

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

# **Hmeljarski bilten**

# **Hop Bulletin**

**ISSN za tiskano izdajo 0350-0756**

**ISSN za spletno izdajo 2536-1988**

**29(2022)**



**Žalec 2022**

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

# **Hmeljarski bilten Hop Bulletin**

**29(2022)**



**Žalec, 2022**

## Hmeljarski bilten / Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

- Izdaja /** Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) /  
**Issued by** Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS)  
Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija / Slovenia
- Urednika /** dr. **Barbara Čeh** in dr. **Boštjan Naglič**  
**Editors**
- Uredniški odbor /** dr. **Barbara Čeh** (IHPS), izr. prof. dr. **Andreja Čerenak** (IHPS), izr. prof. dr.  
**Editorial board** **Jernej Jakše** (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani / University of Ljubljana, Biotechnical Faculty – BF UL), izr. prof. dr. **Iztok Jože Košir** (IHPS), doc. dr. **Rok Mihelič** (BF UL), dr. **Boštjan Naglič** (IHPS), prof. dr. **Martin Pavlovič** (IHPS in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru / Faculty of Agriculture and Life Sciences University of Maribor), dr. **Sebastjan Radišek** (IHPS), dr. **Magda Rak Cizej** (IHPS), dr. **Elisabeth Seigner** (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft / Bavarian State Research Center for Agriculture, Freising, Germany), dr. **Siniša Srečec** (Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Hrvaška / College of Agriculture at Križevci, Croatia), dr. **Igor Šantavec** (BF UL), prof. dr. **Dominik Vodnik** (BF UL)
- Naslov uredništva,** Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija / Slovenia;  
**politika /** e-pošta / e-mail: barbara.ceh@ihps.si  
**Editorial office and** Člani uredniškega odbora so tudi recenzenti prispevkov. Prispevki so najmanj  
**policy** dvojno recenzirani. Za jezikovno pravilnost odgovarjajo avtorji. S poslanim člankom se avtorji strinjajo tudi za spletno objavo revije. /  
Articles are reviewed and revised. Authors are fully responsible for linguistic structure of the text. By sending an article, the authors agree for the online and printed publication of the journal.
- Recenzenti** v tej številki izven uredniškega odbora:  
**Reviewers** outside the Editorial Board for this number:  
dr. **Zalika Črepinšek** (UL BF), dr. **Tanja Guček** (IHPS), dr. **Taja Jeseničnik** (UL BF), **Ana Karničnik Klančnik** (IHPS), dr. **Urban Kunej** (UL BF), **Lucija Luskar** (IHPS), izr. prof. dr. **Jana Murovec** (UL BF), dr. **Barbara Pipan** (KIS), **Silvo Žveplan** (IHPS)
- Domača stran /** <http://www.ihps.si/raziskave-in-razvoj/publikacije/hmeljarski-bilten/>  
**Home page**
- Bilten zajemajo /** COBISS, CABI Publishing, EBSCO Publishing  
**Indexed and**  
**abstracted by**
- Tisk / Printed by** Grenko d.o.o.
- Avtorske pravice /** © 2022 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije /  
**Copyright** © 2022 Slovenian Institute of Hop Research and Brewing
- Izdajo sofinancira Agencija za raziskovalno dejavnost RS. /**  
**The issue was financially supported by the Slovenian Research Agency.**

## VSEBINA / CONTENTS

Lucija LUSKAR, Jernej JAKŠE in Andreja ČERENAK <b>Interakcija navadnega hmelja (<i>Humulus lupulus L.</i>) in glive <i>Verticillium nonalfalfae</i></b> Interaction of hop ( <i>Humulus lupulus L.</i> ) and <i>Verticillium nonalfalfae</i> .....	5
Ester STAJIČ, Petra KUNC in Urban KUNEJ <b>Vzpostavitev metode izolacije protoplastov pri hmelju (<i>Humulus lupulus L.</i>)</b> Establishment of protoplast isolation method for hop ( <i>humulus lupulus L.</i> ).....	23
Tanja GUČEK in Sebastjan RADIŠEK <b>Uporaba izotermnih metod pomnoževanja nukleinskih kislin za določanje viroidov na terenu</b> On site detection of viroids using methods for isothermal amplification of nucleic acids .....	34
Ana KARNIČNIK KLANČNIK, Magda RAK CIZEJ and Barbara ČEH <b>A snapshot of meso- and macroorganisms in composting hop waste biomass</b> Mezo- in makroorganizmi v kompostirajoči hmeljevini .....	48
Barbara ČEH, Žan TROŠT in Ana KARNIČNIK KLANČNIK <b>Primerjava gnojenja s svežo hmeljevino v primerjavi z zrelim kompostom iz hmeljevine – lončni poskus</b> Comparison of fertilization with fresh hop plant biomass versus mature hop biomass compost - a pot experiment.....	65
Douglas MACKINNON and Martin PAVLOVIČ <b>Price dynamics in the market of hops</b> Dinamika cen na trgu s hmeljem .....	73
Martin PAVLOVIČ, Douglas MACKINNON and Boštjan NAGLIČ <b>Study of market supply statistics in trading of hops</b> Študija tržnih statistik ponudbe hmelja.....	85
Magda RAK CIZEJ in Franček POLIČNIK <b>Obvladovanja hmeljevega bolhača (<i>Psylliodes attenuatus koch</i>) na hmelju (<i>Humulus lupulus L.</i>) z uporabo alternativnih pripravkov</b> Control of hop flea beetle ( <i>Psylliodes attenuatus koch</i> ) on hops ( <i>Humulus lupulus L.</i> ) using alternative preparations .....	97

Alenka DOLER

**Socio-economic impact of introducing biodegradable twine in the hop fields**

Socioekonomski vidik vpeljave biorazgradljive vrvice v hmeljišče ..... 109

Miha OCVRK, Ksenija RUTNIK, Zarja MEDVED in Iztok Jože KOŠIR

**Vpliv hladnega hmeljenja piva na vsebnost polifenolov in grenčice**

Influence of dry hopping on beer bitterness and polyphenols content..... 119

Marjeta ERŽEN, Andreja ČERENAK, Tjaša CESAR, Lucija LUSKAR in  
Jernej JAKŠE

**Izbira SNP pozicij genoma za določitev genetske raznolikosti pri navadni  
konoplji (*Cannabis sativa* L.)**

Determination of SNP genome positions for capture probes design for  
identification of genetic diversity in hemp (*Cannabis sativa* L.)..... 126

Julija POLANŠEK, Lucija LUSKAR, Darko VERNIK, Irena MAVRIČ PLEŠKO in  
Andreja ČERENAK

**Prenos šalotke v tkivno kulturo s pregledom zdravstvenega stanja čebulic  
pri sorti Pohorka**

Shallot transfer into tissue culture with an examination of bulbs' health  
condition of variety Pohorka..... 135

Žan TROŠT in Barbara ČEH

**Depozicija nekaterih rastlinskih hranil in natrija s padavinami**

Wet deposition of elements that are important for agriculture ..... 146

**INTERAKCIJA NAVADNEGA HMELJA (*Humulus lupulus* L.) IN  
GLIVE *Verticillium nonalfalfae***Lucija LUSKAR<sup>1</sup>, Jernej JAKŠE<sup>2</sup> in Andreja ČERENAK<sup>3</sup>

Pregledni članek / Review article

Prispelo / Received: 25. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 17. 11. 2022

**Izvleček**

Verticilijska uvelost hmelja je bolezen, ki se manifestira v interakciji med fitopatogenimi glivami iz rodu *Verticillium* sensu stricto (*V. dahliae* in *V. nonalfalfae*) in občutljivimi kultivarji hmelja. Interakcija je v glavni meri odvisna od patogenosti glive in stopnje občutljivosti oz. odpornosti hmelja. Letalno obliko bolezni povzroča *V. nonalfalfae*, patotip PG2, ki povzroči razvoj hudih simptomov, kot so kloroze, nekroze, venenje in hitro odmiranje tkiva, rastlina pa v celoti propade v isti ali naslednji sezoni. Prehod glive v prevajalni sistem rastline povzroči zamašitev prevodnega sistema in s tem venenje rastline. Odziv odpornih kultivarjev in občutljivih kultivarjev je pokazal, da imajo občutljivi kultivarji hitrejša in močnejša obrambna mehanizma, kot so tvorba tiloz in nalaganje lignina ter suberina na stenah ksilema, ki vodijo v razvoj simptomov. Ob okužbi pride pri hmelju do povečanega izražanja encimov, ki razgrajujejo in odstranjujejo glivne hife. Ekspresijske študije nakazujejo na povečano izražanje genov, vpletenih v biosintezo kutina pri odpornem kultivarju, poleg tega pa ima pri ekspresiji pomembno vlogo tudi RNA interferenca. Ne glede na poznavanje mnogih glivnih efektorjev in njihovih receptorjev, pa še do danes mehanizem odpornosti ni dokončno raziskan.

**Ključne besede:** verticilijska uvelost hmelja, hmelj, gliva verticilij, odpornost, žlahtnjenje

---

<sup>1</sup> Mag. biotehol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: lucija.luskar@ihps.si

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

<sup>3</sup> Izr. prof. dr., IHPS, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

## INTERACTION OF HOP (*Humulus lupulus* L.) AND *Verticillium nonalfalfae*

### Abstract

*Verticillium* wilting of hops is a disease, manifested in the interaction between phytopathogenic fungus from genus *Verticillium* sensu stricto (*V. dahliae* in *V. nonalfalfae*) and susceptible hop cultivars. Interaction outcome is mostly depended on pathogenicity of the fungi and level of susception or resistance of hop. Lethal type of disease is caused by *V. nonalfalfae*, pathotype PG2, that induce development of severe symptoms, such as chlorosis, necrosis, wilting and plant tissue death, consequently the plant dies in the same season or in the next. The shift of fungi into the phloem results in clogging and wilting. Response studies of resistant and susceptible cultivars revealed faster and stronger defence mechanisms in susceptible cultivars, such as tylose formation, accumulation of lignin and suberin on xylem walls, mechanisms that lead to development of symptoms. Infection of hop is linked with expression of enzymes that degrade fungal hyphae. Expression studies indicate enhanced expression of genes, involved in biosynthesis of cutin in resistant cultivar and also importance of RNA interference. Despite knowing many fungal effectors and plant receptors, mechanism of hop resistance is not fully understood.

