče kombajn naložiti na ustrezno prikolico in prepeljati do druge parcele. Omenjen postopek je upravičen morda le v primeru večjih parcel.

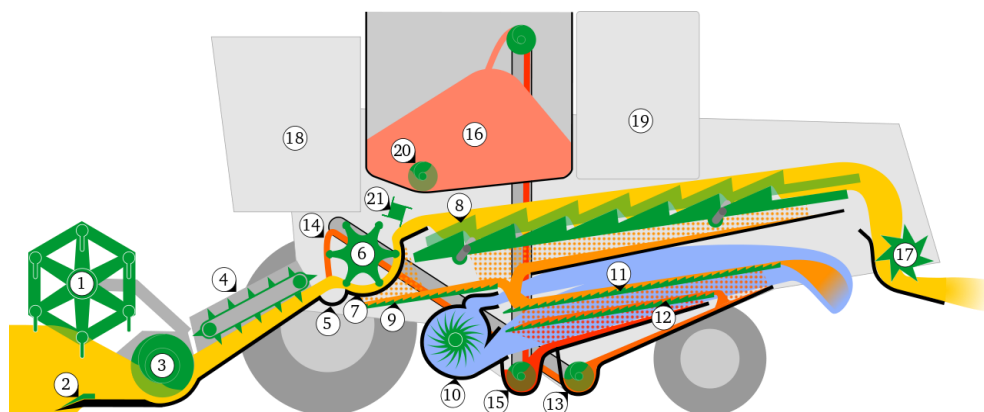


*Slika 3: Prikaz razpršenosti posevkov konoplje v Sloveniji po občinah v letu 2017 (podatki MKGP)*

## 4 KONCEPT KOMBAINOV ZA SPRAVILO KONOPLJE

### 4.1 Zahteve za kmetijsko tehniko za spravilo konoplje na manjših površinah

Slika 4 (Wastlhuber, 2009) prikazuje osnovni princip delovanja kombajnov. Počasi se vrteče kolo (motovilo) (1) potiska žita proti rezalni prečki oz. grebenu (2), kjer noži odrežejo konopljo, ki ga nato polž na vstopnem delu (3) potiska proti vходу v procesni mehanizem kombajna (4). Rezalna prečka deluje po principu rezila pri kosilnici z noži. Boben za mlattev (6) stisne konopljo ob kletko (7) in tako loči seme od slame. Nato gre material na sita (11 in 12), kjer pade seme skozi sita, medtem ko se slama pomika s transporterji, ki se imenujejo transporterji slame (8). Proces se nadaljuje proti zadnjemu delu kombajna, skozi sita pa pade seme, ki se nato s transporterjem (15) premakne v zalogovnik (16). Ko je zalogovnik poln, se seme preko polžastega transporterja presipa iz zalogovnika na traktorsko prikolico (20). Slama pade skozi odprtino na zadnjem delu kombajna. Nekateri kombajni imajo še sekalnik slame, ki jo ustrezno zreže na koščke in jo raztrosi po površini.



*Slika 4: Osnovni princip delovanja kombajnov (Wastlhuber, 2009)*

#### 4.2 Posebne zahteve za kombajne za žetev konoplje za seme

Za žetev konoplje mora biti standardni žitni kombajn, zaradi specifičnih značilnosti te rastline, prilagojen. Glavna razlika glede na žetev žit je predvsem v tem, da želimo rez višje, in sicer tik pod socvetji, saj gre tako skozi kombajn manjši del konopljinoga stebela, sicer lahko nastopijo težave. Vlaknasto in žilavo steblo povzroča težave predvsem na motovilu in bobnu, kjer se začnejo stebela navijati okrog osi in gredi podobno kot vrvi. S tem lahko popolnoma zaustavijo delovanje kombajna ali ga celo poškodujejo.

Težava se pojavi tudi pri kletki (7) za ločevanja semena od slame, saj je kletka za druga žita bolj zaprta, saj je to potrebno, da se seme loči. Pri konoplji, pri kateri se seme znatno lažje loči od rastline, pa to ni potrebno in je bolj primerna bolj odprta kletka, ki pa preprečuje, da bi se konoplja navijala okrog vrtečega se bobna. To so tudi glavni vzroki, da se lastniki kombajnov za žetev žit ne odločajo za žetev semena konoplje.

