

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

Hmeljarski bilten Hop bulletin

12 (2005)



**Žalec - Slovenija, 2005
ISSN 0350-0756**

Hmeljarski bilten – Hop bulletin

Izdaja	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija.
Odgovorni urednik	Doc. dr. Martin Pavlovič
Uredniški odbor	Prof. dr. Branka Javornik (Ljubljana), prof. dr. Anton Ivančič (Maribor), doc. dr. Milica Kač (Ljubljana), dr. Dušica Majer (Žalec), dr. Janko Rode (Žalec), dr. Elisabeth Seigner (Freising, Nemčija), dr. Gregory K. Lewis (Durham, NC, ZDA).
Tisk	Tiskarna Koštomaj Marjan s.p., Meškova ulica 6, 3000 Celje v 300 izvodih
Naslov uredništva	Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija martin.pavlovic@guest.arnes.si
Domača stran	http://www.ihps.si
Naročnina	Posamezna številka 4.000 SIT, za tujino 25 USD
Transakcijski račun	06000-0006336339 Banka Celje d.d., Celje
Bilten selektivno zajemajo	COBISS, AGRIS, CAB Abstracts
Dokumentacijska obdelava	Mednarodna: Slovenski nacionalni center AGRIS Domača: INDOK Biotehniške fakultete v Ljubljani
Publikacije v zameno za Hmeljarski bilten pošljite na naslov	Knjižnica Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, 3310 Žalec, Slovenija
Avtorska pravica	Copyright © 2003 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Hop bulletin - Hmeljarski bilten

Issued by	Slovenian Institute for Hop Research and Brewing Žalskega tabora 2, SI - 3310 Žalec.
Editor in Chief	Assist. Prof. Martin Pavlovič, Ph.D.
Editor Board	Prof. Ph.D. Branka Javornik (Ljubljana), Prof. Ph.D. Anton Ivančič (Maribor), Assist. Prof. Ph.D. Milica Kač (Ljubljana), Ph.D. Dušica Majer (Žalec), Ph.D. Janko Rode (Žalec), Ph.D. Elisabeth Seigner (Freising, Germany), Ph.D. Gregory K. Lewis (Durham, NC, USA).
Printed by	Tiskarna Koštomaj Marjan s.p., Meškova ulica 6, 3000 Celje, Slovenia in 300 copies
Address of Editor	Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenia martin.pavlovic@guest.arnes.si
Home page	http://www.ihps.si
Subscription	Individual issue 4.000 SIT, for foreign countries 25 USD
Account	06000-0006336339 Banka Celje d.d., Celje
Bulletin is indexed and abstracted by	COBISS, AGRIS, CAB Abstracts
Indexing, Classification and Networking	International: Slovene National AGRIS Center National: INDOC of Biotechnical Faculty in Ljubljana
Please, address exchange publication to	Library of the Slovenian Institute For Hop Research and Brewing Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenia
Copyright	© 2003 Slovenian Institute For Hop Research and Brewing

HMELJARSKI BILTEN - HOP BULLETIN

ISSN 0350-0756

VSEBINA / CONTENTS

Dušica MAJER, Nada GOGALA MOŽNOST PROGNOZE NAMAKANJA HMELJA NA OSNOVI VSEBNOSTI PROLINA / THE POSSIBILITY OF IRRIGATION PROGNOSIS BASED ON PROLINE CONTENT	5
Sebastijan RADIŠEK, Jernej JAKŠE RAZVOJ NOVIH DIAGNOSTIČNIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO POVZRO- ČITELJEV HMELJEVE UVELOSTI. / DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTICS METHODS FOR IDENTIFICATION OF HOP WILT INDUCERS	15
Simona LUSKAR, Iztok Jože KOŠIR, Milica KAČ DEPOZIT BAKROVIH IONOV NA LISTIH VINSKE TRTE IN NJEGOV VPLIV NA BIOLOŠKO UČINKOVITOST UPORABLJENIH FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV ZA ZATIRANJE PERONOSPORE VINSKE TRTE: 1. BIOLOŠKA UČINKOVITOST. / DEPOSIT OF COPPER IONS ON VINE LEAVES AND ITS EFFECT ON BIOLOGICAL EFFICACY OF DIFFERENT PLANT PROTECTION PRODUCTS AGAINST DOWNY MILDEW: 1. BIOLOGICAL EFFICACY	23
Simona LUSKAR, Iztok Jože KOŠIR, Milica KAČ DEPOZIT BAKROVIH IONOV NA LISTIH VINSKE TRTE IN NJEGOV VPLIV NA BIOLOŠKO UČINKOVITOST UPORABLJENIH FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV ZA ZATIRANJE PERONOSPORE VINSKE TRTE: 2. DEPOZIT BAKROVIH IONOV NA LISTIH VINSKE TRTE. / DEPOSIT OF COPPER IONS ON VINE LEAVES AND ITS EFFECT ON BIOLOGICAL EFFICACY OF DIFFERENT PLANT PROTECTION PRODUCTS AGAINST DOWNY MILDEW: 2. DEPOSIT OF COPPER IONS ON VINE LEAVES	31
Andreja ČERENAK, Jernej JAKŠE IDENTIFIKACIJA SLOVENSКИH SORT HMELJA Z MIKROSATELITSKIMI MARKERJI. / IDENTIFICATION OF SLOVENE HOP VARIETIES USING MICROSATELLITE MARKERS	43
Jernej JAKŠE, Sebastijan RADIŠEK VZPOSTAVITEV IDENTIFIKACIJSKEGA SISTEMA ZA DOLOČEVANJE HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA. / REESTABLISHMENT OF THE IDENTIFICATION SYSTEM FOR DETECTION OF HOP LATENT VIROID	49
Suzana ŠKOF, Zlata LUTHAR REGENERACIJA IZ RAZLIČNIH IZSEČKOV PRI SORTI HMELJA AURORA. / REGENERATION EFFICIENCY OF DIFFERENT EXPLANT TYPES OF HOP CV. AURORA	59
Suzana ŠKOF, Zlata LUTHAR DOLOČANJE TRANSGENOV V HMELJU PO TRANSFORMACIJI Z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . / IDENTIFICATION OF TRANSGENES IN HOP AFTER <i>Agrobacterium</i> -MEDIATED TRANSFORMATION.....	65

Branka JAVORNIK MOLEKULARNO GENETSKE RAZISKAVE HMELJA. / GENETIC RESEARCH ON HOPS	71
Martin PAVLOVIČ, Peter ŠTORMAN TEHNOLOŠKE RAZMERE PRIDELAVE HMELJA V RS PO STRUKTURNIH SPREMEMBAH V LETU 2000. /HOP PRODUCTION IN SLOVENIA AFTER STRUCTURAL CHANGES IN 2000	79
Elisabeth SEIGNER, Martin PAVLOVIČ IHGC SCIENTIFIC COMMISSION SUMMARY REPORT 2005. / POVZETEK PRISPEVKOV NA ZNANSTVENI KOMISIJI MHZ V LETU 2005	85
Marko ZUPAN, Matej KNAPIČ, Borut VRŠČAJ, Andrej SIMONČIČ, Metka SUHADOLC SOIL VULNERABILITY ASSESSMENT FOR PESTICIDE LEACHING IN SAVINJA VALEY. / OBČUTLJIVOSTI TAL ZA IZPIRANJE FITOFARMACEVSTSKIH SREDSTEV V SAVINJSKI DOLINI	91

MOŽNOST PROGNOZE NAMAKANJA HMELJA NA OSNOVI VSEBNOSTI PROLINA

Dušica MAJER¹, Nada GOGALA²

UDK/UDC 633.791: 631.67 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 15. 09. 2005
sprejeto/accepted: 26. 10. 2005

IZVLEČEK

Raziskali smo možnost prognoze namakanja na osnovi meritev vsebnosti prolina v listih hmeljnih rastlin. Raziskavo smo zasnovali kot poljski poskus v polnorodnem nasadu hmeljnih rastlin (*Humulus lupulus* L. cv. Savinjski golding). Preizkusili smo tri obravnavanja: nenamakano (kontrola), namakano in suho ter spremljali vpliv različnih obravnavanj na vsebnost prolina v listih rastlin in na vlago tal. Vsebnost prolina v listih je signifikantno narasla ob začetku vodnega stresa, vendar ni naraščala sorazmerno s stopnjo preskrbljenosti tal z vodo. Na osnovi vsebnosti prolina v listih hmeljnih rastlin lahko prognoziramo začetek namakanja, ne pa tudi stopnje vodnega stresa in stopnje preskrbljenosti tal z vodo. Tovrstna prognoza se ne ujema s trenutno veljavno metodo prognoziranja.

Ključne besede: *Humulus lupulus*, prognoza namakanja, vodni stres, prolin, vlaga v tleh

THE POSSIBILITY OF IRRIGATION PROGNOSIS BASED ON PROLINE CONTENT

ABSTRACT

The possibility of irrigation prognosis based on proline content in hop leaves was studied. The research was planned as the field experiment in a fully-developed hop garden (*Humulus lupulus* L. cv. Savinjski Golding). Three trials were tested: unirrigated (control), irrigated and dry. The effect of different trials on proline content and soil moisture was investigated. Proline content in leaves increased significantly at the beginning of water stress but it did not increase proportionally with the soil moisture supply level. Proline content in leaves of hop plants can be used to prognosticate the beginning of water stress and the beginning of irrigation, but it is not credible at prognosticating the level of water stress and the soil moisture supply level. There is no accordance between this prognosis and momentary available prognosis.

Key words: *Humulus lupulus*, irrigation prognosis, water stress, proline, soil moisture

¹ dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija

² prof.dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija

1 UVOD

Pomanjkanje vode je eden glavnih dejavnikov, ki zavirajo rast in razvoj rastlin, saj so neposredno ali posredno prizadeti vsi procesi v rastlini [9]. Kadar so rastline izpostavljene preobilici ali pomanjkanju vode, govorimo o vodnem stresu. Stres kot posledica pomanjkanja vode se za razliko od ostalih stresnih faktorjev razvija počasi, vendar je običajno dolgotrajnejši, zato je prilagodljivost rastlin sušnim razmeram pomembna za njihovo preživetje [6]. Zmanjšanje občutljivosti kmetijskih rastlin na vodni stres je glavni cilj agronomov, fiziologov in žlahtniteljev [7].

Rastline razvijejo različne morfološke in fiziološke mehanizme za odpornost proti vodnemu stresu. Adaptacije rastlin so lahko usmerjene v maksimalno izkoriščanje razpoložljive vode v tleh, v razvoj organov za skladiščenje vode v rastlini in v zaščito celice in tkiva pred propadom preko biokemijskih prilagoditev [2].

Med najpomembnejše fiziološke mehanizme vsekakor sodita osmoregulacija in hormonalna regulacija. Ob pomanjkanju vode v okolju pride v celicah do kopičenja toplencev, ki močno povečajo osmotski potencial in s tem tudi vodni potencial celic. Organski osmotiki so različni polioli, ogljikovi hidrati, amonijeve substance, proste aminokisliline in organske kisline [13]. Eden najpomembnejših osmotikov je prolin [8]. Količina prolina naraste zelo hitro ob pojavu vodnega stresa in se povečuje sorazmerno s stopnjo stresa, zato ga nekateri raziskovalci uporabljajo za napoved namakanja in za selekcijo na vodni stres odpornejših rastlinskih vrst [1]. Tudi nas je zanimala možnost dopolnitve prognoze namakanja s spremljanjem količine osmotikov v rastlini. To možnost smo proučevali pri hmelju. Hmelj potrebuje za optimalni razvoj v rastnem obdobju najmanj 600 mm padavin. Za slovensko klimo je značilna precej velika letna količina padavin (1300 mm), vendar je razporeditev neustrezna za optimalni razvoj hmeljnih rastlin. Pogostokrat nastopijo sušna obdobja že v maju, skoraj vedno pa tudi v juniju in juliju. Zato je namakanje hmeljskih nasadov reden ukrep, ki temelji na prognozi namakanja. Sedanja prognoza namakanja temelji le na meritvah trenutne vlažnosti tal, desorbcijskih karakteristik tal, padavin in evapotranspiracije rastlin, ne vključuje pa spremljanja fizioloških procesov v rastlini. Prognozo namakanja smo želeli dopolniti s spremljanjem vsebnosti prolina v listih rastlin. Ugotavljali smo povezavo med stopnjo preskrbljenosti tal z vodo in stopnjo vodnega stresa v rastlini, ki smo ga ocenili na osnovi vsebnosti prolina v listih rastlin. Predvidevali smo, da bodo tudi hmeljne rastline odreagirale na manjšo stopnjo preskrbljenosti tal z vodo z večjo vsebnostjo prolina.

O vplivu vodnega stresa na fiziološke procese v hmeljni rastlini je znano, da fotosintetska aktivnost storžkov sovпада z izgubami vode iz storžkov pri različnih osvetlitvah. Izgube vode so posledica odzivnosti rež na storžkih [11]. Ob vodnem stresu se zmanjšajo vodni potencial listov hmeljnih rastlin, stomatarna prevodnost, intenzivnost fotosinteze, rast in razvoj rastlin [10]. O osmoregulaciji ob vodnem stresu oziroma osmotikih v hmeljnih rastlinah ni podatkov. Ugotavljanje stresne odzivnosti hmeljnih rastlin je pomembno za dopolnitev prognoze namakanja hmelja na področjih, kjer je razporeditev padavin neugodna za optimalni razvoj hmeljnih rastlin. Raziskave v tej smeri so pomembne tudi za iskanje prilagodljivejših hmeljnih kultivarjev za premagovanje vodnega stresa.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Zasnova poskusa

Poskus smo zasnovali na hmelju (*Humulus lupulus* L.) cv. Savinjski golding. Kultivar Savinjski golding je klasičen, aromatičen, srednje zgođen kultivar s plemenito grenčico in aromo. Storžki vsebujejo od 0,7 do 0,9 ml eteričnih olj/100 g. Razmerje med α -humulenom in β -kariofilenom je okrog 3,5, povprečno vsebujejo storžki 5,5 % alfa kislin [5].

Poskus je potekal dve leti v polnorodnem nasadu hmelja na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu v Savinjski dolini. Savinjska dolina leži v vlažno zmerno toplem pasu s povprečno 146 padavinskimi dnevi na leto in s povprečno letno količino padavin 1196 mm (povprečje zadnjih dvajset let). Razporeditev padavin na tem območju je pogosto neugodna za hmeljne rastline. Obdobja, ki so glede preskrbljenosti hmeljnih rastlin z vodo najbolj kritična, so večinoma v vseh letih sušna.

Tla na poskusnem polju sodijo v skupino distričnih rjavih tal na produ in pesku. Poljski poskus je bil zastavljen v naključnih blokih s tremi obravnavanji v treh ponovitvah: namakane parcele, nenamakane (kontrolne) parcele in suhe parcele. Namakane parcele smo zalivali na osnovi obstoječe prognoze namakanja, nenamakane parcele pa so bile izpostavljene naravnim razmeram in so dobile le toliko vode kot je bilo padavin v tem obdobju. Suhe parcele smo pokrili s streho iz nepropustne folije in tako rastlinam odvzeli vir meteorske vode. Rastline smo pokrili v začetku julija, ko je za Savinjski golding najbolj kritično obdobje glede pomanjkanja vode tako za količino pridelka (17. julij - 22. julij) kot za količino alfa kislin (25. junij - 19. julij) [4]. V prvem letu smo pokrili parcele 17. julija, v drugem letu pa 09. julija.

Površina osnovne parcele je bila 20,8 m x 16,8 m. Medvrstna razdalja na parcelah je 2,4 m, razdalja med rastlinami v vrsti je 1,3 m.

2.2 Prognoza namakanja in vlažnost tal

Prognoza namakanja je temeljila na izračunani stopnji preskrbljenosti tal z vodo, merjeni evapotranspiraciji, količini padavin, spremljanju trenutne vlažnosti tal ter določitvah desorbcijskih karakteristik tal. Stopnjo preskrbljenosti tal z vodo smo določili na osnovi trenutne vlažnosti tal, točke venenja in razpoložljive vode v tleh. Stopnja preskrbljenosti pod 50 % je kritična za hmeljne rastline in pomeni nujno namakanje. Za določanje poljske kapacitete in točke venenja smo uporabili standardne metode [12]. Meritve evapotranspiracije in količine padavin smo opravili vsak dan na evapotranspiracijski postaji na posestvu.

Trenutno vlažnost tal smo ugotavljali vsak tretji dan po gravimetrični metodi [12]. Vzorčili smo s sondo iz globin 0-20 cm in 20-40 cm.

2.3 Vsebnost prolina v listih

Vsebnost prolina smo merili v povprečnih vzorcih listov, ki smo jih nabirali v obdobju razraščanja in storžkanja rastlin. Vzorčili smo dvakrat tedensko z zgornje, srednje in spodnje tretjine rastlin, vedno na istih rastlinah. Količino prolina smo določili spektrofotometrično [1].

2.4 Statistične analize

Rezultate smo statistično vrednotili z analizo variance. Pri računanju F-testov smo upoštevali 95 % verjetnost ($p = 0,05$) ter ustrezne stopnje prostosti. Najmanjšo značilno razliko smo ugotavljali s pomočjo LSD testa pri $p = 0,05$. Na slikah so prikazani rezultati, kjer je vsaka vrednost povprečje treh ponovitev s standardno napako (\pm standardna napaka).

3 REZULTATI

Stopnja preskrbljenosti tal z vodo se je na pokritih parcelah v obeh letih opazno zmanjševala od prvega do zadnjega merjenja (slika 1 in 4). V avgustu se je vlažnost tal v obeh letih zmanjšala celo do točke venenja.

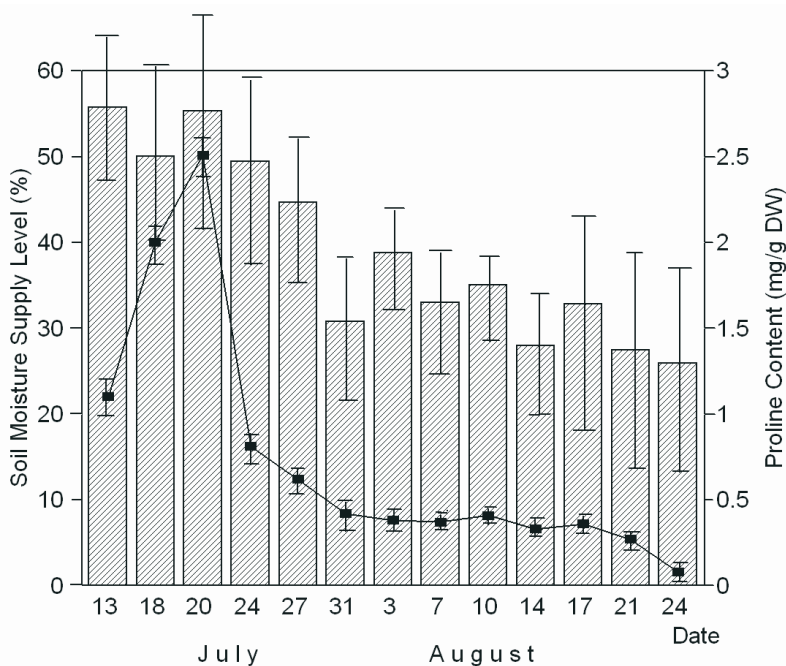
Med namakanimi in kontrolnimi parcelami glede stopnje preskrbljenosti tal z vodo v nobenem letu ni bilo bistvenih razlik. Razlike so se izrazile v obdobju suše (druga polovica julija), ko je na kontrolnih parcelah (slika 2 in 5) stopnja preskrbljenosti tal z vodo padla pod minimalno stopnjo (50 %), na namakanih (slika 3 in 6) pa je ostala stopnja preskrbljenosti ves čas nad minimalno.

Razlike v stopnji preskrbljenosti tal z vodo so bile pri zadnjem merjenju v obeh letih tudi statistično značilne. Najmanjša statistično značilna razlika je bila v prvem (29,156 %) in drugem letu (11,980 %) presežena med pokritimi in kontrolnimi parcelami ter med pokritimi in namakanimi parcelami.

Dinamika vsebnosti prolina v hmeljnih rastlinah je bila precej podobna v obeh letih. Vsebnost prolina se je na pokritih parcelah takoj po začetku različnih obravnavanj opazno povečala, vendar se je že po nekaj dneh ponovno zmanjšala. Konec julija je bila na vseh obravnavanjih nižja kot ob prvem merjenju. Razlike ob zadnjem merjenju v avgustu so bile v obeh letih statistično neznačilne.

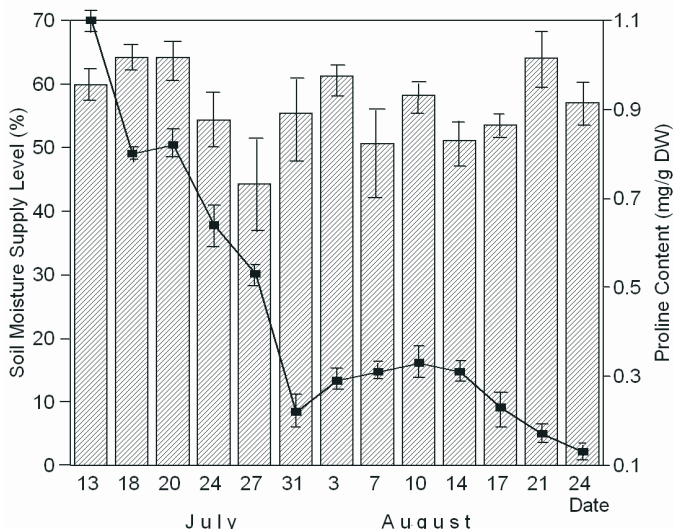
V prvem letu smo maksimalne vsebnosti prolina (2,51 mg/g suhe snovi) ugotovili 20. julija pri pokritih rastlinah. Po tem datumu je vsebnost prolina v listih pokritih rastlin močno upadla. Pri namakanih in kontrolnih rastlinah se je vsebnost prolina od začetka do konca julija ves čas zniževala. V avgustu se je nadaljevalo zmanjševanje količine prolina v listih rastlin na vseh obravnavanjih. Vsebnost prolina se je (kljub velikemu pomanjkanju vode v tleh) tudi v listih pokritih rastlin stabilizirala (slika 1). V juliju (razen 24. in 27. julija) so bile razlike med obravnavanji še statistično značilne. Minimalna statistično značilna razlika je bila 13. julija (LSD=0,131 mg/g) in 31. julija (LSD=0,058 mg/g) presežena pri vseh treh obravnavanjih. V ostalih terminih v juliju so bile razlike značilne le med pokritimi in kontrolnimi parcelami ter pokritimi in namakanimi parcelami. Statistično značilne razlike med vsemi obravnavanji (LSD=0,083 mg/g) smo ugotovili tudi še v začetku avgusta, ob zadnjem merjenju na koncu avgusta (24. avgust) pa razlike med obravnavanji niso bile več statistično značilne.

Tudi v drugem letu so se po začetku različnih obravnavanj pojavile statistično značilne razlike. Maksimalne vsebnosti prolina (0,69 mg/g suhe snovi) smo namerili 11. julija na pokritih parcelah (slika 4). Na ta datum je bila minimalna statistično značilna razlika (0,113 mg/g) presežena med pokritimi in kontrolnimi ter pokritimi in namakanimi parcelami, med nenamakanimi in namakanimi parcelami ni bilo statistično značilnih razlik. Po tem datumu se je vsebnost prolina v listih pokritih rastlin zmanjšala. Pri zadnjem merjenju v avgustu (22. avgust) so bile vsebnosti prolina v listih precej podobne po obravnavanjih in so se gibale med 0,28 mg/g suhe snovi pri kontrolnih rastlinah (slika 5) do 0,30 mg/g suhe snovi pri namakanih rastlinah (slika 6) in 0,31 mg/g suhe snovi pri pokritih rastlinah (slika 4). Tudi v tem letu so bile razlike na koncu statistično neznačilne.



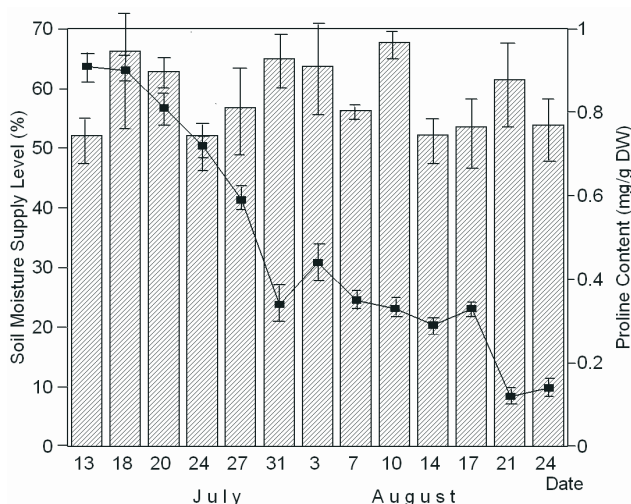
Slika 1: Stopnja preskrbljenosti tal z vodo in vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin na pokritih parcelah v prvem letu. Stolpci predstavljajo stopnjo preskrbljenosti tal z vlago, točke predstavljajo vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin. Vsaka vrednost je povprečje (\pm standardna napaka) treh ponovitev.

Figure 1: Soil moisture supply level and proline content in leaves of hop plants on covered plots in the first year. Bars represent soil moisture supply level, points represent proline content in leaves of hop plants. Each value is the mean (\pm SE) of three replicates.



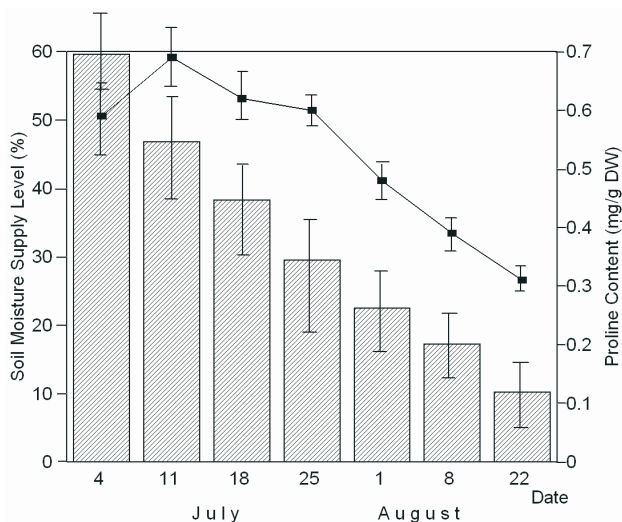
Slika 2: Stopnja preskrbljenosti tal z vodo in vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin na kontrolnih parcelah v prvem letu. Stolpci predstavljajo stopnjo preskrbljenosti tal z vlago, točke predstavljajo vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin. Vsaka vrednost je povprečje (\pm standardna napaka) treh ponovitev.

Figure 2: Soil moisture supply level and proline content in leaves of hop plants on control plots in the first year. Bars represent soil moisture supply level, points represent proline content in leaves of hop plants. Each value is the mean (\pm SE) of three replicates.



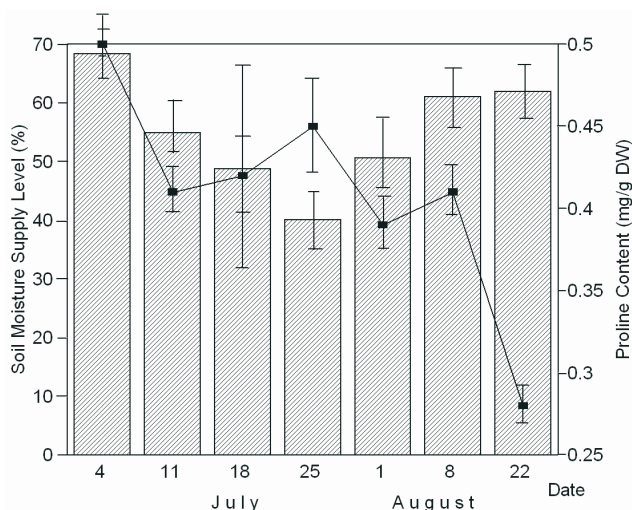
Slika 3: Stopnja preskrbljenosti tal z vodo in vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin na namakanih parcelah v prvem letu. Stolpci predstavljajo stopnjo preskrbljenosti tal z vlago, točke predstavljajo vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin. Vsaka vrednost je povprečje (\pm standardna napaka) treh ponovitev.

Figure 3: Soil moisture supply level and proline content in leaves of hop plants on irrigated plots in the first year. Bars represent soil moisture supply level, points represent proline content in leaves of hop plants. Each value is the mean (\pm SE) of three replicates.



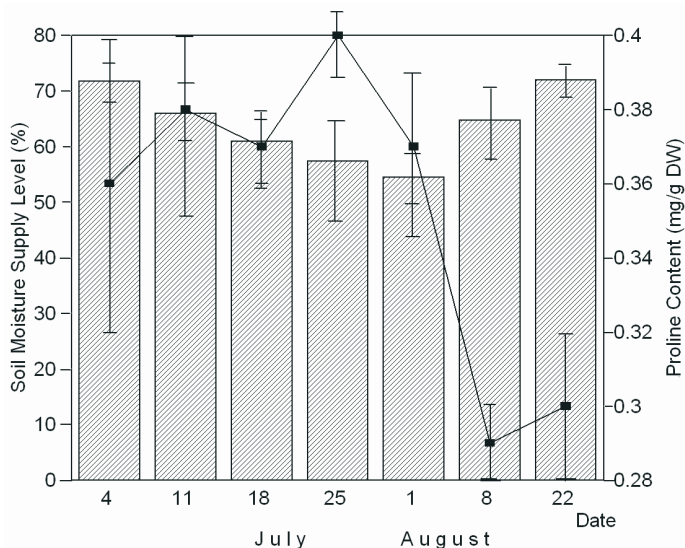
Slika 4: Stopnja preskrbljenosti tal z vodo in vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin na pokritih parcelah v drugem letu. Stolpci predstavljajo stopnjo preskrbljenosti tal z vlago, točke predstavljajo vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin. Vsaka vrednost je povprečje (\pm standardna napaka) treh ponovitev.

Figure 4: Soil moisture supply level and proline content in leaves of hop plants on covered plots in the second year. Bars represent soil moisture supply level, points represent proline content in leaves of hop plants. Each value is the mean (\pm SE) of three replicates.



Slika 5: Stopnja preskrbljenosti tal z vodo in vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin na kontrolnih parcelah v drugem letu. Stolpci predstavljajo stopnjo preskrbljenosti tal z vlago, točke predstavljajo vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin. Vsaka vrednost je povprečje (\pm standardna napaka) treh ponovitev.

Figure 5: Soil moisture supply level and proline content in leaves of hop plants on control plots in the second year. Bars represent soil moisture supply level, points represent proline content in leaves of hop plants. Each value is the mean (\pm SE) of three replicates.



Slika 6: Stopnja preskrbljenosti tal z vodo in vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin na namakanih parcelah v drugem letu. Stolpci predstavljajo stopnjo preskrbljenosti tal z vlago, točke predstavljajo vsebnost prolina v listih hmeljnih rastlin. Vsaka vrednost je povprečje (\pm standardna napaka) treh ponovitev.

Figure 6: Soil moisture supply level and proline content in leaves of hop plants on irrigated plots in the second year. Bars represent soil moisture supply level, points represent proline content in leaves of hop plants. Each value is the mean (\pm SE) of three replicates.

4 RAZPRAVA

Različna obravnavanja so statistično značilno vplivala na stopnjo preskrbljenosti tal z vodo. Opazne so bile predvsem razlike med količino vode v tleh na pokritih in namakanih parcelah ter na pokritih in kontrolnih parcelah. Vsebnost prolina ni naraščala sorazmerno s stopnjo vodnega stresa oziroma z naraščajočo sušo, kot je znano iz podatkov v literaturi [1]. Hmeljne rastline so precej dobro prenašale vodni stres, saj je bila njihova odzivnost razmeroma šibka. Vsebnost prolina v listih pokritih rastlin se je kmalu po pokritju parcel statistično značilno povečala, vendar se je kmalu ponovno znižala in se v avgustu stabilizirala. Kljub nadaljevanju različnih obravnavanj, so bile vsebnosti na koncu poskusa podobne po obravnavanjih, razlike pa statistično neznačilne. Manjša stopnja preskrbljenosti tal z vodo ni več vplivala na povečano vsebnost prolina kot smo pričakovali. V prvem letu je bila v poljskem poskusu vsebnost prolina največja pri 55,3-odstotni stopnji preskrbljenosti tal z vodo, najmanjša pa pri 25-odstotni stopnji preskrbljenosti, ko se vlažnost tal bliža že točki venenja in je potrebno namakanje. V drugem letu je bila vsebnost prolina največja, ko je bila stopnja preskrbljenosti tal z vodo 46,8-odstotna, pri 10,2-odstotni preskrbljenosti tal z vodo pa je bila vsebnost prolina v listih najmanjša.