**Key words:** verticillium wilting of hops, hop, verticillium, resistance, breeding

### 1 UVOD

Rastline so se na našem planetu razvile kasneje od gliv, zato so interakcije med glivami in rastlinami stare toliko, kot so stare rastline same (Humphreys in sod., 2010). V grobem ločimo štiri glavne tipe interakcij: mutualistične, komenzalistične, neutralistične in parazitske. Rastlinski receptorji in z obrambo povezani proteini, ki interagirajo z glivnimi molekulami, lahko odločajo o izidu interakcije med dvema organizmoma (Zeilinger in sod., 2015). Veliko interakcij med glivo in rastlino je mutualističnih. Takšna interakcija stimulira rast rastlin in razvoj; ker gliva rastlini omogoča boljši privzem hranil in vode iz tal in ji pomaga pri toleranci na stres, rastlina pa v zameno glivi dovaja sladkorje (Buscot in sod., 2000). Medtem ko koristne interakcije nudijo stabilnost obema partnerjema, so škodljive interakcije evolucijski pritisk tako za patogena kot za rastlino (Jones in Dang, 2006).

Med glivami iz rodu *Verticillium* sensu stricto, ki parazitirajo rastline, verticilijsko uvelost hmelja povzročata predvsem *Verticillium dahliae* in *Verticillium nonalfalfae*. Slednja spada med vretenaste glive in je tipična zemeljska hemibiotrofna gliva, ki lahko prezimi v tleh, na obolelih rastlinah in v koreninah kot trajni micelij. Hife ali konidiji najdejo pot v prevajalni sistem skozi zdrave ali poškodovane mlade korenine. Po naselitvi korenin micelij nadaljuje pot v prevajalnem sistemu, kjer se začne močno razmnoževati in tvori konidije, ki se s sokom vred prenašajo po rastlini (Fradin in Thomma, 2006; Radišek in sod., 2004).

Pomembnejši gostitelji glive so krompir, špinača, petunija ter, glede na patofiziologijo in potek okužb najpomembnejši, hmelj (Inderbitzin in sod., 2011; Kasson in sod., 2014; Snyder in sod., 2014). Ker je hmelj trajnica, lahko *V. nonalfalfae* povzroči popolno uničenje nasada in posledično ogromno gospodarsko škodo (Pegg, 1984; Klosterman, 2009).

Lažja oblika verticilijske uvelosti se je na hmelju pojavila leta 1924 v Angliji (Harris, 1927), leta 1933 pa v težji oz. letalni obliki. Leta 1955 se je bolezen prvič pojavila v Sloveniji, v večjem obsegu pa leta 1974 na kultivarju Aurora. Leta 1977 se je zaradi okužbe pojavila večja gospodarska škoda. Sprva je bilo ugotovljeno, da imajo angleški in slovenski visoko virulentni izolati najverjetneje različen izvor in so se verjetno razvili iz manj virulentnih patotipov, ki so že dolgo prisotni v hmeljiščih, a so bili zaradi blagih bolezenskih znakov neopazni in gospodarsko manj pomembni (Mandelc in sod., 2009).

V Sloveniji verticilijsko uvelost hmelja povzročata dva patotipa glive *V. nonalfalfae*: patotip PG1, ki povzroča blago obliko bolezni, in patotip PG2, ki povzroča letalno obliko bolezni. Hmelj je primarni gostitelj slovenskih PG1 in PG2 patotipov (Radišek in sod., 2003). Razlika med blago in letalno obliko je, da se simptomi pri blagi obliki pojavijo kasneje v rastni sezoni, obolele rastline pa začnejo odebeljevati trte od spodaj navzgor, zaradi česar začne skorja pokati in postane hrapava, prevajalno tkivo postane rjavo. Listi porumenijo, robovi listov se obrnejo navzgor in ob dotiku odpadejo. Pri blagi obliki, za razliko od letalne, se obolele rastline posušijo, naslednje leto pa normalno rastejo naprej. Trte se pri letalni obliki običajno ne debelijo. Visoko virulentni patotip glive pri občutljivih rastlinah povzroči, da v nekaj mesecih po okužbi razvijejo hude simptome, kot so kloroze, nekroze in hitro odmiranje tkiva. Pri letalni obliki občutljive rastline odmrejo preko zime ali v naslednji rastni dobi (Talboys, 1987; Neve, 1991; Dolinar in Simončič, 1999; Radišek in sod., 2006).

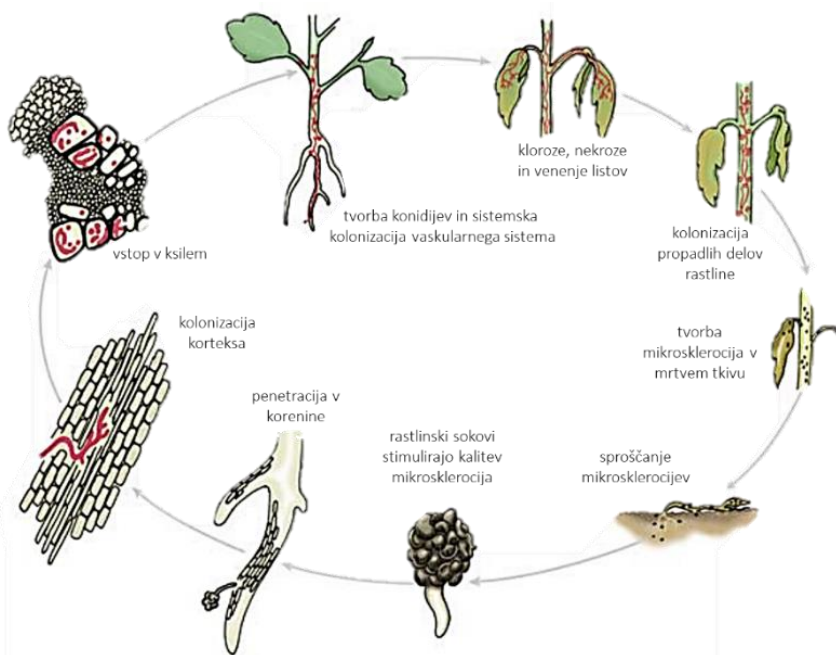
Od prvega izbruha leta 1997 je bilo v 6 letih odkritih več kot 180 ha okuženih površin, od katerih jih je bila več kot polovica eradikiranih (Radišek in sod., 2004). Eradikacija in strogi ukrepi so bolezen zaježili, še vedno pa povzroča veliko škodo na že okuženih območjih, v hmeljiščih z zelo občutljivimi kultivarji. V članku so predstavljene dosedanje študije s področja interakcije med glivo *V. nonalfalfae* in različnimi kultivarji hmelja.

## 2 ŽIVLJENJSKI CIKEL GLIV IZ RODU *VERTICILLIUM* SENSU STRICTO

Gliva *V. nonalfalfae* je patogen prevajalnega sistema rastlin in živi v ksilemu gostitelja (Pegg in Brady, 2002). Življenjski cikel gliv *Verticillium* sensu stricto, vključno z glivo *V. nonalfalfae*, delimo v tri faze, dormantno, parazitsko in



saprofitsko (Fradin in Thomma, 2006). V času neugodnih razmer je *V. nonalfalae* v dormantni fazi v obliki melaniziranega micelija (trajni micelij), ki ji omogoča preživeti v tleh več let. Ob zaznavi rastlinskih eksudatov nastopi parazitska faza življenjskega cikla glive, v kateri se začne trajni micelij razraščati in tvoriti hife. Razvoj bolezni pospešijo mokra in nepropustna tla ter pretirano gnojenje z dušikom (Keyworth in Hewitt, 1948). V ksilemu iz hif poganjajo konidiofori, na katerih se razvijejo fialide s številnimi konidiji. Konidiji potujejo po rastlini navzgor s transpiracijskim tokom ter vzkljujejo v micelij na delih, kjer so žile manj prehodne in zadržijo konidije (Sewell and Wilson, 1964). Najtežji del širjenja glive je prodiranje glive v prevajalni sistem in traja dalj časa, razmnoževanje v prevajalnem sistemu in širjenje po njem pa je hitro.



**Slika 1:** Življenjski cikel fitopatogenih gliv iz rodu *Verticillium sensu stricto* (povzeto po Berlanger in Powelson, 2000).

V času kolonizacije lahko gliva izraža in izloča hidrolitične encime, ki so vpleteni v degradacijo rastlinske celične stene, kar ji dodatno olajša razširjenje (Chen in sod., 2016; Fradin in Thomma, 2006). Z razraščanjem glive po rastlini se krepijo simptomi okužbe in venenje rastline, do končnega propada rastline. Na tej stopnji se prične saprofitska faza, ko ob propadu rastline gliva naseli celotno rastlino (Talboys, 1958a, 1972). Med saprofitsko fazo gliva ponovno tvori trajne organe, ki ji bodo omogočili preživetje ter s tem sklene življenjski cikel (Fradin in Thomma, 2006; Radišek in sod., 2004).

### 3 SPLOŠEN RASTLINSKI IMUNSKI ODZIV

Prvo oz. fizično bariero med rastlino in patogenom predstavljata kutikula in epitelij, ki zagotavljata konstitutivno obrambo. V primeru, da patogen prodre v rastlino, imajo rastline sistem, ki zaznava patogene in ga imenujemo inducirana obramba (Doughari, 2015). V obrambi rastline spremenijo osnovne fiziološke procese, kot so dihanje, fotosinteza, translokacija nutrientov, transpiracija, rast in razvoj (Zeilinger in sod., 2016).