Glede na opisane posebnosti konoplje sledi, da je treba pri standardnem kombajnu za žita ustrezno spremeniti:

- konstrukcijo kombajna z ustrezno dodelavo oz. predelavo mehanskih sklopov (rezalni sistem, podajalo, kletka, sita, ...),
- obratovalne parametre vrtečih in premo se gibajočih sklopov (vrtilne frekvence, pomike, pospeške, ...)
- dopolniti mehatronski sistem vodenja in regulacije kombajna.

### 4.3 Stroji za spravilo konoplje

Pri pregledu virov, obisku sejmov in sodelovanju pri žetvah smo ugotovili, da so v uporabi naslednje vrste kombajnov:

- samohodni kombajni (namenski); najdemo jih na velikih površinah, za transport od parcele do parcele po javnih cestah niso predvideni (Hemp-flax, 2017);
- samohodni kombajni (predelani kombajni) so v povojih. Zaslediti je razvoj pri posameznikih v Sloveniji;
- kot traktorski priključki (namenski), posamezni primeri, večina jih semena ne očisti popolnoma, potrebno je dodatno čiščenje v skladiščih.

## 5 ZAKLJUČEK

Za uspešno spravilo konoplje smo poiskali potrebne tehnološke posebnosti kombajna, ki izhajajo iz značilnosti konoplje in iz značilnosti pridelave v Sloveniji. Predstavljene obratovalne parametre kombajna lahko kontroliramo tako, da se v danem procesu obratovanja ne pojavijo težave in morebitne zaustavitve. Z ustreznimi konstrukcijskimi spremembami in tehnološkimi parametri predelamo žitni kombajn za spravilo konoplje, da lahko spravilo poteka nemoteno.

Pri klasičnem žitnem kombajnu je torej nujno potrebno prirediti, spremeniti (slika 4):

- Kombajn je potrebno dvigniti. Prijemi so lahko različni glede na tip kombajna, in sicer spredaj montirati večja kolesa, prirediti zadnje preme ali izdelati konstrukcijo, s katero celi kombajn dvignemo ohranimo obstoječa kolesa.
- Potrebno je spremeniti položaj prijemališč hidravličnih valjev za dvig vstopnega dela kombajna (slika 4 pozicija 3). Tako lahko dosežemo primerno višino za žetev (slika 1, preglednica 1).
- Na vseh pogonih na mlatilnici (slika 4), pozicije 1, 3 in 6, mora biti možno spreminjati število vrtljajev (jermensko z variatorjem, hidravlični pogon ali tudi elektromotor s krmiljenjem).
- Vse vrteče dele, ki pridejo v stik s stebli konoplje, je potrebno zaščititi pred navijanjem vlaken. Prijemi so različni od primera do primera. Na gredi namestimo cevi, izdelamo zaščitne pločevine. Zelo uporabni so tudi materiali iz plastičnih mas, ki jih lahko zelo enostavno prilagajamo. Ostale podrobnosti pa so potem odvisne od osnovnega tipa žitnega kombajna.

Raziskava se nadaljuje, rezultati pa bodo ustrezno predstavljeni.

**Zahvala.** V članku so prikazani rezultati dela, opravljenega v prvem letu trajanja CRP: V4-1611 Pridelava industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) v Sloveniji, ki ga financirata ARRS in MKGP. Na tem mestu se moramo avtorji še posebej zahvaliti: Kmetiji Pal, Marjan Pal, Zlatoličje 96, Starše, Kmetiji Oliver Berden,



Murski Petrovci 22, Tišina in dr. Barbari Čeh z Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

