

\\IHPS

Inštitut za hmeljarstvo
in pivovarstvo
Slovenije

Slovenian Institute
of Hop Research
and Brewing

Hmeljarski bilten Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

30 (2023)

Žalec 2023

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

Hmeljarski bilten Hop Bulletin

30 (2023)

\\IHPS

Žalec, 2023

Hmeljarski bilten / Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

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

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

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

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

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:

prof. dr. **Helena Abramovič** (UL BF), prof. dr. **Karmen Erjavec** (Univerza v
Novem Mestu, Fakulteta za zdravstvene vede), dr. **Marjeta Eržen** (IHPS),
mag. **Nataša Ferant** (IHPS), doc. dr. **Marko Flajšman** (UL BF), dr. **Tanja**
Guček (IHPS), doc. dr. **Anita Kušar** (Inštitut za nutricionistiko), **Lucija**
Luskar (IHPS), **Monika Oset Luskar** (IHPS), dr. **Ester Stajič** (UL BF),
dr. **Helena Volk** (UL BF)

Domača stran /
Home page

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

Bilten zajemajo /
Indexed and
abstracted by

COBISS, CABI Publishing, EBSCO Publishing

Tisk / Printed by

Grafika Gracer d. o. o.

Avtorske pravice /
Copyright

© 2023 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije /
© 2023 Slovenian Institute of Hop Research and Brewing

Izdajo sofinancira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in
inovacijsko dejavnost RS. /

The issue was financially supported by the Slovenian Research and
Innovation Agency.

VSEBINA / CONTENTS

Tanja GUČEK in Sebastjan RADIŠEK Določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin: sanje ali realnost? Detection of viroids without nucleic acid isolation: dream or reality?.....	5
Ester STAJIČ Primerjava metod za izolacijo RNA iz korenin in listov hmelja za analize izražanja genov z metodo RT-qPCR Comparison of RNA isolation methods from hop roots and leaves for gene expression analysis using RT-qPCR.....	18
Tanja GUČEK in Sebastjan RADIŠEK Validacija metode duRT-qPCR za določanje viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na hmelju z uporabo mRNA1192 interne kontrole Validation of the RT-qPCR method for the detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd) on hops including mRNA1192 as internal control.....	26
Helena VOLK Ocena stabilnosti in dekontaminacije hmeljevih viroidov v laboratorijskih pogojih Assessing the stability and decontamination of hop viroids in laboratory conditions.....	40
Douglas MACKINNON and Martin PAVLOVIČ The hops surplus influence on global market events Vpliv presežkov hmelja na globalna tržna dogajanja.....	54
Tamara KOROŠEC and Alenka LEVART Impact of microbiological preparation on yield and seed composition in the industrial hemp variety Futura 75 - preliminary results Vpliv uporabe mikrobiološkega preparata na pridelek in sestavo semen industrijske konoplje sorte Futura 75 - preliminarni rezultati.....	64
Miha OCVIRK, Karin GOLE, Ksenija RUTNIK in Iztok Jože KOŠIR Validacija plinsko kromatografske metode za določanje sestave eteričnih olj konoplje Validation of analytical method for determination of hop essential oil composition by gas chromatography.....	75

Marjeta ERŽEN, Andreja ČERENAK, Tjaša CESAR in Jernej JAKŠE
Asociacijske študije celotnega genoma in populacijska struktura različnih genotipov navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.)
Genome-wide association study and population structure of different hemp (*Cannabis sativa* L.) genotypes84

Monika OSET LUSKAR
Škodljivci in bolezni zelišč
Herb pests and diseases97

Nataša FERANT in Barbara ČEH
Vpliv gnojenja z dušikom in gostote nasada rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) sorte Arp na količino in kakovost pridelka v Spodnji Savinjski dolini
The impact of nitrogen fertilization and planting density of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) variety Arp on quantity and quality of the yield at the location of Lower Savinja valley107

Marjeta ERŽEN in Barbara ČEH
Nabiralništvo zelišč in okolje
Herb foraging and the environment119

Barbara ČEH, Lovro ČEH BREŽNIK in Nataša FERANT
Vpliv pridelave zelišč na okolje
Cultivation of herbs and the environment127

DOLOČANJE VIROIDOV BREZ IZOLACIJE NUKLEINSKIH KISLIN: SANJE ALI REALNOST?

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADIŠEK²

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Received / Prispelo: 25. 10. 2023

Accepted / Sprejeto: 11. 12. 2023

Izvleček

Na hmelju viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) v kombinaciji s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd) povzroča bolezen hudo viroidno zakrnelost hmelja. Z namenom omejitve nadaljnega širjenja bolezni v Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin (DL) razvijamo metodo za hitro detekcijo viroida CBCVd na terenu. V raziskavi smo na vzorcih treh sort hmelja primerjali dva standardna načina izolacije nukleinskih kislin in dva načina »hitre izolacije«. Vzorce smo na prisotnost viroidov CBCVd in HLVd analizirali s PCR s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) in RT-PCR v realnem času za sočasno določanje (duplex, duRT-qPCR). V primeru hitre izolacije smo testirali vpliv inhibicije na občutljivost reakcije. Dodatno smo testirali tudi vpliv shranjevanja in rastlinski sok pred analizo dlje časa hranili pri – 70 °C. Viroid CBCVd in HLVd smo uspešno določili pri vseh štirih načinih izolacije z obema metodama. Kot pričakovano smo z duRT-qPCR pri hitri izolaciji zaznali inhibicijo in 100-krat manjšo občutljivost kot pri uporabi standardnih metod. Sorta hmelja in hranjene vzorcev na rezultate ni imelo vpliva. Uporabljeni protokoli za hitro izolacijo tako predstavljata dober potencial za uporabo pri detekciji viroidov na terenu. Glede na rezultate raziskave lahko sklepamo, da je določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin zelo blizu realnosti in to niso le sanje rastlinskih diagnostikov.

Ključne besede: CBCVd, HLVd, hitra izolacija, rastlinski sok, RT-PCR, duRT-qPCR

DETECTION OF VIROIDS WITHOUT NUCLEIC ACID ISOLATION: DREAM OR REALITY?

Abstract

On hops, citrus bark cracking viroid (CBCVd) in combination with hop latent viroid (HLVd) causes the severe hop stunt disease. In order to limit further spread of the disease, the Diagnostic Laboratory for Plant Protection (DL) is developing a method for rapid detection of CBCVd in the field. In the research, we compared two standard methods of isolation of nucleic acids and two methods of "fast isolation" on samples of three hop varieties. The samples were analysed for the presence of CBCVd and HLVd viroids using reverse transcription PCR (RT-PCR) and duplex real

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

² Dr., IHPS, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

time RT-PCR (duRT-qPCR). In the case of fast isolation, we tested the influence of inhibitors on the sensitivity of the reaction. Additionally, we also tested the effect of storage and stored the crude extract at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a longer time period before analysis. Viroid CBCVd and HLVD were successfully determined in all four isolations using both methods. As expected, we detected inhibition and 100 times lower sensitivity with duRT-qPCR for fast isolation than when using standard methods. The variety of hops and storage had no effect on the results. The used protocols for fast isolation, thus represents a good potential for use in the detection of viroids in the field. Based on the results of the research, we can conclude that the determination of viroids without isolation of nucleic acids is very close to reality and is not only a dream of plant diagnosticians.

Key words: CBCVd, HLVD, fast isolation, crude extract, RT-PCR, duRT-qPCR

1 UVOD

Pri diagnostiki rastlinskih patogenov predstavlja prvi korak določitve patogena izolacija njegovega genoma (DNA/RNA molekul) iz rastline. Za izbor ustrezne metode je nujno razumeti lokalizacijo patogena v rastlini in prisotnost rastlinskih komponent, ki bi lahko inhibirale reakcijo pomnoževanja (Ivanov in sod., 2020). Izolacija nukleinskih kislin (NA; DNA in RNA) je najpomembnejša metoda uporabljena v molekularni biologiji, saj kakovost in integriteta izoliranih NA neposredno vpliva na rezultat (Tan in Yiap, 2009). Prisotnost viroidov v rastlinah se določa na osnovi prisotnosti RNA (Ivanov in sod., 2020). Določanje viroidov je še posebej zahtevno, ker je RNA molekula, zaradi prisotnosti RNaz, zelo nestabilna in ima po izolaciji iz celic zelo kratko obstojnost (Tan in Yiap, 2009).

V primeru rastlin je dostopnost NA za izolacijo odvisna od homogenizacije tkiva, ki se razlikuje glede trdote tkiva. V primeru mehkih tkiv je dovolj že samo stresanje v ustreznem pufru ali pa uporaba ročnega homogenizatorja in ekstrakcijske vrečke z mrežo. V primeru trših tkiv se lahko uporablja terilnice, kovinske kroglice, naprave za mletje z rezili. V primeru izotermnih metod pomnoževanja (RPA, LAMP, itd.) lahko učinkovita homogenizacija iz celic sprosti dovolj NA, da za detekcijo patogenov ni potrebno dodatno čiščenje in izolacija. Ne glede na to je za povečanje količine izoliranih NA potrebno izvesti dodatne postopke čiščenja (Ivanov in sod., 2020).

Dva ključna koraka priprave vzorca NA sta liza celic in izolacija NA. V najboljšem primeru mora metoda omogočati učinkovito lizo celic in porušiti celično steno in organele ter sprostiti znotrajcelične komponente brez zaviranja nadaljnjih korakov izolacije in detekcije. Za lizo celic obstajajo številne kemične in mehanske metode, ki imajo svoje prednosti in slabosti. Kemične metode so enostavne in ne potrebujejo veliko opreme, vendar pa lahko uporabljeni reagenti zavirajo nadaljnje detekcijske metode. Za uspešno analizo je zato potrebno izvesti dodatno čiščenje. Po drugi strani pri mehanskih metodah ne potrebujemo reagentov, vendar pa lahko zaradi

trenja in segrevanja poškodujejo DNA/RNA in za izvedbo potrebujejo vpeljavo dodatne opreme (Emaus in sod., 2020).

Metode za izolacijo NA najpogosteje temeljijo na ekstrakciji tekoče-tekoče (LLE) in ekstrakciji v trdni fazi (SPE). Metode so zelo raznolike in za čiščenje in koncentriranje NA uporabljajo različne interakcije (elektrostatske, hidrofobne, vodikove vezi) (Emaus in sod., 2020). Med prvimi razvitimi LLE metodami je ekstrakcija na osnovi fenola in kloroforma, ki NA izolira v zgornji vodni plasti, medtem ko hidrofobni lipidi migrirajo v gostejšo organsko fazo, proteini pa se zberejo vmes (Tan in Yiap, 2009). Za izolacijo rastlinskih patogenov se tradicionalne uporablja CTAB detergent, ki omogoča izolacijo iz bakterij, gliv, rastlin in živali (Ivanov in sod., 2020). Metoda se lahko uporablja v kombinaciji s fenol-kloroformom in obsega številne korake (3 in 4 h), vendar zagotavlja visoko koncentracijo izoliranih NA (Guček in sod., 2020). CTAB metoda zahteva uporabo centrifuge, vodne kopeli in zdravju škodljivih reagentov, kar predstavlja omejitev pri aplikaciji na terenu (Ivanov in sod., 2020). V primeru SPE metod se najpogosteje uporablja kolone na osnovi silika filtrov. Ti kompleti uporabljajo reagente na osnovi soli, ki prekinejo raztapljanje biopolimera in olajšajo adsorpcijo NA na silicijev dioksid. Adsorbirane NA nato speremo z alkoholom in speremo s topilom z nizko ionsko močjo (Emaus in sod., 2020). Za izolacijo RNA iz rastlin so na voljo številni komercialno dostopni kompleti na osnovi kolon, ki so različno časovno obsežni in zagotavljajo visoko kakovost izoliranih NA (Guček in sod., 2020; Ivanov in sod., 2020). Večina komercialno dostopnih kompletov za izolacijo NA potrebuje laboratorijsko opremo, kar je za uporabo na terenu nepraktično. Za uporabo na terenu že obstajajo prenosne centrifuge, razvoj pa poteka tudi v uporabo 3D tiskanja za namene manjše prenosne opreme (Ivanov in sod., 2020).

Na splošno uspešna izolacija NA zahteva učinkovito lizo celic, denaturacijo nukleo-proteinskih kompleksov, inaktivacijo nukleaz (DNaze, RNaze) brez prisotnosti kontaminacije. Tarčne NA morajo biti brez nečistoč, kot so proteini, polisaharidi, lipidi, druge nukleinske kisline (DNA brez RNA in obratno) in metaboliti (Tan in Yiap, 2009). PCR je občutljiv na inhibitorje, kot so polifenoli, tanini, pektin in ksilen, kar pogosto vodi v zmanjšanje občutljivosti in lažno negativne rezultate (Silva in sod., 2018; Ivanov in sod., 2020). Izotermne metode pomnoževanja uporabljajo druge encime, ki so odporni na rastlinske inhibitorje, vendar pa lahko reakcijo inhibira prisotnost drugih NA iz ozadja (Ivanov in sod., 2020). Na reakcijo pomnoževanja lahko negativno vplivajo tudi reagenti, ki se uporabljajo za izolacijo NA. Ostanki fenol-kloroforma lahko povzročijo inhibicijo katerekoli encimske reakcije. Prisotnost EDTA lahko veže magnezijeve ione in inhibira PCR, RPA in LAMP. Detergenti, kot sta CTAB in SDS, lahko inhibirajo RPA (Ivanov in sod., 2020). Zato je za pridobitev zanesljivih in ponovljivih rezultatov ključno, da se z metodo izolacije NA odstrani inhibitorje (Emaus in sod., 2020).

Z razvojem detekcijskih metod je prišlo tudi do razvoja zelo različnih metod izolacije NA, ki med drugim omogočajo izolacijo s pomočjo avtomatizacije, uporabe kolon, filtrov, kroglic, čipov in so lahko celo specifične za določeno zaporedje. V zadnjih

letih so številne izboljšave privedle k večjemu izkoristku, zmanjšanju prisotnosti nečistoč, zmanjšanju časa priprave vzorca in volumna izolacije NA. Med pomembnejšimi je razvoj v smeri poenostavitve in avtomatizacije z namenom testiranja na terenu oziroma izven laboratorija (Emaus in sod., 2020, Ivanov in sod., 2020). Pri rastlinah je najenostavnejši način, da to dosežemo, z uporabo ekstrakcijske vrečke z mrežo, ročnega homogenizatorja in ustreznega pufra. Toda ta metoda ne omogoča očiščenja NA celičnih komponent, ki lahko inhibirajo detekcijo patogenov. Prav tako se učinkovitost izolacije zmanjša (Ivanov in sod., 2020). Glede na naše podatke je najhitrejši način izolacije NA iz rastlin, živali in mikrobov z uporabo hitrih testov (lateral flow stick) na osnovi papirnatih diskov, ki vežejo NA in omogočajo izolacijo NA že v 30 s (Zou in sod., 2017).

Z namenom razvoja izotermnih metod pomnoževanja za določanje viroida CBCVd na terenu smo v raziskavi želeli razviti metodo »hitre izolacije« oziroma priprave rastlinskega ekstrakta. V ta namen smo primerjali štiri metode izolacije NA, dve standardni metodi (CTAB reagent in komercialen komplet reagentov) in dve na novo razviti metodi hitre izolacije za uporabo na terenu. Trenutno so v DL v uporabi metode, ki so zamudne, zahtevajo uporabo kakovostnih nukleinskih kislin in drage opreme, kar je lahko ovira za izvajanje detekcije na terenu. Razvoj novih metod hitre izolacije nam bo omogočil hitro določanje viroidov brez dolgotrajnega postopka izolacije NA in posledično možnost uporabe na terenu.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za analizo primerjave izolacij smo uporabili hmelj sort Celeia (CEL), Aurora (AU) in Bobek (BO) okužen z viroidoma CBCVd in HLVd. Kot negativno kontrolo smo uporabili rastline divjega hmelja negativne na viroid CBCVd in HLVd. Rastline so del Referenčne zbirke DL in so bile na prisotnost viroidov predhodno testirane z RT-PCR. Zaradi neenakomerne razporeditve viroidov po rastlini smo vzorčili 4-6 simptomatičnih listov iz različnih delov rastline in vzorce združili v en vzorec. Rastline smo vzorčili na dan analize, do pričetka analize so bili vzorci shranjeni pri +4 °C.

2.2 Standardna izolacija nukleinskih kislin

V primeru standardne izolacije nukleinskih kislin smo izvedli primerjavo med hišno metodo in komercialnim kompletom reagentov. Prva omogoča izolacijo celokupnih nukleinskih kislin (TNA) z uporabo CTAB reagenta po obsežnem protokolu, ki zahteva 4 ure. Druga pa omogoča izolacijo RNA z uporabo kolon na osnovi silikatov in zahteva 1,5 ure. Metodi sta v DL v rutinski uporabi in omogočata zanesljivo določanje viroidov (Guček in sod., 2020). Vse izolacije smo izvedli v dveh tehničnih ponovitvah in hkrati pripravili kontrolne izolacije (PIC, pozitivna kontrola izolacije; BVV, zdrav hmelj brez virusov in viroidov; NIC, negativna kontrola izolacije).

2.2.1 Izolacija s CTAB reagentom

Kot prvi način standardne izolacije smo iz hmelja TNA izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). Uporabili smo 100 mg tkiva (listi hmelja), ki smo ga zdrobili v terilnicah. Vzorce smo raztopili v 50 μ l TE pufra (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) in jih shranili pri -20 °C. Da bi preprečili vpliv inhibitorjev, smo pred analizo izolirano TNA 10-krat razredčili v vodi brez RNaz (Sigma-Aldrich, ZDA).

2.2.2 Izolacija s komercialnim kompletom reagentov

Kot drugi način standardne izolacije smo vzorce hmelja izolirali s komercialno dostopnim kompletom Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (SPT, Sigma-Aldrich, ZDA), po A-protokolu iz Jakše in sod. (2015). Vzorce listov hmelja (100 mg) smo zdrobili z uporabo terilnice in priloženega pufra. Izolirano RNA smo shranili pri -70 °C. Pred analizo smo izolirano RNA 10-krat razredčili v vodi brez RNaz, da bi preprečili vpliv inhibitorjev. Raziskavo smo izvedli z namenom detekcije viroida CBCVd in kot dodatno naknadno analizirali prisotnost viroida HLVd, zato rezultati v primeru SPT za viroid HLVd niso podani.

2.3 »Hitra izolacija« nukleinskih kislin

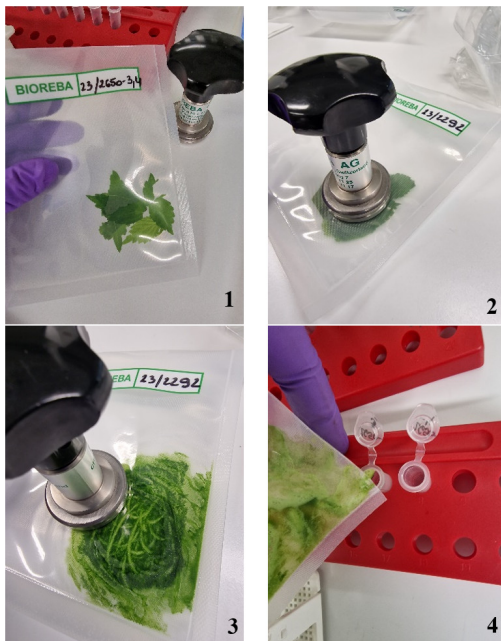
Pri »hitri izolaciji« nukleinskih kislin oziroma pripravi rastlinskega soka za direktno določanje viroidov CBCVd in HLVd smo primerjali dva protokola (PI in PII). Želeli smo uporabiti načine, ki omogočajo čim bolj enostavno pripravo rastlinskega soka, brez zahtevne opreme in daljših postopkov, da bi uporaba le-teh lahko bila mogoča tudi na terenu. Protokola sta se razlikovala v uporabi različnih raztopin za drobljenje in razredčenje vzorcev, hkrati pa smo primerjali tudi vpliv centrifugiranja. V primeru PI smo izvedli centrifugiranje, v primeru PII pa samo mešanje. V primeru PI smo izvedli preliminarno analizo in vzorce razredčili 5- in 20-krat in na osnovi teh rezultatov nadaljevali testiranje. Pri drugem testiranju smo pred testiranjem z duRT-qPCR in RT-PCR z namenom določitve vpliv inhibicije pripravili serijo razredčitev (10x, 20x, 50x, 100x). Z namenom analize občutljivosti smo na enem setu vzorcev izvedli dodatno serijo razredčitev (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

Vpliv hrambe na rezultate duRT-qPCR in RT-PCR smo določili z različnimi časi hranjenja vzorcev pri -70 °C oziroma -20 °C. V ta namen smo rastlinski sok pridobljen po PI in PII pred analizo z duRT-qPCR hranili 24 h pri -70 °C in razredčili 10- in 100-krat. Analizo že razredčenih vzorcev (shranjenih pri -20 °C) smo izvedli v časovnem obdobju od 0 h (duRT-qPCR za CBCVd in interno kontrolo mRNA1192), 24 h (duRT-qPCR za HLVd in interno kontrolo mRNA170; RT-PCR za CBCVd), 48 h (analiza občutljivosti) do 18 dni (RT-PCR za HLVd).

2.3.1 PROTOKOL I (PI)

Kot način prve »hitre izolacije« smo vzorce hmelja za direktno določanje pripravili po modificiranem protokolu raziskovalcev iz Univerze v Hohenheimu (osebni razgovor

z mag. Swati Jagani, 2023). Vzorec listov hmelja (100 mg) smo s pomočjo ročnega homogenizatorja (Bioreba, Švica) zdrobili v vrečki za ekstrakcijo (univerzalna velikost, Bioreba, Švica). Vzorcju smo za lažje mletje dodali 600 μ L vode tretirane z DEPC (Merck, Nemčija). Ko smo liste zdrobili, smo sok prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko in centrifugirali 4 minute pri 12 700 vrtljajih na minuto in 4 °C (slika 1). Supernatant smo nato odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in ostalo zavrgli. Vzorce smo razredčili v 10 mM Tris (Invitrogen, ZDA). V okviru preliminarne analize smo izvedli 5- in 20-kratno razredčitvi, v nadaljevanju pa 10-, 20-, 50- in 100-kratne. Vzorce smo analizirali takoj oziroma v primeru testiranja daljšega shranjevanja hranili pri -70 °C 24 h oziroma dlje.



Slika 1: Prikaz izvedbe »hitre izolacije«. Prikazani so posamezni koraki, pri katerih smo liste hmelja z uporabo vrečk za ekstrakcijo in ročnega homogenizatorja zmelili v rastlinski sok in prenesli v mikrocentrifugirko.

2.3.2 PROTOKOL II (PII)

Kot primer druge »hitre izolacije« smo vzorce hmelja za direktno določanje pripravili po protokolu Marqués in sod. (2022). Vzorec listov hmelja (100 mg) smo s pomočjo ročnega homogenizatorja (Bioreba, Švica) zdrobili v vrečkah za ekstrakcijo (univerzalna velikost, Bioreba, Švica). Vzorcju smo za lažje mletje dodali 600 μ L raztopine za mletje (15 % PEG 4000, 20 mM NaOH). Ko smo liste zdrobili, smo sok prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko (slika 1) in zmešali. Vzorce smo razredčili v TE

pufu (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Vzorce smo analizirali takoj oziroma v primeru testiranja daljšega shranjevanja hranili pri -70 °C 24 h oziroma dlje.

2.4 RT-PCR in duRT-qPCR reakcija

RT-PCR smo izvedli s kompletom One Step Ahead RT-PCR (Qiagen, Nemčija) v inštrumentu Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf). Z RT-PCR smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (ZO) ločeno analizirali prisotnost HLVD in CBCVd v vzorcih hmelja, kot predhodno opisano v Guček in sod. (2019). Namnožene produkte smo analizirali na 2 % agaroznem gelu v 1x TBE pufu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) in detektirali z UV lučjo (Syngene, ZDA). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 170 V in 180 mA.

Analizo duRT-qPCR smo izvedli s kompletom SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline, Meridian Bioscience) in encimom reverzno transkriptazo MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) v inštrumentu LightCycler96 (Roche). Z duRT-qPCR smo sočasno analizirali prisotnost viroida (CBCVd oziroma HLVD) in interne kontrole (mRNA1192 oziroma mRNA170) v vzorcih hmelja s specifičnimi ZO, kot predhodno opisano v Guček (2020). Vzorce smo analizirali z reakcijami v enem koraku, v dveh tehničnih ponovitvah na ploščah za 96 vzorcev z detekcijskim sistemom LightCycler96 (Roche) in programom LightCycler96 Software 1.1.0.1320, pri čemer so bile vse nastavitve programa avtomatske.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru preliminarne analize smo vzorce izolirane s hitro izolacijo po protokolu I (PI) razredčili 5- in 20-krat, da bi ugotovili vpliv inhibicije na reakcijo duRT-qPCR. V primeru 5-kratne razredčitve smo potrdili inhibicijo, ker pri nobenem vzorcu nismo dobili pozitivnega rezultata (rezultati niso prikazani). Pri 20-kratni razredčitvi istih vzorcev smo v povprečju dobili za viroid CBCVd Cq-vrednosti okrog 25 in za HLVD okrog 28 pri pozitivnih vzorcih (preglednica 1). Pri zdravem vzorcu (BVV) smo dobili pozitivne Cq-vrednosti za mRNA1192 in mRNA170, medtem ko smo pri večini ostalih vzorcev dobili negativne rezultate. Tako pri viroidih (HLVD) kot pri interni kontroli smo zaradi prevelike količine rastlinske RNA in možnih prisotnih inhibitorjev dobili lažno negativne rezultate. Zaradi inhibicije smo se pri nadaljnjih analizah PI in PII odločili za dodatne razredčitve vzorcev (10-, 20-, 50- in 100-kratna). Analizo duRT-qPCR smo za CBCVd in HLVD na istih vzorcih izvedli s standardno metodo CTAB in SPT (samo CBCVd) in v povprečju dobili za 6 do 10 ciklov nižje Cq-vrednosti. Najnižje Cq-vrednosti smo za viroid CBCVd dobili pri CTAB izolaciji, medtem ko smo pri interni kontroli za mRNA1192 nižje Cq-vrednosti dobili pri SPT. Rezultati so pričakovani, kajti z uporabo komercialnega kompleta SPT dobimo manj izolirane RNA, ki je bolj čista, glede na hišno metodo (preglednica 1). Prav tako smo pričakovali, da bomo s PI dobili višje Cq-vrednosti kot s CTAB in SPT, ker smo s hitro metodo zaradi odsotnosti lize celic in čiščenja NA izolirali manj viroidne RNA.

Preglednica 1: Rezultati detekcije viroidov CBCVd in HLVd z metodo duRT-qPCR za vzorce različnih sort hmelja izolirane s standardno metodo (CTAB in SPT) in hitro izolacijo (PI). Za vzorce so podane povprečne Cq-vrednosti za CBCVd, HLVd, mRNA1192 in mRNA170.

CTAB*				
Oznaka vzorca	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	14,10	17,75	23,22	18,02
CBCVd + HLVd CEL	14,58	20,08	22,37	17,49
CBCVd + HLVd BO	14,82	20,79	22,16	17,58
PIC	19,21	31,44	19,24	14,64
BVV	-	-	18,63	16,55
NIC	-	-	-	-
SPT				
Oznaka vzorca	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	17,78	/	20,01	/
CBCVd + HLVd CEL	17,39	/	19,49	/
CBCVd + HLVd BO	17,56	/	20,01	/
PIC	17,23	/	18,75	/
BVV	-	/	24,09	/
NIC	-	/	-	/
PI 20x				
Oznaka vzorca	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	25,27	30,05	-	-
CBCVd + HLVd CEL	23,96	26,24	-	19,80
CBCVd + HLVd BO	26,60	-	-	-
BVV	-	-	26,41	22,68
NIC	-	-	-	-

* CTAB, vzorci izolirani s CTAB reagentom; SPT, vzorci izolirani s Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit; PI 20x, 20-kratna razreditev vzorcev izoliranih po protokolu I; CBCVd + HLVd, vzorec hmelja okužen s CBCVd in HLVd; AU, Aurora; CEL, Celeia; BO, Bobek; PIC, pozitivna kontrola izolacije; BVV, vzorec hmelja negativen na CBCVd in HLVd; NIC, negativna kontrola izolacije; Cq-vrednosti so podane kot povprečje dveh tehničnih ponovitev izolacije (štiri tehnične ponovitve duRT-qPCR reakcije); -, v vzorcu viroid ni prisoten; /, vzorec ni bil testiran.

Z duRT-qPCR smo vzorce različnih sort hmelja izoliranih po PI in PII analizirali na prisotnost CBCVd in HLVd. Pozitivne Cq-vrednosti smo dobili ne glede na sorto hmelja, razreditev (10-, 20-, 50- in 100-kratna) ali uporabljeno metodo (PI, PII) (preglednica 2). Med metodama PI in PII smo dobili zelo primerljive povprečne Cq-vrednosti za viroide. Za viroid CBCVd smo pri obeh metodah dobili povprečne Cq-vrednosti ~22,8 in za HLVd pri PI ~24,4 in pri PII ~22,6. Pri interni kontroli mRNA1192 smo v povprečju dobili nižje Cq-vrednosti in pri mRNA170 več pozitivnih vrednosti pri metodi PII kot pri PI. Vendar pa smo pri metodi PII v več primerih dobili lažno negativen rezultat, predvsem pri 10-kratni razredčitvi. Viroid CBCVd in HLVd smo tako večkrat ustrezno določili z uporabo metode PI. V primeru interne kontrole smo

pri mRNA170 s PI in PII v večini primerov dobili negativne rezultate, ne glede na razredčitev in vzorec. Zanimivo je, da smo pri mRNA1192 v istih vzorcih dobili pozitivne rezultate, tako da sklepamo, da negativen rezultat ni posledica inhibicije samo zaradi prevelike količine tkiva. Pri mRNA1192 smo pri 10-kratni razredčitvi potrdili inhibicijo, predvsem pri BVV vzorcu, kjer smo pri ostalih razredčitvah dobili pozitivne rezultate. Pri mRNA170 pa pozitivnega rezultata nismo dobili pri nobeni razredčitvi. ZO za mRNA170 se najverjetneje niso uspeli vezati na tarčo zaradi prevelike aktivnosti drugih metabolitov, ki so s hrambo 24 h pri -70 °C postali manj aktivni, ker smo samo v tem primeru pri mRNA170 dobili pozitiven rezultat (preglednica 2).

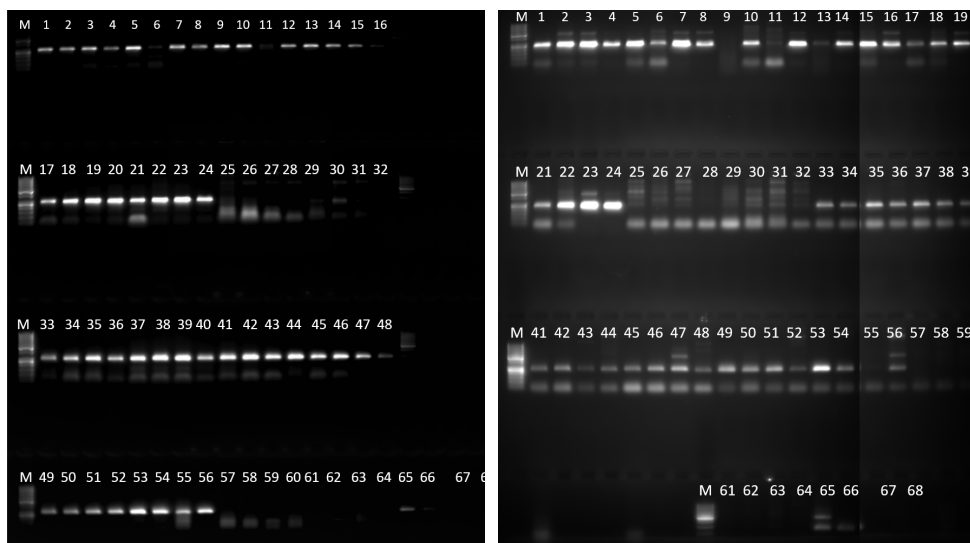
Preglednica 2: Primerjava rezultatov viroidov CBCVd in HLVd z metodo duRT-qPCR za vzorce različnih sort hmelja izolirane s hitro izolacijo po PI in PII. Podane so Cq-vrednosti za CBCVd, HLVd, mRNA1192 in mRNA170 pri različnih razredčitvah vzorcev.

Vzorec*	Razredčitev	PROTOKOL I (PI)				PROTOKOL II (PII)			
		Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	10x	21,44	22,89	27,20	-	20,81	21,45	21,71	-
	20x	21,86	23,14	27,50	-	23,08	20,33	24,43	21,80
	50x	22,71	23,84	28,51	-	24,10	24,23	26,20	-
	100x	23,23	24,00	29,14	-	24,17	24,52	25,97	-
	10 ⁻³	26,48	26,57	32,08	-	-	27,95	26,93	-
	10 ⁻⁴	-	30,20	-	-	-	33,97	-	-
CBCVd + HLVd AU	10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-	-
	10x	21,55	22,79	27,05	-	21,57	19,39	22,71	-
	20x	21,95	23,08	27,17	-	22,33	20,47	23,66	21,72
	50x	22,57	23,70	28,08	-	24,63	23,73	26,45	-
	100x	23,26	24,13	28,81	-	24,29	23,52	26,56	-
CBCVd + HLVd AU (po 24 h)	10x	20,85	23,01	27,24	18,81	21,12	20,52	21,67	21,18
	100x	22,59	24,08	29,55	24,18	23,52	22,20	25,97	23,64
CBCVd + HLVd CEL	10x	22,14	24,91	27,58	-	-	-	-	-
	20x	22,68	24,83	27,19	-	23,74	21,74	24,87	-
	50x	24,41	25,25	28,31	-	23,19	-	25,01	-
	100x	23,72	26,21	28,40	-	24,14	21,26	26,36	-
	10x	22,25	24,90	27,48	-	-	-	-	-
CBCVd + HLVd CEL	20x	22,11	25,33	26,95	-	23,91	24,60	25,49	-
	50x	23,63	26,32	28,11	-	23,97	21,11	25,87	-
	100x	23,77	26,70	28,48	-	24,44	24,81	27,01	-
	10x	21,37	23,14	27,55	-	18,91	20,65	-	-
	20x	22,52	23,35	27,89	-	21,48	19,09	24,67	-
CBCVd + HLVd BO	50x	23,32	24,16	28,53	-	22,75	20,00	26,66	-
	100x	23,26	24,34	28,91	-	21,38	21,69	24,97	-
	10x	21,34	22,46	26,66	-	19,43	20,36	23,33	-
	20x	22,60	22,74	27,46	-	22,54	22,31	25,44	-
CBCVd + HLVd BO	50x	23,62	24,06	28,11	-	23,90	23,61	27,15	-
	100x	23,21	24,15	28,72	-	23,24	22,42	26,85	-
	10x	-	-	25,77	-	-	-	22,74	-
	20x	-	-	26,31	-	-	-	24,81	17,39
BVV	50x	-	-	27,14	-	-	-	25,15	19,44
	100x	-	-	27,74	-	-	-	25,65	21,73
	10x	-	-	25,38	-	-	-	-	-
	20x	-	-	25,86	-	-	-	23,22	17,15
BVV	50x	-	-	27,04	-	-	-	23,30	18,79
	100x	-	-	27,44	-	-	-	25,15	22,15

* CBCVd + HLVd, vzorec hmelja okužen s CBCVd in HLVd; AU, Aurora; CEL, Celeia; BO, Bobek; BVV, vzorec hmelja negativen na CBCVd in HLVd; Cq-vrednosti so podane kot povprečje dveh tehničnih ponovitev duRT-qPCR reakcije; 10x/20x/50x/100x, 10-/20-/50- in 100-kratna razredčitev vzorca; -, v vzorcu viroid ni prisoten.

Pri analizi občutljivosti smo viroid CBCVd z metodo PI zaznali do 10⁻³, z metodo PII pa do 10⁻² (100x), viroid HLVd pa smo z obema metodama zaznali do 10⁻⁴ (preglednica 2). Občutljivost oziroma meja detekcije (LOD) pri duRT-qPCR reakciji z

uporabo standardnih metod izolacije je za CBCVd do 10^{-5} (LOQ= 10^{-4}). Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da se v primeru uporabe hitrih metod izolacije občutljivost zmanjša 100-krat. Rezultat je pričakovan, kajti metoda hitre izolacije iz vzorcev ne omogoča specifične izolacije RNA in odstranitve inhibitorjev RT-qPCR reakcije, kot so nečistoče, proteini, polisaharidi in soli, kar posledično negativno vpliva na potek reakcije.



Slika 2: Agarozni gel RT-PCR analize vzorcev izoliranih po PI (vzorci od 33 do 64) in PII (vzorci od 1 do 32). Levo: Rezultati za RT-PCR za CBCVd viroid. Desno: Rezultati za RT-PCR za HLVd viroid. Rezultati so podani za 8 vzorcev, vsak vzorec pri 10x, 20x, 50x in 100x razredčitvi. Zadnja dva vzorca sta negativna na CBCVd in HLVd (št. od 25 do 32 in od 57 do 64). Vzorci št. 65 do 68 predstavljajo kontrole RT-PCR reakcije. M: velikostni standard 50 bp/ 100 bp.

Vpliv hrambe smo določili z različnimi časi hranjenja vzorcev pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rastlinski sok) oziroma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (razredčeni vzorci). V primeru hrambe rastlinskega soka 24 h pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo v vzorcih pri 10- in 100-kratni razredčitvi uspešno potrdili prisotnost viroidov in namnožitev interne kontrole. Dobili smo primerljive Cq-vrednosti, tako da lahko sklepamo, da kratkotrajna hramba nima negativnega vpliva na rezultate. Prav tako smo pozitivne rezultate z duRT-qPCR dobili po hrambi že razredčenih vzorcev po 48 h (za HLVd in analizo občutljivosti). V primeru negativnih vzorcev smo z duRT-qPCR pri vseh vzorcih dobili ustrezne rezultate. Na ta način lahko sklepamo, da metodi PI in PII omogočata zanesljivo detekcijo. Zaradi sočasne izolacije nukleaz (DNaz), smo namreč pričakovali lažno pozitivne vzorce, ker bi nukleaze lahko razgradile sondo, ki bi posledično lahko fluorescirala. Glede na rezultate duRT-qPCR se je kot bolj zanesljiva metoda izkazala PI, ker smo dobili več pozitivnih Cq-vrednosti. Rezultat je pričakovan, ker metoda PI glede na PII vsebuje korak centrifugiranja, v katerem smo odstranili večje nečistoče. Ne glede na to smo z metodo PII, ki je bila precej enostavnejša in posledično primerna za uporabo na

terenu, prav tako dobili ustrezne rezultate. Zaradi prisotnosti inhibicije pri 10-kratni razredčitvi bi bilo smiselno v primeru metode PII za zanesljivo določanje uporabiti vsaj dve različni razredčitvi in se na ta način izogniti vplivu inhibicije.

Pri analizi viroidov CBCVd in HLVd z RT-PCR smo z metodo PI viroid CBCVd uspešno določili v vseh vzorcih pri vseh razredčitvah, viroid HLVd pa pri v dveh primerih neuspešno pri 50- in 100-kratni razredčitvi (slika 2, preglednica 3). V primeru uporabe metode PII smo pri CBCVd in HLVd viroid uspešno določili pri 21 od 24 vzorcev in bili neuspešni pri različnih razredčitvah (slika 2, preglednica 3).

Preglednica 3: Primerjava rezultatov za viroid CBCVd in HLVd z metodo RT-PCR za vzorce različnih sort hmelja izolirane s hitro izolacijo po PI in PII. Rezultati so prikazani za vse vzorce glede na 10-, 20-, 50- in 100-kratno razredčitev.

Protokol/Razredčitev*	Število pozitivnih vzorcev/Število vseh testiranih vzorcev	
	CBCVd	HLVd
PI		
10x	6/6	6/6
20x	6/6	6/6
50x	6/6	5/6
100x	6/6	5/6
Skupaj	24/24	22/24
PII		
10x	6/6	4/6
20x	5/6	6/6
50x	5/6	5/6
100x	5/6	6/6
Skupaj	21/24	21/24

*PI, vzorci izolirani po protokolu I; PII, vzorci izolirani po protokolu II; 10x/20x/50x/100x, 10-/20-/50- in 100-kratna razredčitev vzorca.

V primeru RT-PCR se je tako metoda PI izkazala kot zelo primerna za uporabo, predvsem z 10- in 20-kratno razredčitvijo, pri kateri smo uspešno določili vse vzorce za CBCVd in HLVd. Z metodo PI smo glede na PII dobili z RT-PCR boljše rezultate najverjetneje zaradi dodatnega koraka centrifugiranja. Rezultati so sovpadali z duRT-qPCR. S centrifugiranjem smo namreč odstranili večje dele tkiva in za analizo uporabili samo supernatant ter na ta način odstranili del inhibitorjev RT-PCR reakcije. V primeru metode PII je pri testiranju viroidov tudi z RT-PCR, zaradi prisotnosti inhibitorjev, zato smiselna uporaba vsaj dveh različnih razredčitev. Pri analizi negativnih vzorcev (slika 2) smo v vseh primerih dobili ustrezne rezultate.

Vpliv hrambe smo prav tako testirali z metodo RT-PCR, pri kateri smo viroid CBCVd določili po 24 h, viroid HLVd pa po 18 dneh in v obeh primerih dobili pozitivne signale (slika 2). Iz rezultatov lahko sklepamo, da so viroidi v rastlinskem soku oziroma

razredčenih vzorcih stabilni in lahko za krajše časovno obdobje (1 mesec) ostanejo shranjeni pri -20 °C, za daljše časovno obdobje pa pri -70 °C.

Z raziskavo smo tako potrdili, da se viroid CBCVd in HLVd lahko določi tudi brez dolgotrajnega postopka izolacije NA. Viroida smo potrdili pri treh različnih sortah in štirih različnih razredčitvah z uporabo dveh metod detekcije. Kot pričakovano smo potrdili prisotnost inhibicije, vendar v zelo omejenem obsegu, ki se ga lahko odpravi s pomočjo večjega števila razredčitev. Obe metodi hitre izolacije PI in PII sta se izkazali kot primerni za določanje viroidov CBCVd in HLVd in kažeta potencial pri nadaljnjem razvoju metod za detekcijo na terenu. Za izvajanje rutinskih pregledov na terenu bo potrebnih še nekaj izboljšav, da bo postopek omogočal čim krajšo in zanesljivo analizo. Zaradi lažno negativnih rezultatov, ki smo jih dobili pri nekaterih razredčitvah, bomo pri nadaljnjem delu poskusili metodi še dodatno optimizirati in testirati tudi druge protokole in pufre, ki so komercialno dostopni.

4 ZAKLJUČEK

Metode na osnovi določanje nukleinskih kislin še vedno predstavljajo temelj diagnostike viroidov v rastlinski patologiji. Z razvojem novih metod je določanje rastlinskih patogenov, kot so virusi in viroidi, postalo precej enostavnejše in mogoče na terenu ob samem vzorčenju rastlin. Razvoj je zato usmerjen v optimizacijo hitrih metod priprave rastlinskih ekstraktov namesto zahtevne in obsežne izolacije nukleinskih kislin. Možnost določanja patogenov na terenu iz rastlinskih ekstraktov in brez uporabe sofisticirane opreme bo z izboljšavami in optimizacijo postopkov kmalu del našega vsakdana.

Z vpeljavo dveh novih metod hitre izolacije oziroma priprave rastlinskih ekstraktov smo potrdili, da prisotnost viroidov v rastlinah lahko določamo brez izolacije nukleinskih kislin. Metodi glede na rezultate kažeta potencial za uporabo pri razvoju CRISPR/Cas-RT-RPA sistema, ki ga želimo razviti za določanje viroida CBCVd na terenu. Potrebni bo še nekaj dodatnih izboljšav in testiranje drugih komercialno dostopnih reagentov, da bomo dobili optimalno kombinacijo priprave vzorca za detekcijo na terenu in posledično zanesljive rezultate. Določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin bo tako lahko postala realnost in ne samo sanje rastlinskih diagnostikov.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077).

5 LITERATURA

Bernad L., Duran-Vila N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 105-113

- Emaus, M. N., Varona, M., Eitzmann, D.R., Hsieh, S., and Anderson, J.L. Version of Record: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620302144>. 2020.
- Guček T., Jakše J., Matoušek J., Radišek S. 2019. One-Step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viroids from hop (*Humulus lupulus* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 154: 273-286
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2020. Primerjava metod za izolacijo RNA z namenom določanja viroidov v hmelju z RT-PCR in RT-qPCR. *Hmeljarski bilten*, 27: 5-21.
- Guček, T. 2020. Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju : doktorska disertacija = Biology of citrus bark cracking viroid (CBCVd) and development of methods for detection of viroids in hop : doctoral dissertation. Ljubljana: [T. Guček], XIV, 139 str., [33] str. pril., ilustr. <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpis/gradiva.php?id=121584>.
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2023. Optimization and validation of singleplex and multiplex RT-qPCR for detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd), hop latent viroid (HLVd), and hop stunt viroid (HSVd) in hops (*Humulus lupulus* L.). *Plant Disease*, 10.1094/PDIS-11-22-2606-RE
- Ivanov, Aleksandr V., Irina V. Shmyglya, Anatoly V. Zherdev, Boris B. Dzantiev, and Irina V. Safenkova. 2020. "The Challenge for Rapid Detection of High-Structured Circular Rna: Assay of Potato Spindle Tuber Viroid Based on Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Tests." *Plants* 9 (10): 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants9101369>.
- Jakše, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matoušek, J., Javornik, B. 2015. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64: 831-842
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Tanikoshi T., Shikata E. 1992. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 58: 677-684
- Kump, B., Javornik, B. 2016. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149-158
- Marqués, M. C., Sánchez-Vicente, J., Ruiz, R., Montagud-Martínez, R., Márquez-Costa, R., Gómez, G., Carbonell, A., Daròs, J. A., and Guillermo, R. 2022. "Diagnostics of Infections Produced by the Plant Viruses TMV, TEV, and PVX with CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13." *ACS Synthetic Biology*, 11 (7): 2384–93.
- Pokorn T. 2017. Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.), doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 159 str.
- Tan, S.C., Yiap, B.C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present, *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2009/574398.
- Zou, Y., Mason, M. G., Wang, Y., Wee, E., Turni, C., Blackall, P.J., Trau, M., and Botella, J.R. 2017. "Nucleic Acid Purification from Plants, Animals and Microbes in under 30 Seconds." *PLoS Biology* 15 (11): 1–22.