Rastline so sposobne zaznavati molekularne vzorce določenega patogena ali njegove efektorske molekule. Z vzorci izzvana imunost (PTI, angl. *pattern-triggered immunity*) se sproži, ko receptorji za prepoznavanje vzorcev (PRR, angl. *pattern recognition receptors*) zaznajo molekularne vzorce oz. molekule (PAMP, angl. *microbial oz. pathogen-associated molecular patterns*) (Gust in sod., 2017). Glavni molekularni vzorci so običajno kompleksni ogljikovi hidrati v celični steni, kot so hitin, beta glukani, galaktoglukomanani in drugi (De Wit in sod., 2009). Posledično pride do sinteze salicilne kisline, jasmonske kisline in etilena, oksidativnega izbruha, proizvodnje protimikrobnih snovi, nalaganja kaloze ob plazmodezme in zmanjšane prenosa snovi iz citosola v apoplast (Bigeard in sod., 2015). Tekom evolucije so patogeni razvili različne načine, da bi se izognili PTI. Z efekorskimi molekulami ga lahko zatrejo, obidejo s toksičnimi efektorji ali pa razgradijo produkte obrambnih signalov. Rastline so v odgovor razvile z efektorji izzvano imunost (ETI, angl. *effector-triggered immunity*), pri kateri imajo vlogo proteini R (Anderson in sod., 2010). Pri rastlinah so najbolj poznani nukleotid vezavni LRR (ang. *leucine-rich repeat*, z leucinom bogata ponovitev) proteini, ki zaznavajo efektorske molekule ali pa modifikacije ključnih rastlinskih proteinov (Dangl in Jones, 2001; Gao in sod., 2018). Posledično pride do preobčutljivostnega odziva, ki se izraža v obliki lokalizirane programirane celične smrti, sinteze salicilne kisline in oksidativnega izbruha, ki prepreči širjenje škodljivca po rastlini (Wu in sod., 2014). Na ETI nivoju lahko govorimo o konstantni evolucijski tekmi med gostiteljem in patogenom, pri čemer gostitelj razvija in prilagaja receptorje za prepoznavo patogenov, na drugi strani pa patogen razvija nove strategije, kako zaobiti obrambne mehanizme gostitelja (Dodds in Rathjen, 2010; Jones in Dangl, 2006). Del PTI in ETI odgovora so tudi majhne RNA molekule (angl. *small RNA*; sRNA), ki so odgovorne za regulacijo odgovorov na abiotični in biotični stres. Najbolje opisan razred rastlinskih sRNA so miRNA (angl. *micro RNA*), ki lahko prispevajo k obrambi pred patogenom, in sicer z vplivom na izražanje obrambnih, s patogenozo povezanih proteinov (Zhang in sod., 2011; Yang L. in sod., 2013).

## 4 ODZIV HMELJA NA OKUŽBO Z GLIVO *V. NONALFALFAE*

### 4.1 Fizična obramba pred vstopom glive v ksilem

Rastline se na glive rodu *Verticillium* sensu stricto odzovejo na dveh temeljnih ravneh - s fizično zamejitvijo glive v ksilemu ter nato z njeno kemično odstranitvijo ali inhibicijo (Pegg in Brady, 2002; Yadeta in Thomma, 2013). Prvo bariero glivi predstavljata epidermalno in endodermalno tkivo, ki sta običajno zaščitena s plastjo lignina, suberina in kutina (Talboys, 1958a; Yadeta in Thomma, 2013). Ko hife prodrejo med epidermalne celice koreninskega tkiva ter gliva vstopi v ksilemsko tkivo, se fizično omejevanje nadaljuje z mašenjem ksilemskih žil s tvorbo tiloz (mehurčkasti izrastki parenhimskih celic, ki se lahko razširijo v lumen ksilema), z nalaganjem kaloze in lignina na ksilemskih stenah, ter želiranjem ksilemskega soka (Talboys, 1958b; Pegg in Brady, 2002). Z vstopom v prevajalni sistem, prične gliva tvoriti konidiospore, ki se pasivno razširijo iz korenin v stebela s tokom ksilemskega soka v prevajalnem tkivu (Yadeta in Thomma, 2013). Omejevanje kolonizacije v odpornem in občutljivem kultivarju hmelja v času okužbe z *V. nonalfalfae* je začel preučeval Talboys (1958b). Občutljivi kultivarji hmelja ob okužbi z glivo *V. nonalfalfae* sprožijo tvorbo tiloz in snovi za utrjevanje celičnih sten prevajalnega tkiva, medtem ko so bili ti procesi pri odpornih kultivarjih manj intenzivni in zakasneli (Cregeen in sod., 2015; Talboys, 1958a, c). Talboys (1958b) je ugotovil, da je nalaganje lignina na stene epidermalnih celic koreninskega tkiva v stiku z glivo splošni odziv na okužbo z *V. nonalfalfae*, s čimer rastline hmelja otežijo penetracijo hif v prevajalno tkivo. Opazil je, da je ta proces bolj intenziven v občutljivem v primerjavi z odpornim kultivarjem hmelja (Wye Challenger), kjer pa je zaznal intenzivnejše nalaganje suberina v endodermalni plasti, kar bi lahko učinkoviteje omejilo vstop hif v ksilem. Tak fizični odziv lahko vodi v popolno zatesnitev ksilemskih žil in s tem prispeva k venenju in zmanjšani vitalnosti hmelja, vendar pa lahko rastline sprožijo diferenciacijo novega ksilemskega tkiva iz kambija (Fradin in Thomma, 2006; Talboys, 1958a). Pri drugem odpornem kultivarju (Wye Target), ki ga je preučevala Cregeen in sod. (2015), pa ni prišlo do nalaganja suberina, kar je verjetno posledica različnih virov odpornosti (Neve, 1991; Darby, 2001). Razlika med neodpornimi in odpornimi gostiteljskimi rastlinami se kaže v skorajšnji ali popolni odsotnosti kolonizacije ksilema pri odpornih rastlinah, medtem ko do okužbe korteksa pride tako pri neodpornih kot pri odpornih rastlinah (Pegg in Brady, 2002). Že Keyworth (1953) je predpostavil, da igrajo pri odpornosti ključno vlogo obrambni procesi v koreninah, ki preprečijo oziroma omejijo vstop glive v ksilem rastline, kar je dokazal na dva načina. Pri okuževanju stebel neodpornega kultivarja hmelja (Fuggle) z glivo *V. nonalfalfae* je opazil povezavo med količino inokuluma in intenzivnostjo bolezenskih znamenj – ob injiciranju manj koncentrirane suspenzije spor so bili simptomi milejši, kot ob injiciranju bolj koncentrirane suspenzije spor. Nato je v poskusu s cepljenjem stebel neodpornega kultivarja hmelja (Fuggle) na korenine odpornega (OR55, vir odpornosti Y 90) in obratno pokazal, da

so v tem primeru bolezenska znamenja intenzivnejša v stebelu odpornega kultivarja (s koreninami neodpornega), kot v stebelu neodpornega kultivarja (s koreninami odpornega), kar naj bi odražalo različno količino inokuluma, ki doseže stebela skozi koreninski sistem odpornega oz. neodpornega kultivarja (Keyworth, 1953). Tranzicijo glive iz korenin v stebela so pri občutljivem kultivarju za podlagi glivne DNA zaznali 12 dni po inokulaciji (dpi), medtem ko so pri odpornem kultivarju zaznali nizke količine glivne DNA v vseh točkah vzorčenja (1, 3, 6, 12, 15, 18 in 30 dpi) (Kunej in sod., 2020).

## 4.2 Kemični obrambni mehanizmi

Kemični obrambni mehanizmi vključujejo inhibicijo rasti glive in razgradnjo hif s številnimi snovmi s protimikrobnim delovanjem, kot so s patogenezo povezani proteini, fitoaleksini in fenolne snovi (Benhamou, 1995; Daayf in sod., 1997). Sinteza in sproščanje teh snovi spada med splošne odzive rastline na okužbo in je značilna tako za odporne kot za neodporne rastline (Pegg in Brady, 2002). Ob okužbi z *V. nonalfalfae* je značilno povečano izražanje peroksidaz, hitinaz in  $\beta$ -glukanaz, ki igrajo pomembno vlogo pri odstranjevanju glivnih hif iz prevajalnih tkiv (Mandelc in sod., 2013). Fenoli so pri rastlinah prisotni tekom rasti, kjer delujejo kot signalne molekule in modulatorji. Pomembno vlogo pa igrajo tudi pri odzivu na okužbo, kjer pride do sinteze dodatnih fenolov (Cheynier in sod., 2013). Berne in sod. (2020) niso ugotovili korelacije med konstitutivno vsebnostjo fenolov pri različnih kultivarjih hmelja in odpornostjo na *V. nonalfalfae*, so pa ugotovili, da ima odporen kultivar Wye Target v koreninah signifikantno več fenolov v fazi pred cvetenjem, kar bi mu lahko pomagalo pri preprečevanju okužb. Kunej in sod. (2020) so opazovali prisotnost različnih fenolnih skupin v koreninah in steblih odpornega in občutljivega kultivarja hmelja okuženih in neokuženih rastlin in opazili povečane koncentracije flavanolor 3 dpi v koreninah okuženih rastlinah odpornega kultivarja, kar lahko vpliva na preprečevanje nadaljnje infekcije.