## 6 VIRI IN LITERATURA

- Chen Ying, Gratton Jean Louis, Liu Jude. Power Requirements of Hemp Cutting and Conditioning, *Biosystems Engineering*. 2004; 87(4): 417–424.
- CRP V4-1611. <http://www.ihps.si/rastline-tla-in-okolje/pridelava-industrijske-konoplje-cannabis-sativa-l-v-sloveniji/> (cit. 25. oktober 2017)
- Čeh Barbara. Hemp varietis from the EU variety list in Slovenia : World hemp congress 2017: International professional-educational-agri-economic-social event of Industrial hemp, Ljubljana 12.-15. October 2017.
- Hemp-flax;[http://hempflax.com/en/equipmenthttps://tu-dresden.de/ing/maschinenwesen/int/ast/ressourcen/dateien/publikationen/Vorlesungsskripte/grundlagen\\_maehdrescher.pdf?lang=de](http://hempflax.com/en/equipmenthttps://tu-dresden.de/ing/maschinenwesen/int/ast/ressourcen/dateien/publikationen/Vorlesungsskripte/grundlagen_maehdrescher.pdf?lang=de) (12. junij 2017)
- Kremensasa A., Stapilioniene R., Vaitkus S., Kairyte A. Investigations on physical-mechanical properties of effective thermal insulation materials from fibrous hemp. *Procedia Engineering*. 2017; 172: 586–594.
- Robinson D. Velika knjiga o konoplji. Ljubljana : samozaložba Aleksander Urbančič. 2000.
- Robinson R. Industrial oil crops. London : Academic Press. 2016.
- Schreiber Gisela. The hemp handbook. London : Fusion press. 2002.
- Wastlhuber H. Vorlesung im Fach Be- und Verarbeitung von Naturstoffen. TU Dresden, Dresden. 2009.

## NAVADNA KONOPLJA V PREHRANI

Roman ŠTUKELJ<sup>41</sup>, Majda Barbara POVŠE<sup>42</sup> in Tanja BAGAR<sup>43</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 16. 10. 2017

Sprejeto / accepted: 11. 12. 2017

### Izvleček

Navadno konopljo (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) so kot enoletno rastlino v prehranske namene in za vlakna gojili že pred mnogimi stoletji po vsem svetu in tako je tudi danes. Seme konoplje je dober vir esencialnih nenasičenih maščobnih kislin in aminokislin, vsebuje pa tudi širok spekter vitaminov in mineralov. Seme lahko uživamo oluščeno ali pa iz neoluščenega s postopkom hladnega stiskanja pridobimo olje, katero ima ugodno razmerje med omega-3 in omega-6 maščobami, ki je 1:3 v korist slednje. Tudi v sveži obliki imajo deli konoplje, predvsem socvetja in listi, ugoden vpliv na zdravje. Socvetje je bogato z esencialnimi maščobnimi kislinami in aminokislinami, vlakninami, flavonoidi, karotenoidi, terpenoidi in kanabinoidi (fitokanabinoidi). Potrebno je razlikovati med jedilnim oljem iz semen konoplje in pa t.i. konopljinim oljem, pri čemer gre v bistvu za smolo, pridobljeno pri ekstrakciji sušenih socvetij/vršičkov navadne konoplje.

**Ključne besede:** prehrana, konoplja, *Cannabis sativa*, seme, maščobne kisline, aminokisline, kanabidiol, CBD

## HEMP AS FOOD

### Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) was grown as an annual crop for food and fiber for many centuries around the world, and so is today. Hemp seed contains a wide range of vitamins in minerals and is a good source of essential unsaturated fatty acids and essential amino acids. Seeds used in a diet can be hulled or unhulled (whole seed), from which we obtain cold press hemp seed oil. It contains an ideal omega-3 to omega-6 ratio for our bodies, which is 1:3 in favor of omega-6. Hemp flowers and leaves can also be used in a diet in its natural, fresh form and

---

<sup>41</sup> Asist. dr., Laboratorij za klinično biofiziko, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, e-pošta: roman.stukelj@institut-icanna.com

<sup>42</sup> Dr., ICANNA - Mednarodni inštitut za kanabinoide, Grad Kodeljevo, Ulica Carla Benza 16, 10000 Ljubljana, e-pošta: majda.barbara-povse@guest.arnes.si

<sup>3</sup> Doc. dr., ICANNA - Mednarodni inštitut za kanabinoide, Grad Kodeljevo, Ulica Carla Benza 16, 10000 Ljubljana, e-pošta: majda.barbara-povse@guest.arnes.si

can have a beneficial effect on our health. Flowers are rich in essential fatty acids and amino acids, fibers, flavonoids, carotenoids, terpenoids and cannabinoids (phytocannabinoids). It is necessary to distinguish between hemp seed oil and hemp resin, which can be obtained from the extraction process of dried hemp flowers.