PRIMERJAVA METOD ZA IZOLACIJO RNA IZ KORENIN IN LISTOV HMELJA ZA ANALIZE IZRAŽANJA GENOV Z METODO RT-qPCR

Ester STAJIČ¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 23. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 16. 11. 2023

Izvleček

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvodomna zeljnata trajnica in ovijalka, ki ima pomembno vlogo v pivovarski industriji. Ker je gostiteljska rastlina številnih škodljivih organizmov, so raziskave na nivoju RNA ključne za razumevanje odziva rastlin na patogene in mehanizmov odpornosti na bolezni. Pridobivanje zadostnih količin visokokvalitetne RNA za molekularne analize pa je pri rastlinah zaradi prisotnosti metabolitov, kot so fenoli in polisahardi, pogosto oteženo. V ta namen smo primerjali pet različnih postopkov za izolacijo RNA iz listov in korenin hmelja, od tega dva komercialno dostopna kompleta za izolacijo RNA – Monarch Total RNA Miniprep kit (NEB) in Spectrum™ Plant Total RNA Isolation kit (Sigma-Aldrich), ter tri nekomercialne protokole. Pri vseh vzorcih smo s spektrofotometrom določili koncentracijo in čistost izolirane RNA. Z nekomercialnima metodama 'Hot borate' in CTAB smo dosegli najvišje koncentracije in čistost izolirane RNA tako pri listih, kot tudi pri koreninah hmelja. Pri analizi vzorcev z metodo RT-qPCR smo ugotovili, da so bili ti primerni za nadaljnje molekularne analize.

Ključne besede: hmelj, izolacija RNA, RT-qPCR

COMPARISON OF RNA ISOLATION METHODS FROM HOP ROOTS AND LEAVES FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS USING RT-qPCR

Abstract

Hops (*Humulus lupulus* L.) is a dioecious perennial climbing plant that plays an important role in the brewing industry. Since it is a host plant for many pathogens, research at the RNA level is critical to understand the plant's response to pathogens and mechanisms of disease resistance. Obtaining sufficient amounts of high-quality RNA for molecular analysis is often difficult in plants because they contain metabolites such as phenols and polysaccharides. For this purpose, we compared five different methods for RNA isolation from hop leaves and roots, including two commercially available kits for RNA isolation - Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB) and Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich); and three noncommercial protocols. For all samples, the concentration and purity of the isolated RNA was determined using a spectrophotometer. With the non-commercial 'Hot borate' and CTAB methods, we achieved the highest concentrations and purity

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

of isolated RNA in both leaves and roots of hops. When the samples were analysed using the RT-qPCR method, we found that they were suitable for further molecular analysis.

Key words: hop, RNA isolation, RT-qPCR

1 UVOD

Rastline se odzivajo na zunanje dejavnike, kot so sprememba temperature, suša ali napadi škodljivcev in se na te spremembe prilagajajo z izražanjem različnih genov in sintezo metabolitov (Das in sod., 2013). Pri obvladovanju bolezni so zato za razumevanje mehanizma odziva rastline na okužbo s patogenom ključne raziskave na nivoju RNA. Za analizo izražanja genov se v zadnjih desetletjih najpogosteje uporablja metoda obratnega prepisa z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-qPCR). Analiza je sestavljena iz več korakov: izolacije RNA, odstranjevanja DNA, sinteze cDNA in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Protokole, ki so na voljo, je običajno potrebno prilagoditi posamezni rastlinski vrsti, predvsem korak izolacije RNA (Moebes in sod., 2022).

Za izolacijo RNA iz rastlinskih tkiv se uporabljajo različne metode, ki temeljijo na uporabi gvanidin tiocionata, heksadeciltrimetilamonijevega bromida (CTAB) ali natrijevega dodecil sulfata (SDS) (Sasi in sod., 2023). Na voljo so tudi različni komercialno dosegljivi kompleti. Na uspešnost izolacije RNA vplivajo številni dejavniki, kot sta starost in fiziološko stanje rastlin, tip tkiva in biokemijski profil rastline. Predvsem slednji ima ključno vlogo, saj lahko prisotnost sekundarnih metabolitov negativno vpliva na izolacijo kvalitetne RNA zaradi njihove vezave na nukleinske kisline, kar vodi v obarjanje (Das in sod., 2013; Sasi in sod., 2023). Posledično je potrebno protokol izolacije RNA prilagoditi za posamezno rastlinsko vrsto in tip tkiva. Izolacija visoko kvalitetne RNA brez ostankov DNA je ključna za izvedbo številnih molekularnih metod na nivoju RNA, poleg metode RT-qPCR tudi za prenos po Northernu, sekvenciranje RNA, itd.

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je rastlina, bogata z bioaktivnimi snovmi, kot so eterična olja, hmeljeve smole in polifenoli. Zasledimo jih lahko predvsem v storžkih, ki se uporabljajo v pivovarski industriji in v farmacevtskih pripravkih (Hrnčič in sod., 2019), v manjših količinah pa jih lahko zasledimo tudi v listih (Abram in sod., 2015). Zaradi prisotnih sekundarnih metabolitov je izolacija RNA lahko otežena in rezultati molekularnih analiz nezanesljivi. Pri preučevanju verticilijske uvelosti hmelja, ki se začne s prehodom glive v podzemne dele rastline in nato napreduje v nadzemne, je ključna izolacija kvalitetne RNA iz korenin, ki pa so se večkrat pokazale za zahteven tip tkiva (Kolenc, 2022). S tem namenom smo primerjali pet različnih protokolov za izolacijo RNA iz listov in korenin hmelja. Uspešnost izolacije smo določili spektrofotometrično in izolirano RNA uporabili v reakciji RT-qPCR.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za izolacijo RNA smo uporabili vzorce listov in korenin hmelja, ki smo jih predhodno strli v terilnicah s pomočjo tekočega dušika in hranili v zmrzovalniku na -80°C . Za vsako od uporabljenih metod smo uporabili vzorce iz štirih rastlin hmelja in za izolacijo odvzeli po 100 ng materiala.

2.2 Izolacija RNA z različnimi metodami

V poskusu smo primerjali pet različnih metod za izolacijo RNA:

- komercialni komplet Monarch Total RNA Miniprep kit (NEB)
- komercialni komplet Spectrum™ Plant Total RNA Isolation kit (Sigma-Aldrich)
- CTAB protokol (Kump in Javornik, 1996)
- 'Hot borate' protokol (Gudenschwager in sod., 2012)
- modificiran CTAB protokol (CTAB-LiCl) (Kistner in Matamoros, 2005).

Izolacijo RNA smo izvedli po navodilih proizvajalca (komercialni kompleti) oz. po postopku, objavljenem v zgoraj navedenih objavah (nekomercialni protokoli). Izolirano RNA smo do nadaljnje uporabe hranili v zmrzovalniku na -80°C .

2.3 Odstranjevanje DNA

Da bi se izognili kontaminaciji vzorcev z genomsko DNA, smo vse vzorce tretirali z DNazo. Pri komercialnih kompletih (NEB in Sigma-Aldrich) je ta korak že vključen v samem protokolu med izolacijo, pri ostalih pa smo odstranjevanje DNA izvedli po zadnjem koraku izolacije. Pri tem smo uporabili komercialni komplet Rnase-Free Dnase Set (Qiagen) in sledili navodilom proizvajalca.

2.4 Določanje koncentracije in kvalitete RNA

Koncentracijo izolirane RNA smo določili z uporabo spektrofotometra NanoVue™ (Healthcare Bio-Sciences), ki izmeri absorbanco pri 230, 260 in 280 nm. Na podlagi podanih razmerij absorbanc $A_{260}/280$ in $A_{260}/230$ smo ovrednotili čistost izolirane RNA. Za preverjanje kakovosti smo 500 ng RNA nanесли na 1,2 % agarozni gel. Ločene fragmente smo po eni uri vizualizirali na podlagi barvila etidijev bromid na UV transiluminatorju.

2.5 RT-qPCR

Obratni prepis smo izvedli s komercialnim kompletom High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) po navodilih proizvajalca v cikličnem termostatu SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems™). Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca s Fast

SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™). V reakciji smo uporabili 10 ng cDNA in začetne oligonukleotide, specifične za gen *DRH1*, ki se pri hmelju uporablja kot referenčni gen pri analizi izražanja genov z metodo RT-qPCR (Štajner in sod., 2013). Za vsak vzorec smo uporabili tri tehnične ponovitve. Rezultate smo analizirali s programskim orodjem QuantStudio™ Design & Analysis Software.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Analize izražanja genov imajo velik pomen na številnih področjih bioloških raziskav, saj dajejo vpogled v obrambni mehanizem rastlin na različne dejavnike biotskega in abiotskega stresa. Za natančno preučevanje izražanja genov je izolacija kvalitetne RNA ključna, kar pa je pri rastlinah zaradi prisotnosti sekundarnih metabolitov velikokrat težavno (Behnam in sod., 2018). Hmelj je rastlina, bogata z bioaktivnimi komponentami, ki lahko negativno vplivajo na uspešnost izolacije RNA, zato smo za izolacijo RNA iz vzorcev listov in korenin hmelja uporabili pet različnih postopkov, ter jih med seboj primerjali glede na koncentracijo, čistost in nerazgrajenost RNA, ter na koncu tudi preverili, ali je izolirana RNA primerna za nadaljnje molekularne analize.

Koncentracijo izolirane RNA smo določili z uporabo spektrofotometra z merjenjem absorbance pri 260 nm. Pri vseh vzorcih smo odstranili genomsko DNA, zato ta ni imela vpliva na izmerjeno absorbanco. Pri vseh izbranih metodah izolacije smo imeli enako količino začetnega materiala, prav tako smo RNA na koncu raztopili v enakem volumnu, zato je bilo mogoče uspešnost izolacije med različnimi metodami neposredno primerjati. Najvišje koncentracije smo dobili z nekomercialnim protokolom 'Hot borate', ki je bil optimiziran za izolacijo RNA iz sadežev, bogatih z različnimi metaboliti (Gudenschwager in sod., 2012). Izmerjena povprečna koncentracija RNA pri vzorcih listov hmelja je bila 1098 ng/μl, pri koreninah pa 419 ng/μl (Preglednica 1).

Preglednica 1: Koncentracija in čistost RNA, izolirana iz korenin in listov hmelja z različnimi metodami.

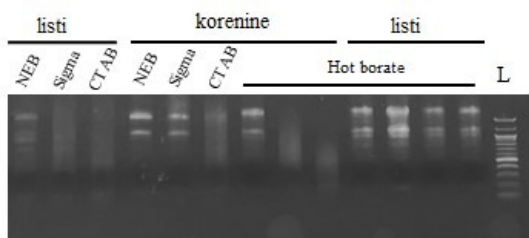
Metoda	Tkivo	Koncentracija RNA (ng/μl)	A260/280	A260/230
NEB	korenine	143 ± 42	2,05 ± 0,04	1,65 ± 0,39
	listi	375 ± 247	2,09 ± 0,05	1,70 ± 0,66
Sigma-Aldrich	korenine	113 ± 42	1,75 ± 0,38	0,87 ± 0,46
	listi	361 ± 311	2,00 ± 0,26	1,46 ± 0,89
CTAB	korenine	341 ± 212	2,21 ± 0,02	2,09 ± 0,72
	listi	655 ± 440	2,18 ± 0,03	2,11 ± 0,53
Hot borate	korenine	419 ± 178	2,15 ± 0,01	2,14 ± 0,46
	listi	1098 ± 239	2,14 ± 0,01	2,42 ± 0,03
CTAB-LiCl	korenine	131 ± 135	1,44 ± 0,14	0,35 ± 0,07
	listi	76 ± 31	1,20 ± 0,10	0,21 ± 0,05

Visoke koncentracije RNA smo pridobili tudi po protokolu CTAB (listi 655 ng/ μ l, korenine 341 ng/ μ l), medtem ko smo s komercialnima kompletoma pridobili veliko nižje koncentracije RNA (korenine 113 ng/ μ l in 143 ng/ μ l, listi 361 ng/ μ l in 375 ng/ μ l). Protokoli na osnovi CTAB z različnimi modifikacijami so se izkazali za primerne za izolacijo visokokakovostne RNA iz težavnih rastlinskih tkiv (Johnson in sod., 2012). V našem primeru smo preizkusili dva protokola na osnovi CTAB – protokol po Kump in Javornik (1996) ter modificiran protokol po Kistner in Matamoros (2005), vendar smo s slednjim dobili 3-8x nižje koncentracije kot s prvim.

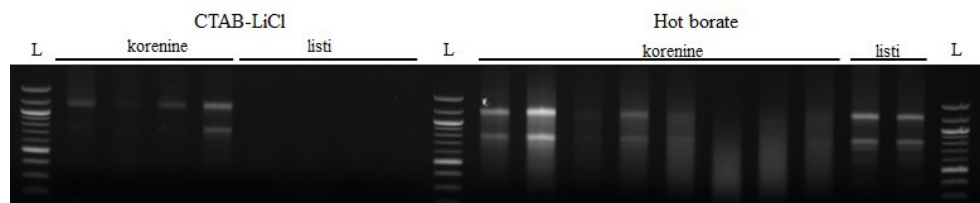
Če primerjamo uspešnost izolacije RNA iz dveh različnih tkiv (korenine in listi), lahko ugotovimo, da so koncentracije RNA pri vseh metodah, razen pri CTAB-LiCl (kjer so bile koncentracije pri obeh tipih tkiva nizke), pričakovano višje pri listih kot pri koreninah. Korenine so se izkazale za težavne pri številnih rastlinskih vrstah (Das in sod., 2013; Kistner in Matamoros, 2005), zato se za izolacijo RNA priporočajo mladi listi, ki vsebujejo najmanj inhibitornih komponent (Sasi in sod., 2023). Kljub temu ima uspešna izolacija RNA iz korenin velik pomen, predvsem pri preučevanju bolezni, ki se začnejo v podzemnih delih rastlin.

Z razmerjem izmerjenih absorbanca A260/A280 in A260/A230 smo lahko ovrednotili tudi čistost izolirane RNA. Priporočljive vrednosti so po Unger in sod. (2019) za razmerje A260/A280 \sim 2,0 in A260/A230 med 1,8 in 2,2. Kot je razvidno iz Preglednice 1, vsi vzorci, razen tistih, pridobljenih z metodo CTAB-LiCl (korenine in listi) ter vzorci RNA iz korenin, ki je bila izolirana s kompletom Sigma-Aldrich, ustrezajo prvemu pogoju, medtem ko imajo omenjeni vzorci nižje razmerje A260/A280, kar lahko nakazuje na ostanke proteinov (Gudenschwager in sod., 2012). Pri razmerju A260/A230 smo vrednosti, ki kažejo na visoko čistost RNA dosegli le z uporabo protokolov CTAB in 'Hot borate'. Pri ostalih metodah so bile vrednosti nižje, kar pomeni, da so bile v vzorcih RNA prisotne nečistoče. Če primerjamo rezultate glede na tip tkiva, lahko ugotovimo, da med vzorci RNA iz korenin ali listov ni večjih razlik v čistosti, razen pri komercialnem kompletu Sigma-Aldrich, kar je v nasprotju s pričakovanim.

Da bi ocenili kvaliteto izolirane RNA smo od vsake kombinacije (metoda izolacije in tip tkiva) naključno izbrane vzorce nanесли na 1,2 % agarozni gel. V primeru nerazgrajene RNA smo na gelu videli dva lepo vidna fragmenta 18S in 28S ribosomalne RNA (rRNA). Takšen primer so vzorci RNA iz korenin, ki je bila izolirana s komercialnima kompletoma, medtem, ko smo s protokolom CTAB dobili zelo razgrajeno RNA, brez vidnih fragmentov 18S in 28S rRNA (Slika 1). Pri protokolu 'Hot borate' smo opazili velike razlike v kvaliteti RNA med vzorci korenin (Slika 1 in 2). Vzrok bi lahko bila homogenizacija tkiva, ki je pri koreninah otežena, daljši čas, ki ga potrebujemo za učinkovito homogenizacijo pa lahko vodi v segrevanje vzorcev in sproščanje nukleaz, kar povzroči razgradnjo RNA (Moebes in sod., 2022). Pri protokolu CTAB-LiCl je bila koncentracija RNA nizka, zato pri listih kvalitete RNA nismo mogli oceniti, medtem ko je bila kvaliteta RNA pri vzorcih korenin visoka.

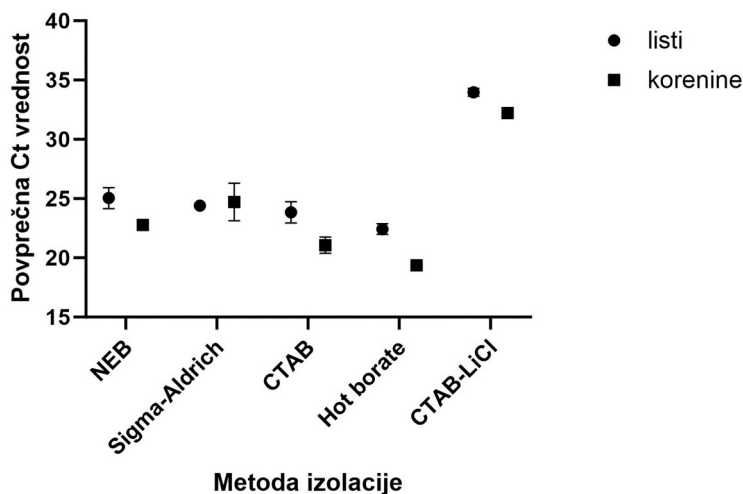


Slika 1: Agarozni gel vzorcev RNA, izoliranih iz korenin in listov hmelja s komercialnima kompletoma (NEB in Sigma-Aldrich) ter po CTAB in 'Hot borate' protokolu. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



Slika 2: Agarozni gel vzorcev RNA, izoliranih iz korenin in listov hmelja po CTAB-LiCl in 'Hot borate' protokolu. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).

Ker nas je zanimalo, ali je izolirana RNA primerna za nadaljnje molekularne analize, smo jo prepisali v cDNA in izvedli qPCR z začetnimi oligonukleotidi za gen *DRH1*, ki je bil zaradi stabilnega izražanja izbran za referenčni gen pri hmelju v študiji Štajner in sod. (2013). Kot prikazuje Slika 3, smo pri vseh vzorcih gen *DRH1* uspešno pomnožili. Višje Ct vrednosti (33,97 listi in 32,22 korenine) pri vzorcih RNA, ki je bila izolirana po protokolu CTAB-LiCl, so lahko posledica prisotnosti nečistoč, kot so sekundarni metaboliti, ki lahko inhibirajo delovanje reverzne transkriptaze med obratnim prepisom (Johnson in sod., 2012) in polimeraze med pomnoževanjem v qPCR reakciji (Unger in sod., 2019). Enako navajajo tudi Deepa in sod. (2014) pri izolaciji RNA iz več tipov tkiv kurkume. Povprečne Ct vrednosti pri ostalih metodah so se gibale med 19,36 in 25,05 ter se med vzorci korenin in listov pri vseh preizkušanih metodah niso bistveno razlikovale.



Slika 3: Rezultat analize RT-qPCR prikazan kot povprečne Ct vrednosti pri vseh RNA vzorcih.

4 ZAKLJUČEK

Pri študijah izražanja genov je izolacija kakovostne RNA iz rastlinskega tkiva ključen korak, ta pa je v veliki meri odvisna od rastlinskega materiala, zato je protokol izolacije RNA potrebno prilagoditi posamezni rastlinski vrsti in tipu tkiva. V ta namen smo primerjali uspešnost izolacije RNA iz listov in korenin hmelja z različnimi metodami. Ugotovili smo, da so bile razlike tako v koncentraciji, čistosti in kvaliteti izolirane RNA med različnimi metodami in tipoma tkiva, vendar pa so bili vsi vzorci, razen tistih, pridobljenih z metodo CTAB-LiCl, primerni za nadaljnjo analizo z metodo RT-qPCR. Za molekularne metode, pri katerih so potrebne večje količine RNA (npr. sekvenciranje RNA), pa tako za liste, kot tudi za korenine hmelja priporočamo uporabo nekomercialnih protokolov 'Hot borate' in CTAB.

Zahvala. Avtorica se za finančno podporo zahvaljujem Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077). Za tehnično pomoč se zahvaljujem dr. Urbanu Kuneju in Tjaši Cesar. Zahvala za pomoč pri delu gre tudi dijakoma Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana Maticu Krašni in Filipu Gromu ter študentki Biotehniške fakultete Emanueli Žnidaršič.

5 VIRI

Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Možina S. S., Košir J. I., Kač M., Demšar L., Poklar Ulrih N. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*. 2015; 64: 124–134.

- Behnam B., Bohorquez-Chaux A., Castaneda-Mendez O.F., Tsuji H., Ishitani M., Becerra Lopez-Lavalle, L.A. An optimized isolation protocol yields high-quality RNA from cassava tissues (*Manihot esculenta* Crantz). *FEBS Open Bio*. 2019; 9: 814–825.
- Das A., Saha D., Mondal T.K. An optimized method for extraction of RNA from tea roots for functional genomics analysis. *Indian Journal of Biotechnology*. 2013; 12: 129–132.
- Deepa K., Sheeja T.E., Santhi R., Sasikumar B., Cyriac A., Deepesh P.V., Prasath D. A simple and efficient protocol for isolation of high quality functional RNA from different tissues of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Physiol Mol Biol Plants*. 2014; 20, 2: 263–271.
- Gudenschwager O., González-Agüero M., Defilippi B.G. A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits. *South African Journal of Botany*. 2012; 83 186–192.
- Hrnčič M. K., Spaninger E., Košir I. J., Knez Z., Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*. 2019; 11, 2: 275.
- Johnson M. T. J., Carpenter E. J., Tian Z., Bruskiwich R., Burris J. N., Carrigan C. T., Chase M. W., Clarke N. D., Covshoff S., dePamphillis C. W., Edger P. P., Goh F., Graham S., Greiner S., Hibberd J. M., Jordon-Thaden I., Kutchan T. M., Leebens-Mack J., Mlekonian M., Miles N., Myburg H., Patterson J., Pires J. C., Ralph P., Rolf M., Sage R. F., Soltis D., Soltis P., Stevenson D., Stewart Jr C. N., Surek B., Thomsen C. J. M., Villarreal J. C., Wu X., Zhang Y., Deyholos M. K., Wong G. K. Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLOS ONE*. 2012; 7, 11: e50226.
- Kolenc Ž. Analiza izražanja mikroRNA in njihovih tarč v obrambnem odzivu hmelja (*Humulus lupulus*) ob okužbi z glivo *Verticillium nonalfalfae*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2022, 54 str.
- Kistner C., Matamoros M. RNA isolation using phase extraction and LiCl precipitation. V: *Lotus japonicus Handbook*. Márquez A.J. (ur.). Springer, Dordrecht. 2005: 123–124.
- 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.
- Moebes M., Kuhlmann H., Demidov D., Lermontova I. Optimization of quantitative reverse transcription PCR method for analysis of weakly expressed genes in crops based on rapeseed. *Front. Plant Sci*. 2022; 13: 954976.
- Sasi S., Krishnan S., Kodackattumannil P., Shamisi A. A., Aldarmaki M., Lekshmi G., Kottackal M., Amiri K. M. A. DNA-free high-quality RNA extraction from 39 difficult-to-extract plant species (representing seasonal tissues and tissue types) of 32 families, and its validation for downstream molecular applications. *Plant Methods*. 2023; 19: 84.
- Štajner N., Cregeen S., Javornik B. Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop (*Humulus lupulus* L.) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*. *PLoS One*. 2013; 8, 7: e68228.
- Unger C., Lokmer N., Lehmann D., Axmann I. M. Detection of phenol contamination in RNA samples and its impact on qRT-PCR results. *Analytical Biochemistry*. 2019; 571, 49–52.

VALIDACIJA METODE duRT-qPCR ZA DOLOČANJE VIROIDA RAZPOKANOSTI SKORJE AGRUMOV (CBCVd) NA HMELJU Z UPORABO mRNA1192 INTERNE KONTROLE

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADIŠEK²

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 15. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 5. 12. 2023

Izvleček

Z namenom širjenja obsega akreditacije v Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin (DL) na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) za diagnostično metodo »duRT-qPCR za določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192« (MDL 12) smo izvedli njeno delno validacijo in analizirali analitično občutljivost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost. Analizo smo izvedli z uporabo dveh kompletov reagentov (SensiFast in AgPATH). Pri analitični občutljivosti smo mejo zaznavnosti (LOD) določili pri 5 pg in mejo določljivosti (LOQ) pri 50 pg. V okviru testiranja občutljivosti in selektivnosti smo primerjali različne sorte hmelja, načine okužbe, kombinacije viroidov in dve metodi izolacije nukleinskih kislin in v vseh primerih dobili ustrezne rezultate. Ponovljivost in obnovljivost smo testirali s štirimi analitiki v treh dneh, z dvema kompletoma reagentov, na setu 30 vzorcev. Skupno smo izvedli 12 analiz in analizirali 360 vzorcev in jih določili s 100 % natančnostjo. V primeru SensiFast kompleta smo dobili nižje C_q-vrednosti in ga določili kot optimalno izbiro za duRT-qPCR. Dodatno smo z metodo MDL12 izvedli tudi analizo vzorcev hmelja in RNA vključenih v med-laboratorijsko testiranje in bili 100 % uspešni. Z validacijo smo dokazali, da zagotavljamo zanesljive rezultate in da je metoda primerna za akreditacijo. Članek predstavlja validacijo diagnostične metode, ki prinaša nove ugotovitve na področju izvajanja RT-qPCR tehnike.

Ključne besede: CBCVd, analitična občutljivost, selektivnost, ponovljivost, obnovljivost

VALIDATION OF THE RT-qPCR METHOD FOR THE DETECTION OF CITRUS BARK CRACKING VIROID (CBCVd) ON HOPS INCLUDING mRNA1192 AS INTERNAL CONTROL

Abstract

In order to expand the scope of accreditation in the Diagnostic Laboratory for Plant Protection (DL) at the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS) for the diagnostic method "duRT-qPCR for detection of CBCVd and internal control

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

² Dr., IHPS, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

mRNA1192" (MDL 12), we performed its partial validation and analysed the analytical sensitivity, selectivity, repeatability and reproducibility. Analyses were performed using two sets of reagents (SensiFast and AgPATH). For analytical sensitivity, the limit of detection (LOD) was set at 5 pg and the limit of quantification (LOQ) at 50 pg RNA. As part of sensitivity and selectivity testing, we compared different hop cultivars, infection methods, viroid combinations and two nucleic acid isolation methods. In all tests we obtained accurate results. Repeatability and reproducibility were tested with four analysts over three days, with two sets of reagents, on set of 30 samples. We performed a total of 12 analyses and tested 360 samples, and determined them with 100 % accuracy. In the case of SensiFast kit, we obtained lower Cq values and chose it as the optimal choice for duRT-qPCR. In addition, with the MDL 12 method, we also performed an analysis of hop samples and RNA included in inter-laboratory testing and were 100 % successful. Through validation, we proved that we provide reliable results and that the method is suitable for accreditation. The paper presents the validation of the diagnostic method, which brings new findings in the field of RT-qPCR method implementation.

Key words: CBCVd, analytical sensitivity, selectivity, repeatability, reproducibility

1 UVOD

Za določanje viroidov so vedno pogosteje v rutinski uporabi metode na osnovi določanja nukleinskih kislin, kot je RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) (Guček in sod., 2023). Metoda RT-qPCR je zelo hitra, občutljiva, z manj možnostmi za kontaminacijo (brez gela), vendar z omejitvami kot so dragi reagenti, oprema in visoka kakovost izolirane RNA (Boonham in sod., 2004). Pomnoževanje produkta vodi do povečanja fluorescence, ki jo spremljamo med samim potekom reakcije, zato končna analiza na gelu ni potrebna. Zaznavanje pomnoženih PCR produktov je mogoče z uporabo nespecifičnih. (npr. SYBR Green I) ali specifičnih metod (npr. TaqMan) (Valasek in Repa, 2005). V primeru TaqMan kemije se med začetna oligonukleotida (ZO) na tarčno zaporedje komplementarno veže tudi sonda označena s fluorescentnima barviloma. Ob podaljševanju verige DNA-polimeraza razgradi sondo, zato se dušilec oddalji od poročevalca in poročevalski signal lahko izmerimo (Valasek in Repa, 2005). Na podoben način specifično zaznavo omogočajo tudi LNA-sonde (ang. Locked nucleic acids), ki omogočajo modifikacije posameznih nukleotidov, pri čemer se poveča talilna temperatura (T_m) sonde in specifičnost hibridizacije (Latorra in sod., 2003).

Metode na osnovi TaqMan kemije so pogosteje v uporabi za določanje viroidov (Boonham in sod., 2004; Botermans in sod., 2013; Luigi in Faggioli, 2011; Monger in sod., 2010; Mumford in sod., 2000) kot SYBR Green barvila (Parisi in sod., 2011; Rizza in sod., 2009). Uporaba več sond in različnih fluoroforov omogoča z RT-qPCR sočasno določanje več viroidov (ang. multiplex RT-qPCR, mRT-qPCR). Tarče za mRT-qPCR so lahko enakih velikosti, kar omogoča analizo večjega števila vzorcev, krajši čas analize in manjšo porabo reagentov, zaradi manjšega števila analiz (Lin in sod., 2013; Mumford in sod., 2000). Osman in sod. (2017) so razvili mRT-qPCR za

določanje HSVd (ang. hop stunt viroid), CEVd (ang. citrus exocortis viroid) in CBCVd (ang. citrus bark cracking viroid) v agrumih. Na hmelju so Seigner in sod. (2020) razvili RT-qPCR za sočasno določanje CBCVd in interne kontrole na osnovi mRNA mitohondrijskega gena nad5 (ang. NADH dehydrogenase subunit 5) (ang. duplex RT-qPCR, duRT-qPCR). Uporaba interne kontrole je pri RT-qPCR ključna, saj nam poda informacijo o kvaliteti izolirane RNA in kakovosti reagentov, hkrati pa se lahko uporabi tudi za kvantifikacijo tarče (Guček, 2020).

Pred kratkim smo Guček in sod. (2023) razvili RT-qPCR in mRT-qPCR za določanje viroidov HSVd, HLVd (ang. hop latent viroid) in CBCVd v hmelju. V okviru raziskave smo objavili nove začetne oligonukleotide (ZO) za določanje CBCVd in interne kontrole na osnovi endogenov mRNA1192 in mRNA170 odkritih v transkriptomu z viroidi okuženega hmelja (Pokorn, 2017). Plod tega dela je tudi razvita metoda duRT-qPCR za določanje CBCVd z uporabo interne kontrole mRNA1192, ki je v DL v uporabi za raziskave že od leta 2018 (interna oznaka MDL 12), vendar še ni bila v celoti validirana. ZO so bili testirani *in situ* in na 35 vzorcih različnih izolatov viroida CBCVd, HLVd, HSVd in CEVd. Nespecifično pomnoževanje ni bilo potrjeno. Analitična občutljivost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost so bile predhodno že testirane za ZO CBCVd (Guček in sod., 2023). Uporabljeni so bili ZO v kombinaciji z drugimi tarčami kot pri duRT-qPCR (MDL 12), kar ima lahko vpliv na rezultate validacije. Z MDL 12 smo v zadnjih petih letih v okviru raziskav prav tako testirali več kot 1000 vzorcev in nespecifičnega pomnoževanja nismo potrdili. Zato smo v okviru ocene tveganja odločili, da izvedemo analitično občutljivost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost.

Za validacijo metod, ki so v postopku akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 so na voljo EPPO smernice PM 7/98 (5) »Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity« (EPPO, 2021). Pri vsaki diagnostični metodi za določanje rastlinskih škodljivih organizmov je potrebno določiti analitično občutljivost, specifičnost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost (dodatno lahko tudi robustnost). V postopku akreditacije izbrane metode je potrebno izvesti oceno tveganja, identificirati katera merila uspešnosti morajo biti ocenjena in v kakšnem obsegu ter določiti obseg validacije (celotna, delna, verifikacija). Po izvedbi validacije se oceni ali laboratorij ustreza kriterijem določenim v validirani metodi. Če zahteve niso dosežene tudi po modifikaciji metode, laboratorij ne sme izvajati metode glede na uveljavljena merila uspešnosti (EPPO, 2021).

Z namenom širitve obsega akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 smo izvedli delno validacijo za diagnostično metodo MDL 12 z namenom, da zagotovimo objektivne dokaze, da je DL kompetenten za izvedbo metode MDL 12 in da se metoda v prihodnosti lahko vključi v obseg akreditacije.

2 MATERIAL IN METODE

Pri pregledu dosedanjih raziskav (Guček, 2020; Guček in sod., 2023) smo zbrali podatke o validaciji metode in izvedli oceno tveganja. V okviru analitične specifičnosti so bili predhodno začetni oligonukleotidi (ZO) (preglednica 1) (Guček, 2020; Guček in sod., 2023) že testirani z metodo RT-qPCR in mRT-qPCR. Dodatno smo metodo MDL 12 vključili tudi v med-laboratorijsko testiranje vzorcev hmelja in RNA (skupno 14 vzorcev), organizirano s strani Nacionalnega referenčnega laboratorija iz Češke republike.

2.1 Izolacija nukleinskih kislin

Celokupne nukleinske kisline (TNA) smo iz vzorcev hmelja izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). Uporabili smo 100 mg tkiva (listi hmelja), ki smo ga homogenizirali v terilnicah v prisotnosti CTAB pufra. Vzorce smo raztopili v 50 μ l TE pufra (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) in jih shranili pri -20 °C. Da bi preprečili vpliv inhibitorjev, smo pred analizo izolirano TNA 10-krat redčili v vodi brez RNaz (RNase-free Water, Sigma-Aldrich, ZDA).

V oceno analitične občutljivosti smo vključili tudi vzorce hmelja izolirane s komercialno dostopnim kompletom Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (SPT, Sigma-Aldrich, ZDA), po A-protokolu z manjšimi modifikacijami (Jakše in sod., 2015). Vzorce listov hmelja (100 mg) smo zdrobili z uporabo terilnice in priloženega pufra. Izolirano RNA smo shranili pri -70 °C. Pred analizo smo izolirano RNA 10-krat redčili v vodi brez RNaz, da bi preprečili vpliv inhibitorjev.

2.2 duRT-qPCR reakcija

Analizo duRT-qPCR smo izvedli s specifičnimi ZO in sondo za viroid CBCVd in interno kontrolo mRNA1192 (preglednica 1). Za analizo smo pripravili 20 in 40 \times koncentrirano mešanico ZO in sond (20 \times PP mRNA1192, 40 \times PP CBCVd; ang. primer-probe mix). Mešanico smo pripravili iz 100 μ M raztopin smernih (F) (4 μ l/ 8 μ l) in protismernih (R) (4 μ l/ 8 μ l) ZO ter sonde (P) (4 μ l/ 8 μ l), ki smo jim do 100 μ l dodali vodo. Za viroid CBCVd smo uporabili končno koncentracijo 300 nM ZO in za sonde 150 nM. Uporabili smo LNA-sonde z reporterskimi barvili (CBCVd s FAM, mRNA1192 s HEX) in dušilcem BHQ1 (preglednica 1). Za pozitivno kontrolo reakcije duRT-qPCR smo uporabili referenčne vzorce hmelja okuženega s CBCVd in umetno sintetizirano cDNA zaporedje (gBlocks) viroida CBCVd (pristopna številka KM211546; podatkovna zbirka GenBank, NCBI) (PAC) (Guček in sod., 2023), kot negativne kontrole pa zdrave rastline (BVV hmelj) in vodo (NAC, negativna kontrola reakcije). Načrtovana zaporedja ZO, sonde in gBlocks nam je sintetiziralo podjetje IDT (Integrated DNA Technologies, ZDA).

Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za CBCVd in mRNA1192 za MDL 12.

ZO/sonda*	Zaporedje 5'-3'**	Dolžina produkta [bp]	Barvilo	Dušilec	Vir
CBCVdq-F6	GAGGGAACATACCTG AAGAGGGA	88	FAM	BHQ1	Guček in sod., 2023
CBCVdq-R6	GGTGCTGGACGCCAG				
CBCVdq-P1	CCGGG+GAAATC+TCT TCA+GACTC+GTC				
mRNA1192_F1	GGTAGCAACACCCTT CTTCTACTT	96	HEX	BHQ1	Guček in sod., 2023
mRNA1192_R1S	ACCCGACTTTCCTCTA CTTTG				
mRNA1192_PL	CACAAAC+TCAACC+T CTT+AGCACTTG				

*F, smerni ZO; R, protismerni ZO; P, sonda

**modificirani nukleotidi pri LNA-sondah so označeni s + (pred nukleotidom)

Reakcijo duRT-qPCR smo izvedli z dvema kompletoma reagentov SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline, Meridian Bioscience) v kombinaciji z MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, TFS) in AgPath-ID™ One Step RT-PCR (TFS).

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice in programi pomnoževanja duRT-qPCR s kompletom reagentov SensiFast (Bioline) in AgPATH (TFS).

SensiFast		AgPATH	
Komponenta*	V [μL]	Komponenta*	V [μL]
H ₂ O	1,65	H ₂ O	1,35
2x Pufer	5	2x Pufer	5
40 x PP CBCVd	0,5	40 x PP CBCVd	0,5
20x PP mRNA1192	0,75	20x PP mRNA1192	0,75
RT-encim	0,1	RT-encim	0,4
vzorec (TNA/RNA)	2	vzorec (TNA/RNA)	2
Volumen reakcije	10	Volumen reakcije	10

Program pomnoževanja

45 °C 10 min

47 °C 10 min

95 °C 2 min

95 °C 5 min

95 °C 15 s 40 ciklov

95 °C 15 s 40 ciklov

60 °C 30 s

60 °C 30 s

*H₂O, sterilna voda brez nukleaz iz kompleta reagentov, Pufer, mešanica reagentov za qPCR iz kompleta reagentov; PP, mešanica ZO in sonde; RT-encim, encim reverzna transkriptaza iz kompleta reagentov, v primeru uporabe kompleta SensiFAST™ je bil uporabljen encim MultiScribe Reverse Transcriptase

Sestava reakcijske mešanice in program pomnoževanja (preglednica 2) sta bila podana za vsak komplet reagentov ločeno. Vzorce smo analizirali z reakcijami v enem koraku, v dveh tehničnih ponovitvah na ploščah za 96 vzorcev z detekcijskim sistemom LightCycler96 (Roche) in programom LightCycler96 Software 1.1.0.1320.

2.3 Validacija metode

2.3.1 Analitična občutljivost in selektivnost

Določanje analitične občutljivosti in selektivnosti smo izvedli hkrati na istem setu vzorcev z dvema kompletoma reagentov (SensiFast in AgPATH). Analitično občutljivost za duRT-qPCR smo določili iz serije redčitev (10^0 do 10^{-10}) šestih vzorcev okuženih s CBCVd. Za analizo smo izbrali vzorce odvzete v okviru sistematičnih pregledov hmeljišč iz okuženih rastlin (CBCVd in HLVd) sort Aurora, Bobek, Celeia, ter biolistično okuženega hmelja (CBCVd, sorta Celeia), na katerih smo izvedli dva načina izolacije nukleinskih kislin (CTAB in SPT). V analizo smo vključili tudi umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd (gBlocks). Program na detekcijskem sistemu LightCycler96 nam je samodejno izrisal standardno krivuljo serije redčitev, iz katere smo dobili podatke o vrednosti naklona krivulje in o koeficientu linearne regresije (R^2). Učinkovitost pomnoževanja vzorcev v reakciji duRT-qPCR smo določili s pomočjo vrednosti naklona umeritvene krivulje (enačba 1), kjer E pomeni učinkovitost pomnoževanja, ki je 100 %, če je naklon -3,32 in $E = 1$. Iz R^2 smo ugotovili, kako dobro se vrednosti meritev prilegajo krivulji linearne regresije, če je $R^2 = 1$, to pomeni 100 % prileganje (Pfaffl, 2001).

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{naklon}}\right)}$$
$$E(\%) = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{naklon}}\right)} - 1\right) \times 100 \quad (1)$$

Dodatno smo za analizo občutljivosti, glede na rezultate serije redčitev šestih vzorcev, testirali osem vzorcev pri minimalni redčitvi (10^{-4} in 10^{-5}). Pri čemer minimalna redčitev pomeni zadnjo oziroma najmanjšo redčitev, pri kateri še dobimo pozitiven rezultat. V analizo smo vključili vzorce z različnimi kombinacijami viroidov (CBCVd, CBCVd+HLVd, CBCVd+HSVd) in različnim načinom okužbe (naravno, mehansko, biolistično). V primeru kombinacije CBCVd in HSVd smo vzorec pripravili sami iz RNA ekstraktov (razmerje 1:1). Na osnovi serije redčitev in testiranja vzorcev pri minimalni redčitvi smo določili mejo detekcije (LOD), to je bila redčitev oziroma koncentracija, pri kateri smo v več kot 50 % izvedenih poskusov še lahko določili viroid (Boben, 2006). Koncentracijo, pri kateri smo lahko viroide zaznali v 100 % poskusov, smo določili kot mejo kvantifikacije (LOQ, ang. Limit of quantification) glede na rezultate testiranja vzorcev pri minimalni redčitvi. LOD in LOQ smo definirali kot število molekul viroida v vzorcu, ki smo jih izračunali glede na koncentracijo po Olmos in sod. (2005). Na osnovi vseh rezultatov analize občutljivosti smo določili mejno vrednost. Izračunali smo jo iz povprečja zadnje pozitivne Cq-vrednosti (najvišji Cq), ki smo ji dodali 0,5 cikla (Dreo, 2013). Iz mejne vrednosti smo lahko

določili občutljivost reakcij, ki smo jo primerjali z RT-qPCR za določanje viroida CBCVd (rezultati predhodnih raziskav; Guček, 2020).

2.3.2 Ponovljivost in obnovljivost

Za validacijo ponovljivosti in obnovljivosti smo duRT-qPCR analizo izvedli s štirimi analitiki (AN1-4), dvema kompletoma reagentov (SensiFast in AgPATH) v treh dneh. Analizo smo izvedli v treh ločenih dneh z namenom določitve vpliva različnih časovnih točk na ponovljivost testiranja. Za set sedmih vzorcev hmelja (CBCVd, CBCVd+HLVd, BVV) smo izvedli izolacijo nukleinskih kislin s CTAB reagentom za vsakega analitika. Za vsak vzorec smo z duRT-qPCR testirali dve redčitvi vzorcev (10^{-1} in 10^{-3}) in dve tehnični ponovitvi ter skupno analizirali 30 vzorcev na analitika na komplet reagentov.

Za ponovljivost in obnovljivost smo izvedli 12 ločenih analiz v treh dneh s štirimi analitiki (preglednica 3). V okviru ponovljivosti smo vzorce testirali v istem dnevu (1. dan) v dveh ločenih reakcijah, od tega smo na eni plošči vzorce ponovili dvakrat, torej tri analize za en komplet reagentov v enem dnevu z dvema analitikoma in enim inštrumentom. Poleg rezultatov ponovljivosti smo za analizo obnovljivosti testirali vzorce še v dveh ločenih dnevih, skupaj torej dvanajst analiz. Vsi analitiki niso izvedli enakega števila analiz, ker smo se zaradi velikega števila vzorcev omejili na izvedbo iste analize v enem dnevu z enim kompletom reagentov samo z enim analitikom. Analizo smo ovrednotili z izračunom koeficienta variance (CV [%] = $(SD/Cq) \cdot 100$) iz povprečja standardnih deviacij (SD) in Cq-vrednosti, glede na Osman in sod. (2017).

Preglednica 6: Seznam analitikov (AN1-4) za testiranje ponovljivosti in obnovljivosti glede na dan duRT-qPCR analize in komplet reagentov (SensiFast in AgPATH).

Komplet reagentov/ dan	1. dan*	2. dan	3. dan
SensiFast	AN1, 2x AN2	AN1, AN3	AN4
AgPATH	2x AN1, AN2	AN3, AN4	AN2

*2x, testiranje istega seta vzorcev v 2 ponovitvah

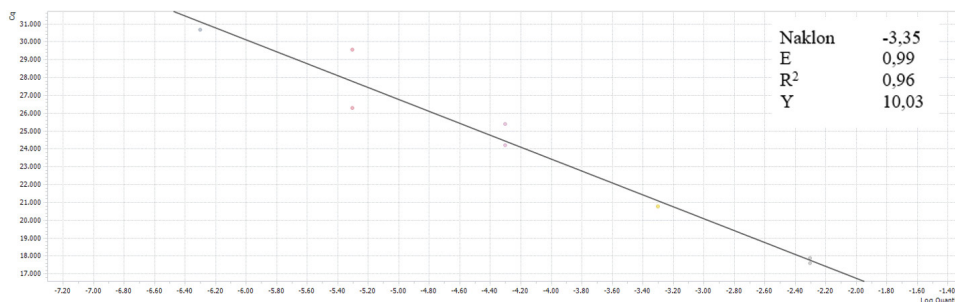
2.4 Med-laboratorijska primerjava

V validacijo metode MDL 12 smo vključili tudi vzorce hmelja in RNA vključene v med-laboratorijsko testiranje organizirano s strani NRL iz Češke republike. V testiranje je bilo vključeno 6 vzorcev liofiliziranega hmelja in 8 vzorcev RNA ekstraktov. V okviru med-laboratorijske primerjave smo v vzorcih določali prisotnost viroida CBCVd z akreditirano metodo RT-PCR (MDL 10), metodo duRT-qPCR (MDL 12) in metodo mRT-qPCR (MDL 13). Iz vzorcev liofiliziranega hmelja smo izvedli izolacijo nukleinskih kislin s CTAB reagentom kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017) v dveh ponovitvah na vzorec. Za duRT-qPCR analizo smo vse vzorce redčili 10-krat, da bi se izognili inhibiciji qPCR reakcije. Analizo smo izvedli z uporabo SensiFast kompleta reagentov v dveh tehničnih ponovitvah.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Analitična občutljivost in selektivnost

Pri testiranju analitične občutljivosti in selektivnosti smo z obema kompletoma reagentov dobili primerljive rezultate. Učinkovitost pomnoževanja (E) standardne krivulje za gBlocks vzorec je bila za SensiFast komplet reagentov 99 % (slika 1), za AgPATH kit pa 118 %, kar ustreza sprejemljivim vrednostim za sočasno določanje več tarč (80 do 120 %) (preglednica 4). Pri sočasnem določanju več tarč je namreč sprejemljiva nižja/višja E kot pri RT-qPCR (90-110 %) (Broeders in sod., 2014).



Slika 3: Standardna krivulja za duRT-qPCR s kompletom SensiFast za vzorec gBlocks CBCVd. Za krivuljo viroida CBCVd so podani naklon, učinkovitost pomnoževanja (E), napaka, R² in Y.

Pri analizi vzorcev umetno sintetiziranega linearnega zaporedja gBlocks smo pri obeh kompletih reagentov viroid CBCVd določili do redčitve 10⁻⁷. Vse rezultate smo primerjali z RT-qPCR za CBCVd (Guček, 2020) in potrdili, da se občutljivost pri sočasnem določanju dveh tarč (CBCVd, mRNA1192) zmanjša 10-krat (preglednica 4).