## 4.3 Odziv na nivoju ekspresije

Da imajo neodporni kultivarji močnejši splošen odziv na okužbo so s proteomskimi in transkriptomskimi študijami ugotovili različni raziskovalci raziskovalne skupine na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (Mandelc in sod., 2013; Cregeen in sod., 2015; Progar, 2017). Zaradi močnejšega splošnega odziva pri neodpornem kultivarju verjetno pride do zamašitve prevajalnega tkiva. Mandelc in sod. (2013) so pri primerjalnem proteomskem profiliranju korenin odpornega (Wye Target) in neodpornega (Celeia) kultivarja, okuženih z visoko virulentnim patotipom glive, ugotovili, da se v koreninah neodpornih rastlin ob okužbi inducirajo številni obrambni proteini, med njimi hitinaze,  $\beta$ -glukanaze in peroksidaze, medtem ko ob okužbi odpornih rastlin ne pride do večjih sprememb v koreninskem proteomu. Ugotovili so, da so pri neodpornem kultivarju izrazito inducirani geni povezani s

patogenezo (PR proteini) v koreninah. Ker pri odpornem kultivarju niso zaznali nobenih infekcijsko specifičnih sprememb, so sklepali, da gre pri odpornem kultivarju (Wye Target) za konstitutivno obrambo. Cregeen in sod. (2015) tudi na transkriptomskem nivoju poročajo o izrazitem povečanju izražanja s patogenozo povezanih proteinov ob okužbi z glivo *V. nonalfalfae* v neodpornih rastlinah hmelja, medtem ko je bilo za odporne rastline specifično povečano izražanje genov, vpletenih v ubikvitinacijo in vezikularni transport, kar kaže na možno vpletenost teh mehanizmov pri odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja.

V prvi RNA-seq študiji na področju interakcije glive *Verticillium nonalfalfae* in hmelja so Progar in sod. (2017) merili diferencialno izražene gene v odpornem in neodpornem kultivarju v koreninah in nadzemnih delih, ter pogledali, v katere obogatitvene skupine spadajo najdeni geni. Izbrali so 8 kandidatnih genov, ki so jih analizirali s qPCR. Opazili so povišano izražanje dveh genov, ki sta povezana z modifikacijami celične stene. Pri odpornem kultivarju je gen za sintezo kutina kazal znatno povečano izražanje. Kandidatna gena *HICYP86A* (citokrom P450 86A) in *HIGLIP* (lipaza GDSL) spadata med gene, povezane z biosintezo kutina, ki je bila po mrežni analizi sodeč z diferencialno izraženimi geni najbolj obogatena funkcijska skupina v nadzemnih delih odpornega kultivarja. Oba gena sta po okužbi z glivo pokazala znižano izražanje pri obeh kultivarjih, ki je bilo intenzivnejše pri odpornem kultivarju. Tudi pri predhodni transkriptomski raziskavi odziva hmelja na glivo *V. nonalfalfae*, ki so jo izvedli Cregeen in sod. (2015), sta bila med diferencialno izraženimi geni zaznana dva, ki sta povezana z metabolizmom kutina: epoksid hidrolaza, katere izražanje je bilo bolj povišano v odpornem kultivarju, in acil-CoA vezavni protein, katerega izražanje je bilo povišano v odpornem kultivarju, v neodpornem pa se je izražanje po okužbi znižalo.

#### 4.4 RNA interferenca

Kunej in sod. (2021) so preučevali izražanje genov za ključne proteine RNA interference (RNAi) in okarakterizirali diferencialno izražene miRNA v koreninah občutljivega in odpornega kultivarja hmelja 1 in 3 dpi. Oba kultivarja ob okužbi utišata biogenezo ta-siRNA (trans delujoča mala interferenčna RNA), vendar vsak na svoj način. Opazili so visoko ohranjenost izbranih RNAi genov (*AGO*, *DCL* in *RDR*) pri hmelju in njemu sorodnimi vrstami. S študijo izražanja so ugotovili, da je *AGO2* statistično signifikantno različen pri okuženih in neokuženih rastlinah pri obeh kultivarjih 3 dpi, kar lahko doprinese k zmanjšanju ta-siRNA odziva na okužbo. K temu lahko doprinese tudi zmanjšano izražanje *AGO7* pri okuženih rastlinah občutljivega kultivarja hmelja 1 dpi. Gen *RDR6* je kazal znatno znižano izražanje v okuženih koreninah odpornega kultivarja 3 dpi, kar povezujejo s formacijo lateralnih korenin in aktivacijo sekundarnih metabolitov. S študijo miRNA so ugotovili, da je mehanizem odpornosti oziroma tolerance kultivarja Wye Target, verjetno povezan z regulacijo miRNA, ki modulirajo biološke procese vpletene v rast, razvoj in *de novo*

nastajanje korenin in koreninskega prevajalnega tkiva med okužbo z *V. nonalfalfae*. Občutljivi kultivar hmelja kaže spremembe v izražanju miRNA, ki uravnavajo gene vključene v transkripcijsko reprogramiranje, kar vodi v spremembe različnih metabolnih procesov (Kunej in sod., 2021).

## 5 GLIVNI VIRULENTNI DEJAVNIKI

Fitopatogeni mikroorganizmi ob napadu rastlin izločajo različne virulentne dejavnike (efektorje, encime za razgradnjo celične stene ali fitotoksine), s katerimi vplivajo na celično strukturo in celične procese gostitelja z namenom vzpostaviti uspešno kolonizacijo. Efektorji so glivne manjše molekule brez značilnih proteinskih struktur, ki se izražajo v rastlinah (Jones in Dangl, 2006).

### 5.1 Kandidatni efektorji glive *V. nonalfalfae*

V okviru raziskovalne skupine na Biotehniški fakulteti so tekom različnih raziskav našli nekaj kandidatnih efektorjev, in sicer 2 proteina iz ksilemskega soka (Mandelc, 2010), protein z domeno za vezavo hitina (CBD) najden v transkriptomu hmelja (Cregeen in sod., 2015), 8 naključno izbranih proteinov iz letalno specifične regije (Flajšman, 2016) in 5 kandidatnih efektorjev izbranih z bioinformacijskimi orodji (Marton in sod., 2018). Cregeen in sod. (2015) so v transkriptomu hmelja identificirali tri glivne gene, med katerimi je CBD kazal zelo visoko ekspresijo v občutljivem kultivarju (Celeia), zato je bil uvrščen med potencialne glivne efektorje (Volk in sod., 2019). Kljub temu, da mutanta z delecijo v genu za ta protein ni kazala manjše virulence, je bilo ugotovljeno (Flajšman in sod., 2016), da ima sposobnost vezave hitina, in po okužbi v rastlini glivo zaščiti pred rastlinskimi hitinazami (Volk in sod., 2019). Flajšman in sod. (2016) so v študiji z mutantami poleg encima lignin-peroksidaza (VnaPRX1.1277) poročali tudi o prvem majhnem sekretornem proteinu pri vrsti *V. nonalfalfae* (VnaSSP4.2), ki ima efektorjem podobne strukturne lastnosti in je udeležen v virulenci glive. Gena se ne nahajata samo v visoko virulentnem patotipu, ampak se homologa nahaja tudi v manj virulentnem patotipu *V. nonalfalfae*, kar pomeni, da gena nista patotip specifična znotraj vrste *V. nonalfalfae*. Za VnaSSP4.2 so nadaljnji poskusi pokazali, da ob vezavi z lipidom v rastlinski membrani tvori pore in omogoča vstop drugim efektorjem (Volk in sod., 2016; Javornik, 2019).

### 5.1 Regulacija patogenosti z RNA interferenco

Prve raziskave s področja RNAi pri *V. nonalfalfae* so bile narejene v okviru doktorske naloge Jeseničnik (2020), kjer so zabeležili povečano izražanje komponent RNAi v steblih odpornega in občutljivega kultivarja hmelja, ki predstavljajo okolje, kjer se gliva aktivno razrašča po rastlini. Le-to podpira domnevo, da je mehanizem RNAi eden izmed akterjev patogenosti visoko

virulentnega patotipa glive. Okarakterizirali so mehanizem RNAi pri glivi *V. nonalfalfae* z identifikacijo ključnih komponent sinteze malih in miRNA (mikro molekulam RNA podobne RNA) ter komponente utišanja tarčnih genov. Potrdili so obstoj in izražanje dveh proteinov RdRP, dveh DCL in dveh AGO (Jeseničnik in sod., 2019). Nadaljnje so identificirali ter potrdili izražanje devetih miRNA glive ter potrdili aktivnost mehanizma RNAi z eksperimentalno analizo razreza tarčnih mRNA, napovedanih v anotiranem genomu glive (Jeseničnik in sod., 2022).

RNAi posredovano izražanje genov lahko poteka tudi med različnimi kraljestvi organizmov, kar je bilo ugotovljeno tudi pri interakciji *V. nonalfalfae* in hmelja. Jeseničnik in sod. (2019) so preverjali izražanje glivnih RNAi genov v koreninah in steblih okuženih rastlin in opazili večje izražanje glivnih RNAi genov v steblih odpornega in občutljivega genotipa. Sklepajo, da visoko virulentni patotip sintetizira sRNA ter jih verjetno kot efektorje transportira v rastlino, kjer vplivajo na obrambne mehanizme rastline. Devet identificiranih in potrjenih miRNA ima več kot 600 predpostavljenih tarč v genomu hmelja.

## 6 ISKANJE MARKERSKIH GENOV ZA ODPORNOST

### 6.1 Viri odpornosti

V hmelju sta znana dva izhodiščna vira odpornosti, in sicer iz dveh ameriških divjih genotipov hmelja podvrste *H. lupulus* var. *neomexicanus* z oznakama Y 90 in AA 7 (Darby, 2001). Za vir odpornosti iz genotipa Y 90 je bilo ob analizi stopnje odpornosti potomcev ocenjeno, da gre za aditivni genski učinek oziroma za poligensko lastnost, ki je zato manj zanimiva za nadaljnje žlahtnjenje. Pri viru odpornosti iz genotipa AA 7, ki je bil uporabljen pri žlahtnjenju kultivarja Wye Target in celotnem nadaljnjem angleškem programu žlahtnjenja hmelja, pa je bilo na podlagi analize segregacijskih razmerij potomcev križanja določeno, da odpornost temelji na delovanju dveh komplementarnih dominantnih genov, kar potrjuje tudi relativno konstanten nivo odpornosti skozi več generacij potomcev (Darby, 2001). V Sloveniji je drugi najbolj razširjen kultivar, ki se prideluje na 27 % vseh hmeljišč Celeia, ki je zelo občutljiv kultivar. Med novejšimi kultivarji so na *V. nonalfalfae* odporni Styrian Gold, Styrian Eureka, Styrian Eagle in Styrian Dragon, ki se iz tržnih razlogov gojijo le na manjšem deležu površin (Čerenak in sod., 2022).