V prvem letu se je vsebnost prolina v poljskem poskusu povečala za največ 1,7-krat, v drugem letu pa le za 1,2-krat. To je majhno povečanje v primerjavi z nekaterimi vrednostmi iz literature, kjer navajajo pri nekaterih rastlinskih vrstah tudi do 60-kratno povečanje [3]. Vzrok za razmeroma slabo odzivnost na stres je verjetno tudi v slabši možnosti kontrole razmer na polju. Parcele smo sicer pokrili in na ta način rastline umetno izpostavili suši, vendar učinek ni bil enak kot v primeru naravne suše. Rastline so nekaj vode lahko še vedno dobile s sosednjih površin in tudi iz zraka.

S povečanjem vsebnosti prolina so rastline reagirale na začetku poskusa ob nenadnem in hitrem zmanjšanju količine vode v tleh, kasneje pa so se količine prolina ponovno zmanjšale. Vsebnost prolina je bila dober pokazatelj začetka vodnega stresa ne pa tudi stopnje vodnega stresa in stopnje preskrbljenosti tal z vodo. Na osnovi teh rezultatov lahko ugotovimo, da lahko na osnovi vsebnosti prolina v listih hmeljnih rastlin prognoziramo začetek vodnega stresa in začetek namakanja, ne moremo pa prognozirati stopnje vodnega stresa in stopnje založenosti tal z vodo.

V drugem letu poskusa smo ugotovili tudi vpliv različnih obravnavanj v preteklem letu. Rastline na parcelah, ki so bile v prvem letu poskusa pokrite, so bile v drugem letu precej nižje in slabše razvite od rastlin na ostalih obravnavanjih.

Kljub temu, da je Savinjski golding eden izmed najbolj občutljivih hmeljnih kultivarjev na sušo, je bila odzivnost rastlin na sušni stres, merjena z vsebnostjo prolina, razmeroma slaba. To pomeni, da so pri tem kultivarju za obrambo pred sušnim stresom verjetno pomembnejši drugi fiziološki parametri. Zato bomo dobljene rezultate dopolnili z raziskavami ostalih fizioloških mehanizmov regulacije odpornosti na vodni oziroma sušni stres. Prihodnje raziskave bodo usmerjene predvsem v ugotavljanje hormonalne regulacije vpliva vodnega stresa pri hmeljnih rastlinah in osmoregulacije pri različnih kultivarjih hmelja.

5 LITERATURA

1. Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., Rapid determination of free proline for water-stress studies.- *Plant and soil* (1973)39, p. 205-207.
2. Fitter, A.H., Hay, R.K.M., The Water Relations of Plants and Soils. In: *Environmental physiology of plants*.- Academic Press, San Diego, (1987), p.124-184.
3. Grousse, C., Bournoville, R., Bonnemain, J.L., Water Deficit-Induced Changes in Concentrations in Proline and Some Other Amino Acids in the Phloem sap of Alfalfa.- *Plant Physiologie* (1996)1, p. 109-113.
4. Hacin, J., Vpliv temperature in padavin na pridelek in vsebnost alfa kislin pri hmelju, in : *Prispevek k poznavanju vpliva dejavnikov okolja na rast in razvoj ter na pridelek in vsebnost alfa kislin pri hmelju (*Humulus lupulus* L.)*.- Biotehniška fakulteta, Ljubljana, (1989), s.70-74.

5. Kralj, D., Žolnir, M., Zupanec, J., Dolinar, M., Oset, F., Značilnosti slovenskih hmeljnih kultivarjev.- Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, (1994), Žalec.
6. Larcher, W., Plants under stress, in : Physiological Plant Ecology.- Springer, Berlin, (1995), p.322-330.
7. Lawlor, D.W., Uprety, D.C., Effects of Water Stress on Photosynthesis of Crops and the Biochemical Mechanism, in: Abrol Y.P., Mohanty P., Govindjee (Eds.) Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity.- Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, (1993), p.420-449.
8. Lösch, R., Plant Water Relations.- Progress in Botany, Springer, Berlin, (1991), p.35-54.
9. Miller, R.J., Bell, D.T., Koeppe, D.E., The Effects of Water Stress on Some Membrane Characteristics of Corn Mitochondria.- Plant Physiology (1971)48, p. 229-231.
10. Neve, R.A., Irrigation.- Chapman and Hall, eds. Hops, (1991), p. 62-65.
11. Peat, W.E., Thomas G.G., The photosynthetic activity of the developing hop cone.- Annals of applied biology (1974)3, p. 319-324.
12. Resulović, H., Metode istraživanja fizičkih svojstava zemljišta, in: Priručnik za ispitivanje zemljišta.- Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, Beograd, (1971), s. 28-30, 55-57, 92-95.
13. Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N., Living with water stress: Evolution of osmolyte systems.- Science (1982)217, p. 1214-1222.

RAZVOJ NOVIH DIAGNOSTIČNIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO POVZROČITELJEV HMELJEVE UVELOSTI

Sebastjan RADIŠEK¹, Jernej JAKŠE²

UDK/UDC 633.791 : 632.2 : 632.911 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 24. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Identifikacija povzročiteljev hmeljeve uvelosti je izrednega pomena pri odločanju o načinu izvajanja fitosanitarnih ukrepov in v procesu žlahtnjenja odpornih sort. Klasična diagnostika temelji predvsem na osnovi morfoloških lastnosti, uporabi selektivnih gojišč, patogenih testih in analizah vegetativne kompatibilnosti. Nekatere od teh metod so delovno zahtevne, dolgotrajne in podvržene vplivom okolja, kar otežuje zanesljivost identifikacije. V prispevku je predstavljen razvoj in vpeljava novih diagnostičnih metod z uporabo molekularskih tehnik, katerih vrednost se izraža predvsem v hitrosti, občutljivosti in zanesljivosti analize.

Ključne besede: molekularni markerji, *Verticillium albo-atrum*, PCR

DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTICS METHODS FOR IDENTIFICATION OF HOP WILT INDUCERS

ABSTRACT

Identification of hop wilt inducers is very important for deciding how to carry out phytosanitary measures and for resistance breeding of new hop varieties. Traditional diagnostics is primary based on morphological features, selective media, pathogenicity tests and analysis of vegetative compatibility. Some of these methods are laborious, time consuming and influenced by environmental conditions that could hinder the reliability of identification. The article presents the development and introduction of new diagnostic methods using molecular techniques, which enable faster, more sensitive and reliable analysis.

Key words: molecular markers, *Verticillium albo-atrum*, PCR

¹ dr. znanosti, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Diagnostični laboratorij, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² doc.dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Hitra in zanesljiva identifikacija povzročiteljev bolezni predstavlja osnovo pri preprečevanju širjenja bolezni, tako v humanem, živalskem kot v rastlinskem svetu. V Sloveniji smo na področju hmeljarstva s pojavom letalne oblike hmeljeve uvelosti v letu 1997 veliko pozornosti namenili identifikaciji izolatov talnih gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Omenjeni traheomikotični glivici spadata med povzročiteljici uvelosti mnogih rastlin, med katerimi v Evropi naredita največ škode na hmelju. Za hmeljevo uvelost sta značilna dva bolezenska sindroma in sicer blaga in letalna oblika, katerih bistvena razlika je v tem, da letalna oblika povzroča odmiranje rastlin, pri blagi pa se rastline opomorejo in naslednje leto normalno odženejo. Gliva *V. dahliae* je znana kot razmeroma redek povzročitelj blage oblike hmeljeve uvelosti, medtem ko *V. albo-atrum* povzroča večino okužb na hmelju v obeh bolezenskih oblikah. Razvoj blage ali letalne oblike je odvisen predvsem od virulence povzročitelja, velik vpliv na izražanje bolezni pa imajo tudi ekološki dejavniki in odpornost sort [10], kar otežuje zanesljivo določitev bolezni na polju.

Identifikacija povzročiteljic hmeljeve uvelosti je izrednega pomena pri odločanju o načinu izvajanja fitosanitarnih ukrepov in v procesu žlahtnjenja odpornih sort. Klasična diagnostika temelji predvsem na osnovi morfoloških lastnosti glivic, uporabi selektivnih gojišč, patogenih testih, analizah vegetativne kompatibilnosti in razlikah v biokemičnih lastnostih. Omenjene metode so večinoma delovno zahtevne, dolgotrajne in podvržene vplivom okolja, kar otežuje zanesljivost identifikacije. Za določitev vrste na osnovi morfoloških lastnosti je pri glivah *V. albo-atrum* in *V. dahliae* potrebna vsaj 2 tedenska inkubacija. Prav tako določanje patotipov s patogenimi testi časovno zahteva najmanj 2-3 mesečno analizo. Vpeljava molekularskih tehnik, ki omogočajo hitrejšo in neposredno analizo genoma proučevanega organizma, pomeni pomembno dopolnitev obstoječih analitičnih metod. Tako se pri molekularski identifikaciji posameznih vrst iz rodu *Verticillium* najpogosteje uporablja PCR tehnika z uporabo specifičnih začetnih oligonukletidov, ki zaznajo razlike v ITS regijah rDNA genov [5,8]. Poleg identifikacije pa imajo te tehnike veliko prednost pri omogočanju določanja prisotnosti omenjenih gliv neposredno v rastlinah, tleh in vodi.

V Sloveniji smo pri proučevanju hmeljnih izolatov glive *V. albo-atrum* s pomočjo patogenih testov in molekulske tehnike AFLP (amplified fragment length polymorphism) dokazali prisotnost dveh različno virulentnih skupin izolatov oz. patotipov, od katerih PG1 povzroča blago obliko, PG2 pa letalno obliko hmeljeve uvelosti [6]. Z identifikacijo 17 patotipsko specifičnih fragmentov se je AFLP analiza izkazala kot izredno dobra tehnika za iskanje genetskih razlik med ozko sorodnimi izolati, vendar pa je zaradi delovne zahtevnosti manj primerna za rutinske analize. Iz omenjenega smo raziskavo nadaljevali s pretvorbo patotipsko specifičnih AFLP fragmentov v SCAR diagnostične markerje, ki bi omogočili enostavnejše in hitrejšo določanje omenjenih hmeljnih patotipov.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Kulture izolatov

V raziskavo smo skupno zajeli 92 izolatov gliv iz rodu *Verticillium* iz različnih gostiteljskih rastlin in geografskih območij Evrope in Severne Amerike, ter izolate nekaterih pogosteje zastopanih talnih gliv iz rodov *Alternaria*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monillia*, *Penicillium* in *Trichoderma*. Največji delež so predstavljali izolati *V. albo-atrum* iz hmelja od katerih smo jih 34 izolirali na območju Slovenije, medtem ko smo ostale izolate pridobili iz Anglije (15), Nemčije (5) in Poljske (1). Od 34 slovenskih izolatov jih je 27 pripadalo letalnemu patotipu PG2, 7 pa blagemu patotipu PG1. Vsi izolati v tej raziskavi predstavljajo del mikološke zbirke Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) in se hranijo v duplikatih monospornih kultur na krompirjevem dekstroznemu agarju (PDA-potato dextrose agar; Fluka, Švica) na temperaturi 4°C in v tekočem gojišču »General fungal medium« [13] z 20 % koncentracijo glicerola pri temperaturi -80°C.

2.2 Izolacija DNA

Pred izolacijo DNA iz micelija smo izolate najprej namnožili v že omenjenem tekočem gojišču. Kulture smo 4-5 dni inkubirali v temi pri sobni temperaturi na rotacijskem stresalniku (50 vrt./min). Po inkubaciji smo micelij iz gojišča odstranili z večkratnim centrifugiranjem (5 min pri 2500 x g) in sprotnim spiranjem s sterilno bidestilirano vodo. Sledila je izolacija DNA po vpeljanem SDS protokolu, ki sta ga razvila Lee in Taylor [3], z nekaterimi modifikacijami [7]. Za izolacijo DNA iz prevodnega tkiva rastlin smo uporabili CTAB metodo [2].

2.3 Izolacija AFLP fragmentov in določanje nukleotidnega zaporedja

Patotipsko specifične AFLP fragmente smo pri treh izolatih vsakega PG1 in PG2 patotipa namnožili z ustreznimi AFLP kombinacijami začetnih oligonukleotidov in jih nato ločili z denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo ter detektirali s srebrom. Sledil je takojšnji izrez fragmentov iz gela in ponovno namnoževanje z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi. Reamplificirane PCR produkte smo nanесли na 1,2 % agarozni gel, ki je omogočil ločitev zelenega fragmenta od nespecifičnih PCR produktov. Nadaljnje čiščenje fragmentov iz agaroznega gela smo izvedli po metodi, ki sta jo razvila Boyle in Lew [1]. Postopek smo nadaljevali s kloniranjem fragmentov v plazmidni vektor pPCR-Script™ Amp SK(+) (Stratagene, La Jolla, USA). Rekombinatne plazmide smo iz bakterijskih kultur izolirali s komercialnim kompletom NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel) in jim na osnovi dideoksi sekvenčne reakcije (Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences) ter avtomatske laserske naprave (ALFexpress II DNA Analysis System, Amersham Biosciences) določili nukleotidno zaporedje.

2.4 Izdelava SCAR markerjev in specifičnost PCR namnoževanja

Za vsako nukleotidno zaporedje smo z uporabo programa Primer3 [9] izdelali dva para začetnih oligonukleotidov, od katerih je prvi par temeljil na terminalnem delu, drugi pa na notranjem delu sekvence. Pri določanju optimalnih pogojev PCR namnoževanja in v

začetnem pregledu specifičnosti začetnih oligonukleotidov smo v analizo vključili genomsko DNA 4 izolatov vsakega od hmeljnih patotipov PG1 in PG2, dve negativni kontroli (voda in genomska DNA hmelja) in pozitivno kontrolo (plazmidna DNA z ustreznim fragmentom). Optimizacija je potekala s spreminjanjem temperature prileganja po 2°C (v območju od 50°C do 65°C) navzgor ali navzdol od teoretične temperature prileganja in v povečevanju ali zmanjševanju števila PCR ciklov (od 30 do 35 ciklov). Reakcijske mešanice (20 µl) so vsebovale 1× PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 1,5 mM MgCl₂ in 0,6 enote encima *Taq* DNA polimeraze in 20 ng genomske DNA izolatov. V primeru kontrolnih reakcij smo namesto DNA izolatov, uporabili 2 µl sterilne vode, 20 ng genomske DNA hmelja in 1 ng plazmidne DNA. Reakcije smo izvajali v PCR napravi MWG Primus 96 po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4 minutna denaturacija pri 94°C, Δ št. ciklov [94°C (45 s), Δ temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov (30 s) in 72°C (60)]. Vzorce smo ločevali z 1,6 % agarozno gelsko elektroforezo. Po določitvi optimalnih pogojev smo specifičnost SCAR markerjev preizkusili še na ostalih izolatih vključenih v raziskavo.

2.5 Multipleks PCR analiza

Multipleks PCR analizo smo izvedli v 20 µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala tri različne pare SCAR začetnih oligonukleotidov (Preglednica 1): 0,25 µM (9-2I-For/9-2I-Rev), 0,5 µM (9-1E-Rev/9-1I-For) in 0,5 µM (1I-For/1I-Rev), 1 PCR pufer, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 2,75 mM MgCl₂, 0,6 enote encima *Taq* DNA polimeraze in 20 ng genomske DNA izolatov. Reakcija je potekala po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4-minutna denaturacija pri 94°C, ki ji sledi 30 ciklov pri 94°C (45 s), 60°C (30 s) in namnoževanje pri temperaturi 72°C (70 s). Vzorce smo ločevali z 2 % agarozno gelsko elektroforezo.

2.6 Sidrna (nested) PCR analiza

Sidrno PCR analizo smo uporabili za neposredno določanje letalnega patotipa PG2 v okuženem tkivu. Prvo PCR reakcijo smo izvedli z začetnimi oligonukleotidi 9-1E-For/9-1E-Rev, ki temeljijo na terminalnem delu fragmenta AFLP 9-1. Po namnoževanju smo PCR vzorce 10 × razredčili s sterilno vodo in 1 µl razredčene raztopine prenesli v nove mikrocentrifugirke, kjer je sledila druga PCR reakcija z notranjimi začetnimi oligonukleotidi 9-1I-For/9-1I-Rev fragmenta AFLP 9-1. Reakcijski pogoji so bili enaki kot za analizo izolatov (poglavje 2.4) z modifikacijo v zmanjšanju koncentracije začetnih oligonukleotidov na 0,25 µM in številu ciklov na 20 v prvi PCR reakciji.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Razvoj SCAR markerjev

Pretvorba specifičnih AFLP fragmentov v SCAR diagnostične markerje omogoča razširitev njihove uporabnosti v smeri hitrejše, delovno manj zahtevne in občutljive analize, ki je lokusno specifična [14]. Od 17 namnoženih AFLP fragmentov smo uspešno reamplificirali 11 fragmentov, medtem ko smo pri ostalih dobili nespecifične PCR produkte, ki so onemogočali

nadaljnje delo. Uspešno reamplificirane fragmente smo klonirali in jim določili nukleotidno zaporedje, pri čemer smo v primeru treh fragmentov dobili različne sekvence, ki so se razlikovale v razmerju velikosti od 0-2 nukleotidov. Vzrok za pojav različnih nukleotidnih zaporedij lahko iščemo v kontaminaciji med izolacijo fragmentov iz poliakrilamidnih gelov o čemer poročajo Xu in sod., [14] in v prisotnosti različnih sekvenc enakih velikosti v posameznem fragmentu na gelu, kar je posledica metodologije AFLP tehnike [12]. Skupno smo tako pri določanju nukleotidnega zaporedja iz 11 AFLP fragmentov dobili 16 različnih sekvenc, pri čemer so vse imele prisotna ustrezna nukleotidna zaporedja AFLP začetnih oligonukleotidov. Z namenom ohranitve specifičnosti smo za vsako izmed 16 nukleotidnih zaporedij izdelali po dva para začetnih oligonukleotidov. Prvi par smo izdelali iz terminalnega dela sekvence, ki je vključeval *EcoRI/MspI* prepoznavno mesto, selektivne nukleotide in naslednje nukleotide AFLP sekvence do dolžine 23 baznih parov (bp). Drugi par pa smo izdelali iz notranjega dela sekvence.

Po začetni optimizaciji PCR namnoževanja z izdelanimi začetnimi oligonukleotidi smo njihovo specifičnost preizkusili na 92 izolatih rodu *Verticillium* in ostalih izolatih, ki so bili vključeni v raziskavo. Pri tem sta se med PG2 specifičnimi SCAR markerji, S-9-1INT in S-9-1EXT (Preglednica 1), ki izhajata iz fragmenta AFLP-9-1, namnožila samo pri izolatih PG2 patotipa, kar potrjuje predhodne rezultate AFLP analize o specifičnosti tega fragmenta. Visoko specifičnost za patotip PG2 so prav tako ohranili SCAR markerji S-9-2INT, S-11EXT in S-11INT (Preglednica 1). V primeru SCAR markerjev specifičnih za manj virulentni hmeljni patotip PG1 so ti izrazili manjšo stopnjo specifičnosti, saj so se poleg izolatov patotipa PG1 PCR produkti namnožili tudi pri nekaterih izolatih ostalih gostiteljskih rastlin *V. albo-atrum* in *V. dahliae*.

Preglednica 1: Specifičnost, nukleotidno zaporedje, temperatura prileganja in dolžina produktov visoko specifičnih SCAR markerjev

Table 1: Specificity, nucleotide sequences, annealing temperatures, and product length of highly specific SCAR markers

Patotip	SCAR marker	SCAR začetni oligonukleotidi in nukleotidno zaporedje (5-3)	Dolžina produkta	T _a (°C)	
PG1	S-1EXT	1E-For 1E-Rev	ATTCGAGGCTCCGAGCATCC GGATAGGCCCGCACCTTGAGAA	241 bp	59
	S-1INT	1I-For 1I-Rev	CGAGCATCCGATGACACAG AAGAGATCAATAGTCGTTTGCC	175 bp	60
PG2	S-9-1EXT	9-1E-For 9-1E-Rev	GGTAAGACTCCTTACCGATGCTG ATTCACACGCTACATATCAAACA	248 bp	9
	S-9-1INT	9-1I-For 9-1I-Rev	CGATGCTGGATCTGACCAATTAC ATAAGGGCAGGCAAGGCAC	198 bp	65
PG2	S-9-2EXT	9-2E-For 9-2E-Rev	ATTCACCATCAGCCTGTGC GGTAATCCTTGACAACAATATTC	190 bp	60
	S-9-2INT	9-2I-For 9-2I-Rev	CAGCGATGCACCTTCAGTG TGACAACAATATTCTGAAGCCA	163 bp	60
PG2	S-11EXT	11E-For	ATTCTCGCCGATCGTTACTC	216 bp	63
	S-11INT	11E-Rev 11I-For 11I-Rev	GGTACAGCAGCAGTTCCTG GCCATCGCCAAAGTACCAT GCCAGATCATATACCCATTGTC	169 bp	63

3.2 Uporaba SCAR markerjev v diagnostiki

Z namenom razvitja zanesljivejšega diagnostičnega testa za identifikacijo PG1 in PG2 patotipov glive *V. albo-atrum* smo uporabili tehniko hkratnega namnoževanja več SCAR markerjev v eni PCR reakciji. Pri tem smo v metodo vključili tri pare SCAR začetnih oligonukleotidov 9-1E-Rev/9-1I-For, 9-2I-For/9-2I-Rev, 1I-For/1I-Rev. Prva dva para sta specifična za patotip PG2, pri čemer smo zaradi doseganja enotne temperature prileganja 60°C v PCR reakciji, sestavili prvi par iz kombinacije začetnih oligonukleotidov SCAR markerjev S-9-1EXE in S-9-1INT, ki namnožuje fragment dolžine 233 bp. V prvih analizah smo opazili slabše namnoževanje enega izmed PG2 specifičnih fragmentov, kar smo rešili z določitvijo razmerja koncentracij med pari začetnih oligonukleotidov in spreminjanjem koncentracije MgCl₂. Po optimizaciji reakcijskih pogojev smo multipleks PCR tehniko preizkusili na različnih izolatih, kjer se je pokazala kot zelo učinkovito in zanesljivo orodje določanja obeh omenjenih patotipov. Metodo smo ocenili kot delovno manj zahtevno, primerno za testiranje večjega števila vzorcev in časovno izvedljivo v enem dnevu ob predhodni 3-4 dnevni inkubaciji izolatov v tekočem gojišču.

Visoko specifična SCAR markerja S-9-1EXE in S-9-1INT smo uporabili tudi pri neposrednem določanju patotipa PG2 v rastlinskem tkivu. Metodo smo razvijali na genomski DNA umetno okuženih hmeljnih rastlin z vpeljavo nested PCR tehnike, ki se zaradi visoke občutljivosti detekcije uporablja pri določanju prisotnosti organizmov v različnih medijih kot so tla, voda in rastline [11]. Nested PCR analizo smo vpeljali po postopku, ki so ga opisali Mercado-Blanco in sod., [4] in pri tem v prvi PCR reakciji uporabili začetne oligonukleotide 9-1E-For/9-1E-Rev, ki izhajajo iz terminalnega dela fragmenta AFLP-9-1, druga PCR reakcija pa je vključevala začetne oligonukleotide izdelane iz notranjega dela sekvence omenjenega fragmenta. Analiza je pokazala visok nivo detekcije pri vseh okuženih rastlinah ne glede na različno odporne sorte. Pri tem smo tehniko ocenili kot delovno zahtevno, občutljivo na kontaminacijo s tujo DNA, primerno za testiranje manjšega števila vzorcev in časovno izvedljivo v enem dnevu.

4 ZAKLJUČEK

V raziskavi smo uspešno izkoristili predhodno identificirane AFLP fragmente specifične za hmeljna patotipa PG1 in PG2 glive *V. albo-atrum* in jih pretvorili v SCAR markerje, ki imajo višjo aplikativno vrednost v smislu hitrosti in enostavnosti analize. Izdelane SCAR markerje smo preizkusili na velikem številu izolatov rodu *Verticillium* in nekaterih pogosteje zastopanih saprofitskih glivah. Pri tem sta markerja S-9-1EXE in S-9-1INT ohranila specifičnost samo za določanje patotipa PG2, medtem ko so bili ostali markerji manj specifični. Visoko specifične markerje smo nadalje uporabili pri razvitju multipleks in nested PCR analize, ki predstavljata pomembno dopolnilo obstoječim diagnostičnim tehnikam. Poleg omenjenega imajo izdelani SCAR markerji potencialno vrednost pri nadaljnjih genetskih analizah izolatov iz rodu *Verticillium*, predvsem v smislu proučevanja virulence.

ZAHVALA

Testiranje diagnostičnih markerjev so z darovanimi izolati omogočili dr. Dez. J. Barbara, dr. Richard Cooper, dr. Graeme Down, dr. Jan-Kees Goud, dr. Jane Robb, dr. Elisabeth Seigner in dr. Ewa Solarska, za kar se jim avtorja iskreno zahvaljujeva.

5 VIRI

1. Boyle, J.S., Lew, A.M., An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification.- Trends in Genetics, 11(1995)1, s. 8.
2. Kump, B., Javornik, B., Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers.- Plant Science, 114(1996), s. 149-159.
3. Lee, S.B., Taylor, J.W., Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. V: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, D.H., White, J.J., Eds. T.J. (ur).- San Diego, Academic Press, (1990), s. 282-287.
4. Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Péres-Artés, E., Jiménez-Díaz, R.M., Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR.- European Journal of Plant Pathology, 108(2002), s. 1-13.
5. Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., Robb, J., Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens.- Molecular Plant Pathology, 39(1991), s. 1-11.
6. Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., Javornik, B., Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis.- Plant Disease, 87(2003), s. 633-638.
7. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B., Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*).- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 77(2001)2, s. 139-146.
8. Robb, J., Moukhamedov, R., Hu, X., Platt, H., Nazar, R.N., Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays.- Physiological and Molecular Plant Pathology, 43(1993), s. 423-436.
9. Rozen, S., Skaletsky, H.J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. V: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Krawetz, S., Misener, S. (ur).- Totowa, Humana Press (2000), s. 365-386 (program dostopen na: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
10. Talboys, P.W., Resistance to vascular wilt fungi.- Proceedings of the Royal Society (London) 181(1972), s. 319-333.
11. Volossiuk, T., Robb, E.J., Nazar, R.N., Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms.- Applied and Environmental Microbiology, 11(1995), s. 3972-3976.
12. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, F., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.- Nucleic Acids Research, 21(1995), s. 4407-4414.
13. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, K. Fingerprinting in Plants and Fungi.- London, CRC Press, Inc., (1995), s. 322.
14. Xu, M., Huaracha, E. Korban, S.S., Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple.- Genome, 44(2001), s. 63-70.

DEPOZIT BAKROVIH IONOV NA LISTIH VINSKE TRTE IN NJEGOV VPLIV NA BIOLOŠKO UČINKOVITOST UPORABLJENIH FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV ZA ZATIRANJE PERONOSPORE VINSKE TRTE: 1. BIOLOŠKA UČINKOVITOST

Simona LUSKAR¹, Iztok Jože KOŠIR², Milica KAC³

UDK/UDC 633.95 : 632.937 : 634.8 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 18. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Na vinski trti (*Vitis vinifera*) smo ocenjevali okuženost grozdov in listov s peronosporo vinske trte (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni) ter biološko učinkovitost različnih fitofarmaceutskih sredstev, ki se uporabljajo za zatiranje peronospore vinske trte. Peronospora vinske trte je glivična bolezen, ki se zagotovo pojavi vsako leto in povzroči škodo v vseh razvojnih stadijih vinske trte na vseh zelenih nadzemnih delih vinske trte, vse od sredine maja do pozne jeseni. Ocenjevali smo vpliv obravnavanj na okužbo grozdov in listov vinske trte s peronosporo vinske trte. Med vsemi standardnimi obravnavanji ni bilo statistično značilnih razlik.

Ključne besede: vinska trta, peronospora vinske trte, biološka učinkovitost, preventivni fungicidi.

DEPOSIT OF COPPER IONS ON VINE LEAVES AND ITS EFFECT ON BIOLOGICAL EFFICACY OF DIFFERENT PLANT PROTECTION PRODUCTS AGAINST DOWNY MILDEW: 1. BIOLOGICAL EFFICACY

ABSTRACT

The infection of vine grapes and vine leaves with downy mildew (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni) and biological efficacy of different plant protection products against downy mildew were assessed. Downy mildew is a fungal disease which appears every year and can damage grapevine at every stage of development, and the fungus is able to attack every green part of the plant from the middle of May to the late autumn. We assessed the effect of treatments against downy mildew infection of vine grapes and vine leaves. There were no statistically significant differences between all standard treatments.

Key words: vine, downy mildew, biological efficacy, preventive fungicides.

¹ univ.dipl.inž.kmet., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, simona.luskar@quest.arnes.si

² dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, iztok-joze.kosir@quest.arnes.si

³ doc. dr., Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, milica.kac@bf.uni-lj.si

1 UVOD

Peronospora vinske trte (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni) je ena izmed najpomembnejših glivičnih boleznin vinske trte, ki lahko v ugodnih vremenskih razmerah povzroči popolno uničenje grozdja in zelenih delov trte [4, 7]. Najbolj je nevarna okužba v začetku cvetenja, sicer pa lahko gliva okuži vinsko trto v kateri koli razvojni fazi. Največ okužb nastane v letih, ko je dovolj zaporednih padavin in ko so temperature ugodne za razvoj bolezni.

Osnovna strategija zmanjšanja infekcijskega pritiska peronospore vinske trte je preventivna zaščita rastlin, torej ustrezna izbira sorte, pravilna izbira rastišča, orientacija vrst, vzgojna oblika, sanitarni ukrepi (odstranjevanje propadlih listov in grozdov), obdelava tal in zatiranje plevelov [4]. Ko ti ukrepi niso več dovolj učinkoviti, uporabimo za zatiranje peronospore vinske trte fungicide: kontaktne, lokalno-sistemične ali sistemične.

2 MATERIAL IN METODE

V poskusu v vinogradu smo ugotavljali učinkovitost uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev. Med njimi so bili štiri različni kontaktni fungicidi na osnovi bakrovega hidroksida. Opravljena so bila štiri zaporedna tretiranja v desetdnevnih razmakih, v času od 20. julija do 19. avgusta 2002. Obravnavanja, uporabljeni fungicidi, odmerki fungicidov in odmerki bakrovih ionov na površino ter poraba vode in koncentracija fungicidov uporabljenih v poskusu so navedeni v tabeli 1. Vinska trta je bila pri prvem tretiranju v razvojni fazi, ko so bile jagode velikosti graha (20. julija) pri zadnjem tretiranju v začetku barvanja jagod (19. avgusta).

Poskus je bil opravljen v Slovenskih Konjicah, v 18 let starem vinogradu v gojitveni obliki dvokrakega guyota, na sorti Renski Rizling, ki velja za eno občutljivejših sort na peronosporo vinske trte (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni).

Izmed 80 ha razpoložljivih površin vinograda smo izbrali 3,5 ha veliko parcelo, na kateri smo imeli sedem obravnavanj v štirih ponovitvah. Izbrana parcela za poskus je bila izenačena po številu rastlin in strukturi vinske trte, kolikor je bilo mogoče. Sadilna razdalja med vrstami je bila 2,8 m in 1,0 m v vrsti, skupno 3571 trt na hektar. Dolžina vrst je bila 90 m. Eno obravnavanje je vključevalo 5 vrst, od katerih smo vzorčili le srednjo vrsto, ostale vrste pa so služile kot varovalni pas [2].

Tabela 1: Obravnavanja, uporabljeni fungicidi, odmerki fungicidov na ha in odmerki bakrovih ionov na ha, poraba vode na ha in koncentracija fungicidov uporabljenih v poskusu

Table 1: Treatment code, fungicides tested in the study, application rate of fungicides per ha, application rate of copper ions per ha, application rate of water per ha and concentration of fungicides used in field trial

Obravnavanj	Fungicidi	Odmerki fungicidov (kg ha ⁻¹)	Odmerki bakrovih ionov (kg ha ⁻¹)	Poraba vode (L ha ⁻¹)	Koncentracije fungicidov (%)
CuZ	Cuprablau Z	3,0	1,05	400	0,75
CuZU-1	Cuprablau Z Ultra	2,5	0,875	400	0,63
CuZU-2	Cuprablau Z Ultra	2,5	0,875	1000	0,25
RefS1	Referenčno sredstvo 1	2,5	1,25	400	0,63
RefS2	Referenčno sredstvo 2	2,0	0,8	400	0,50
RefS3	Referenčno sredstvo 3	2,0	1,0	400	0,50
RefS4	Referenčno sredstvo 4	2,5	1,0	400	0,63

Pred pričetkom tretiranj smo testirali vlečeni vinogradniški pršilnik tip Zupan ZM 600 E. Podatki o vrsti in številu šob, pritisku, vozni hitrosti in količini porabljene vode so navedeni v tabeli 2.