Mejo detekcije oziroma zadnjo pozitivno redčitev, pri kateri v več kot 50 % izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal, smo za duRT-qPCR določili iz RNA ekstraktov hmelja okuženega s CBCVd na seriji redčitev petih vzorcev (preglednica 5). Ker je v primeru gBlocks vzorca umetno sintetizirano cDNA zaporedje viroida CBCVd in ne nativne RNA rezultatov, za LOD in LOQ rezultatov gBlocks nismo upoštevali. Glede na serijo redčitev smo dobili pri RNA pozitivne rezultate za vse vzorce do redčitve 10⁻⁵ kar je 5 pg RNA, kar smo določili kot LOD (preglednica 5). Mejo kvantifikacije (LOQ) oziroma zadnjo pozitivno redčitev, pri kateri v 100% izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal, smo določili pri redčitvi 10⁻⁴, kar je 50 pg RNA. Pri testiranju osmih vzorcev pri minimalni redčitvi (10⁻⁵ in 10⁻⁴) smo namreč pozitivne signale v primeru vseh vzorcev dobili samo pri redčitvi 10⁻⁴. Občutljivost vzorcev RNA izolirane iz hmelja smo primerjali tudi z metodo RT-qPCR in enako kot pri gBlocks dobili 10-krat nižjo LOD, medtem ko se LOQ ni spremenila (preglednica 5). LOD smo definirali kot število molekul viroida v vzorcu, ki smo jih izračunali glede na koncentracijo po Olmos in sod. (2005). V primeru mRNA1192 smo z obema kompletoma reagentov določili LOD in LOQ do enake redčitve kot za CBCVd. Na osnovi rezultatov serij

redčitev smo določili mejno vrednost ($Cq^{cut\ off}$). Izračunali smo jo iz povprečja zadnje pozitivne Cq -vrednosti (najvišji Cq), ki smo ji dodali 0,5 cikla (Dreo, 2013) in jo za CBCVd določili pri 31,2 za SensiFast in pri 33,7 za AgPATH komplet reagentov (preglednica 5). Pri AgPATH smo pri vseh vzorcih dobili višje Cq -vrednosti kot pri SensiFast kompletu, zato je posledično višja tudi mejna vrednost.

Preglednica 7: Določitev občutljivosti duRT-qPCR za sočasno določanje CBCVd in mRNA1192 s SensiFast in AgPATH kompletom reagentov in RT-qPCR za določanje CBCVd in v vzorcih gBlocks CBCVd. Za vzorce je podana redčitev, Cq -vrednost, naklon, R^2 in učinkovitost pomnoževanja standardne krivulje (E).

Reakcija*	Reagent	CBCVd				
		redčitev	Cq	naklon	R^2	E (%)
duRT-qPCR	SensiFast	10^{-7}	30,67	-3,35	0,96	99
duRT-qPCR	AgPATH	10^{-7}	31,49	-2,95	0,96	118
RT-qPCR	SensiFast	10^{-8}	34,44	-3,40	0,98	97

* RT-qPCR, pomnožitev CBCVd s SensiFast kompletom reagentov (Guček, 2020); duRT-qPCR, pomnožitev CBCVd in mRNA1192 s SensiFast kompletom reagentov, duRT-qPCR AgPATH, pomnožitev CBCVd in mRNA1192 z AgPATH kompletom reagentov; vzorec gBlocks, umetno sintetizirano zaporedje cDNA CBCVd viroida; redčitev, zadnja redčitev, pri kateri še dobimo pozitiven signal; Cq , zadnja Cq -vrednost, pri kateri še dobimo pozitiven rezultat; naklon, vrednost naklona standardne krivulje; R^2 , kvadratni koeficient linearne regresije; E, učinkovitost pomnoževanja izražena v odstotkih.

V okviru občutljivosti smo hkrati testirali tudi selektivnost metode in viroid CBCVd uspešno določili ne glede na kombinacijo viroidov (samo CBCVd, CBCVd+HLVd, CBCVd+HSVd), način okužbe (mehansko, naravno, biolistično), sorto (Celeia, Bobek, Aurora) ali način izolacije (CTAB, SPT).

Preglednica 8: Določitev občutljivosti reakcij RT-qPCR za določanje CBCVd in duRT-qPCR za sočasno določanje CBCVd in mRNA1192 v vzorcih RNA izolirane iz hmelja okuženega s CBCVd z metodo CTAB in SPT. Za vzorce je podana LOD, LOQ, koncentracija, število molekul in mejna vrednost ($Cq^{cut\ off}$).

Reakcija*	Reagent	CBCVd				
		LOD	LOQ	Konc.	Št. molekul	$Cq^{cut\ off}$
duRT-qPCR	SensiFast	10^{-5}	10^{-4}	5 pg	$9 \cdot 10^7$	31,2
duRT-qPCR	AgPATH	10^{-5}	10^{-4}	5 pg	$9 \cdot 10^7$	33,7
RT-qPCR	SensiFast	10^{-6}	10^{-6}	0,5 pg	$9 \cdot 10^6$	34,1

*LOD, meja detekcije oziroma zadnja pozitivna redčitev, pri kateri v več kot 50 % izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal; LOQ, meja kvantifikacije oziroma zadnja pozitivna redčitev pri kateri v 100% izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal; konc, koncentracija, ki jo še lahko določimo in je enaka LOD; št. molekul, število molekul pri dani koncentraciji; $Cq^{cut\ off}$, mejna vrednost, nad katero so vzorci negativni.

S primerjavo obeh metod izolacij (CTAB, SPT) smo dobili enake LOD in LOQ, kar pomeni, da metoda izolacije RNA na rezultate občutljivosti ni imela vpliva. Glede na to, da smo v analizo vključili različne kombinacije viroidov, smo hkrati izvedli tudi dodatno analizo specifičnosti in ponovno potrdili, da so ZO v kombinaciji z LNA sondami specifični, ker nespecifičnega pomnoževanja pri testiranju občutljivosti nismo zaznali.

3.2 Ponovljivost in obnovljivost

Rezultati analize ponovljivosti in obnovljivosti metode duRT-qPCR so bili primerljivi v enakih in različnih časovnih točkah, med analitiki in kompleti reagentov. Skupno smo izvedli 12 analiz na 360 vzorcih. Pri vseh analizah smo dobili ustrezne rezultate in vse vzorce določili s 100 % natančnostjo. V primeru AgPATH kompleta reagentov smo dobili glede na SensiFast komplet višje Cq-vrednosti pri testiranju istih vzorcev. Prav tako smo v primeru uporabe AgPATH kompleta reagentov v vzorcih zdravega hmelja in negativnih kontrolah pri testiranju ponovljivosti dobili smo Cq-vrednosti okrog 34, kar je nad mejno vrednostjo $Cq^{cut\ off}$, zato smo vzorce potrdili kot negativne.

Vzorci, testirane v okviru ponovljivosti in obnovljivosti, smo analizirali z izračunom koeficienta variance (CV [%]) glede na Osman in sod. (2017). CV vrednosti za SensiFast in AgPATH komplet reagentov so bile zelo primerljive in ustrezne glede na predhodne raziskave (Osman in sod., 2017), zato smo kot primer v preglednici 6 podali samo rezultate za SensiFast. V povprečju smo za vse analitike za SensiFast komplet reagentov dobili CV od 0,39 do 2,34 % (preglednica 6). V primeru AgPATH kompleta reagentov smo dobili primerljive povprečne CV vrednosti od 0,31 do 2,85 % (rezultati niso prikazani). Med CV vrednostmi za viroid CBCVd ali interno kontrolo mRNA1192 ni bilo razlik. Glede na večjo stabilnost interne kontrole v vzorcih smo pričakovali nižje vrednosti CV za mRNA1192. Najmanjša varianca je bila pri ponovitvah istega analitika na isti ploščici v eni reakciji za viroid CBCVd (AN2). Najvišjo varianco smo dobili pri primerjavi vseh analitikov v skupno šestih analizah na posamezen komplet reagentov. Rezultati so pričakovani, saj isti analitik znotraj iste analize naredi manjšo napako kot pa štirje različni analitiki v različnih časovnih točkah, če jih primerjamo med seboj. Prav tako je varianca večja, ker smo primerjali vzorce, ki so jih analitiki sami izolirali, kar pomeni, da je zaradi variabilnosti med izolacijo lahko prišlo do večjih odstopanj pri Cq-vrednostih. Med različnimi časovnimi okvirji analiz izvedenih v treh dneh je bila CV vrednost med 0,86 in 1,34 % za SensiFast komplet in med 0,35 in 0,94 % za AgPATH komplet. Na rezultate ponovljivosti prav tako ni imela vpliva kombinacija viroidov (CBCVd, CBCVd+HLVd) ali redčitev vzorcev. Iz rezultatov nizkih CV vrednosti lahko sklepamo, da je metoda zelo ponovljiva in obnovljiva tako med različnimi analitiki, kot tudi v različnih časovnih okvirjih (preglednica 6).

Preglednica 9: Določitev koeficienta variance CV [%] za ponovljivost in obnovljivost duRT-qPCR reakcije pri uporabi SensiFast kompleta reagentov. Podan je CV izračunan za CBCVd in mRNA1192 med vsemi analitiki, za analitika 1 in 2, prvi dan in drugi dan izvajanja analiz.

Vzorec	CV[%] CBCVd*					CV[%] mRNA1192				
	vs AN	AN1	AN2	1. dan	2. dan	vs AN	AN1	AN2	1. dan	2. dan
CBCVd+	0,91	1,55	0,03	0,57	0,81	1,15	1,27	0,11	1,30	1,09
CBCVd+	1,51	1,41	0,09	0,20	1,54	1,01	0,60	0,39	0,39	0,81
CBCVd+	1,10	0,84	0,21	0,21	0,51	0,65	0,33	0,70	0,60	1,21
CBCVd+	1,17	1,09	0,20	1,16	0,93	0,95	0,57	0,53	0,84	0,22
CBCVd+HLVd	1,91	1,21	0,30	0,87	0,23	2,30	0,07	3,88	2,94	2,81
CBCVd+HLVd	2,37	1,07	0,52	1,20	0,07	1,17	0,36	0,33	0,68	0,62
CBCVd+HLVd	1,76	1,75	0,08	0,23	1,15	1,07	0,62	0,07	1,08	0,29
CBCVd+HLVd	2,45	0,92	0,05	2,12	2,19	0,53	0,62	0,20	0,62	0,25
PIC1= CBCVd	7,67	2,80	0,13	0,55	5,82	4,58	2,43	0,07	0,42	4,94
NIC1= BVV	-	-	-	-	-	3,32	0,07	0,74	0,66	2,01
PAC1= CBCVd	1,60	1,67	1,64	1,34	0,69	2,09	0,82	5,02	3,85	0,74
PAC2=gBlocks CBCVd	3,32	0,88	1,02	0,99	0,18	-	-	-	-	-
NAC1= BVV	-	-	-	-	-	0,63	0,18	0,37	0,33	1,10
POVPREČJE CV [%]	2,34	1,38	0,39	0,86	1,28	1,62	0,66	1,03	1,14	1,34

*CV, koeficient variance; AN, analitik; PIC1, pozitivna kontrola izolacije; NIC1, negativna kontrola izolacije; BVV, vzorec hmelja brez virusov in viroidov; PAC1, pozitivna kontrola amplifikacije; PAC2, pozitivna kontrola amplifikacije umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd; NAC1= negativna kontrola amplifikacije

3.3 Med-laboratorijska primerjava

Rezultati med-laboratorijske primerjave so podani v preglednici 7. V primeru liofiliziranega rastlinskega tkiva (Plant) smo CBCVd potrdili pri dveh od šestih vzorcev, v primeru RNA ekstraktov (RNA) pa pri dveh od osmih vzorcev. Rezultati so bili primerljivi tako z metodo RT-PCR (MDL 10) in mRT-qPCR (MDL 13). Glede na analizo rezultatov organizatorja med-laboratorijske primerjave smo bili pri določitvi viroida CBCVd 100 % uspešni.

Preglednica 10: Rezultati duRT-qPCR za vzorce med-laboratorijske primerjave. Podane so Cq-vrednosti za CBCVd in mRNA1192. Vzorci, v katerih je CBCVd prisoten, so obarvani sivo.

Vzorec*	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Rezultat CBCVd
2023 Plant 1	-	17,82	ni prisoten
2023 Plant 2	10,54	17,14	prisoten
2023 Plant 3	-	17,71	ni prisoten
2023 Plant 4	10,06	17,43	prisoten
2023 Plant 5	-	17,44	ni prisoten
2023 Plant 6	-	17,36	ni prisoten
2023 RNA1	-	24,97	ni prisoten
2023 RNA2	-	24,72	ni prisoten
2023 RNA3	14,64	25,19	prisoten
2023 RNA4	-	24,84	ni prisoten
2023 RNA 5	-	24,88	ni prisoten
2023 RNA 6	-	24,49	ni prisoten
2023 RNA 7	14,66	25,19	prisoten
2023 RNA 8	-	24,59	ni prisoten
PAC hmelj CBCVd	13,36	15,19	prisoten
PAC gBlocks CBCVd	9,99	-	prisoten
BVV	-	19,34	ni prisoten
NAC	-	-	ni prisoten

*PAC, pozitivna kontrola amplifikacije; BVV, vzorec hmelja brez virusov in viroidov; NAC, negativna kontrola kvantifikacije; Cq-vrednost, povprečje dveh tehničnih ponovitev

4 ZAKLJUČEK

Zagotavljanje zanesljivosti rezultatov je ključnega pomena pri analizi prisotnosti patogenov v rastlinskih vzorcih. Nepravilna določitev rezultata lahko povzroči negativne posledice, ki se lahko kažejo v neizvajanju ustreznih ukrepov in posledično gospodarski škodi. V primeru rastlinske diagnostike je zato ključna uporaba zanesljivih, občutljivih, neselektivnih in ponovljivih metod, ki so hkrati hitre in cenovno ugodne. V primeru vzpostavitve sistema kakovosti v skladu s standardom ISO/IEC 17025:2017 in pridobitve akreditacije se upoštevajo in sproti odpravljajo vsa tveganja, ki bi lahko povzročila nepravilne rezultate analiz. Pri vpeljavi metode v sistem kakovosti in obseg akreditacije je validacija metode ključnega pomena. Validacija namreč zagotavlja objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo validirane metode v skladu z določenimi merili uspešnosti. Dodatno je za ohranjanje kompetentnosti pomembno tudi sodelovanje v med-laboratorijskih primerjavah.

Z delno validacijo diagnostične metode za sočasno določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192 z duRT-qPCR smo določili analitično občutljivost (LOD pri 5 pg in LOQ pri 50 pg RNA), selektivnost (različne sorte, načini okužbe, izolacije, kombinacije viroidov), ponovljivost in obnovljivosti (12 analiz, 360 vzorcev, 100 % natančnost). Pri validaciji smo boljše rezultate, tako pri določanju občutljivosti, kot tudi ponovljivosti in obnovljivosti, dobili pri uporabi SensiFast kompleta reagentov,

ki predstavlja optimalno izbiro za določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192. AgPATH komplet reagentov predstavlja alternativo vendar se priporoča uporaba samo v primeru, ko uporaba SensiFast kompleta reagentov res ni mogoča (npr. dobava...). Validacijo smo izvedli z AgPATH kompletom zaradi testiranja najboljše možne alternative, ki pa naj ne bo optimalna izbira.

Metoda MDL 12 glede na trenutno akreditirano metodo RT-PCR za določanje viroida CBCVd (MDL 10), omogoča določanje viroida CBCVd z večjo občutljivostjo, manj možnostmi za kontaminacijo (ni agaroznega gela), hkrati pa omogoča tudi kvantifikacijo. Metoda duRT-qPCR je v DL v uporabi od leta 2018 in se uporablja predvsem za raziskovalne namene v okviru epidemioloških študij CBCVd (analize vode, tal, hmelj in ostale rastline). V tem obdobju je bila MDL 12 vključena tudi v medlaboratorijska testiranja. Kot zadnjega smo izvedli v oktobru 2023 z NRL iz Češke Republike, kjer smo dobili enake rezultate, kot pri uporabi že akreditirane metode RT-PCR in mRT-qPCR in bili 100 % uspešni. Glede na vse izvedene analize in rezultate validacije z duRT-qPCR za določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192 (MDL 12) lahko sklepamo, da je metoda ustrezno validirana in primerna za tudi za uporabo pri analizah uradnih vzorcev, kjer se zahtevajo akreditirane metode.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077) in Upravi za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin RS (Program strokovnih nalog zdravstvenega varstva rastlin na IHPS). Zahvala za uspešno tehnično izvedbo gre osebju DL: Mariji Grašinar Ašenberger, Silviji Žgajner in Maji Dobrajc.

5 VIRI

- Boben J. 2006. Kvalitativno in kvantitativno določanje rastlinskih virusov z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 122 str.
- Boonham N., Pérez L.G., Mendez M.S., Peralta E.L., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116: 139-146
- Botermans M., van de Vossen B.T., Verhoeven J.T., Roenhorst J.W., Hooftman M., Dekter R., Meekes E.T. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43-50
- Broeders, S., I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens, and D. Morisset. 2014. "Guidelines for Validation of Qualitative Real-Time PCR Methods." *Trends in Food Science and Technology* 37 (2): 115-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>.
- Dreo, T. 2013. "Determination of LOD and Cycle Cut-off in Real-Time PCR Detecting Culturable and Non-Culturable Target Organisms." In *EPPO Workshop on Setting Ct Cut-off Values for Real-Time PCR, 11th-12th November 2013*, 19.
- EPPO. PM 7/98 (5). 2015. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *Bulletion OEPP/EPPO Bulletin*; 51 (3): 468-498.

- Guček, T. 2020. Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju : doktorska disertacija = Biology of citrus bark cracking viroid (CBCVd) and development of methods for detection of viroids in hop : doctoral dissertation. Ljubljana: [T. Guček], XIV, 139 str., [33] str. pril., ilustr. <https://repositorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=121584>.
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2023. Optimization and validation of singleplex and multiplex RT-qPCR for detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd), hop latent viroid (HLVd), and hop stunt viroid (HSVd) in hops (*Humulus lupulus* L.). *Plant Disease*, 10.1094/PDIS-11-22-2606-RE
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. 2015. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64: 831-842
- Kump B., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149-158
- Latorra D., Arar K., Michael Hurley J. 2003. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Molecular and Cellular Probes*, 17: 253-259
- Lin L., Li R., Bateman M., Mock R., Kinard G. 2013. Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 797-804
- Luigi M., Faggioli F. 2011. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 109-116
- Monger W., Tomlinson J., Boonham N., Marn M.V., Plesko I.M., Molinero-Demilly V., Tassus X., Meeke E., Toonen M., Papayiannis L., Perez-Egusquiza Z., Mehle N., Jansen C., Nielsen S.L. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207-210
- Mumford R.A., Walsh K., Boonham N. 2000. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 431-435
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151-155
- Osman F., Dang T., Bodaghi S., Vidalakis G. 2017. One-step multiplex RT-qPCR detects three citrus viroids from different genera in a wide range of hosts. *Journal of Virological Methods*, 245: 40-52
- Parisi O., Lepoivre P., Jijakli M. 2011. Development of a Quick Quantitative Real-Time PCR for the In Vivo Detection and Quantification of Peach latent mosaic viroid. *Plant Disease*, 95: 137-142
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45: 22 str.
- Pokorn T. 2017. Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.), doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 159 str.
- Rizza S., Nobile G., Tessitori M., Catara A., Conte E. 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. *Plant Pathology*, 58: 181-185
- Seigner L., Liebrecht M., Keckel L., Einberger K., Absmeier C. 2020. Real-time RT-PCR detection of Citrus bark cracking viroid (CBCVd) in hops including an mRNA-based internal positive control. *Journal of Plant Diseases and Protection*, doi: 10.1007/s41348-020-00317-x: 5 str.
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159

OCENA STABILNOSTI IN DEKONTAMINACIJE HMELJEVIH VIROIDOV V LABORATORIJSKIH POGOJIH

Helena VOLK¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 23. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 21. 11. 2023

Izvleček

Viroidi so najpreprostejši rastlinski patogeni. Te majhne, nekodirajoče, enovijačne RNA molekule tvorijo značilne sekundarne strukture, kar jim omogoča stabilnost na okoljske razmere in preživetje izven gostitelja. To lahko povzroča težave v diagnostičnih in raziskovalnih laboratorijih, saj kontaminirajo opremo in zmanjšujejo diagnostično natančnost. V predstavljeni raziskavi smo preučevali stabilnost treh viroidov hmelja CBCVd, HLVd in HSVd v različnih pogojih, ki se uporabljajo v laboratorijih: UV obsevanje, avtoklaviranje, pomivanje z detergentom in kemijska dekontaminacija z Na-hipokloritom. V raziskavo smo vključili tudi plazmide z DNA vključki, ki kodirajo te viroide. Ugotovili smo, da se je kot najučinkovitejša metoda izkazalo tretiranje z Na-hipokloritom, kljub temu pa, za uspešno izogibanje težavam s kontaminacijo laboratorija z (viroidnimi) nukleinskimi kislinami, priporočamo uporabo kombinacije preučevanih metod in dosledno ločevanje opreme, ki je uporabljena za pripravo vzorcev in opreme, ki je uporabljena za detekcijo viroidov.

Ključne besede: viroid, CBCVd, HLVd, HSVd, PCR, kontaminacija

ASSESSING THE STABILITY AND DECONTAMINATION OF HOP VIROIDS IN LABORATORY CONDITIONS

Abstract

Viroids are the simplest plant pathogens. These small, non-coding, single-stranded RNA molecules form distinctive secondary structures, granting them stability in environmental conditions and survival outside their host. This can pose challenges in diagnostic and research laboratories, as they contaminate equipment and reduce diagnostic accuracy. In the presented study, the stability of three hop viroids CBCVd, HLVd, and HSVd was examined under various conditions used in laboratories: UV irradiation, autoclaving, washing with detergent, and chemical decontamination with Na-hypochlorite. We also included plasmids with DNA constructs that encode these viroids. We found that the most effective method was treatment with Na-hypochlorite. However, to successfully avoid laboratory contamination with (viroidal) nucleic acids, we recommend using a combination of the studied methods

¹ Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, e-naslov: helena.volk@bf.uni-lj.si

and consistently separating equipment used for sample preparation from that used for viroid detection.

Keywords: viroid, CBCVd, HLVd, HSVd, PCR, contamination

1 UVOD

Odkar so viroide leta 1971 prvič identificirali, jih prepoznavamo kot najpreprostejše rastlinske patogene (Hadidi in sod., 2017). Viroidi so majhne, enovijačne RNA molekule, ki, z razliko od virusov, ne kodirajo peptidov ali proteinov (Flores in sod., 2005). A kljub temu, so viroidi sposobni podvajanja znotraj gostiteljske rastline in zmorejo zaobiti njene obrambne mehanizme (Darós, 2016).

Na hmelju so do sedaj identificirali štiri viroide: hmeljev latentni viroid (HLVd), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), viroid grbavosti jabolk (AFCVd) in viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd), vsi pa so uvrščeni v družino Pospiviroidae. HLVd so prvič potrdili leta 1988 (Puchta in sod., 1988). Njegovo hitro širjenje omogoča vegetativno razmnoževanje hmelja, okužene rastline pa pogosto ne kažejo simptomov. Posledično je postal globalno najpogostejši viroid na hmeljiščih (Hadidi in sod., 2003). HSVd so prvič opazili v 1940-ih letih na Japonskem (Shikata, 1987). Za razliko od HLVd, HSVd ni globalno razširjen, zaenkrat je bil potrjen le v ZDA (Eastwell in Nelson, 2007), na Kitajskem (Guo in sod., 2008), v Južni Koreji (Cho in sod., 2011), v Sloveniji (Radišek in sod., 2012) in v Nemčiji (Seigner in sod., 2014). Okužba s HSVd vodi do manjših storžkov hmelja, zmanjšanih pridelkov in manj rastlinskih metabolitov. Različne sorte kažejo različne občutljivosti na HSVd, izražanje simptomov pa je lahko odvisno od vremenskih razmer (Mahaffee in sod., 2009). CBCVd lahko okuži tako agrume kot hmelj (Jakše in sod., 2015) in pistacijo (Al Rwahnih in sod., 2018). V Sloveniji, kjer njegovo hitro širjenje predstavlja grožnjo za hmelj, je bilo v letih 2018 in 2019 izkoreninjenih 135 hektarjev slovenskih hmeljišč. Kljub strogim ukrepom eradikacije, so v letu 2020 na nekaterih rastlinah hmelja (povprečno pri 0,09 %) CBCVd zaznali še v hmeljiščih pri 25 kmetijah (Update ..., 2021).

Viroidi se prenašajo mehansko, prek okuženih vegetativnih poganjkov, semen, peloda, orodja in stika med rastlinami ter posredno prek žuželk (Verhoeven in sod., 2010; Matsushita in Tsuda, 2014). V praksi se za zatiranje viroidov uporabljajo fitosanitarni ukrepi, kot so: uporaba certificiranega sadilnega materiala, identifikacija, temeljita dezinfekcija orodja in odstranjevanje okuženih rastlin (Agrios in sod., 1997). Slednje je pri okužbah s CBCVd problematično, saj se bolezenska znamenja izrazijo šele eno leto po okužbi in tako prvo leto predstavljajo vir mehanskega prenosa (Radišek in sod., 2020).

Značilna sekundarna struktura viroidov, majhna velikost in pomanjkanje proteinskega ovoja prispevajo k stabilnosti in odpornosti na okoljske razmere in tako se lahko izven gostitelja ohranijo različna daljša časovna obdobja. Stabilnost viroidov so preučevali na primeru viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev

(PSTVd) in pokazali, da ohrani svojo infektivnost tudi po 24 urah od nanosa na različne površine, kot so bombaž, les, guma, usnje, kovina, plastika. Zanimivo je, da je, z razliko od dolge infektivnosti na površinah, PSTVd na človeški koži ostal infektiven zgolj 30 min (Mackie in sod., 2015) do 2 uri (Verhoeven in sod., 2010). To je najverjetneje posledica prisotnosti encimov RNaz na človeški koži, ki razgradijo RNA molekule, tudi viroide. Ravno prisotnost RNaz na človeški koži lahko razloži zakaj so Timmermann in sod. (2001) ugotovili večji prenos PSTVd v primeru, da so delavci nosili rokavice za enkratno uporabo, na katerih PSTVd ohrani svojo infektivnost tudi do 24 ur (Mackie in sod., 2015). Do podobnih ugotovitev o infektivnosti so prišli tudi pri virusih. Na primeru virusa rumenega mozaika buče (ZYMV) so pokazali, da na različnih površinah ohrani infektivnost tudi po več ur, medtem kot je na človeški koži ostal infektiven zgolj 5 min (Coutts in sod., 2013). Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV) pa je na površinah ostal tudi do 6 mesecev, na človeški koži pa do 2 uri (Skelton in sod., 2023).

Mackie in sod. (2015) so poleg stabilnosti in ohranjanja infektivnosti viroida PSTVd na različnih površinah, preučevali tudi učinkovitost petih dezinfekcijskih sredstev za inaktivacijo viroida. V poskusih se nobena rastlina ni okužila, ko so kužnemu soku pred inokulacijo dodali posneto mleko v prahu ali gospodinjsko belilo (Na-hipoklorit), podobno pa so za virus ZYMV pokazali tudi Coutts in sod. (2013). Z drugimi štirimi dezinfekcijskimi sredstvi (etanol, Farmcleanse (aktivne snovi: 5 do 10 % soli alkalijских kovin alkilbenzensulfonske kisline) in Virkon (aktivne snovi: Naperoksimonosulfat in Na-klorid) 1 % in 0,5 %) se je več kot polovica inokuliranih rastlin s PSTVd še vedno okužila. V kontrolnih obravnavah pa so dosegli nad 90 % okuženost rastlin: pri obdelavi z destilirano vodo se je v vsakem poskusu okužilo 9 do 10 od 10 rastlin, pri uporabi infektivnega soka brez razkužila pa je bilo okuženih vseh 10 rastlin (Mackie in sod., 2015). Ustreznost Na-hipoklorita in posnetega mleka so potrdili tudi Li in sod. (2015), ki so preučevali vpliv razkužil na PSTVd, virus mozaika pepina in paradižnikov mozaik virus. Kot uspešnega v inaktivaciji naštetih viroidov in virusov so poleg Na-hipoklorita pokazali še Virkon S, vendar moramo omeniti, da so uporabili višjo, 2 %, koncentracijo in ne 1 ali 0,5 %, kot Mackie in sod. (2015). Copes in Ojiambo (2021) sta opravila metaanalizo v kateri sta pregledala 86 raziskav vpliva Na-hipoklorita na ne-glivne rastlinske patogene. Zaključila sta, da so trenutne priporočene doze in čas učinkovanja Na-hipoklorita ustrezni, vendar je učinkovitost odvisna tudi od tarčnega organizma. Kljub tako obetavnim rezultatom kemične dezinfekcije, učinkovito obvladovanje viroidov zahteva integriran pristop: karanteno in certificiranje semen, uporabo dobre higienske prakse, vključno z uporabo učinkovitih razkužil, iskanje in odstranjevanje obolelih rastlin, dekontaminacijo rastlinjakov in kolobarjenje z negostiteljskimi rastlinami (Ling, 2017). Strogih higienskih ukrepov (razkuževanje opreme, uporaba rokavic, ločeno obutev in oblačila) in izolacije rastlin so se držali tudi na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, ko so bili zaradi okužb s CBCVd primorani v krčitev poskusnih nasadov in vzpostavitev projekta ohranjanja genskih virov za nadaljnje raziskave in razvoj hmeljarstva (Čerenak in Radišek, 2020). Taki higienski ukrepi so potrebni tudi pri eradikaciji CBCVd okuženih rastlin v hmeljiščih na kmetijah (Citrus bark ..., 2021).

Zaradi svoje sposobnosti, da ohranjajo stabilnost na različnih površinah in odpornosti na dezinfekcijska sredstva, povzročajo viroidi težave tudi v diagnostičnih in raziskovalnih laboratorijih. Stabilnost viroidov na laboratorijskih površinah bistveno zmanjšuje diagnostično natančnost, saj lahko kontaminirajo laboratorijsko opremo in površine. To problematiko so naslovili Mackie in sod. (2015), ki so preverili, ali različna razkužila vplivajo na PCR detekcijo PSTVd. V dveh poskusih je samo obdelava s posnetim mlekom v prahu razgradila in odstranila PSTVd v tolikšni meri, da PCR detekcija ni bila mogoča. Kot je razvidno iz preglednice 1 so s PCR uspešno določili viroid PSTVd pri vseh ostalih desinfekcijskih tretmajih. Zanimivo je, da sta med neučinkovitimi tudi etanol in Na-hipoklorit, ki se redno uporabljata v laboratorijih za sterilizacijo orodij in površin (Mackie in sod., 2015), kot so pulti in pipete.

Preglednica 1: Detekcija PSTVd RNA v vzorcih okuženega rastlinskega soka tretiranih z različnimi dezinfekcijskimi sredstvi (Prirejeno po: Mackie in sod. (2015)). Legenda: "+" detekcija s PCR je bila uspešna; "-" detekcija s PCR ni bila uspešna.

Tretiranje	Uspešnost detekcije PSTVd
Kontrola: Rastlinski sok zdravih rastlin	-
Kontrola: Rastlinski sok PSTVd okuženih rastlin	+
PSTVd in etanol (70 %)	+
PSTVd in posneto mleko v prahu (20%)	-
PSTVd in belilo (Na-hipoklorit), redčena 1:4	+
PSTVd in Farmcleanse, redčen 1:4	+
PSTVd in Virkon S (1 %)	+
PSTVd in Virkon S (0,5 %)	+

Različni raziskovalci do sedaj so preučevali tudi vpliv temperature na obstojnost virusov. Skelton in sod. (2023) za ToBRFV ugotovili, da je bilo 5 minutno namakanje plastičnih pladnjev v vodi pri 90 °C učinkovito, vendar 5 minut pri 70 °C ni bilo. S segrevanjem okuženega soka so pokazali, da je točka toplotne inaktivacije 90 °C, kar potrjuje, da je do deaktivacije prišlo zaradi toplotne obdelave in ne zaradi pralnega učinka vode. Choi in sod. (2014) pa so preučevali vpliv avtoklaviranja na zmožnost PCR detekcije različnih virusov. Pokazali so, da je bila mokra sterilizacija učinkovitejša od suhe sterilizacije. Poleg tega je na učinkovitost najbolj vplivalo ali so preučevali RNA virus ali DNA virus, saj je bil pri slednjih potreben daljši čas sterilizacije. Obstojnost DNA ob avtoklaviranju so preučevali že leta 1992, Dwyer in Saksena sta poročala, da 15 minut avtoklaviranja (121 °C, 15 p.s.i.) ni preprečilo PCR pomnoževanja 1 ng produkta velikosti 115 bp. Podobno so pokazali, da je šele 2 uri avtoklaviranja odstranilo nanogramске količine DNA (Gefrides in sod. 2009). Skladno z ugotovitvami Choi in sod. (2014) so tudi v tej raziskavi pokazali, da je bilo avtoklaviranje najučinkovitejše, ko površine niso bile zaščitene pred izpostavljenostjo pari.

V raziskovalnih in diagnostičnih laboratorijih je pogosta praksa, da se za zagotavljanje sterilnosti in preprečevanje kontaminacije ne uporabljajo samo kemične dezinfekcijske metode, kot sta natrijev hipoklorit (Na-hipoklorit) in 70 % etanol, temveč se v laboratorijsko delo redno vključuje tudi obsevanje z ultravijolično (UV) svetlobo. Zlasti pri pripravi verižne reakcije s polimerazo (PCR), se uporabljajo specifične komore, ki so zasnovane tako, da preprečujejo DNA kontaminacijo. Te komore so opremljene z UV lučmi, ki jih je mogoče aktivirati pred in/ali po postopku priprave vzorca za PCR, s čimer se zagotavlja, da so delovne površine in reagenti brez neželenih nukleinskih kislin, ki bi lahko vplivale na končne rezultate. Ali je obsevanje z UV svetlobo uspešno za preprečevanje kontaminacije PCR vzorca so preverjali že v začetku 90 let, ko se je metoda PCR šele uveljavljala v diagnostičnih laboratorijih. Pokazali, da je z izpostavitvijo UV svetlobi možno preprečiti nastajanje lažno pozitivnih vzorcev v diagnostiki virusov (Fox in sod., 1991, Ou in sod., 1991), medtem ko so drugi raziskovalci, ki so preučevali obstojnost DNA na UV obsevanje, prišli do nasprotnih rezultatov (Dwyer in Saksena, 1992). Gefrides in sod. (2009) pa so kasneje poročali, da je za učinkovito dekontaminacijo nekaj nanogramov DNA potrebno vsaj 2-urno obsevanje z UV svetlobo ($>7250 \text{ mJ/cm}^2$). V zaključku strokovne objave so poudarili, da je bilo avtoklaviranje učinkovitejše kot UV obsevanje pri odstranjevanju majhnih fragmentov kontaminirane DNA ($<200 \text{ bp}$) in bi ga bilo treba izbrati pred UV obsevanjem, kadar je to mogoče. To daleč najbolj uveljavljeno prakso dekontaminacije površin in opreme z nukleinskimi kislinami so leta 2018 validirali tudi Linqvist in sod. in presenetljivo ugotovili, da večkratno daljše izpostavljanje pipet UV svetlobi sproži izločanje PCR inhibitornih molekul ter posledično lahko povzroči lažno negativne rezultate PCR.

V tej raziskavi smo preverili obstojnost treh viroidov hmelja (HLVd, HSVd in CBCVd) v različnih pogojih, ki jih v našem raziskovalnem laboratoriju uporabljamo med rutinskim delom: obsevanje z UV lučjo, avtoklaviranje, pomivanje z detergentom in kemijska dekontaminacija z Na-hipokloritom. Poleg RNA, izolirane iz z viroidi okuženih rastlin, smo v raziskavo vključili tudi tri plazmide z DNA vključki, ki kodirajo zapis za preučevane viroide.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Priprava vzorcev

Uporabili smo vzorce RNA CBCVd, HLVd in HSVd pozitivnih hmeljev Celeia ter plazmide pBluescript II, z ustreznimi viroidnimi vključki. RNA so izolirali na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije s CTAB metodo (Kump in Javornik, 1996, plazmide pa smo s komercialnim kompletom High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) po proizvajalčevem protokolu izolirali iz prekonočnih kultur *E. coli* DH5a, ki so vsebovale plazmid pBluescript II s posameznim viroidnim vključkom. Koncentracijo RNA in plazmidov smo določili spektrofotometrično z napravo NanoVue (VWR). Vzorce plazmidov smo redčili tako, da smo z redčitvijo dosegli enako število molekul viroida, kot je ocenjena vsebnost viroida v vzorcih RNA

izolirane iz okuženih rastlin (0,1 %, Sečnik, 2022). Vzorce RNA in plazmidov smo v volumnu 4 μ l nanegli na notranjo stran pokrovčka 15 ml centrifugirke in po končanem tretiranju z različnimi pogoji (preglednica 2) smo notranjost pokrovčka natančno s pomočjo pipetiranja sprali z 20 μ l vode, ki ne vsebuje DNaz ali RNaz (IDT). Za vsako poskusno enoto smo izvedli dve ponovitvi, skupno smo torej pripravili 60 vzorcev.

Preglednica 2: Različni pogoji tretiranja RNA in plazmidov z viroidi hmelja (HLVd, HSVd in CBCVd) pri katerih smo preverili njihovo obstojnost

Tretiranje	Opis
Kontrola	Vzorec 30 min inkubiramo na sobni temperaturi.
UV	Vzorec 30 min inkubiramo pod UV svetlobo v PCR komori (LFVP122, Iskra Pio).
Avtoklav	Vzorec avtoklaviramo na programu za suho sterilizacijo (121 °C, 20 min) v avtoklavu (3870ELVC, Tutthauer).
Pomivanje	Vzorec ročno pomijemo z 0,5 ml detergenta (Chemotex) in speremo z destilirano vodo.
Na-hipoklorit	Vzorec pošpricamo z 0,1 ml Na-hipoklorita (Belilo Arekina, Šampionka, redčeno 1:4 z destilirano vodo) in po 10 min speremo z destilirano vodo.

2.2 Reverzna transkripcija

Za vzorce viroidne RNA smo izvedli reverzno transkripcijo s komercialnim kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in tako pridobili cDNA, ki smo jo nato uporabili za PCR detekcijo. Navodila proizvajalca smo deloma prilagodili, tako da smo uporabili polovični volumen reakcije (10 μ l) in na račun višjega volumna RNA (6,6 μ l) iz priprave reakcijske mešanice izključili vodo. Pripravili smo tudi kontrolni reakciji: v pozitivno kontrolo smo dodali 6,6 μ l RNA posameznega viroida, v negativno kontrolo pa 6,6 μ l vode. Reverzna transkripcija je potekala v napravi PCR (SimpliAmp Thermocycler, Applied Biosystems) pri pogojih: 25 °C, 10 min; 37 °C, 120 min; 85 °C, 5 min; 4 °C, ∞ . Za vzorce plazmidov reverzna transkripcija ni smiselna, zato smo jih pripravili tako, da smo dosegli enako redčitev, kot je bila redčitev RNA vzorcev: 6,6 μ l vzorca eluiranega s pokrovčkov smo zmešali z 3,4 μ l destilirane vode.

2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Viroidne sekvence v vzorcih cDNA pripravljenih iz RNA in v vzorcih redčenih plazmidov smo določali s PCR. Za detekcijo smo pripravili reakcijsko mešanico volumna 20 µl, ki so jo sestavljali: 2 µl matične DNA (cDNA ali plazmid), 10x PCR pufer (Kappa Fidelity Buffer, Roche), 1,6 µl 10 mM mešanice dNTP-jev (Promega), po 0,5 µl 10 µM ustreznega para začetnih oligonukleotidov (Preglednica 3) in 0,1 µl Taq polimeraze (lastna proizvodnja). Časovno temperaturni program pomnoževanja v napravi PCR (SimpliAmp Thermocycler, Applied Biosystems) je bil: 94 °C, 5 min; 35 ciklov (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s); 72 °C, 7 min; 4 °C, ∞. Produktom PCR smo dodali 5 µl nanašalnega bavlila (22,5% (w/v) ficoll tip 400; 0,2% (w/v) brom fenol modro; 0,67x TBE) in pomnožke ločili na 1,2 % agaroznem gelu v elektroforezni kadički (Biorad). Po 1 h ločbe pri 120 V smo agarozni gel osvetlili s transiluminatorjem (High Performance UV Transiluminator, UVP) in rezultate fotografirali.

Preglednica 3: Pari začetnih oligonukleotidov uporabljeni za PCR detekcijo viroidnih sekvenc CBCVd, HLVd in HSVd

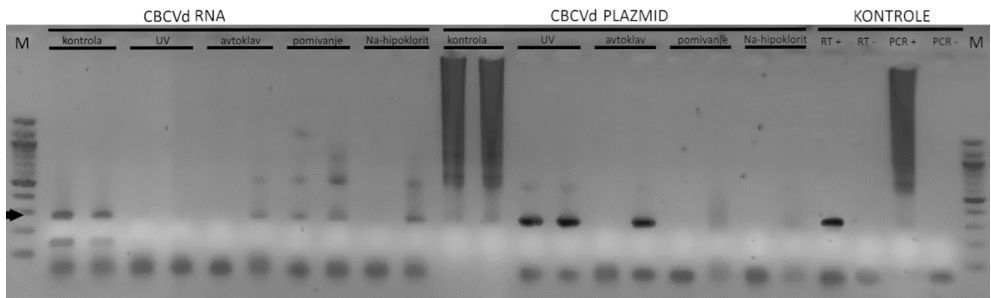
Detekcija	Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5'-3'	Vir
CBCVd	CVd-IV-F1_1	GGGGAAATCTCTTCAGACTC	Guček in sod., 2019
	CVd-IV-R1	GGGGATCCCTCTTCAGGT	
HLVd	HLVdM	TAGTTTCCAACCTCCGGCTGG	Hataya in sod., 1992
	HLVdP	GGATACAACCTTTGAGGGCC	
HSVd	HSVd-I	GCGTCTCATCGGAAGAGCC	Matousek in sod., 2003
	HSVd-II	GACCGGTGGCATCACCTCT	

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

V tej raziskavi smo primerjali obstojnost viroidov HLVd, HSVd in CBCVd na različne tretmaje, ki jih v našem laboratoriju rutinsko uporabljamo z namenom odstranjevanja in preprečevanja morebitne kontaminacije z nukleinskimi kislinami. Ker za raziskovalno delo poleg native RNA oblike viroidov, ki so prisotni v rastlinah, pogosto uporabljamo tudi DNA molekule plazmidov z vključenimi viroidnimi sekvencami, smo tudi za te plazmide preverjali kako izbrani tretmaji vplivajo na njihovo obstojnost. Rezultati PCR pomnoževanja so prikazani na fotografijah agarozne gelske elektroforeze: na sliki 1 so prikazani rezultati za CBCVd, na sliki 2 so prikazani rezultati za HLVd, na sliki 3 pa so prikazani rezultati za HSVd.

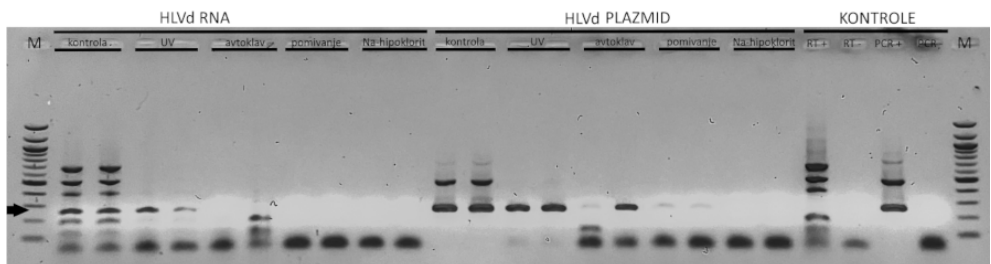
Za vzorce RNA, izolirane iz rastlin hmelja okuženega s CBCVd, se je kot uspešna metoda dekontaminacije izkazalo 30 min obsevanje z UV lučjo. Avtoklaviranje in tretiranje z Na-hipokloritom sta bila 50 % uspešna, medtem ko se je po ročnem pomivanju z detergentom viroidna RNA ohranila na pokrovcikih in smo jo s PCR lahko zaznali. Iz intenzivnosti pomnožkov lahko razumemo, da so pomivanje,

avtoklaviranje in Na-hipoklorit deloma učinkovali in nekoliko znižali koncentracijo viroidne RNA. Iz rezultatov PCR pomnoževanja plazmida, ki vsebuje CBCVd zaporedje, vidimo, da so bili za odstranjevanje DNA uspešni pomivanje in Na-hipoklorit, avtoklaviranje je ponovno dalo mešano rezultate, medtem ko se je obsvetljavane z UV lučjo izkazalo za neuspešno.

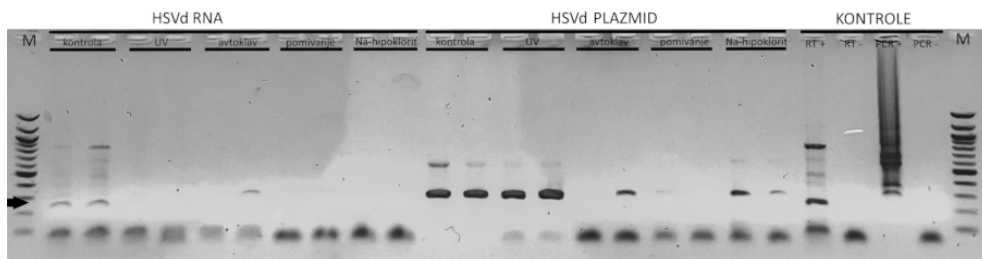


Slika 1: Rezultati agarozne gelske elektroforeze PCR detekcije viroida CBCVd tretiranega z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "M" dolžinski standard DNAmark 100bp Plus Ladder (G-biosciences); "→"pričakovana velikost PCR produkta; "RT +" pozitivna kontrola reverzne transkripcije; "RT -" negativna kontrola reverzne transkripcije; "PCR +" pozitivna kontrola PCR; "PCR -" negativna kontrola PCR.

Pri poskusu z RNA vzorci, izoliranimi iz hmelja okuženega s HLVd, smo opazili, da sta bila za odstranjevanje RNA najprimernejša pomivanje in Na-hipoklorit. Tudi tokrat se je, tako kot pri RNA CBCVd pozitivnih rastlin, avtoklaviranje izkazalo za neuspešno. Zanimivo je, da smo HLVd detektirali tudi pri vzorcih, ki smo jih obsvetlili z UV, kar ni skladno z rezultati pridobljenimi za CBCVd. V nasprotju z razlikami med RNA CBCVd in HLVd, pa so bila tretiranja enako uspešna pri obeh plazmidih. Tako sta se za plazmid, ki vsebuje sekvenčno zaporedje viroida HLVd, kot najbolj uspešni metodi izkazali Na-hipoklorit in pomivanje, pri katerem smo zaznali le blag pomnožek. Avtoklaviranje je bilo delno uspešno, UV svetloba pa ni imela večjega učinka.



Slika 2: Rezultati agarozne gelske elektroforeze PCR detekcije viroida HLVd tretiranega z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "M" dolžinski standard DNAmark 100bp Plus Ladder (G-biosciences); "→"pričakovana velikost PCR produkta; "RT +" pozitivna kontrola reverzne transkripcije; "RT -" negativna kontrola reverzne transkripcije; "PCR +" pozitivna kontrola PCR; "PCR -" negativna kontrola PCR.



Slika 3: Rezultati agarozne gelske elektroforeze PCR detekcije viroida HSVd tretiranega z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "M" dolžinski standard DNAmark 100bp Plus Ladder (G-biosciences); "→" pričakovana velikost PCR produkta; "RT +" pozitivna kontrola reverzne transkripcije; "RT -" negativna kontrola reverzne transkripcije; "PCR +" pozitivna kontrola PCR; "PCR -" negativna kontrola PCR

Tretji viroid, ki smo ga vključili v raziskavo je HSVd. RNA viroida HSVd se je v naših poskusih izkazala za najpreprostejšo za eliminacijo, saj je nismo zaznali po tretmaju z UV lučjo, ročnem pomivanju in po obdelavi z Na-hipokloritom. Deloma smo jo zaznali le pri enem avtoklavianem vzorcu. Nasprotno, pa se je plazmid, ki je vseboval sekvenčno zaporedje viroida HSVd izkazal za najbolj obstojnega, saj nismo dosegli 100 % eliminacije z nobenim od preučevanih tretmajev. Najprimernejše je bilo ročno pomivanje z detergentom kjer je prišlo do rahlega pomnoževanja pri smo enem vzorcu.