### 6.2 Segregacija odpornosti pri potomcih

Leta 2013 je bila pri hmelju opravljena genetska raziskava vira odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja na F1 generaciji potomcev križanja odpornega kultivarja Wye Target (vir odpornosti AA 7) in neodpornega moškega genotipa hmelja BL2/1, pri kateri je bila ocenjena stopnja bolezenskih znamenj in izvedeno kartiranje kvantitativnih lokusov (QTL, ang. *quantitative trait locus*; Jakše in sod., 2013). Na

ta način je bila identificirana pomembna QTL regija, povezana z odpornostjo na verticilijsko uvelost hmelja, ki pojasnjuje med 24,2 in 26,0 % fenotipske variabilnosti bolezenskih znamenj in potrjuje delovanje več kot enega gena. Pri tem sicer ni znano, koliko genov je zajetih v omenjeni QTL regiji, a segregacijska analiza F1 generacije križanja je bila skladna z omenjenim Darbyjevim modelom delovanja dveh komplementarnih dominantnih genov in kaže na verjetno vključenost vsaj enega od genov v omenjeni QTL regiji (Jakše in sod., 2013; Darby, 2001).

### 6.3 Kandidati za odpornostne gene

Analogi R genov (RGA – *R gene analogues*), so kandidati za odpornostne gene, ki imajo ohranjene domene in igrajo pomembno vlogo pri odpornosti na patogene (Kumar Sekhwal in sod., 2015). Pri hmelju je bilo izvedeno RGA profiliranje, v katerem je bilo odkritih 17 skupin RGA (Kozjak in sod., 2009). Proizvedena sta bila dva molekularna označevalca, ki sta segregirala za družino križanja in v kateri segregira tudi odpornost na verticilijsko uvelost hmelja (Wye Target x 2/1). Kmalu zatem so transkriptomski projekti omogočili prost dostop do okrog 10 000 hmeljnih oznak izražene zaporedja (EST, angl.: *expressed sequence tag*; Nagel in sod., 2008) za izvedbo iskanja EST-RGA s pristopom kandidatnega gena (Majer, 2014). V tej raziskavi sta bila odkrita dva homologa gena *Ve1* iz krompirja, *HLVe1-1* in *HLVe1-2*, ki nosita zapis za membranska receptorska proteina z zunaj-celično LRR domeno; takšni receptorji so tipični za prepoznavo efektorskih proteinov. *HLVe1-1* se deduje dominantno, zato ne more predstavljati vira odpornosti, saj so potomci različno odporni na *V. nonalfalfae*. Za *HLVe1-2* so opazili običajno Mendelsko segregacijo dveh funkcionalnih alelnih oblik (*HLVe1-2A* in *HLVe1-2B*) pri potomstvu križanja, kjer so potomci z alelom *HLVe1-2A* bili bolj odporni kot prejemniki drugega alela (Majer, 2014). V koekspresijskem poskusu v tobaku je bila ugotovljena interakcija med *HLVe1-2A* in glivnim efektorjem *Ave1* (Song in sod., 2017). Kljub temu, da hmelj vsebuje funkcionalni homolog *Ve1*, pa le-ta najverjetneje ni vključen v obrambo hmelja pred glivo *V. nonalfalfae*, saj v sevih, ki okužujejo hmelj, ni bilo mogoče najti zaporedij gena za efektor *Ave1* (Progar, 2016).

## 7 ZAKLJUČEK

Pojav simptomov bolezni je pogojen z interakcijo rastline, patogena in okoljskih dejavnikov (Agrios, 2005). Interakcije med rastlinami in mikrobi so na molekularni ravni zelo kompleksne in kažejo na dolgotrajno koevolucijo obeh vpletenih (Dangl in Jones, 2001; Chisholm in sod., 2006; Zeillinger, 2016). Skupna lastnost bolezni, ki jih povzročajo talne glive, je predvsem pogosta neuspešnost zdravljenja okuženih rastlin, ter njihovo dolgotrajno ohranjanje v tleh v obliki trajnih organov (Radišek in Razinger, 2019).



Glavni dejavniki, ki omejujejo pridelavo hmelja na številnih hmeljiščih po svetu, so različni povzročitelji bolezni, od katerih največ škode povzročajo hmeljeva pepelovka, hmeljeva peronospora, viroidi ter glive iz rodu *Verticillium* sensu stricto, ki povzročajo verticilijsko uvelost hmelja (Neve, 1991; Radišek in sod., 2006). Interakcija med *V. nonalfalfae* in hmeljem je predmet raziskav na področju hmeljarstva že od leta 1953 (Keyworth, 1953) in je aktualna še danes, saj visoko virulentni patotipi glive povzročajo veliko gospodarsko škodo po hmeljiščih v Angliji, Nemčiji, Sloveniji, Češki in Belgiji.

Številne študije izražanja genov niso dale jasnih odgovor, so pa potrdile, da je odziv pri občutljivem kultivarju močnejši kot pri odpornem (Mandelc in sod., 2013; Cregeen in sod., 2015; Progar, 2017). Pri odpornem kultivarju so zaznali povečano izražanje genov, ki sodelujejo v metabolizmu proteinov (Cregeen in sod., 2015). Študije na nivoju RNAi odzivov na okužbo niso podale jasnih odgovorov. Iz dela Kunej in sod. (2021) lahko domnevamo, da je mehanizem odpornosti, opažen pri kultivarju Wye Target, verjetno povezan z regulacijo miRNA, ki modulirajo biološke procese vpletene v rast, razvoj in *de novo* nastajanje korenin in koreninskega prevajalnega tkiva med okužbo z *V. nonalfalfae*. Občutljivi kultivar hmelja kaže spremembe v izražanju miRNA, ki uravnavajo gene vključene v transkripcijsko reprogramiranje, kar vodi v spremembe v različnih metabolnih procesih. Primer znanega mehanizma odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja je receptor Ve1 iz paradižnika, ki prepoznava efektorski protein Ave1 iz glive *V. dahliae* (Song in sod., 2017) in čeprav je bil homolog *Ve1* najden tudi v hmelju, gliva *V. nonalfalfae*, ki okužuje hmelj, ne vsebuje efektorja Ave1, zato mora biti mehanizem odpornosti tu drugačen. Najden kvantitativni lokus pri segregacijski analizi potomcev križanja odpornega in neodpornega genotipa hmelja v generaciji F1 pojasnjuje 24–26 % fenotipske variabilnosti odpornosti na glivo *V. nonalfalfae* (Jakše in sod., 2013), kar ustreza modelu delovanja dveh dominantnih komplementarnih genov, kar je na dveh drugih družinah potomcev ugotovil že Darby (2001).

Analize flavanolov v okuženih rastlinah so pokazale njihovo akumulacijo v koreninah odpornega kultivarja hmelja v zgodnjih fazah okužbe, kar nakazuje na morebitno vlogo le-teh pri omejevanju širjenja glive *V. nonalfalfae* v stebelno tkivo (Kunej in sod., 2020).

Pri študijah glivnih efektorjev sta najbolj izstopala gena *VnaPRX1.1277* in *VnaSSP4.2*, najdena pri visoko virulentnem in manj virulentnem patotipu, katerih izbitje je imelo vidne učinke na virulenco patogena (Flajšman, 2016). Kljub temu, da je bilo dokazano, da ima efektor CBD sposobnost vezave hitina in po okužbi v rastlini glivo zaščiti pred rastlinskimi hitinazami (Volk in sod., 2019), ne spremeni virulentnosti glive (Flajšman, 2016).

Velika izraženost glivnih RNAi komponent je pokazala, da je mehanizem RNAi verjetno eden izmed virov patogenosti glive *V. nonalfalfae*, ki glivi omogoča uspešno okuževanje ter kolonizacijo gostiteljske rastline hmelja (Jeseničnik in sod., 2019, 2022). Biološke poti, katerim pripadajo predpostavljene tarče v transkriptomu hmelja, skupaj z ravnmi izražanja komponent RNAi v okuženem hmelju ter zastopanostjo molekul miRNA po patotipih in tkivih, podpirajo dejstvo, da bi gliva *V. nonalfalfae* lahko sintetizirala sRNA oziroma miRNA ter jih transportirala v gostitelja po tako imenovanem modelu prenosa signalov RNAi med kraljestvi. Za potrditev tarč pri glivi in hmelju pa bi bilo potrebno narediti še raziskave z mutantami.

Zatiranje povzročiteljev verticilijske uvelosti hmelja je zelo težavno, predvsem zaradi dolgoživosti spor in melaniziranega micelija v tleh, zaradi širokega spektra gostiteljskih rastlin in zaradi neučinkovitosti fungicidov na delovanje patogena, ko se ta že nahaja v rastlini. Raziskave s področja interakcije predstavljajo pot do poznavanja mehanizmov, ki so ključni za uspešno obrambo hmelja pred glivo *V. nonalfalfae*. Poznavanje teh ne omogoča le razvoj fitofarmaceutskih sredstev, temveč tudi hitrejšo selekcijo z genetskimi markerji v smeri žlahtnjenja za odpornost na verticilijsko uvelost hmelja. Kljub mnogim raziskavam, ki so bile narejene v opisanih študijah, še vedno nismo uspeli najti ključnih elementov za obrambo pri odpornih kultivarjih. Verticilijska uvelost hmelja je bolezen, ki še vedno ogroža pridelavo hmelja, zato je sajenje odpornih kultivarjev ključno. V žlahtnjenju hmelja se še vedno uporabljajo testi z umetnim okuževanjem, ki jih izvajamo na kandidatnih genotipih, ki pa so dolgotrajni in delovno zahtevni. S prihodom novih generacij sekvenciranja in boljšega poznavanja genoma obeh vpletenih organizmov ciljamo na najdbo ključnih markerjev.