Tabela 2: Vrsta, število šob in pritisk pršilnika ter vozna hitrost za različno porabo vode

Table 2: Type, number of nozzles, pressure of sprayer, speed of sprayer for different application rates of water

	Zupan ZM 600 E	
	Volumen vode	
	400 L ha ⁻¹	1000 L ha ⁻¹
Vrsta šobe	Albuz ATR rumena	Albuz ATR rdeča
Število šob	6+6	6+6
Pritisk (bar)	7	13
Vozna hitrost (km h ⁻¹)	5,4	5,4

Biološko oceno okuženosti listov in grozdov vinske trte [3] smo opravili prvič pred izvajanjem poskusa, 15. julija 2002. Drugič smo opravili biološko oceno okuženosti grozdov 8. avgusta 2002. Za eno obravnavanje v posamezni ponovitvi smo pregledali 150 grozdov. Da smo dobili odstotek okuženih grozdov, smo uporabili Townsend-Heubergerjevo enačbo, za oceno učinkovitosti pa enačbo po Abbottu [1]. Tretjo oceno biološke učinkovitosti smo opravili v začetku septembra (4. do 6. september 2002), ko so se na listih sekundarnih poganjkov pojavili znaki peronospore vinske trte. Za eno obravnavanje in eno ponovitev smo pogledali 1500 listov. Odstotek okuženosti listov in učinkovitost sredstev sta bila izračunana na isti način kot pri grozdih.

Pred tretiranj s fitofarmaceutskimi sredstvi na osnovi bakrovih ionov, je bila vinska trta ustrezno zaščitena pred boleznimi, in sicer petkrat v 10 do 13-dnevnih razmakih, po škropilnem programu, kot so ga za to leto sestavili na Zlatem Griču. Po štirih tretiranjih s fitofarmaceutskimi sredstvi na osnovi bakrovih ionov, je bilo konec avgusta opravljeno še zadnje tretiranje po škropilnem programu. Skupaj je bilo v tej rastni sezoni opravljenih deset tretiranj.

Vremenski podatki v času poskusa so bili zabeleženi v neposredni bližini poskusa in so podani v tabeli 3.

Tabela 3: Meteorološki podatki v času poskusa

Table 3: Meteorological conditions at the time of spraying

Datum tretiranja	1 (20. julij)	2 (30. julij)	3 (9. avgust)	4 (19. avgust)
Hitrost vetra (m s ⁻¹)	1,5	1	1,3	2,5
Relativna zračna vlaga (%)	72	71	81	73
Povprečna temperatura (°C)	20,5	22,5	18,8	22,1
Količina padavin do naslednjega tretiranja (mm)	-	23,8	88,1	96,2
Prve padavine (mm)	9	38	14	0,6
Prve padavine (dnevi)	2	2	2*	3

* prve padavine dve uri po tretiranju do naslednjega dne do 7 h zjutraj

** prve padavine dve uri po tretiranju

V poskusu zbrane podatke smo uredili v programu Microsoft Excel XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS [6] s proceduro GLM (General Linear Models).

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Okuženosti grozdov vinske trte

Okuženost grozdov vinske trte s peronosporo vinske trte in statistična obdelava podatkov so prikazani v tabelah 4 in 5 ter na sliki 1. Navedeni so osnovni statistični parametri, viri variabilnosti s statističnimi značilnostmi njihovega vpliva na parametre in vpliv obravnavanja na okuženost grozdov vinske trte.

V tabeli 4 je prikazana okuženost grozdov vinske trte z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri. Podana je povprečna vrednost štirih ponovitev in sedmih obravnavanj, intervali oziroma najmanjša in največja vrednost, standardna deviacija in koeficienti variabilnosti.

Tabela 4: Okuženost grozdov vinske trte z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Table 4: Infection of vine grapes with calculated basic statistical parameters

	Parametri					
	n	\bar{x}	min	max	sd	KV(%)
Okuženost grozdov vinske trte (%)	28	1.4	0.5	2.1	0.5	33.4

n - število meritev; \bar{x} - povprečna vrednost; min - minimalna vrednost; max - maksimalna vrednost; sd - standardna deviacija; KV (%) - koeficient variabilnosti

V tabeli 5 sta prikazana vira variabilnosti (obravnavanje in ponovitev), odgovorna za vrednost parametra. Izračunana P vrednost kaže, kako vpliven je posamezen vir variabilnosti oz. vpliv na okuženost grozdov. Statistična analiza podatkov je pokazala, da ni bilo statistično značilnih razlik v okuženosti grozdov vinske trte med posameznimi obravnavanji ($P = 0,0790$).

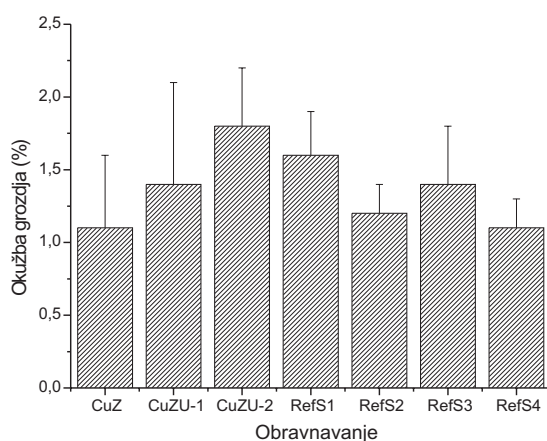
Tabela 5: Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na okuženost grozdov vinske trte

Table 5: Variability and significance of individual effects on the infection of vine grapes

Parametri	Viri variabilnosti (P vrednost)	
	O (DF = 6)	PO (DF = 3)
Okuženost grozdov vinske trte	0.0790	0.0071

O-obravnavanja, PO-ponovitve; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilna razlika; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilna razlika; $P \leq 0,05$ statistično značilna razlika; $P > 0,05$ statistično neznačilna razlika; DF – prostostne stopnje. Statistično značilne P vrednosti so označene z debelim tiskom.

Slika 1 ponazarja odstotek okuženosti grozdov vinske trte s peronosporo vinske trte in standardno deviacijo ločeno po posameznih obravnavanjih. Razlike v povprečni vrednosti okuženosti grozdov vinske trte s peronosporo vinske trte niso drastično odstopale med posameznimi obravnavanji (vrednosti se gibljejo od 1,1 do 1,8 odstotka).



Slika 1: Okuženosti grozdov vinske trte s peronosporo vinske trte in standardna deviacija
Figure 1: Infection of vine grapes with downy mildew with standard deviation

Na podlagi dobljenih vrednosti v tabelah 4 in 5 ter s slike 1 lahko zaključimo, da smo imeli v tem vinogradu (8. avgust) opravka z 'zdravimi grozdi', če vzamemo za primerjavo podatke primerljive neškropljene parcele v isti rastni dobi, v podobnih klimatskih in rastnih pogojih v okolici Maribora, je bila okuženost grozdov vinske trte 13. avgusta 74,6 % [5]. Z upoštevanjem tega primerljivega podatka s stopnjo okužbe v našem poskusu, lahko zaključimo, da je bila učinkovitost uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev približno 98 %.

3.2 Okuženost listov vinske trte

Okuženost listov vinske trte s peronosporo vinske trte in statistična obdelava podatkov so prikazani v tabelah 6 in 7 ter na sliki 2. Navedeni so osnovni statistični parametri, viri variabilnosti s statističnimi značilnostmi njihovega vpliva na parametre in vpliv obravnavanja na okuženost listov vinske trte.

V tabeli 6 je prikazana okuženost listov vinske trte z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri. Podana je povprečna vrednost štirih ponovitev in sedmih obravnavanj, intervali oziroma najmanjša in največja vrednost, standardna deviacija in koeficienti variabilnosti.

Tabela 6: Okuženost listov vinske trte z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Table 6: Infection of vine leaves with calculated basic statistical parameters

	Parametri					
	n	\bar{x}	min	max	sd	KV(%)
Okuženost grozdov vinske trte (%)	28	2.8	1.1	5.2	1.2	43.0

n - število meritev; \bar{x} - povprečna vrednost; min - minimalna vrednost; max - maksimalna vrednost; sd - standardna deviacija; KV (%) - koeficient variabilnosti

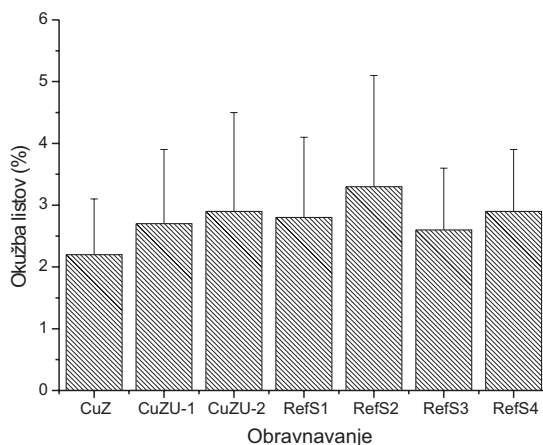
V tabeli 7 sta prikazana vira variabilnosti (obravnavanje in ponovitev), odgovorna za vrednost parametra. Izračunana P vrednost kaže, kako vpliven je posamezen vir variabilnosti oz. vpliv na okuženost grozdov. Iz tabele 7 je jasno razvidno, da ni bilo statistično značilnih razlik v okuženosti listov vinske trte na sekundarnih poganjkih med posameznimi obravnavanji ($P = 0,5360$).

Tabela 7: Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na okuženost listov vinske trte
Table 7: Variability and significance of individual effects on the infection of vine leaves

Meritev	Parametri	Viri variabilnosti (P vrednost)	
		O (DF = 6)	PO (DF = 3)
Okuženost listov vinske trte		0.5360	<0.0001

O-obravnavanja, PO-ponovitve; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilna razlika; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilna razlika; $P \leq 0,05$ statistično značilna razlika; $P > 0,05$ statistično neznačilna razlika; DF – prostostne stopnje. Statistično značilne P vrednosti so označene z debelim tiskom.

Slika 2 prikazuje odstotek okuženosti listov vinske trte s peronosporo vinske trte in standardno deviacijo ločeno po posameznih obravnavanjih. Okuženi so bili le listi vinske trte na sekundarnih poganjkih, medtem ko listi na primarnih poganjkih niso bili okuženi s peronosporo vinske trte.



Slika 2: Okuženosti listov vinske trte s peronosporo vinske trte na sekundarnih poganjkih in standardna deviacija.

Figure 2: Infection of vine leaves with downy mildew on secondary shoots with standard deviation

Na datum ocenjevanja (4. do 6. september) so bili znaki peronospore vinske trte ti. 'pozne peronospore' le na listih sekundarnih poganjkih vinske trte, ki so rasli visoko nad zadnjo žico nosilne armature, za katere ni tako pomembna izguba listov kot dejstvo, da iz njih izprane zoospore lahko okužijo pecljevino nižje ležečih grozdov [7].

Okuženost listov vinske trte je nihala od 2,2 do 3,3 % za različna obravnavanja, med njimi ni bilo statistično značilnih razlik. Če tudi v tem primeru vzamemo za primerjavo primerljivo neškropljeno parcelo v okolici Maribora, kjer so 13. avgusta ocenili 87,7 % okuženost listov vinske trte s peronosporo vinske trte [5] na primarnih poganjkih, lahko zaključimo, da je bila učinkovitost uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev za zatiranje peronospore vinske trte v našem poskusu približno 97 %.

4 ZAKLJUČKA

1. Statistična analiza podatkov okuženosti grozdov in listov vinske trte s peronosporo vinske trte ni pokazala statistično značilnih razlik med posameznimi obravnavanji, $P = 0,0790$ za okuženost grozdja in $P = 0,5360$ za okuženost listja vinske trte.
2. Na podlagi odstotka okuženosti grozdov in listja vinske trte s peronosporo vinske trte lahko zaključimo, da je bilo varstvo vinske trte proti tej bolezni skozi celo rastno dobo ustrezno, kar kaže na zelo veliko učinkovitost uporabljenih sredstev. Z obravnavanimi fitofarmaceutskimi sredstvi smo pri grozdju dosegli 98 % učinkovitost, pri listju vinske trte pa 97 % učinkovitost.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se vsem sodelavcem iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, ki ste pri poskusu sodelovali, Zlatemu Griču iz Slovenskih Konjic, ki nam je omogočil izvedbo poskusa na terenu in Javni agenciji za raziskovalno dejavnost za sofinanciranje.

5 LITERATURA

1. Ciba-Geigy Documenta. Manual for Field Trials in Plant Protection. Second Edition, Revised and Enlarged, 1981, p. 33-34 and p. 161-163.
2. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Guideline for the efficacy evaluation of plant protection products. Design and analysis of efficacy evaluation trials. PP 1/152(2). Bulletin OEPP/EPPO 29(1999), p. 297-317.
3. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Guideline for the efficacy evaluation of plant protection products. Plasmopara viticola. PP 1/31(3). Bulletin OEPP/EPPO 31(2001), p. 313-317.
4. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Good plant protection practice. Grapevine. PP 2/23(1). Bulletin OEPP/EPPO 32(2002), p. 371-392.

5. Matis, G. Poročilo o preizkušanju fungicidov proti peronospori vinske trte (*Plasmopara viticola*) v letu 2002.- Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Maribor, Svetovalna služba za varstvo rastlin, 2002.
6. SAS/STAT Software. Version 8.01. Cary, SAS Institute Inc:software. 1999.
7. Vršič, S., Lešnik, M., Vinogradništvo. - Založba Kmečki glas, Ljubljana, 2001.

**DEPOZIT BAKROVIH IONOV NA LISTIH VINSKE TRTE IN NJEGOV
VPLIV NA BIOLOŠKO UČINKOVITOST UPORABLJENIH
FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV ZA ZATIRANJE
PERONOSPORE VINSKE TRTE:
2. DEPOZIT BAKROVIH IONOV NA LISTIH VINSKE TRTE**

Simona LUSKAR¹, Iztok Jože KOŠIR², Milica KAČ³

UDK/UDC 633.95 : 632.937 : 634.8 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 18. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

V poljskem poskusu v vinogradu smo testirali štiri bakrove fungicide, ki se uporabljajo za preventivna škropljenja proti peronospori vinske trte (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni). Vsi fungicidi so vsebovali aktivno snov bakrov hidroksid. Poskus je zajemal sedem različnih obravnavanj, pri katerih smo spreminjali odmerek fitofarmacevtskega sredstva in količino vode na hektar. Pršenje vinske trte smo izvedli štirikrat v desetdnevnih razmakih, s standardnim aksialnim vinogradniškim pršilnikom. Ocenjevali smo vpliv obravnavanj na depozit fitofarmacevtskih sredstev, ki smo ga določali kot depozit bakrovih ionov na naravnih kolektorjih. Določanje depozita so izvajali v Cinkarni Celje z uveljavljeno analizo metodo, z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS). Vsa tretiranja so bila ustrezna, ponekod smo opazili tudi statistično značilne razlike.

Ključne besede: depozit, naravni kolektorji, fungicidi, bakrov hidroksid.

**DEPOSIT OF COPPER IONS ON VINE LEAVES AND ITS EFFECT ON
BIOLOGICAL EFFICACY OF DIFFERENT PLANT PROTECTION
PRODUCTS AGAINST DOWNY MILDEW:
2. DEPOSIT OF COPPER IONS ON VINE LEAVES**

ABSTRACT

Four preventive fungicides against downy mildew (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni) were tested in field trial in a vineyard. All fungicides contained copper in the form of copper hydroxide as active ingredient, and they were used in seven treatments of vineyard at different application rates of plant protection products and different water volumes per hectare. The test was performed four times in 10-day intervals using a standard axial vineyard sprayer. We assessed the effect of treatments on the downy mildew infection of vine grapes and vine leaves, as well as the effect of treatments on the deposit of the active substance (determined as copper ion deposit) on natural collectors. Copper ion deposit was determined in Cinkarna Celje using a standard analytical procedure - atomic absorption spectroscopy (AAS). All treatments were completely satisfactory, some statistically significant differences are reported.

Key words: spray deposit, natural collectors, fungicides, copper hydroxide.

¹ univ.dipl.inž.kmet., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, simona.luskar@guest.arnes.si

² dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, iztok-joze.kosir@guest.arnes.si

³ doc. dr., Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, milica.kac@bf.uni-lj.si

1 UVOD

Depozit fitofarmaceutskih sredstev na rastlinah je odvisen od mnogih faktorjev kot so osnovne nastavitve pršilnika, vrste in število šob, klimatski pogoji (relativna zračna vlaga, temperatura, hitrost in smer vetra, količine prvih padavin), geometrija in gostota krošnje, velikost kapljic in vozna hitrost [1, 2, 10]. Pravilna nastavitve pršilnika izboljša njegovo natančnost in učinkovitost ter zagotavlja enakomeren nanos sredstva na rastline, ki omogoča zaščito rastlin pred boleznimi in škodljivci, zmanjša pojav odpornosti in izgube sredstva, časa in dela ter onesnaževanja okolja [4, 8].

Za napoved biološke učinkovitosti je odločilna določitev razporeditve pršilne brozge znotraj krošnje [2]. V ta namen se uporabljajo standardne analitične metode, s katerimi kvantitativno določimo količino pršilne brozge oziroma sledilca na ciljnih kolektorjih [5, 6].

Kolektorji, ki jih uporabljamo v ta namen, so lahko naravnega izvora, torej listi rastline, poganjki oziroma veje ali plodovi rastlin, ali pa so umetni, kot so lahko filtrirni papir, bombažni trakovi, indikatorski lističi, ki so občutljivi na vodo ali olje, in drugi [3, 9, 12]. V tem prispevku obravnavamo le naravne kolektorje, tj. liste vinske trte.

2 MATERIAL IN METODE

V poskusu, ki je bil opravljen v vinogradu, smo ugotavljali nanos štirih različnih kontaktnih fungicidov: dveh različnih formulacij na osnovi bakrovega hidroksida na liste vinske trte. Ostali podatki o opravljenem poskusu so navedeni v Materialu in metodah v predhodnem članku iz te serije (1. del) [7], zato na tem mestu niso posebej navedeni. Tabela 1 se zaradi preglednosti obravnavanj pojavlja tako v 1. delu kot v tem delu, kjer so navedena obravnavanja, uporabljeni fungicidi, odmerki fungicidov in odmerki bakrovih ionov na površino ter poraba vode in koncentracija fungicidov uporabljenih v poskusu.

Tabela 1: Obravnavanja, uporabljeni fungicidi, odmerki fungicidov na ha in odmerki bakrovih ionov na ha, poraba vode na ha in koncentracija fungicidov, uporabljenih v poskusu

Table 1: Treatment code, fungicides tested in the study, application rate of fungicides per ha, application rate of copper ions per ha, application rate of water per ha and concentration of fungicides used in field trial

Obravnavanja	Fungicidi	Odmerki fungicidov (kg ha ⁻¹)	Odmerki bakrovih ionov (kg ha ⁻¹)	Poraba vode (L ha ⁻¹)	Koncentracije fungicidov (%)
CuZ	Cuprablau Z	3,0	1,05	400	0,75
CuZU-1	Cuprablau Z Ultra	2,5	0,875	400	0,63
CuZU-2	Cuprablau Z Ultra	2,5	0,875	1000	0,25
RefS1	Referenčno sredstvo 1	2,5	1,25	400	0,63
RefS2	Referenčno sredstvo 2	2,0	0,8	400	0,50
RefS3	Referenčno sredstvo 3	2,0	1,0	400	0,50
RefS4	Referenčno sredstvo 4	2,5	1,0	400	0,63

Kot sledilec smo uporabili bakrove ione fitofarmaceutskih sredstev (fungicidov na osnovi bakrovega hidroksida). Nekatera trgovska imena so navedena v tabeli 1. Uporabili smo več vrst kolektorjev (listi vinske trte, grozdi vinske trte, filtrirni papir in indikatorske lističe, občutljive na vodo). V nadaljevanju članka so prikazani le rezultati depozita bakrovih ionov na listih vinske trte.

Liste vinske trte (po 60 listov) smo pobrali pred vsakim tretiranjem in takoj po njem. Nabrali smo jih naključno v srednji vzorčni vrsti, na obeh straneh vrste, na višini od 1,0 do 1,6 m ter jim določili listno maso in površino. Analizirali so jih v laboratoriju Cinkarne Celje, kjer so določili depozit bakrovih ionov po standardni metodi z atomsko absorpcijsko spektroskopijo. Dobljeni rezultati so bili podani v mg L^{-1} vzorca, in nato preračunani na kvadratni centimeter površine kolektorja ($\mu\text{g cm}^{-2}$). Dobljene vrednosti smo nadalje preračunali na enoten odmerek bakrovih ionov, in sicer 1 kg ha^{-1} .

V poskusu zbrane podatke smo uredili v programu Microsoft Excel XP in tako urejene podatke statistično obdelali z računalniškim programom SAS [11] s proceduro GLM (General Linear Models).

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

Analiza bakrovih ionov na listih vinske trte in statistična obdelava podatkov so prikazani v tabelah 2 do 7, kjer so navedeni osnovni statistični parametri, viri variabilnosti s statističnimi značilnostmi njihovega vpliva na parametre; vpliv obravnavanja, vpliv datuma tretiranja, vpliv časa pobiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte ter na spiranje bakrovih ionov.

V tabeli 2 je prikazan depozit bakrovih ionov na listih vinske trte. Podane so povprečne vrednosti štirih ponovitev in sedmih obravnavanj, intervali oziroma najmanjša in največja vrednost, standardna deviacija in koeficienti variabilnosti.

Tabela 2: Depozit bakrovih ionov na listih vinske trte z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri
Table 2: Deposit of copper ions on samples of vine leaves with calculated basic statistical parameters

	Parametri					
	n	\bar{x}	min	max	sd	KV(%)
Depozit bakrovih ionov ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	224	5,8	1,6	15,1	2,8	48,7
Depozit bakrovih ionov ($\mu\text{g cm}^{-2}$) pred tretiranjem	112	3,7	1,6	11,5	1,4	39,6
Depozit bakrovih ionov ($\mu\text{g cm}^{-2}$) po tretiranju	112	8,0	4,0	15,1	2,1	26,5

n - število meritev; \bar{x} - povprečna vrednost; min - minimalna vrednost; max - maksimalna vrednost; sd - standardna deviacija; KV(%) - koeficient variabilnosti

V nadaljevanju je v tabeli 3 prikazanih vseh pet virov variabilnosti (obravnavanje, ponovitev, datum tretiranja, čas pobiranja in interakcija obravnavanja, datuma tretiranja in časa pobiranja), ki vplivajo na vrednost parametrov. Izračunana P vrednost kaže, kako vpliven je posamezen vir variabilnosti oz. vpliv na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte. Ker je vpliv interakcije med obravnavanjem, datumom tretiranja in časom pobiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte statistično značilen ($P \leq 0,001$), je potrebno interpretirati vplive ločeno po obravnavanjih, po datumu tretiranja in po času pobiranja.

Tabela 3: Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte**Table 3:** Variability and significance of individual effects on the deposit of copper ions on vine leaves

Parametri	Viri variabilnosti (P vrednost)				
	O (DF = 6)	PO (DF = 3)	DT (DF = 3)	ČP (DF = 1)	O×DT×ČP (DF = 45)
Meritev					
Depozit Cu²⁺ (µg cm⁻²)	<0.0001	<0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001

O-obravnava, PO-ponovitve, DT-datuma tretiranja, ČP - časa pobiranja, O×DT×ČP-interakcija obravnava, datuma tretiranja in časa pobiranja, P≤0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; P≤0,01 statistično visoko značilna razlika; P≤0,05 statistično značilna razlika; P>0,05 statistično neznačilna razlika; DF - prostostne stopnje. Statistično značilne P vrednosti so označene z debelim tiskom.

3.1 Vpliv obravnava na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte

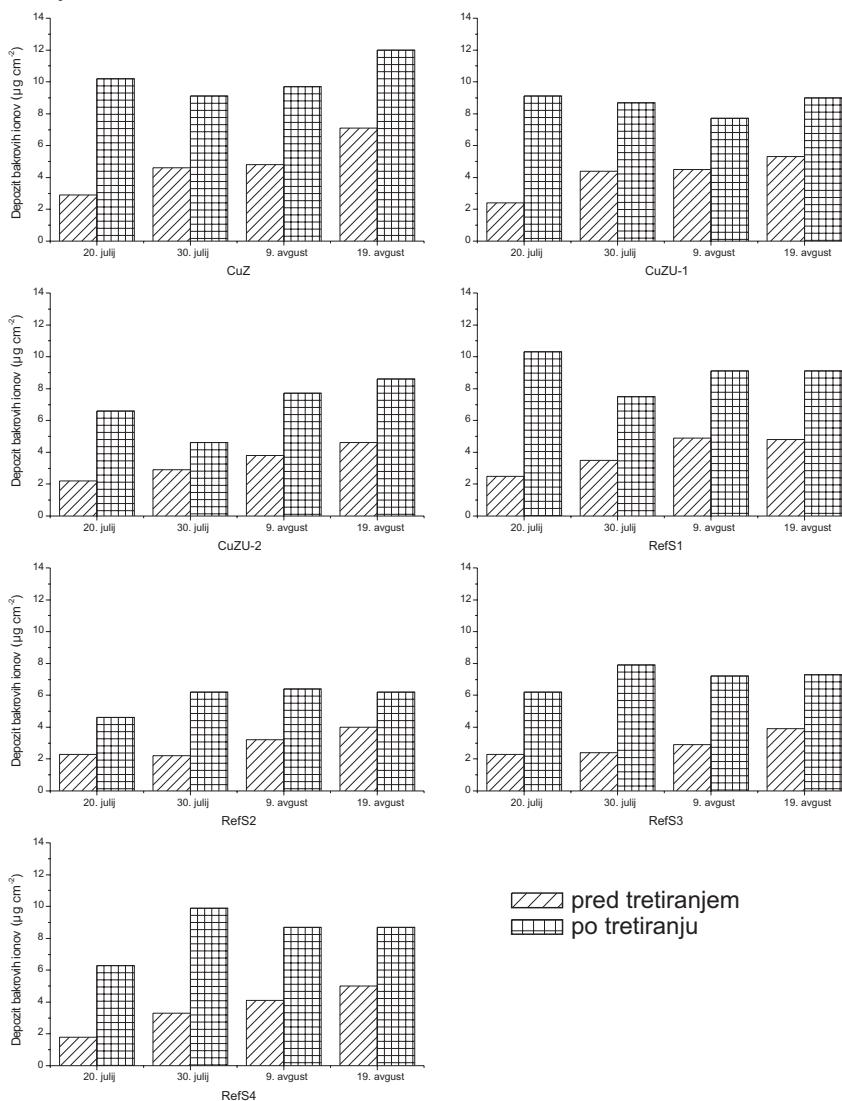
V tabeli 4 je podrobneje razčlenjen vpliv obravnava na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte, posebej glede na datum tretiranja in čas pobiranja. Za vsa obravnava so podane povprečne vrednosti štirih ponovitev. Iz tabele 4 je razvidno, da so bile razlike v depozitu bakrovih ionov na listih vinske trte med posameznimi obravnava statistično značilne, razen pred prvim tretiranjem z bakrovimi ioni (20. julija). Med obravnava ni bilo statistično značilnih razlik (P = 0,0554), kar je posledica uniformnosti vzorčevanih listov.

Tabela 4: Vpliv obravnava na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte, srednje vrednosti s standardnim odklonom, (Duncanov test, α=0,05)**Table 4:** Effect of treatment on the deposit of copper ions on samples of vine leaves, mean values with standard deviation, (Duncan's test, α=0.05)

DT	Depozit bakrovih ionov (µg cm ⁻²)			
	1 (20. julij)		2 (30. julij)	
	pred	po	pred	po
P				
O				
CuZ	2,9±1,1 ^a	10,2±0,9 ^a	4,6±1,3 ^a	9,1±0,7 ^{ab}
CuZU-1	2,4±0,5 ^{ab}	9,1±1,5 ^a	4,4±1,0 ^a	8,7±1,8 ^{ab}
CuZU-2	2,2±0,5 ^{ab}	6,6±0,5 ^b	2,9±0,6 ^{bc}	4,6±0,6 ^e
RefS1	2,5±0,4 ^a	10,3±1,4 ^a	3,5±0,7 ^{ab}	7,5±0,8 ^{cd}
RefS2	2,3±0,4 ^{ab}	4,6±0,2 ^c	2,2±0,2 ^c	6,2±0,7 ^d
RefS3	2,3±0,3 ^{ab}	6,2±0,6 ^b	2,4±0,2 ^{bc}	7,9±1,0 ^{bc}
RefS4	1,8±0,1 ^b	6,3±1,6 ^b	3,3±0,6 ^{abc}	9,9±1,3 ^a
z.	0,0554	<0,0001	0,0027	<0,0001
DT	3 (9. avgust)		4 (19. avgust)	
ČP	pred	po	pred	po
O				
CuZ	4,8±0,8 ^a	9,7±2,4 ^a	7,1±2,9 ^a	12,0±2,5 ^a
CuZU-1	4,5±0,6 ^a	7,7±1,5 ^{bcd}	5,3±0,7 ^{ab}	9,0±1,3 ^b
CuZU-2	3,8±0,3 ^{abc}	7,7±1,5 ^{bcd}	4,6±0,7 ^b	8,6±1,0 ^b
RefS1	4,9±1,3 ^a	9,1±2,2 ^{ab}	4,8±0,2 ^b	9,1±1,5 ^b
RefS2	3,2±0,4 ^{bc}	6,4±0,8 ^d	4,0±0,6 ^b	6,2±0,7 ^c
RefS3	2,9±0,6 ^c	7,2±1,7 ^{cd}	3,9±0,6 ^b	7,3±1,5 ^{bc}
RefS4	4,1±0,9 ^{ab}	8,7±2,9 ^{abc}	5,0±1,0 ^b	8,7±1,0 ^b
z.	0,0049	0,0019	0,0315	0,0004

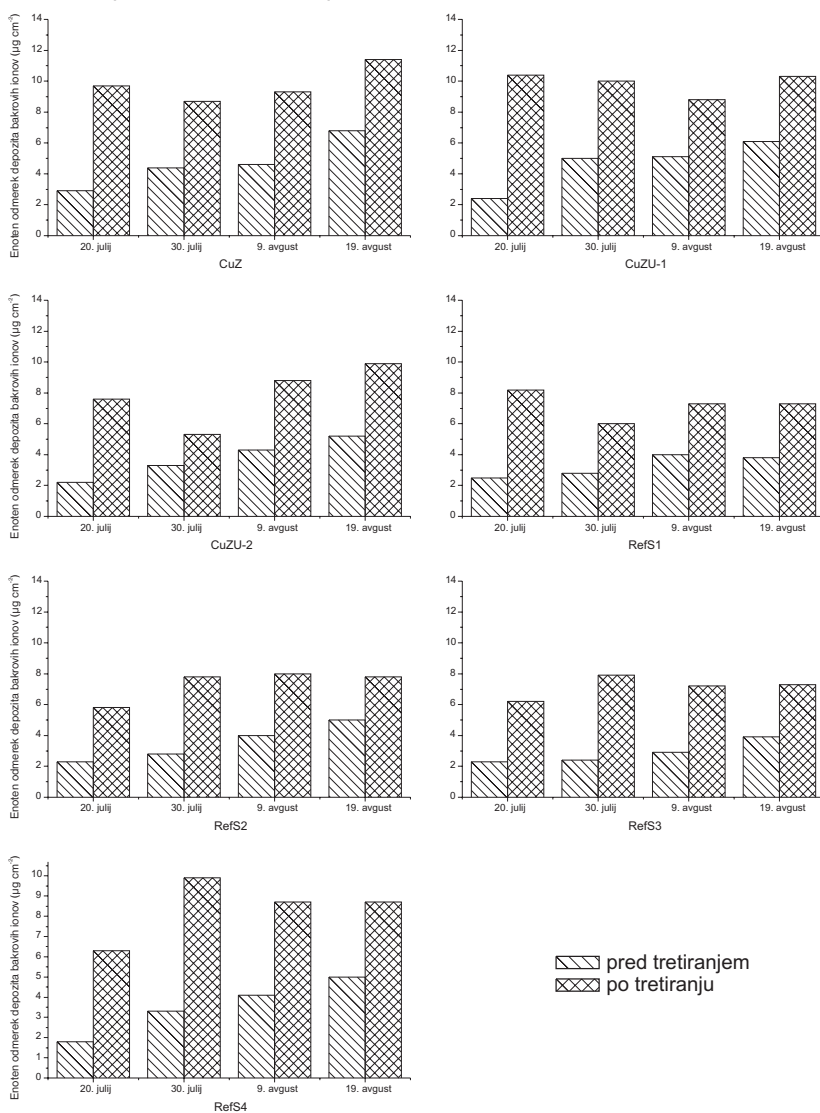
DT- datum tretiranja (1 do 4); ČP - čas pobiranja (pred tretiranjem, po tretiranj); O - obravnava (1 do 7); z. značilnost vpliva (P vrednost); P0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; P0,01 statistično visoko značilna razlika; P0,05 statistično značilna razlika; P>0,05 statistično neznačilna razlika; skupine v stolpcu z enako črko v eksponentu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Statistično značilne razlike so označene z debelim tiskom.