**Key words:** diet, hemp, *Cannabis sativa*, seed, fatty acids, amino acids, cannabidiol, CBD.

## 1 UVOD

Zapisi o uporabnosti konoplje (*Cannabis sativa* L.) v prehranske namene in za pridobivanje vlaken segajo daleč v zgodovino po vsem svetu (Schlутtenhofer in Yuan, 2017). Na naših tleh se je prvič pojavila v drugi polovici 18. stoletja, zlasti na Gorenjskem, Štajerskem, Dolenjskem, Prekmurju in v Beli Krajini (Kocjan Ačko, 1995). Prohibicija, ki se je pričela v tridesetih letih prejšnjega stoletja, je znanstvenikom na področju prehrane v mnogih državah preprečila resne študije in raziskovanje njene uporabe in koristi uživanja. Danes pa na tržišču lahko najdemo že veliko izdelkov, narejenih iz različnih delov te rastline.

## 2 OD SEMENA DO OLJA IN BELJAKOVIN

### 2.1 Seme konoplje

Konopljinno seme je obarvano rjavo do sivo črno. Semenska jedrca so bogata z beljakovinami, nenasičenimi maščobnimi kislinami (NMK), prehranskimi vlaknami ter nekaterimi vitamini in minerali. Prekrito je s tanko lupino, v kateri se nahajajo minerali in prehranske vlaknine. Premer semen je od 3 do 4 mm. Neoluščena semena v povprečju vsebujejo 20-25 % beljakovin, 20-30 % ogljikovih hidratov, 25-35 % olja, 10-15 % netopnih vlaknin in 2 % sladkorja (Pate, 1999). Seme konoplje vsebuje širok spekter vitaminov in mineralov, kar je razvidno iz preglednice 1. Semena konoplje ne vsebujejo glutena, zato so primerna za vključevanje v prehrano bolnikov s celiakijo (Radočaj in sod., 2014).

V prehrani se kot dodatek jedem uporabljajo neoluščena (cela) in pa oluščena semena. Iz celih semen lahko s postopkom hladnega stiskanja pridobimo tudi jedilno olje ali pa jih oluščimo in uporabimo v prehrani na različne načine. Oluščena semena so jedra semen, ki jim z mehanskim postopkom odstranijo lupino, tako da ostanejo le mehka jedrca, ki se zaradi oksidacije maščob lahko hitro pokvarijo, postanejo neužitna, zato jih shranjujemo v hladnem in temnem prostoru. Po hranilni vrednosti so oluščena semena podobna celim semenom, le da vsebujejo manj prehranske vlaknine in mineralov, s katerimi je bogata lupina. Povprečna hranilna sestava celega (neoluščenega) konopljinega semena sorte Finola je prikazana v preglednici 2.

**Preglednica 1:** Vsebnost (mg/100g) vitaminov in mineralov v neoluščenem konopljinem semenu sorte Finola (Callaway, 2004) in priporočeni dnevni vrednosti za izbrane vitamine in minerale (Uredba 1169/2011)

	mg/100g	PDV* (mg)
Vitamin A	1,1	0,8
Vitamin E	90,0	12
Tiamin (B1)	0,4	1,1
Fosfor (P)	1160	700
Kalij (K)	859	2000
Magnezij (Mg)	483	375
Železo (Fe)	550	14
Mangan (MN)	7	2
Cink (Zn)	7	10
Baker (Cu)	2	1,0

\*PDV- priporočeni dnevni vnosi

**Preglednica 2:** Sestava konopljinega semena sorte Finola in oljne pogače iste sorte (Callaway, 2004)

	Celo seme (%)	Oljna pogača (%)
Skupne maščobe	35,5	11,1
Beljakovine	24,8	35,5
Ogljikovi hidrati	27,6	42,6
Vlaga	6,5	5,6
Pepel	5,6	7,2
Energija (kJ/100g)	2200	1700
Skupne prehranske vlaknine	27,6	42,6
Topne vlaknine	5,4	16,4
Netopne vlaknine	22,2	26,2

## 2.2 Konopljino olje

Iz semen konoplje lahko s hladnim stiskanjem pridobimo olje, ki je zeleno do rjavo rumene barve, svetlo ali temno, odvisno od sorte in zrelosti semen (Kocjan Ačko, 1995). S postopkom hladnega stiskanja se ohrani ugodna maščobno-kislinska sestava olja, vključno z antioksidanti.