## 8 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujejo prof. dr. Kristini Gruden in dr. Sebastjanu Radišku za pregled članka.

## 9 LITERATURA

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology 5th Edition. *San Diego: Academic Press*, 922. [https://books.google.com/books/about/Plant\\_Pathology.html?hl=sl&id=CnzbGZgby60C](https://books.google.com/books/about/Plant_Pathology.html?hl=sl&id=CnzbGZgby60C)
- Anderson, J. P., Gleason, C. A., Foley, R. C., Thrall B, P. H., Burdon, J. B., & Singh, K. B. (2010). *Plants versus pathogens: an evolutionary arms race*. <https://doi.org/10.1071/FP09304>
- Benhamou, N. (1995). Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with Verticillium-infected xylem vessels. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46(4), 321–338. <https://doi.org/10.1006/PMPP.1995.1025>

- Berlanger, I., & Powelson, M. L. (2000). Verticillium wilt. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-0801-01>
- Berne, S., Kovačević, N., Kastelec, D., Javornik, B., & Radišek, S. (2020). Hop Polyphenols in Relation to Verticillium Wilt Resistance and Their Antifungal Activity. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1318, 9(10), 1318. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9101318>
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). *Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI)*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Buscot, F., Munch, J. C., Charcosset, J. Y., Gardes, M., Nehls, U., & Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 601–614. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2000.TB00561.X>
- Chen, J. Y., Xiao, H. L., Gui, Y. J., Zhang, D. D., Li, L., Bao, Y. M., & Dai, X. F. (2016). Characterization of the Verticillium dahliae exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. *Frontiers in Microbiology*, 1709. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01709>
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). *Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4), 803–814. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.008>
- Cregeen, S., Radisek, S., Mandelc, S., Turk, B., Stajner, N., Jakse, J., & Javornik, B. (2015). Different Gene Expressions of Resistant and Susceptible Hop Cultivars in Response to Infection with a Highly Aggressive Strain of Verticillium albo-atrum. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 689–704. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0767-4>
- Čerenak, A., Oset Luskar, M., Luskar, L., Radišek, S., Rutnik, K., Ocvirk, M., Košir, I. J. (2022). Hop breeding in Slovenia – influence of storage on hop quality. *Proceedings of the Scientific-Technical Commission*. IHGC, Galicija, Španija. 18.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A., & Geiger, J. P. (1997). Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of Verticillium dahliae. *European Journal of Plant Pathology* 1997 103:2, 103(2), 125–136. <https://doi.org/10.1023/A:1008620410471>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). *defence responses to infection*. 411(June).
- de Wit, P. J. G. M., Mehrabi, R., van den Burg, H. A., & Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 735–747. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00591.X>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 2010 11:8, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dolar, M., Simoncic, A. (1999). Verticillium albo-atrum Reinke at Berthold and Verticillium dahliae Klebahn in Slovenia. *Lectures and Papers presented at 4th Slovenian Conference on Plant Protection*. Macek, J. (Ed.) (Ljubljana Univ. (Slovenia) Biotechnical Fac., Agronomy Dept).- Ljubljana
- Darby, P. (2001). Single gene traits in hop breeding. *Proceedings of the Scientific Commission IHGC*. Kent, England.76–81.
- Flajšman, M. (2016). Določanje virulentnih dejavnikov fitopatogene glive Verticillium albo-atrum z mutacijsko analizo : doktorska disertacija.

- Flajsman, M., Mandelc, S., Radisek, S., Stajner, N., Jakse, J., Kosmelj, K., & Javornik, B. (2016). Identification of novel virulence-associated proteins secreted to xylem by *Verticillium nonalfalfae* during colonization of hop plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(5), 362–373.
- Fradin, E. F., & Thomma, B. P. H. J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7(2), 71–86. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2006.00323.X>
- Gao, Y., Wang, W., Zhang, T., Gong, Z., Zhao, H., & Han, G. Z. (2018). Out of Water: The Origin and Early Diversification of Plant R-Genes. *Plant Physiology*, 177(1), 82–89. <https://doi.org/10.1104/PP.18.00185>
- Gust, A. A., Pruitt, R., & Nürnberger, T. (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science*, 22(9), 779–791. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.005>
- Harris R. V. (1927). A wilt disease of hops. East Malling Research Station. Annual Report for 1925, II Supplement: 92-93
- Humphreys, C. P., Franks, P. J., Rees, M., Bidartondo, M. I., Leake, J. R., & Beerling, D. J. (2010). Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications* 2010 1:1, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms1105>
- Inderbitzin P., Bostock R. M., Davis R. M., Usami T., Platt H. W., Subbarao K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE*, 6, 12: e28341, doi: 10.1371/journal.pone.0028341: 21 str.
- Javornik B. (2019). Genetske raziskave hmelja in njegovih škodljivih organizmov v Sloveniji – pogled nazaj. *Hmeljarski bilten*, 26: 5–22
- Jakse, J., Cerenak, A., Radisek, S., Satovic, Z., Luthar, Z., & Javornik, B. (2013). Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(6), 1431–1443. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2062-4>
- Jeseničnik, T., Štajner, N., Radišek, S., & Jakše, J. (2019). RNA interference core components identified and characterised in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44494-8>
- Jeseničnik, T., Identifikacija in opis malih molekul RNA pri fitopatogeni glivi *Verticillium nonalfalfae*: doktorska disertacija.
- JH, D. (2015). An Overview of Plant Immunity. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6(11). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000322>
- Jeseničnik, T., Štajner, N., Radišek, S., Mishra, A.K., Košmelj, K., Kunej, U., Jakše, J. (2022) Discovery of microRNA-like Small RNAs in Pathogenic Plant Fungus *Verticillium nonalfalfae* Using High-Throughput Sequencing and qPCR and RLM-RACE Validation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2):900. <https://doi.org/10.3390/ijms23020900> (14. 11. 2022)
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 2006 444:7117, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/NATURE05286>
- Kasson, M. T., Short, D. P. G., O'Neal, E. S., Subbarao, K. V., & Davis, D. D. (2014). Comparative pathogenicity, biocontrol efficacy, and multilocus sequence typing of *Verticillium nonalfalfae* from the invasive *Ailanthus altissima* and other hosts. *Phytopathology*, 104(3), 282-292.

- Keyworth, W. G. (1953). Verticillium Wilt Of The Hop. *Annals of Applied Biology*, 40(2), 344–361. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1953.TB01087.X>
- Keyworth, W. G., & Hewitt, E. J. (1948). Verticillium Wilt of the Hop (*Humulus Lupulus*) V. The Influence of Nutrition on the Reaction of the Hop Plant to Infection with Verticillium Albo-Atrum. *Journal of Horticultural Science*, 24(4), 219–227. <https://doi.org/10.1080/00221589.1948.11513692>
- Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity, and management of Verticillium species. *Annual review of phytopathology*, 47, 39–62.
- Kozjak, P., Jakše, J., & Javornik, B. (2009). Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogues from hop *Humulus lupulus* L. *Plant Science*, 176(6), 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.021>
- Kunej, U., Jakše, J., Radišek, S., & Štajner, N. (2021). Identification and Characterization of Verticillium nonalfalfae-Responsive MicroRNAs in the Roots of Resistant and Susceptible Hop Cultivars. *Plants 2021, Vol. 10, Page 1883*, 10(9), 1883. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10091883>
- Kunej, U., Mikulič-Petkovšek, M., Radišek, S., & Štajner, N. (2020). Changes in the Phenolic Compounds of Hop (*Humulus lupulus* L.) Induced by Infection with Verticillium nonalfalfae, the Causal Agent of Hop Verticillium Wilt. *Plants 2020, Vol. 9, Page 841*, 9(7), 841. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9070841>
- Majer, A. (2014). Identifikacija genov za odpornost na hmeljevo uvelost: doktorska disertacija.
- Mandelc, S., Radisek, S., Jamnik, P., & Javornik, B. (2009). Comparison of mycelial proteomes of two Verticillium albo-atrum pathotypes from hop. *European journal of plant pathology*, 125(1), 159–171
- Mandelc, S. (2010). Proteomska analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) in diferencialno izraženih proteinov v hmelju po okužbi s patotipom PG2 *Verticillium albo-atrum*: doktorska disertacija.
- Mandelc, S., Timperman, I., Radišek, S., Devreese, B., Samyn, B., & Javornik, B. (2013). Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 68, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.017>
- Marton, K., Flajsman, M., Radisek, S., Kosmelj, K., Jakse, J., Javornik, B., & Berne, S. (2018). Comprehensive analysis of Verticillium nonalfalfae in silico secretome uncovers putative effector proteins expressed during hop invasion. *PLOS ONE*, 13(6), e0198971. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198971>
- Nagel, J., Culley, L. K., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P. D., Stevens, J. F., & Page, J. E. (2008). EST Analysis of Hop Glandular Trichomes Identifies an O-Methyltransferase That Catalyzes the Biosynthesis of Xanthohumol. *The Plant Cell*, 20(1), 186–200. <https://doi.org/10.1105/TPC.107.055178>
- Neve R. A. 1991. Hops. London, *Chapman and Hall*: 266 str.
- Pegg, G. F., Brady, B. L. (2002). Verticillium wilts. *Wallingford (Oxon)*; New York, CABI Pub: 552.
- Pegg, G. F., & Street, P. F. S. (1984). Measurement of Verticillium albo-atrum in high and low resistance hop cultivars. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 99–106. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(84\)80216-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(84)80216-8)