V večini primerov je bil dosežen največji depozit bakrovih ionov za obrnavanje CuZ (4,9 $\mu\text{g cm}^{-2}$ za tretje in četrto tretiranje), kjer je bil uporabljen odmerek bakrovih ionov 1050 g na ha (glej tabelo 1). Pri obrnavanju z referenčnim sredstvom 1 (RefS1) je bil uporabljen za 19 % večji odmerek bakrovih ionov (1250 g na ha, glej tabelo 1), kot pri obrnavanju CuZ, vendar kljub večjemu odmerku bakrovih ionov ni bil dosežen večji depozit bakrovih ionov, razen pri prvem tretiranju (20. julija), kjer je bil dosežen depozit 7,8 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Pri drugem tretiranju je bil dosežen največji depozit pri obrnavanju z referenčnim sredstvom RefS4, in sicer 6,6 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Na sliki 1 je podan grafični prikaz depozita bakrovih ionov na listih vinske trte po posameznih obrnavanjih.



Slika 1: Depozit bakrovih ionov na listih vinske trte ločeno po obrnavanjih
Figure 1: Deposit of copper ions on vine leaves for different treatments

Pri preračunanih vrednostih bakrovih ionov na enoten odmerek (slika 2) so bile dosežene največje vrednosti za obravnavanji CuZ (9,3 $\mu\text{g cm}^{-2}$ po tretjem tretiranju, 6,8 $\mu\text{g cm}^{-2}$ pred in 11,4 po četrtem tretiranju) in za CuZU-1 (10,4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ po prvem tretiranju, 5,0 $\mu\text{g cm}^{-2}$ pred in 10,0 $\mu\text{g cm}^{-2}$ po drugem tretiranju ter 5,1 $\mu\text{g cm}^{-2}$ pred tretjem tretiranjem). Kljub temu, da je bil pri obravnavanju CuZU-1 uporabljen za 17 % nižji odmerek bakrovih ionov (875 g ha^{-1} , glej tabelo 1) kot pri obravnavanju CuZ (1050 g ha^{-1} , glej tabelo 1), je bil pri obravnavanju CuZU-1 dosežen večji depozit bakrovih ionov preračunano na enoten odmerek.



Slika 2: Depozit bakrovih ionov na listih vinske trte preračunano na enoten odmerek bakrovih ionov ločeno po obravnavanjih

Figure 2: Deposit of copper ions on vine leaves normalized to the same application rate of copper ions for different treatments

3.2 Vpliv datuma tretiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte

V tabeli 5 je podrobneje razčlenjen vpliv datuma tretiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte, posebej po obravnavanjih in času pobiranja. Za vsa obravnavanja so podane povprečne vrednosti štirih ponovitev. Tabela 5 prikazuje, da je depozit bakrovih ionov na listih vinske trte naraščal od prvega do četrtega tretiranja, kar je bilo tudi pričakovati.

Enaki rezultati glede datuma tretiranja so bili doseženi tudi pri preračunanih vrednostih bakrovih ionov na enoten odmerek.

Tabela 5: Vpliv datuma tretiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte, (Duncanov test, $\alpha=0,05$)

Table 5: Effect of the date of application on the deposit of copper ions on samples of vine leaves, (Duncan's test, $\alpha=0.05$)

Obravnavanje	Čas pobiranja	Depozit bakrovih ionov ($\mu\text{g cm}^{-2}$)				Značilnost vpliva (P vrednost)
		Datum tretiranja				
		1 (20. julij)	2 (30. julij)	3 (9. avgust)	4 (19. avgust)	
CuZ	pred	2,9 ^b	4,6 ^b	4,8 ^{ab}	7,1 ^a	0,0199
	po	10,2 ^a	9,1 ^a	9,7 ^a	12,0 ^a	0,1751
CuZU-1	pred	2,4 ^c	4,4 ^b	4,5 ^b	5,3 ^a	<0,0001
	po	9,1 ^a	8,7 ^{ab}	7,7 ^b	9,0 ^{ab}	0,1255
CuZU-2	pred	2,2 ^d	2,9 ^c	3,8 ^b	4,6 ^a	<0,0001
	po	6,6 ^b	4,6 ^c	7,7 ^{ab}	8,6 ^a	0,0008
RefS1	pred	2,5 ^c	3,5 ^b	4,9 ^a	4,8 ^a	0,0011
	po	10,3 ^a	7,5 ^b	9,1 ^a	9,1 ^a	0,0039
RefS2	pred	2,3 ^c	2,2 ^c	3,2 ^b	4,0 ^a	0,0002
	po	4,6 ^b	6,2 ^a	6,4 ^a	6,2 ^a	0,0044
RefS3	pred	2,3 ^b	2,4 ^b	2,9 ^b	3,9 ^a	0,0043
	po	6,2 ^b	7,9 ^a	7,2 ^{ab}	7,3 ^{ab}	0,1725
RefS4	pred	1,8 ^c	3,3 ^b	4,1 ^{ab}	5,0 ^a	0,0003
	po	6,3 ^b	9,9 ^a	8,7 ^a	8,7 ^a	0,0149

3.3 Spiranje bakrovih ionov

V tabeli 6 je prikazano spiranje bakrovih ionov med prvim in drugim tretiranjem, med drugim in tretjim tretiranjem ter med tretjim in četrtem tretiranjem za posamezna obravnavanja.

Tabela 6: Delež spranih bakrovih ionov med posameznimi tretiranjmi za različna obravnavanja

Table 6: Relative wash-off of copper ions between the applications for different treatments

Obravnavanje	Odstotek izpiranja			Povprečje \pm SD
	20. julij - 30. julij	30. julij - 9. avgust	9. avgust - 19. avgust	
CuZ	55%	47%	27%	43% \pm 14%
CuZU-1	53%	49%	31%	44% \pm 12%
CuZU-2	56%	20%	42%	39% \pm 18%
RefS1	66%	33%	48%	49% \pm 17%
RefS2	52%	48%	38%	46% \pm 7%
RefS3	61%	63%	46%	57% \pm 9%
RefS4	47%	60%	43%	52% \pm 9%
Povprečje \pmSD	65% \pm 6%	46% \pm 15%	39% \pm 8%	

SD, standardni odklon.

Med prvim in drugim tretiranjem je padlo 23,8 mm padavin [7]. V tem času je bilo doseženo minimalno spiranje fitofarmacevtskega sredstva pri referenčnem sredstvu 4 (RefS4), in sicer 47 %. Med drugim in tretjim tretiranjem je padlo 88,1 mm padavin [7] in bilo doseženo minimalno spiranje fitofarmacevtskega sredstva pri obravnavanju CuZU-2 (20 %). Med tretjim in četrtem tretiranjem je padlo 96,2 mm padavin [7] in bilo doseženo minimalno spiranje fitofarmacevtskega sredstva pri obravnavanju CuZ (27 %). Če primerjamo povprečne vrednosti med vsemi temi tretiranjmi, je bilo doseženega najmanj spiranja pri obravnavanju CuZU-2 (39 %), sledijo CuZ (43 %), CuZU-1 (44 %), RefS2 (46 %), RefS1 (49 %), RefS4 (52 %) in RefS3 (57 %). Najmanjše je bilo spiranje pri obravnavanju CuZU-2, kjer je bila uporabljena največja količina vode (1000 L ha^{-1} , glej tabelo 1). Posledica tako majhnega spiranja med tretiranjem je otekanje pršilne brozge že takoj po tretiranju zaradi večje porabe vode kot pri ostalih obravnavanjih, kjer je bila poraba vode 400 L ha^{-1} .

3.4 Vpliv časa pobiranja listov na depozit bakrovih ionov

V tabeli 7 je podrobneje razčlenjen vpliv časa pobiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte, posebej po obravnavanjih in datumu tretiranja. Za vsa obravnavanja so podane povprečne vrednosti štirih ponovitev. Iz tabele 7 je razvidno, da so bile razlike v depozitu bakrovih ionov na listih vinske trte za vsa obravnavanja in za vse datume tretiranja statistično značilne z ozirom na čas pobiranja listov. Depozit bakrovih ionov na listih vinske trte po tretiranjih je bil pričakovano večji kot depozit bakrovih ionov pred tretiranjem.

Pri vplivu časa pobiranja listov na depozit bakrovih ionov preračunano na enoten odmerek bakrovih ionov so bili doseženi enaki rezultati.

Tabela 7: Vpliv časa pobiranja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte, (Duncanov test, $\alpha=0,05$)
Table 7: Effect of the time of sampling on the deposit of copper ions on samples of vine leaves, (Duncan's test, $\alpha=0,05$)

Obravnavanje	Datum tretiranja	Depozit bakrovih ionov ($\mu\text{g cm}^{-2}$)		Značilnost vpliva (P vrednost)
		Čas pobiranja		
		pred	po	
CuZ	1 (20. julij)	2,9 ^b	10,2 ^a	0,0033
	2 (30. julij)	4,6 ^b	9,1 ^a	0,0047
	3 (9. avgust)	4,8 ^b	9,7 ^a	0,0122
	4 (19. avgust)	7,1 ^b	12,0 ^a	0,0067
CuZU-1	1 (20. julij)	2,4 ^b	9,1 ^a	0,0040
	2 (30. julij)	4,4 ^b	8,7 ^a	0,0062
	3 (9. avgust)	4,5 ^b	7,7 ^a	0,0303
	4 (19. avgust)	5,3 ^b	9,0 ^a	0,0023
CuZU-2	1 (20. julij)	2,2 ^b	6,6 ^a	0,0030
	2 (30. julij)	2,9 ^b	4,6 ^a	0,0030
	3 (9. avgust)	3,8 ^b	7,7 ^a	0,0207
	4 (19. avgust)	4,6 ^b	8,6 ^a	0,0034
RefS1	1 (20. julij)	2,5 ^b	10,3 ^a	0,0017
	2 (30. julij)	3,5 ^b	7,5 ^a	<0,0001
	3 (9. avgust)	4,9 ^b	9,1 ^a	0,0261
	4 (19. avgust)	4,8 ^b	9,1 ^a	0,0121

Obravnavanje	Datum tretiranja	Depozit bakrovih ionov ($\mu\text{g cm}^{-2}$)		Značilnost vpliva (P vrednost)
		Čas pobiranja		
		pred	po	
RefS2	1 (20. julij)	2,3 ^b	4,6 ^a	0,0008
	2 (30. julij)	2,2 ^b	6,2 ^a	0,0009
	3 (9. avgust)	3,2 ^b	6,4 ^a	0,0079
	4 (19. avgust)	4,0 ^b	6,2 ^a	0,0164
RefS3	1 (20. julij)	2,3 ^b	6,2 ^a	0,0014
	2 (30. julij)	2,4 ^b	7,9 ^a	0,0014
	3 (9. avgust)	2,9 ^b	7,2 ^a	0,0130
	4 (19. avgust)	3,9 ^b	7,3 ^a	0,0151
RefS4	1 (20. julij)	1,8 ^b	6,3 ^a	0,0105
	2 (30. julij)	3,3 ^b	9,9 ^a	0,0006
	3 (9. avgust)	4,1 ^b	8,7 ^a	0,0363
	4 (19. avgust)	5,0 ^b	8,7 ^a	0,0280

P \pm 0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; P \pm 0,01 statistično visoko značilna razlika; P \pm 0,05 statistično značilna razlika; P $>$ 0,05 statistično neznačilna razlika; skupine v vrstici z različno črko v eksponentu se med seboj statistično značilno razlikujejo. Statistično značilne razlike so označene z debelim tiskom.

4 ZAKLJUČKI

1. Vpliv obravnavanja na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte je bil statistično značilen. Največji depozit bakrovih ionov je bil dosežen pri obravnavanju CuZ. Statistično značilen je bil tudi vpliv obravnavanja na depozit bakrovih ionov na listih preračunano na enotni odmerek bakrovih ionov. Največje vrednosti bakrovih ionov preračunano na enotni odmerek so bile dosežene pri obravnavanju CuZ in CuZU-1.
2. Vpliv datuma tretiranja je pokazal, da so bile statistično značilne razlike v depozitu bakrovih ionov med posameznimi datumi tretiranja. Opazen je trend naraščanja v depozitu bakrovih ionov od prvega do četrtega tretiranja. Enaki rezultati so bili doseženi za depozit bakrovih ionov preračunano na enotni odmerek.
3. Spiranje uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev, pri porabi vode 400L ha⁻¹, je bilo najmanjše pri obravnavanju CuZ (43 %) in CuZU-1 (44 %). Pri referenčnih sredstvih je bilo spiranje večje (do 46 do 57 %).
4. Vpliv časa pobiranja zelenih listov vinske trte je pokazal, da je bil depozit bakrovih ionov pred vsemi tretiranjmi statistično značilno manjši glede na depozit bakrovih ionov na listih vinske trte po tretiranjih. Prav takšne so bile statistično značilne razlike pri depozitu bakrovih ionov preračunano na enotni odmerek.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se vsem, ki so sodelovali pri tem projektu, predvsem Zlatemu Griču iz Slovenskih Konjic, ki nam je omogočil izvedbo poskusa na terenu in Cinkarni Celje, Metalurško kemični industriji Celje za opravljene laboratorijske analize in sofinanciranje ter vsem sodelavcem iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, ki ste nam pomagali. Zahvaljujemo se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost za sofinanciranje.

5 LITERATURA

1. Cross, J.V., Murray, R.A., Ridout, M.S., Walklate, P.J., Quantification of spray deposits and their variability on apple trees.- *Aspects of Applied Biology*, 48(1997), p. 217-224.
2. De Moor, A., Langenakens, J., Vereecke, E., Jaeken, P., Lootens, P., Vandecasteele, P., Image analysis of water sensitive paper as a tool for the evaluation of spray distribution of orchard sprayers.- *Aspects of Applied Biology*, 57(2000), p. 329-341.
3. Doruchowski, G., Labanowska, B., Goszczynski, W., Godyn, A., Holownicki, R., Spray deposit, spray loss and biological efficacy of chemicals applied with different spraying techniques in black currants.- *Electronic journal of Polish Agricultural Universities, Agricultural Engineering*, 5(2002)2.
4. Furness, G.O., Magarey, P.A., Miller, P.H., Drew, H.J., Fruit tree and vine sprayer calibration based on canopy size and length of row: unit canopy row method.- *Crop protection*, 17(1998)8, p. 639-644.
5. Kač, M., Comparison of various methods for determination of the deposit of pesticides on leaves of the treated plants. *Zbornik biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 61(1993), p. 199-204.
6. Kač, M., Golhleb, S., Košir, I. J., Kdaj so podatki določanja depozita fitofarmaceutskega sredstva res povedni? *Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Power and pitfalls of deposit measurements of phytopharmaceuticals. The 6th Slovenian Conference on Plant Protection. Zreče, 4.-6. marec 2003*, s. 66-71.
7. Luskar, S., Košir, I. J., Kač, M., Depozit bakrovih ionov na listih vinske trte in njegov vpliv na biološko učinkovitost uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev za zatiranje peronospore vinske trte: 1. Biološka učinkovitost. - *V tisku*.
8. Salyani, M., Fox, R. D., Performance of image analysis for assessment of simulated spray droplet distribution.- *Transactions of the ASAE* 37(1994)4, p. 1083-1089.

9. Salyani, M., Methodologies for assessment of spray deposit in orchard applications.- ASAE Meeting Presentation, Milwaukee, Wisconsin, USA, July 9-12, 2000, Paper No. 00-1031.
10. Salyani, M., McCoy, C.W., Deposition of different spray volumes on citrus trees. Proc. Fla. State Hort. Soc. 102(1989), p. 32-36.
11. SAS/STAT Software. Version 8. 01. 1999. Cary, SAS Institute Inc:software.
12. Žolnir, M., Nekatere kvalitativne značilnosti nanosa škropiva v območju pršilnika pri pršenju hmeljišč. Zbornik predavanj in referatov 1. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, 1993, s. 237-248.

IDENTIFIKACIJA SLOVENSКИH SORT HMELJA Z MIKROSATELITSKIMI MARKERJI

Andreja ČERENAK¹, Jernej JAKŠE²

UDK/UDC 633.791 : 522.524 (497.4) (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 17. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

V članku je za identifikacijo slovenskih sort hmelja prikazana uporaba mikrosatelitskih markerjev. V molekularni analizi je bilo analiziranih šestnajst genotipov s tremi pari začetnih oligonukleotidov. Narejena je shema identifikacije sort na osnovi podatkov polimorfnihi mikrosatelitov, uporabna za žlahtnitelje hmelja, trgovce in pivovarje.

Ključne besede: hmelj, mikrosatelitski markerji, identifikacija sort

IDENTIFICATION OF SLOVENE HOP VARIETIES USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The article reports on the use of microsatellite markers for identification of Slovene varieties. Sixteen genotypes were analysed using three primer pairs for the molecular analysis. A scheme of cultivar identification based on polymorphic microsatellite data is provided which can be used by for hop breeders, merchants, and brewers.

Key words: hop, microsatellite markers, variety identification

¹ dr. znanosti, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² doc., dr. znanosti, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Biotehniška Fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Zanesljivo ločevanje sort hmelja in ugotavljanje sortne čistosti je v hmeljarstvu zelo pomembno. Nujno potrebno je na številnih področjih panoge, od pridelave, žlahtnjenja, trgovine hmelja do pivovarske industrije. Žlahtnitelji potrebujejo uporabno identifikacijsko orodje za ločevanje sort in posledično uveljavljanje svojih žlahtniteljskih pravic, hmeljarji pa želijo sortno čista hmeljišča za zagotavljanje optimalne pridelave hmelja. Identifikacija sort je pomembna v pivovarstvu, saj sta grenčica in aroma piva neposredno pogojeni z izvorom hmelja.

Za potrjevanje identitete hmeljnih sort se uporablja več tradicionalnih metod na podlagi vrednotenja fenotipa rastline. Že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja je Davis [4] predlagal sedem morfoloških značilnosti rastlin za ločevanje sort hmelja. Fenotipska vrednotenja so se v nadaljnjih letih izpopolnjevala in so postala zelo učinkovita, njihova glavna slabost je dolgotrajnost opazovanj. Poleg tega so fenotipske ocene močno pod vplivi okolja kot so rastni pogoji, področje gojenja in tudi čas opazovanj. V zadnjih 40 letih je bil povečan interes v smeri razvoja identifikacijskih metod na podlagi kemijskih analiz eteričnih olj in grenčičnih komponent hmelja, sestava katerih je genetsko kontrolirana [9, 13, 14, 16]. Proučevanje sestave eteričnih olj poteka na IHPS že od leta 1982. S primerjavo organoleptičnega ocenjevanja genotipov, vključenih v poskus v Žalcu in na sorodnem inštitutu v Nemčiji (Institut für Hopfenforschung, Hüll) so ugotovili, da je le-to precej subjektivno, saj so skladne rezultate dosegli le pri 62 % vzorcev. Variabilnost eteričnih olj je intenzivno proučevala Kraljeva s sod. [11], rezultat česar je med drugim razvit min-max model, sistem za klasifikacijo 95 hmeljnih kultivarjev v 14 skupin z uporabo 31 deskriptorjev. V zadnjih letih so bile v model dodane 3 nove nemške sorte [8], ista avtorja pa sta določila 5 slovenskih komercialno najbolj zanimivih sort hmelja z vključitvijo 78 hmeljnih vzorcev iz različnih področij gojenja v Sloveniji [10]. Vsekakor je večina identifikacij narejenih z uporabo kemijskih analiz svežih ali procesiranih produktov hmelja, na drugi strani pa razvoj metod molekularne genetike vodi k novim alternativam in pristopom.

Tehnika naključno nanožene polimorfne DNA (RAPD) [1, 7], sekvenčno označena mesta (STS) [2], polimorfizem dolžine pomnoženih restrikcijskih fragmentov (AFLP) [5, 15] in mikrosateliti oz. enostavne ponavljajoče se sekvence (SSR) [3, 6] so metode, ki so do neke mere že bile uporabljene za identifikacijo sort hmelja. Zaradi velike ponovljivosti in primerljivosti rezultatov med različnimi laboratoriji so najbolj obetavni mikrosatelitski markerji, predvsem zaradi robustnosti, enostavne izvedbe amplifikacije in visoke stopnje polimorfnosti. Mikrosatelitska DNA sestoji iz zaporedja majhnih ponavljajočih se enot, običajno dolgih 1 do 6 baznih parov, ki so razpršene po celotnem eukariotskem genomu. Polimorfizem mikrosatelitov predstavlja dolžina osnovnega motiva ter število tandemskih ponovitev, ki se lahko enostavno določijo s pomnoževanjem v polimerazni verižni reakciji (PCR). Rezultat kombinacije podatkov več visoko polimorfnih mikrosatelitskih lokusov so individualni alelni profili, ki omogočajo ločevanje genotipov.

Cilj našega dela je bilo zagotoviti sistem identifikacije slovenskih sort hmelja z mikrosatelitskimi markerji. Rezultati dela bodo lahko uporabni za identifikacijo sort ne glede na razvojno stopnjo rastline.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Material

V analizo smo vključili vse slovenske sorte hmelja (Aurora, Ahil, Atlas, Apolon, Blisk, Buket, Bobek, Celeia, Cerera, Cicero, Cekin in Savinjski golding) ter štiri tetraploide, pridobljene s kolhicinskim tretiranjem sort Ahil, Apolon, Atlas in Savinjski golding.

2.2 Izolacija DNA

Za izolacijo celokupne genomske DNA hmelja smo uporabili metodo CTAB po uveljavljenem protokolu [12]. Iz svežih, mladih listov hmelja, ki smo jih nabrali v kolekcijskem nasadu na IHPS, smo vzeli približno 1-2 cm² rastlinskega tkiva in ga v terilnici dobro homogenizirali ob dodatku 1 ml CTAB ekstrakcijskega pufru [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 % (v/v) -merkaptometanol], predhodno segretega na 68 °C. Vzorce smo ekstrahirali z mešanico fenola, kloroforma in izoamilalkohola v razmerju 25:24:1. DNA smo oborili z dodatkom 1/10 volumna 3 M Na-acetata (pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in z enim volumnom ledeno-hladnega izopropanola. Usedlino (zgoščeno DNA) smo sprali s 70 % etanolom in jo raztopili v TE pufru [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in vzorce shranili pri 4 °C. Koncentracijo DNA smo izmerili s pomočjo mini fluorometra TKO100 (Hoefer Scientific, San Francisco, ZDA).

2.3 Namnoževanje mikrosatelitskih markerjev

Za namnoževanje mikrosatelitskih lokusov smo uporabili predhodno objavljene pare začetnih oligonukleotidov [3]. Lokusno specifični začetni oligonukleotidi so bili izdelani pri MWG-Biotech (Ebersberg, Nemčija). PCR reakcija je vsebovala 50 ng genomske DNA, 1 enoto *Taq* DNA polimeraze (Boehringer Mannheim, Nemčija), 1x PCR pufer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3), 0,5 μM koncentracijo vsakega začetnega oligonukleotida in 0,2 mM koncentracijo vsakega deoksinuklotid trifosfata (Boehringer Mannheim, Nemčija). Po 3 minutni denaturaciji pri 94 °C je sledilo 26 ciklov s ponavljanjem:

- 45 sekund pri 94 °C
- 30 sekund pri 55 °C
- 90 sekund pri 72 °C

s končno inkubacijo vzorcev 7 minut pri 72 °C v Perkin Elmer 480 cikličnem termostatu.

2.4 Zaznavanje namnožene DNA

Namnožene mikrosatelitske markerje smo ločili z uporabo vertikalne denuracijske poliakrilamidne gelske elektroforeze (S2; Life Technologies, Carlsbad, California). Po pravilnem tretiranju obeh plošč smo med plošči nanegli denuracijski poliakrilamidni gel pripravljen iz 7,5 M uree, 1x TBE elektroforetskega pufru in 5% raztopine akrilamid: bisakrilamid, pripravljene iz 40% založne raztopine z razmerjem 19:1. Raztopino smo po filtraciji vakumirali, pred vlitjem gela pa smo dodali 0,5 μl TEMED-a in 2 μl 10% amonpersulfata. Elektroforeza in zaznavanje namnožene DNA po barvanju s srebrom sta potekala po protokolu Promega Silver Sequence™ z manjšimi modifikacijami [6].

Dolžina alelov je bila določena s primerjavo z dolžinskimi AFLP 10 bp dolgimi fragmenti. Najdaljši alel je bil označen s črko A, sledili so mu krajši aleli, označeni z naslednjimi črkami abecede.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Pri vseh namnožitvah smo dobili jasne in nedvoumne DNA produkte. Prisotnost dveh fragmentov na enem lokusu smo smatrali za heterozigoten genotip in namnožitev le enega fragmenta za homozigotno stanje (Slika 1). Prisotnosti treh alelov nismo zasledili, kar je v skladu s pričakovanji, saj triploidi niso bili vključeni v raziskavo.

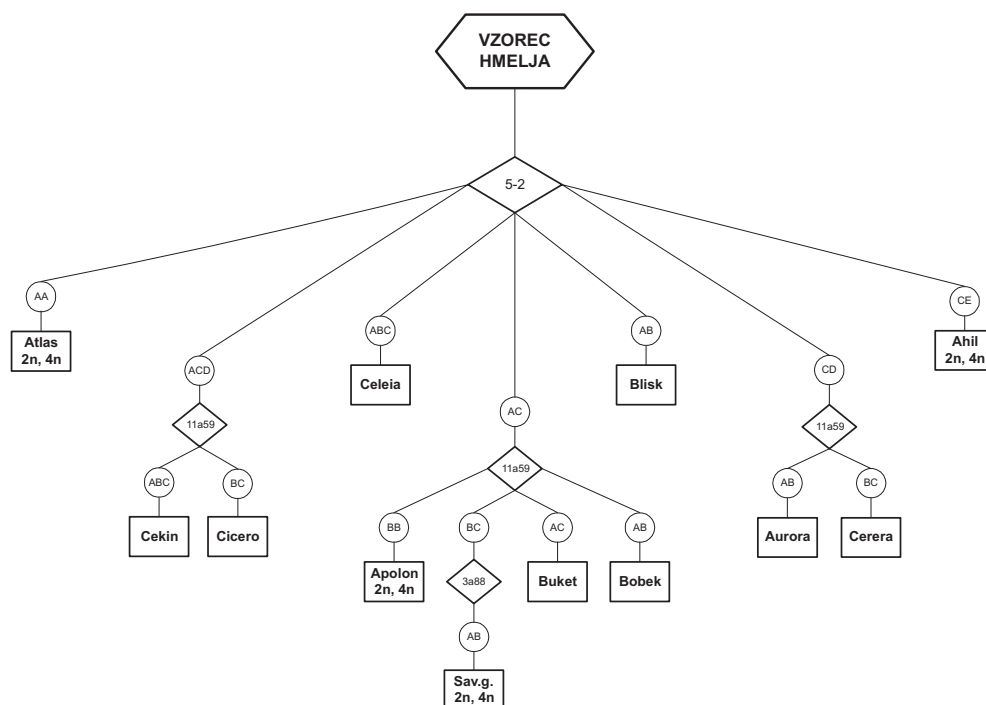
Preglednica 1: Dolžina alelov na mikrosatelitskih lokusih v baznih parih

Table 1: Length of alleles at microsatellite loci in base pairs

Lokus	Aleli				
	A	B	C	D	E
5-2	184	182	180	178	166
11a59	196	194	184		
3a88	198	194			

Predstavljena raziskava je del širše zasnovanega proučevanja genotipov z več mikrosatelitskimi markerji. V članku je izpostavljena shema določevanja slovenskih sort hmelja v primeru, da je potrebno analizirati hmeljni vzorec neznanega porekla. Z uporabo lokusa 5-2, ki smo ga uvrstili na začetek določevanja sort, smo slovenske sorte razdelili na 7 enot. Sorte Atlas, Ahil, Blisk in Celeia so bile s specifičnim genotipom določene že v prvi fazi analize. Velika večina ostalih sort je bila ločena z namnoževanjem na lokusu 11a59, pri čemer smo na tej stopnji uspešno določili sorte Aurora, Apolon, Buket, Bobek, Cekin, Cicero in Cerera. Slednjo sorto, Savinjski golding smo določili z lokusom 3a88. Vsi tetraploidni genotipi, dobljeni s tretiranjem s kolhicinom so imeli elektroforetski profil enak diploidnemu donorju, zato v skladu s pričakovanji niso bili ločljivi. Njihovo ločevanje za samo panogo ni pomembno, saj se tetraploidi v slovenskih hmeljiščih ne pridelujejo.

Zaključimo lahko, da so mikrosatelitski markerji uspešen markerski sistem za ločevanje slovenskih sort hmelja. Poudariti je potrebno, da je za analizo primeren katerikoli del rastline ne glede na stopnjo razvoja, na rezultat analize pa ne vpliva področje gojenja in drugi vplivi okolja.



Slika 1: Shema identifikacije slovenskih sort hmelja z mikrosatelitskimi markerji. Krogi označujejo genotip (preglednica 1), romboidi pa lokuse, uporabljene v analizi.

Figure 1: Flowchart for the identification of Slovene varieties using microsatellite markers. Circles indicate obtained genotypes (Table 1) and rhomboids indicate loci used in analysis.

4 VIRI

1. Abbot, M.S., Fedele, M.J., A DNA-based varietal identification procedure from hop leaf tissue.-J. Inst. Brew. 100(1994), s. 283-285.
2. Araki, S., Tsuchiya, Y., Takashio, M., Tamaki, T., Shinotsuka, K., Identification of hop cultivars by DNA marker analysis.- J. Amer. Soc. Brew. Chem. 56 (1998), s. 81-130.
3. Brady, J.L., Scott, N.S., Thomas, M.R., DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS).-Euphytica 91(1996), s. 277-284.
4. Davis, E.L., Variation in cultivated varieties of *Humulus lupulus* L. and its relation to the possible sources of these varieties. - Doct. Diss. Ser., Publ. no. 17(1956), Univ. microfilms, Ann Arbor, Michigan.

5. Hartl, L., Seefelder, S., Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs.- Theor. Appl. Genet. 96(1998), s. 112-116.
6. Jakše, J., Kindlhofer, K., Javornik, B., Assessment of genetic variation and differentiation of hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by microsatellite and AFLP markers.- Genome 44(2001), s. 773-782.
7. Jakše, J., Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Identification of hop cultivars by RAPD markers.- Proc. Int. Colloq. Impact Plant Biotech. Agric., Rogla, Slovenia, 5-7 December 1994. Ljubljana, Centre for Plant Biotechnology and Breeding, University of Ljubljana, Agronomy Department, s. 147-151.
8. Kač, M., Kovačevič, M., Solid phase microextraction of hop volatiles. Potential use for determination and verification of hop varieties.- J. Chromatogr. A 918(2001), s. 159-167.
9. Kenny, S.T., Identification of US-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analysis.- J. Amer. Soc. Brew. Chem. 48(1988), s. 3-8.
10. Kovačevič, M., Kač, M., Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. - Food Chem. 77(2002), s. 489-494.
11. Kralj, D., Zupanec, J., Vasilj, D., Kralj, S., Pšeničnik, J., Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. - J. Inst. Brew. 97(1991), s. 197-206.
12. Kump B., Svetek S., Javornik B., Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv.- Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 59(1992), s. 63-66.
13. Lemmens, G.W.C., The breeding and parentage of hop varieties.- Brew. Dig. May (1998), s. 16-26.
14. Perpete, P., Varietal Discrimination of hop pellets by essential oil analysis I. Comparison of fresh samples.- J. Amer. Soc. Brew. Chem. 56(1998), s. 104-108.
15. Townsend M.S., Henning J.A., Moore, D.L., AFLP analysis of DNA from Dried Hop Cones.- Crop Sci. 40(2000), s. 1383-1386.
16. Wagner, T., The quantity and composition of bitter resins chemotaxonomic characteristics of hop varieties.- Pharm. J. Slov. 34(1983), s. 77-83.