Za lažjo primerjavo smo rezultate zbrali v preglednici: rezultati za RNA, izolirano iz viroid-pozitivnih rastlin so prikazani v preglednici 4; rezultati za vse tri preučevane plazmide pa so združeni v preglednici 5.

Preglednica 4: Povzetek rezultatov PCR detekcije RNA vzorcev viroidov CBCVd, HLVd in HSVd, tretiranih z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "+" detekcija s PCR je bila uspešna; "-" detekcija s PCR ni bila uspešna.

		RNA			Št. pozitivnih
		CBCVd	HLVd	HSVd	
Kontrola	1	+	+	+	6
	2	+	+	+	
UV	3	-	+	-	2
	4	-	+	-	
Avtoklav	5	-	-	-	3
	6	+	+	+	
Pomivanje	7	+	-	-	2
	8	+	-	-	
Na-hipoklorit	9	-	-	-	1
	10	+	-	-	
Št. pozitivnih		6	5	3	14 / 30

Kot najbolj uspešna metoda za odstranjevanje viroidne RNA se je pokazalo tretiranje z Na-hipokloritom, saj smo viroid s PCR določili samo v 1 od 6 primerov. Sledita mu ročno pomivanje z detergentom (2/6 pozitivnih) in 30 min obsevanje z UV svetlobo (2/6 pozitivnih). Avtoklaviranje pa je bilo na viroidno RNA zgolj 50 % uspešno. Zanimivo je, da smo zaznali tudi razlike med obstojnostjo posameznih viroidov, HSVd se je izkazal za najmanj obstojnega, medtem ko je bil CBCVd najbolj obstojen.

Plazmidi so DNA molekule, zato smo pri njih pričakovali nekoliko večjo obstojnost od obstojnosti RNA molekul viroidov, kar se je tudi pokazalo. Podobno, kot pri RNA vzorcih, je bil tudi pri plazmidnih vzorcih najbolj učinkovit Na-hipoklorit, saj smo s PCR viroidne sekvence v plazmidih detektirali le pri 2 od 6 vzorcev. Po uspešnosti mu sledita ročno pomivanje z detergentom in ročno pomivanje (oba s 50 % uspešnostjo). Zanimivo je, da je bilo obsevanje z UV svetlobo skoraj neučinkovito saj smo s PCR lahko detektirali 5 od 6 plazmidnih vzorcev.

Preglednica 5: Povzetek rezultatov PCR detekcije plazmidnih vzorcev viroidov CBCVd, HLVD in HSVd, tretiranih z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "+" detekcija s PCR je bila uspešna; "-" detekcija s PCR ni bila uspešna.

		PLAZMID			Št. pozitivnih
		CBCVd	HLVd	HSVd	
Kontrola	1	+	+	+	6
	2	+	+	+	
UV	3	-	+	+	5
	4	+	+	+	
Avtoklav	5	-	+	-	3
	6	-	+	+	
Pomivanje	7	-	+	+	3
	8	-	+	-	
Na-hipoklorit	9	-	-	+	2
	10	-	-	+	
	Št. pozitivnih	3	8	8	19 / 30

V tej raziskavi smo na vzorcih viroidov preverili delovanje metod nukleinske dekontaminacije, ki jih redno uporabljamo v našem raziskovalnem laboratoriju. Zanimivo je, da smo kot najbolj učinkovitega določili Na-hipoklorit, ki v raziskavi Mackie in sod. (2015) ni dal zadovoljivih rezultatov. V našem poskusu smo se želeli čim bolj približati realnim metodam, ki jih uporabljamo v laboratoriju. Na-hipoklorit je koroziven, zato smo ga po 10 min sprali z destilirano vodo, medtem kot so Mackie in sod. (2015) Na-hipoklorit inaktivirali z Na-tiosulfatom. Spiranje Na-hipoklorita je lahko povzročilo tudi spiranje RNA viroida in DNA plazmida, posledično učinka dekontaminacije ne moremo nujno pripisati zgolj delovanju Na-hipoklorita na RNA in DNA. Do podobnega sinergističnega učinka spiranja s preučevano metodo

dekontaminacije je lahko prišlo tudi pri metodi ročnega pomivanja s tekočim detergentom. Ne glede na to, so rezultati za naše delo zelo informativni, saj smo preučili postopke, kot so se in se redno uporabljajo pri laboratorijskem delu. Podobno smo pri avtoklaviranju izbrali metodo suhe sterilizacije, ki je primerna za sterilizacijo pipet. Mokre sterilizacije, za katero so raziskovalci poročali, da je bolj učinkovita (Gefrides in sod., 2009; Choi in sod., 2014), nismo preskusili, saj ni primerna za našo opremo. Z namenom dekontaminacije nukleinskih kislin, vsi raziskovalci v našem laboratoriju pred pripravo PCR reakcijskih mešanic, komoro, pripomočke za delo in potrošni material, obsevamo z UV svetlobo (15 do 30 min). V tej raziskavi smo pokazali, da je obsevanje z UV svetlobo delno učinkovito (2 od 6 vzorcev sta bila na PCR pozitivna) za viroide, ki so RNA molekule. Za plazmide, ki so DNA molekule, pa je bilo 30 min obsevanje z UV skoraj neučinkovito (5 od 6 vzorcev je bilo na PCR pozitivnih). Daljših časov obsevanja, ki jih priporočajo Gefrides in sod. (2009) se nismo posluževali.

Zaskrbljujoči so rezultati različnih raziskovalcev, ki so pokazali na dolgo stabilnost viroidov (Mackie in sod., 2015; Verhoeven in sod. 2010) in virusov (Coutts in sod., 2013; Skelton in sod., 2023) na različnih površinah, tudi plastiki (npr. pipete, rokavice, centrifugirke, pult), kovini (pincete, skalpeli, delovna površina v laminariju) in bombažu (laboratorijske halje). Nobena od metod, ki jih v našem delu vključujemo v rutinsko delo, se ni izkazala za 100 % učinkovito pri dekontaminaciji laboratorijski površin in materiala na katerih so neželene nukleinske kisline. Za uspešno raziskovalno in laboratorijsko delo se še naprej poslužujemo kombinacije vseh zgoraj naštetih metod, ki jih dosledno izvajamo pred in po delu z viroidi. Ključen ter najpreprostejši ukrep za uspešno delo in izogib problemov s kontaminacijo pa je, da ločimo prostore ter opremo v katerih potekajo priprava vzorcev in izolacija nukleinskih kislin, od prostorov ter opreme v katerih poteka priprava reakcijskih mešanic za PCR. Poleg tega je nujna tudi redna menjava zaščitnih rokavic in zaščitnih halj.

4 ZAKLJUČEK

V predstavljeni raziskavi smo preverili obstojnosti treh viroidov hmelja (HLVd, HSVd in CBCVd) v različnih pogojih, ki so običajni za rutinsko delo v našem laboratoriju. Med preučevanimi metodami so bile obsevanje z UV lučjo, avtoklaviranje, pomivanje z detergentom ter kemijska dekontaminacija z Na-hipokloritom. Ne le da smo preučevali RNA, izolirano iz z viroidi okuženih rastlin, v raziskavo smo prav tako vključili tri plazmide z DNA vključki, ki kodirajo zapis za obravnavane viroide. Naše ugotovitve so pokazale, da je dekontaminacija z Na-hipokloritom najučinkovitejša metoda. Vendar pa se za maksimalno učinkovitost in preprečevanje morebitne kontaminacije laboratorija z viroidnimi nukleinskimi kislinami priporoča kombinirana uporaba vseh preučevanih metod. Pomembno je, da laboratorijsko okolje in delo organiziramo tako, da omogočimo preventivno zaščitno ravnanje pred morebitno kontaminacijo z viroidnimi nukleinskimi kislinami. Poleg v tej raziskavi preučevanih metod dekontaminacije, vključimo še dosledno ločevanje opreme (pipete,

centrifuge, brezprašne komore), uporabljene za pripravo vzorcev, od tiste, ki se uporablja za detekcijo viroidov. Priporočamo ločene prostore za vsak korak detekcije viroidov: izvajanje homogenizacije rastlinskega materiala, izolacije nukleinskih kislin, pripravo PCR mešanice, dodajanje nukleinskih kislin in za detekcijo pomnožkov z agarozno elektroforezo. Pri prehajanju med prostori je potrebno zamenjati rokavice, halje in obutev. Možnost kontaminacije zmanjšamo tudi z uporabo komercialnih kompletov, ki omogočajo reverzno transkripcijo in PCR amplifikacijo hkrati, v eni reakcijski mešanici.

5 ZAHVALA

Hvala dr. Tanji Guček (Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije), ki je za potrebe te raziskave pripravila vzorce RNA, izolirane iz z viroidi okuženih rastlin hmelja. Za sodelovanje in pomoč pri delu poskusa gre zahvala tudi Emi Rutar in Juliji Novak, obe Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, ki sta se raziskavi pridružili v okviru maturitetne projektne naloge pri predmetu Biotehnologija. Raziskava je nastala s finančno podporo ARIS projekta Z4-3214 in ARIS programa P4-0077.

6 LITERATURA

- Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology*. San Diego, Elsevier.
- Al Rwahnih, M., Rowhani, A., Westrick, N., Stevens, K., Diaz-Lara, A., Trouillas, FP., Preece, J., Kallsen, C., Farrar, K., Golino, D. (2018). Discovery of Viruses and Virus-Like Pathogens in Pistachio using High-Throughput Sequencing. *Plant Disease*, 102(7), 1419-1425.
- Cho, I.S., Chung, B.N., Cho, J.D., Choi, S.K., Choi, G.S., Kim, J-S. (2011). Hop stunt viroid (HSVd) Sequence Variants from Dapple Fruits of Plum (*Prunus salicina* L.) in Korea. *Research in Plant Disease*. Korean Society of Plant Pathology. 7, 3, 358-363.
- Choi, W.S., Rodríguez, R.A., Sobsey, M.D. (2014). Persistence of viral genomes after autoclaving. *Journal of Virological Methods*, 198, 37-40.
- Citrus bark cracking viroid (CBCVD0). (2021). EPPO Datasheet: Citrus bark cracking viroid. <https://gd.eppo.int/taxon/CBCVD0/datasheet> (9. nov. 2023).
- Copes, W.E., Ojiambo, P.S. (2021). Efficacy of Hypochlorite in Disinfesting Nonfungal Plant Pathogens in Agricultural and Horticultural Plant Production: A Meta-Analysis. *Plant Disease* 105:12, 4084-4094.
- Coutts, B.A., Kehoe, M.A., Jones, R.A.C. (2013). Zucchini yellow mosaic virus: Contact Transmission, Stability on Surfaces, and Inactivation with Disinfectants. *Plant Disease*, 97(6), 765-771.
- Čerenak, A., Radišek, S. (2020). Ohranjanje genskih virov hmelja ob krčitvi poskusnih nasadov zaradi okužb s CBCVd. *Hmeljar*, 82(1-2), 53-54.
- Darós, J. A. (2016). Viroids: small noncoding infectious RNAs with the remarkable ability of autonomous replication. V: Wang, A., Zhou, X. (ur.). *Current Research Topics in Plant Virology* (str. 295-322). Cambridge, Springer.
- Dwyer, D. E., Saksena, N. (1992). Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 87-88.
- Eastwell, K. C., Nelson, M. E. (2007). Occurrence of Viroids in Commercial Hop (*Humulus lupulus* L.) Production Areas of Washington State. *Plant Health Progress*, 8, 1.
- Flores, R., Hernandez, C., de Alba, A. E. M., Daros, J. A., Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 117-139.

- Fox, J.C., Ait-Khaled, M., Webster, A., Emery, V.C. (1991). Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? *Journal of Virological Methods*, 33(3), 375-82.
- Gefrides, L. A., Powell, M. C., Donley, M. A., Kahn R. (2010). UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Science International: Genetics*, 4 (2), 89-94.
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. (2019). Preizkušanje različnih metod okuževanja rastlin s CBCVd. *Hmeljarski bilten*, številka 26, str. 36-49.
- Guo, L., Liu, S., Wu, Z., Mu, L., Xiang, B. (2008). Hop stunt viroid (HSVd) newly reported from hop in Xinjiang, China. *Plant Pathology*, 57, 4.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J.S. (2003). *Viroids*. Collingwood, CSIRO: 362 str.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Palukaitis P. (2017). *Viroids and Satellites*. London, Elsevier: 688 str.
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Tanikoshi T., Shikata E. (1992). Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 58, 677-684.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matousek J., Javornik B. (2015). Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64, 1, 831-842.
- Kump, B., Javornik, B. (1996). Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114, 149-158.
- Li, R., Baysal-Gurel, F., Abdo, Z. (2015). Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Virology Journal* 12 (5), 2-10.
- Ling, K-S. (2017). Decontamination Measures to Prevent Mechanical Transmission of Viroids. V: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P. (ur.). *Viroids and Satellites* (str. 437-445). Cambridge, Academic Press.
- Linquist, V., Stoddart, C.A., McCune, J.M. (1998). UV irradiation of polystyrene pipets releases PCR inhibitors. *Biotechniques*, 24 (1), 50-51.
- Mackie, A.E., Coutts, B.A., Barbetti, M.J., Rodoni, B.C., McKirdy, S.J., Jones, R.A.C. (2015). Potato spindle tuber viroid: Stability on Common Surfaces and Inactivation With Disinfectants. *Plant Disease*, 99 (6), 770-775.
- Mahaffee, W.F., Pethybridge, S.J., Gent, D.H. (2009). *Compendium of hop diseases and pests*. St Paul, American Phytopathological Society, APS Press.: 93 str.
- Matousek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvikova, I. (2003). Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil and Environment*, 49(4), 168-175.
- Matsushita, Y., Tsuda, S. (2014). Distribution of Potato spindle tuber viroid in reproductive organs of petunia during its developmental stages. *Phytopathology*, 104(9), 964-969.
- Ou, C.Y., Moore, J.L., Schochetman, G. (1991). Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 10(4), 442-446.
- Puchta, H., Ramm, K., Sanger, H. L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Research*, 16, 10, 4197-4216.
- Radišek, S., Majer, A., Jakše, J., Javornik, B., Matoušek, J. (2012). First report of hop stunt viroid infecting hop in Slovenia. *Plant Disease*, 96, 4, 2 str.
- Radišek, S., Guček, T., Kolenc, U., Friškovec, I., Benko-Beloglavac, A. (2020). Stanje okuženosti hmeljišč s hudo viroidno zakrnelostjo hmelja v letu 2020. *Hmeljar*, 82, 1-12, 52-53.
- Sečnik, A. (2022). Ocenjena vsebnost viroida v povprečnem vzorcu RNA izolirane iz okuženih rastlin. Osebna komunikacija (december, 2022).

- Seigner, L., Lutz, A., Seigner, E. (2014). Monitoring of Important Virus and Viroid Infections in German Hop (*Humulus lupulus* L.) Yards. *BrewingScience*, 67, 5: 81-87.
- Shikata, E. (1987). Hop stunt. V: Diener, T. O. (ur.). *The Viroids*. (str. 279-290). New York, Plenum Press.
- Skelton, A., Frew, L., Ward, R., Hodgson, R., Forde, S., McDonough, S., Webster, G., Chisnall, K., Mynett, M., Buxton-Kirk, A., Fowkers, A.R., Weekes, R., Fox, A. (2023). Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Survival and Disinfection Efficacy on Common Glasshouse Surfaces. *Viruses*, 15, 10, 2076, 1-14.
- Timmermann, C., Muhlbach, H. P., Bandte, M., and Buttner, C. (2001). Control of mechanical viroid transmission by the disinfection of tables and tools. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66, 2a, 151-156.
- Update of the situation of Citrus bark cracking viroid in Slovenia. EPPO Reporting Service no. 05 - 2021 Num. article: 2021/109. <https://gd.eppo.int/reporting/article-7048> (9. nov. 2023).
- Verhoeven, J., Th, J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Roenhorst, J. W. (2010). Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveoles*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 417-421.

THE HOPS SURPLAS INFLUENCE ON GLOBAL MARKET EVENTS

Douglas MACKINNON¹ and Martin PAVLOVIČ²

Original scientific paper / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 31. 10. 2023

Accepted / Sprejeto: 21. 11. 2023

Abstract

The U.S. hop industry data measuring the change of inventory and acreage responsiveness to price demonstrated a delayed, reduced, or total lack of, responsiveness in the change of direction of acreage and inventory in response to directional changes in season average price during free market periods. This reaction was referred to as the delayed surplus response (DSR). The data also demonstrated the absence of the DSR during periods in which proprietary varieties reached greater than 50% of U.S. acreage and production. Patented plant varieties offer a legal monopoly over that intellectual property. The absence of the DSR during periods in which a majority of U.S. acreage and production were proprietary indicate a strong degree of control by the owners of proprietary hop varieties over supply and therefore the ability to manage price at desired levels.

Keywords: hop market, brewing industry, surplus, Bayesian inference, proprietary varieties

VPLIV PRESEŽKOV HMELJA NA GLOBALNA TRŽNA DOGAJANJA

Izvleček

Podatki o hmelju v ZDA, ki merijo spremembo zalog in odzivnosti spremembe površin na ceno, so pokazali zapozneno, zmanjšano ali popolno pomanjkanje odzivnosti pri spremembi površin in zalog kot odgovor na usmerjene spremembe sezonske povprečne cene v obdobjih prostega trga. Ta pojav obravnavamo kot zakasneli odziv tržnih presežkov (DSR). Podatki so tudi pokazali odsotnost DSR v obdobjih, ko so lastniške sorte dosegle več kot 50 % površine in proizvodnje v ZDA. Patentirane sorte hmelja nudijo pravni monopol nad to intelektualno lastnino. Odsotnost DSR v obdobjih, ko je bila večina površin in pridelave v ZDA lastniška, kaže na močno stopnjo nadzora lastnikov lastniških sort hmelja nad ponudbo in s tem na sposobnost upravljanja cen na zelenih ravneh.

Ključne besede: hmeljski trg, pivovarstvo, presežki, Bayesov sklep, lastniške sorte

¹ PhD, MacKinnon Report. Hoppy, balanced and unfiltered, USA, e-mail: doug@demackinnon.com

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

1 INTRODUCTION

Hops (*Humulus lupulus* L.) are a perennial that grow vines requiring a trellis system capable of supporting the weight of the vines themselves as well as the many cones each bine may produce. Commercial production takes place in latitudes greater than 35 degrees in both the Northern and Southern Hemispheres due to strong photoperiodism requirements for flowering (Henning et al. 2015). In the United States in 2021 we noted 41% of the global hop production with the average hop yield of 2,1 metric tons per hectare (IHGC 2021). This weight represented only the cones, not the weight of the bines themselves.

Breweries are the primary customer requiring hops in significant quantities and are responsible for 98% of global hop sales. The demand for other products, therefore, does not affect the hop market in a meaningful way (DHWV 2012, Pavlovič et al. 2022). The hop industry is relatively small. Therefore, hops are not publicly traded. Instead, they are traded in what is referred to as Over-The-Counter (OTC) deals. The practice of OTC trading is an archaic, yet effective, system requiring personal communications between the interested parties, but lacks transparency. The hop industry is therefore an opaque market oscillating between the influences of a merchant oligopoly and a brewer oligopsony depending upon the supply situation (MacKinnon and Pavlovič 2021).

Folwell et al. (1985) first introduced the concept of a "lagged supply response" when describing the hop market disequilibrium. That term however does not adequately describe the situation. Supply is highly elastic and responsive to increasing prices. It is the industry's response to declining demand that is lagging leading to the term "Delayed Surplus Response" (DSR) (MacKinnon and Pavlovič 2021).

The aggregate and regular methods used by the United States Department of Agriculture (USDA) to gather and calculate data regarding the U.S. hop industry, their policies regarding reporting confidentiality and their consistency for over 100 years makes USDA data removed potential biases and was well suited to serve as Bayesian priors (Bayarri and Berger 2004). USDA season average price acreage and production data demonstrated that in response to deficit situations in 1980, 2007 and 2008, U.S. grower responses were rapid (USDA 2020).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Calculating the Depletion Rate

The U.S. hop stock figures represented inventory in warehouses located in the United States. To achieve a more accurate picture of the amount of U.S. and foreign hops stored in the U.S. during the period analyzed, import and export figures were added to the equation.

The depletion rate is the rate of change from one data point to the next similar data point. We measured the depletion rate between annual September 1 hop stocks figures. Alternate depletion rates (i.e., between September year n-1 and March year n or between March year n-1 and March year n) may be calculated and provide some value. For the purposes of this research however the September 1 depletion rate was used and will be referred to henceforth as "the depletion rate".

We calculated the depletion rate by taking the September 1 U.S. Hop Stocks value for the previous year n-1, $\sqrt{(S^{n-1})}$ adding in the total production of the U.S. crop (accounting for processing loss) for year n-1, $\sqrt{(C^{n-1})}$, and subtracted the September 1 U.S. hop stocks value for year n, $\sqrt{(S^n)}$. To account for the quantity of hop production lost during processing for any year n into pellets or extract, referred to as $\sqrt{(C^n)}$, we estimated that 97% of the original raw production volume (hops in bale form). Furthermore, we estimated that 3% of the crop remained in bale form. For these hops, it can be assumed there was zero loss. These conversion rates came from a priori knowledge and will certainly change in the future as brewer purchasing preferences change. These numbers may be adjusted as necessary to test an alternate set of beliefs. The formula below represents this calculation.

$$D^n = S^n - [(S^{n-1} + C^{n-1}) - S^n] \quad (1)$$

where: D^n – depletion rate; S^n – September 1 hop stocks figures for year n; S^{n-1} – September 1 hop stocks figures for year n – 1; C^{n-1} – total production of the US crop once processing loss has been accounted for.

2.2 Data Populations

For this research, we analyzed USDA season average price (SAP), September 1 hop stocks and acreage for two data subpopulations.

1980-2000: The years 1980 to 2000 were marked by a lack of effective regulation over supply and the introduction of new hop varieties and products with greater efficiency. This was a time when four situations converged created a surplus market situation.

- 1) The third Federal Marketing Order had failed because as Folwell (1982) mentioned growers increased saleable quantities to take market share away from German growers (creating a permanent infrastructure production solution in the U.S. to a temporary German yield problem).
- 2) The new high-yielding alpha varieties, Nugget and Galena, were introduced to the market replacing lower-yielding alpha producing hops on a 1:1 basis increasing grower production efficiency of alpha-acid per acre.
- 3) Merchant proprietary products based on alpha-acid with greatly increase efficiencies were introduced to the market reducing demand by brewers. There were no effective forms of production or sales regulation during this period.

- 4) Early proprietary alpha hop varieties were quietly introduced into the market under other variety names (i.e., red stripe Nugget). It is not possible to quantify the scale of this effect as the new acreage was reported as Nugget and there was no way to distinguish actual Nugget acreage from "red stripe" Nugget acreage (which many later speculated was one of the CTZ varieties).

1998-2020: This was a period during which branded proprietary varieties were introduced into the market. It was also a time during which the craft brewing industry reached a tipping point enabling its demands for proprietary aroma varieties for which they were willing to pay a premium to direct the industry. Since 1938, the U.S. hop industry had experimented with Federal Marketing Orders to regulate the saleable quantity of hops to brewers. All three Federal Marketing Orders that were enacted failed due to the lack of authority to effectively regulate grower activities. A fourth Federal Marketing Order was voted down in 2003 with concerns over the potential for the formation of a cartel expressed by one significant opponent (Federal Register 2020). Proprietary variety production, however, grew to such an extent that it effectively created the regulatory system the industry had long sought via the enforcement of intellectual property rights (IPR). Correlation however does not imply causation. The reverse, however, is not true. Causation implies some form of correlation (Goldthorpe 2001).

2.3 Bayesian Inference

For each data set, we analyzed the effect of a hypothetical change in the independent variable upon the directional movement of the dependent variable (i.e. increase, decrease, no change) while keeping other variables stable (Hines 2015). We measured the effect of consecutive hypothetical identical changes to the independent variable upon the dependent variable to determine the probability of a change occurring because of the change. Limiting the possible numbers of outcomes increased the ability of our Bayesian inferential analysis to yield meaningful probability forecasts. A simple model can increase the chance for accuracy and reduce errors in forecasting by as much as 25% (Green and Armstrong 2015). The parameters of this analysis were limited to the directional movement of dependent and independent variables to limit false discovery data. More accurate probabilities resulted without compromising the integrity of the operation. Yekutieli (2012) concluded that while specifying a selection rule introduces an arbitrary element to Bayesian analysis, the selection rule was determined before the data were observed and carried out the same way as Bayesian inference. Our inferences were based on the Bayesian posteriors generated from a selection-adjusted analysis, which as Yekutieli (2012) noted led to a reduction in the forecasts possible from the available data (i.e. forecasts regarding directional price movements as opposed to forecasts regarding the probability of actual future prices).

2.4 The Bayesian Formula

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)P(A)}{P(B)}$$

where: $P(A|B)$ - probability of A occurring given that B was true; $P(B|A)$ - probability of B occurring given that A was true; $P(B)$ - probability of observing B; $P(A)$ - probability of observing A; A and B - unique events.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The Bayesian inferential of analyses of the U.S. Season Average Price (SAP) resulted in the emergence of several sequences of data demonstrating that September 1 hop stocks and acreage did not follow market signals indicating reduced demand for hops. We discovered that when U.S. SAP decreased two years in a row during the period 1980-2000 it resulted in a 100% likelihood that September 1 hop stocks would increase, a trend that continued through the fourth consecutive year of U.S. SAP decreases (Table 1).

Table 1: U.S. SAP decreased in consecutive years and the probability of an increase in U.S. September 1 hop stocks (1980-2000).

DESCRIPTION	Prior Probability	Posterior Probability	PPV	Sensitivity	Specificity
U.S. SAP year n decreased; U.S. September 1 stocks increase	38,10%	41,67%	62,50%	41,67%	62,50%
U.S. SAP year n decreased 2 consecutive years; U.S. September 1 stocks increase	41,67%	100%	61,54%	100%	0,00%
U.S. SAP year n decreased 3 consecutive years; U.S. September 1 stocks increase	100%	100%	64,29%	100%	0,00%
U.S. SAP year n decreased 4 consecutive years; U.S. September 1 stocks increase	100%	100%	66,67%	100%	0,00%

Source: USDA NASS 2013, USDA NASS 2014, USDA NASS NHR 2000-2020

The data reflected that these two factors impacted market forces. There was only a slight reaction in the n year to a decrease in U.S. SAP. The prior probability of an increase in stocks of 38,10 percent changed to a posterior probability of 41,67

percent, a mild change. In the second consecutive year and beyond the posterior probabilities were 100 percent. The same was true of the sensitivity demonstrating the certainty of the true positive results. The PPV values introduced some room for doubt, but only marginally. The n year PPV value was 62,50 percent and increased by the fourth consecutive year to a mere 66,67 percent.

Similar changes during the 1998-2020 period yielded very different results with very low probabilities of increases in September 1 hop stocks in years two, three and four of the calculations (Table 2). Following consecutive years of decreased U.S. SAP, the posterior probability (i.e., the likelihood) that stocks will increase resulting from these changes decreased to 21,69 percent by the fourth consecutive year of decreased U.S. SAP. The PPV value was high in the n year at 90,00 percent. This demonstrated a high degree of confidence in the posterior probability generated in that year. The PPV values decreased during the second, third and fourth consecutive year of decreasing U.S. SAP. By the fourth consecutive decrease in U.S. SAP, the PPV value was 60,00 percent. This is considered by our research to be a high value, but in conjunction with the direction of its movement provided by the other years measured in this research, we could better understand its relative significance.

Table 2: U.S. SAP decreased in Consecutive Years and the Probability of an Increase in U.S. September 1 Hop Stocks (1998-2020).

DESCRIPTION	Prior Probability	Posterior Probability	PPV	Sensitivity	Specificity
U.S. SAP year n decreased; U.S. September 1 stocks increase	43,48%	60,00%	90,00%	60,00%	85,71%
U.S. SAP year n decreased 2 consecutive years; U.S. September 1 stocks increase	60,00%	44,68%	53,85%	87,50%	0,00%
U.S. SAP year n decreased 3 consecutive years; U.S. September 1 stocks increase	44,68%	31,58%	57,14%	88,89%	0,00%
U.S. SAP year n decreased 4 consecutive years; U.S. September 1 stocks increase	31,58%	21,69%	60,00%	90,00%	0,00%

Source: USDA NASS 2013, USDA NASS 2014, USDA NASS NHR 2000-2020

There exists a symbiotic relationship between acreage, production and stocks. Experiments regarding U.S. SAP data and its effect upon U.S. acreage yielded data that demonstrated that acreage lacked responsiveness to price signals indicating reduced demand during the 1980-2000 period (Table 3). There was a low probability of a decrease in acreage in response to consecutively decreasing prices. The year n posterior probability of a 37,50 percent likelihood of such a decrease increased to 50 percent by the fourth year of consecutive decreased U.S. SAP.

Table 3: U.S. SAP decreased in consecutive years and the probability of U.S. acreage decreases (1980-2000).

DESCRIPTION	Prior Probability	Posterior Probability	PPV	Sensitivity	Specificity
U.S. SAP year n decreased; U.S. acreage decrease	42,86%	37,50%	33,33%	37,50%	50,00%
U.S. SAP year n decreased 2 consecutive years: U.S. acreage decrease	37,50%	36,55%	40,00%	44,44%	50,00%
U.S. SAP year n decreased 3 consecutive years: U.S. acreage decrease	36,55%	38,59%	45,45%	50,00%	50,00%
U.S. SAP year n decreased 4 consecutive years: U.S. acreage decrease	38,59%	42,99%	50,00%	54,55%	50,00%

Source: USDA NASS 2013, USDA NASS 2014, USDA NASS NHR 2000-2020

The low PPV values of 33,33 percent in the n year increasing only to 50,00 percent in the fourth consecutive year of U.S. SAP decreases instilled confidence in the ability to forecast accurately using these results. These data are a result of the following events that occurred:

(1) The newly introduced high yielding alpha varieties of Nugget and Galena created a Bertrand Supertrap reducing demand for U.S. hop acreage as efficiency was greatly increased on the farm. (2) The introduction of proprietary processed alpha-oriented products added to the effects of the Bertrand Supertrap. The hyper efficiency of these new products further reduced the demand for alpha hop products by brewers and the need for existing hop acreage. (3) The complete lack of effective regulation of production or saleable quantities, acreage and production meaning that laissez-faire economics were governing the market, which was in essence a free for all. (4) The homogeneity of hop products marketed between 1980 and 2000.

Even some branded proprietary varieties that existed at the time (i.e., a proprietary variety referred to as Red Stripe Nuggets so it could be sold as a Nugget when it was not) found their way into the homogenous product stream offering a disproportionate advantage to the morally impaired growers who did not shy away from selling an intentionally mislabeled product.

The data from the 1998-2020 period demonstrated that the opposite was true during that time, which indicated a greater likelihood of responsiveness to market price signals (Table 4). The data during the period between 1998 and 2020 suggested a high responsiveness to consecutive decreased U.S. SAP. Such strong data were not evidenced during the other data subpopulations measured with respect to U.S. SAP and U.S. acreage. In year n, in response to a single decrease of U.S. SAP the probability of acreage decreasing increased from the prior probability of 43,48 percent to a posterior probability of 71,43 percent. After another year of decreased U.S. SAP, the posterior probability representing the likelihood of an acreage decrease jumped to 89,86 percent. In the third and fourth consecutive years the likelihood soared yet again to 97,11 percent and 99,26 percent probability. These data represented not only a high degree of correlation but causation between the two data points under these circumstances.

Table 4: U.S. SAP Decreased in Consecutive Years and the Probability of U.S. Acreage Decreases (1998-2020).

DESCRIPTION	Prior Probability	Posterior Probability	PPV	Sensitivity	Specificity
U.S. SAP year n decreased; U.S. acreage decrease	43,48%	71,43%	50,00%	71,43%	68,75%
U.S. SAP year n decreased 2 consecutive years: U.S. acreage decrease	71,43%	89,86%	54,55%	75,00%	68,75%
U.S. SAP year n decreased 3 consecutive years: U.S. acreage decrease	89,86%	97,11%	58,33%	77,78%	68,75%
U.S. SAP year n decreased 4 consecutive years: U.S. acreage decrease	97,11%	99,26%	61,54%	80,00%	68,75%

Source: USDA NASS 2013, USDA NASS 2014, USDA NASS NHR 2000-2020

The PPV remains strong with values going from 50,00 percent in the n year to 61,54 percent in the fourth consecutive year introducing reasonable doubt into the equation in what otherwise appeared to be near certainty with regards to acreage reduction. The high degree of sensitivity in these data with values ranging from 71,43 percent in the n year and increasing to 80,00 percent in the fourth consecutive year was of interest in that it suggested a high True Positive (TP) rate.

These results were significant. They represented the first occurrence of a situation in which we can see that the DSR effect was not present indicating that something has changed with regards to how the market operates. There was an increased degree of control making acreage more responsive to market forces.

4 CONCLUSIONS

The period 1980–2000 contained data that represented surging stock levels and what we have referred to as the DSR. Stock levels were among the underlying market characteristics that affected price volatility. Data suggest the disequilibrium created by the DSR has been responsible for market imbalances and the boom-and-bust cycles recorded in the hop industry. The increase in the concentration of power within the hop industry changes market dynamics. SAP data strong merchant oligopoly during times of deficit to a strong brewer oligopsony during times of surplus combined with forced contracting that is later renegotiated respectively contributes to the DSR. Reduced contract revenue following renegotiation and/or renegeing resulting from decreased prices enables lower profits than would otherwise be possible on the spot market without the presence of contracts (Cabral and Villas-Boas 2005).

The period 1998–2020 produced data that demonstrated the absence of the DSR during that time representing a significant change in market dynamics. One of the primary differences between the 1980–2000 and 1998–2020 periods was the ability to effectively regulate the production and saleable quantity of proprietary hop varieties using IPR. Intellectual property (IP)-related constraints to the market affected planting decisions (Stiglitz and Dixit 1977). Patented varieties represent the potential for legal monopoly control over a product. IPR empower individuals to regulate acreage, production, and therefore stocks of the varieties they own.

The DSR represented the natural dynamics of the hop market for centuries. The high concentration of proprietary hop varieties in the US industry altered those dynamics. It is still unknown whether their presence has completely removed the DSR or created an extended DSR that will reveal itself over a longer period. The authors speculate the latter will be the case, but further research in the future will be necessary to confirm this.

5 REFERENCES

- Bayarri, M.J., Berger, J.O. (2004): The Interplay of Bayesian and Frequentist Analysis. *Statistical Science*, 19, 58-80.
- DHWV (2012): Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. Market Report. International Hop Growers' Convention. Available at <http://www.hmelj-giz.si/ihgca/act.htm> (accessed May 11, 2022).
- Folwell R.J. (1982): The U.S. Hop Marketing Order: The Price of Success is Misunderstanding. Exhibit 28 USDA Federal Hop Marketing Order Hearings.
- Folwell R.J., Mittelhammer R.C., Hoff F.L., Hennessy P.K. (1985): The Federal Hop Marketing Order and Volume-Control Behavior. *Agricultural Economics Research* 37: 17-32.
- Goldthorpe J. (2001): Causation, statistics and sociology. *European Sociological Review*, 17: 1-20.
- Green K., Armstrong J. (2015): Simple versus complex forecasting: The evidence. *Journal of Business Research*, 68: 1678-1685.
- Henning J.A., Gent D.H., Twomey M.C., Townsend M.S., Pitra N.J., Matthews P.D. (2015): Precision QTL mapping of downy mildew resistance in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 202: 487-498.
- Hines K. (2015): A primer on Bayesian inference for biophysical systems. *Biophysical Journal*, 108: 2103-2113.
- Stiglitz J.E., Dixit A.K. (1977): Monopolistic competition and optimum product diversity. *The American Economic Review*, 67: 297-308.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2021): *Hoponomics: Market analysis applied to the hop industry 1980-2020*. Hamburg: Verlag Dr. Kovač, 197 p.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2022): The delayed surplus response for hops related to market dynamics. *Agricultural economics*, 68, 8: 293-298.
- Pavlovič M., MacKinnon D., Naglič B. (2022). Study of market supply statistics in trading of hops. *Hmeljarski bilten*, 29: 85-96.
- USDA NASS. (2013): WA Hops 1915-2013. Available at www.nass.usda.gov-Statistics_by_State-Washington-Publications-Historic_Data-hops-wahops.pdf (accessed April 28, 2022).
- USDA NASS. (2014): Hop Stocks Held by Growers, Dealers, and Brewers, United States (1,000 Pounds). Available at www.nass.usda.gov-Statistics_by_State-Washington-Publications-Historic_Data-hops-ushopstk.pdf (accessed April 28, 2022).
- USDA NASS. (2000-2020): NHR. Available at www.nass.usda.gov-Statistics_by_State-Washington-Publications-Hops-index.php (accessed March 29, 2022).
- Yekutieli D. (2012): Adjusted Bayesian inference for selected parameters. *Journal of the Royal Statistical Society*. Vol. 74, No. 3: 515-541.

IMPACT OF MICROBIOLOGICAL PREPARATION ON YIELD AND SEED COMPOSITION IN THE INDUSTRIAL HEMP VARIETY FUTURA 75 - PRELIMINARY RESULTS

Tamara KOROŠEC¹ and Alenka LEVART²

Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 25. 10. 2023

Accepted / Sprejeto: 11. 12. 2023

Abstract

Hemp cultivation in Slovenia currently takes place on just over a hundred hectares. The predominant varieties are those used for seed and seed-flower production (Futura 75 and Fedora 17), while smaller areas are dedicated to flower varieties. As hemp is promoted as a suitable crop for sustainable agriculture, we aimed to investigate whether we could influence the yield by using a microbiological preparation that is expected to enhance the utilization of nutrients from the soil, thereby reducing the need for conventional fertilization. During the 2022 growing season, we applied a commercial microbiological product containing a consortium of microbial species with the prevalence of the *Pseudomonas putida* strain to half of the test plots in the field trial. Compared to the control group, the group treated with microbiological product exhibited increased height, with indications of differences in root characteristics (larger main root mass, shallower roots with a larger main root diameter, and greater root ramification). However, there were no differences in flower, seed, and stem yields between the two groups. Furthermore, there were no variations in the analysis of basic seed nutrients, fatty acid composition, or CBD and THC content in the dried inflorescence. Given the prevailing drought conditions in 2022, it is essential to conduct additional research on tested microbiological preparation in order to draw credible conclusions and make recommendations for its further use in hemp production.

Key words: hemp, microbial preparations, nutritional composition, fatty acid composition, yield

¹ Dr., univ. dipl. inž. zoot., Kmetijsko gozdarski zavod Maribor, e-naslov: tamara.korosec@kmetijski-zavod.si

² Dr., univ. dipl. inž. kem., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, e-naslov: alenka.levart@bf.uni-lj.si

VPLIV UPORABE MIKROBIOLOŠKEGA PREPARATA NA PRIDELEK IN SESTAVO SEMEN INDUSTRIJSKE KONOPLJE SORTE FUTURA 75 - PRELIMINARNI REZULTATI

Izveček

Pridelava konoplje v Sloveniji trenutno poteka le na nekaj več kot sto hektarjih. Prevladujejo sorte za pridelavo semena in kombinacije seme-socvetje (Futura 75 in Fedora 17) ter na manjših površinah sorte za socvetja, katerih sortiment se iz leta v leto spreminja. Ker je konoplja rastlina, ki se promovira kot primerna za trajnostno kmetijstvo, smo želeli preveriti ali lahko vplivamo na pridelek z uporabo mikrobiološkega pripravka, ki bi naj povečal izkoristljivost hranil iz tal in tako zmanjšal potrebe po gnojenju. V poljskem poskusu smo v vegetacijski sezoni 2022 na polovici testnih ploskev aplicirali komercialni mikrobiološki preparat, ki vsebuje združbo različnih vrst mikrobov, s prevalenco seva *Pseudomonas putida* sp. V primerjavi s kontrolno skupino je skupina, tretirana s preparatom, zrasla višja, trend je nakazoval razlike v karakteristikah korenin (večja masa glavnih korenin, bolj plitke korenine z večjim premerom glavne korenine in večjo razvejanostjo in gostoto koreninske grude). Pridelek socvetja, semen in stebel se med skupinama ni razlikoval. Prav tako ni bilo razlik v sestavi osnovnih hranilnih snovi v semenu, maščobno-kislinski sestavi semena in vsebnosti CBD ter THC v biomasi socvetij. Zaradi izjemno neugodnih vremenskih razmer v letu 2022 (suše) bi bilo potrebno izvesti dodatne poskuse, da bi lahko podali kredibilne zaključke in priporočila za uporabo preizkušene komercialnega mikrobiološkega preparata v pridelavi konoplje.

Ključne besede: konoplja, mikrobní preparat, maščobno kislinska sestava, hranilna vrednost, pridelek

1 INTRODUCTION

Hemp, a versatile and environmentally friendly crop, has been gaining significant attention for its potential in various industries, including textiles, food, construction, and wellness products (Adamovičs and Zēverte-Rivža, 2015). With its ability to grow in diverse climates and soils, hemp holds great promise for sustainable agriculture (Sunoj Valiaparambil Sebastian et al., 2023).

Hemp production in Slovenia is decreasing. From approximately 500 hectares in 2015, the hemp cultivation area has decreased to 103.6 hectares in 2023 (Ministry for Agriculture, Forestry and Food of Slovenia - personal communication). French varieties continue to dominate, with Futura 75 and Fedora 17 being the most prevalent. These varieties are primarily grown for seed production (for oil) and for combined seed-flower production. There is a growing trend of small-scale cultivation, focusing on flower varieties such as Eletta Campana, Enectarol, and Midwest. Over the past three years, there has been a significant shift in the assortment. Some varieties that were highly represented in 2021 have practically

disappeared in 2023, including Antal, Carmagnola Selected, and Tiborszallasi (Ministry for Agriculture, Forestry and Food of Slovenia - personal communication).

Most hemp production in Slovenia is conducted in an extensive and environmentally friendly manner, 18.42 ha also under organic certification (Ministry for Agriculture, Forestry and Food of Slovenia - personal communication). Hemp is frequently recommended as a crop suitable for resource conservation in agriculture and as a plant adapted to climate change. It is typically grown without the use of herbicides, can withstand high temperatures and elevated CO₂ levels in the atmosphere, and is relatively drought-resistant (Chandra et al., 2011; Tang et al., 2018; Van der Werf, 2004). However, to achieve optimal yields it requires high-quality soils rich in organic matter, nutrients and irrigation in periods of drought (Bajić et al., 2022).

To reduce the use of mineral fertilizers, promote the mineralization of organic fertilizers, and enhance nutrient availability, the use of microbial preparations is becoming increasingly popular in agriculture (Jacoby et al., 2017). Microbial fertilizers harness the power of beneficial microorganisms to improve soil health and enhance plant growth. These microorganisms include nitrogen-fixing bacteria, mycorrhizal fungi, and other beneficial microbes that form symbiotic relationships with plants. The beneficial *Pseudomonas spp.* are ubiquitous in soils and competitively colonize all compartments of the plant microbiome, including the rhizosphere, the surface of aerial organs (phyllosphere), and the inner plant tissues (endosphere). The host plants, in turn, benefit from growth- and health-promoting effects (Balthazar et al., 2022). By incorporating these beneficial microbes into their farming practices, hemp growers, especially those who do not have their own organic fertilizers, might not only boost crop yields but also contribute to a more sustainable and environmentally friendly agricultural future.

In this context, we decided to test whether a commercial microbiological product based on the microbial consortia prevalent in *Pseudomonas putida* strain improves the utilization of nutrients from the organic matter of clover that was incorporated into the soil before hemp sowing. This test aimed to assess the impact of microbial preparation on biomass yield, plant development, and the nutritional quality of hemp seeds.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Field trial

A randomized block design (3 blocks x 2 treatments) to assess the impact of microbial preparation on hemp yield in a field experiment conducted at GERK PID 964486 (WGS 84 46°22'58,59" N 15°44'19,71" E) was employed during the 2022 growing season. The randomized block design was chosen to account for the expected spatial variability and to reduce the potential bias associated with soil heterogeneity. The chemical analysis of soil showed a pH of 6.09, 42.5 mg/100g P₂O₅, 31.5 mg/100 g K₂O and 4.13% of humus.

Cultivated field had a prior crop of black clover, which was ploughed under in spring before the field preparation for the hemp sowing. In this experiment, half of the designated plots received an application of a commercial microbiological consortia preparation (MICROB). The total number of microorganisms is declared as minimum of 4.10^9 CFU/cm³. The consortia consist of various microbial specimens like *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium* and prevalent *Pseudomonas putida*. The general objective of this preparation is to expedite the decomposition of post-harvest residues, straw, and organic matter within the soil matrix, concomitant with enhancing the assimilation of soil-borne nutrients. Conversely, the remaining half of the plots remained untreated, serving as the control group for comparison (CONTROL). All applications were administered during the evening hours, with subsequent seedbed preparation and the actual sowing performed post-application. No ordinary fertilizers were used.

The chosen hemp variety for seed production was Futura 75. Sowing density was 35 kg/ha. Sowing was conducted on 12th of June 2022 using a conventional grain seeder with inter-row spacing of 25 cm (every other row closed). Test plots measured 4x4 m each, samples were taken from one square meter in each plot.

2.2 Data Collection

Data collection involved monitoring crop growth parameters, pests, diseases and weeds throughout the growing season. The sampling was carried out on 26th of September 2022 after 98 days from sowing. We collected the plants manually from 1 m² in each block and measured plant height, seed, stem, main root and inflorescence yield, diameter of stems and main root, CBD content, basic nutrient content and fatty acid composition of seeds. Weeds were identified and their mass was determined. The seed yield in manual sampling was much higher than in harvest with combine harvester. Ten days after the samples were taken, the whole field was mechanically harvested for seed, namely. The yield of mechanically harvested seed was only 30 % of the manually harvested (calculated per hectare). This loss can be contributed to mechanical disturbances (seeds falling down) and bird consumption.

2.3 Fatty acid analysis of hemp seeds

Fatty acid analysis of hemp seeds was performed in laboratory of Department of Animal Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Hemp seeds were ground using laboratory homogenizer Grindomix (Retsch). The fatty acid composition of seeds was analysed using a gas chromatographic method after the *in-situ* transesterification of lipids, as described previously by Park and Goins (1994). Briefly, fatty acids seed samples (approximately 0.5 g) were transmethylated using 0.5 M NaOH in methanol followed by 14% BF₃ in methanol. Fatty acid methyl esters were extracted using hexane. For separation of fatty acid methyl esters, an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with an DB-FATWAX UI (30 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 μm, Agilent, Santa Clara, CA) and flame-ionization detector was used. Instrument was calibrated using Nu-Check-Prep (Elysian, MN) GLC reference

standards 411, 85, 68A and 674. Total fatty acids in seeds were calculated according to Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1998) by multiplying fatty acid proportion with lipid content in samples.