Maščobne kisline se delijo na nasičene in nenasičene, ter na esencialne (nujno potrebne) in neesencialne. Nasičene maščobne kisline se nahajajo predvsem v živilih živalskega izvora, veliko pa jih je tudi v nekaterih rastlinskih živilih, npr. oljih kakavovca in kokosove palme ipd. V svoji strukturi imajo med atomi ogljika

le enojne vezi, zato so dokaj stabilne, kar pomeni, da pri zmernem segrevanju in kasnejšem vnosu v telo ne tvorijo škodljivih in strupenih produktov, razen pri obdelavi z zelo visokimi temperaturami. Njihovo prekomerno uživanje poveča tveganje za nastanek bolezni srca in ožilja, povzroča pa tudi zvišanje koncentracije LDL («slabega») holesterola v krvi, medtem ko NMK prispevajo k nižjim vrednostim LDL holesterola. Slednje delimo na enkrat NMK (omega-9), ki imajo v svoji strukturi eno dvojno vez, in večkrat NMK, ki imajo dve ali več dvojnih vezi. Med pomembnejši spadata esencialni maščobni kislini linolna (omega-6) in alfa-linolenska (omega-3). Omega-3 in omega-6 maščobne kisline so esencialne, kar pomeni, da so nujno potrebne za normalno delovanje, našega telesa. Telo jih samo ne more sintetizirati, zato jih moramo nujno zaužiti s hrano. Vsebnost olja in njegova sestava se med različnimi sortami, pridelanimi pod enakimi pogoji, pomembno razlikuje, medtem ko okoljski dejavniki še dodatno vplivajo na variabilnost (Dimič in sod., 2008; Kušar in sod., 2017). V raziskavi, ki je bila izvedena z 19 različnimi sortami navadne konoplje v Sloveniji, so ugotovili, da je bila vsebnost olja v obravnavanih sortah med 32,5 % in 37,7 %. Analizirali so tudi vsebnost olj v semenih štirih sort, ki so bile pridelane na dveh različnih lokacijah, in ugotovili povprečno 2 % razliko vsebnosti olja pri isti sorti. Maščobno-kislinske sestave niso določali (Kušar in sod., 2017).

**Preglednica 3:** Maščobno-kislinska sestava (g/100g maščobe) nekaterih najpogosteje uporabljenih jedilnih olj (OPK, 2016)

Vrsta olja	Nasičene m.k.	Enkrat-	Večkrat-		Razmerje
		nenasičene m.k.	linolenska (omega-6)	alfa- linolenska (omega-3)	
		oleinska		omega- 6:3	
Bučno	17	13	50	1	50:1
Laneno	10	19	14	53	1:4
Oljčno	14	71	8	1	8:1
Repično	7	58	22	10	2:1
Kokosovo	91,9	6,5	1,5	/	/
Sončnično	11	20	63	1	63:1
Konopljino	11	8	55	18	<b>3:1</b>

Konopljino olje je predvsem dober vir NMK. V primerjavi z drugimi olji predstavljajo enkrat in večkrat NMK skoraj 80 % vseh maščob v semenih (preglednica 3). V olju, pridobljenem iz semen sedmih različnih sort, so v raziskavi izmerili povprečno vrednost linolne kisline, ki je znašala med 51,9–55,7 %, za alfa-linolensko pa med 12,3–15,3 % in med 0,8–2,46 % gamalinolenske kisline (GLA), ki je v drugih jedilnih oljih redko prisotna. Ima pomembno vlogo pri imunski