VZPOSTAVITEV IDENTIFIKACIJSKEGA SISTEMA ZA DOLOČEVANJE HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA

Jernej JAKŠE¹ in Sebastjan RADIŠEK²

UDK/UDC 632.95 : 633.791 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 18. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Testiranje hmeljnih rastlin na okužbo s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd) je Evropska organizacija za varstvo rastlin (EPPO) uvedla v certifikacijsko shemo produkcije sadilnega materiala, katero je prevzela tudi Slovenija. Rastline okužene s HLVd so ponavadi brez simptomov, se pa lahko občutno zniža pridelek alfa kislin. Identifikacija HLVd s klasičnimi morfološkimi metodami zaradi tega ni izvedljiva, imamo pa voljo sodobne molekulske tehnike, ki temeljijo na povratni poliakrilamidni elektroforezi, hibridizaciji in reverzni transkripciji z verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR). Slednji dve odlikujeta predvsem hitrost in zanesljivost obenem pa se tudi dopolnjujeta. Njihova razvoj in vpeljava v diagnostiko sta predstavljena v nadaljevanju.

Ključne besede: HLVd, RT-PCR, hibridizacija, patogeni hmelja

REESTABLISHMENT OF THE IDENTIFICATION SYSTEM FOR DETECTION OF HOP LATENT VIROID

ABSTRACT

Testing hop plants for HLVd infection is being considered under the European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) certification scheme for the production of planting material and it has been fully adopted by Slovenia. Plants infected by HLVd are usually symptomless, but decline in total yield of alpha acids has been reported. Identification of HLVd by classical morphological methods is not possible due to the non-expressed symptoms, but novel molecular techniques are capable of detecting it. They are mainly based on reverse PAGE electrophoresis, hybridization and RT-PCR. The latter two are considered to be quick, reliable and complementary. Their development and utilization in HLVd diagnostics is presented in the paper.

Keywords: HLVd, RT-PCR, hybridization, hop pathogens

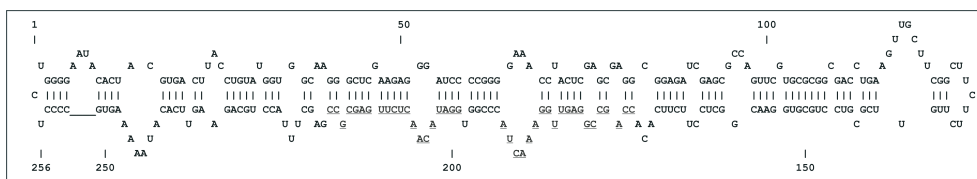
¹ doc. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

² dr. znanosti, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Diagnostični laboratorij, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

1 UVOD

Viroidi so enoverižne, krožne, nizko molekularne RNA molekule, katerih obstoj in patogenost sta dokazana že v mnogih rastlinskih vrstah. Povzročajo mnogo pomembnih boleznih s simptomi, ki so navidez podobni virusnim obolenjem. Viroidne RNA molekule ponavadi niso daljše od 400 baznih parov (bp) in nimajo kodirajočih regij, ki bi se prepisale v protein. Značilna je njihova sekundarna struktura (Slika 1), ki je določena z medsebojnim parjenjem nukleotidnih baz molekule, zaradi česar ima viroid značilno paličasto strukturo. Ta se v denaturacijskih pogojih poruši in prevzame zaprto-krožno obliko. Za vse viroidne bolezni je značilno, da so popolnoma odvisne od metabolizma gostiteljske rastline, njihova replikacija in patogeneza pa je pogojena z viroidnimi strukturnimi lastnostmi in sposobnostjo interakcije s celičnimi faktorji. Dve ključni vprašanji, ki se vseskozi pojavljata pri viroidih, sta kako povzročajo bolezenske simptome brez kodirajočih proteinov in zakaj imajo značilno sekundarno strukturo. Nedavne študije so pokazale, da so viroidne molekule sposobne vključiti mehanizem RNA utišanja pomembnih fizioloških genov gostitelja [14].

Do sedaj sta bila pri hmelju opisana dva viroida: (1) hmeljev stunt viroid (HSVd, 297 bp) [13], ki je zaenkrat omejen le na Japonsko in okužuje tudi sadne vrste in (2) hmeljev latentni viroid (HLVd, 256 bp) [11], ki je vsesplošno razširjen v intenzivni pridelavi hmelja z neizrazitimi simptomi okužbe, vendar lahko pri nekaterih kultivarjih hmelja izredno škodljivo vpliva na pridelek [10]. Pri tem je treba izpostaviti kvantitativne spremembe nekaterih sekundarnih metabolitov lupulinske frakcije, prav tako pa se lahko nekoliko zmanjšajo storžki hmelja rastlin okuženih s HLVd v primerjavi z neokuženimi rastlinami [1, 2, 3]. Čeprav so morfološki znaki okužbe neizraziti, so biokemične spremembe storžkov v nasprotju z imenom bolezni, ki ga označuje za latentnega. Nedavno so tudi v Sloveniji povezali pojav kržljivosti hmelja s kombinacijo pomanjkljive preskrbe z borom, stresnih vremenskih razmer in hkratne izrazitejšje navzočnosti HLVd [7].



Slika 1: Nukleotidno zaporedje hmeljnega latentnega viroida (HLVd) v termodinamično optimizirani sekundarni strukturi. Mesti prileganja začetnih oligonukleotidov pri RT-PCR reakciji sta podčrtani. Povzeto po [11].

Figure 1: The nucleotide sequence of hop latent viroid (HLVd) arranged in a thermodynamically optimized secondary structure. Primer annealing sites employed in the RT-PCR reaction are underlined. According to [11].

Testiranje hmeljnih rastlin na okužbo s HLVd je Evropska organizacija za varstvo rastlin (European and Mediterranean Plant Protection Organisation – EPPO) uvedla v certifikacijsko shemo produkcije sadilnega materiala hmelja. Tega je tudi v celoti prevzela slovenska certifikacijska shema, zaradi česar se je pojavila potreba po razvoju in vpeljavi testov določanja za HLVd. Za vse teste določanja patogena velja, da morajo biti hitri, enostavi in zanesljivi. V preteklosti so bili pri nas izvedeni poskusi s povratno poliakrilamidno elektroforezo (R-PAGE) in obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) za

določevanje HLVd [8]. R-PAGE tehnika ni primerna za detektiranje viroida v večjem številu vzorcev. Zaradi tega smo se odločili za vpeljavo metode hibridizacije točkovnega odtisa (DOT-BLOT) v kombinaciji z uporabo RT-PCR metode, ki izpolnjujeta kriterije enostavnosti, hitrosti in zanesljivosti in se v metodološkem smislu medsebojno dopolnjujeta, saj prva temelji na tehniki hibridizacije nukleinskih kislin, druga pa na *in vitro* pomnoževanju RNA molekule. V nadaljevanju bova predstavila vpeljavo obeh tehnik, ki se sedaj rutinsko uporabljata pri testiranju sadilnega in žlahniteljskega materiala hmelja.

2 MATERIAL IN METODE

V primeru dela z RNA je potrebno paziti na morebitne kontaminacije z RNazami. Natančna navodila glede izogibanja kontaminacij z RNazami in uporabe inhibitorjev so na voljo v splošnih laboratorijskih priročnikih.

2.1 Rastlinski material

Detekcijo viroida smo opravili na 20-ih sadikah hmelja, ki so bile certifikata A, gojenih v rastlinjaku Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (po pet različnih rastlin štirih kultivarjev hmelja 'Aurora' 1-5, 'Savinjski Golding' 6-10, 'Celeia' 11-15 in 'Taurus' 16-20), in na dveh vzorcih hmeljnih storžkov ('Aurora' -21 in 'Savinjski Golding' - 22). V primeru rastlin smo izolirali celokupne nukleinske kisline (TNA) ali rastlinski sok (SAP) iz mladih listov (2-4 cm² tkiva), pri storžkih pa smo uporabili za izolacijo ovršne lističe (približno tretjino celega storžka), ki smo jim odstranili lupulinske žleze.

2.2 Izolacija vzorcev

Pri optimizaciji metode smo uporabili tri različne ekstrakcijske raztopine, dve za izolacijo celokupnih nukleinskih kislin (TNA), (CTAB [2 % CTAB, 0,1 M TRIS-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% Na-sulfit, 2 % PVP-40, 0,4 % β -merkaptioetanol] in AMES [3 % SDS, 20 % etanol, 1 M NaCl, 0,5 M Na-acetat, 10 mM MgCl₂, pH 6,0]), [5] in raztopino za izolacijo rastlinskega soka (SAP) (HOP EXTRACTION raztopina [200 mM K₂HPO₄, 10 mM DIECA, 5 mM DTT, 0,1 %, Triton X-100]) [3].

CTAB izolacija. Postopek je identičen že objavljenemu postopku izolacije rastlinske DNA [9], na voljo je pri avtorjih. Vzorce smo shranjevali pri -20 °C.

AMES izolacija. Postopek je bil identičen CTAB izolaciji, le ob uporabi AMES ekstrakcijskega pufra.

Izolacija rastlinskega soka. Rastlinski vzorec smo homogenizirali ob dodatku 1 ml HOP EXTRACTION raztopine, centrifugirali 5 min pri 14.000 vrt/min in dobljeni supernatant takoj nanесли na membrano. Ostalo raztopino smo zavrgli.

2.3 RT-PCR reakcija

Za RT-PCR reakcijo smo uporabili komercialni RT-PCR komplet (Access RT-PCR, Promega) po navodilih proizvajalca. V reakcijsko tubico smo zmešali 1,5 μ l redčene matrične DNA (preizkušali smo redčitve TNA vzorcev od 1:10 do 1:25000, SAP vzorcev pri RT-PCR nismo uporabili) in po 15 pmol HLVd 1P in 1M začetnega oligonukleotida (HLVd 1P: 5'-GGATACAACCTTTGAGCGCC-3', HLVd 1M: 5'-TAGTTTCCAACCTCCGGCTGG-3') [6] (sl. 1).

Mešanico smo denaturirali 5 min pri 94 °C, jo nato takoj ohladili na ledu in dodali komponente RT-PCR kompleta. Reakcijo smo inkubirali v cikličnem termostatu z naslednjim temperaturnim profilom: 48 °C 45 min, sledila je 2 min denaturacija pri 94 °C in nato 33 ciklov pomnoževanja: 94 °C 30 sec, 57 °C 1 min in 68 °C 2 min, ki se je zaključilo s 7 min inkubacijo pri 68 °C in hlajenjem vzorca pri 12 °C. Pomnožene vzorce smo analizirali na 1,5-odstotnem agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom v koncentraciji 0,5 µg/ml gela.

2.4 Izdelava sonde HLVD

Za izdelavo sonde smo uporabili plazmid pHLP121 [11,12], ki vsebuje dve kopiji (dimer, 2x256 bp) cDNA HLVD, vstavljeni v plazmid Bluescribe M13+ (Stratagene) v restriksijsko mesto *Sma*I. 20 µg plazmidne DNA smo linearizirali 16 ur pri 37°C s 60 U encima *Hind*III (Sigma) v volumnu 50 µl. Razrezan plazmid smo izolirali iz 0,8% agaroznega gela po postopku Boylea in Lewa [4] in mu spektrofotometrično določili koncentracijo.

Sondo (1 µg lineariziranega plazmida) smo označili z digoksigeninom z uporabo DIG Northern Strater Kit kompleta (Roche) po priporočilih proizvajalca kompleta. Koncentracijo sonde smo določili s primerjavo standarda po priporočilih proizvajalca kompleta.

2.5 Priprava membrane in hibridizacija točkovnega odtisa

Priprava membran. Vzorce TNA smo pripravili v volumnu 100 µl z redčenjem v 4 × SSC [iz 20x koncentrirane raztopine: 3M NaCl, 0,2M NaH₂PO₄]. Za vsak vzorec smo pripravili 3 redčitve: 0,1, 1 in 5 µl vzorca TNA, ki smo ga zmešali v 4 × SSC. V primeru SAP vzorcev smo pripravili 3 redčitve v 4 × SSC: 1, 10 in 100 µl (neredčeno) vzorca. Preverili smo nivo detekcije pri denaturiranih (5 min 95 °C) in nedenaturiranih TNA vzorcih. Za nanos vzorcev smo uporabili dot-blot vakuumsko napravo (Biometra- Whatman), ki omogoča nanos 96-ih vzorcev na membrano mikrotiterskega formata (8 × 12 cm). Po nanosu vzorcev na membrano smo napravo vakuumirali 5 min in membrane sparli z 200 µl 4 × SSC pufra. Membrane smo zračno posušili in fiksirali nukleinske kisline na UV transiluminatorju (312 nm) do 5 min. Membrane smo nato uporabili v postopku hibridizacije ali shranili pri -20 °C.

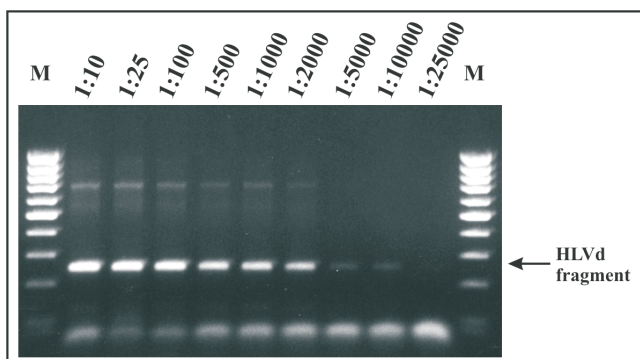
Hibridizacija in detekcija. Membrane smo predhibridizirali do dve uri pri 68 °C v 8 ml DIG Easy Hyb raztopine (komponenta kompleta, Roche), ki smo ga predhodno segreti na 68 °C. 450 ng sonde smo denaturirali 4 min pri 95 °C in zmešali s svežo hibridizacijsko raztopino (4 ml, DIG Easy Hyb) in hibridizirali preko noči pri 68 °C. Po hibridizaciji smo membrane spirali 20 min pri sobni temperaturi v 25 ml 2 × SSC in 0,01-odstoten SDS, 20 min pri 55 °C v 25 ml 2 × SSC in 0,01-odstoten SDS in dvakrat po 20 min pri 55 °C v 25 ml 0,5 × SSC in 0,01-odstoten SDS. Takoj smo nadaljevali s postopkom detekcije po priporočilih proizvajalca kompleta. Po končani detekciji smo rentgenski film izpostavili membrani za 10 min in ga razvili v GBX razvijalcu, spirali v vodi in fiksirali v GBX fiksirju (Kodak).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Zaradi vsesplošne razširjenosti HLVD pri gojenem hmelju smo predpostavljali okuženost vseh analiziranih vzorcev.

3.1 RT-PCR

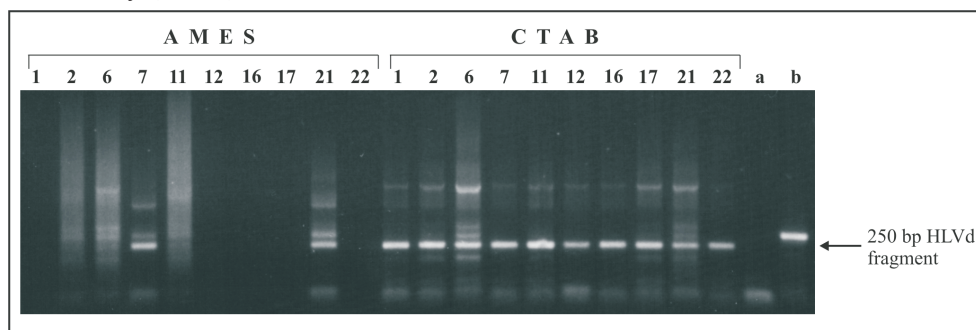
Pri občutljivosti RT-PCR reakcije smo ugotovili, da še vedno z gotovostjo detektiramo viroidno RNA v vzorcu, ki smo ga redčili 1:2000 (1 μ l TNA vzorca v 2 ml vode) (slika 2). Slabotno pomnožen fragment pričakovane dolžine 250 bp pa je bil delno opazen še v vzorcih redčenih 1:5000 in 1:10000. Glede na rezultate priporočamo pripravo RT-PCR reakcije v redčitvenem območju od 1:100 do 1:1000. V nekaterih primerih smo pri manj redčenih vzorcih opazili tudi 500 in 750 bp dolge fragmente, ki so bili posledica večkratne krožnega prepisa RNA molekule zaradi prevelike koncentracije matrične RNA.



Slika 2: Občutljivost RT-PCR reakcije pri različnih redčenjih vzorca, M dolžinski marker 100 bp lestvica (Fermentas)

Figure 2: Sensitivity of RT-PCR reaction at different dilution levels, M molecular weight marker 100 bp ladder (Fermentas)

Pri primerjavi različnih izolacijskih raztopin za TNA, se je CTAB raztopina izkazala za boljše izbiro kot AMES raztopina. V vseh primerih smo pri vzorcih izoliranih s CTAB raztopino brez težav pomnožili viroidno RNA, medtem ko smo pri AMES vzorcih detektirali do 70 % izpad RT-PCR reakcije (slika 3).



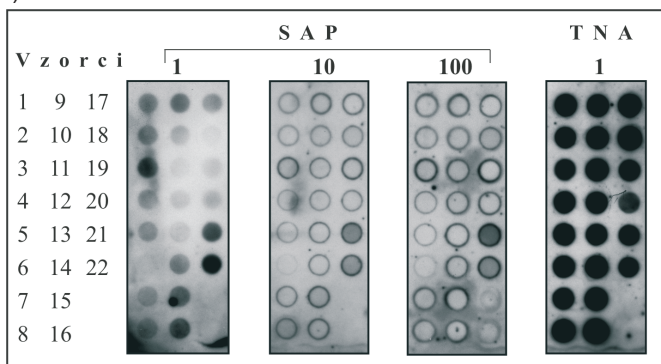
Slika 3: RT-PCR rezultati 10-ih vzorcev hmelja izoliranih z AMES in CTAB ekstrakcijsko raztopino. Predviden HLVd fragment dolžine 250 bp smo pomnožili pri vseh 10-ih CTAB vzorcih. Pri AMES ekstrakcijski raztopini smo zasledili močno inhibicijo, saj smo le v dveh vzorcih (7 in 21) pomnožili HLVd fragment; a vzorec brez TNA (slepi vzorec), b kontrolna RNA pomnožitev (323 bp, kontrola RT-PCR kompleta).

Figure 3: RT-PCR results of 10 hop samples extracted with AMES and CTAB buffer. Predicted 250 bp HLVd fragment is amplified in all ten CTAB samples. Strong inhibition of reaction in AMES samples is detected, since the HLVd band was amplified in only two samples (7 and 21); a - blank sample (no nucleic acids added), b - control RNA amplification (323 bp, control from RT-PCR kit).

Pri RT-PCR analizi s CTAB ekstrakcijsko raztopino smo dokazali predpostavljeno domnevo, da so vsi analizirani vzorci hmelja okuženi s HLVD (rezultati niso prikazani). CTAB ekstrakcijska raztopina se je izkazala za boljše pri RT-PCR analizi v primerjavi z AMES raztopino, zato za nadaljnje delo priporočamo njeno uporabo pri izolaciji TNA. Nivo detekcije RT-PCR reakcije se kljub zmanjšanemu volumnu za 70% od priporočenega ni spremenil, smo pa s tem občutno zmanjšali stroške analize.

3.2 Hibridizacija

Pri hibridizaciji točkovnega odtisa smo primerjali rezultate dobljene pri uporabi SAP ali TNA vzorcev in različne redčitve teh vzorcev. Izolacija SAP vzorcev je hitrejša (15 min) v primerjavi z izolacijo TNA (3 ure). Iz dobljenih rezultatov lahko potrdimo neuporabnost vzorcev soka (SAP), saj je bil signal hibridizacije neizrazit in je bilo težko določiti ali je vzorec pozitiven ali negativen (slika 4). Pri 1 μ l vzorcih soka smo dobili hibridizacijske signale šibke intenzitete, pri večjih volumnih (10 in 100 μ l) pa so bili signali izredno neizraziti. Le pri vzorcih hmeljnih storžkov (vzorca 21 in 22) so bili signali močnejši, kar potrjuje večjo koncentracijo viroida v storžkih. Zmanjšano intenziteto signalov nekateri avtorji razlagajo z aktivnimi RNazami v rastlinskem soku [3]. Pri uporabi TNA vzorcev smo dobili signale močne intenzitete pri 1 μ l vzorcu. Čeprav je postopek izolacije TNA v primerjavi z izolacijo rastlinskega soka daljši, pa priporočamo prav uporabo teh vzorcev, saj dobimo zanesljive hibridizacijske signale. CTAB in AMES vzorci so pri hibridizaciji dali identične rezultate (rezultati niso prikazani).

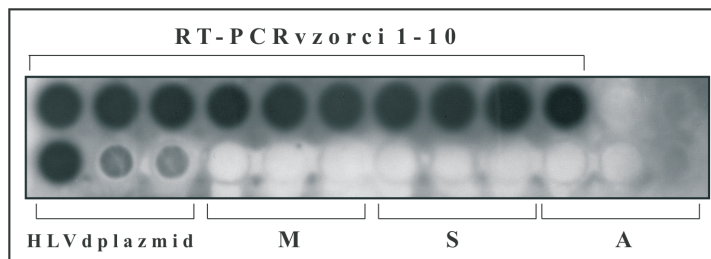


Slika 4: Rezultati hibridizacije 22-ih vzorcev soka (SAP) in celokupnih nukleinskih kislin (TNA) (izoliranih s CTAB ekstrakcijsko raztopino)

Figure 4: Hybridization results of 22 sap (SAP) and total nucleic acids (TNA) samples (CTAB isolation)

V našem primeru smo za določitev signala ozadja uporabljali TNA ostalih kmetijskih rastlin (koruza, sončnica, lucerna), kjer nismo zasledili hibridizacijskega signala. Kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili pozitivno RT-PCR reakcija (0,5 μ l), ki smo jo predhodno denaturirali. S tem smo potrdili tudi identičnost RT-PCR vzorcev in naše sonde. Za kontrolo pa odsvetujemo uporabo plazmida, ker smo opazili slabe in neponovljive hibridizacijske signale pri uporabi različnih, relativno visokih

koncentracij plazmida (10 ng in navzdol) (slika 5). Identičnost HLVD RT-PCR produktov smo potrdili tudi s sekvenčno analizo in s primerjavo z objavljenim GenBank zaporedjem (rezultati niso prikazani). TNA vzorcev ni potrebno denaturirati, ker nismo opazili razlik med jakostjo hibridizacijskih signalov denaturiranih in nendenaturiranih TNA vzorcev (rezultati niso prikazani).



Slika 5: Pri desetih hmeljnih vzorcih smo napravili dot-blot detekcijo RT-PCR vzorcev pri zaostrenih pogojih in pri vseh dobili jasne hibridizacijske signale. Pri hibridizaciji na nekatere rastlinske TNA vzorce (M – koruza, S – sončnica, A – lucerna) nismo zasledili hibridizacijskih signalov. Pri hibridizaciji na plazmidno pHLP121 DNA smo zasledili jasen hibridizacijski signal le pri 10 ng DNA (HLVD: 10, 1 in 0,1 ng).

Figure 5: Identity of 10 amplified RT-PCR products was confirmed by stringent DOT-BLOT hybridization, in which strong hybridisation signals were observed. Hybridisation to other plant TNA samples (maize - M, sunflower - S and alfalfa - A) revealed no sequence homology to the HLVD probe used. Plasmid DNA pHLP121 revealed a strong hybridization signal only at 10 ng DNA (HLVD: 10, 1 and 0.1 ng).

S pomočjo RT-PCR produkta smo določili tudi domnevni nivo detekcije hibridizacije. Iz gela smo izolirali RT-PCR produkt, mu določili koncentracijo spektrofotometrično in pripravili njegove redčitve z znanim številom molekul RT-PCR produkta. Določili smo, da je spodnji nivo detekcije metode okrog 108 molekul RT-PCR produkta, kar odgovarja približno 28 pg RT-PCR produkta oz. molekul HLVD.

4 ZAKLJUČEK

Kombinacija hibridizacije in RT-PCR reakcije se je pokazala za optimalno izbiro tehnik za določanje hmeljnega latentnega viroida. Metodološko se tehniki razlikujeta, saj prva temelji na hibridizaciji in druga na in vitro pomnoževanju DNA. S tem smo še dodatno izboljšali zanesljivost testiranja.

Glede na dobljene rezultate priporočamo uporabo ekstrakcijske raztopine CTAB za izolacijo celokupnih nukleinskih kislin, ker smo dobili najboljše rezultate tako pri hibridizaciji kot pri RT-PCR določanju viroida. Ekstrakcijska raztopina AMES je dala pri hibridizaciji enake rezultate kot CTAB, medtem ko smo zasledili velik izpad pomnoževanja vzorcev pri RT-PCR določanju. Uporabo hmeljnega rastlinskega soka odsvetujemo, ker v našem primeru vzorci niso dali jasnih hibridizacijskih signalov in so tudi neprimerni za RT-PCR reakcijo.

Obe tehniki smo uspešno vpeljali za rutinsko testiranje matičnih rastlin in rastlin, ki so v procesu eliminacije hmeljevega latentnega viroida. Pri tem v sistemu testiranja najprej uporabimo tehniko hibridizacije, ki omogoča hkratno testiranje velikega števila vzorcev. V primeru odsotnosti hibridizacijskih signalov oz. negativnih vzorcev analizo nadaljujemo z občutljivejšo RT-PCR analizo, ki dokončno ovrže ali potrdi prisotnost HLVd.

5 VIRI

1. Adams, A.N., Morton, A., Barbara, D.J., Ridout, M.S., The distribution and spread of hop latent viroid within two commercial plantings of hop (*Humulus lupulus*).- *Annals of Applied Biology*, 121(1992)3, s. 585-592.
2. Adams, A.N., Barbara, D.J., Morton, A., Effects of hop latent viroid on weight and quality of the cones of the hop cultivar Wye Challenger.- *Annals of Applied Biology*, 118(1991)(Suppl.), s. 126-127.
3. Barbara, D.J., Morton, A., Adams, A.N., Green, C.P., Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK.- *Annals of Applied Biology*, 117(1990)2, s. 359-366.
4. Boyle J.S., Lew A.M., An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification.- *Trends in Genetics*, 11(1995)1, s. 8.
5. EPPO. Diagnostic protocols for regulated pests: Chrysanthemum stunt viroid.- *PM*, 7/6(2001)1.
6. Hataya, T., Hikage, K., Suda, N., Nagata, T., Li, S., Itoga, Y., Tanikoshi, T., Shikata E., Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR).- *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 58(1992)5, s. 677-684.
7. Knapič, V., Vpliv okužbe z viroidno latentno boleznijo in stresnih vremenskih razmer na hmelj.- *Hmeljarski bilten*, 10(2003), s. 39-53.
8. Knapič, V., Javornik, B., *Viroidi v slovenskih kultivarjih hmelja (Humulus lupulus L.)*.- V: Maček, Jože (ur.). *Zbornik predavanj in referatov 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Portorožu od 3. do 4. marca 1999*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, (1999), s. 311-318.
9. Kump, B., Javornik, B., Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers.- *Plant Science*, 114(1996)2, s. 149-159.
10. Matoušek, J., Patzak, J., Orctová, L., Schubert, J., Vrba, L., Steger, G., Riesner, D., The variability of hop latent viroid as induced upon heat treatment.- *Virology*, 287(2001)2, s. 349-58.
11. Puchta, H., Ramm, K., Saenger, H.L., The molecular structure of hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops.- *Nucleic Acids Research*, 16(1988)10, s. 149-158.
12. Puchta, H., Sanger, H.L., An improved procedure for the rapid one-step-cloning of full-length viroid cDNA.- *Archives of Virology*, 101(1988)1-2, s. 137-140.

13. Sano, T., Shikata, E., Hop stunt viroid disease.- Proceedings Int. Workshop on Hop Virus Diseases Rauschholzhausen 1988, A. Eppler Edt., Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, (1989), s. 159-164.
14. Wang, M.B, Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M., On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites.- Proceedings of the National Acadademy of Sciences USA, 101(2004)9, s. 3275-3280.

REGENERACIJA IZ RAZLIČNIH IZSEČKOV PRI SORTI HMELJA AURORA

Suzana ŠKOF¹, Zlata LUTHAR²

UDK/UDC 633.791:57.084/.085 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 17. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Proučevali smo odzivnost treh vrst izsečkov: internodijev, listnih pecljev (petiol) in listnih diskov ter odstotek regeneracije pri sorti hmelja Aurora na treh gojiščih z različno vsebnostjo citokininov. Uspelo nam je dvigniti uspešnost regeneracije na gojišču z visoko vsebnostjo citokina in s selekcijo odzivnejšega genotipa. Najvišji odstotek regeneracije (17,7 %) smo dosegli z odzivnejšim genotipom Aurore na internodijih na gojišču z 2iP (N⁶-(2-izopentenil) adenin) 6 mg/l. Listni peclji so imeli najboljšo regeneracijo na istem gojišču (8,6 %), vendar so bili manj regenerativni kot internodiji. Listni diski so imeli najnižji odstotek regeneracije, vendar je bila regeneracija najbolj učinkovita na gojiščih z zeatin ribozidom 2 in 3 mg/l (4,2%).

Ključne besede: hmelj, regeneracija, tkivna kultura, citokinin

REGENERATION EFFICIENCY OF DIFFERENT EXPLANT TYPES OF HOP CV. AURORA

ABSTRACT

The regeneration capacity of different types of hop cv. Aurora explants (internodes, petioles and leaf disks) on three media with different cytokinines contents was tested. We managed to increase the regeneration efficiency on medium with a high cytokinin content and by the selection of a more responsive genotype. The highest rate of regeneration of internodal explants (17.7 %) was achieved with a more responsive genotype of cv. Aurora on medium supplemented with 2iP (N⁶-(2-isopentenyl) adenine) 6 mg/l. A lower efficiency of regeneration was observed with petioles as explants, with the best regeneration rate on the same medium (8.6 %). Leaf disks were the least responsive, with the highest rate of explants with shoots on medium with zeatin riboside 2 and 3 mg/l (4.2 %).

Key words: hop, regeneration, tissue culture, cytokinin

¹ asist., univ. dipl. ing. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

² izr. prof., dr., ibid

1 UVOD

Učinkovita *in vitro* regeneracija je osnovni predpogoj za genske transformacije. Hmelj je za regeneracijo v tkivni kulturi težavna rastlina in le omejeno število avtorjev poroča o učinkoviti regeneraciji hmelja, največkrat preko oblikovanja kalusa na izsečkih. Objavljeni so postopki regeneracije bodisi pri divjih varietetah [1, 2], bodisi pri nekaj komercialnih sortah hmelja [9, 3, 7, 6, 12, 8]. Direktno regeneracijo dveh čeških kultivarjev hmelja sta dosegla Rakouský in Matoušek [11]. O izboljšanju regeneracije slovenskega kultivarja Aurora poročajo tudi Ferant in sod. [5]. Različni izsečki (internodiji, listni peclji in listni diski) so bili različno odzivni, največjo sposobnost regeneracije so imeli večinoma internodiji in samo v enem primeru listni peclji [2]. Najpogosteje proučevani rastni hormoni za indukcijo regeneracije so bili indol-3-acetna kislina (IAA), indole-3-maslena kislina (IBA), kinetin, 6-benzilaminopurin (BAP), zeatin ter tidiazuron (TDZ). Citokinini so najbolj vplivali na sposobnost regeneracije [12]. Vrsta in koncentracija uporabljenega citokinina je bila bistvena za organogeno sposobnost *in vitro* gojenih tkiv tudi pri drugih rastlinskih vrstah [4]. Uspešnost regeneracije pri hmelju je močno odvisna od genotipa [6], zato je potrebno prilagoditi protokol regeneracije za vsako sorto/kultivar posebej.

Z visoko koncentracijo citokinina v regeneracijskem gojišču in selekcijo odzivnega genotipa smo poskušali zvišati odstotek regeneracije pri najbolj razširjeni slovenski sorti hmelja Aurora, ki se je že v prejšnjih raziskavah izkazala za slabo regenerativno sorto z zelo nihajočim odstotkom regeneracije [12, 5].