- Progar, V., Transkriptomaska analiza genov hmelja (*Humulus lupulus* L.) po okužbi s fitopatogeno glivo *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold: doktorska disertacija.
- Progar, V., Jakše, J., Štajner, N., Radišek, S., Javornik, B., & Berne, S. (2017). Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports*, 36(10), 1599–1613. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2177-1>
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2003. Identifikacija dveh patotipov glive *Verticillium albo-atrum* na hmelju z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. V: *Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče*, 4.-6. marec 2003. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 107–111
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2004. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*, 88: 1115–1122
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 301–314
- Radišek S., Javornik B. 2011. Taksonomija in variabilnost fitopatogenih vrst gliv iz rodu *Verticillium*. *Hmeljarski bilten*, 18: 41–55
- Radišek S., Razingar J. 2019. Preiskusanje biotičnih pripravkov za zatiranje verticilijske uvelosti in fuzarijskih obolenj paradižnika. *Hmeljarski bilten*, 26: 176–187
- Sekhwil, M. K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S., & You, F. M. (2015). Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19248. <https://doi.org/10.3390/IJMS160819248>
- Sewell, G. W. F., & Wilson, J. F. (1964). Occurrence and Dispersal of *Verticillium Conidia* in Xylem Sap of the Hop (*Humulus lupulus* L.). *Nature* 1964 204:4961, 204(4961), 901–901. <https://doi.org/10.1038/204901a0>
- Snyder, A. L., Salom, S. M., & Kok, L. T. (2014). Survey of *Verticillium nonalfalfae* (Phyllachorales) on tree-of-heaven in the southeastern USA. *Biocontrol Science and Technology*, 24(3), 303-314.
- Song, Y., Zhang, Z., Seidl, M. F., Majer, A., Jakse, J., Javornik, B., & Thomma, B. P. H. J. (2017). Broad taxonomic characterization of *Verticillium* wilt resistance genes reveals an ancient origin of the tomato Ve1 immune receptor. *Molecular Plant Pathology*, 18(2), 195–209. <https://doi.org/10.1111/mpp.12390>
- Talboys P. W. (1958a). Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transaction of the British Mycological Society*, 41: 249-260
- Talboys P. W. (1958b). Some mechanisms contributing to *Verticillium*-resistance in the hop root. *Transactions of the British Mycological Society*, 41, 2: 227-241
- Talboys P. W. (1958c). Degradation of cellulose by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 41, 2: 242-248
- Talboys P. W. (1972). Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 181(1064), 319–332. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1972.0053>
- Talboys P. W. (1987). *Verticillium* wilt in English hops - Retrospect and prospect. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 9, 1: 68-77
- Volk, H., Marton, K., Flajšman, M., Radišek, S., Tian, H., Hein, I., Podlipnik, Č., Thomma, B. P. H. J., Košmelj, K., Javornik, B., & Berne, S. (2019). Chitin-Binding Protein of *Verticillium nonalfalfae* Disguises Fungus from Plant Chitinases and Suppresses Chitin-Triggered Host Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(10), 1378–1390.

- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., & Qing Fu, Z. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, 5(7), 710–721. <https://doi.org/10.4161/viru.29755>
- Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. H. J. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4(APR), 97. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00097/BIBTEX>
- Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M., & Yang, Q. (2013). Identification of MiRNA from Eggplant (*Solanum melongena* L.) by Small RNA Deep Sequencing and Their Response to *Verticillium dahliae* Infection. *PLOS ONE*, 8(8), e72840. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072840>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, V., Kin, C., Tsui, M., & Nayak, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 045, 182–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W. C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H. da, Raikhel, N., & Jin, H. (2011). Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393\*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene MEMB12. *Molecular Cell*, 42(3), 356. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.04.010>

**VZPOSTAVITEV METODE IZOLACIJE PROTOPLASTOV PRI HMELJU**  
**(*Humulus lupulus* L.)**Ester STAJIČ<sup>1</sup>, Petra KUNC<sup>2</sup> in Urban KUNEJ<sup>3</sup>

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 10. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 22 10. 2022

**Izveleček**

Učinkovit protokol izolacije protoplastov je glavni pogoj za razvoj metod transformacije protoplastov, ki imajo široko uporabnost, od bazičnih študij funkcij genov do regeneracije transformiranih rastlin s spremenjenimi lastnostmi. Pri hmelju je takšnih protokolov zelo malo. Z namenom vzpostavitve metode izolacije protoplastov pri hmelju smo preizkusili različna gojišča za rast v tkivni kulturi. Na gojišču brez hormonov je bila ta najhitrejša, listi so bili lepo razviti in primerni za izolacijo protoplastov. Z optimizacijo sestave encimske mešanice smo pri sorti Celeia dosegli visok donos ( $8,0 \times 10^5$  protoplastov na g tkiva) in (86 %) živost izoliranih protoplastov. Vzpostavljen protokol se je izkazal za primerne tudi za izolacijo protoplastov pri drugih slovenskih sortah hmelja, pri čemer smo med uporabljenimi sortami opazili razlike v donosu in v živosti izoliranih protoplastov. Poročamo o prvem protokolu za izolacijo protoplastov iz listov hmelja, ki bo omogočala številne nadaljnje aplikacije za zlahtnjenje hmelja.

**Ključne besede:** hmelj, protoplasti, protokol, izolacija

**ESTABLISHMENT OF PROTOPLAST ISOLATION METHOD FOR HOP**  
**(*Humulus lupulus* L.)****Abstract**

An efficient protoplast isolation protocol is the main requirement for development of protoplast transformation methods that have wide applicability, from basic studies of gene functions to the regeneration of transformed plants with modified characteristics. Very few such protocols exist for hop. In order to establish a method for the isolation of protoplasts for hop, we tested different media for growth in tissue culture. On the hormone-free medium, growth was fastest and leaves were well developed and suitable for protoplast isolation. By optimizing the composition of the enzyme mixture, we achieved high yield ( $8.0 \times 10^5$  protoplasts per g of leaves) and

<sup>1</sup> Asist. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (UL BF), Oddelek za agronomijo, e-naslov: ester.stajic@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Mag. inž. hort., UL BF, e-naslov: petra.kunc@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Asist. dr., UL BF, e-naslov: urban.kunej@bf.uni-lj.si



(86 %) viability of the isolated protoplasts in the Celeia cultivar. The established protocol also proved to be suitable for the isolation of protoplasts from other Slovenian hop cultivars, although we observed differences in yield and viability of isolated protoplasts between the cultivars used. We report the first protocol for isolation of protoplasts from hop leaves, which will enable many further applications for hop breeding.

**Key words:** hop, protoplasts, protocol, isolation

## 1 UVOD

Žlahtnjenje novih sort s klasičnimi metodami vnašanja novih lastnosti je dolgotrajen postopek. Nove biotehnoške metode, kot so tehnike preurejanja genoma (angl. genome editing), bi lahko s tarčnim spreminjanjem genov ta proces pospešile (Reed in Bargmann, 2021). Ključno pri vzpostavljanju metod tarčnega preurejanja je razvoj enostavnega in hitrega sistema za testiranje učinkovitosti vektorjev. V ta namen lahko uporabimo protoplaste, rastlinske celice brez celične stene, pri katerih je zaradi odstranjene celične stene vnos DNA, RNA in proteinov veliko enostavnejši (Nadakuduti in sod., 2019). Transformacija protoplastov je primerna tudi za *in vivo* funkcijske študije, preučevanje interakcij med proteini in določanje njihove lokalizacije znotraj celic (Priyadarshani in sod., 2018).

Pri rastlinah je celična stena sestavljena iz mešanice celuloze, hemiceluloze, pektina, beljakovin in lipidov. Za pridobivanje protoplastov je zato celično steno potrebno odstraniti z mešanico encimov, ki razgrajujejo celično steno in vsebujejo celuloze, hemiceluloze in pektinaze. Za optimalno razgradnjo je glede na rastlinsko vrsto in izvorno tkivo potrebno določiti najbolj učinkovito kombinacijo in koncentracijo encimov (Naing in sod., 2021). Na uspešnost izolacije protoplastov poleg sestave encimske mešanice pomembno vplivajo tudi drugi dejavniki, kot je fiziološko stanje donorskih rastlin, izbira osmotika in način čiščenja izoliranih protoplastov (Navrátilová, 2004).

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je pomembna kmetijska rastlina, katere storžki ženskih rastlin se uporabljajo v pivovarski industriji, zaradi številnih bioaktivnih komponent pa je hmelj uporaben tudi v farmaciji in medicini (Hrnčič in sod., 2019). Pridelava hmelja ima v Sloveniji dolgoletno tradicijo, zato je žlahtnjenje lastnih sort izrednega pomena. Kljub pomembnosti hmelja je do sedaj edini objavljen protokol za izolacijo protoplastov iz leta 1987 (Furze in sod., 1987), kjer so protoplaste izolirali iz suspenzijskih celic, medtem ko protokol za izolacijo protoplastov iz listov hmelja še ni bil objavljen. V raziskavi smo najprej želeli optimizirati rast hmelja v tkivni kulturi za izolacijo protoplastov in preizkusiti različne encimske mešanice, ki bi omogočale visok donos živih protoplastov. Najbolj primerno encimsko mešanico smo nato preizkusili še na različnih sortah hmelja.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Rastlinski material

V poskusih izolacije protoplastov smo uporabili *in vitro* gojene rastline hmelja sort Atlas, Blisk, Celeia, Cicero, Wye Target, Styrian Eureka in Styrian Gold, ki smo jih pridobili od Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Aseptične kulture smo vzdrževali s subkultivacijo nodijev na gojišču MS (Murashige in Skoog, 1962) z vitamini in dodano saharozo 30 g/l ter agarjem 8 g/l; pH 5,8. Rastline smo gojili v rastni komori pri 16/8 urni fotoperiodi in  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Optimizacija rasti v *in vitro* pogojih

Da bi optimizirali rast rastlin hmelja v tkivni kulturi in pridobili čim večje število rastlin z lepo razviti listi, primernimi za izolacijo protoplastov, smo nodije inokulirali na tri različna trdna gojišča:

- gojišče 1 – MS gojišče z vitamini in 20 g/l glukoze
- gojišče 2 – MS gojišče z vitamini, 20 g/l glukoze in 1 mg/l BAP
- gojišče 3 – MS gojišče z vitamini, 20 g/l glukoze, 0,5 mg/l TDZ in 0,1 mg/l IAA

Na vsako gojišče smo inokulirali 16 nodijev sorte Celeia in po 6 (Termin 1) ter 8 tednih (Termin 2) izmerili višino rastlin, ocenili razvitost listov in pojav nezaželenih lastnosti, kot sta kalus in vitrifikacija tkiva. Za ugotavljanje vpliva obeh preučevanih faktorjev, t.j. vpliv gojišča in termina na velikost rastlin smo izvedli smiselne primerjave med skupinami obeh faktorjev ter pridobili koeficiente razlik med skupinami ter prilagojene *p*-vrednosti.