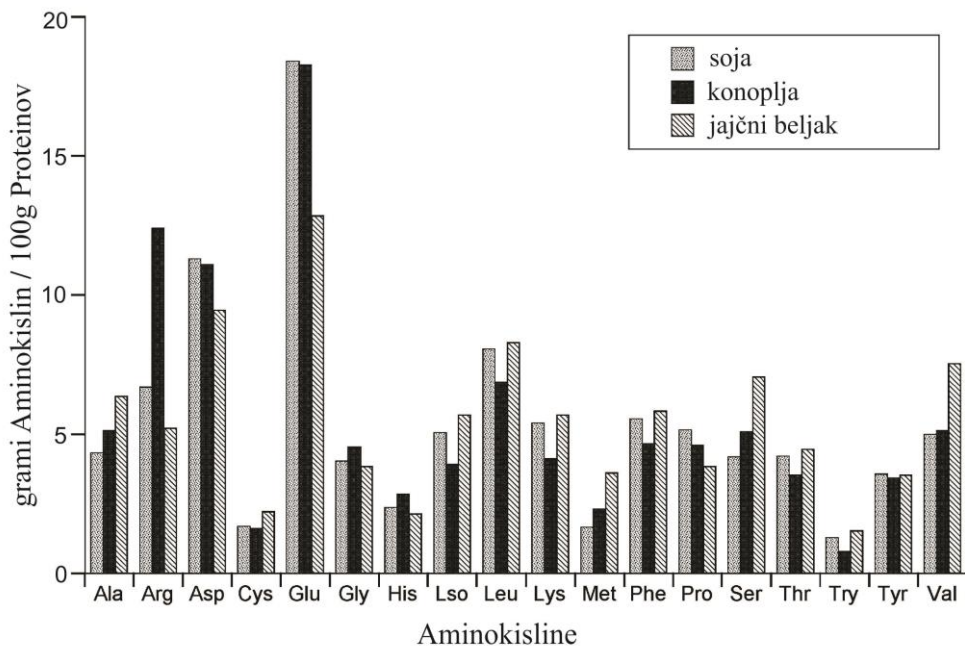
odpornosti (Dimič in sod., 2008; Leizer in sod., 2000). Z zaužitjem od 15 do 20 g hladno stiskanega konopljinega olja človeško telo zadovolji dnevno potrebo po esencialnih maščobnih kislinah.

Pomembno je tudi pravilno razmerje med omega-6 in omega-3 v prehrani. NMK v nasprotju z nasičenimi ne služijo le kot vir energije, ampak skrbijo za nemoteno delovanje organizma, rast in razvoj možganov, živčevja, očne mrežnice, sodelujejo pri sintezi tkivnih hormonov, služijo tudi kot prekurzorji (predstopnja) za biosintezo mnogih regulatornih biomolekul, tudi endokanabinoidov (Dain in sod., 2010; Naughton in sod., 2013). Prav tako so nujne za normalno delovanje imunskega sistema, zato njihovo pomanjkanje poveča možnosti za okužbe in vnetne procese (Kelley, 2001). Naše telo esencialnih maščobnih kislin ne more samo sintetizirati, zato je njihov vnos s prehrano nujen. Delež NMK naj predstavlja dve tretjini vseh zaužitih maščob dnevno (Hlastan Ribič, 2010). Velik vpliv na vnos zadostnih količin NMK v sodobni prehrani ima lahko tudi ustrezna uporaba jedilnih olj z ugodno maščobno-kislinsko sestavo. V zadnjem stoletju je hiter način življenja prinesel velike spremembe v prehranjevalnih navadah ljudi. Eden izmed problemov današnjega načina prehranjevanja je, da pojemo skoraj dvakrat preveč nasičenih maščobnih kislin in NMK omega-6 ter kar desetkrat premalo omega-3 maščobnih kislin (Hlastan Ribič, 2010). S tem ne dosegamo priporočenega oz. ugodnega razmerja med omega-6 in omega-3 maščobnimi kislinami, ki naj bi znašalo 5:1 v korist omega-6 maščobnih kislin. Razmerje zaužitih maščobnih kislin v sodobni prehrani se namreč običajno giblje med 15:1 do 20:1 v korist omega-6 (Simopoulos, 2016). Znanstveniki so v različnih študijah dokazali, da nepravilno razmerje poveča možnost za nastanek bolezni srca in ožilja, sladkorne bolezni, artritisa, debelosti, vnetja, ter nekaterih vrst raka (Hlastan Ribič, 2010; Simopoulos, 2002). Iz preglednice 3 je razvidno, da ima konopljino olje optimalno sestavo z vidika omenjenega razmerja, saj znaša med omega-3 in omega-6 1:3.