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Uporabili smo rastline slovenske sorte hmelja Aurora iz kolekcije Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Poganjke hmelja smo gojili *in vitro* na mikropropagacijskem gojišču v steklenih kozarčkih [5]. Vsake 6–8 tednov smo narezali hmelj na izsečke z nodiji in jih subkultivirali na sveže mikropropagacijsko gojišče in jih tako razmnožili. Rastline smo gojili v rastni komori pri 16/8 h (svetloba/tema) fotoperiodi in temperaturi 24 ± 1 °C ter osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Regeneracija

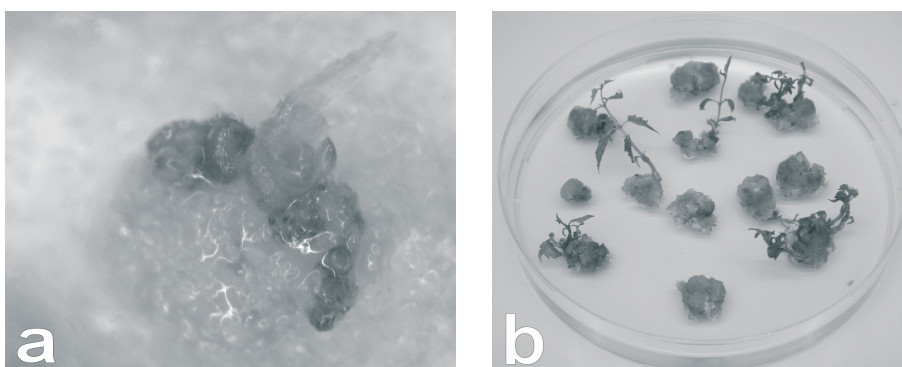
Za učinkovitost regeneracije smo uporabili tri tipe izsečkov: internodije, listne peclje in listne diske sorte hmelja Aurora. Izsečke smo gojili v petrijevkah na treh različnih gojiščih pod istimi pogoji kot pri mikropropagaciji hmelja. Gojišča za regeneracijo so bila sestavljena kot je opisano v Okada in sod. [10] z izjemo vsebnosti citokinina, ki je bil pri gojišču A 2iP (N^6 -(2-izopentenil) adenin) v koncentraciji 6 mg/l, pri gojiščih B in C pa zeatin ribozid v koncentracijah 2 oz. 3 mg/l. Frekvenco regeneracije smo ocenjevali v dvo tedenskih intervalih do treh mesecev po inokulaciji izsečkov. Na vsako gojišče smo inokulirali vsaj 100 izsečkov vsakega tipa in poskus vsaj dvakrat ponovili in izračunali skupni odstotek regeneracije. Kot regenerativni izseček smo upoštevali tistega, ki je imel vsaj 1 cm velik regenerant oz. regenerante.

Regenerante smo nato prestavili na gojišče za izdolževanje in koreninjenje poganjkov, enake sestave kot gojišče za mikropropagacijo, le namesto citokinina BAP smo dodali avksin IBA 0,1 mg/l.

3 REZULTATI

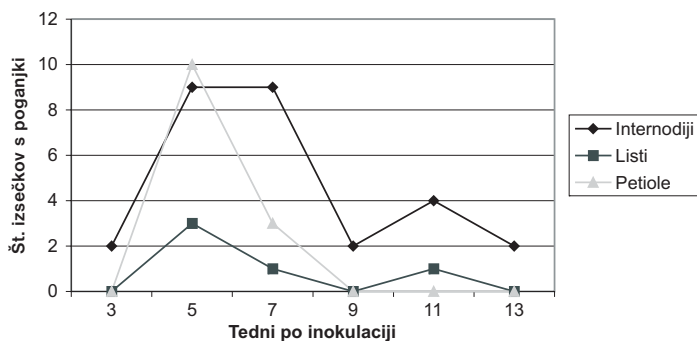
Kalusno tkivo se je začelo formirati na koncih oz. reznih ploskvah internodijev v 8-10 dneh po inokulaciji. Na listnih pecljih se je formiralo zelo veliko kalusnega tkiva, več kot na internodijih, medtem ko je na listnih diskih nastalo le malo kalusa ob robovih listne oz. rezne ploskve.

Prve organogene strukture - globule (slika 1a) so se začele pojavljati na kalusu že po 10-14 dneh po inokulaciji in prvi regeneranti (slika 1b) že po 8 dneh po inokulaciji na gojišču B in C ter po 20 dneh na gojišču A. Večina regenerantov je nastala v enem do dveh mesecih, največ v petem tednu po inokulaciji (slika 2 in 3).



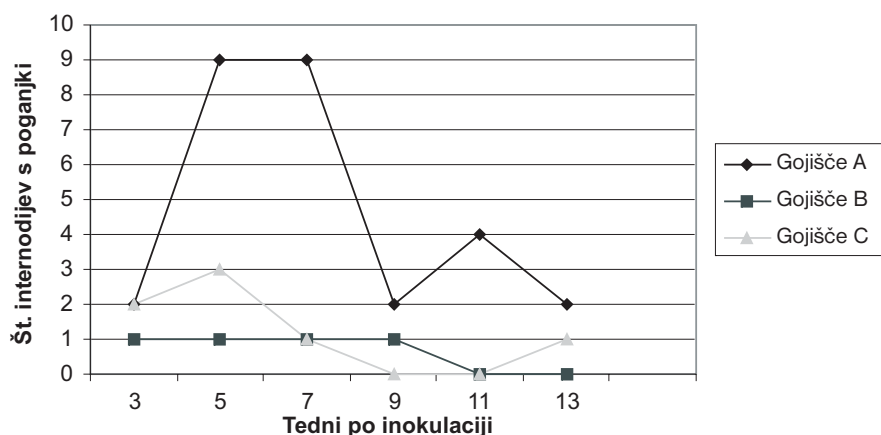
Slika 1: Regeneracija sorte hmelja Aurora na internodijih na gojišču A: a - organogene strukture na kalusu; b - regeneranti na kalusu

Figure 1: Shoots of hop cv. Aurora emerging on internodal explants on medium A: a - organogenic structures on callus; b - shoots on callus



Slika 2: Regeneracija sorte hmelja Aurora na internodijih, listnih pecljih in listnih diskih na gojišču A v dvotedenskih intervalih

Figure 2: Regeneration of hop cv. Aurora from internodes, petioles and leaf disks explants on medium A in two weeks intervals



Slika 3: Regeneracija hmelja cv. Aurora na internodijih na gojiščih A, B in C v dvotedenskih intervalih
Figure 3: Regeneration of hop cv. Aurora from internodes on media A, B in C in two weeks intervals

Tri mesece po inokulaciji izsečkov na gojiščih za regeneracijo smo prešteli samo tiste izsečke, na katerih so nastali vsaj 1 cm dolgi poganjki (preglednica 1).

Preglednica 1: Učinkovitost regeneracije iz internodijev, listnih pecljev in listnih diskov sorte hmelja Aurora na različnih gojiščih

Table 1: Regeneration efficiency from internodes, petioles and leaf disks of hop cv. Aurora on different culture media

Gojišče	Internodiji s poganjki* (%)		Petiole s poganjki* (%) genotip RN/330	Listni diski s poganjki* (%) genotip RN/330
	Genotip RN/330	Ostali genotipi		
A	17,7	11,1	8,6	3,7
B	5,8	2,9	0	4,2
C	7,2	4,2	7,3	4,2

* Upoštevali smo samo izsečke z vsaj 1 cm velikimi poganjki

Ugotovili smo, da je specifičen genotip Aurore, ki smo ga poimenovali RN/330, bolj odziven kot preostali genotipi, saj smo dobili višje odstotke internodijev s poganjki na vseh gojiščih in sicer 17,7 % na gojišču A, 5,8 % na gojišču B in 7,2 % na gojišču C (preglednica 1) v primerjavi s preostalimi genotipi, ki so imeli 11,1 %, 2,9 % oz. 4,2 % regenerativnih internodijev na gojiščih A, B oz. C.

Odstotek regeneracije pri listnih pecljih je bil najvišji 8,6 % na gojišču A, 7,3 % na gojišču C, na gojišču B pa regenerantov ni bilo (preglednica 1). Regeneracija poganjkov na listnih diskih je bila najboljša 4,2 % na gojiščih B in C, nekoliko nižja 3,7 % pa na gojišču A.

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

Proučevali smo uspešnost regeneracije v tkivni kulturi sorte hmelja Aurora. Preizkusili smo odzivnost treh vrst izsečkov: internodijev, listnih pecljev in listnih diskov na treh gojiščih z različno vsebnostjo citokininov (2iP 6 mg/l; zeatin ribozid 2 in 3 mg/l).

Regeneracija pri hmelju je močno odvisna od genotipa [6], zato smo poskušali dvigniti odstotek regeneracije s selekcijo odzivnejšega genotipa. Tudi drugi avtorji [1, 5] poročajo o razlikah v regeneracijski sposobnosti med različnimi genotipi in o problemih stabilne regeneracije. Sorta Aurora se je že v prejšnjih raziskavah izkazala za slabo odzivno sorto [12] z nizko regenerativno sposobnostjo. S predhodno regeneracijo *in vitro* iz internodijev (podatki niso prikazani) nam je uspelo pridobiti odzivnejši genotip (RN/330) Aurore, ki je pokazal na vseh preizkušanih gojiščih višji odstotek regeneracije kot preostali genotipi Aurore. Pri odzivnejšem genotipu RN/330 je bila dosežena stabilna regeneracija, ki je zelo malo variirala med ponovitvami, medtem ko je pri ostalih genotipih znotraj sorte Aurora odstotek regeneracije zelo nihal. Najvišji odstotek regeneracije (17,7 % internodijev s poganjki) smo dosegli na internodijih odzivnejšega genotipa na gojišču A z 2iP 6 mg/l v primerjavi s preostalimi genotipi, ki so na istem gojišču imeli le 11,1 % regeneracijo. Naš najvišji odstotek regeneracije je višji od doslej objavljenih rezultatov pri sorti Aurora. Ferant in sod. [5] poročajo o najboljši regeneraciji (12,5 %) pri Aurori na gojišču z dodatkom 3,5 mg/l citokinina BAP. Šuštar-Vozlič in sod. [12] so dosegli enak najvišji odstotek regeneriranih izsečkov (12,5 %) na gojišču z dodatkom 5 mg/l kinetina. Oboji poročajo, da so najbolj odzivni tip izsečkov internodiji, medtem ko so bili listni peclji manj odzivni, listi pa sploh ne. Tudi večina drugih avtorjev poroča o internodijih kot najprimernejših izsečkih za regeneracijo [11, 1, 6, 12, 8]. V našem primeru so imeli listni peclji najboljšo regeneracijo (8,6 %) na istem gojišču kot internodiji (gojišče A z 2iP 6 mg/l), vendar so bili manj regenerativni kot internodiji (17,7 %). Listni diski so imeli najnižji odstotek regeneracije, vendar je bila regeneracija najbolj učinkovita na gojiščih z zeatin ribozidom 2 in 3 mg/l (4,2 %). Listni peclji so bili najbolj regenerativni pri varieteti hmelja Eroica [2], nihče pa ne poroča o uspešni regeneraciji iz listnih diskov.

Rezultati naše študije nam bodo služili kot osnova za novejšo biotehnološke metode vnosa genov z namenom izboljšati agronomsko pomembne lastnosti (npr. odpornost na bolezni) v najbolj razširjeno slovensko sorto hmelja.

5 LITERATURA

1. Batista, D., Sousa, M.J., Pais, M.S., Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Bragança and var. Brewers's Gold.- In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 32(1996) s. 37-41.
2. Batista, D., Ascensão, L., Sousa, M.J., Pais, M.S., Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures.- Plant Science, 151(2000) s. 47-57.

3. Connell, S.A., Heale, J.B., Development of an *in vitro* selection system for novel sources of resistance to Verticillium wilt in hops.- V: Withers, L., Anderson, P.G. (ur.) Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworth, London, (1986) s. 451-459.
4. D'Onofrio, C., Morini, S., Development of adventitious shoots from in vitro grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration.- *Biologia Plantarum*, 49(2005) s. 17-21.
5. Ferant, N., Javornik, B., Luthar, Z., Regeneracija hmelja (*Humulus lupulus* L.) pri cv. Aurora.- *Hmeljarski bilten*, 8(2001) s. 19-25.
6. Gurriarán, M.J., Revilla, M.A., Tamés, R.S., Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brevers Gold and Nugget.- *Plant Cell Reports*, 18(1999) s. 1007-1011.
7. Heale, J.B., Legg, T., Connell, S., *Humulus lupulus* L. (Hop): *in vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance.- V: Bajaj, Y.P.S. (ur.) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin Heidelberg New York, (1989) s. 264-285.
8. Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M., Weber, G., Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.).- *Plant Cell Reports*, 22(2003) s. 210-217.
9. Motegi, T., Differentiation of shoots from hop stem callus culture.- *Kyoyubo kenkyu Neupo Iwate Ika Daigaku*, 14(1979) s. 15-17.
10. Okada, Y., Saeki, K., Inaba, A., Suda, N., Kaneko, T., Ito, K., Construction of a gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter.- *Journal of Plant Physiology*, 160(2003) s.1101-1108.
11. Rakouský, S., Matoušek, J., Direct organogenesis in hop-a prerequisite for the application of *A. tumefaciens*-mediated transformation.- *Biologia Plantarum*, 36(1994) s. 191-200.
12. Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Bohanec, B., Studies of Somaclonal Variation in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Phyton-Annales Reis Botanica*, 39(1999) s. 283-287.

DOLOČANJE TRANSGENOV V HMELJU PO TRANSFORMACIJI Z *Agrobacterium tumefaciens*

Suzana ŠKOF, Zlata LUTHAR²

UDK/UDC 633.791:579.64:57.084/.085 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 17. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

V nodije hmelja sorte Aurora smo s posredno transformacijo z *Agrobacterium tumefaciens* vnesli testni *gus* (*uidA*) gen in rastlinski selekcijski *nptII* gen. Izražanje testnega *gus* gena smo preverjali z metodo histokemičnega GUS testa aktivnosti β -glukuronidaze v poganjkih nastalih na transformiranih izsečkih. Na podlagi GUS testa je bilo 10,7 % nastalih regenerantov uspešno transformiranih. Z molekulsko analizo modro obarvanih regenerantov (GUS pozitivnih regenerantov) smo s PCR metodo (polimerazno verižno reakcijo) preverili vključenost testnega in selekcijskega gena v rastlinski genom in v večini primerov potrdili vključenost obeh transgenov.

Ključne besede: hmelj, transformacija, *Agrobacterium tumefaciens*, *gus* gen, *nptII* gen

IDENTIFICATION OF TRANSGENES IN HOP AFTER *Agrobacterium*- MEDIATED TRANSFORMATION

ABSTRACT

Agrobacterium-mediated transformation of hop nodal explants was used for the introduction of a *gus* (*uidA*) marker gene and *nptII* plant selection gene into commercial hop cv. Aurora. Expression of the *gus* gene was evaluated by histochemical analysis of β -glucuronidase (GUS) activity in shoots that emerged on transformed hop explants. GUS staining revealed a relatively high transformation efficiency (10.7 % of all regenerants). Molecular analysis of blue coloured plants (GUS positive regenerants) by the PCR method (polymerase chain reaction) was used to detect integration of marker and selection genes into the hop genome and in the majority of cases confirmed the integration of both transgenes.

Key words: hop, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *gus* gene, *nptII* gene

¹ asist., univ. dipl. ing. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

² izr. prof., dr., ibid

1 UVOD

Novejše biotehnološke metode genskih transformacij predstavljajo dopolnitev in privlačno alternativo klasičnemu žlahnjenju hmelja, ki je dolgotrajen postopek tudi zaradi specifičnih lastnosti (dvodomna trajnica). Genske transformacije omogočajo relativno hitro vključitev željenih lastnosti v genom že obstoječih sort hmelja ne da bi spremenili njihove kvalitativne agronomsko pomembne lastnosti.

Predpogoj za učinkovit vnos željenih genov je visok odstotek regeneracije *in vitro*. Le nekaj avtorjev poroča o uspešni regeneraciji hmelja, največkrat preko oblikovanja kalusa na izsečkih, bodisi divjih varietet [1, 2] ali komercialnih sort hmelja [3]. O direktni regeneraciji dveh čeških kultivarjev hmelja poročata Rakouský in Matoušek [13]. Le nekaj objav poroča o začetkih transformacij pri hmelju. Dosedaj so dosegli le prehodno izražanje *gus* testnega gena v kalusnem tkivu [12] in stabilno izražanje *gus* testnega gena in to samo pri dveh tesno sorodnih genotipih hmelja Tettnanger in Saaz [5, 11]. Ker je regeneracija pri hmelju močno odvisna od genotipa [3], je potrebno razviti modificiran protokol regeneracije in posledično transformacije za vsako sorto/kultivar posebej. Do sedaj ni poročil o uspešni regeneraciji in transformaciji katerekoli slovenske sorte oz. divje oblike hmelja.

V raziskavi smo poskušali vzpostaviti učinkovit transformacijski sistem s pomočjo posrednega vnosa genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* pri najbolj razširjeni slovenski sorti hmelja Aurora. Izražanje vnešenega testnega *gus* (β -glukuronidaza) gena smo preverili s histokemičnim GUS testom, vključitev testnega in selekcijskega *nptII* (odpornost na antibiotik kanamicin) gena v rastlinski genom s PCR analizo.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material, kokultivacija z *Agrobacterium* in regeneracija transformiranih rastlin

Iz *in vitro* gojenih rastin sorte hmelja Aurora smo narezali nodije in jih gojili tri dni na regeneracijskem gojišču z MS [10] makro in mikroelementi ter vitamini z dodanim inozitolom 100 mg/l, glukozo 20 g/l, TDZ 1 mg/l, IAA 0,025 mg/l, acetosiringonom 100 μ M in agarjem 8 g/l; pH 5,8.

V tekočem YEB gojišču smo gojili do logaritemske faze rasti *Agrobacterium tumefaciens* sev LBA4404 z vnešenim pCAMBIA2201 plazmidom, ki je vključeval testni *gus* gen z intronom in selekcijski *nptII* gen, oba pod kontrolo CaMV 35S promotorja.

Izsečke hmelja - nodije smo potopili v suspenzijo z *Agrobacterium* (10 min), izpostavili ultrazvoku (60 s) in vakuumu (10 min) ter nato še pustili v bakterijski suspenziji (10 min), posušili na sterilnem filterskem papirju in prestavili na regeneracijsko gojišče s 100 μ M acetosiringonom. Po treh dneh kokultivacije smo izsečke sprali z raztopino antibiotika timentin [100:1 tikarcilin : klavulonska kislina] 200 mg/l, osušili na sterilnem filterskem papirju

in prestavili na regeneracijsko gojišče s timentinom 150 mg/l, da bi preprečili rast *Agrobacterium*. Gojili smo jih v rastni komori pri 16/8 h (svetloba/tema) fotoperiodi, temperaturi 24 ± 1 °C in osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Histokemični test aktivnosti *gus* gena

S histokemičnim GUS testom smo testirali aktivnost *gus* gena v listih novo nastalih poganjkov na kalusnem tkivu. Obarvanje z raztopino X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronid) smo izvedli 110 dni po okuževanju izsečkov z *Agrobacterium* [6, 4]. Celice, v katerih se izraža *gus* gen, se obarvajo modro.

2.3 Molekulska analiza rastlinskega materiala s PCR metodo

Celokupno genomsko DNA smo izolirali iz transformiranih poganjkov z izraženim *gus* genom in kontrolnih netransformiranih rastlin po protokolu s CTAB detergentom [7]. Koncentracijo izolirane DNA smo določili z mini DNA fluorometrom (TKO 100) in jo razredčili na 20 ng/ μl .

S PCR analizo smo preverili vključitev testnega in selekcijskega gena. Uporabljeni specifični začetni oligonukleotidi (GUS3for/GUS3rev, NPTIIa/NPTIIb) so bili narejeni za pomnožitev fragmenta 408 bp pri *gus* oz. fragmenta 650 bp pri *nptII* genu. PCR reakcijska mešanica je vsebovala 1 \times PCR pufer, 0,1 mM vsakega deoksinukleotid trifosfata, 0,5 mM ustreznega začetnega oligonukleotida (GUS ali NPT), 1 enoto Taq DNA polimeraze in ustrezen volumen DNA vzorca. Namnoževanje DNA je potekalo v cikličnem termostatu (Thermal Cycler 480) po modificiranem temperaturnem profilu [8]: začetna denaturacija DNA pri 94 °C 5 min, nato 35 ciklov: 1 min pri 94 °C, 1 min pri 58 °C in 1,5 min pri 72 °C ter končno izdolževanje fragmentov 5 min pri 72 °C. Namnožene fragmente smo ločevali na 1,4 % agaroznem gelu in vizualizirali z etidijevim bromidom pod UV svetlobo.

3 REZULTATI

110 dni po okužbi izsečkov z *Agrobacterium tumefaciens* smo z GUS testom preverili izražanje testnega *gus* gena v regeneriranih poganjkih nastalih na kalusnem tkivu. Med 475 testiranimi poganjki jih je imelo 51 vsaj eno modro točko (preglednica 1) in od teh 14 intenzivnejše modro obarvanje.

Preglednica 1: GUS test na listih poganjkov, nastalih na izsečkih sorte hmelja Aurora 110 dni po okužbi z *Agrobacterium*

Table 1: GUS-assay of shoots's leaves formed on explants of hop cv. Aurora performed 110 days after *Agrobacterium*-mediated transformation

Testirani poganjki	GUS pozitivni* poganjki	Odstotek transformacije (%)
475	51	10,7

*Vsaj ena modra točka

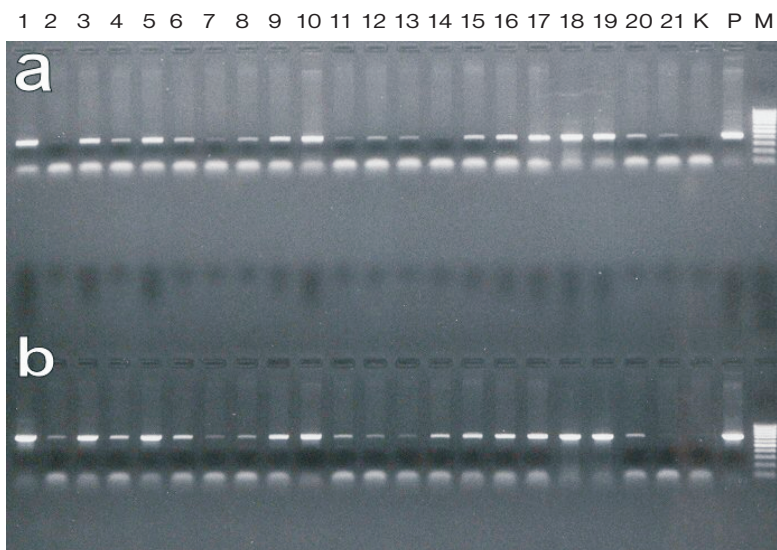
Pri 47 GUS pozitivnih poganjkih jih je bilo 14 intenzivneje modro obarvanih in 33 z vsaj eno modro točko. Pri teh smo preverili vključitev testnega *gus* in selekcijskega *nptII* gena v rastlinski genom s PCR metodo (slika 1). Rezultati so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: PCR analiza 47 z GUS testom pozitivnih regenerantov hmelja

Table 2: PCR analysis of 47 with GUS-assay positive hop regenerants

Štev. regenerantov z vgrajenimi transgeni	Vgrajeni transgeni			
	<i>gus</i> in <i>nptII</i>	samo <i>gus</i>	samo <i>nptII</i>	brez obeh
14 intenzivno modro obarvanih regenerantov	10	1	1	2
33 regenerantov z le nekaj modrimi točkami	22	3	3	5

Od 14 analiziranih poganjkov, ki so bili intenzivneje modro obarvani z GUS testom, jih je imela večina, kar 71,4 % vgrajen tako testni (*gus*) kot selekcijski (*nptII*) gen, 7,1 % samo *gus* ali samo *nptII* gen in 14,3 % nobenega od transgenov. Podobno smo pri 33 poganjkih z le nekaj modrimi točkami zaznali večinoma prisotnost obeh transgenov (66,7 %), 9,1 % jih je vsebovalo le enega od obeh transgenov ter 15,1 % nobenega.



Slika 1: PCR analiza vključitve testnega *gus* (a) in selekcijskega *nptII* (b) gena v genom 21 transformiranih regenerantov hmelja. 1 do 21 - transformirane rastline, K - netransformirana rastlina, P - plazmid pCAMBIA2201, M - marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas)

Figure 1: PCR analysis of marker *gus* (a) and selection *nptII* (b) gene integration into genome of 21 transformant hop regenerants. 1 to 21 - trasformed hops; K - control plant, P - pCAMBIA2201; M - marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas)

Iz slike 1 je razvidno, da se pri transformantih št. 2 in 14 ni namnožil DNA fragment pribl. dolžine 408 bp (*gus* gen) (slika 1a), medtem ko se je namnožil DNA fragment pribl. dolžine 650 bp, ki potrjujejo vključenost *nptII* gena (slika 1b). Pri transformantu št. 21 pa se je ravno obratno namnožil DNA fragment, ki potrjuje vključenost *gus* gena (slika 1a), ni pa fragmenta *nptII* gena (slika 1b).

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

GUS test smo izvedli več kot tri mesece po okužbi izsečkov hmelja z *A. tumefaciens*, zato je modro obarvanje testiranih regeneriranih poganjkov pokazalo ne le prehodno temveč stabilno izražanje testnega *gus* gena. Testirani listi nekaterih transgenih regenerantov so imeli večja intenzivno modra področja, drugi le nekaj modrih točk. Opazili smo tudi modro obarvanje pretežno v žilnem tkivu, kar so opazili tudi pri drugih rastlinskih vrstah [9]. Intenzivnost in vzorec modrega obarvanja sta odvisna od mesta vključitve in števila kopij *gus* gena, ki se naključno vgradi v rastlinski genom in od opremljenosti gena s promotorjem. Na podlagi GUS testa smo dobili relativno visok odstotek uspešnosti transformacije (10,7 % vseh na izsečkih nastalih regenerantov). Horlemann in sod. [5] poročajo o 2,9 % GUS pozitivnih organogenih skupkih.

PCR se lahko uporablja kot rutinsko analitično orodje za hitro analizo prisotnosti transgenov v transformiranih rastlinah. Ker je bil *gus* gen v našem primeru opremljen z intronom, kateri onemogoča izražanje gena v bakteriji, so bili preprečeni PCR lažno pozitivni rezultati zaradi možne kontaminacije rastlinskega materiala z *Agrobacterium*, ki lahko ostane v kulturi. Od testiranih 47 GUS pozitivnih regenerantov jih je imela večina, kar 70 % vgrajena tako testni kot selekcijski gen, manjši del 8 % le enega od obeh in 14 % nobenega od obeh (preglednica 2). Pri transformaciji se vgradi v rastlinski genom celotni genski konstrukt (v našem primeru *gus* in *nptII* gen). V primerih, ko smo detektirali le enega od obeh transgenov, je lahko prišlo do mutacij/delekcij ali modifikacij samo v enem delu genskega konstrukta, še posebej je to verjetneje za *nptII* gen, ker v gojišču za regeneracijo ni bilo selekcijskega antibiotika. Lahko je šlo tudi za himerno tkivo (samo del celic je bil uspešno transformiran) in je sčasoma netransformirano tkivo preraslo transgeno tkivo, kar se je najverjetneje zgodilo tudi v primerih, ko v predhodno GUS pozitivnih regenerantih nismo detektirali nobenega od transgenov. Horlemann in sod. [5] so s PCR preverili vključitev le selekcijskega *nptII* gena in ugotovili, da so imeli vsi GUS pozitivni organogeni skupki, ki so rasli na selekciji tudi vključen selekcijski (*nptII*) gen. V primeru, če se genski konstrukt vgradi na mesto v genom, ki ni kodirajoče se ga lahko dokaže z molekulskimi analizami, vendar se gen ne izraža, ni funkcionalen in ne zasledimo produkt oz. lastnost. Stabilnost transgena je potrebno testirati tako na DNA nivoju, kot njegov produkt oz. produkte tudi na potomcih.

Vzpostavljeni transformacijski protokol je prvi objavljeni pri slovenski sorti hmelja Aurora in nam bo služil kot osnova za vnos agronomsko pomembnih lastnosti (npr. odpornost na bolezni) v najbolj razširjeno slovensko sorto.

5 LITERATURA

1. Batista, D., Sousa, M.J., Pais, M.S., Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Bragança and var. Brewers's Gold.- In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant, 32(1996) s. 37-41.
2. Batista, D., Ascensão, L., Sousa, M.J., Pais, M.S., Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures.- Plant Science, 151(2000) s. 47-57.
3. Gurriarán, M.J., Revilla, M.A., Tamés, R.S., Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brevers Gold and Nugget.- Plant Cell Reports, 18(1999) s. 1007-1011.
4. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA.- The Plant Journal, 6(1994) 2, s. 271-282.
5. Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M., Weber, G., Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.).- Plant Cell Reports, 22(2003) s. 210-217.
6. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bewan, M.W., GUS fusions: â-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.- The EMBO Journal, 6(1987) s. 3901-3907.
7. Kump, B., Svetek, S., Javornik, B., Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv.- Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 59(1992) s. 63-66.
8. Lakshmi, S.G., Sreenivas, G.L., Bhattacharya, A., *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree.- Plant Tissue Culture and Biotechnology, 4(1998) s. 189-195.
9. Mercuri, A., De Benedetti, L., Burchi, G., Schiva, T., *Agrobacterium*-mediated transformation of African violet.- Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60(2000) s. 39-46.
10. Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.- Physiologia Plantarum, 15(1962) s. 473-497.
11. Okada, Y., Saeki, K., Inaba, A., Suda, N., Kaneko, T., Ito, K., Construction of a gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter.- Journal of Plant Physiology, 160(2003) s. 1101-1108.
12. Oriniaková, P., Pavingerova, D., Matoušek, J., Methodical aspects of hop *Humulus lupulus* L.) genetic transformation.- Rostlinna Výroba, 45(1999) s. 219-227.
13. Rakouský, S., Matoušek, J., Direct organogenesis in hop-a prerequisite for the application of *A. tumefaciens*-mediated transformation.- Biologia Plantarum, 36(1994) s.191-200.

MOLEKULARNO GENETSKE RAZISKAVE HME LJJA

Branka JAVORNIK¹

UDC/UDK 633.791 : 631.522/.524 (045)
review article/pregledni znanstveni članek
prispelo/received: 24. 10. 2005
sprejeto/accepted: 15. 11. 2005

IZVLEČEK

V članku so predstavljene molekularno genetske raziskave hmelja, ki so bile opravljene z namenom prispevati k učinkovitejšemu žlahtnjenju novih sort hmelja. Kratko bodo opisane metode molekulskih markerjev, razvite za proučevanje hmelja ter rezultati vrednotenja genske variabilnosti kolekcije hmeljnih genotipov in akcesij v genski banki. Predstavljeni bodo rezultati kartiranja genoma hmelja za natančnejšo opredelitev genskih dejavnikov, ki pogojujejo visoko vsebnost alfa kislin ter odpornost na hmeljevo uvelost.

Ključne besede: hmelj, *Humulus lupulus* L., molekularski markerji, genetska variabilnost, kartiranje genoma

GENETIC RESEARCH ON HOPS

ABSTRACT

Hop growing has a tradition of more than 100 years in Slovenia, and there is significant agricultural production oriented towards export. The Slovenian Institute for Hop Research and Brewing (SIHRB) has released eleven hop varieties, four of which occupy the majority of hop fields in Slovenia. Such a varietal structure emphasizes the importance of "regional" hop breeding and the adaptation of hop varieties to specific growing conditions. Hop genetic studies have been set up in order to assist the hop breeding program at the SIHRB. The main approach of genetic research is rational use of the genetic diversity available from the hop germplasm collection, and gene incorporation or introgression by means of hop genome mapping, marker-assisted selection and/or cloning. Major effort is directed towards improving hop quality (resin content) and resistance to biotic stresses (*Verticillium* wilt and hop Damson aphid). We present a review on our research work on the development of the hop molecular markers, on the assessment of genetic variability and genome mapping and analysis of QTL markers.

Key words: hop, *Humulus lupulus* L., molecular markers, genetic variability, genome mapping

¹Dr. Branka Javornik, redna profesorica za genetiko in biotehnologijo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana.