2.4 Proximate analysis of hemp seeds

The relative amounts of protein (AOAC Official method 954.01), lipid (AOAC Official method 954.01), water (AOAC Official Method 934.01), and ash (AOAC Official method 942.05) in seed samples were estimated by proximate analysis in the laboratory of Department of Animal Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Carbohydrate content in seeds was calculated by difference (100 – water – lipids – proteins – ash).

2.5 Cannabinoid analysis of inflorescence

Cannabinoid content was measured by Spectral Fingerprints laboratories (SFP d.o.o., Medenska cesta 4a, 1000 Ljubljana, Slovenia) with gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID full spectrum_v1.0).

2.6 Statistical Analysis

The two-way t-test was performed using SAS STAT software to compare the means of the MICROB and CONTROL group. The analysis included the calculation of the t-statistic, degrees of freedom, and the corresponding p-value. Prior to conducting the t-test, several assumptions were checked, including normality of the data distribution, homogeneity of variances, and independence of observations. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. The data of fatty acid composition was transformed by arcus sinus of square root to ensure normal distribution.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The average daily temperatures throughout the hemp growing season ranged between 10 and 29°C, with three heatwaves (June, July and August) during which the average daily temperature did not drop below 20°C. The longest heatwave period lasted from mid-July to mid-August (Table 1). In comparison, the thirty-year (1981–2010) average daily temperatures for the mentioned months were 18.6°C, 20.4°C and 19.6°C, respectively (ARSO, 2023). Simultaneously, in 2022 there were extended periods without precipitation, with the longest one occurring from mid-July to early August and the last one in the first half of October (ARSO, 2023). The total amount of precipitation in 2022 at the nearby meteorological station was 742.4 mm (Table 1), which is 190 mm less than the thirty-year average. The hemp crop visually appeared to be in better condition than the adjacent corn crops, which showed significant damage due to drought.

Table 1: Average and maximum temperatures, sunshine hours, and precipitation levels at the meteorological station at the airport »Edvarda Rusjana Maribor« (lon=15.6818, lat=46.4797, height=264m) (ARSO, 25.10.2023).

2022	Ave. T [°C]	Ave. max T [°C]	Abs. max T [°C]	Sunlight duration [h]	Precipitation [mm]
Jan	0.8	6.6	14.2	137	32.3
Feb	4.2	10.8	16.2	164.3	12.3
Mar	4.4	12.1	22.7	229.4	5.6
Apr	9.5	15.2	22.9	213.7	87.7
May	17.3	23.1	29.7	236.3	69.2
Jun	21.8	27.2	33.7	296.7	73.3
Jul	22.6	29.2	35.7	312	53.7
Aug	21.7	28.4	35.2	240.5	78.8
Sep	15.3	20.8	28.4	154.3	162.7
Oct	13.1	20	23	186.7	17.2
Nov	6.7	11.2	23.9	84.2	55.6
Dec	2.1	5.3	16.5	61.3	94
Year	11.6	17.5	35.7	2316.4	742.4

Hemp plants have grown significantly higher in the MICROB group (Table 2). Also, the yield of main roots showed a trend to be higher in the MICROB group (Table 3). The main roots in MICROB group tend to be shorter, with higher percentage of high ramification (28.3 % vs 19.7 % in CONTROL, data not shown) and wider main root diameter (Table 2). On the contrary, the results show numerically higher yield of aboveground biomass in the CONTROL group, however with no statistical significance (Table 3). This is probably connected with higher density of plants in this group. The density of plants was very variable, pointing out either problems with seeding or germination. *Pseudomonas putida* is a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that establishes commensal relationships with plants. The interaction involves a series of functions encoded by core genes which favour nutrient mobilization, prevention of pathogen development and efficient niche colonization (Molina et al., 2020). PGPRs were capable to improve growth and development, secondary metabolite accumulation and antioxidant capacity or Finola variety under glasshouse conditions (Pagnani et al., 2018). *Pseudomonas* sp. inoculation also increased the photosynthetic rate at the vegetative and reproductive stages, and the harvest index of a hemp (Lyu et al., 2019). Inoculation with other microorganisms, for example *Trichoderma harzianum*, positively affected root density, inflorescence number, fresh weight moisture and compactness of inflorescence and cannabidiol (CBD) content in Fedora 17 and Felina varieties (Kakabouki et al., 2021). Slow-release potassium fertiliser with added soil microorganisms increased stalk diameter, height, shoot dry weight and the contents of tetrahydrocannabinol (THC) and similar cannabinoids (De Prato et al., 2022). The problem in microbial effect on hemp yield might be in the periods of drought, which could negatively affect the microbial activity. *Pseudomonas putida* has very low

tolerance to air desiccation in comparison to other bacteria. Desiccated state has a decreased cell size, retracted cytoplasm and damaged membranes which can be repaired after prolonged rehydration or rehydration in the presence of plant root exudates (Pazos-Rojas et al., 2019). On the other hand, *Azotobacter chroococcum* strains, also present in the used microbial preparation, exhibited high tolerance to drought stresses and could alleviate the negative effects exerted by abiotic stress in tomato plants (Viscardi et al., 2016).

The conclusion of this preliminary trial is that in the following field trials, the microbial identification and activity should be measured alongside other parameters to confirm the effect of microbial preparations on plant production.

Table 2: Measurements of crop density and hemp plant height on microbially treated and untreated field areas (mean \pm std err)

	Plant density (1000 plants/ha)	Plant height (cm)	ϕ of stem (mm)	ϕ of central root (mm)	Root length (mm)
CONTROL	550.0 \pm 23.0	129.0 \pm 3.2	6.05 \pm 0.14	5.96 \pm 0.35	201.10 \pm 3.00
MICROB	463.3 \pm 117.2	144.8 \pm 3.9	7.15 \pm 1.00	7.11 \pm 0.57	189.20 \pm 5.81
P-value	0.538	0.037	0.385	0.052	0.166

Table 3: Yield (kg dry matter per hectare) of hemp biomass on microbially treated and untreated field areas (mean \pm std err)

	Yield of inflorescence (kg DM/ha)	Yield of seeds (kg DM/ha)	Yield of stems (kg DM/ha)	Yield of roots (kg DM/ha)
CONTROL	2000.6 \pm 450.4	1765 \pm 141.6	3600 \pm 236.8	235.0 \pm 20.7
MICROB	1598.7 \pm 361.0	1487 \pm 70.5	3492 \pm 419.8	396.3 \pm 49.0
P-value	0.297	0.179	0.836	0.064

We also sent the samples to the lab for informative cannabinoid testing, although the hemp in this case was grown for the seed production and cannabinoids were of no commercial interest. This is why we just made a joint sample from all three plots in each treatment/group. The percentages of CBD and Δ^9 -THC in both tested groups were identical, 0.82 % and 0.03 % of dried inflorescence mass, respectively. Thus, the CBD yield per hectare was 16.40 kg in CONTROL and 13.03 kg in MICROB group. Statistical analysis was not performed as we took only one average sample from all three plots from each group. The CBD content of our samples was higher if we compare it to the results of Burgel et al. (2020), where Futura 75 reached 0.15 % of CBD in inflorescence, yielding together 3,9 kg of CBD per hectare. The CBD content can be affected by several factors (weather conditions, daily light, fertilisation, time of harvest, stress etc.) thus CBD content of Futura 75 variety can vary from 0.14 %

to 2.2 % in the time of harvest (Folina et al., 2020; Hillig & Mahlberg, 2004; Pavlovic et al., 2019). From other cannabinoids and terpenes measured only cannabichromene (CBC) was detected in small percentage (0.04 % in both samples), all others were below detection level.

Table 4: The proximate analysis of hemp seeds (g per kg of dry matter (mean \pm std err))

(g/kg DM)	CONTROL	MICROB	P-value
Crude fibre	275.87 \pm 4.73	279.15 \pm 3.97	0.446
Crude ash	58.46 \pm 0.97	60.95 \pm 0.68	0.112
Crude fat	302.73 \pm 4.74	296.66 \pm 2.36	0.336
Crude protein	265.0.5 \pm 3.39	266.37 \pm 0.94	0.741
N-free extract	98.73 \pm 2.59	96.88 \pm 5.20	0.771

Proximate analysis showed no differences between the nutrient seed composition of two test groups (Table 4). The approximate hemp crude fat, protein and fibre content was around 30 %, 27 % and 28 %, respectively. The fatty acid profile of the seeds also showed a typical Futura 75 profile with no differences between microbially treated or untreated group (Table 5). The oil extracted from hemp seeds is highly nutritious because it is rich in polyunsaturated fatty acids (mostly linoleic acid, α -linolenic acid, oleic acid, and some rare fatty acids like γ -linolenic acid and stearidonic acid), some of which are essential and must be acquired from diet (Alonso-Esteban et al., 2023; Leizer et al., 2000). There are some studies which demonstrate that the use of *Pseudomonas* spp. inoculants increased seed yield, oil yield and/or composition in desirable fatty acids in other oilseed crops including sesame, sunflower, flax, soybean, canola, and corn gromwell (Balthazar et al., 2022). To our knowledge, this was not yet demonstrated for hemp. Additionally, more research is still needed to investigate the largely unknown mechanisms resulting in these alterations of seed oil content and composition by microbes.

Table 5: Fatty acid profile of hemp seed (g per 100 g of total fatty acids (mean \pm std err))

FA (g/100 g)*	CONTROL	MICROB	P-value
SFA	9.46 \pm 0.15	9.43 \pm 0.07	0,872
MUFA	10.95 \pm 0.23	10.8 \pm 0.16	0,637
PUFA	79.58 \pm 0.38	79.75 \pm 0.23	0,719
n6 PUFA	56.63 \pm 0.26	56.68 \pm 0.16	0,871
n3 PUFA	20.38 \pm 0.42	20.53 \pm 0.22	0,777
n6/n3 ratio	2.78 \pm 0.07	2.76 \pm 0.03	0,835
γ linolenic acid	2.56 \pm 0.23	2.54 \pm 0.04	0,951
Stearidonic acid	0.96 \pm 0.09	0.96 \pm 0.002	0,966

*For assessing normality of the data, the data was transformed by arc sinus square root transformation. The data presented in the table is means as gram per 100 grams of fat.

4 CONCLUSION

Unfortunately, based on preliminary one year experiment we cannot confirm any effective influence of used microbial consortia commercial preparation on measured parameters except plant height and a trend in changes of some root parameters. There are many possible reasons for such outcome, however none of them was confirmed. We did not test the viability of microbes in the preparation, neither did we have the possibility to measure the microbial populations in the soil during the vegetation season. Due to the drought conditions, various microbes in the consortia could be differently affected due to their different susceptibility to dry conditions. The microbes are not necessarily destroyed by drought, but can become temporary less active (depending on the species). However, there is still scientific evidence that even in drought stress conditions, plants benefit from microbial consortia applications to soil. We can conclude that the effectiveness of various new microbial commercial preparations should be regularly evaluated in field trials as outdoor field experiments are lacking and these preparations will gain more and more popularity in the future.

5 REFERENCES

- Adamovičs, A., and Zeverte-Rivža, S. (2015). *Industrial hemp (Cannabis sativa L.) productivity and risk assessment in hemp production*. 16, 18.
- Alonso-Esteban, J. I., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., de Cortes Sánchez-Mata, M., Torija-Isasa, E., & Guil-Guerrero, J. L. (2023). Fatty acids and minor functional compounds of hemp (*Cannabis sativa L.*) seeds and other Cannabaceae species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115, 104962. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104962>
- ARSO (25.10.2023) <https://meteo.arso.gov.si/met/sl/app/webmet/#webmet==8Sdwx2bhR2cv0WZ0V2bvEGcw9ydlJWbIR3LwVnaz9SYtVmYh9icIFGbt9SaulGdugXbsx3cs9mdl5WahxXYyNGapZXZ8tHZv1WYp5mOnMHbvZXZulWYnwCchJXYtVGdlJnOn0UQQdSf>
- Bajić, I., Pejić, B., Sikora, V., Kostić, M., Ivanovska, A., Pejić, B., & Vojnov, B. (2022). The Effects of Irrigation, Topping, and Interrow Spacing on the Yield and Quality of Hemp (*Cannabis sativa L.*) Fibers in Temperate Climatic Conditions. *Agriculture*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/agriculture12111923>
- Balthazar, C., Joly, D. L., & Fillion, M. (2022). Exploiting Beneficial *Pseudomonas* spp. For Cannabis Production. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.833172>
- Burgel, L., Hartung, J., Pflugfelder, A., & Graeff-Hönninger, S. (2020). Impact of growth stage and biomass fractions on cannabinoid content and yield of different hemp (*Cannabis sativa L.*) genotypes. *Agronomy*, 10(3), 372.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2011). Photosynthetic response of *Cannabis sativa L.*, an important medicinal plant, to elevated levels of CO₂. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17, 291–295.
- De Prato, L., Ansari, O., Hardy, G. E. St. J., Howieson, J., O'Hara, G., & Ruthrof, K. X. (2022). Morpho-physiology and cannabinoid concentrations of hemp (*Cannabis sativa L.*) are affected by potassium fertilisers and microbes under tropical conditions. *Industrial Crops and Products*, 182, 114907. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114907>

- Folina, A., Kakabouki, I., Tourkochoriti, E., Roussis, I., Pateroulakis, H., & Bilalis, D. (2020). Evaluation of the Effect of Topping on Cannabidiol (CBD) Content in Two Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivars. In *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture* (Vol. 77, p. 52). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:2019.0021>
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 91(6), 966–975. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.6.966>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—Current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1617.
- Kakabouki, I., Tataridas, A., Mavroidis, A., Kousta, A., Karydogianni, S., Zisi, C., Kouneli, V., Konstantinou, A., Folina, A., Konstantas, A., & Papastylianou, P. (2021). Effect of Colonization of *Trichoderma harzianum* on Growth Development and CBD Content of Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Microorganisms*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030518>
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, V., & Raskin, I. (2000). The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 2, 35–53. https://doi.org/10.1300/J133v02n04_04
- Lyu, D., Backer, R., Robinson, W. G., & Smith, D. L. (2019). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Cannabis Production: Yield, Cannabinoid Profile and Disease Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01761>
- Ministry for Agriculture, Forestry and Food of Slovenia - personal communication
- Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J.-L. (2020). Chapter Four—The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. In G. M. Gadd & S. Sariaslani (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 110, pp. 149–180). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.12.002>
- Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., Stagnari, F., Sergi, M., Lo Sterzo, C., Pisante, M., & Del Gallo, M. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial Crops and Products*, 123, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.033>
- Pavlovic, R., Panseri, S., Giupponi, L., Leoni, V., Citti, C., Cattaneo, C., Cavaletto, M., & Giorgi, A. (2019). Phytochemical and Ecological Analysis of Two Varieties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Grown in a Mountain Environment of Italian Alps. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01265>
- Pazos-Rojas, L. A., Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., Lopes-Olivares, F., Luna-Suarez, S., Baez, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Villalobos-López, M. A., De la Torre, J., & Muñoz-Rojas, J. (2019). Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. *PLOS ONE*, 14(7), e0219554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>
- Sunoj Valiarambil Sebastian, J., Dong, X., Trostle, C., Pham, H., Joshi, M. V., Jessup, R. W., Burow, M. D., & Provin, T. L. (2023). Hemp Agronomy: Current Advances, Questions, Challenges, and Opportunities. *Agronomy*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy13020475>
- Tang, K., Fracasso, A., Struik, P. C., Yin, X., & Amaducci, S. (2018). Water- and Nitrogen-Use Efficiencies of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Based on Whole-Canopy Measurements and Modeling. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00951>

- Van der Werf, H. M. (2004). Life cycle analysis of field production of fibre hemp, the effect of production practices on environmental impacts. *Euphytica*, 140(1–2), 13–23.
- Viscardi, S., Ventrino, V., Duran, P., Maggio, A., De Pascale, S., Mora, M. L., & Pepe, O. (2016). Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16, 848–863.

VALIDACIJA PLINSKO KROMATOGRFSKE METODE ZA DOLOČANJE SESTAVE ETERIČNIH OLJ KONOPLJE

Miha OCVIRK¹, Karin GOLE², Ksenija RUTNIK³ in Iztok Jože KOŠIR⁴

Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Prispelo / Received: 16. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 26. 10. 2023

Izvleček

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je znana predvsem zaradi psihoaktivne spojine delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) in kanabidiola (CBD). Poleg omenjenih spojin je konoplja bogata tudi z drugimi zdravilnimi in koristnimi snovmi, ki se nahajajo v eteričnem olju, med katere sodijo tudi terpeni. Področje raziskav terpenov je v zadnjem času naraslo predvsem zaradi njihovih pozitivnih učinkov na človeški organizem in njihovo uporabo v agronomiji. Kemotip konoplje določa sestavo komponent eteričnega olja in je odvisen od sorte in rastišča. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije smo optimizirali in validirali metodo za določanje sestave eteričnih olj konoplje. Validacijski postopek je zajemal preverjanje selektivnosti, linearnosti, točnosti, natančnosti, določitev meje zaznavnosti in meje določanja, na novem plinskem kromatografu Agilent GC8890. S tem smo skrajšali čas, potreben za kvantitativno analizo določanja sestave eteričnih olj konoplje.

Ključne besede: terpeni, LOD, LOQ, plinska kromatografija

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

Abstract

Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) is known mainly for the psychoactive compound delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). In addition to the mentioned compounds, hemp is also rich in other medicinal and useful substances found in the essential oil, including terpenes. Terpenes are compounds found in plants, herbs, fruits and vegetables and are responsible for their taste and smell. The field of terpene research has recently grown mainly due to their positive effects on the human organism and their use in agronomy. The chemotype of cannabis determines the composition of essential oil components and depends on the variety and the growing area. At the Slovenian Institute of Hop Research and

¹ Dr., Univ. dipl. inž. kem. tehnol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: miha.ocvirk@ihps.si

² Dipl. inž. kem. tehnol, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

³ Mag. inž.kem, IHPS, e-naslov: ksenija.rutnik@ihps.si

⁴ Dr. univ. dipl. kem., IHPS, e-naslov: iztok.kosir@ihps.si

Brewing, we optimized and validated a method for determining the composition of hemp essential oils. The validation process included checking the selectivity, linearity, accuracy, precision, determination of the limit of detection and the limit of determination on a new Agilent 8890 GC. With this, we have reduced time, needed for the analyses.

Key words: Terpenes, LOD, LOQ, gas chromatography

1 UVOD

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je dvodomna rastlina, ki spada v družino Cannabaceae in je najbolj prepoznana zaradi proizvodnje delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) (Chacon in sod., 2022a). V družino Cannabaceae spada tudi hmelj (*Hummulus Lupulus* L.). Na splošno obstajata dva tipa konoplje: vlaknasti in kanabinoidni tip. Vlaknasti tip konoplje ima visoko rast in se uporablja predvsem za vlakna in semena, medtem ko je kanabinoidni tip konoplje nižje rast in bogatejši s samimi kanabinoidi. Nadalje se konoplja deli na industrijsko konopljo in marihuano (Chen in sod., 2021). V večini evropskih držav vsebuje marihuana do 20 % THC glede na suho maso, medtem ko ima industrijska konoplja vsebnost THC nižjo od 0,3 % (Isidore in sod., 2021). Zaradi različnih spojin v konoplji, poskušajo raziskovalci karakterizirati posamezno spojino v kultivarje z vzpostavitvijo petih razredov kemotipov konoplje (Chacon in sod., 2022b). Kemotipi so rastline enakega rodu in po videzu enake, vendar imajo različno sestavo komponent v eteričnem olju. Danes je znanih več tisoč različnih kemotipov s podobnim imenom, vendar vsaka uspeva v različnih pogojih (Hanus in sod., 2020). Kemotipi se ločijo glede na vsebnost kanabinoidov; od tipa (I), ki ima najvišje razmerje med THC in kanabidiolom (CBD) do tipa (V), ki vsebuje zelo malo kanabinoidov (Chacon in sod., 2022b). Najbolj raziskana skupina so kanabinoidi, ki so produkt kondenzacije fenolnih spojin in terpenov. Vzrok, da so kanabinoidi najbolj raziskani, sta molekuli THC in CBD, zaradi svojih učinkov (Isidore in sod., 2021). Spojine, ki so odgovorne za vonj in okus zeliščnih in lesnatih rastlin, so terpeni. Terpeni so aromatične spojine, ki sestavljajo eterično olje in imajo široko uporabo v proizvodnji hrane in kozmetike, kjer jih dodajajo kot aromo (Bakro in sod., 2020). Terpene najdemo tudi v sadju in zelenjavi. Do sedaj so v konoplji identificirali več kot 120 terpenov, ki se nahajajo v socvetju konoplje, natančneje v tako imenovanih glandularnih trihomih (Chen in sod., 2021). Kemijsko gledano so terpeni 5-ogljikne enote, ki so med sabo povezane v verige (Chen in sod., 2021). Med sabo se ločijo glede na ponavljajočo enoto verig, imenovanih izoprenske enote. Ločimo tri vrste terpenov: monoterpene z desetimi ogljikovimi atomi, seskviterpene s petnajstimi ogljikovimi atomi in triterpene s tridesetimi ogljikovimi atomi (Andre in sod., 2016). Zaradi nepolarnega značaja so slabo topni v vodnem mediju. Temperatura vrelišča je od 119 °C do 198 °C. Na splošno so to zelo hlapne komponente in termično nestabilne, ki z oksidacijo preidejo v terpenoide (Chen in sod., 2021). Razlika med terpeni in terpenoidi je ta, da so terpenoidi terpeni, ki vsebujejo kisik (Hanus in sod., 2020). Koncentracija terpenov v eteričnem olju je odvisna od samega procesa pridobivanja, okoljskih

pogojev in zrelosti rastline. Monoterpeni imajo antioksidativno delovanje, delujejo tudi proti stresu, tesnobi in rakastim obolenjem. Po drugi strani imajo seskviterpeni protivnetno, protiglivično, protibolečinsko, protibakterijsko, protirakasto, proti depresivno, antioksidativno, antiproliferativno in nevroprotektično delovanje (Sommano in sod., 2020).

S separacijsko tehniko, imenovano plinska kromatografija, je bilo zaznanih in identificiranih že več kot 120 različnih komponent eteričnega olja. 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 termostatisirani pečici do detektorja. Najpogosteje uporabljen detektor je plamensko ionizacijski detektor (FID). 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 oz. komponento iz preiskovanega vzorca.

Namen raziskave je predstavitev analizne metode iz starejšega plinskega kromatografa Agilent GC 6890, na novejšo napravo Agilent GC 8890. Metoda je bila na tej napravi uporabljena prvič, zato je bilo potrebno izvesti celoten postopek validacije 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 (Zupan, 2009). Validacijo smo izvedli na petih pomembnejših komponentah eteričnega olja konoplje: α -pinen, mircen, limonen, linalol in β -kariofilen.

2 METODE DELA

Pri delu smo uporabili predpripravljene vzorce eteričnega olja konoplje sorte Fedora in Uso, pridobljenega z destilacijo z vodno paro, ki smo jih pripravili na Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Pred kromatografsko analizo na GC aparaturi je bilo potrebno eterično olje konoplje (0,1 mL) redčiti s heksanom (2 mL) analitske čistosti (Honeywell, Poljska). 1 μ L razredčenega vzorca eteričnega olja smo pod specifičnimi pogoji (European Brewery Convention, 2006) injicirali v injektor, segret na 180°C. Uporabili smo nepolarno kapilarno kromatografsko kolono HP-1 (25 m \times 0,2 mm \times 0,11 μ m) (Hewlett Packard, ZDA), prevlečeno z dimetilpolisiloksanom. Temperaturni program termostatisirane pečice je bil nastavljen na: 1 min pri 60 °C, 2,5 °C/min do 190 °C, 1 min pri 190 °C, 70 °C/min do 240 °C in 11 min pri 240 °C 11 min pri 240 °C. Pretok nosilnega plina je bil nastavljen na 14,35 mL/min.

Za obdelavo kromatogramov smo uporabili računalniško opremo OpenLab CDS (Agilent Technologies, 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 Z RAZPRAVO

3.1 Selektivnost

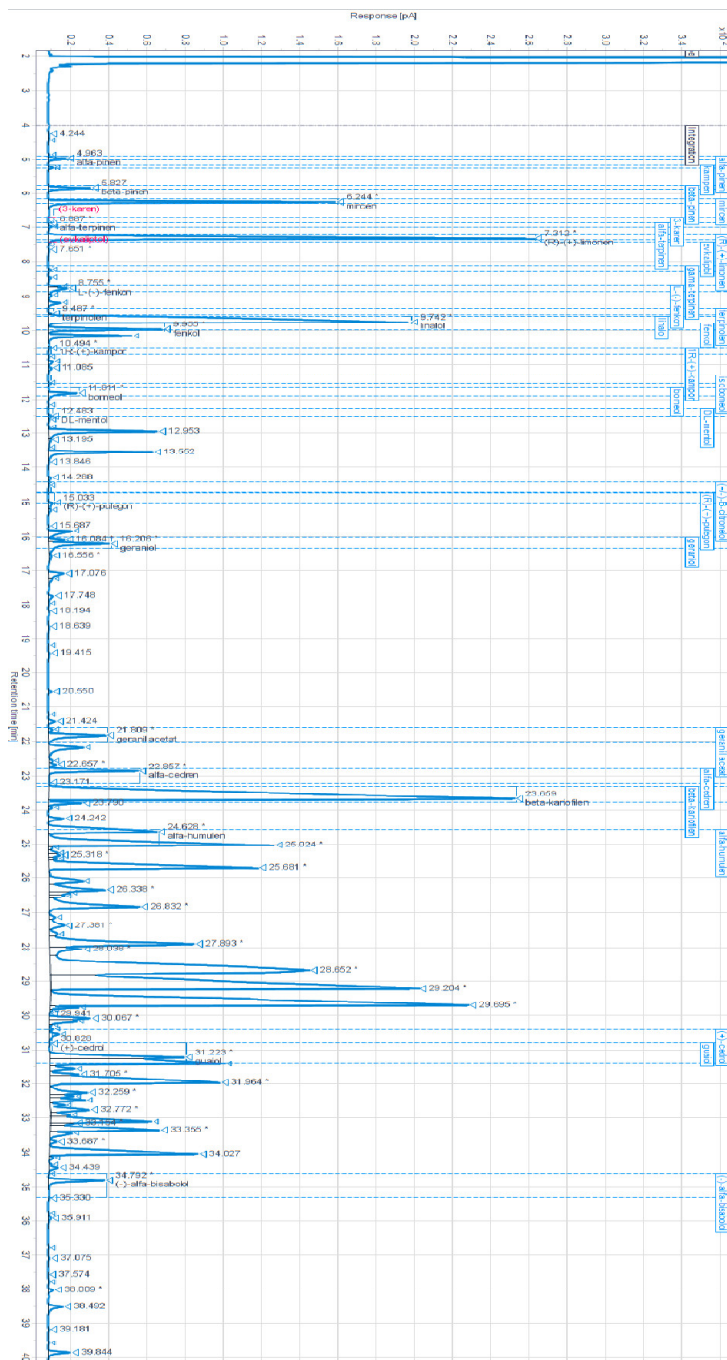
Da lahko metodo označimo za selektivno, mora biti izpolnjen pogoj, da so kromatografski vrhovi pri določenih retencijskih časih dobro ločeni. Če ta pogoj ni izpolnjen, je metoda neselektivna (Aslanyan in sod., 2016). Kromatografski vrhovi so bili simetrični in na kromatogramu dobro ločeni (slika 1),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

3.2 Natančnost

Vsaka izmerjena meritev se od prave vrednosti navadno vsaj malo razlikuje ali navzgor ali navzdol. Nihanje rezultatov oz. odklon podatkov od povprečne vrednosti podajamo s standardnim odklikom s oz. relativnim standardnim odklikom RSD, ki je izražen v odstotkih in je merilo natančnosti pri analizi podatkov. Relativni standardni odklon se izračuna z deljenjem standardnega odklika s povprečjem vrednosti. Natančnost meritve je obratno sorazmerna s standardnim odklikom. 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 (Rutnik, 2017; Zupan, 2009). Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri enakih pogojih opisuje ponovljivost. Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri različnih pogojih opisuje obnovljivost.

Izvedli smo sedem zaporednih kvantitativnih in kvalitativnih analiz pripravljenega eteričnega olja. Definirali smo, da je metoda natančna, če je RSD manjši od 20 %. 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.

Z vidika vsakodnevne uporabe analizne metode, je natančnost metode potrebno preverili še s t.i. obnovljivostjo, saj lahko analizo opravljamo v različnih dneh, letnih časih in različni analitiki. Enak postopek analize smo izvedli pri obnovljivosti metode s to razliko, da smo vzorce pripravili naslednji dan in opravili meritve.



Slika 1: Kromatogram preiskovanega eteričnega olja vzorca konoplje sorte Fedora, posnet na novem plinskem kromatografu Agilent 8890.

Pri vseh meritvah smo preverili morebitno prisotnost mimobežnikov z Dixonovim Q-testom, pri čemer ni nobena meritev izstopala. V obeh primerih je tako ponovljivosti kot tudi obnovljivosti pri vseh komponentah $RSD < 5 \%$, kar pomeni, da je metoda natančna (podatki niso prikazani). V primeru, da bi bil $RSD > 20 \%$, bi bila metoda nenatančna. Natančnost smo preverili tudi s t-testom z enačbo,

$$t_{izrač.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

kjer je:

- $t_{izrač.}$ izračunana vrednost t,
 \bar{x}_1 povprečna vrednost prve skupine meritev-ponovljivost,
 \bar{x}_2 povprečna vrednost druge skupine meritev-obnovljivost,
s skupni standardni odmik,
 n_1 število meritev po metodi A,
 n_2 število meritev po metodi B.

Pri vseh standardih je t-test pokazal, da med meritvami ni signifikantnih razlik (Evropska komisija, 2021).

Preglednica 1: Povprečna koncentracija analita v vzorcu, standardni odmik in relativni standardni odmik, izračunani na sedmih ponovitvah istega vzorca.

Ime komponente	y_1 [g/L]	y_2 [g/L]	y_3 [g/L]	y_4 [g/L]	y_5 [g/L]	y_6 [g/L]	y_7 [g/L]	Povpreč-na vrednost y [g/L]	s [g/L]	RSD [%]
α-pinen	1,11	1,07	1,06	1,03	1,00	0,99	1,01	1,04	$\pm 0,04$	4,25
Mircen	1,98	1,91	1,88	1,82	1,77	1,76	1,80	1,84	$\pm 0,08$	4,35
Limonen	0,46	0,44	0,44	0,42	0,41	0,41	0,42	0,43	$\pm 0,02$	4,42
Linalol	0,23	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	$\pm 0,01$	3,56
β-kariofilen	1,37	1,31	1,29	1,25	1,22	1,21	1,23	1,27	$\pm 0,06$	4,47

Kjer je:

y - masna koncentracija

s - standardni odmik

RSD – relativni standardni odmik

3.3 Točnost

Točnost smo podali kot izkoristek, ki je povprečna vrednost šestih paralelk, pri katerih smo vzorcu eteričnega olja dodali znano koncentracijo standardov. Iz površine pikov smo za vsako komponento izračunali koncentracijo in nato iz razlike koncentracij med vzorcem in vzorcem z dodanim standardom izračunali izkoristek za vsako komponento posebej. 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 80,5 % in 107,6 %, zato lahko zaključimo, da je metoda točna.

Preglednica 2: Izkoristek metode in standardni odmik za preiskovane analite

Ime komponente	Izkoristek [%]	s [%]
α-pinen	85,58	4,14
Mircen	106,12	5,33
Limonen	107,62	6,33
Linalol	102,26	6,83
β-kariofilen	106,73	7,14

Kjer je:

s - standardni odmik

3.4 Linearnost

Linearnost metode je sposobnost, da v določenim območju dobimo linearno proporcionalne odzive detektorja v odvisnosti od koncentracije vzorca (Rutnik, 2017; Zupan, 2009). 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.

Preglednica 3: Različne koncentracije standardnih raztopin preiskovanih komponent

Ime komponente	a [pA·s]	b [pA·s·L/g]	R ²	Koncentracijsko območje
α-pinen	-1,48	606,36	0,9999	0,03 – 1,15
Mircen	-2,27	476,50	0,9997	0,71 – 6,17
Limonen	-1,49	640,11	0,9997	0,16 – 1,43
Linalol	-34,51	513,50	0,9995	0,10 – 2,41
β-kariofilen	-33,31	667,42	0,9996	0,08 – 7,95

Kjer je:

a – odsek premice na ordinatni osi

b – naklon premice

R - korelacijski faktor

Za določanje linearnosti metode smo pripravili mešanico petih standardov različnih koncentracij v pričakovanem koncentracijskem območju. Pričakovana koncentracijska območja smo določili iz objavljene literature (Bakru in sod., 2020, Hacan in sod. 2022a, Sommano in sod. 2020). Pričakovane masne koncentracije smo izračunali iz podatkov o relativnem deležu (%) komponent v eteričnem olju. Iz rezultatov linearnosti (preglednica 3) vidimo, da so korelacijski faktorji vseh

komponent večji od 0,99, kar potrjuje linearnost metode v območju predvidenih koncentracij.

3.5 Meja zaznavnosti in meja določljivosti

Najnižjo koncentracijo analita v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, ne moremo pa je kvantitativno ovrednotiti, imenujemo meja zaznavnosti (Limit of detection - LOD). Določimo jo iz odseka in napake umeritvene krivulje (Rutnik, 2017; Tevž, 2014). Meje zaznavnosti so predstavljene v preglednici 5 in so bile izračunane iz pripravljene mešanice analitskih standardov. Najmanjša možna koncentracija analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo, imenujemo meja določljivosti (Limit of quantification - LOQ). Izračuna se iz umeritvene krivulje in standardnega odmika (Rutnik, 2017; Tevž, 2014). Meje detekcije so predstavljene v preglednici 5 in so bile izračunane iz pripravljene mešanice analitskih standardov.

Preglednica 5: Meja zaznavnosti in meja detekcije preiskovanih komponent

Ime komponente	LOD [g/L]	LOQ [g/L]
α-pinen	0,01	0,04
Mircen	0,11	0,37
Limonen	0,029	0,096
Linalol	0,062	0,205
β-kariofilen	0,18	0,60

Kjer je:

LOD – meja zaznavnosti

LOQ – meja določljivosti

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 v posodobljeni različici lahko uporabna za nadaljnje analize različnih eteričnih olj konoplje. Ugotovili smo, da ima vsaka preiskovana komponenta eteričnega olja drugačno mejo zaznavnosti in določljivosti zaradi različne polarosti.

5 VIRI

- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, str. 78–89
- Aslanyan, M. A., Bobritskaya, L. A., Nazarova, E. S., Mirnaya, T. A., & Zborovskaya, T. V. (2016). Development and Validation of a Gas Chromatography Method for Quantitative Determination of Lavendar Oil in Lavaflam Preparation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50(3), str. 200–204.

- Bakro, F., Jedryczka, M., Wielgusz, K., Sgorbini, B., Inchingolo, R., & Cardenia, V. (2020). Simultaneous determination of terpenes and cannabidiol in hemp (*Cannabis sativa* L.) by fast gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*, 43(14), str. 2817–2826.
- Chacon, F. T., Raup-Konsavage, W. M., Vrana, K. E., & Kellogg, J. J. (2022a). Secondary Terpenes in *Cannabis sativa* L.: Synthesis and Synergy. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, str. 3142.
- Chacon, F. T., Raup-Konsavage, W. M., Vrana, K. E., & Kellogg, J. J. (2022b). Secondary Terpenes in *Cannabis sativa* L.: Synthesis and Synergy. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 12, str. 289-295).
- Chen, C., & Pan, Z. (2021). Cannabidiol and terpenes from hemp – ingredients for future foods and processing technologies. In *Journal of Future Foods* Vol. 1, Issue 2, str. 113–127
- European Brewery Convention. (2006). *EBC Analytica, 7.12 - Hop Essential Oils by Capillary Gas Chromatography Flame Ionization Detection*.
- Evropska komisija. (2021). *Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-approval Control and Monitoring Purposes 1*.
- Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? In *Medical Cannabis and Cannabinoids*, Vol. 3, Issue 1, str. 61–73 S. Karger AG.
- Isidore, E., Karim, H., & Ioannou, I. (2021). Extraction of phenolic compounds and terpenes from cannabis sativa L. By-products: From conventional to intensified processes. In *Antioxidants*, Vol. 10, Issue 6, str. 115-124
- Rutnik, K. (2017). Optimizacija in validacija metode za določanje sestave eteričnih olj hmelja s plinsko kromatografijo, Diplomsko delo, FKKT MB.
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The Cannabis Terpenes. In *Molecules*, Vol. 25, Issue 24 Str. 65-76
- Tevž, D. (2014). Validacija plinsko kromatografske metode za določanje vsebnosti ogljikovodikov (c 10 -c 40) v tleh in odpadkih. Diplomsko delo, FKKT MB
- Zupan, J. (2009). *Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov*. Ljubljana: Kemijski inštitut. Str. 51-96

ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE CELOTNEGA GENOMA IN POPULACIJSKA STRUKTURA RAZLIČNIH GENOTIPOV NAVADNE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)

Marjeta ERŽEN¹, Andreja ČERENAK², Tjaša CESAR³ in Jernej JAKŠE⁴

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 16. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 6. 12. 2023

Izvleček

Zaradi tujeprašnosti vetrocvetnosti in dvodomnosti konoplje večkrat prihaja do navzkrižnega križanja dveh sort in ker so sorte konoplje populacijske, se znotraj sorte lahko pojavi neizenačenost med posameznimi rastlinami, kar privede do pojava različnih fenotipov. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali se fenotipi, odbrani na podlagi vizualnih lastnosti, med sabo razlikujejo tudi na genetskem nivoju. Znotraj treh različnih sort Carmagnole selected, Tiborszallasi in selekcije Finole smo odbrali fenotipe glede na vizualne lastnosti rastlin. Iz listov smo izolirali DNA in izdelali knjižnice NGS. Sledila je hibridizacija knjižnic NGS z biotiniziranimi vabami, obogatitev ulovljenih knjižnic s sondami ter sekvenciranje na napravi Ion Proton. Izvedli smo populacijsko strukturo genotipov in asociacijske študije celotnega genoma (GWAS). Z orodjem Admixture smo določili, da se preučevane sorte lahko razdelijo v največ pet skupin glede na populacijsko strukturo. Carmagnola selected se na genotipskem nivoju ni razlikovala, medtem ko smo lahko sorto Tiborszallasi, in selekcijo Finole razdelili v dve skupini. Na podlagi analize PCA smo na genetski ravni sorte ločili med sabo, medtem ko znotraj sort posameznih fenotipov ni bilo mogoče razlikovati. Na podlagi analize MLM smo analizirali 45 različnih fenotipskih lastnosti, v nadaljevanju pa izpostavljammo samo dve. Pri lastnosti CBD-A določili osem signifikantnih SNP, medtem ko smo pri lastnosti α -pinen določili 37 signifikantnih SNP. Za vse signifikantne pozicije smo določili tudi gene.

Ključne besede: *Cannabis sativa* L., genotipi, GWAS, konoplja, populacijska struktura

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

² Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

³ Mag. biotehnol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (UL BF), e-pošta: tjasa.cesar@bf.uni-lj.si

⁴ Prof. dr., UL BF, e-pošta: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY AND POPULATION STRUCTURE OF DIFFERENT HEMP (*Cannabis sativa* L.) GENOTYPES

Abstract

In the context of hemp, due to cross-pollination and dioecy, crossbreeding of two varieties often occurs. Since hemp varieties are population-based, differences among individual plants can arise within a single variety, leading to the emergence of different phenotypes. The aim of our research was to determine whether phenotypes selected based on visual characteristics also differ at the genetic level. Within three different varieties, namely Carmagnola selected, Tiborszallasi, and Finole selection, we selected phenotypes based on visual plant traits. We isolated DNA from the leaves and constructed NGS libraries. Hybridization of NGS libraries with biotinylated probes, enrichment of captured libraries with probes, and sequencing on the Ion Proton platform were performed. Population structure of genotypes and whole-genome association studies (GWAS) were conducted. Using the Admixture tool, we determined that all three examined varieties could be divided into up to five groups based on population structure. Carmagnola selected did not show genotypic differentiation, whereas both Tiborszallasi and Finole selections could be divided into two groups. Genetic differentiation between varieties was observed through PCA analysis, but differentiation between individual phenotypes within varieties was not possible. Through MLM analysis 45 different phenotype traits were analysed. In this article two traits will be exposed. Eight significant SNPs were identified for the CBD-A trait, while 37 significant SNPs were identified for the α -pinene trait. Genes were also assigned to all significant positions.

Keywords: *Cannabis sativa* L., genotypes, GWAS, hemp, population structure

1 UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.), ena izmed najstarejših gojenih rastlin na svetu (Andre in sod., 2016), je najbolj prepoznavna zaradi psihoaktivnega učinka kanabinoida THC. THC je eden od več kot sto kanabinoidov, ki imajo pomembno vlogo pri zdravljenju različnih bolezni (Namdar in sod., 2018). Drugi najpomembnejši sekundarni metaboliti so komponente eteričnega olja, odgovorne za vonj rastline in imajo sinergistični učinek s kanabinoidi (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016).

Konoplja je dvodomna in tujeprašna rastlina, kar lahko povzroči navzkrižno križanje dveh rastlin (Clarke in Merlin, 2013). Zaradi populacijskih sort pa prav tako lahko prihaja do neizenačenosti med rastlinami in pojava različnih fenotipov znotraj sorte (Barcaccia in sod., 2020).

Konopljin genom pri ženskih rastlinah meri 818 Mb, pri moških pa 843 Mb. Sestavljen je iz devetih parov avtosomnih kromosomov in enega para spolnih kromosomov (van Bakel in sod., 2011).

Prvi osnutek konopljinega genoma so leta 2011 objavili (van Bakel in sod., 2011) za sorto Purple Kush. Leta 2018 pa so (Grassa in sod., 2018) objavili genom sorte cs10 na ravni kromosomov. Z razvojem naprednejših in zmogljivejših tehnik sekvenciranja je mogoče sekvencirati daljša zaporedja ter veliko število zaporedij v kratkem času, pri nižjih stroških, večji kakovosti in manjši možnosti napake (Ambardar in sod., 2016). Z novejšimi tehnikami sekvenciranja so se razvijala tudi nova bioinformacijska orodja, hkrati pa je bilo omogočeno *de novo* sekvenciranje genomov kateregakoli organizma (Kulski, 2016). Sodobne tehnologije večinoma temeljijo na skupnih korakih, kot so: fragmentacija DNA, ligacija adapterjev ter sekvenciranje fragmentov.

Kar nekaj raziskav je že bilo narejenih z namenom ugotavljanja genetske raznolikosti predvsem med različnimi kultivarji konoplje pa tudi med podvrstami (Kojoma et al., 2002; Laverty et al., 2019; Soler et al., 2017; Grassa et al., 2021). Namen naše raziskave je bil ugotoviti populacijsko strukturo različnih genotipov navadne konoplje in ugotoviti ali so razlike vidne na fenotipski ravni vidne tudi na genetski ravni. Z asociacijskimi študijami celotnega genoma (GWAS) pa smo želeli opredeliti gene, ki se nahajajo na signifikantnih mestih za fenotipski lastnosti (CBD-A in α -pinen) ter jih z njima povezati.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Odbira fenotipov glede na vizualne lastnosti

Znotraj treh različnih sort konoplje (Carmagnola selected, Tiborszallasi in selekcija Finole) smo glede na vizualne lastnosti posameznih rastlin znotraj sort, ki smo jih spremljali skozi celotno rastno dobo, konec rastne dobe odbrali različne fenotipe (Eržen in sod., 2023). Odbirali smo jih glede na velikost rastline, barvo rastline, razvejanost, dolžino in kompaktnost socvetij, velikost listov in antociansko obarvanje listnih pecljev. Znotraj sorte Carmagnola selected smo določili dva fenotipa, in sicer CI in CII, znotraj sorte Tiborszallasi pet fenotipov: TI, TII, TIII, TIV, TV, ter znotraj selekcije Finola štiri fenotipe: FI, FII, FIII, FIV. Da smo ohranili rastline ne oprasene, smo enkrat tedensko posevek pregledali ter izločili rastline moškega spola. Za izolacijo DNA smo pri vsakem fenotipu vzorčili do 20 rastlin na fenotip. Liste smo po vzorčenju zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Izdelava knjižnice NGS

DNA smo prvo izolirali s pomočjo CTAB po hišnem protokolu (Kump in Javornik, 1996). Izolirano DNA smo z ultrazvočno kopeljo razbili na fragmente povprečne dolžine od 250 bp do 350 bp. Soniciranje je trajalo 30 minut. Uspešnost soniciranja smo preverili na agaroznem gelu, nato pa vzorce izpareli do $40\text{ }\mu\text{L}$ z evaporatorjem. Sledilo je popravilo koncev fragmentov pri čemer smo uporabili μL 10X T4 DNA ligaznega pufra (New England Biolabs, ZDA), $2\text{ }\mu\text{L}$ dNTP (10mM), $1\text{ }\mu\text{L}$ T4 polinukleotidne kinaze (10 U/ μL) (New England Biolabs, ZDA), $0,33\text{ }\mu\text{L}$ T4 polinukleotidne polimeraze (3U/ μL) (New England Biolabs, ZDA), $6,76\text{ }\mu\text{L}$

deionizirane vode ter 40 μL vzorca. Reakcijo smo termostatirali v cikličnem termostatu pri 25 $^{\circ}\text{C}$ (25 min) in 12 $^{\circ}\text{C}$ (10 min) in ohladili na 4 $^{\circ}\text{C}$. Reakcijo smo očistili z magnetnimi delci MagSi-NGSprep Plus (Magtivio, Nizozemska) (1,8-kratni volumen vzorca) in odstranili supernatant ter dodali 180 μL 70-odstotnega etanola. Fazo čiščenja smo ponovili še dvakrat. Po čiščenju smo izvedli ligacijo adapterjev. Uporabili smo naslednjo mešanico: 20 μL očiščenega vzorca, 3 μL 10X T4 DNA ligaznega pufra (New England Biolabs, ZDA), 0,42 μL P1 adapterja, 0,42 μL barkodnih oligonukleotidov, ki so bili za vsak vzorce drugi, 3 μL dNTP (10mM), 1 μL T4 DNA ligaze (New England Biolabs, ZDA), 0,66 μL deionizirane vode in 1,5 μL Bst 2.0 WarmStart DNA polimeraze (New England Biolabs, ZDA). Reakcijo smo termostatirali v cikličnem termostatu pri 22 $^{\circ}\text{C}$ (30 min) in pri 50 $^{\circ}\text{C}$ (20 min) ter ohladili na 4 $^{\circ}\text{C}$. Reakcijo smo ponovno očistili z magnetnimi delci in 70-odstotnim etanolom. Sledilo je pomnoževanje knjižnice NGS. Uporabili smo mešanico PCR 10 μL očiščene knjižnice, 10 μL 5X KAPA HiFi Fidelity pufra (Roche, Švica), 1,5 μL dNTP (10 mM), 2,5 μL P1amp začetnega oligonukleotida, 2,5 μL T_PCR_A začetnega oligonukleotida, 22,5 μL deionizirane vode in 2 μL HotStart DNA polimeraze (Roche, Švica). Pomnoževanje knjižnice je potekalo v cikličnem termostatu z začetno denaturacijo pri 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 minute, sledilo je 8 ciklov pri 98 $^{\circ}\text{C}$ (20 s), 60 $^{\circ}\text{C}$ (30 s) in 72 $^{\circ}\text{C}$ (30 s), zaključno podaljševanje je potekalo 1 minuto pri 72 $^{\circ}\text{C}$, sledilo je ohlajanje na 4 $^{\circ}\text{C}$. Produkte PCR smo ponovno očistili z magnetnimi delci in 85-odstotnim etanolom. DNA smo raztopili v 20 μL TE pufra. Sledila je kvantifikacija z napravo Agilent 2100 DNA Bioanalyzer in uporabo komercialnega kompleta DNA 1000 (Agilent Technologies Inc., ZDA).