### 2.3 Beljakovine v konoplji

Pri stiskanju olja iz semen je uporaben tudi ostanek, t.i. oljna pogača (briketi), ki se lahko uporabi v prehrani ljudi in živali. Brikete se lahko zmelje v moko, bogato z beljakovinami, vlakninami, minerali, ogljikovimi hidrati (preglednica 1). Največkrat se pri peki uporablja kot dodatek drugim mokam, saj ne vsebuje glutena, doprinese pa k boljši hranilni vrednosti in bogatejšemu ter oreščkastemu okusu peciva oz. kruha. Zmleto oljno pogačo - moko lahko fino presejemo, da s tem odstranimo trdne delce oziroma lupino in tako dobimo bolj čisto konopljino moko, ki je bogata predvsem z beljakovinami. V študiji Kušar in sod. (2017) so ugotavljali vsebnost beljakovin v 19 različnih sortah semen konoplje, ki je zrasla v Sloveniji, in izmerili med 22,4 % in 28,8 % beljakovin, največ v sorti Santica 27. Ugotovili so tudi različno vsebnost beljakovin pri isti sorti, pridelani na različnih lokacijah pri drugačni agrotehnik in različnih tleh. Vsebnost beljakovin in primerjavo aminokislinske sestave semen konoplje sorte Finola z jajčnim beljakom

in sojo prikazuje slika 1. Vidimo lahko, da je aminokislinska sestava konopljinih beljakovine povsem primerljiva z drugimi visoko kakovostnimi viri beljakovin, kot so v soji in jajčnem beljaku (Callaway, 2004). V konopljinih semenih je prisotnih tudi vseh devet esencialnih aminokislin, ki jih naše telo ne sintetizira v zadostni količini (Callaway, 2004). Iz esencialnih aminokislin se v našem telesu sintetizirajo beljakovine, ki so gradniki našega telesa kot tudi njegova gonilna sila–encimi.



**Slika 1:** Grafični prikaz vsebnosti beljakovin in aminokislinske sestave sojinega semena, konopljinega semena in jajčnega beljaka. Posamezne aminokislinae so prikazane po IUPAC okrajšavah (Callaway, 2004).

### 3 PREHRANSKI ZAVIRALCI V KONOPLJINI OVOJNICI

Kadar govorimo o uporabi semena konoplje v prehrani, je potrebno poudariti tudi, da semenska ovojnica, poleg vitaminov in mineralov, vsebuje tudi številne antihranila oziroma zaviralce resorpcije hranil (fitinska kislina, tanini, saponini, tripsinski inhibitorji). Te snovi vežejo vitamine in minerale v obliko, ki jo človeško telo ne more izkoristiti, kar pomeni, da postane del zaužitih hranil za za naše telo neizkoristljiv. Zaradi svoje kemijske sestave ima fitinska kislina močno afiniteto do mineralov, kot so kalcij, železo in cink, pri čemer se tvorijo soli – fitati, iz katerih se minerali v našem telesu slabo izkoristijo (Russo in Reggiani, 2013). Antihranilom, ki jih nekatere rastline vsebujejo, se lahko delno izognemo z

namakanjem, kaljenjem, mlečnokislinsko fermentacijo in termično obdelavo semen (Urbano in sod., 2000).

#### 4 KONOPLJINA SOCVETJA IN NJIHOVI IZVLEČKI

Uporabnost konopljinih semen in stebel je znana že stoletja. V zadnjem času pa se je v zahodnem svetu pričela razširjati uporaba tudi ostalih delov rastline, predvsem svežih in suhih socvetij (vršičkov) in listov. Socvetja navadne konoplje v sveži obliki predstavljajo vir snovi, potencialno uporabnih v varovalni prehrani, saj nimajo psihoaktivnega delovanja, kot ga poznamo pri indijski konoplji, kjer so vrednosti delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) mnogo višje kot pa pri navadni. Kot taka je bogata z esencialnimi maščobnimi kislinami in aminokislinami, vlakninami, flavonoidi, karotenoidi, terpenoidi in kanabinoidi (Brenneisen, 2007). Iz socvetij in listov je mogoče pripraviti konopljin čaj, najpogostejša oblika uporabe pa je priprava konopljinih izvlečkov, v javnosti pogosto poimenovanih kot konopljino olje, pri čemer gre v bistvu za konopljino smolo. Pri tem je potrebno ločiti med konopljinim jedilnim oljem, ki je bogato predvsem z NMK in ga pridobivamo iz semen ter konopljinim izvlečkom iz socvetja, bogatim s terpenoidi, fenoli, v največji meri pa s kanabidiolom (CBD), ki izkazuje številne blagodejne, pa tudi terapevtske učinke, zaradi česar se uporablja tudi pri proizvodnji zdravil (Kogan in Mechoulam 2007; Zuardi, 2008).