1 UVOD

Hmelj v Sloveniji pridelujemo že več kot 100 let in je pomemben kmetijski pridelek, ki je večinoma namenjen izvozu. Vse sorte hmelja so bile požlahtnjene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu (IHPS) pod vodstvom žlahtniteljice dr. Dragice Kralj. Danes pridelujejo na 1462 ha hmeljišč (in 416 ha premene) pretežno slovenske sorte. Največ je sorte Aurora na več kot 60% hmeljskih površin, sledijo ji Savinjski golding (15%), Bobek (10%), Celeia (5%) in ostale. Moderna introducirana nemška sorta Magnum se prideluje samo na 5% površin. Ta sortna sestava poudarja pomen regionalnega žlahtnjenja hmelja zaradi prilagoditve kulture na specifične rastne razmere. Zadnje nove sorte hmelja so bile potrjene leta 1990 in v preteklem obdobju se je pokazala potreba po novih kultivarjih, zato je žlahtniteljski program ponovno oživel. Sedanji žlahtniteljski program je usmerjen k razvoju sort hmelja z izboljšano kvaliteto (visoka vsebnost alfa kislin), z odpornostjo na pomembnejše povzročitelje glivičnih bolezni (*Verticillium* spp., *Pseudoperonospora humuli*, *Sphaerotheca humuli*) in škodljivce (*Phorodon humuli*) ter združuje klasično žlahtnjenje z molekulkimi metodami. S pojavom zelo viruletnega patotipa (PG2) glive *V. albo-atrum* v letu 1997, ki povzroča letalno obliko hmeljeve uvelosti in posledično propadanje hmeljišč, ta bolezen predstavlja resno grožnjo vsem hmeljarskim območjem Slovenije. Najuspešnejši način ohranjanja in obnove proizvodnje hmelja na okuženih območjih predstavlja vzgoja odpornih oz. tolerantnih sort, saj za zatiranje hmeljeve uvelosti ni na voljo ustreznih fitofarmaceutskih pripravkov. Ker do nedavnega bolezni ni bila gospodarsko pomembna tudi ni bila vključena v predhodne žlahtniteljske programe, kar je glavni razlog za neodpornost večine slovenskih sort, ki so komercialno zanimive.

Tako sedaj ta bolezen narekuje smeri pri žlahtnjenju novih sort hmelja, saj je potrebno poleg drugih lastnosti (npr. visoka vsebnost alfa kislin) vključiti v sorte tudi dejavnike odpornosti na *Verticillium*.

Težava pri žlahtnjenju hmelja je njegova dolgotrajnost, saj traja vzgoja novih sort najmanj 10 let. Splošni interes panoge je čimhitrejši odziv žlahtnjenja na potrebe pridelovalcev in na zahteve industrije. Pri razširjenih poljščinah in hortikulturnih rastlinah se je izkazalo, da lahko sodobni molekulske genetski pristopi bistveno prispevajo k učinkovitejši vzgoji izboljšanih novih kultivarjev. Zato smo tudi pri hmelju zastavili molekulske genetski program, ki naj bi prispeval k boljšemu poznavanju lastnosti pomembnih za ekonomsko opravičeno pridelovanje hmelja ter za razvoj molekulskih orodij, ki bi lahko neposredno služila v žlahtnjenju hmelja. Program je sestavljen iz posameznih med seboj dopolnjujočih sklopov in sicer:

- Razvoj molekulskih markerjev hmelja.
- Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja.
- Izdelava genskih kart za identifikacijo markerjev vezanih z visoko vsebnostjo alfa kislin, odpornostjo na *Verticillium* in za določevanje kandidatnih genov.
- Uporaba genetskih informacij v žlahtnjenju s pomočjo markerjev ali pri eventualnih genskih transformacijah.

1.1 Razvoj molekulskih markerjev hmelja

Molekulski markerji izpolnjujejo veliko lastnosti, ki so želene pri vrednotenju genetske variabilnosti naravnih ali selekcioniranih populacij, za DNA tipiziranje v identifikacijskih namenih ali za kartiranje genomov. Te lastnosti so predvsem visok polimorfizem, velika pogostnost v genomu, neodvisnost od vplivov okolja, visoka informativnost, relativno preproste tehnike in visoka ponovljivost določevanja, možnost izmenjave podatkov med laboratoriji itd. Karakterizacija genetske variabilnosti ali polimorfizma populacije (kultivar, klon, linija,

akcesija) rastlin je pomembna, ker genetska raznolikost znotraj populacije ali vrste določa nivo prilagajanja na modifikacije in širino odzivnosti za izboljšanje kulturnih rastlin.

S pričetkom raziskovalnega dela pri hmelju smo razpolagali predvsem z metodološko preprostejšimi molekulskimi metodami kot je na primer RAPD metoda (naključno namnožena polimorfna DNA; RAPD markerji). Z RAPD markerji, ki so se izkazali ustrezni pokazatelji polimorfizma, smo vrednotili raznolikosti in sorodstvene odnose tako med domačimi sortami [7] kot tudi med genotipi zbranimi v obsežni kolekciji hmeljnih kultivarjev [25]. Zaradi večje informacijske vrednosti drugih molekulskih markerjev smo pričeli najprej z uporabo mikrosatelitov (SSR markerji), ki so jih razvili za hmelj avstralski raziskovalci [10] in nato z razvojem in karakterizacijo lastnih mikrosatelitskih lokusov pri hmelju [9, 19, 24]. Vpeljan je bil tudi AFLP (polimorfizem dolžine pomnoženih restriksijskih fragmentov) markerski sistem, najprej z barvanjem s srebrom [10] in nato z avtomatsko fluorescenčno detekcijo [23], ki omogoča relativno hitro analizo genoma brez predhodnega poznavanja nukleotidnih zaporedij. Za uporabo AFLP markerjev pri različnih organizmih pa so bile potrebne posamezne optimizacije postopkov [17].

Za izvajanje tovrstnih analiz smo morali v laboratoriju uvesti nove molekulske metode in ustrezno opremiti laboratorij za učinkovito delo. Izolacija in karakterizacija mikrosatelitskih markerjev se je izkazala kot delovno in finančno obsežna naloga, vendar nadaljujemo z izdelavo novih SSR markerjev hmelja, ker so se glede na naše in tuje izkušnje ravno ti markerji izkazali kot nepogrešljivi in visoko informativni predvsem pri kartiranju genoma heterozigotnih rastlin kot je hmelj. Sedaj razpolagamo z okoli 40 uporabnimi SSR markerji hmelja, sekvenciranih pa je že večje število klonov iz obogatenih SSR knjižnic, pripravljenih za optimizacijske postopke genotipizacije hmelja. Zaključimo lahko, da smo v preteklem obdobju naredili dober metodološki napredek ter da razpolagamo z zadovoljivo opremo in znanjem tudi za zahtevnejše molekulske analize rastlin in rastlinskih patogenov. Molekulske metode so bile tudi praktično uporabljane za identifikacijske namene pri določanju pristnosti hmeljnih kultivarjev [3], določevanju spola [1], iskanju markerjev povezanih z odpornostjo na hmeljevo uš [2], pri nejasnostih označb akcesij divjega hmelja v genski banki [8] in pri identifikaciji hmeljnih patotipov glive *V. albo-atrum* [18, 19].

1.2 Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja

Sodobni hmeljni kultivarji so vzgojeni s križanji, ki so omogočila vnos in kombiniranje lastnosti, kot so pridelek, hmeljna grenčica in aroma ter za odpornosti na bolezni in škodljivce. Sedanja žlahniteljska praksa uporablja pri ustvarjanju novih kombinacij različnih lastnosti kot izhodiščni žlahniteljski material hmeljne kultivarje, žlahniteljske linije in divje hmelje, ki izražajo željene lastnosti, običajno ocenjene s fenotipskimi znaki. Današnji osnovni žlahniteljski material se vzdržuje v kolekcijah hmeljne dednine s katerimi razpolagajo največji žlahniteljski centri hmelja med njimi tudi IHPS. V teh kolekcijah je ohranjena biodiverziteteta hmelja, ki se je generirala skozi daljša obdobja načrtna selekcije in žlahtnjenja ter z zbiranjem divjih akcesij hmelja. Za učinkovitejšo uporabo ohranjene biodiverzitete za vzgojo novih sort hmelja pa je potrebno natančno poznavanje obsega in porazdelitve obstoječe genetske variabilnosti ter genetskih odnosov med razpoložljivimi hmeljnimi genotipi.

Za opis kolekcij hmelja in vrednotenje genetske diverzitete hmelja so se največ uporabljali morfološki in kemijski podatki. Posebnega pomena so kemijski parametri, ker so neposredno povezani s kakovostjo hmelja. Te vrste raziskav so nedvoumno opredelile razdelitev hmeljnih akcesij v geografsko ločene skupine [21, 22] ter hmeljne kultivarje v skupine, ki so odražali njihovo geografsko poreklo in njihove kakovostne lastnosti [13, 6]. Te

raziskave so razdelile hmelj na dve osnovni veliki, geografsko ločeni skupini, ameriški grenčični hmelj in evropski aromatični hmelj, ter na skupino sodobnih, hibridnih hmeljnih kultivarjev. Prva vrednotenja genetske diverzitete hmeljnih akcesij z molekulskimi markerji je izvedla naša skupina in pozneje še druge študije [25, 20, 10, 16].

RAPD in AFLP analize so nedvoumno potrdile ločitev hmeljne dednine v dve geografski skupini, evropsko in severno-ameriško, ter znotraj evropske skupine genetsko opredelile grupiranje hmeljnih kultivarjev v podskupine, ki so odražale preteklo žlahniteljsko prakso v posameznih regijah (Anglija, Bavarska, Češka) ali značilnosti žlahniteljskih programov (Slovenija, ZDA, Anglija, Japonska, Nova Zelandija, Avstralija). Molekulsko genetske študije so relativno dobro opredelile raznolikosti in variabilnosti ženskih kultiviranih akcesij v hmeljnih kolekcijah. Manj raziskav pa je bilo opravljenih na divjih hmeljih ter moških akcesijah. Med temi raziskavami je zanimiva molekulska analiza diverzitete geografsko raznolikih divjih hmeljev [15, 16], ki predvideva, da sta se ameriški in evropski hmelj ločila pred 1.05 do 1.27 milijoni let ter, da so zaznavne tudi variabilnost znotraj teh dveh geografskih skupin. Za žlahnitelje pa je lahko zanimiv podatek o stopnji raznolikosti med kultiviranim in divjim hmeljem, kar je analizirala naša skupina [12].

Za evropski hmelj je bilo ugotovljeno, da se divji in kultiviran hmelj sicer signifikantno razlikujeta, vendar se nahaja vsa diverziteteta znotraj obeh skupin, ki izkazuje približno enako stopnjo variabilnosti. Ali povedano drugače, variabilnost med hmeljnimi kultivarji je enako velika kot variabilnost med divjimi akcesijami, vendar se obe dve variabilnosti razlikujeta, s čimer se nakazuje, da divje akcesije vsebujejo še neuporabljen vir genetske variabilnosti. Dosedanja proučevanja genetske raznolikosti hmelja so prinesla znanja in rezultate, ki so potencialno uporabni v žlahnjenju hmelja. Vendar je za učinkovito uporabo diverzitete s pomočjo asocijacijskih študij, posebno za obvladovanje kompleksnih, ekonomsko pomembnih lastnosti, kot je vsebnost alfa kislin, potrebno natančno poznavanje populacijske strukture znotraj kolekcij genskih virov za identifikacijo in pravilno interpretacijo povezav med funkcijsko in molekulsko diverziteteto. To je eden izmed možnih načinov kako genetsko definirati kompleksno lastnost vendar so zato potrebne nadaljnje študije.

1.3 Kartiranje genoma hmelja

Za kartiranje genoma hmelja smo se odločili, ker želimo poiskati markerje vezane za kvantitativne lokuse, ki so povezani z visoko vsebnostjo alfa kislin ter za določitev markerjev vezanih za odpornost na *Verticillium*. Identifikacija obeh vrst markerjev bi služila neposredno v žlahnjenju hmelja in bi lahko bistveno doprinesla k učinkovitosti in krajšemu času vzgoje novih sort hmelja. Poleg tega želimo poiskati gen(e), ki pogojujejo odpornost na *Verticillium* in tako proučiti molekularne mehanizme patogeneze, ker bi le poznavanje in razumevanje teh mehanizmov omogočilo dolgoročneje reševanje hmeljeve uvelosti.

Genske karte, dobljene s primerjavo rekombinacijskih frekvenc med pari markerjev, omogočajo proučevanje dedovanja kromosomskih regij pri kontroliranem križanju. Z razvojem molekularnih tehnik se je število markerjev zelo povečalo, kar je omogočilo izdelavo genskih kart vezanih markerjev pri večini agronomsko pomembnih rastlinah, kot so ječmen, koruza, riž, soja, solata, krompir, paradižnik itd. Saturirane karte so uporabne za kartiranje monogenih lastnosti kot tudi za razčlenitev kvantitativnih lastnosti. Osnovni princip kartiranja za obe vrsti lastnosti je podoben, to je tesna vezanost med markerjem in fenotipom ter skupna segregacija pri kontroliranem križanju. Tako določeni vezani markerji nam nato lahko služijo v žlahnjenju s pomočjo markerjev (MAS, marker assisted selection). Monogene lastnosti z lahko določljivim fenotipom, kot na primer nekatere bolezni, je relativno enostavno vključiti v

gensko karto. Kartiranje kvantitativnih lastnosti (QTL) je bolj kompleksno, ker jih pogojuje več genov, katerih ekspresija je večkrat odvisna od zunanjih dejavnikov. S pomočjo saturiranih genskih kart je možno tudi izolirati gene na osnovi njihove lokacije na kromosomu brez poznavanja njihovega produkta in sicer z metodo pozicijskega kloniranja, kjer z identifikacijo tesno vezanih markerjev na obeh straneh željenega gena določimo segment DNA z genom.

Za kartiranje kvantitativnih lokusov za vsebnost alfa kislin smo uporabili F1 družino potomcev križanja Magnum x 2/1 ter AFLP in SSR markerje. Ta družina je segregirala kvantitativno glede vsebnosti alfa kislin določene v letih 2002, 2003, in 2004. Najprej smo izdelali moško in žensko gensko karto vezanih markerjev, nato pa smo z analizo kvantitativnih lastnosti določili štiri (*alpha1*, *alpha2*, *alpha3* in *alpha4*) kvantitativne markerje kot pokazatelje vsebnosti alfa kislin. Najbolj obetaven za uporabo v žlahtnjenju je marker *alpha2*, ker se nahaja na genski karti skupaj z enim izmed AFLP markerjev [4, 5]. Pri tem kartiranju smo dobili zelo dobre prve rezultate in bomo z delom nadaljevali z nanašanjem večjega števila SSR markerjev na regije kvantitativnih markerjev ter s testiranjem njihove stabilnosti tako da pričakujemo neposredno uporabne rezultate v bližnji prihodnost.

Za kartiranje genov za odpornost na hmeljevo uvelost je bila vzgojena družina križancev iz odporne sorte Wye Target in domačega občutljivega moškega hmelja 2/1. Izdelava genske karte in iskanje vezanih markerjev je relativno zahteven projekt zaradi obsežnosti dela pri multiplikaciji križancev v družini in ocenjevanju bolezenskih znakov. Družina je posajena na poskusnem polju in razmnoženi so bili potaknjenci za testiranje na odpornost na hmeljevo uvelost. Opravljena so bila predhodna testiranja na testnih kultivarjih za ocenjevanje stopnje okuženosti hmelja z letalnim patotipom *Verticillium albo-atrum* v rastnih komorah in pripravljena je shema okuževanja in ocenjevanja bolezenskih znakov za 90 križancev družine. V laboratoriju pa se izvaja genotipizacija 156 križancev z novimi SSR markerji. Opremljivejši rezultati bodo v prihodnjem letu, v prvi fazi pa pričakujemo identifikacijo vezanih markerjev za odpornost na *Verticillium*.

2 ZAKLJUČEK

V prispevku so prikazani rezultati in tekoče delo programa genetskih raziskav hmelja z namenom seznaniti širši krog zainteresiranih za tovrstne raziskave, ki naj bi prispevale k boljšemu poznavanju lastnosti pomembnih za ekonomsko opravičeno pridelovanje hmelja ter za razvoj molekularnih orodij, ki bi lahko neposredno služila v žlahtnjenju hmelja. V prikazu niso zajete raziskave, ki se nanašajo na iskanje analognih sekvenc rezistentnih genov v hmelju ter proteomske raziskave odpornosti hmelja na hmeljevo uvelost. Z dosedanjimi rezultati smo lahko delno zadovoljni predvsem zaradi tega, ker bi želeli povečati obseg in učinkovitost dela. Ta pa žal v veliki meri zavisi od razpoložljivih kadrovskih in finančnih zmožnosti. Vsekakor pa je program genetskih raziskav hmelja primer uspešnega medinstitutskega sodelovanja med Inštitutom za hmeljarsvo in pivovarstvo Slovenije in Biotehniško fakulteto ter dobrega dela mnogih sodelavcev programa.

ZAHVALA

Za navedene rezultate v prispevku so zaslužni dr. Andreja Čerenak, dr. Jernej Jakše, dr. Sebastjan Radišek, Branka Juvančič, dr. Zlatko Šatovič, dr. Jelka Šuštar-Vozlič ter številni drugi sodelavci z IHPS in Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, BF.

3 VIRI

1. Čerenak, A., Jakše, J., Javornik, B., Application of sex-linked marker in hop (*Humulus lupulus* L.) breeding.- V: Glavač Damjan (ur.), Ravnik-Glavač (ur.). 2nd Congress of Genetic Society of Slovenia with International Participation, Bled, September 13-17, 2000. Congress proceedings, Ljubljana: Slovensko genetsko društvo, 2000, p. 371-372.
2. Čerenak, A., Javornik, B., Analysis of DNA markers for damson hop aphid resistance in hop.- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 79(2001)2, p. 361-369.
3. Čerenak, A., Jakše, J., Javornik, B. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers.- J. Am. Soc. Brew. Chem., 62(2003)1, p. 1-7.
4. Čerenak, A., Kartiranje genoma hmelja (*Humulus lupulus* L.) z AFLP markerji. Ljubljana, Doktorske disertacije, Biotehniška fakulteta, 2004, pp. 114.
5. Čerenak, A., Šatovič, Z., Javornik, B., Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content.- Genome, 2005, (sprejeto vtisk).
6. Henning, J.A., Steiner, J.J., Hummer, K.E., Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA.- Crop Science, 44(2003)2, p. 411-417.
7. Jakše, J., Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Identification of hop cultivars by RAPD markers.- In: Javornik, B., B. Bohanec, and I. Kreft (Eds.), Proc. of IPBA, 5-7 Dec, 1994, Rogla, Slovenia, p. 147-151.
8. Jakše, J., Čerenak, A., Javornik, B., Molekularni markerji pri proučevanju genskih virov hmelja (*Humulus lupulus* L.).- V: Tajnšek, A., (ur.), Šantavec, I., (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2000: zbornik simpozija : proceedings of symposium, [Moravske Toplice, 14. in 15. december 2000], (Novi izzivi v poljedelstvu). Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2000, p. 144-148.
9. Jakše, J., Javornik, B., High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.).- Plant Mol. Biol. Report, 19(2001), p. 217-226.
10. Jakše, J., Kindlhofer, K., Javornik, B., Assesment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers.- Genome, 44(2001), p. 773-782.
11. Jakše, J., Bandelj-Mavsar, D., Javornik, B., Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.).- Mol. ecol. notes (Print), 2(2002)4, p. 544-546.
12. Jakše, J., Šatovič, Z., Javornik, B., Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulu lupulus* L.).- Genome, 47(2004), p. 889-899.
13. Kralj, D., Zupanec, J., Vasilj, Đ., Kralj, S., Pšeničnik, J., Variability of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.).- J. Inst. Brew. 97(1991), p. 197-206.
14. Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., Molecular evolution of hops, *Humulus lupulus*.- In Proceedings of the Scientific Commission, I.H.G.C., held 24-27 June 2003, Dobrna, Slovenia. Edited by E. Seigner. By Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Hüll, Germany, 2003, p. 92-96.
15. Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L.- Genetic Resources and Crop Evoltion, 2005, (vtisku).

16. Patzak, J., Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.).- Euphytica 121(2001), p. 9-18.
17. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B., Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*).- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 77(2001)2, p. 139-146.
18. Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., Javornik, B., Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis.- Plant Disease, 87(2003)6, p. 633-638.
19. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop.- Plant Disease 88(2004)10, p. 1115-1122.
20. Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., Seigner, E., Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hops, *Humulus lupulus*, as determined by amplification fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data.- Plant Breeding, 119(2001), p. 257-233.
21. Small, E., A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*.- Systematic Botany 3(1978), p. 37-76.
22. Stevens, J.F., Taylor, A.W., Nickerson, G.B., Ivancic, M., Henning, J., Hanunold, A., Deinzer, M.L., Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol.- Phytochemistry, 53(2000), p. 759-775.
23. Štajner, N., Javornik, B., Bandelj-Mavsar, D., Protocol used for AFLP by automatic laser fluorescence analysis.- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 81(2003)1, p. 39-45.
24. Štajner, N., Jakše, J., Kozjak, P., Javornik, B., The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.).- Plant Science, Limerick, 168(2004)1, p. 213-221.
25. Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis.- Plant Breeding, 118(1999), p. 75-181.

TEHNOLOŠKE RAZMERE PRIDELAVE HMELJA V RS PO STRUKTURNIH SPREMEMBAH V LETU 2000

Martin PAVLOVIČ¹, Peter ŠTORMAN²

UDK/UDC 633.791 : 631.55 (497.4) (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 23. 09. 2005
sprejeto/accepted: 24. 10. 2005

IZVLEČEK

V letu 2000 beležimo izrazite spremembe v lastnini in strukturi pridelave hmelja v RS. Za osvetlitev razmer je bila v letu 2003 opravljena anketa o tehnološko-ekonomskih razmerah na hmeljarskih posestvih v Sloveniji. Vzorec je zajel 30 naključno izbranih hmeljarskih posestev z obsegom pridelave nad 5 ha. Povprečna velikost vzorčnih hmeljarskih posestev je bila 29 ha, povprečna površina hmeljišč na posestvo pa 16 ha. 75% hmeljišč vzorca je bilo v najemu. V povprečju so imela posestva po 9 parcel velikosti med 0,8 in 4,9 ha. Povprečna hektarska poraba delovnih ur na anketiranih posestvih je znašala 70 strojnih ur, 65 traktorskih ur in 354 ročnih ur. Anketni podatki so služili tudi za dopolnitev verzije simulacijskega modela SIMAHOP 3.0. Rezultati aplikacij modela potrjujejo njegovo uporabnost za nadaljnje raziskave na podjetniški ravni.

Ključne besede: struktura pridelave hmelja, anketna analiza, območje Savinjske doline

HOP PRODUCTION IN SLOVENIA AFTER STRUCTURAL CHANGES IN 2000

ABSTRACT

In 2000 there were structural changes in a Slovenian hop industry. An opinion poll survey was carried out in 2003 that aimed at analysing a production structure and an economic situation of the Slovenian hop industry, for which 30 hop farmers (15%) with more than 5 ha of hop production were randomly selected. An average size of the farms analysed was 29 ha where their average hop area was 16 ha. 75 % of hop area included was rented. An average plot number of hop fields was 9, where their sizes range between 0,8 and 4,9 ha. A hop production per hectare on a sample farms required 70 machine hours, 65 tractor hours and 354 hand hours. The questionnaire results were used also for an updated version of the SIMAHOP 3.0 simulation model. The results validate the application of the model for further research.

Key words: hop production structure, opinion poll survey, Savinja valley region

¹ doc., dr. agr., IHPS, Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija

² univ. dipl. ing. agr., prav tam

1 UVOD

Pri analizah gospodarske konkurenčnosti izvozno usmerjene hmeljarske pridelave v RS je potrebno dinamično spremljati tehnološke in ekonomske razmere te kmetijske panoge, kamor se v letu 2005 s 3% svetovnih površin uvršča tudi slovenska pridelava [3, 4]. Obseg površin, podjetniška organiziranost pridelave ter optimalna izkoriščenost kapacitet strojev in opreme na posestvih odločilno vpliva v segmentu pridelovalnih stroškov na dosežen finančni rezultat posameznega hmeljarskega posestva.

Zaradi stečaja nekoč največjega pridelovalca hmelja v RS - Hmezad kmetijstvo Žalec, d.d. v letu 1999 z okoli 1000 ha površin hmeljišč se je po letu 2000 velikostna spremenila struktura pridelave na preostalih hmeljarskih posestvih. Priložnost povečanja površin pridelave hmelja je omogočila približno petini pridelovalcev (17%), da so na različne načine postopno investirali v svoje dodatne kapacitete pridelave in predelave hmelja.

Za pridobitev jasnejše slike o tehnološko-ekonomskih razmerah na hmeljarskih posestvih v Sloveniji v prvih 3 letih po strukturi spremembah pa je bila na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v okviru diplomske naloge na Fakulteti za kmetijstvo Maribor opravljena anketna raziskava [5]. V članku je predstavljen del rezultatov omenjene ankete analize iz leta 2003 dopolnjen s podatki o površinah in sortni sestavi pridelave v letu 2005.

2 METODA DELA

V vzorec anketiranih je bilo v letu 2003 vključenih 30 hmeljarskih posestev Spodnje Savinjske doline. Vsa so imela več kot 5 ha hmeljišč in so v letu 2000 povečala svoje obdelovalne površine hmelja. Vzorec je predstavljal 15% vseh posestev v RS. Anketa je bila sestavljena iz štirih sklopov vprašanj (2.1-2.4):

- 2.1** Podatki o posestvu (število družinskih članov, skupno število domačih delavnih ur, velikost kmetijskih površin, zavarovanje pridelkov, obseg rastlinske pridelave, obseg živinorejske proizvodnje, število parcel hmelja, oddaljenost od hmeljišč, trend pridelave hmelja in trend kmetijske proizvodnje).
- 2.2** Podatki o osnovnih sredstvih za hmeljarsko pridelavo (a) hmeljišča z žičnicami - velikost v ha, povprečen pridelek hmelja v kg/ha za leto 2002 in povprečen pridelek hmelja za preteklih 10 let, (b) stroji in oprema - posebna poslopja, oprema, stroji in priključki (tip, lastnosti, letnik, delež uporabe v hmeljarstvu (%) in tržna vrednost).
- 2.3** Podatki o porabi časa po posameznih fazah obdelave hmelja na ha (število domačih oz. najetih traktorskih, strojnih in ročnih ur).
- 2.4** Podatki o porabljenem materialu pri pridelavi hmelja (gnojila, vodila, sredstva za varstvo hmelja).

Pretežni del podatkov anonimne ankete je bil v šifriran. Za obdelavo podatkov je služil tabelarni generator MS Excel.

3 DEL REZULTATOV ANKETE HMELJARSKIH POSESTEV V LETU 2003

3.1 Splošne značilnosti analiziranega vzorca

Razpon števila družinskih članov na analiziranih hmeljarskih posestvih je bil med 2 in največ 10. Povprečje pa je bilo 4,9. 60% je bilo odraslih družinskih članov (od 18 do 65 let), 28% mlajših od 18 let in 12% starejših od 65 let.

V vzorcu ni bilo izključno hmeljarskih posestev. Na vzorčnih posestvih predstavljajo druga kmetijska zemljišča - kmetijska zemljišča brez hmeljišč - 44,5% površin. Ostala kmetijska zemljišča na vzorčnih posestvih predstavljajo njive (61%), travniki (37%) in sadovnjaki in vinogradi (2%).

Ob hmeljarstvu se ukvarjajo pridelovalci predvsem in živinorejo, največ z govedorejo. V povprečju je bilo 24,4 GVŽ goveda na vzorčno posestvo. Povprečno je bilo na vsakem posestvu tudi 7 prašičev - predvsem za lastno rabo.

Največ posestev je imelo v strukturi pridelave 50 do 60% hmeljišč. Brez premene hmeljišč pa je imelo največji - 40% delež posestev med 40 in 50% hmeljišč na posestvo.

Število razpoložljivih domačih delovnih ur na dan je na različno velikih analiziranih posestvih znašalo od najmanj 12 do največ 52 delovnih ur na dan na posestvo. Povprečje razpoložljivih delovnih ur je 26 ur na dan na posestvo.

3.2 Struktura pridelovalnih površin hmeljišč

V vzorcu so bila namenoma zajeta le posestva z več kot 5 ha hmeljišč. Najmanjša površina hmeljišč na vzorčno posestvo je bila 5,3 ha, največja pa 42,0 ha (primer pridelovalne skupnosti 3 hmeljarjev). Povprečna velikost vzorčnih hmeljarskih posestev je bila 28,8, povprečna površina hmeljišč na posestvo pa 16,0 ha. Površine vzorčnih posestev so predstavljale 73% rodnih nasadov, 7% novih nasadov oziroma prvih letnikov in 20% hmeljišč v premeni pretežno karantenskega značaja.

S postopnim prenosom lastništva hmeljišč Hmezada Kmetijstvo d.d. v stečaju na posamezne pridelovalce v letu 2000 so hmeljarji odkupili hmeljske žičnice, zemljišča pa so ostala last Zemljiškega sklada in so jih v letu 2003 imeli hmeljarji v najemu. Zato so ta hmeljišča obravnavana kot zemljišča v najemu. Na vzorčnih posestvih je bilo 75,4% hmeljišč v najemu, ostalih 24,6% hmeljišč je v lasti hmeljarjev.

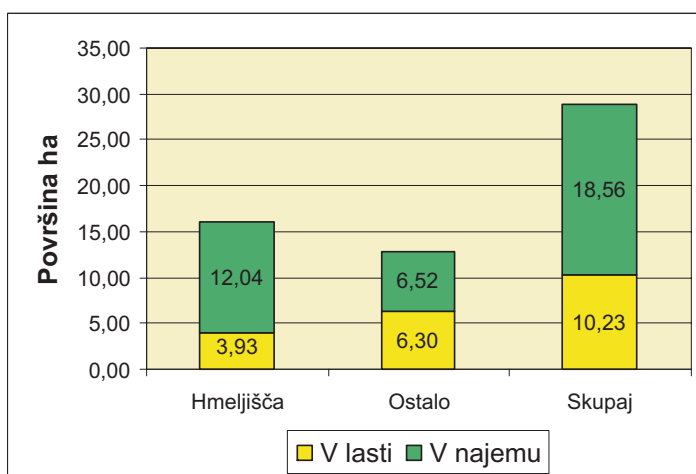
Velikost najmanjših parcel hmelja na posestvih se je gibala od 0,05 ha do 8,56 ha. Velikost največjih parcel hmelja je bila v razponu od 2,06 ha do 10,20 ha. Povprečna velikost najmanjših parcel hmelja na posestvih je bila 0,78 hektarja, povprečna velikost največjih parcel pa 4,95 hektarja.

Rezultati o prostorske razpršenosti pridelave kažejo, da je bilo povprečno 9,1 parcel hmelja na posamezno posestvo. Eno od posestev pa je imelo celotna hmeljišča v enem kompleksu.

Najmanjša oddaljenost od dvorišča posestva do hmeljišč je znašala od 0,01 km do 4,5 km (v povprečju 0,5 km). Največja oddaljenost do hmeljišč pa se je gibala med 0,5 km in 6,0 km (povprečno 2,5 km).

Površine vzorčnih posestev so predstavljale 73% rodnih nasadov, 7% novih nasadov oziroma 1. letnikov in 20% hmeljišč v premeni pretežno karantenskega značaja.

Povprečni hektarski pridelki hmelja na 30 vzorčnih posestvih v letu 2002 so bili 1.582 kg/ha. Povprečni hektarski pridelki za obdobje zadnjih 10 let pa 1.865 kg/ha. Pri vseh anketiranih so se njihovi povprečni pridelki občutno zmanjšali v obdobju, odkar so obdelovali tudi hmeljišča firme Hmezad kmetijstvo, d.d.



Slika 1: Povprečna velikost vzorčnih posestev (ha)

Figure 1: Average area of analysed hop farms (Ha)

3.3 Poraba delovnega časa pri pridelavi hmelja

Rezultati ankete kažejo, da je bilo za pridelavo hmelja v letu 2002 potrebnih 489 delovnih ur, od tega 70 strojnih ur (14%), 65 traktorskih ur (13%) in 354 ročnih delovnih ur (72% vseh delovnih ur).

V delovnih konicah napeljave vodil, čiščenja in navijanja ter obiranja hmelja zahteva pridelava dodatne sezonske delavce. Ti so opravili 78% potrebnega ročnega dela. Po podatkih iz ankete najemajo sezonske delavce na vseh vzorčnih posestvih in sicer v povprečju po 8,5 na posestvo. Posestva v povprečju na en ha hmeljišč najamejo 0,7 delavca pri napeljavi vodil, 0,7 delavca pri čiščenju in navijanju in 0,4 delavca pri obiranju hmelja. Največ najetih delavcev na posameznem posestvu je bilo 30 pri napeljavi vodil, 28 pri čiščenju in navijanju, ter 14 pri obiranju hmelja. Najeti sezonski delavci v letu 2002 so bili predvsem iz Hrvaške, Bosne in Hercegovine, Romunije.

3.4 Pomen podjetniških informacij

V anketi so odgovarjali hmeljarji tudi o pomenu in osebni vrednotenju domačih strokovnih informacij, ki so jim bile na voljo v različnih oblikah. Pisne Hmeljarske informacije IHPS Žalec, kjer so objavljene aktualne informacije o pridelavi hmelja, je uporabljalo 97% anketiranih hmeljarjev. Ostali 3% so za potrebne informacije občasno koristili avtomatski telefonski odzivnik IHPS Žalec. Tega je prav tako uporabljalo 40% tistih hmeljarjev, ki so brali tudi pisne Hmeljarske informacije.