Koncentracijo DNA smo izmerili s qPCR, pri čemer smo uporabili komplet KAPA Library Quantification Kit for Ion Torrent Platforms (Kapa Biosystems, ZDA). Knjižnice smo nato ekvimolarno združili v štiri reakcije do skupno 2000 ng DNA na reakcijo ter nato volumen skupne knjižnice izpareli z evaporatorjem do končnega volumna 7 μL .

2.3 Hibridizacija knjižnice NGS

Pripravili smo hibridizacijsko mešanico z biotiniliziranimi vabami (MyBites, Arbor Bioscience, ZDA). To smo inkubirali v cikličnem termostatu 10 minut pri 60 $^{\circ}\text{C}$ ter na sobni temperaturi 5 minut. Hibridizacijsko mešanico smo alikvotirali v štiri tubice v mikrocentrifugirki po 18,5 μL . Sledila je priprava mešanice začetnih oligonukleotidov, s katerimi hibridiziramo adapterje ter preprečimo nastanek konkatemerov. Tudi te smo po 5 μL alikvotirali v štiri tubice v mikrocentrifugirki in dodali 7 μL knjižnice v vsako tubico. Sledila je inkubacija v cikličnem termostatu pri 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 minut, nato smo temperaturo spustili do 65 $^{\circ}\text{C}$ in v ciklični termostat dodali stripe s hibridizacijsko mešanico. Inkubacija je potekala 5 minut, nato pa smo 18 μL hibridizacijske mešanice prenesli v PCR stripe z začetnimi oligonukleotidi. Sledila je ponovna inkubacija pri 65 $^{\circ}\text{C}$, 16 ur. Po inkubaciji smo pripravili streptavidinske magnetne kroglice (MyBites, Arbor Bioscience, ZDA), ki smo jih po 120 μL alikvotirali v štiri tubice v mikrocentrifugirki, dali na magnet in odstranili supernatant. Dodali smo 800 μL vezavnega pufra, ponovno dali na magnet, odstranili supernatant in postopek

ponovili še dvakrat. Sprane streptavidinske magnetne kroglice smo raztopili v 280 μL vezanega puфра ter jih alikovtirali v štiri tubice v mikrocentrifugirko po 70 μL . Kroglice smo segrevali na 65 °C 2 minuti ter nato v vsako tubico v mikrocentrifugirki k kroglicam dodali 30 μL ulovljene hibridizirane reakcije. Sledila je 5 minutna inkubacija pri 65 °C ter štirikratno spiranje z 180 μL Wash X puфrom. Reakcijo smo raztopili v 30 μL puфра E in pomnožili v cikličnem termostatu, pri čemer smo uporabili komercialni komplet KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, ZDA). Denaturacija je potekala 2 minuti pri 98 °C, sledilo je 10 ciklov pri 98 °C (20 s), 60 °C (30 s), 72 °C (30 s). Zaključno podaljševanje je potekalo 5 minut pri 72 °C. Reakcijo smo ohladili na 8 °C. Sledil je prenos supernatanta v nov strip ter čiščenje z magnetnimi kroglicami MagSI-NGSprep Plus. Reakcijo smo nato raztopili v 20 μL TE puфра. Koncentracijo reakcije smo določili s pomočjo qPCR, po postopku, ki je opisan zgoraj.

2.4 Sekvenciranje

Hibridizirane oz. ulovljene knjižnice s sondami smo združili v eno reakcijo s skupno koncentracijo 100 pM. Reakcijo smo nato pomnožili s sistemom Ion Onetouch 2 System (Thermo Fisher Scientific, ZDA), pri čemer je pomnoževanje potekalo 4 ure in 50 minut. Z uporabo kroglic Dynabeads My One Streptavidin C1 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) smo obogatili vezane fragmente na kroglicah. Za obogatitev smo uporabili napravo Ion OneTouch ES (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Obogatitev je potekala 37 minut. Reakciji smo dodali delce Ion PI Controle Ion Sphere Particles (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in sekvenčne oligonukleotide. Postopek obogatitve je bil izveden po protokolu (Ion PI™ ..., 2017a). Sledila je priprava sekvenatorja, ki je potekal po protokolu (Ion PI™ ..., 2017b), ter nalaganje vzorca na sekvenčni čip Ion PI Chip v3 (Thermo Fisher Scientific, ZDA), ki smo mu še prej dodali 6 μL Ion PI™ Hi-Q Sequencing Polymerase (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in 60 μL 50 % puфра za prileganje, ter zagnali sekvenciranje.

2.5 Analiza sekvenčnih podatkov

Po sekvenciranju smo surove sekvenčne podatke uvozili v program CLC Genomics Workbench 22. Podatke smo očistili slabih regij, izločili prekratka zaporedja ter izvedli analizo kvalitete podatkov. Nato smo na referenčni genom konoplje cs10 (GCA_900626175.2) kartirali sekvencirane odčitke. Sledil je postopek določanja SNP, za kar smo uporabili orodje GATK (angl. Genome Analysis Toolkit), pri čemer smo dobili končno datoteko VCF. Nato smo vzorce genotipizirali na podlagi 4537 analiziranih pozicij SNP.

2.6 Populacijska struktura genotipov

Za določanje populacijske strukture smo uporabili orodje Admixture 1.3.0. Genotipske podatke v obliki datoteke VCF smo pretvorili v obliko Plink in z orodjem Admixture pognali ukaz, za katerega smo predvidevali razporeditev genotipov v najmanj eno skupino in največ 20 skupin. Za vsako skupino je bila izračunana napaka

navzkrižnega preverjanja (CV) (angl. cross-validation error). Skupina z najnižjo CV vrednostjo je nato določila število populacij. Za vizualen prikaz razporeditve genotipov smo uporabili orodje Structurly 0.1.0.

2.7 Asociacijske študije celotnega genoma (GWAS)

Za izvedbo asociacijskih študij celotnega genoma smo uporabili orodje Tassel (različica 5.2.88). V program Tassel smo uvozili datoteko VCF z genotipskimi podatki. Manjkajoče genotipske podatke iz datoteke smo nadomestili z ukazom 'LD KNNi Imputation'. Ta temelji na kombinaciji algoritma k-najbližjih sosedov in neuravnoteženosti vezave. Sledilo je filtriranje genotipskih podatkov, kjer smo pogostost redkega alela določili pri 0,05, najvišjo porazdelitev heterozigotnosti pri 1,0, odstranili smo insercije in delecije ter SNP z majhno statistično verjetnostjo.

Sledila je izvedba metode glavnih komponent (PCA), pri čemer smo število komponent nastavili na 5. Na podlagi prvih dveh komponent smo s pomočjo programa R Studio izrisali grafe PCA.

Sledila je analiza linearnega mešanega modela (MLM), s katero smo opravili končno asociacijsko študijo celotnega genoma (GWAS), pri čemer smo 171 genotipskih podatkov združili z dvema fenotipskima podatkom, in sicer CBD-A in α -pinenom. Na podlagi združenih podatkov in analize Kinship smo izvedli analizo linearnega mešanega modela (MLM). Podatke smo vizualno prikazali v programu R studio z grafi tipa Manhattan, pri čemer smo z namenom zmanjšanja možnosti lažno pozitivnih vrednosti določili mejo FDR (angl. False Discovery Rate). Meja FDR je bila določena z ukazom 'qvalue'. Na podlagi p-vrednosti pridobljenimi z analizo MLM smo s paketom 'qqman' vizualno prikazali podatke z uporabo grafov tipa Manhattan.

Na podlagi pridobljenih signifikantnih pozicij SNP smo poiskali gene, ki se za posamezne lastnosti nahajajo na teh pozicijah.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

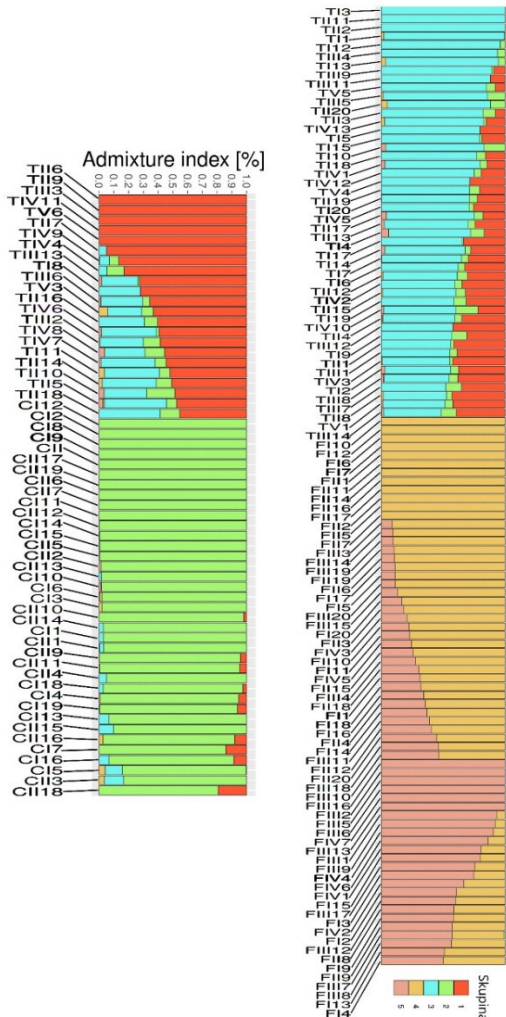
Za sekvenciranje 171 vzorcev smo uporabili dva čipa. Pri prvem čipu smo bili pri nalaganju na čip 90 % uspešni, povprečna dolžina odčitkov je bila 193 bp, skupno pa smo pridobili 87.961.831 uporabnih odčitkov, kar predstavlja 66 %. Pri drugem čipu smo bili 87 % uspešni. Povprečna dolžina odčitkov je bila 132 bp, pridobili pa smo 85.279.421 uporabnih odčitkov, kar, tako kot pri prvem čipu, predstavlja 66 %.

3.1 Populacijska struktura genotipov

Na podlagi genotipskih podatkov smo z orodjem Admixture razdelili v pet skupin, saj je imela skupina 5 najnižjo CV vrednost, in sicer 0,44940.

Vseh pet skupin smo vizualizirali s programom StructuRly. Skupine so prikazane na Sliki 1. Glede na genotipske podatke lahko rečemo, da je sorta Carmagnola selected na genetskem nivoju zelo homogena, saj celotna spada v eno skupino, kljub temu, da smo jo na fenotipskem nivoju lahko razdelili v dve skupini. Sorta Tiborszallasi in

selekcija Finole pa sta manj homogeni, saj lahko vsako sorto razdelimo v dve skupini, pri čemer so fenotipi znotraj posameznih sort naključno razdeljeni po skupinah. Kljub temu, da je konoplja populacijska sorta, so fenotipi znotraj sort dovolj izenačeni. Glede na barve, ki označujejo posamezne skupine, lahko vidimo, da imata sorti Carmagnola selected in Tiborszallasi nekaj podobnosti, medtem ko se selekcija Finole popolnoma loči od teh dveh sort, saj ne najdemo nobene sorodnosti s sortama.



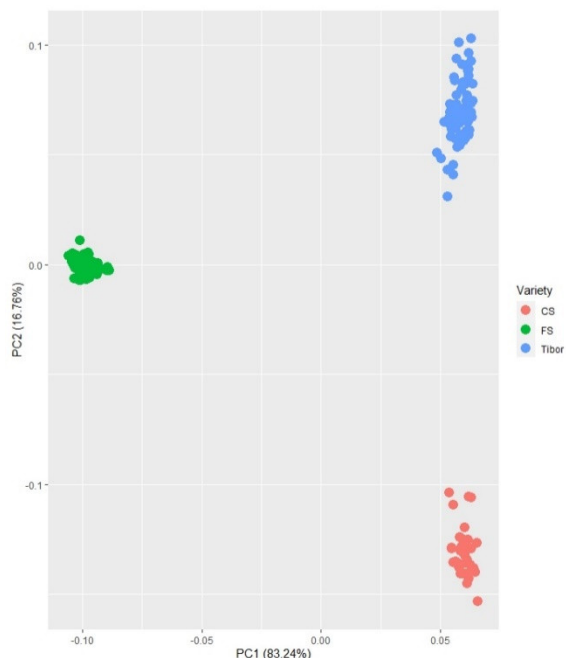
Slika 4: Populacijska struktura 171 različnih genotipov narejena na podlagi treh različnih sort konoplje, ki smo ji lahko na podlagi vizualnih lastnosti razdelili na različne fenotipe znotraj posamezne sorte. Rdeča in modra barva predstavljata sorto Tiborszallasi, zelena barva predstavlja sorto Carmagnola selected, rumena in bež barva pa predstavljata selekcijo Finole.

Homogenost sorte Carmagnola selected lahko pojasnimo s tem, da izvira iz stare italijanske sorte Carmagnola, katero so kot izvorno rastlino uporabljali pri žlahtnjenju številnih novih sort (Clarke in Merlin, 2013). Večja homogenost sorte Carmagnola selected se vidi tudi v tem, da smo pri tej sorti lahko določili je dva fenotipa, medtem ko smo pri ostalih dveh sortah določili štiri oz. pet fenotipov. V svoji raziskavi so sicer Sawler in sod. (2015) ugotovili, da je industrijska konoplja bolj heterogena od indijske konoplje ter da se podvrsti na genetski ravni signifikantno ločita med sabo. Heterogenost industrijske konoplje je odraz širšega genetskega bazena, prav tako pa je pri indijski konoplji bolj pogosto žlahtnjenje med bližnjimi sorodniki.

3.2 Asociacijske študije celotnega genoma (GWAS)

Po filtriranju podatkov v programu Tassel smo od skupno 4537 pozicij SNP dobili 3670 pozicij SNP.

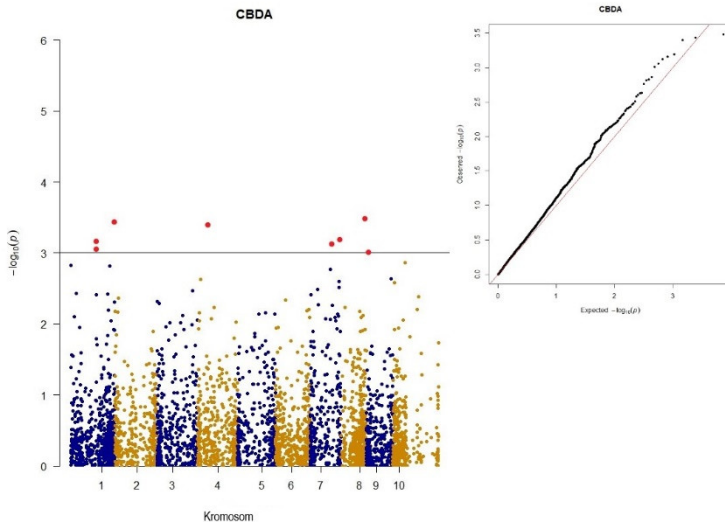
Z izvedbo analize PCA in vizualizacijo podatkov smo ugotovili, da se vse tri sorte popolnoma ločijo med sabo. Na Sliki 2 je prikazan graf analize PCA glede na vse tri sorte (Carmagnola selected, Tiborszallasi in selekcija Finole). Komponenta PC1 pojasni 83,41 % variance, komponenta PC2 pa 16,76 %.



Slika 5: Graf analize PCA na podlagi sort Carmagnola selected, Tiborszallasi in selekcije Finole.

Fenotipov znotraj posameznih sort ni bilo mogoče razlikovati.

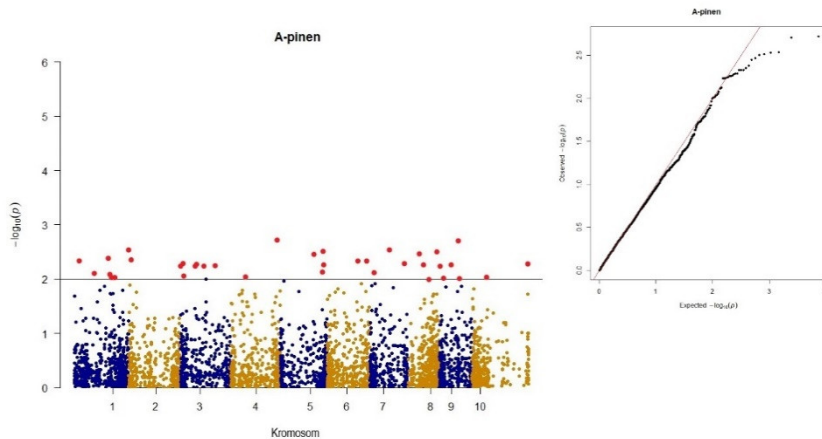
Asociacijske študije celotnega genoma smo izvedli na podlagi dveh fenotipskih podatkov vseh treh sort konoplje, in sicer na podlagi vsebnosti CBD-A in vsebnosti α -pinena. Na podlagi MLM analize in p-vrednosti posameznih signifikantnih pozicij SNP smo izrisali grafe tipa Manhattan za vsako lastnost.



Slika 6: Graf tipa Manhattan za lastnost CBD-A. Različne barve ločijo kromosome med seboj.

Lastnost CBD-A je imela nad statistično značilno FDR mejo 8 signifikantnih SNP: tri na kromosomu 1, en na kromosomu 4, dva na kromosomu 7, en na kromosomu 8 in en na kromosomu 9. Na signifikantnih pozicijah SNP kromosoma 1 se nahaja protein TSS, ki vsebuje domeno Clu (angl. protein TSS (Clu domain-containing protein), ta ima vlogo pri organizaciji organelov, dvokomponentni odzivni regulator- verjetni PRP 95 (angl. two-component response regulator-like PRR95), ki ima vlogo pri fosforilaciji in oligomerna kompleksna Golgijeva podenota 4 (angl. conserved oligomeric Golgi complex subunit 4-like), ki zagotavlja normalno delovanje Golgijevega aparata. Na signifikantnih pozicijah SNP na kromosomu 4 se nahaja verjetna glukana 1,3-alfa glikozidaza iz družine glikozidne hidrolaze, ki vsebuje domeno proteina N-terminal (angl. probable glucan 1,3-alpha-glucosidase- Glycoside hydrolase family 31 N-terminal domain-containing protein), ta sodeluje pri metabolnih procesih ogljikovih hidratov. Na kromosomu 7 najdemo encimu podoben barberinski most 15 (angl. berberine bridge enzyme-like 15), ki ima oksidoreduktazno aktivnost, v enako družino kot barberinski most pa spadajo tudi kanabinoidi CBD-A, THC-A in CBC-A (Onofri in sod., 2015). Na kromosomu 8 se nahajata dva gena, in sicer verjeten transkripcijski faktor WRKY 72 (angl. probable WRKY transcription factor 72), ta je vključen v rast in razvoj rastlin ter je vključen v stresni odziv. Verjetno pa deluje tudi kot represor ali aktivator stresnega odziva. Matoušek in sod. (2016) so pri hmelju

našli transkripcijske faktorje iz družine WRKY, ki imajo precej verjeten učinek na biosintezo lupulina. Na kromosomu 8 se nahajata tudi protein IQ-DOAIN 30 (angl. protein IQ-DOMAIN 31) ter beta-glukozidazi podoben SFR2, kloroplastičen gen (angl. beta-glucosidase-like SFR2, chloroplastic).



Slika 7: Graf tipa Manhattan za lastnost α -pinen. Različne barve ločijo kromosome med seboj.

Za lastnost α -pinen je bilo nad statistično značilno mejo FDR določenih 37 signifikantnih SNP. Pri določanju genov smo določili šest neopredeljenih genov. Na kromosomu 1 smo določili F-box ponavljajoči protein (angl. F-box/kelch-repeat protein At4g39560), ribosomalni biogenezni protein NOP53 (angl. ribosome biogenesis protein NOP53), aneksin D3, ki se veže na kalcij in se odziva na stres, DEAD box ATP odvisno RNA helikazo 31 (angl. DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 31), ki katalizira odvijanje DNA ali RNA, protein RBL, ki sodeluje pri prenosu signala. Na kromosomu 2 se nahaja nifU podoben protein 2 (angl. nifU-like protein 2, chloroplastic), ki regulira sestavo železovih in žveplovih skupin. Na kromosomu 3 smo določili rodanezi podobno domeno proteina 11 (angl. rhodanese-like domain-containing protein 11, chloroplastic), ki ima ob prisotnosti aktivne strani cisteina verjetno sulfotransferazno aktivnost, receptorju S podobna serin/threoninska proteinska kinaza At4g27290 (angl. G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g27290), ki je vključena v abiotski stres in rastlini omogoča prilagajanje na spreminjajoče okoljske faktorje, protein IQ-domena 0, T-kompleksni protein 1 (angl. T-complex protein 1 subunit delta), šaperon, ki pomaga pri zvijanju proteinov pri hidrolizi ATP in verjetno neaktivna vijolična kislinska fosfataza 27 (angl. probable inactive purple acid phosphatase 27), ki katalizira hidrolizo širokega spektra aktivnih mono in diestrov fosforjeve kisline in anhidridov. Na kromosomu 4 se nahajata gen beta galaktozidaza 3, ki sodeluje pri metabolnem procesu ogljikovih

hidratov in ribosomski biogenezni protein TSR3 homolog (angl. ribosome biogenesis protein TSR3 homolog). Na kromosomu 5 se nahajajo protein 1 toleranten na nekovine (angl. metal tolerance protein 1), ki ima transportno aktivnost kovinskih kationov, taumatinu podoben protein 1 (angl. thaumatin-like protein 1), ki ima obrambno funkcijo ter odziv na bakterije, 2-oksidooglutarat-Fe(II) tip oksidoreduktaze hxnY (angl. 2-oxoglutarate-Fe(II) type oxidoreductase hxnY), ki veže kovinske ione in ima oksidoreduktazno aktivnost. Na kromosomu 6 najdemo gen beta-heksosaminidaza 2, ki sodeluje pri metabolnih procesih ogljikovih hidratov in gen amidofosforibozil transferaraza (angl. amidophosphoribosyltransferase, chloroplastic-like). Na kromosomu 7 najdemo NR1/HIN1 podoben protein (angl. NDR1/HIN1-like protein 12), ki ima obrambno funkcijo, protein ATHB-14 leucinske zadrge- homeobox (angl. homeobox-leucine zipper protein ATHB-14), ki se veže na DNA in ima aktivnost transkripcijskega faktorja in vezavo lipidov in PHD prstni protein LFIN-LIKE 2 (angl. PHD finger protein ALFIN-LIKE 2). Na kromosomu 8 se nahaja transkripcijski terminacijski faktor MTEF18 (angl. transcription termination factor MTEF18, mitochondrial), ki se veže na promotor DNA in regulira mitohondrijsko podvajanje in transkripcijo, protein 4, ki se veže na plazmodezmatki kalus (angl. Plasmodesmata callose-binding protein 4) ter prolikopenska izomeraza (angl. prolycopenine isomerase, chloroplastic), ki sodeluje pri biosintetskem procesu karotenoidov. Na kromosomu 9 imamo fosfoprotein 1 (angl. stress-induced-phosphoprotein 1), protein ABA deficient 4 (angl. protein ABA DEFICIENT 4, chloroplastic), ki sodeluje pri biosintezi neoksantina in abscizinske kisline, protein RDM15, transkripcijski faktor SRM1, ki prav tako koordinira biosintezo abscizinske kisline in evkariontski translacijski iniciacijski faktor 2, podenota gama (angl. eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma), ki se veže na tRNA. Na kromosomu 10 pa se nahajata gen za vijolično kislinsko fosfatazo 2 (angl. purple acid phosphatase 2) in protein GIGANTEA, ki regulira fotoperiodo cvetenja.

4 ZAKLJUČEK

Zaradi populacijskih sort dvodomnosti ter tujeprašnosti vrste, prihaja pri konoplji pogosto do neizenačenosti in heterogenosti znotraj sorte. Zato je bil naš namen ugotoviti, ali se fenotipi odbrani na podlagi vizualnih lastnosti med sabo razlikujejo tudi na genetski ravni. Ugotovili smo, da se fenotipi na genetski ravni ne razlikujejo med sabo, medtem ko sorte se. Z analizo populacijske strukture sta se sorta Tiborszallasi in selekcija Finole lahko razdelili v dve skupini znotraj posamezne sorte, kar nakazuje na manjšo uniformnost kot pri sorti Carmagnola selected, ki je bila opredeljena kot ena skupina. Razlog za veliko raznolikost na fenotipskem nivoju bi lahko bil bolj okoljsko pogojen (vreme, lokacija, tla), kar pomeni, da bi lahko v več zaporednih letih poskusa ugotovili vpliv na število fenotipov znotraj sorte. Ker so bile sorte na genetski ravni bolj uniformne pomeni, da dejavniki, ki so vplivali na fenotipsko raznolikost niso genetsko pogojeni. Za boljše razumevanje konoplje na genetski ravni so potrebne nadaljnje analize delovanja različnih genov ter njihove povezave in vpliv na posamezne komponente, kar nam bi koristilo pri nadaljnji odbiri in žlahtnjenju novih sort z zaželenimi lastnostmi.

5 LITERATURA

- Aizpurua-Olaizola O., Soydaner U., Öztürk E., Schibano D., Simsir Y., Navarr, P., Etxebarria N., Usobiaga A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*. 2016; 79(2): 324–331.
- Ambardar S., Gupta R., Trakroo D., Lal R., Vakhlu J. . High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*. 2016; 56(4).
- Andre C. M., Hausman J. F., Guerriero G. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 1–17.
- Barcaccia G., Palumbo F., Scariolo F., Vannozzi A., Borin M., Bona S.. Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11: 573299.
- Clarke R. C., Merlin M. D. *Cannabis: Evoluton and Ethnobotany* (1st ed.). University of California Press. 2013.
- Eržen M. Določanje kemijske sestave terpenov in kanabinoidov ter genetske raznolikosti odbranih fenotipov navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.). Doktorska disertacija, Ljubjana. 118 str.
- Grassa C., Wenger J., Dabney C., Poplawski S., Motley S. T., Michael T., Schwartz C. J. Weiblen G. A complete *Cannabis* chromosome assembly and adaptive admixture for elevated cannabidiol (CBD) content. *BioRxiv*. 2018; 458083.
- Grassa C. J., Weiblen G. D., Wenger J. P., Dabney C., Poplawski S. G., Timothy Motley S., et al. A new *Cannabis* genome assembly associates elevated cannabidiol (CBD) with hemp introgressed into marijuana. *New Phytologist*. 2021 230:1665–79.
- Kojoma M., Iida O., Makino Y., Sekita S., Satake M.. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Planta Medica*. 2002;68:60–3. <https://doi.org/10.1055/s-2002-19875>.
- Kulski J. K. Next-Generation Sequencing – An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. In *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. 2016.
- Kump B., Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114(2): 149–158.
- Laverty K. U., Stout J. M., Sullivan M. J., Shah H, Gill N., Deikus G., et al. A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangement at the 1 A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangement at the 2 T. *Genome Research*. 2019;29:146–56.
- Matoušek J., Kocábek T., Patzak J., Bříza J., Siglová K., Mishra A. K., Duraisamy G. S., Týcová A., Ono E., Krofta K. The “putative” role of transcription factors from HIWRKY family in the regulation of the final steps of prenylflavonoid and bitter acids biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology*. 2016; 92(3): 263–277.
- Namdar D., Mazuz M., Ion A., Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*. 2018; 113(1): 376–382.
- Onofri C., De Meijer E. P. M., Mandolino G. Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry*. 2015; 116(1): 57–68.
- Sawler J., Stout J. M., Gardner K. M., Hudson D., Vidmar J., Butler L., Page J. E., Myles S. The genetic structure of marijuana and hemp. *PLoS ONE*. 2015; 10(8): 1–9.

- Soler S., Gramazio P., Figàs M. R., Vilanova S., Rosa E., Llosa E. R., et al. Genetic structure of *Cannabis sativa* var. indica cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. *Industrial Crops and Products*. 2017;104:171–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.043>.
- van Bakel H., Stout J. M., Cote A. G., Tallon C. M., Sharpe A. G., Hughes T. R., Page J. E. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology*. 2011; 12(10).

ŠKODLJIVCI IN BOLEZNI ZELIŠČ

Monika OSET LUSKAR¹

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 20. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 14. 12. 2023

Izvleček

Zelišča, katerih rastlinske dele v različnih oblikah uporabljamo v zdravilstvu in tudi kulinariki, so pri pridelovanju dovzetna za različne škodljive organizme, ki lahko poškodujejo njihove cvetove, liste, stebila, korenine, kar zmanjšuje njihovo uporabnost. V Sloveniji je pridelava zelišč v večini primerov na ravni dopolnilne dejavnosti na kmetijah oziroma je v večji meri samooskrbna. Način pridelovanja sledi v glavnem metodam ekološkega oziroma biodinamičnega pridelovanja. V članku predstavljamo nekaj skupin škodljivih organizmov, za katere ugotavljamo, da se pogosteje pojavljajo in povzročajo težave pri pridelovanju zelišč.

Ključne besede: zelišča, pridelovanje, škodljivi organizmi, metode pridelovanja

HERB PESTS AND DISEASES

Abstract

Herbs, whose plant parts are used in various forms in both medicine and culinary applications, are susceptible to various harmful organisms during cultivation. These organisms can damage their flowers, leaves, stems, roots, reducing their usability. In Slovenia, herb cultivation is mostly practiced as a supplementary activity on farms or is largely self-sustaining. The cultivation methods mainly adhere to the principles of organic or biodynamic farming. In this article, we present some groups of harmful organisms that are observed to occur more frequently and cause problems in herb cultivation.

Key words: herbs, cultivation, pests, cultivation methods.

1 UVOD

Zelišča (zdravilne in aromatične rastline) in njihovi pripravki so najstarejša oblika zdravljenja najrazličnejših bolezni. Še danes so dvema tretjinama človeštva zdravilne rastline glavna pomoč pri zdravljenju (Gale Toplak, 2015). V središču zeliščarstva je filozofija krepitev in podpiranja telesnih prirojenih funkcij in sposobnosti za dobro počutje in zdravljenje (Carpenter J., 2023). Pojem droga v fitoterapiji pomeni posušene ali drugače pripravljene rastline oziroma rastlinske

¹ Univ. dipl. inž. kmet., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: monika.oset-luskar@ihps.si

dele, ki so osnova za pripravo zdravilnih pripravkov, kot so čaji, izvlečki, tinkture, sokovi in podobno (Gale Toplak, 2015). Droga mora biti kvalitetna; zahteve za to so podane v evropski farmakopeji. Vpliv na kakovost droge ima več dejavnikov: rastne razmere (vremenske razmere, lastnosti tal, agrotehnika, poškodbe rastlinskih delov zaradi vremenskih nepravilnosti – veter, toča, zmrzal ...), mehanske poškodbe zaradi manipulacije z rastlinami pri pridelavi, predelave (sušenje ...) ter poškodbe zaradi škodljivcev in rastlinskih bolezni.

V članku smo se osredotočili na škodljivce in bolezni zelišč, predvsem tistih, ki lahko povzročijo pomembno ekonomsko škodo, in sicer glede na pregled literature in poročanje iz prakse. Pri posamezni skupini škodljivega organizma je na kratko navedena biologija ter škoda, ki jo povzročajo na zeliščih.

Da smo dobili informacijo, na kakšen način pridelovalci v Sloveniji pridelujejo zelišča, kar je bistvenega pomena za to, katere pripravke oziroma načine za obvladovanje škodljivih organizmov uporabljajo, smo vzeli za podlago rezultate anketne raziskave, ki smo jo izvedli v okviru ciljnega raziskovalnega projekta V4-2207 Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji (CRP Zelišča). Anketiranih je bilo 217 pridelovalcev. Večina se s pridelavo zelišč ukvarja ljubiteljsko (47,5 %) oziroma imajo registrirano dopolnilno dejavnost (40 %). Površine, namenjene pridelavi zelišč, so majhne; več kot polovica anketirancev (53,5 %) za pridelavo zelišč nameni manj kot 1 ar, četrtnina (26 %) pa od 1 do 10 arov. 80 % anketirancev pridelava zelišč predstavlja majhen dohodek (do 10 %), dohodek od 20–50 % pa le 3 % anketirancev. Način pridelave zelišč je v največjem deležu ekološki (73,3 %), sledi biodinamični način (11,5 %), 5,5 % pridelovalcev je v preusmeritvi načina pridelave iz integrirane ali konvencionalne v certificirano ekološko oz. biodinamično. Le manjši delež pridelovalcev (7,8 %) zelišča prideluje na integriran/konvencionalen način (CRP Zelišča, 2023). Tako smo se osredotočili predvsem na predstavitev metod za obvladovanje škodljivih organizmov z nizkim tveganjem, kajti pripravkov, dovoljenih v integrirani/konvencionalni in ekološki pridelavi, registriranih za zelišča, je v Sloveniji zelo malo.

2 ŠKODLJIVCI

2.1 Uši

Listne uši so majhne žuželke z mehkim telesom z dolgimi ozkimi ustnimi deli, s katerimi prebadajo stebela, liste in druge občutljive dele rastlin ter izsesavajo rastlinski sok, kar lahko povzroči rumenjenje, venenje in tudi sušenje delov rastlin ali celotnih rastlin, ter deformacijo rastlin. Listne uši lahko proizvedejo tudi velike količine lepljivega eksudata, znanega kot medena rosa, ki je lahko medij za različne plesni. Kot posledica nastane sajavost, ki zmanjšuje fotosintezo in spodbuja druge glivične bolezni. Listne uši so znani prenašalci različnih virusov in drugih patogenov. Običajno so najbolj razširjene ob vetrovnem robu posevkov in blizu drugih okuženih rastlin iste vrste. Škodljiva vrsta listne uši lahko prizadene le specifično rastlinsko

vrsto, skupino sorodnih vrst rastlin (npr. križnice) ali pa je precej polifagna znotraj družin rastlin in med njimi. Številne vrste listnih uši je težko ločiti med seboj, vendar je zatiranje večine vrst listnih uši podobno. Listne uši imajo mehka hruškasta telesa z dolgimi nogami in antenami ter so lahko zelene, rumene, rjave, rdeče ali črne, odvisno od vrste in rastlin, s katerimi se hranijo. Nekatere vrste so videti voskaste ali volnate zaradi izločanja voskaste bele ali sive snovi na površini telesa. Na splošno so odrasle listne uši brez kril, vendar se večina vrst pojavlja tudi v krilatih oblikah v času migracije iz letnega na zimskega gostitelja in obratno. Imajo več generacij na leto. Večina listnih uši se večinoma ali celo leto razmnožuje nespolno. Nekatere vrste proizvajajo spolne oblike, ki se pariyo in proizvedejo jajčeca jeseni ali pozimi, ki jih odložijo na alternativnega gostitelja, običajno na trajnico, kar zagotavlja prezimitev (Sorensen, 2009).

Uši so pogost škodljivec na različnih rastlinskih vrstah iz skupine zelišč. Predvsem napadajo rastline, ki imajo mesnate (sukulentne) debele, sočne liste. Kot že opisano, so poškodbe vidne v razbarvanosti in deformacijah listov, povzročijo zastoj ali popolnoma ustavijo rast in razvoj, kar seveda vpliva na pridelek. Poškodovani listi niso primerni kot droga za trženje in uporabo. Pogost škodljivec so na baziliki, sivki, meti, melisi, ognjiču, origanu, rožmarinu, artičoki, žajblju, citronki.

2.2 Pršice

Vse pršice imajo igličaste ustnike za prebadanje in sesanje iz rastlinskih celic in se razlikujejo od uši, ki sesajo iz listnih žil. Pršice se prehranjujejo tako, da z ustnim delom prodrejo v rastlinsko tkivo in sesajo sokove. Nahajajo se predvsem na spodnji strani lista. Vse pršice na gostiteljski rastlini predejo tanke mreže – od tod tudi njihovo ime. Prehranjevanje pršic povzroči nekrotične pege, ki se pojavijo v napredovalih fazah kot poškodbe listov. Poškodba odprtih cvetov s pršicami povzroči porjavitev, ki spominja na opekline s škropljenjem. Ko pršice odstranijo sok, se mezofilno tkivo sesede in na vsakem mestu hranjenja nastane majhna klorotična pega. Nadaljnje hranjenje povzroči pikčasto beljen učinek, kasneje pa listi postanejo rumeni, sivi ali bronasti. Če pršic ne zatiramo, lahko pride do popolne defoliacije (odpadanje listov). Ob velikih prerazmožitvah tega škodljivca na spodnji strani listov opazimo pajčevinasto prevleko, ki je naravna zaščita pršic prelk (Flint, 2018).

Najpogostejše pršice so tesno sorodne vrste v rodu *Tetranychus* in jih na terenu ni mogoče zanesljivo ločiti. Med njimi je najbolj zastopana *Tetranychus urticae* (navadna pršica), ki je polifagna vrsta in se pojavlja na več kot 200 rastlinah. Pršica je ovalne oblike, in je lahko rjava ali oranžno rdeča, vendar je najpogosteje zelena, zelenkasto rumena ali skoraj prosojna. Samica je dolga približno 0,4 mm z eliptičnim telesom, ki nosi 12 parov hrbtnih ščetin. Telo pršice je ločeno na dva različna dela: ustni aparat in preostanek telesa ter glave, prsnega koša in trebuha. Po izvalitvi iz jajčeca ima prvi nezreli stadij (ličinka) tri pare nog. Naslednji stadiji nimfe in odrasli osebki imata štiri pare nog. Skozi prozorno steno telesa je pogosto vidna telesna vsebina (velike temne lise). Ker so lise kopičenje telesnih odpadkov, lahko pršicam, ki so na novo odlegle, manjkajo lise. Samec je eliptičen s zoženim repnim koncem

in manjši od samice. S prostim očesom so pršice videti kot drobne premikajoče se pike, vendar so dobro vidne z ročna lečo s 10x povečavo (Flint, 2018).

Škodljivcu ustrezajo tople in suhe razmere. Razvoj pršic se v takšnih razmerah konča že v 6 do 7 dneh. Navadni pršici ustreza nizka relativna zračna vlaga (45–55 %), visoka temperatura (med 30 in 32°C) ter obilica svetlobe. V takšnih razmerah se rod razvije že v 8 do 12 dneh. Krajši dnevi in nižje temperature jeseni vplivajo na samice, da prenehajo odlagati jajčeca in se zavlečejo na skrivna mesta v armaturo rastlinjakov in drugam, kjer prezimijo kot odrasle samice. Zimske samice spremenijo barvo (rumeno oranžne) in postanejo bolj okrogle. Na leto imajo navadno več kot 10 rodov (Škerbot, 2015).

Pršice so kot uši pogosti škodljivci tudi na zeliščih. Najpogostejša opažanja pojava smo zasledili na citronki, rožmarinu, sivki, slezu ter meti. Močan pojav tega škodljivca lahko vodi v popolno defoliacijo rastlin (njihovih delov-listov).

2.3 Resarji

Resarji – tripsi, red Thysanoptera, so drobne, vitke žuželke z resastimi krili. Prehranjujejo se tako, da predrejo epidermalno (zunanjo) plast gostiteljskega tkiva in izsesajo celično vsebino, kar ima za posledico pikčaste, razbarvane madeže ali posrebrenje površine listov, povzročajo brazgotinjenje površine listov, cvetov in plodov ter deformirajo dele rastlin ali prenašajo rastlinske patogene. Hranjenje resarjev običajno spremljajo črni lakasti madeži (iztrebki). Večina odraslih resarjev je podolgovatih, vitkih, majhnih in ima dolge resice na robovih obeh parov svojih dolgih, ozkih kril. Ličinke so podolgovate ter nimajo kril. Barva večine resarjev sega od prosojno bele ali rumenkaste do temno rjave ali črne. Imajo več generacij (do približno osem) na leto. Ko je vreme toplo, se lahko življenjski cikel od jajčeca do odraslega osebka konča v 2 tednih. (Škerbot, 2015; Flint, 2018)

Resarji so pogost škodljivec, ki se lahko prekomerno razmnoži pri vzgoji sadik v rastlinjakih na različnih vrstah zelišč.

2.4 Ščitkarji

Ščitkarji so drobne žuželke, ki sesajo rastlinski sok. Najpogostejši vrsti sta rastlinjakov ščitkar (*Trialeurodes vaporariorum*) in tobakov ščitkar (*Bemisia tabaci*), ki sta polifaga. V primeru zelo velike populacije lahko hranjenje z rastlinskim sokom prizadene fiziologijo rastlin, kar se odrazi v zaviranju rasti, prvi znaki poškodb so blede lise na listih. V razmerah močne osvetlitve se napadeni listi zvijajo in odpadajo. Ščitkarji izločajo lepljivo medeno roso, na katero se naselijo glive sajavosti, pridelek – plodovi, listi so zaradi prizadetega videza netržni, sajavost na listih pa negativno vpliva na fotosintezo in transpiracijo. Ščitkarji dodatno škodo povzročijo s prenašanjem nekaterih virusov (Škerbot, 2015).

Ščitkar se razvije skozi tri življenjska obdobja: jajčece, nimfa in odrasel osebek. Odrasle samice ščitkarjev vstavijo svoja jajčeca v nežno rastlinsko tkivo in povzročijo drobne rane. Ličinke - nimfe se na splošno razvijejo skozi štiri razvojne stopnje, preden se preobrazijo v odrasli osebek. Škodljivec se nahaja na spodnji strani listov, celotni razvojni krog poteka na gostiteljski rastlini. Na rastlinah najdemo žuželko v vseh razvojnih stadijih: jajčeca, ličinke, puparije (4 - zadnja stopnja ličinke) in odraslega osebka. Ščitkarji običajno prezimijo v obliki jajčec, ki se izležejo pozno pozimi ali spomladi. Na območjih z milimi zimami so lahko vse faze prisotne vse leto. Rastlinjakov ščitkar ima letno tudi od 10 do 12 rodov (Škerbot, 2015).

Ščitkarji so kot resarji in tudi uši pogost škodljivec, ki se lahko prekomerno razmnoži pri vzgoji sadik v rastlinjakih na vrsti različnih zelišč. Pomembna škoda, ki jo povzročajo poleg primarne, v smislu slabe fiziologije rastlin, je tudi predvsem pri zeliščih sekundarna - s pojavom gliv sajavosti na prizadetih rastlinah, kajti tako poškodovani deli rastlin (listi, cvetovi ...) so pri zeliščih neprimerni za uporabo v smislu droge.

2.6 Polži

Polži sodijo med najbolj prezirane vrtno škodljivcev. Uvrščamo jih med mehkužce. Večina jih ima spiralno hišico, v kateri je drobovjak, in vpotegljivo nogo, prekrito z epitelom, v katerem so sluzne žleze, ki izločajo sluz. Na začetku noge je glava s tipalnicami. V ustih imajo s hrustancem ojačan jezik, na katerem je z zobci prekrita strgača, s katero strgajo hrano. Gospodarsko pomembni škodljivci gojenih in samoniklih rastlin so predvsem polži brez hišic, ki jih uvrščamo v družini lazarjev (*Arionidae*) in slinarjev (*Limacidae*). Polži so občutljivi na izsušitev, zato so aktivni ponoči in v oblačnem in deževnem vremenu. Večinoma ne povzročajo zelo velike škode, ob pre-razmnožitvah pa lahko zlasti na manjših omejenih območjih povzročijo precejšnjo škodo. Gospodarsko škodo povzročajo na vrtninah, poljščinah, sadnem drevju, grmovnicah, travi, zeliščih in okrasnih rastlinah. Najraje se hranijo z mladimi, komaj posejanimi rastlinami, objedajo sadike, liste, vejice, korenine, plodove in druge dele rastlin. Med slinarji je pomembna škodljiva vrsta veliki slinar (*Limax maximus*), ki najraje živi in se prehranjuje v vrtovih in sadovnjakih. Med lazarji poznamo pri nas devet vrst, med njimi pa so vrličkarjem in kmetovalcem poznani zlasti navadni vrtni lazar (*A. distinctus*), vrtni lazar (*A. hortensis*), sivi lazar (*A. circumscriptus*) in predvsem zadnjih deset do dvajset let tudi zelo agresivni španski lazar (*A. vulgaris* sinonim *A. luscitanicus*). Vrsta se zelo hitro množi in širi ter se je v zadnjih desetletjih v Sloveniji in drugod po srednji in vzhodni Evropi močno razširila. Lazarji so dvospolniki (hermafroditi), ki pa se večinoma medsebojno oplojujejo. Po paritvi oba osebka odlagata jajčeca v skupke na skrita mesta, kjer je zagotovljena vlaga. Jajčeca odlagajo spomladi ali jeseni v tla, pod gosto vegetacijo z organskimi ostanki na tleh in na druga zaščitena mesta, npr. v kompostne kupe. Jajčeca, odložena pozno jeseni, prezimijo (Flint, 2018; Lanovšek, 2021).

Polži ne napadajo rastlin z močnim vonjem npr. timijana, rožmarina, žajblja, prav tako ne rastlin, ki imajo dlakave liste. Tako lahko s primerno razporeditvijo rastlin v zeliščnem vrtu in druge pripravimo naravno bariero pred tem škodljivcem.

3 BOLEZNI ZELIŠČ

3.1 Pepelasta plesen

Pepelasta plesen je pogosta bolezen mnogih vrst rastlin. Obstaja veliko različnih vrst gliv pepelaste plesni (npr. *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp.) in vsaka vrsta napada samo določene skupine rastlin. Pepelasta plesen se najprej pojavi kot bele praškaste lise, ki se lahko tvorijo na obeh straneh listov, na poganjkih in včasih na cvetovih in plodovih. Te lise se postopoma razširijo na veliko površino listov in stebel. Izjema je pepelasta plesen, ki prizadene artičoke, čebulo, papriko in paradižnik; ta na listih povzroča rumene lise. Listi, okuženi s pepelasto plesnijo, lahko postopoma popolnoma porumenijo, odmrejo in odpadejo. Na nekaterih rastlinah lahko pepelasta plesen povzroči, da se listi zvijejo, upognejo ali kako drugače deformirajo. Pepelaste plesni potrebujejo za rast živo rastlinsko tkivo. Večina gliv pepelaste plesni raste kot tanke plasti micelija (glivičnega tkiva) na površini prizadetega dela rastline. Trosi, ki so primarno sredstvo za razpršitev, predstavljajo večino bele praškaste rasti, vidne na površini rastline, in nastajajo v verigah, ki jih je mogoče videti z ročno lečo; nasprotno pa trosi peronopore rastejo na razvejanih steblih, ki so videti kot drobna drevesca. Spore pepelaste plesni prenaša veter na nove gostitelje. Čeprav se zahteve glede vlažnosti za kalitev razlikujejo, lahko vse vrste pepelaste plesni kalijo in okužijo brez proste vode. Zmerne temperature (15 do 25°C) in senčne razmere so na splošno najbolj ugodne za razvoj pepelaste plesni. Spore in rast gliv so občutljive na ekstremno vročino (nad 32°C) in neposredno sončno svetlobo (Flint, 2018).

Pojav pepelaste plesni je ob optimalnih razmerah za to bolezen pogost na zeliščih iz družine ustnatic (žajbelj, meta, melisa ...), pogosto se pojavi tudi na slezenovcu.