Kanabidiol sodi med več kot 140 do sedaj odkritih kanabinoidov (fitokanabinoidov) v rastlini konoplji, za katere je značilno, da se vežejo na kanabinoidne receptorje v človeškem telesu in imajo lahko farmakološki učinek (Pertwee, 2005). CBD je najbolj zastopan fitokanabinoid v navadni konoplji, njegova povprečna koncentracija v rastlini pa je zelo odvisna od sorte in rastnih pogojev. Vrednosti v suhih vršičkih so med 0,5 % in 3 %. Zaradi minimalnega deleža THC-ja (< 0,2 %) v navadni konoplji so izvlečki iz nje, katere lahko kupimo na trgu, varni za uporabnika. Zanimanje za uporabo CBD-ja v terapevtske namene je v zadnjih letih med znanstveniki in zdravniki skokovito naraslo zaradi številnih pozitivnih učinkov na naše telo in razcveta različnih izdelkov.

**Zahvala.** Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in ICANNA - Mednarodnemu inštitutu za kanabinoide.

#### 5 VIRI IN LITERATURA

- Brenneisen R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents, in: Marijuana and the Cannabinoids, 2007: pp. 17–49.
- Callaway J.C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 2004; 140: 65–72.
- Dain A., Repossi G., Das U.N., Eynard AR. Role of PUFAs, the precursors of endocannabinoids, in human obesity and type 2 diabetes. *Frontiers in bioscience (Elite Edition)*. 2010; 2: 1432–47.



- Dimić E., Romanić R., Vujasinović V. Essential fatty acids, nutritive value and oxidative stability of cold pressed hempseed (*Cannabis sativa* L.) oil from different varieties. *Acta Alimentaria*. 2008; 38: 229–236.
- Hlaskan Ribič C. Zdrava prehrana kot temelj zdravja. V: Zdrava prehrana in javno zdravje. Cvahtetovi dnevi javnega zdravja 2010, Ljubljana, oktober 2010. Hlaskan Ribič C. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za javno zdravje. 2010; 5-26.
- Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*. 2001 Jul-Aug;17(7-8):669-73.
- Kocjan Ačko D. Konoplja. V: Pozabljene poljščine. Ljubljana, Kmečki glas. 1999: 101–118.
- Kogan N.M., Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007; 9(4): 413–430.
- Kušar A., Čeh B., Flajšman M., Kocjan Ačko D., Pravst I. Raznolikost hranilne sestave navadne konoplje (*Cannabis sativa* L. var. *sativa*). V: *Novi izzivi v agronomiji 2017*: zbornik simpozija. Ur.: Čeh B. In sod.,: Laško, 2017: 82-87.
- Leizer C., Ribnicky D., Poulev A., Dushenkov S., Raskin I. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of nutraceuticals, functional & medical foods*. 2000; 2(4): 235–253.
- Naughton S.S., Mathai M.L., Hryciw D.H., McAinch A.J. Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *International Journal of Endocrinology*. 2013: 11 str.
- OPKP – Odprta platforma za klinično prehrano (IJS). URL: <http://www.opkp.si>
- Pate D.W. Hemp seed: a valuable food source. V: *Advances in hemp research*. Ur.; Ranali P. The Hawort Press: Binghamton, New York. 1999; 243–245.
- Pertwee R.G. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2005; 168: 1-51.
- Radočaj O., Dimić E., Tsao R. Effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil press-cake and decaffeinated green tea leaves (*Camellia sinensis*) on functional characteristics of gluten-free crackers. *Journal of Food Science*. 2014;79(3):C318-25.
- Russo R., Reggiani R. Variability in Antinutritional compounds in Hempseed meal of Italian and French varieties. *Plant*. 2013;1(2): 25-29.
- Schluttenhofer C., Yuan L. Challenges towards Revitalizing Hemp: A Multifaceted Crop. *Trends in Plant Science*. 2017; pii: S1360-1385(17)30177-2.
- Simopoulos A.P. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*. 2016; 8(3): 128.
- Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002; 56(8): 365–379.
- Uredba o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom. Uradni list EU št. 1169/2011, Priloga XIII. Priporočeni vnosi: 44 pp.
- Urbano G., López-Jurado M., Aranda P., Vidal-Valverde C., Tenorio E., Porres J. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J. Physiol. Biochem*. 2000; 56(3): 283-94.
- Zuardi A.W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008; 30(3): 271-80.