Polovico (50%) anketiranih hmeljarjev je najbolj zanimalo varstvo hmelja pred boleznim in škodljivci. 40% hmeljarjev aktualne teme, oziroma sprotne ukrepi pri pridelavi hmelja, 10% hmeljarjev pa se je najbolj zanimalo za različne novice v zvezi s hmeljarstvom.

Največ, 43% hmeljarjev je pri delu IHPS pogrešalo razvoj novih tržno zanimivih sort hmelja. Četrtnina hmeljarjev je menila, da je potrebno več neposrednega svetovanja na terenu. 10% hmeljarjev je pogrešalo konkreten prenos teorije v prakso, manjši del, 7% hmeljarjev pa je bilo mnenja, da bi morala biti strokovna publikacija IHPS Hmeljarske informacije še bolj obširna in ažurna.

Hmeljarje zelo zanima tudi pridelava hmelja v drugih deželah, saj je kar 97% anketiranih hmeljarjev že obiskalo hmeljišča v tujini. Večina hmeljarjev se zanima za razmere na hmeljskem trgu. Le 10% pridelovalcev hmelja ne spremlja razmer na hmeljskem trgu. Ostali spremljajo razmere v stiku s tujimi trgovci, domačimi trgovci, tujimi in domačimi pridelovalci ter preko ostalih dostopnih informacij.

Tudi v kmetijstvu so elektronski informacijski sistemi za izmenjavo raziskovalnih, strokovnih in tržnih podatkov vse bolj prisotni. Poleg že utečenih načinov črpanja podatkov pridobivajo računalniško podprte informacije iz dneva v dan večji pomen. Z vse bolj razširjeno rabo računalniške opreme vedno lažje premagujemo časovne in zemljepisne ovire pri izmenjavi podatkov tudi na mednarodni ravni.

Z anketo smo ugotovili, da je 17 % hmeljarjev uporabljalo osebni računalnik, vendar še brez spletne uporabe, polovica (50 %) hmeljarjev preko osebnega računalnika uporablja tudi internet. Tretjina (33 %) hmeljarjev osebnega računalnika do leta 2003 za potrebe kmetijstva še ni uporabila.

Iz rezultatov je bilo razvidno, da je polovica anketiranih hmeljarjev (50 %) uporabljala osebni računalnik tudi za potrebe pridelave hmelja. Desetina (10 %) le za splošne kmetijske, 40 % pa jih je uporabljalo računalnik izključno za osebno rabo.

4 ZAKLJUČEK

Predstavljeni podatki o razmerah pridelave hmelja RS po letu 2000 predstavljajo del rezultatov anketne raziskave vključenega vzorca hmeljarskih posestev v RS [5]. Spremembe velikostne strukture so posledica tako globalnih tržnih razmer, kot tudi omenjene spremembe v lastniški strukturi slovenskih hmeljišč na prelomu tisočletja.

Tudi v Sloveniji je tako zaznaven značilen svetovni trend koncentracije v sektorju pridelave, ki se odraža v zmanjševanju števila pridelovalcev hmelja in na drugi strani povečevanju povprečne površine hmeljišč na posestvo. Število hmeljarjev v RS se je v 5 letnem obdobju 2000-2005 zmanjšalo za tretjino - od 231 na 159. Povprečna površina družinskih hmeljarskih posestev se je istočasno povečala s 3,5 ha na 9,5 ha hmeljišč. Še zmeraj pa je bilo 2/3 posestev (96) z obsegom pridelave do 5 ha hmeljišč [1].

V sortni sestavi pridelanega hmelja v letu 2005 je bilo 910 ha Aurore (62%), 190 ha Savinjskega goldinga (13%), 136 ha Bobka (9%), 107 ha Celeie (7%), preostale površine (9%) pa so bile zasajene z ostalimi sortami. 416 ha hmeljišč je bilo v premeni [1].

Povprečna velikost površin hmeljišč v RS je s tem že postala primerljiva tistim v nekaterih konkurenčnih državah pridelovalkah. Nemčija 10,3 ha, Anglija 22,6 ha, Češka 36 ha, Slovaška 24,6 ha, Rusija 7,1 ha, Avstralija 32 ha, NZ 21,2 ha [2].

Glede na globalne razmere velja ocena, da se bo omenjeni trend koncentracije v hmeljarski pridelavi tudi v Sloveniji še nadaljeval. Obseg površin hmeljišč v RS pa se bo lahko ohranjal le ob predpostavki, da bodo razpoložljiva opuščena hmeljišča lahko odkupovali ali najemali preostali aktivni hmeljarji. Ohranitev obsega pridelovalnih površin hmelja v RS na globalni ravni okoli 3%, s tem pa tudi pomembnega deleža količin v ponudbi aromatičnega hmelja pa je nenazadnje tudi strateška nujnost za ugodna pogajalska izhodišča pri sklepanju večletnih pogodb z maloštevilnimi tujimi trgovci in pivovarji.

5 LITERATURA

1. Anon., Statistični podatki o pridelavi hmelja v RS.- Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano RS, Ljubljana, 2005.
2. Anon., Der Barth Bericht Hopfen 2004/2005.- Joh.Barth & Sohn, Nürnberg, 2005.
3. <http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/1-EC-Table.pdf> (15. sept. 2005).
4. Pavlovič, M., 2003. Slovensko hmeljarstvo v svetovni ponudbi hmelja.- *Sodobno kmetijstvo*, 36(2003)5, s. 13-15.
5. Štorman, P., Stroškovna analiza pridelave hmelja (*Humulus lupulus* L.) v Sloveniji.- Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo, Maribor, 2003, 62 s.

SCIENTIFIC COMMISSION IHGC SUMMARY REPORT 2005

Elisabeth SEIGNER¹, Martin PAVLOVIČ²

UDC/UDK: 633.791 : 061.3 : 001.814 (045)
review article/pregledni znanstveni članek
prispelo/received: 22. 08. 2005
sprejeto/accepted: 15. 10. 2005

ABSTRACT

The Scientific Commission of the International Hop Growers' Convention (IHGC) aims in promoting high scientific research results in a field of hop breeding, chemistry and quality of hops as well as hop diseases and pests. On its biannual meeting in George, South Africa, from 20-25 February 2005 the 31 scientists and representatives of the hop and brewing industry from 10 different countries all around the globe participated with their research contributions. In 12 papers and 10 posters the hop scientists presented their work covering the relevant topics.

Key words: IHGC, hop breeding, hop chemistry, hop diseases and pests

POVZETEK PRISPEVKOV NA ZNANSTVENI KOMISJI MHZ V LETU 2005

IZVLEČEK

Znanstvena komisija Mednarodne hmeljarske zveze (IHGC) skrbi za promocijo rezultatov raziskav s področja žlahtnjenja hmelja, kemije in kakovosti hmelja ter varstva hmelja pred boleznimi in škodljivci. Znanstvena komisija zaseda vsaki dve leti. Med zasedanjem komisije v letu 2005 v Južnoafriški Republiki je v času od 20-25 februarja 31 raziskovalcev iz 10 držav predstavilo svoje raziskovalne dosežke s področja hmeljarstva in pivovarstvo. Raziskovalni rezultati so bili predstavljeni v 12 referatih in na 10 posterjih.

Ključne besede: MHZ, žlahtnjenje hmelja, kemija hmelja, bolezni in škodljivci hmelja

¹ IHGC Secretary of the Scientific Commission, Bavarian State Research Center, Institute for Crop Science and Plant Breeding, Hop Research Center Hüll, Hüll 5 1/3, D-85283 Wolnzach, Germany

² IHGC Secretary General, Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Cesta Žalskega tabora 2, SI- 3310 Žalec, Slovenia

1 INTRODUCTION

The Scientific Commission of the International Hop Growers' Convention (IHGC) aims in promoting high scientific research results in a field of hop breeding, chemistry and quality of hops as well as hop diseases and pests [1]. Also in 2005, the meeting of the IHGC Scientific Commission in the RSA has proven to be a valuable forum for bringing together hop experts with different backgrounds and responsibilities [3]. In their papers and posters hop scientists presented their current research and together with their partners from the hop and brewing industry they discussed issues facing the hop growers and the hop market in order to develop common strategies for the future [2].

Apart from the scientific part of the meeting there was a chance for an overview about the South African Hop Industry and the SAB Hop Farms. During excursions to the SAB hop yards, current hop varieties and breeding lines could be assessed by the hop experts. In the SAB breeding program main emphasize is put on the development of high-yielding high alpha varieties adapted to the South African growing conditions. During these tours also the whole procedure from the harvest of the hop cones at the SAB Hop Farms and their contract growers to the processing of the hop cones at the SAB facilities was shown. A guided tour through the SAB brewery in Cape Town completed the educational program.

In the paper the sessions' summaries are included together with the incorporated contribution titles and their authors.

2 SUMMARY OF THE IHGC SCIENTIFIC COMMISSION 2005

2.1 Hop Breeding

High yield, excellent brewing quality and an increased level of resistance to diseases and pests are the stated aims of all hop breeding programs. Following these aims, it is crucial to improve the selection efficiency. In this context the appropriate methods for the assessment of resistance towards the major fungal diseases were presented. To a greater extent the chemical analysis of bitter acids and essential oils of male hops should be exploited to facilitate the evaluation of male crossing partners. Studies were presented which confirmed that high-yielding, high alpha varieties can only be created through the selection of specific parents. Classical cross breeding supported by molecular marker techniques were presented in developing new varieties adapted to the needs of growers and brewers as well. A new perspective in breeding may be genetic engineering. The first transgenic hops expressing a chitinase gene were presented showing increased resistance towards powdery mildew. Other key elements of breeding like the preserving, broadening and characterization of the genetic resources were presented as well. The following contributions were presented:

The assessment of resistance to diseases in the UK breeding programme

P. Darby

Stability of the productivity of world hop varieties as an important feature for the selection of parental components

V. Nesvadba and K. Krofta

Breeding and development of hop varieties at the Hop Research Center Huell

E. Seigner, A. Lutz, H. Radić-Miehle and S. Seefelder

Transfer of a resistance gene into hops

H. Radić-Miehle and E. Seigner

Utilisation of chemotaxonomy of male hops for breeding

K. Krofta and V. Nesvadba

Genetic sources of hops in the Czech Republic

V. Nesvadba and K. Krofta

Cultivation of Czech hop varieties on a farm of Hop Research Institute, Co., Ltd. in Žatec, Czech Republic

J. Kořen

Identification of gibberellins and involvement in hop flowering

N. Fernández Villacorta, M. Á. Revilla and H. Fernández

2.2 DNA-Based Techniques in Hop Research

In genome analysis various applications of DNA-based markers have been presented. Microsatellites were used to estimate the genetic variability of the hop germplasm, which is crucial to all breeding programs. Genetic maps saturated with AFLPs (amplified fragment length polymorphism) and microsatellites were created: in one work QTL markers associated with alpha acid content could be identified, in another study closely linked AFLP markers for powdery mildew resistance were detected and mapped. Molecular markers were also used to study and elucidate the structure of functional genes involved in metabolic and resistance processes. Comprehensive molecular characterization of *Verticillium* strains revealed differences between mild and lethal isolates. These investigations are of great importance in tracing the spread of a very aggressive form of *Verticillium* wilt in Slovenia. For effective disease management certainly this information is needed. Since HLVd (hop latent viroid) infected plants do not show any symptoms, pathogen diagnosis is only possible using PCR-based techniques. In the case of phytoplasma infections, hops showed morphological changes, but PCR gave the direct proof of this pathogen. It is quite obvious that PCR-based techniques are exploited to establish marker assisted selection and that they are valuable tools for the precise diagnosis of pathogens. The contributions followed as:

Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.)

S. Seefelder, A. Lutz and E. Seigner

Hop (*Humulus lupulus* L.) genetic map and QTL analysis

A. Čerenak, Z. Šatović, and B. Javornik

Molecular diversity of hops (*Humulus lupulus* L.)

B. Javornik, J. Jakše, Z. Šatović, N. Štajner, and A. Čerenak

New molecular markers for hop (*Humulus lupulus* L.)

J. Patzak, L. Vrba, and J. Matousek

Characterization of *Verticillium albo-atrum* hop isolates by molecular markers

S. Radišek, J. Jakše, and B. Javornik

Callus-derived hop plants show correlation between epigenetic instability and time in culture

E.L. Peredo, M.A. Revilla, J.M. Martínez-Zapater and R. Arroyo-García

2.3 Hop Chemistry

There is currently much interest in prenylflavonoids and among them especially in Xanthohumol. Since this compound has shown a significant anticarcinogenic potential, hop chemists focus on the analysis of the amount of Xanthohumol and its derivatives in hop varieties and beers. Although specific varieties provide 1% and more of this compound, during the brewing process a high percentage of Xanthohumol is converted into its iso-form. But the production and usage of a xanthohumol enriched hop extract would significantly increase the amounts of this anticarcinogenic substance in beer. The contributions included:

Contents of prenylflavonoids in Czech hops and beers

K. Krofta, V. Nesvadba, J. Poustka, K. Nováková and J. Hajšlová

Production of Xanthohumol enriched hop extracts using carbon dioxide as solvent at pressures up to 1000 bars

R. Schmidt, J. Schulmeyr and M. Gehrig

2.4 Hop Diseases and Pests

Powdery mildew (PM) caused by *Podosphaera macularis* (formerly called *Sphaerotheca humuli*) is a serious disease which is associated with significant loss of quality and yield. Thus, the development of a forecasting model for PM will help growers to apply fungicides more efficiently. Besides fungal diseases, infestations with Damson hop aphids are a problem, especially in hot seasons. Investigations clearly showed that the registration of new efficient aphicides is urgently needed, since aphid populations in the Czech Republic have already evolved resistance to several insecticides. Moreover, for an efficient control of aphids a threshold for economic damage should be established. In another paper factors that influence the application of pesticides were elucidated. In this way valuable information was given about what should be kept in mind when spraying and evaluating the efficacy of pesticides or phytopharmaceutical substances in practice. The following research results were offered:

Development and testing of a forecasting model for powdery mildew (*Podosphaera macularis*) in hops in Bavaria

B. Engelhard, K. Kammhuber, R. Huber, A. Lutz, H. Hesse

The resistance phenomenon in damson-hop aphid (*Phorodon humuli* Schrank) in the Czech Republic

J. Vostřel

Economic threshold of intervention against *Phorodon humuli* (Schrank, 1801) (*Hemiptera: Aphididae*) in Leon (Spain): Hop parameters prior to calculation

A. Lorenzana, A. H. de Mendoza, J.A. Magadán, and M.V. Seco

Occurrence of Phytoplasma on hops in Poland

E. Solarska, M. Grudzińska, M. Kamińska, and H. Śliwa

Infection of HLVd in hop gardens in the Czech Republic

P. Svoboda, J. Matousek, J. Patzak, and K. Krofta

Second thoughts about different ways of evaluation of spraying techniques

M. Kač

3 LITERATURE

1. <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/obj.htm> (Sept. 15, 2005).
2. Seigner, E. et al., Proceedings of the Scientific Commission IHGC.- George, RSA, 2025 February 2005, 74 p., ISSN 1814-2206, <http://www.lfl.bayern.de/ipz/hopfen/10585/sc05-proceedings-internet.pdf> (Sept. 15, 2005).
3. Seigner, E., Engelhard, B., Pavlovič, M., Report on the meeting of the Scientific Commission.- Proceedings of the Technical Commission IHGC, BE ISSN 0303-9056, <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/1-TC-05.pdf> (Sept. 15, 2005).

SOIL VULNERABILITY ASSESSMENT FOR PESTICIDE LEACHING IN SAVINJA VALLEY

Marko ZUPAN¹, Matej KNAPIČ², Borut VRŠČAJ², Andrej SIMONČIČ², Metka SUHADOLC¹

UDC/UDK 631.4:632.95:504.05:519.6:528.94:659.2 (045)
original scientific article/izvirni znanstveni članek
received/prispelo: 27. 10. 2005
accepted/sprejeto: 25. 11. 2005

ABSTRACT

A simple model of soil sensibility for pesticide leaching was developed using existing soil data (Soil Information System (SIS) of Slovenia with Digital soil map in scale 1:25000 (DPM25) as main data layer). The attribute data of soil organic matter content (SOM) and depth of soil systematic units (SSU) were used to calculate pesticide-holding capability (PHC). PHC integrate mentioned factors into relative numeric value that is added as a new data to the SSU attribute table. Validation of algorithm was done using PELMO model (one of FOCUS models) where – beside SOM and total soil depth – soil texture, bulk density, percentage of coarse material and thickness of soil horizons from representative soil profiles were used. SSU were classified into five categories according to the PHC attribute and graphically presented (with accordingly adjusted soil mapping units (SMU) of DPK25) as soil vulnerability map of tested area in Žalec and Celje community in Savinja valley.

Keywords: soil vulnerability, pesticide leaching, modelling, groundwater protection

OBČUTLJIVOSTI TAL ZA IZPIRANJE FITOFARMACEVSTSKIH SREDSTEV V SAVINJSKI DOLINI

IZVLEČEK

Izdelali smo model za opredelitev občutljivosti tal za izpiranje fitofarmacevtskih sredstev. Kriterije talnih lastnosti pomembnih za vezavo oziroma izpiranje FFS iz tal smo opredelili s točkami izračunanimi iz atributnih podatkov digitalne pedološke karte v merilu 1:25000 (DPK25). Pri razvoju algoritma smo uporabili delež organske snovi v tleh in podatek o povprečni globini tal. Podatke o teksturi tal, gostoti tal in deležu skeleta v tleh smo uporabili pri testiranju algoritma z modelom PELMO, ki je eden od uradnih modelov EU pri registraciji FFS (FOCUS). Pedosistematske enote (PSE) smo na osnovi izračunanih točk razvrstili v pet kategorij glede na tveganje izpiranja FFS iz tal. Glede na zastopanost PSE v kartografskih enotah DPK25 in smo izrisali karto ranljivosti za rabo FFS na območju občine Žalec in Celje v Savinjski dolini.

Ključne besede: ranljivost tal, izpiranje fitofarmacevtskih sredstev, modeliranje, zaščita podtalnice

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Centre for Soil and Environmental Science, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, E-mail: marko.zupan@bf.uni-lj.si, metka.suhadolc@bf.uni-lj.si;

² Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova 17, 1001 Ljubljana, E-mail: matej.knapic@kis.si, borut.vrscaj@kis.si, andrej.simoncic@kis.si

1 INTRODUCTION

Agrochemicals, particularly pesticides, have different fates after application. Most applied pesticides ultimately reach the soil, even when sprayed on plant surfaces. Some may volatilised or evaporated to the atmosphere; some could be transported by erosion or a surface runoff. Water can move pesticides into the soil, where they can be taken up by plants, broken down under biological degradation and by chemical reactions, or leached through the soil; they cause a potential threat to the groundwater [4]. Groundwater is often referred to as a source for drinking water and should be free of hazardous chemicals. Restrictions in use of pesticides and limitations in agricultural practice are measures taken to fulfil water quality criteria [2, 1]. Soil properties are one of the most important factors influencing the fate of pesticide in soil-groundwater system.

Many useful tools (models) exist for evaluation of pesticides leaching potential. Among several models four of them were included in pesticide registration process as a relevant tool to evaluate pesticide leaching potential on Tier 1 level. PELMO is one of them and it is appropriate when more general data of soil properties are available. Due to a great public concern regarding safe use of drinking water resources we tried to evaluate soil vulnerability for pesticide use. Evaluation was made on pilot area in our case at lower part of Savinja valley. In first step only soil properties were included and transformed to pesticide holding capability (PHC) classes and presented as a soil sensibility/vulnerability map for more precise implementation protection measures.

It is well known that soil organic matter and clay minerals are the most important soil components in pesticide retention after soil application. Furthermore, it is well established that the uptake of nonpolar organic compounds from aqueous solution is strongly correlated with soil organic matter content [3]. Normalisation of pesticide sorption by soil organic matter or soil organic carbon (K_{om} or K_{oc} coefficient) implies that organic matter is sole soil compound in pesticide retention. Such generalisation could be misleading, especially in sorption of more polar pesticides. Many other important factors are neglecting such as pH, CEC (cation exchange capacity), clay content and other soil mineral adsorption sites. In some cases each of these factors could play a crucial role in pesticide sorption. However, in general, organic matter content is the most important factor governing pesticide sorption. In our study this fact was considered as a most important factor in soil vulnerability assessment for pesticide leaching extent.

2 MATERIALS AND METHODS

The Digital Soil Map at scale 1:25000 (DSM25) is used as a basic reference database of Slovenian soils as a natural resource [7]. DSM25 has graphical (spatial) and attribute information. Graphic information is represented by soil mapping units (SMU) polygons with the properties described in attribute tables. Each SMU is composed of up to three different soil types soil systematic units (SSU). Soil profile (SP) data with site and horizons description and standard soil analyses represent additional point layer database with measured parameters. MS Access 2000 and MS SQL 2000 are used to maintain computer relational database with SMU units including SSU properties described in attribute tables (Table 1) and SP data. ESRI software (ArcGis 8.3) was used for GIS processing.

Layer data of land use information from MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Food) were used for focusing GIS analysis only for agriculture land use. Outputs were tested on test area in Žalec and Celje community in Savinja valley where intensive agriculture is present above groundwater table that is an important source of drinking water.

Model FOCUS/PELMO 3.22 was used [6] to calculate potential risk of pesticide leaching through different representative soil profiles of pilot area [5]. Through indicative stage of modelling ponders for soil properties from DSM25 were determined. Ponders were included in algorithm for pesticide holding capability (PHC) calculation.

Pesticide with medium organic carbon partition coefficient ($K_{oc}=200\text{ml/g}$) as a measure of mobility and with medium to high half-life ($HL_{50}=100$ days) as a relative persistence was used on all soil types. Pesticide holding capability (PHC) was calculated for each SSU using results from PELMO model and attribute data (Table 1). Soil vulnerability maps were structured according to SMU composition and their spatial distribution (Fig. 1).

Table 1: Selected attribute data of soil systematic units (SSU) in digital soil map of Slovenia (DSM25)
Tabela 1: Izbrani atributni podatki pedosistematskih enot (PSE) digitalne pedološke karte Slovenije (DPK25)

Attribute class	DEPTH [cm]	TEXTURE (TEXTURE CLASSES*)	ORGANIC MATTER [%]
1	Very shallow < 30	Coarse textured soil (heavy) (S, LS, SL)	Mineral soil <1
2	Shallow < 50	Coarse and medium textured soil (S, LS, SL, SCL, CL, L, SiL, Si)	Low OM 1-2
3	Moderately deep < 70	Medium textured soil (SCL, CL, L, SiL, Si)	Medium OM 2-4
4	Deep > 70	Medium and fine textured soil (SCL, CL, L, SiL, Si, SiCL, SiC, SC, C)	High OM 4-10
5		Fine textured soil (heavy) (SiCL, SiC, SC, C)	Very high OM >10
9	Wide range	Wide range	Wide range

* S - sand, LS - loamy sand, SL - sandy loam, L - loam, SiL - silt loam, Si - silt, SCL - sandy clay loam, CL - clay loam, SiCL - silty clay loam, SC - sandy clay, SiC - silty clay, C - clay

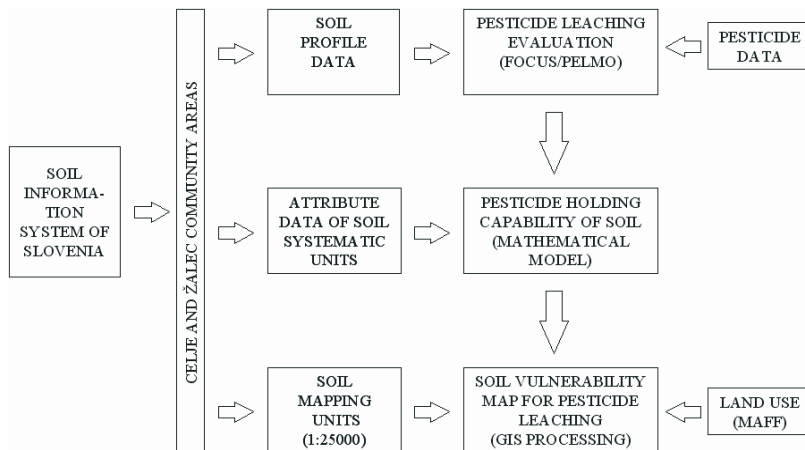


Figure 1: Simplified process of structuring soil vulnerability maps

Slika 1: Shema izdelave karte ranljivosti tal

3 RESULTS AND DISCUSSION

PHC was integrated into relative numeric value for each SSU at pilot area. The value of PHC ranging from 3 to 40, according to validation with PELMO model, five main categories of the interpretation scale from minimum (negligible) to very high concern for ground water contamination by pesticides were established. Each category was split into subclasses of sensibility with general recommendation of pesticide use (Table 2).

Table 2: Interpretation scale for the SSU according to calculated PHC expressed as soil sensibility for pesticide use or risk of pesticide leaching through soil profile

Tabela 2: Interpretacijski ključ za razvrstitev pedosistematskih enot (PSE) v kategorije tveganja izpiranja FFS iz tal glede na izračunano vrednost zadževanja pesticida v tleh

PHC value	Soil Sensibility		Risk of leaching pesticide from soil		
	Class	Characteristics	Level of concern	Category	Label in map
< 7	1	Inappropriate for pesticide use	Very high risk	I	Crosshatch
8-10	2	Inappropriate for pesticide use			
11-12	3	Inappropriate for pesticide use	High risk	II	Simple hatch
13-14	4	Sensitive soil for pesticide use			
15-17	5	Limited use of pesticide	Medium risk	III	Dot net
18-20	6	Limited use of pesticide			
21-25	7	Proper pesticide use is not problematic	Low risk	IV	Horizontal line
26-30	8	Proper pesticide use is not problematic			
33-35	9	Very high capability of pesticide adsorption	Negligible risk	V	Solid grey
36-40	10	Very high capability of pesticide adsorption			

Pilot area for testing soil vulnerability model for pesticide use was set in Žalec and Celje community. Testing area occupied 21200 ha of which 9018 ha is agricultural land (Table 3, Fig.2).

Results of PHC assessment shows that high risk for pesticide use (Fig. 2) represents soil units developed on following soil classes according to FAO classification: Fluvisol, Regosol, Rendzinas and shallow forms of Cambisols. Main characteristics of soil units classified in first category regarding safe use of pesticides are low depth of soil profile and lower organic matter content. On the pilot area those units are mostly situated in the vicinity of Savinja river. Soil units of Rendzinas and Rankers could be found in hills on calcareous parent material (Pirešica, Liboje) and on Miocene sand and sandstone (Pirešica, Štore). In this category were classify 941 ha of agriculture land which represent 10% of all agriculture area (Table 3). In the second category where risk for pesticide leaching is still high, mostly cambisols (usually Eutric cambisol) with medium depth were classified. These units are represented in part of Savinja valley. However some other soil units of Dystric cambisol could be found on other parts of testing area. Area of this category represents 28% of agriculture area under investigation (Table 3).

Soils classified in third category represent medium risk for pesticides leaching. In this category many soil units of eutric and dystric cambisol with different parent material (marl, non sandy alluvial deposit, etc.) are included and also same soil units of Gleysols. It is the largest category where more than 5200 ha (58 %) of agriculture land were included (Table 3).

Only 1% of all area is covered by soil classified as a low risk for pesticide use. Deep soil units developed on alluvial deposit were classified in this category. On tested area no soil units were classified in category of negligible risk for pesticide leaching (Table 3).

Table 3: Area of different category of risk assessment for pesticide leaching

Tabela 3: Površina in delež različnih kategorij glede na ugotovljeno tveganje za izpiranje pesticidov

Category	Area (ha)	Area (%)
1 - Very high risk	941	10
2 - High risk	2524	28
3 - Medium risk	5224	58
4 - Low risk	56	1
5 - Negligible risk	-	-
Error*	273	3
Total	9018	100

* Differences arise due to lower accuracy of urban zones in Slovenian soil map

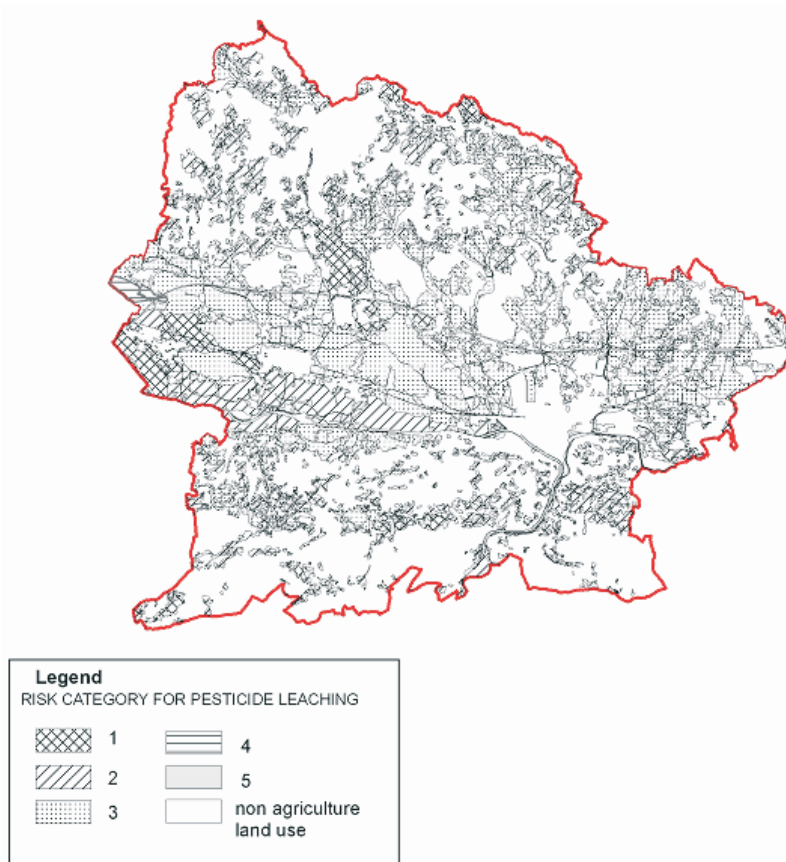


Figure 2: Soil vulnerability map for pesticide leaching

Slika 2: Karta ranljivosti tal zaradi izpiranja fitofarmaceutskih sredstev

4 CONCLUSIONS

Transformation of general (available) soil data into maps of soil vulnerability leaching using simple model with main attribute data for SSU has shown reasonable results on test area. More precise classification and description of soil vulnerability could be done using particular pesticide or pesticide groups according to their persistence and mobility data. Additional site characteristics and management practice in combination with climatic data could contribute to detail scale of thematic maps in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge to the Slovenian Ministry of Science and Technology and Ministry of Agriculture, Food and Forestry for financial support according to the contracts V4-0460, V1-0798 and V4-0885.

5 REFERENCES

1. Brena, S., Pampaluna, M., Riparbelli, C., Auteri, D., Azimonti, G., Bernardinelli, I., Mammone, T., Maroni, M., Capri, E., Trevisan, M., Montanarella, L.,. 1999. Supplying Local Authorities and Farmers With an Innovative Tool to Support a Sustainable Agricultural Production. XI Symposium Pesticide Chemistry – Human and Environmental Exposure of Xenobiotics, Cremona 1215 Sept. 1999.
2. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy Official Journal L 327, 22/12/2000 P. 00010073.
3. Li, H., Sheng, G., Teppen, B.J., Johnston, C.T., Boyd, S.A., Sorption and Desorption of Pesticides by Clay Minerals and Humic Acid-Clay Complexes. - Soil. Sci. Soc. Am. J. 67 (2003), p.122-131
4. Landon, M., Jacobsen, J., Johnson, G., 1994. Pesticide Management for Water Quality Protection. Montana State University, Extension Service, Bozeman, Montana, 19 p.
5. http://eco.wiz.uni-kassel.de/model_db/mdb/pelmo.html (20. sept. 2005)
6. Knapič, M., Bukovec, P. 2004. Fate and behavior evaluation of pesticides in pesticide registration scheme with emphasis on groundwater. Book of abstracts: 9th International Conference Life Sciences 2004, Nova Gorica, 18th-22th of Sept., p. 226.
7. Vrščaj, B., Prus, T., Lobnik F., 2005. Soil Information and Soil Data Use in Slovenia. In: Soil Resources of Europe (Eds. Jones, R. A., Houšková, B., Bullock, P., Montanarella, L.), European Soil Bureau, Institute for Environment & Sustainability, JRC, Ispra., pp. 331–344.