3.2 Padavica

Padavico kalčkov in venenje sadik solatnic in drugih skupin rastlin povzročajo glive in glivam podobni organizmi (oomicete) iz rodov *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis* in nekaterih drugih. Glive, ki živijo v tleh in se ohranjajo tudi v rastlinskih ostankih, so v naravi splošno razširjene. Okužijo lahko že seme med vznikom, sejance neposredno po vzniku in tudi nekoliko starejše sadike. Težave zaradi padavice se pojavljajo predvsem pri pridelovanju sadik v zavarovanih prostorih in so bolj izrazite v obdobjih s slabšo osvetlitvijo in nižjimi temperaturami. Škodi, ki jo delajo omenjene glive, se v večji meri izognemo, če za gojenje sadik uporabljamo kakovosten substrat brez povzročiteljev bolezni in za namakanje čisto, nekontaminirano vodo. Trosi gliv so namreč pogosto navzoči v vodi, ki kroži v namakalnih sistemih, pa tudi v površinskih vodah. Bolezenska znamenja so precej

izrazita. Kot pove že ime bolezni, rastlinice po okužbi poležejo in se kmalu posušijo. *Pythium* lahko povzroči propad rastlinic že pred vznikom semena ali kmalu po razvoju prvih kličnih listov. Na spodnjem delu stebelca (hipokotilu) opazimo rjave lise mokrega videza, ki se širijo po rastlini navzgor in po koreninah navzdol. Ob višji vlagi se okrog stebelca razvije bela prevleka micelija, ki se lahko razširi na sosednje rastline, kadar je sklop gost. Za razliko od oomicet iz rodu *Pythium* lahko *Rhizoctonia* okužuje rastline v vseh razvojnih fazah, od komaj vzniklih pa do starih rastlin v fiziološki zrelosti. Mladim rastlinam stebela počrniijo v bližini koreninskega vratu, rast se ustavi, listi se sušijo. Pogosto se stebela toliko zožijo, da se prelomijo. Kadar je v rastni dobi veliko vlage in pride z glivo okužena zemlja v stik z zunanji listi zelja, lahko na glavah opazimo rjave pege, ki se širijo in gliva prodira v solatno glavo skozi več plasti listov. Med listi včasih najdemo micelij z majhnimi rjavimi sklerociji (Flint, 2018).

Plesnivke iz rodu *Pythium* okužujejo rastline v zgodnjih razvojnih stopnjah, ko so razviti prvi klični listi. Kasneje, ko rastlinsko tkivo dobi močnejšo strukturo in so rastline zaščitene pred vdorom oomicete, okužba ni več mogoča. Oomiceta se ohranja v odmrlih rastlinskih ostankih ali pa oblikuje trajne spore – oospore. V vlažnem okolju oospore kalijo posredno z zoosporami ali neposredno s kličnim mešičkom in okužijo korenine ali stebela. Patogen se v vodi na nespolen način hitro množi v več ciklih pri čemer nastajajo sporangiji in v njih zoospore. Na propadajočih rastlinah nastanejo oospore, ki so spolna oblika glive in služijo za ohranjanje, prezimovanje. Temperatura ima velik vpliv na kalitev oospor in sporangijev. Temperature nižje od 20°C, dobro prehranjene rastline in vlažne rastne razmere pospešijo širjenje glive *Pythium*. *Rhizoctonia* se ohranja v tleh ali na rastlinskih ostankih v obliki sklerocijev ali micelija. Na aktivnost glive vpliva več dejavnikov: prehranjenost, pH, vlaga, temperatura in mikrobiološka aktivnost tal. Gliva lahko okuži gostiteljsko rastlino tekom cele rastne dobe, najbolj dovzetne pa so mlade rastline. Jakost bolezni je odvisna od vremenskih in talnih razmer, kakor tudi od agresivnosti seva glive. Večinoma povzročitelji padavice niso omejeni samo na solatnice, temveč okužujejo tudi druge kmetijske rastline in se v tleh lahko ohranijo med rastnimi dobami tudi brez gostiteljske rastline (Flint, 2018).

Gliva lahko napade vrsto različnih zelišč, predvsem tistih, pri katerih poteka vzgoja sadik iz semena.

3.3 Peronospora

Okužbe s peronosporo lahko opišemo kot puhast videz belo sive do škrlatne plesnive prevleke, ki se običajno pojavi na spodnjih straneh obolelih listov. Poškodbe listov peronospore so pogosto oglate oblike in omejene z žilami. Na zgornji strani lista so pogosto vidna blede rumena, škrlatna ali nekrotična področja. Obsežna bolezen lahko povzroči odmrtje velikih delov listov. Pri nekaterih rastlinah, ko so okuženi mladi poganjki, lahko gliva sistemsko okuži rastlino, kar posledično pomeni zakrnelo, deformirano rast. V nasprotju s pepelasto plesnijo peronospora potrebuje za uspevanje zelo mokre ali vlažne razmere. Za okužbo je potrebna voda, za

sporulacijo pa vlažnost nad 90%. Nizke temperature spodbujajo rast patogena. Spore peronospore lahko preživijo več dni v hladnih in vlažnih razmerah. Prenašajo se po zraku in ko pristanejo na občutljivi rastlini s prisotno prosto vodo, se kalitev in okužba običajno pojavita v 8 do 12 urah. Nekatere peronospore proizvajajo tudi spolne spore (oospore), ki lahko preživijo suhe razmere. To omogoča patogenu preživetje v odsotnosti gostitelja. Peronospori so naklonjeni vlažni in hladni pogoji (Flint, 2018).

Pojav peronospore pogosto ugotavljamo na baziliki in sivki.

3.4 Siva plesen

Gliva, ki povzroča sivo plesen (*Botrytis cinerea*), napada liste in druge dele rastlin, ki so jih poškodovani žuželke ali polži, zmrzal ali drugi dejavniki. Okuženi deli rastlin na zunanji strani porjavijo. Na notranji površini npr. listov se razvije značilna siva rast *B. cinerea*. Gliva preživi na razpadajoči organski snovi. *Botrytis* je najpogostejši v deževnem vremenu (Flint, 2018).

4 OBVLADOVANJE ŠKODLJIVIH ORGANIZMOV NA ZELIŠČIH

V osnovi naj bi obvladovanje škodljivih organizmov potekalo po strategiji integriranega varstva rastlin (IPM - Integrated pest management). IPM temelji na ekosistemu, ki ima fokus dolgoročne zaščite pred škodljivci in njihovimi škodami s kombinacijo tehnik, kot so: biološki nadzor, upravljanje habitata, dobra agronomska praksa, mehanski in fizični nadzor, uporaba odpornih sort (kjer je to mogoče). Pesticidi se uporabljajo šele, ko spremljanje škodljivih organizmov pokaže, da so potrebni v skladu z uveljavljenimi smernicami, tretiranja pa se izvajajo s ciljem odstranitve le ciljnega organizma. Metode za zatiranje škodljivcev morajo biti izbrane in uporabljene na način, ki zmanjšuje tveganje za zdravje ljudi (Flint, 2018).

4.1 Obvladovanje škodljivih organizmov z metodami z nizkim tveganjem

Med okolju prijaznejše metode varstva rastlin in celovito ravnanje s kmetijskimi rastlinami spadajo naslednji preventivni ukrepi: izbira rastišča, kolobar, ustrezna obdelava tal, čas in gostota setve oziroma sajenja, rez, vzgojne oblike, setev mešanih ali vmesnih posevkov ali dosevkov, uporaba odpornih ali tolerantnih sort, sajenje ali setev certificiranega sadilnega ali semenskega materiala, gnojenje, namakanje, izsuševanje in higienski ukrepi. Med ukrepe metod varstva rastlin z nizkim tveganjem spadajo tudi fizikalni ukrepi, biotehniški ukrepi, uporaba koristnih organizmov za biotično varstvo rastlin, uporaba fitofarmaceutskih sredstev na podlagi mikroorganizmov, rastlinskih izvlečkov, feromonov in podobnih snovi (Bremness, 1994; Škerbot, 2015; Flint, 2018).

Osnovno vodilo je, da mora pridelovalec v nasadu ali posevku redno pregledovati in opazovati pojav škodljivih organizmov ter na podlagi lastne presoje ter izkušenj

izbrati najprimernejšo metodo varstva rastlin oziroma ustrezno kombinacijo metod ter fitofarmacevtska sredstva (FFS) uporabiti le takrat, ko presodi, da z metodami varstva rastlin z nizkim tveganjem ni mogoče zagotoviti zadovoljivega učnika obvladovanja škodljivih organizmov. V primeru uporabe FFS mora uporabnik upoštevati tudi informacije o pragu škodljivosti, če te obstajajo, o primernem času uporabe FFS in druge nasvete o uporabi tistih FFS, ki so ciljno naravnana za čim manjšo škodljivost za zdravje ljudi, neciljne organizme in okolje (Flint, 2018).

Biotično varstvo rastlin je način obvladovanja škodljivih organizmov v kmetijstvu in gozdarstvu, ki uporablja žive naravne sovražnike (koristne organizme), antagoniste ali kompetitorje ali njihove produkte in druge organizme, ki se morejo sami razmnoževati (Škerbot, 2015).

4.2 Obvladovanje škodljivih organizmov v integrirani in ekološki pridelavi

V tako imenovani integrirani pridelavi je v Sloveniji na voljo malo fitofarmacevtskih sredstev (FFS) za obvladovanje škodljivih organizmov na zeliščih. Sredstva, ki so na voljo, so sredstva, ki imajo insekticidno in fungicidno delovanje in sodijo v skupino biotičnih agensov, saj vsebujejo mikrobiotične agense, kot so bakterije, glive, ipd. (Seznam FFS, 2023) ali pa pripravke iz rastlinskih izvlečkov. Za uporabo po sistemu certificirane ekološke pridelave pa je na voljo še manj FFS. Navedeni so na Seznamu FFS, dovoljenih v ekološki pridelavi (Seznam ..., 2023)

5 ZAKLJUČEK

V Sloveniji poteka pridelava zelišč v večini primerov na ravni dopolnilne dejavnosti na kmetijah oziroma je namenjena samooskrbi. Pridelava je v glavnem naravnana v smeri ekološke oziroma biodinamične. V prispevku so predstavljene skupine škodljivcev in bolezni, ki so pomembni za zelišča, na osnovi naših opazovanj in citiranih raziskav. Kakor je razvidno iz raziskave, izdelane v okviru CRP Zelišča, pridelava zelišč v glavnem ni glavni vir prihodka pridelovalcem, zato najbrž ti ne poročajo o pretiranih težavah s škodljivimi organizmi oziroma niso pretirano pozorni na njihovo zatiranje. V kolikor pa pri pridelavi posežejo po uporabi FFS, uporabijo sredstva s seznama dovoljenih v ekološki pridelavi. Metode biotičnega varstva po poročanju pridelovalcev trenutno še niso v uporabi (CRP Zelišča, 2023).

Zahvala. Delo je nastalo v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta V4-2207 Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji (CRP Zelišča), ki poteka od 2022 do 2024 in ga financirata Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije in Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

6 VIRI

- Bremness L. The Complete Book of herbs: A practical Guide to growing and using herbs, A Dorling Kindersley Book 1994, str. 215-268 (288)
- Carpenter J., Carpenter M, 2023 The Organic Medical herb farmer revised edition How to produce high quality herbs on a market scale 393 str.
- CRP Zelišča, 2023 – še neobjavljeno gradivo, nastalo v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta V4-2207 Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji.
- Flint M.L., 2018 pest of the Garden and Small Farm, A growers` s guide to using Less Pesticide, University of California, Agriculture and natural resources, str. 249
- Gale Toplak K. Zdravilne rastline na Slovenskem, Mladinska knjiga, 2015, str. 8-11 (518)
- Lanovšek J, Žigon P. 2021 Pogoste bolezni in škodljivci rastlin, Elektronska izdaja dostopna na spletni strani Kmetijskega inštituta Slovenije (chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.kis.si/f/docs/Druge_publicacije/Bolezni_in_Skodljivci_Rastlin_2021-elektronska_prva_prenovljena.pdf)
- Sorensen, J.T. 2009, Aphids Encycyklopedia of Insects, 27-31
- Seznam registriranih fitofarmaceutskih sredstev na dan 24. 10. 2023 (<https://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/>).
- Seznam fitofarmaceutskih sredstev, dovoljenih v ekološki pridelavi na dan 24.10. 2023 (https://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/FFS_sezn.asp?L=1&S=2)
- Škerbot, I. 2015, Bionomija rastlinjakovega ščitkarja (*Trialeurodes vaporariorum* [Westwood], Homoptera, Aleyrodidae) v zavarovanih prostorih in njegovo zatiranje z mehkočno plenilko *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Heteroptera, Miridae): magistrsko delo [na spletu]. Magistrsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani. [Dostopano 24 november 2023].

VPLIV GNOJENJA Z DUŠIKOM IN GOSTOTE NASADA ROŽMARINA (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) SORTE ARP NA KOLIČINO IN KAKOVOST PRIDELKAV SPODNJI SAVINJSKI DOLINI

Nataša FERANT¹ in Barbara ČEH²

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 20. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 10. 12. 2023

Izvleček

V letu 2019 smo na poskusnem posestvu IHPS zasnovali triletni gnojilni poljski poskus z rožmarinom sorte Arp, v katerem smo želeli določiti optimalni odmerek dušika (0, 20, 40, 60 in 80 kg/ha N), v letu 2020 pa smo postavili triletni bločni poljski poskus, s katerim smo želeli določiti najprimernejšo razdaljo sajenja (30 cm x 30 cm, 40 cm x 40 cm, 50 cm x 50 cm, 60 cm x 60 cm) v razmerah Spodnje Savinjske doline. Na podlagi spremljanja pridelka, vsebnosti eteričnega olja in razraščенosti ter višine in širine grmičkov smo zaključili, da je najbolj primeren letni odmerek dušika za gnojenje rožmarina 20 kg/ha N, pognojen maja (svež pridelek 158 g/rastlino oziroma 63,2 kg/100 m²). Širina grmičkov in razraščенost grmičkov sta se značilno povečevala s povečevanjem razdalje med njimi in tudi s starostjo nasada. Najbolj primerna sadilna razdalja med rastlinami glede količine svežega pridelka na enoto površine se je v razmerah poskusa pokazala razdalja 40 cm x 40 cm (41 kg/100 m²). Zelo sušno leto 2022 je na pridelek rožmarina vplivalo značilno negativno (20 kg/100 m² v primerjavi s 30 in 35 kg/100 m² v letih 2020 in 2021). Vsebnost eteričnega olja je bila od 2,4 do 4,2 mL/100 g suhega vzorca, kar je skladno z zahtevami Evropske farmakopeje (minimalno 1,2 mL/100 g suhega vzorca).

Ključne besede: rožmarin, pridelek, vsebnost eteričnega olja, gnojenje z dušikom, gostota nasada

THE IMPACT OF NITROGEN FERTILIZATION AND PLANTING DENSITY OF ROSEMARY (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) VARIETY ARP ON QUANTITY AND QUALITY OF THE YIELD AT THE LOCATION OF LOWER SAVINJA VALLEY

Abstract

In the year 2019, we conducted a three-year fertilization field experiment with the Arp variety of rosemary at the IHPS experimental estate. The aim was to determine the most meaningful nitrogen dosage (0, 20, 40 N, 60 and 80 kg/ha N). In 2020, we established a three-year field experiment with the same variety, aiming to determine

¹ Mag., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: natasa.ferant@ihps.si

² Dr., IHPS, e-naslov: barbara.ceh@ihps.si

the most suitable planting distance (30 cm x 30 cm, 40 cm x 40 cm, 50 cm x 50 cm, 60 cm x 60 cm) in the conditions of the Lower Savinja Valley. Based on the monitoring of the yield, essential oil content and bushiness, as well as the height and width of the bushes, we concluded that the most suitable annual dose of nitrogen for rosemary fertilization is 20 kg/ha N, fertilized in May (fresh yield 158 g/plant or 63.2 kg/100 m²). The width and bushiness of the shrubs significantly increased with the widening distance between them and with the age of the plantation. The most reasonable spacing between plants in terms of yield in the experimental conditions was 40 cm x 40 cm (41 kg/100 m²). The very dry year 2022 had a significant negative impact on the yield (20 kg/100 m² compared to 30 and 35 kg/100 m² in 2020 and 2021). The essential oil content was from 2.4 to 4.2 mL/100 g of dry sample, which is in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia (minimum 1.2 mL/100 g of dry sample).

Keywords: rosemary, yield, essential oil content, nitrogen fertilization, planting density.

1 UVOD

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je vednozelen grm iz družine ustnatic (Lamiaceae), ki v naravi zraste 1–2 metra. Izvira iz Sredozemlja, že dolgo pa ga pridelujejo tudi v osrednji Evropi. Vsebuje eterično olje, čreslovine, grenčine, saponine, smole in organske kisline. Cenjen je tako v kulinariki kot za medicinske, aromatične in okrasne namene. Rožmarin kot začimba je znan po močnem, aromatičnem okusu. Pogosto se uporablja za izboljšanje okusa najrazličnejših jedi. Uporabni del – pridelek so listi. Uporabljajo se sveži ali posušeni.

Kot zdravilna rastlina se rožmarin tradicionalno uporablja za pomoč pri prebavnih motnjah, ima protivnetne lastnosti in pomaga pri lajšanju bolečin, izboljševanju spomina. Vsebuje spojine z antioksidativnimi lastnostmi, ki lahko pomagajo nevtralizirati škodljive proste radikale v telesu. Listi rožmarina namreč vsebujejo dva fenolna diterpena, karnozno kislino in karnozol, ki zagotavljata zaščito pred oksidativnim stresom z različnimi mehanizmi (Loussouarn in sod., 2017).

Eterično olje rožmarina se uporablja v aromaterapiji zaradi osvežujočega in poživljajočega vonja. Menijo, da spodbuja mentalno jasnost in budnost, pozitivno vpliva na krvni obtok (ga poživlja), zvišuje krvni tlak, krepi živce, pomaga pri starostnem opešanju srca, omili izčrpanost in lajša glavobole. Zaradi prijetnega vonja se uporablja v parfumi, milih in drugih kozmetičnih izdelkih. Po določilih Evropske farmakopeje (European Pharmacopoeia 5.0, 2004) naj bi rožmarin vseboval najmanj 1,2 ml eteričnega olja /100 g suhega vzorca.

Rožmarin gojijo kot okrasno rastlino v vrtovih zaradi dišečih listov in lepih modrih cvetov. Zaradi gostega listja je primeren za oblikovanje okrasnih toparijev (umetniško oblikovanje rastlin). Ima tudi kulturni in simbolični pomen. V različnih

kulturah je rožmarin simboliziral spomin in zvestobo. Pogosto se je uporabljal na porokah, pogrebih in pri drugih obredih. Povezan je z različnimi miti, legendami in vraževerji.

Rastlina rožmarina, ki je zdrava in stara 2 do 3 leta, ima pri ustrezni tehnologiji pridelave pridelek več kilogramov svežih listov na leto. Povprečni hektarski pridelek svežih listov in stebel je 20 ton. Povprečno razmerje med svežim in zračno suhim materialom je 3:1. Povprečen pridelek posušenih stebel in listja je 6,7 ton na hektar, samih listov pa 2,5 t/ha. Povprečna koncentracija eteričnega olja je okrog 0,3 % v svežem pridelku (stebela in listi), tako da računamo na pridelek 60 kg eteričnega olja na hektar. Te vrednosti tako za pridelek kot za eterično olje se nanašajo na letni pridelek zdravih in polnorodnih rastlin (starejših od 3 let), ki jih pridelujejo profesionalni pridelovalci (Rosemary Plant and Essential Oil Yield, 2023). V praksi lahko pride do znatnih odstopanj od teh vrednosti, saj je pridelek močno odvisen od številnih parametrov (sorte, starosti rastline, vremenskih razmer, rodovitnosti in drugih lastnosti tal, gnojenja, namakanja, zatiranja plevela in škodljivcev, načina spravila itd.). Pravilno obrezovanje spodbuja bolj grmasto rast in lahko vodi do večjih pridelkov, vendar se je treba izogibati pretiranemu obrezovanju, saj lahko to rastlino oslabi in se pridelek zmanjša. Pomembno je, da ne odrežemo več kot ene tretjine rastline naenkrat (Wikifarmer, 2023). Rožmarin sicer prenaša sušo, vendar je v komercialni pridelavi smiselno namakanje, da se zemlja za dlje časa popolnoma ne izsuši, saj to negativno vpliva na pridelek. Mlade rastline, ki jih vzgojimo bodisi iz semena ali potaknjencev, potrebujejo veliko več vode kot starejše, polnorodne rastline, z močno razvitim koreninskim sistemom. Če letna količina padavin presega 450 mm, se v pridelavi zelišč lahko običajno zanašamo samo na padavine, namakanje ni potrebno (Agri Farming, 2023). Vendar pa je to odvisno tudi od teksture tal. Po drugi strani pa, če rožmarin pretirano namakamo, lahko pride do gnitja korenin in glivičnih bolezni.

Rožmarin je postal zanimiv zaradi visoke vsebnosti snovi, ki delujejo antioksidativno. Te snovi so pomembne, ker lahko nadomestijo sintetične antioksidante. V Sloveniji je zanimanje s strani farmacevtske in tudi prehranske industrije po pridelovanju rožmarina za eterično olje in karnozolno kislino na večji površini (večji odkupni sistemi), saj je za industrijsko predelavo pomembna zadostna količina surovine izenačene kakovosti, kar lahko najbolje zagotovimo s pridelavo. Nabiranje v naravi po eni strani ne daje izenačene kakovosti, po drugi strani pa naj bi se izvajalo le za lastne potrebe. Za uspešno pridelavo, s primerno velikim pridelkom ustrezne kakovosti na večjih površinah, pa je potrebno pripraviti tehnološka navodila, prilagojena našim ravnim razmeram.

2 MATERIAL IN METODE

V letu 2019 smo na poskusnem posestvu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) zasnovali triletni gnojilni poljski poskus z rožmarinom sorte Arp, v katerem smo želeli določiti primeren odmerek dušika, v letu 2020 pa smo postavili triletni bločni poljski poskus z isto sorto, s katerim smo želeli določiti najprimernejšo

razdaljo sajenja v razmerah Spodnje Savinjske doline. Vse sadike smo vzgojili na IHPS od jeseni do pomladi v letu sajenja.

2.1 Tla na lokaciji poskusov

Tla na lokaciji, kjer smo postavili poskusa, so srednje težka, ekstremno preskrbljena s fosforjem ter ustrezno preskrbljena s kalijem in organsko snovjo (preglednica 1).

Preglednica 1: Rezultati analize tal na lokaciji poskusa

Globina odvzema vzorca (cm)	pH v KCl	P ₂ O ₅ * (mg/100 g tal)	K ₂ O* (mg/100 g tal)	Organska snov (%)
0-25	6,9	49,0 E (ekstremno preskrbljeno)	29,4 C (dobro preskrbljeno)	4,0 (dobro preskrbljeno)

2.2 Sorta Arp

Sorta Arp je med najbolj razširjenimi sortami za kulinarične namene, uporablja pa se tudi v medicinske namene. Bolje prenese nižje temperature kot nekatere druge sorte, tudi zmrzal, zaradi česar je priljubljena v regijah s hladnejšimi zimami. Ima blag, rahlo sladek okus in je zelo aromatična (Thedaily ECO, 2023). Liste lahko uporabljamo sveže ali posušene. Običajno raste kot srednje velik grm, ki doseže višino in širino od 0,9 do 1,2 m. Ima pokončno rast in sredi pomladi zacveti s svetlo modrimi cvetovi. Cvetovi so privlačni za čebele in druge opravevalce. Listi so ozki, igličasti, temno zeleni s sivim zgornjim delom. Dobro ukoreninjena rastlina je odporna na sušo (Gardenia Creating Gardens, 2023), vendar koristi namakanje v sušnih obdobjih, da se doseže dober pridelek (High Country countries, 2023; Mountain Valley Growers, 2023; Greenwood Nursery, 2023).

2.3 Gnojilni poskus z dušikom

Razdalja med rastlinami je bila v gnojilnem poskusu 50 cm x 50 cm, posadili smo po 25 rastlin na parcelo, velikost osnovne parcelice je bila tako 6,25 m². Poskus je bil postavljen kot bločni poljski poskus s tremi ponovitvami v letu 2019 in je trajal do leta 2021. Obravnavanja so bila: 0 kg/ha N (brez gnojenja z dušikom), 20 kg/ha N, 40 kg/ha N, 60 kg/ha N in 80 kg/ha N. Z dušikom (gnojilo KAN) smo gnojili pri vseh obravnavanjih istočasno, razlika je bila le v odmerku, in sicer: 13. 5. 2020 in 17. 5. 2021. Gnojilo smo ročno potrosili in ga zadelali v tla z okopavanjem. V prvem letu (2019) z dušikovimi gnojili nismo gnojili. Vsa tri leta nismo gnojili s fosforjevimi in kalijevimi gnojili, preskrbljenost tal s tema dvema hraniloma je bila sicer ekstremna oziroma dobra (preglednica 1). Vsi ostali agrotehnični ukrepi so bili enaki za vsa obravnavanja; okopavali smo in po potrebi opleli. Namakali smo v juniju in juliju v letu 2019 po enkrat, da se je prvoletni nasad dobro ukorenil. V letu 2020 nismo

namakali. Zaradi pomanjkanja padavin smo v letu 2021 namakali dvakrat, in sicer 21. 6. in 27. 7.

2.4 Poskus z gostoto nasada

Poskus je bil postavljen kot bločni poljski poskus s tremi ponovitvami v letu 2020 in je trajal do leta 2022. Obravnavanja so bila različne razdalje med rastlinami, in sicer: 30 cm x 30 cm, 40 cm x 40 cm, 50 cm x 50 cm, 60 cm x 60 cm. Na vsako parcelico smo posadili po 25 rastlin. Ker je bila različna razdalja med rastlinami, so bile osnovne parcele posledično različno velike (od 7,2 m² do 28,8 m²). Vsi ostali agrotehnični ukrepi so bili enaki za vsa obravnavanja. Okopavali in opleli smo po potrebi, gnojili smo vsa obravnavanja enako s foliarnim gnojilom Fructol Bio (0,5 % B, 0,8 % Fe, 0,8 % Mn, 0,08 % Mo, 0,8 % Zn), v odmerku 1 ml na liter vode, in sicer 23. 4. in 8. 8. 2020, 25. 4. in 10. 7. 2021 ter 25. 5. in 7. 7. 2022. Namakali smo v juniju in juliju v letu 2020 po enkrat, da se je prvoletni nasad dobro ukorenil, zaradi pomanjkanja padavin pa tudi v letu 2021, in sicer 21. 6. in 27. 7. V letu 2022 nismo namakali.

2.5 Vremenske razmere (podatki z referenčne postaje Spodnja Savinjska dolina)

V letu 2019 je bil maj moker in relativno hladen (159 mm dežja; 68 mm nad dolgoletnim povprečjem), povprečna temperatura zraka pa je znašala le 12,6°C (za 2,7°C nižje od dolgoletnega povprečja). Od 10. do 16. junija je bil prvi vročinski val (najvišje dnevne temperature vse dni zapored višje od 30°C). Predvsem v drugi dekadi junija smo beležili pogosta neurja s točo. V prvih dveh dekadah junija je skupaj padlo 55 mm dežja (30 mm pod dolgoletnim povprečjem). Tudi od 25. junija do 2. julija so se najvišje dnevne temperature kar petkrat povzpele nad 30°C. V juliju je padlo 124 mm dežja, bilo je 12 deževnih dni. Vremenske razmere so tako v juniju kot juliju ustvarjale zelo ugodne pogoje za razvoj glivičnih bolezní. Avgust je bil toplejši za 2,2°C, september pa za 1,3°C od dolgoletnega povprečja. V avgustu smo zabeležili 102 mm padavin (23 mm manj od dolgoletnega povprečja). V septembru je bilo 139 mm dežja in 13 deževnih dni. V obdobju junij – september smo na referenčni postaji zabeležili 527 mm padavin, kar je 30 mm več kot znaša dolgoletno povprečje.

V letu 2020 je bila zima nadpovprečno topla, sončna in skromna s padavinami ter po nižinah skoraj brez snežne odeje. V obdobju januar do 20. marec smo na referenčni postaji zabeležili le 108 mm padavin. Topli zimi je sledil hladen začetek pomladi (zadnja dekada marca za 2,4°C in prva dekada aprila sta bili za 0,8°C hladnejši od dolgoletnega povprečja). Sledilo je zelo toplo obdobje, ki je trajalo od druge dekade aprila do prve dekade maja. Od druge dekade maja do prve dekade junija je prevladovalo spet obdobje hladnejšega vremena. Vse tri dekade so bile od 1 do 1,9°C hladnejše od dolgoletnega povprečja. V spomladanskem obdobju (21. marec – 20. junij) smo zabeležili le 191 mm padavin. Pomanjkanje padavin, ki smo ga beležili v januarju in februarju, se je nadaljevalo tudi v marcu in aprilu. Od zadnje dekade junija

do konca septembra pa je bilo kar 601 mm padavin. V juniju do avgusta je bilo ekstremno deževno, s pogostimi nalivi in neurji. V obdobju april – september smo zabeležili 779 mm padavin, povprečna temperatura zraka pa je v tem obdobju znašala 17,3°C in bila za 0,8°C višja od vrednosti dolgoletnega povprečja.

Zima 2021 je bila nadpovprečno topla, bogata s padavinami. V aprilu in maju so bile povprečne temperature v vseh dekadah nižje od dolgoletnega povprečja. V aprilu je padlo 63 mm dežja (za 9 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje). Mesec maj je bil zelo hladen, padlo pa je nadpovprečno veliko dežja; bilo je kar 20 deževnih dni in 204 mm dežja (114 mm več kot v dolgoletnem povprečju). Junij je bil nadpovprečno topel in sorazmerno suh. Prvi vročinski val je trajal celo zadnjo dekada junija. V juniju je padlo 51 mm (za 82 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje). V obdobju april – junij so velika temperaturna nihanja zelo neugodno vplivala na rast in razvoj kmetijskih rastlin. Julij in avgust sta bila nadpovprečno topla, zabeležili smo dva vročinska vala. Od junija do avgusta je padlo 307 mm dežja (za 73 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje). Od aprila do septembra smo zabeležili 929 mm padavin (101 mm nad povprečjem), razporeditev le teh pa je bila predvsem v obdobju (april – junij) zelo neenakomerna, prav tako smo v tem obdobju beležili velika temperaturna nihanja, kar je neugodno vplivalo na rast kmetijskih rastlin. Neenakomerna razporeditev padavin se je v obliki nalivi in neurji s točo nadaljevala tudi v juliju in avgustu.

Zima 2022 je bila topla ter ekstremno suha, z izrazitim pomanjkanjem padavin in po nižinah tudi brez snežne odeje. V obdobju januar – marec smo zabeležili le 6 deževnih dni in 67 mm padavin (za 100 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje). Tudi marec je bil ekstremno suh. Pomanjkanje padavin v zimskih mesecih se je nadaljevalo še v obdobju april – maj. V aprilu smo zabeležili 52 mm, v maju pa 60 mm dežja. Mesec maj je bil nadpovprečno topel. Poletje (junij-avgust) so zaznamovale ekstremno visoke temperature s tremi vročinskimi vali in hudo pomanjkanje padavin. Suša je zelo prizadela kmetijske rastline. V prvih dveh dekadah junija so bila pogosta neurja s točo. Pomanjkanje padavin se je nadaljevalo še v juliju in avgustu. Referenčna postaja je julija zabeležila 62 mm (61 mm pod dolgoletnim povprečjem) in avgusta 62 mm (63 mm pod dolgoletnim povprečjem). Toplo vreme se je nadaljevalo do sredine septembra.

2.6 Vrednotenje poskusov

Grmičke smo porezali konec avgusta oziroma začetku septembra na višini 20 cm od tal, stehali svež pridelek vsake rastline posebej in odvzeli vzorce za določitev vlage za preračun v pridelek suhe snovi. Potem smo pridelek posušili in stehali maso posušenega pridelka. Pridelek smo preračunali tudi v pridelek na enoto površine (kg/100 m²). Pred spravilom smo izmerili še višino in širino vsakega posameznega grmička ter prešteli število glavnih in stranskih poganjkov. V letu 2021 smo stehali tudi liste in stebela in izračunali razmerje med njimi.

Kemično analizo listov smo izvedli po obravnavanjih v skladu z Evropsko farmakopejo. Določili smo vsebnost vlage, celokupnega pepela, v kislini netopnega pepela in eterično olje (vlaga po: Analytica EBC: 1997,7.2; celokupni pepel po ISO 928:1997, Spices and condiments-Determination of total ash; v kislini netopni preostanek po ISO 930:1997, Spices and condiments-Determination of acid-insoluble ash; količino eteričnega olja po ISO 6571:1984, Spices, condiments and herbs- Determination of volatile oil content).

Podatke smo obdelali s pogromoma Excel in Statgraphics Centurion.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

3.1 Gnojenje rožmarina z različnimi odmerki dušika

Gnojenje z dušikom ni značilno vplivalo na širino in višino grmičkov rožmarina, medtem ko je bil vpliv leta statistično značilen (preglednica 2); širina in višina grmičkov sta bili značilno največji v drugem preučevanem letu, sledilo je tretje leto, značilno najmanjše vrednosti so bile v prvem letu nasada.

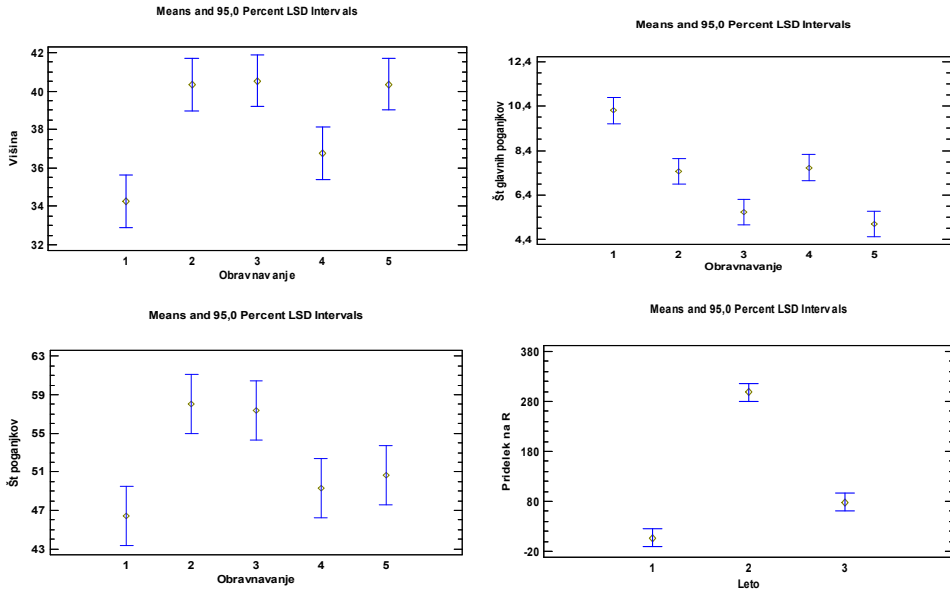
Preglednica 2: Višina, širina in število poganjkov na grmičkih rožmarina ter pridelek v gnojilnem poskusu z dušikom glede na dejavnik v poskusu (preučevano leto; letni odmerki dušika)

	Širina grmičkov (cm)	Višina grmičkov (cm)	Število glavnih poganjkov	Število poganjkov	Svež pridelek (g/rastlino)	Svež pridelek (kg/100 m ²)
Leto						
2019	25 a	27 a	-	35 a	7 a	2,6 a
2020	55 c	56 c	5,8 a	63 c	299 c	119,4 c
2021	38 b	32 b	8,6 b	59 b	78 b	31,3 b
Gnojenje z dušikom						
0 kg/ha N	37 a	34 a	10,2 c	46 a	101 a	40,4 a
20 kg/ha N	42 a	40 b	7,5 b	58 b	158 a	63,2 a
40 kg/ha N	42 a	41 b	5,6 a	57 b	142 a	56,6 a
60 kg/ha N	37 a	37 a	7,6 b	49 a	112 a	45,0 a
80 kg/ha N	38 a	40 b	5,1 a	51 a	126 a	50,4 a

*Enaka črka v stolpcu znotraj dejavnika (leto, razdalja) pomeni, da med obravnavanjema ni značilne razlike (Duncanov test, $p=0,05$)

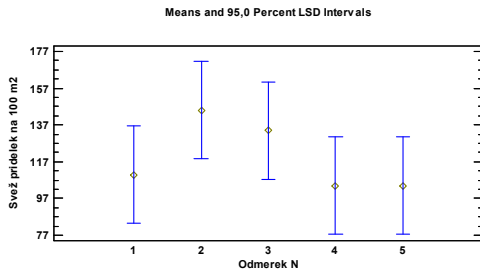
Največ glavnih poganjkov se je razvilo pri kontroli, kjer nismo uporabljali dušikovitih gnojil, z gnojenjem z dušikom se je število glavnih poganjkov na grmiček zmanjševalo. Število vseh poganjkov je bilo značilno večje pri odmerkih dušika 20 kg/ha in 40 kg/ha v primerjavi z ostalimi obravnavanji, pri teh dveh odmerkih se je nakazal tudi večji pridelek, kar sicer statistično nismo mogli potrditi.

Leto 2020 je imelo značilno najboljši vpliv na razraščanost grmičkov rožmarina (število poganjkov) in pridelek (preglednica 2). Sledilo je leto 2021, ko so zelo neenakomerna razporeditev padavin, ki so padle predvsem v obdobju april–junij, ter velika temperaturna nihanja tudi sicer zelo neugodno vplivali na rast kmetijskih rastlin. V prvem letu (2019) smo rastline šele posadili in so se šele dobro ukoreninile; širina in višina grmičkov sta bili zato v tem letu značilno najmanjši. Interakcija Leto x Odmerek dušika na pridelek (na rastlino in na enoto površine) ni bila značilna.



Slika 1: Višina grmičkov rožmarina (levo zgoraj), število glavnih poganjkov (desno zgoraj) in število poganjkov (levo spodaj) glede na letni odmerek dušika (1 = 0 kg/ha N, 2 = 20 kg/ha N, 3 = 40 kg/ha N, 4 = 60 kg/ha N, 5 = 80 kg/ha N) ter pridelek na rastlino glede na leto pridelave (desno spodaj; 1 = 2019, 2 = 2020, 3 = 2021)

Če pogledamo ugodno leto 2020 posebej, vidimo na sliki 2, da se je pridelek tudi posamično v tem letu nakazal kot večji pri odmerkih 20 kg/ha N in 40 kg/ha N.



Slika 2: Svež pridelek rožmarina na 100 m² (v kg) v letu 2020

V letu 2021 smo določili tudi razmerje med maso listov in stebel in ugotovili, da je bilo razmerje v večini primerov 50 % listov in 50 % stebel.

Vsebnost eteričnega olja je bila analizirana po obravnavanjih (po združenih vzorcih ponovitev). V letu 2019 je bila od 2,4 do 2,6 mL/100 g suhega vzorca, v letu 2021 od 2,6 do 3,0 mL/100 g vzorca, medtem ko je pozitivno izstopalo leto 2020, ko je bila vsebnost od 3,0 mL/100 g pri obravnavanju 80 kg/ha N do 4,0 do 4,2 mL/100 g pri ostalih obravnavanjih. Pri tem se nakazuje, da je pretirano gnojenje z dušikom negativno vplivalo na ta parameter in da ima leto določen vpliv na ta parameter. Po evropski farmakopeji naj bi bila vsebnost eteričnega olja najmanj 1,2 mL/100 g suhega vzorca, kar pa so dosegla vsa obravnavanja v vseh letih.

3.2 Gostota nasada rožmarina sorte Arp

Rezultati triletnega poskusa z gostoto nasada rožmarina so prikazani v preglednici 3 ter na sliki 3. Širina grmičkov se je značilno povečevala s povečevanjem razdalje med rastlinami in tudi s starostjo nasada. V višini grmičkov med obravnavanji ni bilo razlik. S povečevanjem razdalje med rastlinami se je značilno povečevala tudi razraščanost grmičkov, obenem je bila le-ta pričakovano večja v drugem in tretjem letu nasada v primerjavi s prvoletnim, ki se je šele ukoreninjal. Starejši kot je gram, širši je, saj z rezjo pospešujemo rast stranskih poganjkov.

Preglednica 3: Višina, širina in število poganjkov na grmičkih rožmarina ter pridelek pri različni razdalji med rastlinami glede na dejavnik v poskusu (preučevano leto; razdalja med rastlinami)

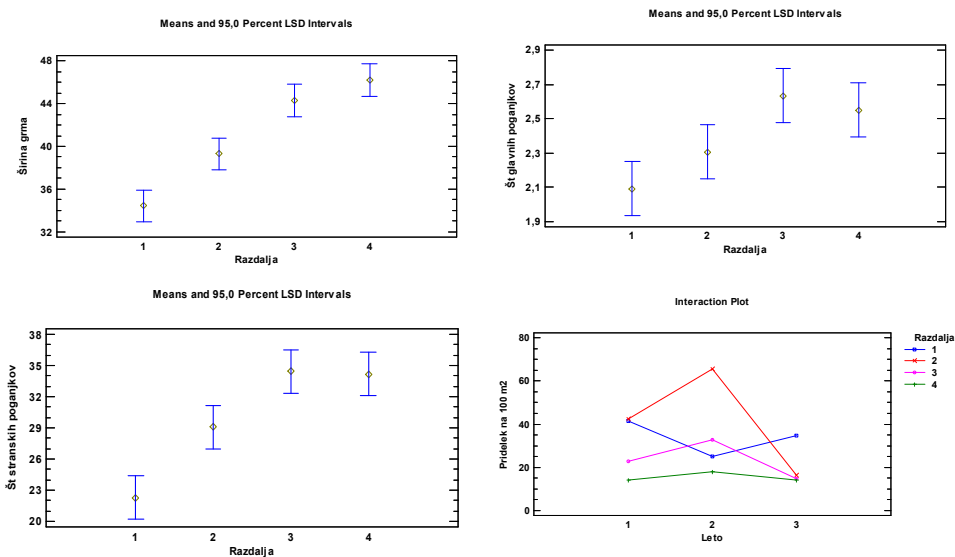
	Širina grmičkov (cm)	Višina grmičkov (cm)	Število glavnih poganjkov	Število stranskih poganjkov	Svež pridelek (g/rastlino)	Svež pridelek (kg/100 m ²)
Leto						
2020	27 a*	44 a	2,0 a	20 a	53 b	30 b
2021	43 b	50 b	2,7 b	40 b	69 b	35 b
2022	54 c	49 b	2,5 b	-	36 a	20 a
Razdalja						
30 cm x 30 cm	34 a	48 bc	2,1 a	22 a	30 a	34 bc
40 cm x 40 cm	39 b	45 a	2,3 ab	29 b	66 b	41 c
50 cm x 50 cm	44 c	47 ab	2,6 c	34 c	59 b	23 ab
60 cm x 60 cm	46 c	50 c	2,5 bc	34 c	56 b	15 a

*Enaka črka v stolpcu znotraj dejavnika (leto, razdalja) pomeni, da med obravnavanjema ni značilne razlike (Duncanov test, p=0,05)

Tako pridelek na rastlino kot pridelek na enoto površine sta bila značilno najmanjša v izredno sušnem letu 2022, ko obenem tudi nismonamakali, celo v primerjavi s pridelkom prvoletnega nasada. Pridelek na rastlino je bil značilno manjši od drugih obravnavanj pri razdalji med rastlinami 30 cm x 30 cm. Če pa pogledamo pridelek na enoto površine, se je kot najbolj primerna nakazala razdalja med rastlinami 40 cm x 40 cm (preglednica 3). Razdalja med rastlinami 60 cm x 60 cm se je v razmerah

poskusa pokazala kot najmanj primerna izmed preučevanih, saj je bil pridelek na enoto površine pri tej razporeditvi rastlin značilno najmanjši, sledila je razdalja 50 cm x 50 cm.

Interakcija Leto x Razdalja sajenja je značilna; pridelek na enoto površine je bil pri razdalji 20 cm x 20 cm v letu 2020 v primerjavi z drugima dvema letoma najnižji, medtem ko je bil v letu 2020 pri vseh ostalih preučevanih razdaljah večji v primerjavi z drugima dvema preučevanima letoma (slika 3 desno spodaj).



Slika 3: Širina grmičkov rožmarina (levo zgoraj), število glavnih poganjkov rožmarina (desno zgoraj), število stranskih poganjkov rožmarina (levo spodaj) glede na razdaljo sajenja (1 = 30 cm x 30 cm, 2 = 40 cm x 40 cm, 3 = 50 cm x 50 cm, 4 = 60 cm x 60 cm) ter interakcija Leto (1 = 2020, 2 = 2021, 3 = 2022) X Razdalja sajenja (desno spodaj)

Rezultati kemijskih analiz so pokazali, da je odstotek vlage, količina celokupnega pepela in vsebnost eteričnega olja pri vseh razdaljah sajenja v skladu z Evropsko farmakopejo. Vlaga je bila pod 10%, količina celokupnega pepela pod 9%. Vsebnost eteričnega olja v posameznih letih pri različnih razdaljah sajenja bistveno ni odstopala. Leta 2020 je bila pri vseh razdaljah sajenja nižja vsebnost eteričnega olja (med 2,7 in 2,9 ml/100 g suhega vzorca) v primerjavi z letoma 2021 in 2022 (3,0 do 3,4 ml/100 g suhega vzorca).

4 ZAKLJUČKI

Triletna poskusa z rožmarinom sorte Arp sta pokazala, da je najbolj primeren letni odmerek dušika za gnojenje rožmarina 20 kg/ha N, pognojen v maju. Število vseh

poganjkov je bilo značilno večje pri odmerkih 20 kg N/ha in 40 kg N/ha v primerjavi z ostalimi obravnavanji, pri odmerku 20 kg N/ha se je nakazal tudi večji pridelek tako na rastlino kot na enoto površine (158 g/rastlino oziroma 63,2 kg/100 m²) v primerjavi z ostalimi obravnavanji (razlika v pridelku med obravnavanji sicer ni bila značilna).

Širina grmičkov se je značilno povečevala s povečevanjem razdalje med rastlinami in s starostjo nasada. S povečevanjem razdalje med rastlinami se je značilno povečevala tudi razraščенost grmičkov, obenem je bila le-ta pričakovano večja v drugem in tretjem letu nasada v primerjavi s prvoletnim, ki se je šele ukoreninjal. Pridelek na rastlino je bil značilno manjši od drugih obravnavanj pri razdalji med rastlinami 30 cm x 30 cm. Glede pridelka na enoto površine se je kot najbolj primerna nakazala razdalja med rastlinami 40 cm x 40 cm (41 kg/100 m²). Razdalja med rastlinami 60 cm x 60 cm se je v razmerah poskusa pokazala kot najmanj primerna izmed preučevanih, saj je bil pridelek na enoto površine pri tej razporeditvi rastlin značilno najmanjši (15 kg/100 m²). Leto 2020 (leto brez posebnih vremenskih odklonov) je imelo značilno najboljši vpliv na razraščенost grmičkov rožmarina. Tako pridelek na rastlino kot pridelek na enoto površine (20 kg/100 m²) sta bila značilno najmanjša v zelo sušnem letu 2022, celo v primerjavi s pridelkom prvoletnega nasada. Med prvima dvema letoma (2020 in 2021) sicer v pridelku ni bilo značilne razlike (30 oz. 35 kg/100 m²).

Kemijski parametri v poskusih pridelanega rožmarina so v vseh primerih dosegali zahteve po Evropski farmakopeji (minimalno 1,2 mL/100 g vzorca); vsebnost eteričnega olja je bila od 2,4 do 4,2 mL/100 g vzorca.

Zahvala. Naloga je bila narejena v okviru Javne službe v vrtnarstvu, ki jo financira Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS (pogodba št. 2330-21-000028 in 2330-20-000153).

5 LITERATURA

- Agri Farming. 2023. Dosegljivo na: <https://www.agrifarming.in/rosemary-cultivation>
- Baričević D. 1996. Priročnik za cikel predavanj Pridelovanje zdravilnih rastlin, 1. del. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
- CC Grow. 2023. Dosegljivo na: <http://www.phytotheca.com/phytotheca/rosemary-common/>
- European Pharmacopoeia 5.0, 2004, Rosemary leaf. EDQM, 2377-2378.
- Gardenia Creating Gardens. 2023. Dosegljivo na: <https://www.gardenia.net/plant/rosmarinus-officinalis-arp>
- Gardenia. 2023. Dosegljivo na: <https://www.gardenia.net/plant/rosmarinus-officinalis-tuscan-blue>
- Greenwood nursery. 2023. Dosegljivo na: <https://www.greenwoodnursery.com/arp-rosemary>
- High country gardens. 2023. Dosegljivo na: <https://mountainvalleygrowers.com/organic-plants/rosmarinus-officinalis-arp-rosemary/>
- High country gardens. 2023. Dosegljivo na: <https://www.highcountrygardens.com/search?q=rosemary+arp>

- High country gardens. 2023. Dosegljivo na: <https://www.highcountrygardens.com/product/perennial-plants/rosmarinus-officinalis-arp>
- Loussouarn M., Krieger-Liszkay, A., Svilar, L., Bily, A., Birtić, S., Havaux, M.: 2017. Carnosic acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms, *Plant Physiology*: 1381–1394.
- Mountain Valley Grower. 2023. Dosegljivo na: <https://mountainvalleygrowers.com/organic-plants/rosmarinus-officinalis-spice-islands-rosemary/>
- Rosemary Plant and Essential Oil Yield. 2023. Dosegljivo na: <https://wikifarmer.com/rosemary-plant-and-essential-oil-yield/>
- Shoot. 2023. Dosegljivo na: <https://www.shootgardening.com/plants/salvia-rosmarinus-joyce-debaggio>
- The daily ECO. 2023. Dosegljivo na: <https://www.thedailyeco.com/different-types-of-rosemary-plants-19.html>

NABIRALNIŠTVO ZELIŠČ IN OKOLJE

Marjeta ERŽEN¹ in Barbara ČEH²

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 23. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 15. 11. 2023

Izvleček

Nabiralništvo je bilo že od nekdaj pomembna dejavnost ljudi, saj so si na ta način zagotavljali hrano, začimbe in zdravilne rastline za svoje potrebe. Znanje o nabiralništvu je v današnjem času manj obsežno, obenem ni več tolikšne potrebe po tovrstnem načinu pridobivanja hrane. Se pa kaže, da nabiralništvo zelišč vedno bolj spet pridobiva svojo vlogo; bodisi ljudje nabirajo zelišča za lastne ali pa za komercialne potrebe. Zaradi neodgovornega nabiralništva zelišč, ki je posledica neznanja ali iskanja ekonomske koristi, pa po drugi strani lahko prihaja do prekomernega izkoriščanja naravnih rastišč in s tem do neravnovesij v ekosistemih (izginjanja določenih avtohtonih in širjenje invazivnih rastlinskih vrst, erozija tal, idr.). Zaradi intenzivne človekove dejavnosti nabiralništva za komercialne namene v naravi se je ponekod pojavilo prekomerno izkoriščanje teh rastlin, zato so iz številnih resorjev, ki se s tem ukvarjajo, prišla navodila, da se divje rastoče rastline prenesejo v pridelovalni sistem ter s tem zmanjša prekomeren odvzem iz narave. Obenem pa, da bi preprečili oziroma zmanjšali negativni vpliv nabiralništva zelišč na okolje, je potrebno sistemsko urediti dejavnost (izobraževanje ljudi, regulacija). K temu bodo nekoliko pripomogle tudi smernice za nabiralništvo zelišč, ki smo jih pripravili v članku.

Ključne besede: zelišča, ohranjanje biotske pestrosti, nabiralništvo, vplivi na okolje, regulacija, smernice za nabiralništvo zelišč

HERB FORAGING AND THE ENVIRONMENT

Abstract

Foraging has always been an important activity for people, as it provided them with food, spices, and medicinal plants. Knowledge of foraging is diminishing in today's times, as there is no longer such a need for this method of food obtaining. However, the trends in foraging herbs are gradually making a comeback, whether people gather them for personal use or for commercial purposes. However, lack of good manners in herb foraging and in understanding of responsible foraging can lead to excessive exploitation of natural habitats, the disappearance of certain plant species, damage to ecosystems, soil erosion, and the spread of invasive species. Due to the intensive human activity of collecting wild species of plants for commercial purposes, the overexploitation of these plants has appeared in some

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

² Dr., IHPS, e-naslov: barbara.ceh@ihps.si

places, therefore, instructions have come from many departments dealing with this to transfer wild plants to the cultivation system and thereby reduce excessive taking from nature. At the same time, to reduce the negative impact of herb foraging on the environment, it is necessary to introduce regulations in this area, educate people about sustainable herb foraging, implement control, and systematically organize the activity of herb gathering. Guidelines for herb foraging, as outlined in this article, can contribute to these efforts.

Key words: herbs, biodiversity preservation, harvesting, environmental impacts, regulation, guidelines for herb harvesting

1 UVOD

Ljudje so že od nekdaj nabirali rastline za svoje potrebe; predvsem oreščke, sadeže, zelišča, začimbe, pa tudi gobe (Schippmann in sod., 2006). S tem so si med drugimi zagotavljali hrano. Najprej so ljudje rastline nabirali zaradi vsakdanje prehrane, šele kasneje zaradi zdravljenja. Ljudje so zelišča nabirali ter jih shranjevali na različne načine (sušili za čaje, jih namakali v žganje, olje ali sladkor). Uporabljali so jih tudi za izdelovanje kozmetičnih pripravkov, rastlinskih barvil, pripravkov za odganjanje mrčesa. Izkušnje in znanje o zdravilnih in užitnih rastlinah so se širili predvsem preko ustnega izročila žensk, širjenje znanja o zdravilnih učinkih rastlin pa so vse do konca 19. stoletja izvajali zeliščarji in ljudski »ranocelniki«. Ti so rastline nabirali, z njimi zdravili, trgovali in o njih pisali knjige (Mlakar, 2015).

Ministrstvo za kulturo je leta 2022 zeliščarstvo vpisalo v register nesnovne kulturne dediščine (Republika Slovenija..., 2023). Kot razlog so predlagatelji navedli, da je zeliščarstvo ena od najstarejših oblik človekove dejavnosti v naravnem okolju. Zeliščarji ohranjajo tradicijo, znanje in to znanje podeljujejo naprej v obliki predavanj, delavnic in pisnih izdelkov. Zeliščarji svoje izdelke tržijo tudi kot del turistične ponudbe ter izvajajo prenos znanja. Bogato znanje o slovenskem zeliščarstvu je izraz kulturne identitete in izročila s čimer se lahko predstavljamo tudi v svetu.

Tudi v današnjem času se nabiralništvo, predvsem zelišč in gob ohranja (Schippmann in sod., 2006), čeprav je mogoče opaziti, da je znanje glede nabiralništva in tudi o prosto rastočih oziroma divjih rastlinah manj obsežno. Opaža se tudi zmanjševanje biotske pestrosti samoniklih rastlin, kar je posledica socio-ekonomskih in okoljskih sprememb, prekomernega izkoriščanja določenih vrst, onesnaževanja in sprememb namembnosti krajine (na primer pozidava ipd.) (Mina in sod., 2023).

V današnjem času se vse bolj poudarja pomen trajnostnega in ohranitvenega nabiralništva divjih rastlin, kar še posebej poudarja strategija Cilji trajnostnega razvoja (angl. Sustainable development goals) (SDG), kjer so med drugimi zapisani tudi cilji za zaščito in promocijo trajnostne rabe ekosistemov, trajnostno upravljanje z gozdovi, zmanjševanje degradacije obdelovalnih površin in preprečevanje izgube

biodiverzitete. V SDG opredeljujejo nabiralništvo kot način, ki pripomore k zmanjšanju lakote, trajnostno kmetijstvo pa kot način, s katerim zagotavljamo lokalno hrano. Z nabiralništvom pripomoremo k zmanjšanju ogljikovega odtisa in spodbujamo lokalno preskrbo s hrano oz. zelišči/začimbami (Sustainable..., 2023).

Tako pri rekreacijskem kot tudi pri komercialnem nabiranju upoštevajmo načela trajnostnega nabiranja. Komercialno nabiranje bi se zaradi varovanja biodiverzitete moralo močno omejiti. V Smernicah razvoja lokalne oskrbe z zelišči za obdobje 2016-2021 navajajo, da lahko komercialno nabiralništvo povzroči tveganje za degradacijo rastišč zelišč in izgubo izvornega materiala, lahko predstavlja nelojalno konkurenco pridelavi zelišč in nabiranju ter nenazadnje lahko predstavlja potencialno zdravstveno tveganje za potrošnika (Smernice..., 2016).

2 NABIRALNIŠTVO ZELIŠČ IN OKOLJE

Divje rastline, ki se nabirajo v Evropi, pripadajo številnim vrstam. V današnjem času ljudje večinoma nabirajo občasno in ne veliko različnih vrst, zelo malo ljudi pa nabiralništvo izvaja vsakodnevno in nabira zelo raznolike vrste rastlin. Večina nabranih rastlin ljudje uporabljajo v prehrani in kot domača zdravila (Schunko in sod., 2015).

Po drugi strani pa nekateri ljudje vidijo zelišča v naravi kot ekonomsko priložnost ter kot material, s katerim se da tržiti, kar vodi v manj trajnostne nabiralniške prakse, sploh če rastline ne izkorišča več le lokalno prebivalstvo, ampak se jih izkorišča širše (Mina in sod., 2023). Problem prekomernega izkoriščanja divjih rastlin v naravi je tudi, da so rastišča prosto in javno dostopna vsem ljudem, možnosti omejevanja dostopnosti so majhne. Razlog prekomernega izkoriščanja rastlin iz narave je tudi pomanjkanje znanja s tega področja ter pomanjkanje ustrezne zakonodaje (Schippmann in sod., 2006).

Vpliv nabiranja zelišč na okolje je pomemben in večplasten, zajema pa več vidikov, ki vplivajo na naravno ravnovesje in biotsko raznovrstnost. Nekateri ključni vidiki so:

- Upad populacije in izginjanje rastlinskih vrst: Prekomerno in/ali neodgovorno nabiranje zelišč lahko izčrpa populacijo določenih rastlinskih vrst, da postane ogrožena ali celo izumre. To lahko vpliva na druge organizme v prehranjevalni verigi. V Sloveniji na primer obstajajo endemične rastlinske vrste, ki jih ne najdemo drugje po svetu. Nabiranje teh vrst lahko ogrozi njihovo preživetje.
- Izguba biotske raznovrstnosti: Prekomerno nabiranje določenih rastlinskih vrst lahko privede do zmanjšanja biotske raznovrstnosti. Ko so določene rastline prekomerno pobrane, se poruši naravno ravnovesje, kar vpliva na druge vrste.
- Poškodbe habitatov, ekosistemov: Nabiralci, ki ne upoštevajo pravil in po nepotrebem uničujejo rastline, lahko pri tem tudi poškodujejo naravna okolja. Hoja, izruvanje in uničevanje okoliške vegetacije lahko škoduje habitatom različnih organizmov, kar lahko vodi v njihovo izgubo. Že samo spreminjanje habitatov lahko vpliva na številne živalske in rastlinske vrste.

- Erozija tal: Nepravilne tehnike nabiranja lahko privedejo do erozije tal, še posebej v občutljivih ekosistemih. Odstranitev vegetacijskega pokrova destabilizira tla, poveča tveganje za erozijo.
- Širjenje invazivnih vrst: Nabiralci lahko nenamerno širijo invazivne rastlinske vrste na nova območja. Te lahko tekmujejo s prvotno vegetacijo, kar vodi v upad domorodnih rastlin in živali, ki so odvisne od njih.
- Vpliv na lokalno prebivalstvo: Prekomerno nabiranje lahko vpliva na lokalne skupnosti, ki se zanašajo na te rastline za tradicionalno medicino in kulturne prakse. Z izgubo teh rastlin lahko zbledi tudi kulturno znanje in prakse.
- Podnebne spremembe: Spremembe v populacijah rastlin zaradi prekomernega nabiranja lahko porušijo ogljikove in dušikove cikle, motena okolja sprostijo shranjeni ogljik, kar doda svoj delček k podnebnim spremembam.

Zelišča v naravi so naša naravna dediščina. Da bi zmanjšali vpliv nabiralništva zelišč na okolje, je ključen pristop z več akterji. Uvesti je potrebno ustrezno zakonsko podlago za regulacijo tega področja, izobraževati javnost o trajnostnih praksah nabiranja, spodbujati odgovorno ravnanje ter varovati ogrožene rastlinske vrste in njihove habitate. Sodelovanje med lokalnimi skupnostmi, strokovno javnostjo, okoljskimi organizacijami in vladnimi agencijami je ključnega pomena. Vsekakor je ključno, da je vključena lokalna skupnost.

Nekaj predlogov dejavnosti, ukrepov, trajnostnih praks (Pieroni in Giusti, 2009; Nataša Ferant, 2023; in širše iz prakse):

- izjemno pomembno je pridobivanje znanja o nabiralništvu, predvsem o nabiralniških tehnikah, da si rastline po nabiranju čim hitreje opomorejo. Trajnostno nabiralništvo je ena od bolj pomembnih strategij za ohranjanje divjih rastlin,
- izobraževalni programi in ozaveščanje skupnosti, nabiralcev in turistov o pomembnosti ohranjanja rastlinskih vrst in njihovih habitatov ter o trajnostnem nabiralništvu,
- spodbujanje gojenja zelišč s trajnostnimi kmetijskimi praksami, saj to zmanjšuje pritisk na divje populacije,
- spodbujanje podjetij, ki se ukvarjajo s trgovino z zelišči, naj upoštevajo etične in trajnostne politike nabiranja; smiselno bi bilo, da bi podjetja, ki se ukvarjajo s trgovino z zelišči, morala odkupovati samo pridelana zelišča, ne pa zelišča iz nabiralništva. Nabiralništvo naj bo samo za osebne potrebe,
- podpiranje podjetij, ki vlagajo v ohranjanje narave in razvoj skupnosti v regijah, iz katerih pridobivajo svoje rastline,
- promoviranje uporabe gojenih rastlin ali tistih, ki so nabrane iz trajnostno upravljanih naravnih ekosistemov,
- spodbujanje potrošnikov, naj izbirajo izdelke s certifikati ali oznakami, ki kažejo na trajnostne in etične prakse nabiranja, v proces trgovanja naj vstopajo samo pridelana zelišča,

- krepitev partnerstva med vladnimi agencijami, organizacijami za ohranjanje okolja, lokalnimi skupnostmi in industrijo zeliščnih izdelkov za razvoj in izvajanje trajnostnih praks,
- sodelovanje z zeliščarji, botaniki in ekologi, za pridobivanje znanje o rastlinskih vrstah in njihovih habitatih,
- vključitev lokalne skupnosti v procese odločanja glede predpisov o nabiranju, saj pogosto razpolagajo z dragocenim tradicionalnim znanjem,
- podpiranje znanstvenih raziskav za spremljanje populacij rastlin in njihovih ekosistemov ter razumevanje njihovih stopenj obnavljanja in ranljivosti,
- redno ocenjevanje vpliva nabiralništva na populacije rastlin in prilagajanje predpisov glede na te ugotovitve,
- omejitve nabiranja določenih rastlin glede na sezono,
- okrepitev obstoječih predpisov glede nabiranja rastlin ter zagotavljanje, da le-ti temeljijo na znanstvenih raziskavah in trajnostnih praksah,
- plačilo pristojbin ter nadzor na zaščitene območjih,
- uvedba nabiralniških kvot,
- zaščitena območja, kjer je nabiranje prepovedano, da bi ohranili ključna življenjska okolja in občutljive ekosisteme.

Nabiralništvo pa ni ogroženo samo zaradi prekomernega izkoriščanja, ampak se biotska raznovrstnost zelišč v naravi zmanjšuje tudi zaradi spreminjanja krajine (na primer pozidava, regulacije vodotokov ipd.), podnebnih sprememb, zaraščanja gozdov, intenzivnega kmetijstva, uporabe fitofarmaceutskih sredstev, onesnaženja ter raznih izpustov (Mina in sod., 2023).

Z izvajanjem smiselne strategije in vključevanjem različnih deležnikov je mogoče najti ravnotežje med izkoriščanjem zelišč ter ohranjanjem naravnih ekosistemov. Trajnostne prakse in informirano odločanje pa sta ključna za zagotavljanje dolgoročnega sobivanja oziroma ohranjanje tako rastlinskih populacij kot tudi okolja.

3 ZAKONODAJA NA PODROČJU NABIRALNIŠTVA V SLOVENIJI

Zaradi intenzivne človekove dejavnosti nabiralništva divjih vrst rastlin za komercialne namene se je ponekod pojavilo prekomerno izkoriščanje teh rastlin, zato so iz številnih resorjev, ki se s tem ukvarjajo, prišla navodila, da se divje rastline prenesejo v pridelovalni sistem ter s tem zmanjša prekomeren odvzem iz narave, hkrati pa se nekatere ogrožene rastline s tem lahko tudi ohranijo (Schippmann in sod., 2006).

Nabiranje rastlin v naravi je v Sloveniji urejeno v okviru zakonodaje, ki se nanaša na varstvo narave in okolja. Določena območja, kot so naravni parki in rezervati, imajo stroga pravila glede nabiranja rastlin, da se ohrani ekosistem. Zakon o divjadi in lovstvu (Ur. l. RS, št. 16/04) ureja nabiranje gozdnih sadežev, vključno z zelišči, in določa pravila o tem, katerih vrst in koliko jih je dovoljeno nabirati (Zakon o divjadi...

2023). Uredba o varstvenih območjih dediščine (Ur. l. RS, št. 69/22) določa posebne ukrepe za ohranjanje ogroženih rastlinskih vrst in njihovih habitatov. To lahko vključuje prepoved ali omejitve nabiranja določenih rastlin. V večini primerov je nabiranje majhnih količin rastlin za osebno uporabo dovoljeno, vendar je pomembno, da se rastline nabirajo odgovorno, brez škode za okolje. Nabiranje zaščitene ali ogrožene rastlinske vrste je običajno strogo prepovedano (Uredba o varstvenih..., 2022). Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst na rdeči seznam (Ur. l. RS, št. 82/02 in 42/10) uvršča na svoj seznam med drugimi tudi rastline, ki so bodisi izumrle, so domnevno izumrle, prizadete, ranljive, redke ali vrste zunaj nevarnosti. Z namenom ohranjanja in izboljšanja ogroženih vrst se izvajajo ukrepi, s katerimi se ogrožene vrste in njihov habitat varuje (Pravilnik..., 2002).

Zakon o ohranjanju narave (Ur. l. RS, št. 56/99) določa skrb za biotsko raznovrstnost z upoštevanjem načel, ciljev in ukrepov za ohranjanje biotske raznovrstnosti. Zakon prav tako prepoveduje iztrebljanje rastlinskih vrst, zniževanje števila rastlin posameznih populacij, omejevanje njihovih habitatov do te mere, da je rastlinska populacija ogrožena. Pri vsakem posegu v naravo je treba upoštevati načine, ki prispevajo k ohranjanju ugodnega stanja vrste ter prispevati k trajnostnemu gospodarjenju z rastlinskimi vrstami. Na zavarovanih območjih pa je celo prepovedano nabiranje rastlin ali pa je nabiranje močno omejeno (Zakon o ohranjanju..., 1999).

4 SMERNICE ZA NABIRALNIŠTVO ZELIŠČ V NARAVNEM OKOLJU

Smernice za nabiranje zelišč v naravnem okolju predstavljajo niz priporočil in načel, namenjenih spodbujanju odgovornih in trajnostnih praks nabiranja ter ohranjanju naravnih ekosistemov. Te smernice so ključne za zagotavljanje populacij rastlin, vzdrževanje ekološkega ravnovesja ter spoštovanje okolja, hkrati pa so lahko dobro izobraževalno čtivo tudi za tiste, ki se nabiralništva šele lotevajo.

Osnovne smernice za nabiranje zelišč v naravnem okolju:

- Pridobimo znanje o lokalnih rastlinskih vrstah, njihovih habitatih in življenjskem ciklu.
- Naučimo se natančno prepoznavati zelišča, da se izognemo morebitni zamenjavi ali nabiranju ogroženih ali zaščitene vrste.
- Upoštevajmo zakone in predpise v zvezi z nabiranjem zelišč. Nekatera območja lahko imajo specifična pravila ali dovoljenja (zaščitena območja, zaščitene vrste zelišč). V Sloveniji so zavarovana zelišča in način njihove uporabe navedena v Uredbi o zavarovanih in prosto živečih rastlinskih vrstah.
- Nabirajmo samo za lastne potrebe in le zelišča, ki jih poznamo.
- Pridobimo znanje o užitnosti rastlin, da se izognemo morebitnim zastrupitvam in zdravstvenim težavam s strupenimi rastlinami.
- Preverimo, da je rastišče dovolj oddaljeno od virov onesnaženja in da je populacija zelenega zelišča dovolj velika.

- Upoštevajmo rastni cikel rastlin in se podučimo, kdaj je optimalen čas za nabiranje in katere dele rastlin se nabira v določenem obdobju. Nabirajmo le uporabne dele in le v suhem vremenu.
- Nabirajmo le zdrave, nepoškodovane in čiste rastline; kolikor se da, jih očistimo in odstranimo neuporabne dele že na terenu.
- Uporabljajmo škarje ali drugo primerno orodje in ustrezno embalažo za nabiranje in transport zelišč.
- Ne izčrpavajmo celotnih populacij zelišč. Nabirajmo zelišča etično in trajnostno, da zagotovimo njihovo preživetje in razmnoževanje ter preživljanje živali.
- Med nabiranjem ne motimo ali poškodujemo habitatov, kjer prebivajo ali se hranijo divje živali.
- Ne pulimo rastlin. Preprečimo poškodbe okoliške populacije in druge vegetacije.
- Sodelujmo pri lokalnih pobudah za ohranjanje naravnih habitatov. Podpirajmo organizacije, ki si prizadevajo za zaščito naravnih habitatov in rastlinskih vrst.
- Delimo znanje o odgovornih praksah nabiralništva z drugimi, zlasti z mladimi. Spodbujajmo jih, da sledijo etičnim smernicam, poučimo jih o trajnostnih tehnikah nabiranja.
- Pred nabiranjem se pozanimajmo oziroma preverimo, da je površina, kjer želimo nabirati, javna (da ni zasebna).
- Ne puščajmo za seboj smeti.
- Posadimo in / ali posejmo zelišča na svojem vrtu, njivi, okolici hiše in jih nabirajmo tam.

Bonton o nabiralništvu, v katerem nabiralcem z vprašanji pomaga do trajnostnega in okolju prijaznega nabiralništva, je napisal že Rode (2021). Pomembno je, da rastlino dobro poznamo, da je zdrava, da je dovolj oddaljena od morebitnih virov onesnaženja, vedeti, katere rastline so ogrožene, spremljati rastišče - ali se le-to spreminja, poznati velikost populacije, optimalen čas nabiranja, da naše delovanje ne bo vplivalo na obseg rastišča, koliko zelišč sploh potrebujemo. Poznati moramo primerno opremo za nabiranje ter ali je na določenem območju sploh dovoljeno nabirati zelišča.

5 SKLEPI

Odgovorno nabiranje zelišč v naravnih okoljih zagotavlja, da bodo lahko tudi prihodnje generacije uživale koristi zelišč v naravnem okolju ter ohranja biotsko raznovrstnost naravnih okolij. Da bi preprečili preveliko izkoriščanje zelišč iz naravnega okolja, je ključnega pomena vzpostaviti regulacijo na področju nabiralništva, kar pomeni urediti zakonodajo in smernice, ki bodo pripomogle k bolj trajnostnemu in habitatom prijaznemu nabiralništvu. Znanje o zeliščih, njihovih učinkih in uporabnosti prav tako pripomore k bolj odgovornemu nabiranju zelišč v naravi, zato je izobraževanje in ozaveščanje na tem področju ključnega pomena.

Vsekakor pa je bistveno, da se za komercialne namene in redno uporabo zelišča gojijo na kmetijskih površinah.

Zahvala. Delo je nastalo v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta V4-2207 Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji, ki poteka od 2022 do 2024 in ga financirata Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije in Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

6 VIRI

- Mina G., Scariot V., Peira G., Lombard G. Foraging Practices and Sustainable Management of Wild Food Resources in Europe: A Systematic Review. *Land*. 2023; 12(7): 1299. Ministrstvo za kulturo RS. 2023. https://geohub.gov.si/ghapp/iskd/?data_filter=dataSource_2-MK_RNSD_4402-3623%3Aeid%3D%272-00109%27&data_id=dataSource_2-MK_RNSD_4402-3623%3A1281&page=RNSD&views=RNSD-Desna-sekcija%2CRNSD-Pogled-OP (7. nov. 2023)
- Nataša Ferant. 2023. Predlogi dejavnosti, ukrepov in trajnostnih praks v nabiralništvu, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (osebni vir, 7. nov. 2023)
- Pieroni A., Giusti M.E. Alpine ethnobotany in Italy: Traditional knowledge of gastronomic and medicinal plants among the Occitans of the upper Varaita valley, Piedmont. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2009; 5(1): 1-13.
- Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. 2002. Ur. l. RS, št. 82/02 in 42/10
- Rode J. Zeliščni vrt. Ljubljana, Založba kmečki glas. 2021; 247 str.
- Schippmann U., Leaman D., Cunningham A.B. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects., *Medicinal and Aromatic Plants*, Springer, 2006; 75-95.
- Schunko C., Grasser S. Vogl C.R. Explaining the resurgent popularity of the wild: Motivations for wild plant gathering in the Biosphere Reserve Grosses Walsertal, Austria. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2015; 11(1): 1-14.
- Sustainable development goals. 2023. <https://sdgs.un.org/goals> (27. okt.2023)
- Smernice razvoja lokalne oskrbe z zelišči za obdobje 2016-2021. 2016. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS. 30 str.
- Uredba o varstvenih območjih dediščine. 2022. Ur. l. RS, št. 69/22
- Zakon o divjadi in lovstvu. 2004. Ur. l. RS, št. 16/04
- Zakon o ohranjanju narave. 1999. Ur. l. RS, št. 56/99

VPLIV PRIDELAVE ZELIŠČ NA OKOLJE

Barbara ČEH¹, Lovro ČEH BREŽNIK² in Nataša FERANT³

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 21. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 14. 12. 2023

Izvleček

Pridelava zelišč načeloma velja za okolju prijazno kmetijsko dejavnost, saj zelišča v glavnem izhajajo iz naravnih habitatov, kjer so prosto rastoča, zato bolje kljubujejo ekološkim dejavnikom in stresnim razmeram tudi na njivah. Pri pridelavi zelišč večinoma ne potrebujemo večjih vložkov, kot so na primer redno namakanje, intenzivno gnojenje in intenzivna uporaba sredstev za varstvo rastlin. Pridelava zelišč ima ključno vlogo pri ohranjanju naravnih habitatov, saj ponuja trajnosten in nadzorovan pristop k pridobivanju zelišč. Tveganje za negativen vpliv pridelave zelišč v Sloveniji na okolje je majhno, saj se zelišča pridelujejo v glavnem na majhnih površinah in po trajnostnih metodah, velikokrat v mešanih nasadih. Za pridelavo zelišč so sprejemljive različne tehnologije pridelave, konvencionalne in ekološke, če se upoštevajo načela dobre kmetijske prakse. Pridelava zelišč nudi tudi osnovo za celostni pristop, za sodelovanje skupnosti, ki presega zgolj kmetijsko dejavnost; ima pozitiven vpliv na ohranjanje kulturne krajine in tradicijo uporabe zelišč, lokalno gospodarstvo in skupnost.

Ključne besede: zelišča, pridelava, biotska pestrost, biodiverziteteta, vplivi na okolje

CULTIVATION OF HERBS AND THE ENVIRONMENT

Abstract

Herb cultivation is generally considered an environmentally friendly agricultural activity because herbs primarily originate from natural habitats where they grow freely, making them more resilient to ecological factors and stressful conditions. Herb cultivation typically does not require significant inputs such as regular irrigation, intensive fertilization, and the use of plant protection agents. Herb cultivation plays a crucial role in preserving natural habitats by offering a sustainable and controlled approach to herb acquisition. The risk of a negative impact of herb production in Slovenia on the environment is small, as herbs are mainly grown on small areas and using sustainable methods, often in mixed plantations. Various cultivation technologies, both conventional and organic, are acceptable for herb cultivation, as long as they adhere to the principles of good agricultural practices. Herb cultivation also provides a foundation for a holistic approach and community

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

² Študent, e-naslov: lovrocb@gmail.com

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

collaboration that goes beyond just agricultural activities. It has a positive impact on preserving cultural landscapes, the tradition of herb use, local economies, and communities.

Keywords: herbs, cultivation, biotic diversity, biodiversity, environmental impacts

1 UVOD

Izbor zelišč za pridelavo je odvisen od več dejavnikov. Priljubljenost posameznih zelišč se regionalno razlikuje in odraža raznolike zdravilne, kulinarčne in kozmetične tradicije ter preference različnih kultur po svetu. Nekatera zelišča se gojijo v večjem obsegu zaradi njihove vsestranskosti in priljubljenosti in posledično večjega povpraševanja. Za uporabo v kulinariki se najpogosteje pridelujejo: peteršilj, timijan (v sredozemski, evropski in bližnjevzhodni kuhinji), bazilika (v sredozemski in azijski kuhinji), rožmarin (v sredozemski in evropski kuhinji), žajbelj (v evropski in ameriški kuhinji), meta, origano (v sredozemski in italijanski kuhinji), drobnjak (v evropski kuhinji, v ZDA in Kanadi, azijski, ruski pa tudi v skandinavski kuhinji), koper (v evropski in bližnjevzhodni kuhinji), koriander (mehiški, indijski in bližnjevzhodni kuhinji), sivka, pehtran (v francoski kuhinji), kamilica, majaron, melisa, kumina. Glede na to, da je v zadnjem obdobju vedno večje povpraševanje po zeliščnih in zdravilnih pripravkih in je posledično večje tudi povpraševanje po surovini v te namene, so med pomembnimi zelišči tudi: ameriški slamnik, arnika, slez, baldrijan, meta, melisa, pegasti badelj.

Gojenje zelišč ima načeloma pozitiven vpliv na okolje, vendar pa lahko pri gojenju zelišč zaradi neprimernih praks pride tudi do negativnih vplivov na okolje. V prispevku povzemamo strokovno mnenje na tem področju in povzemamo določeno vsebino na to tematiko iz literature.

2 POZITIVEN VPLIV GOJENJA ZELIŠČ NA OKOLJE

Gojenje zelišč načeloma velja za okolju prijazno kmetijsko dejavnost, saj zelišča v glavnem izhajajo iz naravnih habitatov, kjer so prostorastoča, zato tudi v primeru pridelave bolje kljubujejo okoljskim dejavnikom in stresnim razmeram. Vendar pa sta tudi žlahtnjenje in selekcija zelišč v smeri višjega pridelka, boljše kakovosti oz. zelene vsebnosti določenih biološko aktivnih snovi v zeliščih v razmahu po celem svetu. Gojenje zelišč ima ugoden vpliv na okolje, če se izvaja trajnostno in odgovorno (Smernice... 2016-2021, 2016). Po drugi strani pa v zadnjem času tudi kupci velikokrat zahtevajo pridelok z ekološkim certifikatom in pridelavo v skladu z dobro kmetijsko in nabiralno prakso (GACP).

Mnenje strokovne javnosti je, da gojenje zelišč ni alternativa nabiranju zelišč v naravnih ekosistemih, ampak pogoj in edini ustrezen pristop, ko se odločimo za tržno dejavnost z zelišči. Nabiranje v naravi naj bi predstavljalo le pokrivanje lastnih potreb nabiralca. Pridelava preprečuje prekomerno nabiranje zelišč v naravi in s tem pomaga ohranjati naravne habitate, zmanjša pritisk nanje, kar je ključno za

ohranjanje biotske raznovrstnosti v naravi - naravnim ekosistemom omogoča, da se obnavljajo in ohranjajo svoje ekološko ravnovesje.

Pri pridelavi zelišč se v Sloveniji večinoma ne izvajajo tehnološko zahtevni pristopi, kot so redno namakanje, intenzivno gnojenje in uporaba sredstev za zaščito rastlin, v glavnem se pri pridelavi zelišč porabi manj vode, gnojil in sredstev za zaščito rastlin kot pri gojenju zelenjadnic in poljščin, so pa pogosto potrebni posebni stroji, še zlasti za spravilo, tudi sušilnice, oprema za destilacijo eteričnih olj, ipd. Sicer so za pridelavo zelišč po zapisu Svetovne zdravstvene organizacije (WHO guidelines ..., 2003) sprejemljive različne tehnologije pridelave, konvencionalne in ekološke, pri katerikoli pa je treba delovati tako, da se čim bolj izognemo vplivu na okolje. Upoštevati je treba načela dobre prakse pridelave, vključno z ustreznim kolobarjem, sajenjem na neonesnažena tla, gnojenjem s kompostiranim gnojem, da se izognemo morebitnemu vnosu patogenov, uporabi zastirk, gnojenje na podlagi analize tal. Gnojila je treba uporabljati zmerno in v skladu s potrebami posamezne vrste in na način, da je izpiranje čim manjše oziroma se ga preprečuje, namakanje naj se izvaja v skladu s potrebami zelišč in v skladu z nacionalno/regionalno zakonodajo. Uporabi pesticidov se je treba izogibati, kolikor je mogoče. Le če je nujno, se uporabijo dovoljena fitofarmaceutvska sredstva, ki se uporabijo v skladu z navodili, aplikacijo pa izvaja le usposobljeno osebje s predpisano opremo. Majhne površine in trajnostni načini pridelave močno zmanjšajo vpliv na lokalne ekosisteme in pozitivno vplivajo na divje opraševalce.

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO guidelines ..., 2003) podaja tudi navodila glede spravila zelišč. Pobiranje pridelka se ne sme izvajati v mokrih razmerah (rosa ali dež) ali pri visoki zračni vlažnosti. Pobrani material je treba zbirati v suhih vrečkah, vrečah, košarah, prikolicah. Oprema za spravilo mora biti čista in dobro vzdrževana. Če se uporabljajo mehanski rezalniki/kombajni, je treba dele stroja, ki so v stiku s pridelkom, skupaj z njihovim ohišjem redno čistiti. Rezila je treba nastaviti tako, da preprečimo pobiranje zemlje. Posodo, ki se uporablja pri pobiranju pridelka, kakor tudi pobran pridelek moramo hraniti na suhem mestu, kjer ni prisotnosti škodljivcev in nedostopno domačim živalim. Poškodovan in pokvarjen pridelek je treba sortirati in zavreči. Zelišča ne smemo polagati na tla. Izogibati se moramo mehanskim poškodbam, tlačanju in načinom skladiščenja, ki bi spodbujalo pregrevanje; ne smemo uporabljati plastičnih vreč, vreče ne smejo biti prenapolnjene, pridelka ne tlačimo in zbijamo. Čas med žetvijo in prevozom pridelka na mesto nadaljnjih tehnoloških postopkov (sušenje, destilacija ...) mora biti čim krajši.

Pridelava zelišč z upoštevanjem dobre kmetijske prakse ima torej pozitiven učinek na okolje, vendar pa gre pri pridelavi zelišč tudi za pozitiven vpliv na ohranjanje kulturne krajine in tradicije uporabe zelišč, lokalno gospodarstvo in skupnost.

Podpora lokalnemu gojenju zelišč zmanjšuje potrebo po prevozu na dolge razdalje, kar zmanjšuje ogljikov odtis, povezan s prevozom. Zelišča, ki se gojijo lokalno in se zaužijejo kmalu po spravilu, pogosto ohranijo več svežine, več biološko aktivnih snovi in hranilno vrednost v primerjavi s tistimi, ki so bila pripeljana od drugod.

Običajno se s tem zagotavlja boljša kakovost zelišč, vključno z aromatičnostjo za potrošnike in živilsko industrijo. Prav tako podpira lokalne kmete in podjetja ter jim zagotavlja priložnosti za dohodek in rast. To pa pomaga ustvariti bolj trajnostno in odporno lokalno gospodarstvo. Krepi povezavo med kmeti in potrošniki, ustvarijo se ekonomske priložnosti in podpirajo lokalna podjetja. Potrošniki lahko obišejo lokalne kmetije, kmetijske trge ali sodelujejo v programih podpore skupnosti. Ta neposredna interakcija gradi občutek skupnosti in zaupanja med proizvajalci in potrošniki in ohranja krajino. S podporo lokalni pridelavi zelišč obstaja spodbuda za ohranjanje kmetijskih zemljišč znotraj skupnosti, s čimer preprečujemo urbano širjenje in pretvorbo kmetijskih zemljišč v nezemeljske namene. Gojenje zelišč, značilnih za določeno regijo, prispeva k ohranjanju tradicionalnega znanja, praks in kulinarčne dediščine. S tem se prispeva k raznolikosti in edinstvenosti lokalne prehranske kulture. Pomaga ohraniti povezavo z dediščino in tradicijami, kar dodaja bogastvo in raznolikost lokalne ponudbe in kulture. Vendar pa imajo ključno vlogo pri tem potrošniki, ko/ki izberejo nakup lokalno gojenih zelišč.

Gojenje zelišč ustvarja priložnosti za učenje. Člani skupnosti, vključno z otroki, lahko pridobijo praktične izkušnje pri sajenju, skrbi in spravi zelišč. Ta izobraževalni vidik spodbuja globlje razumevanje trajnostnega kmetijstva, biodiverzitete, pomena ohranjanja naravnih virov in delovnih navad. Gojenje zelišč omogoča platformo za izobraževanje skupnosti o uporabi zelišč za zdravje, kulinariko, kozmetiko in ostalo, spodbuja družabno interakcijo in sodelovanje. Člani skupnosti lahko skupaj skrbijo za zeliščne vrtove, izmenjujejo znanje in delijo izkušnje. To krepi občutek povezanosti skupnosti in krepi družbene vezi. Organizirajo se lahko delavnice, kuharski tečaji, informativne seje. Tako se člani skupnosti naučijo, kako uporabljati zelišča pri kuhanju, domačih zdravilih in praksah dobrega počutja. To deljenje znanja krepi povezavo skupnosti s tradicionalnim in lokalnim znanjem.

Kombinirano gojenje dreves, kmetijskih posevkov in/ali živali ponuja tudi številne ekosistemske storitve; ima potencial za povečanje rodovitnosti tal, zmanjšanje erozije, izboljšanje kakovost vode, povečanje biotske pestrosti in zadrževanje ogljika (Garrett in McGraw, 2000; Garrity 2004; Williams-Guille'n in sod., 2008; Shibu, 2009; Nair in sod., 2009). Če pridelujemo skupaj drevesa, grme in zelišča, ta raznolikost ustvari bolj odporen in uravnotežen ekosistem ter zagotavlja habitate za različne rastline in živali. Korenine dreves pomagajo preprečevati erozijo tal, kar je še posebej koristno na hribovitem ali strmem terenu. Zagotavljajo senco in regulirajo mikroklimo, kar ustvarja boljše razmere za gojenje nekaterih zelišč. Drevesa pogosto prinašajo hranila iz globljih plasti tal, da so dostopna zeliščem. To lahko zmanjša potrebo po gnojenju. Več pridelkov na isti površini omogoča raznolike vire dohodka in s tem prispeva k ekonomski stabilnosti. Je pa potrebno za tovrstno pridelavo zelo dobro poznati lastnosti zelišč in dreves, katerim ustrezajo določene kombinacije. V strnjenem gozdu na primer zelišča, katerim ta habitat ni primaren, ne bodo dobro uspevala, tudi kakovost bo slabša (vključno z vsebnostjo biološko aktivnih snovi). Primeri kombinacij so na primer sivka in oljke; ginseng, ki pogosto uspeva pod listavci, in mu drevesa, kot so hrast ali javor, zagotavljajo potrebno senco; rožmarin, ki ga lahko gojimo ob borovih drevesih. V ekoloških sadovnjakih na primer

raziskujejo možnosti izboljšanja ekosistemskih storitev z vzdrževanjem sadnih dreves in živega mulča - zelišč. V ekološkem sadovnjaku jablan na Poljskem so na primer ugotovili, da sta podseвка navadna plahtica in poprova meta dobro uspevala, imela dober pridelek, medtem ko se je povečala masa korenin jablane (Mia in sod., 2021).

Dejstvo je, da pridelava zelišč v Sloveniji ne pokriva potreb industrije. Je pa vsekakor potreben nadzor nabiranja in trajnosten pristop k pridelavi, kot je definiran v smernicah Svetovne zdravstvene organizacije (WHO guidelines ..., 2003). V Sloveniji manjka tudi odkupni center, ki bi zagotavljal odkup pridelovalcem, ki nemalokrat ne pridelujejo toliko zelišč, kot je njihov potencial, ampak le toliko, kot znajo prodati. S tem bi bile na voljo večje razpoložljive količine v Sloveniji pridelanih zelišč znane kakovosti tudi za večje odkupne sisteme, kot so npr. javni zavodi (od vrtcev, šol, bolnic do ustanov za starejše).

3 POTENCIALNI NEGATIVNI VPLIVI GOJENJA ZELIŠČ NA OKOLJE

Pretirana uporaba sredstev za zaščito rastlin in gnojil: Če bi se zelišča pridelovala v zelo intenzivnem načinu pridelave, bi le-to lahko predstavljalo negativen vpliv na okolje. Tveganje je v Sloveniji majhno, saj se zelišča pri nas v glavnem pridelujejo po smernicah ekološke pridelave, načelih biodinamike, na manjših površinah in pogosto v mešanih nasadih.

Poraba vode: Gojenje zelišč, kot vsaka oblika kmetijstva, zahteva vodo. Odvisno od regije in praks upravljanja z vodo to lahko prispeva k pomanjkanju vode ali izčrpanju lokalnih vodnih virov. Tveganje je v Sloveniji majhno, saj zelišča načeloma ne potrebujejo večje količine vode za namakanje, veliko jih pomanjkanje padavin dobro prenaša, namakamo le občasno, količina padavin v Sloveniji s stališča pridelave zelišč načeloma ni problematična.

Ogljikov odtis: Prevoz zelišč z območij gojenja do potrošnikov na zelo dolge razdalje prispeva k ogljikovemu odtisu. Tveganje je trenutno zaradi nizke samooskrbe v Sloveniji večje, manjšamo ga lahko s povečanjem lokalne in sezone pridelave zelišč.

Poraba energije: Energetska poraba pri gojenju zelišč, vključno z uporabo strojev, namakanjem in predelavo, ima določen okoljski vpliv. Gojenje zelišč v rastlinjaku ali gojenje zelišč v zaprtih prostorih lahko zahteva znatne vložke energije za razsvetlavo, ogrevanje in prezračevanje. Tveganje za le-to v Sloveniji je srednje veliko, saj se zelišča pri nas pridelujejo v glavnem na prostem in v neintenzivnih sistemih; trajnostne prakse, uporaba obnovljive energije in učinkovite tehnologije, ki se izvajajo v Sloveniji, pomagajo zmanjšati ta vpliv.

Sprememba rabe zemljišč: Če gojenje zelišč vključuje krčenje naravnih habitatov ali gozdov, prispeva k krčenju in izgubi naravnih habitatov. V Sloveniji je to tveganje nizko, saj se za pridelavo zelišč ne krčijo gozdovi in pridelava zelišč celo pomaga ohranjati kmetijsko krajino, kjer bi sicer lahko prišlo do zaraščanja.

4 SKLEPI

Gojenje zelišč ima ključno vlogo pri ohranjanju naravnih habitatov, saj ponuja trajnosten in nadzorovan pristop za pridobivanje zelišč za prodajo, medtem ko naj bi potekalo nabiranje zelišč v naravi le za lastno uporabo. S tem prispevamo k ohranjanju biodiverzitete, zaščiti naravnih populacij in splošnemu zdravju ekosistemov. Uporaba odgovornih in okolju prijaznih praks pridelave zelišč zagotavlja, da se pozitiven vpliv na habitate maksimizira. Za pridelavo zelišč so po zapisu Svetovne zdravstvene organizacije sprejemljive različne tehnologije pridelave, konvencionalne in ekološke, vendar je treba paziti, da se čim bolj izognemo vplivu na okolje. Upoštevat je treba načela dobre prakse pridelave; v tem primeru je vpliv pridelave zelišč na okolje pozitiven. Obenem pridelava zelišč nudi osnovo tudi za celostni pristop, za sodelovanje skupnosti, ki presega zgolj kmetijske dejavnosti. Vključuje lahko izobraževanje, druženje, medgeneracijsko povezovanje, ekonomsko podporo, ohranjanje kulture in ustvarjajoč občutek povezanosti. V tej zvezi in za zmanjševanje ogljikovega odtisa zaradi transporta je pomembno spodbujanje lokalnega gojenja zelišč, podporo bližnjim kmetom, ki gojijo zelišča na trajnosten in okolju prijazen način.

Zahvala. Delo je nastalo v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta V4-2207 Možnosti razvoja zeliščarstva v Sloveniji (CRP Zelišča), ki poteka od 2022 do 2024 in ga financirata Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije in Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

5 LITERATURA

- Garrett HE, McGraw RL (2000) Alley cropping practices. V: Garrett HE, Rietveld WJ, Fisher RF (uredniki) North American agroforestry: an integrated science and practice. ASA, Madison, s. 149–188
- Garrity DP (2004) Agroforestry and the achievement of the millennium development goals. *Agrofor Syst* 61:5–17
- Mia, M.J.; Furmanczyk, E.M.; Golian, J.; Kwiatkowska, J.; Malusá, E.; Neri, D. Living Mulch with Selected Herbs for Soil Management in Organic Apple Orchards. *Horticulturae* 2021, 7, 59.
- Nair PKR, Kumar BM, Nair VD (2009) Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. *J Plant Nutr Soil Sci* 172:10–23
- Shibu, J. 2009. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: An overview. *Agroforestry Systems*, 76(1):1-10
- Smernice razvoja lokalne oskrbe z zelišči za obdobje 2016-2021, 2016, Dostopno na: <https://www.gov.si/assets/ministrstva/MKGP/PODROCJA/KMETIJSTVO/RASTLINSKA-PRIDELAVA/VRTNARSTVO/Zeliscsa-Smernice.pdf>
- WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. 2003. <https://www.who.int/publications/i/item/9241546271>
- Williams-Guille'n K, Perfecto I, Vandermeer J (2008) Bats limit insects in a tropical agroforestry system. *Science* 320:70