### 2.3 Protokol za izolacijo protoplastov

Za izolacijo protoplastov smo sledili protokolu Kiełkowske in Adamus (2012) in najprej primerjali uspešnost izolacije s šestimi različnimi encimskimi raztopinami pri sorti Celeia, nato pa smo najbolj učinkovito encimsko mešanico uporabili za izolacijo protoplastov pri različnih sortah (Atlas, Blisk, Cicero, Wye Target, Styrian Eureka in Styrian Gold). Uspešnost izolacije protoplastov smo vrednotili s štetjem izoliranih protoplastov in barvanjem z barvilom fluorescein diacetat (FDA), s katerim smo določili njihovo živost. Za vsak poskus smo naredili tri ponovitve in izvedli statistično analizo na smiselnih primerjavah za oceno vpliva koncentracije macerocima in celulaze na donos in živost protoplastov ter s Tukey-evim testom mnogoterih primerjav ugotavljali razlike med posameznimi sortami.

Prvi korak pri izolaciji protoplastov je bila priprava listov za izolacijo. Uporabili smo 0,4 g listov rastlin hmelja, ki so rastle v tkivni kulturi vsaj 8 tednov. Liste smo sterilno

prenesli v petrijevko in jih ob prisotnosti 0,4 M manitola (pH 5,8) razrezali. Petrijevke smo inkubirali v temi 1 uro na 25 °C in stresanjem 30 obr./min. Nato smo tekočino odpipetirali in dodali 8 ml encimske raztopine z 1,5 %, 2,0 % ali 2,5 % celulozo (Cellulase Onozuka R-10), 0,5 % ali 0,7 % macerocimom (Macerozyme R-10) v 20 mM MES (pH 5,7) z 10 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 20mM KCl in 0,4 M manitolom. Sledila je prekonočna inkubacija (16 ur) v temi na 25 °C in stresanjem 30 obr./min.

Naslednji dan smo v vsako petrijevko dodali 2 ml raztopine W5 (Menczel in sod., 1981), s 5 ml nastavkom za pipete premešali in vsebino najprej precedilo skozi cedilo, nato pa čez 40 µm najlonske filtre. Nerazgrajeni rastlinski material smo vrnili v petrijevko in spiranje ponovili z 10 ml raztopine W5 in tekočino precedili. Sledilo je centrifugiranje pri 900 obr./min 5 min, nato smo tekočino odpipetirali in pelet protoplastov resuspendirali v 4 ml raztopine za flotacijo (0,5 M saharoza, 1 mM MES; pH 5,8). Protoplaste obeh spiranj smo združili v eno centrifugirko in previdno dodali 2 ml raztopine W5, tako da se vsebina ni zmešala. Po centrifugiranju (10 min pri 1100 obr./min) so se živi in nepoškodovani protoplasti nahajali med obema raztopinama. Te smo prenesli v novo centrifugirko in jih sprali z 10 ml raztopine W5. Pelet smo resuspendirali v enaki raztopini in odvzeli 10 µl za vrednotenje uspešnosti izolacije.

Za določanje živosti smo 10 µl izoliranih protoplastov dodali 10 µl 0,005 % barvila FDA, premešali in 10 µl prenesli na hemocitometer. Pod mikroskopom Nikon Eclipse 80i smo prešteli število izoliranih protoplastov in z uporabo filtrov za detekcijo zelene fluorescence določili odstotek živih protoplastov, ki so pod mikroskopom svetili zeleno.

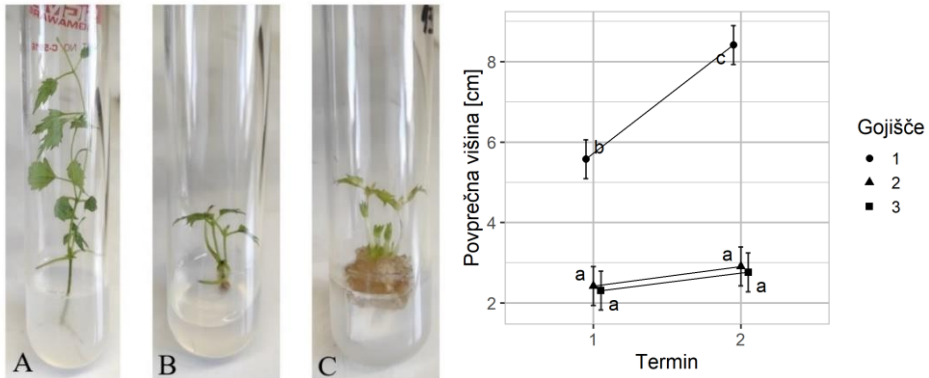
### **3 REZULTATI Z RAZPRAVO**

#### **3.1 Vpliv sestave gojišča na rast rastlin**

Fiziološko stanje izhodiščnega materiala je eden izmed ključnih dejavnikov za uspešno izolacijo protoplastov (Navrátilová, 2004). Iz tega razloga smo se odločili, da v prvem poskusu ovrednotimo rast rastlin hmelja v tkivni kulturi na treh različnih gojiščih. V prvem ocenjevalnem terminu (6 tednov po inokulaciji nodijev na gojišča) smo lahko opazili izrazite razlike v višini rastlin na različnih gojiščih in na gojišču 3 pojav nezaželenih lastnosti, kot sta kalus in vitrificiranost rastlin (Slika 1).

Po 6 tednih so bile rastline najvišje na gojišču 1 (5,58 cm), prav tako so bili listi lepo razviti. Rastline na tem gojišču so tudi hitreje rastle v primerjavi z rastlinami na gojišču 2 in 3, in so v drugem ocenjevalnem terminu (po 8 tednih) dosegle višino 8,41 cm. Rastline, ki so rastle na gojišču 2 z dodanim hormonom BAP, so bile v prvem terminu veliko nižje (2,43 cm) v primerjavi z rastlinami na gojišču 1 brez

dodanih hormonov. Rast je bila tudi veliko počasnejša in v primerjavi z drugim terminom v višini nismo opazili bistvenih sprememb (2,91 cm). Hormon BAP spada v skupino citokininov, ki naj bi imeli največji vpliv na zmožnost regeneracije pri hmelju (Šuštar-Vozlič in sod., 1999), vendar pa je imel v naših poskusih dodatek hormona BAP ravno nasproten učinek.



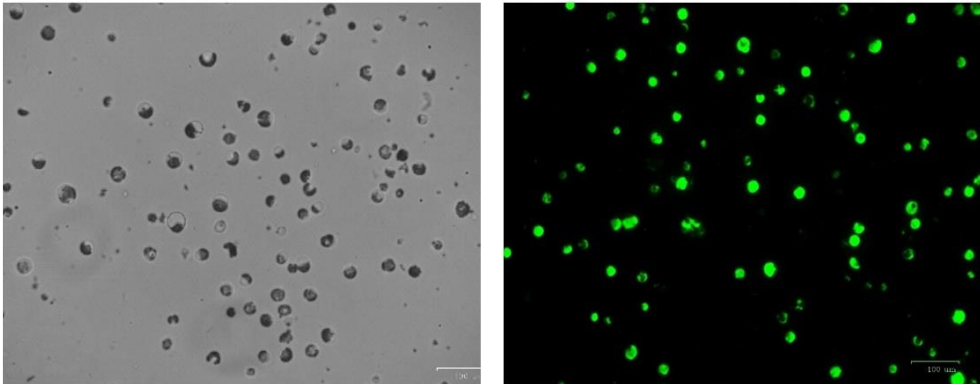
**Slika 1:** Levo - regeneracija nodijev sorte Celeia po 6 tednih na treh različnih gojiščih (A – gojišče 1, B – gojišče 2 in C – gojišče 3), desno - povprečna višina rastlin (cm) glede na vrsto gojišča in termin vrednotenja. Različne črke označujejo statistično značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ) med povprečji.

Pri regeneraciji nodijev na gojišču 3 z dodanima hormonoma TDZ in IAA, smo po 6 tednih opazili nastanek kalusnega tkiva, nastali poganjki so bili kratki (2,31 cm) in vitrificirani. Nastanek kalusnega tkiva pri gojenju rastlin v tkivni kulturi lahko sproži pojav spontanah mutacij, imenovano somaklonska variabilnost, ki je v večini primerov nezaželena, tudi pri gojenju hmelja (de Souza in sod., 2021). Za mikropropagacijo so zato priporočljivi protokoli gojenja na gojiščih brez dodanih rastnih hormonov, ki bi lahko sprožili nastanek kalusnega tkiva in s tem zmanjšali možnosti ohranjanja genetsko stabilnega materiala (Beard in sod., 2021). Gojišče 3 so avtorji Roy in sod. (2001) predlagali za namnoževanje hmelja v tkivni kulturi, vendar so bili nastali poganjki v našem primeru neprimerni za nadaljnje gojenje. V vseh preizkušanih gojiščih smo uporabili glukozo namesto saharoze, kot to za hmelj priporočata Hirakawa in Tanno (2022). Zamenjava sladkorja se je tudi v našem primeru izkazala za ustrezno.

### 3.2 Vzpostavitev protokola izolacije protoplastov in primerjava uspešnosti izolacije protoplastov z različnimi encimskimi raztopinami

Liste rastlin iz gojišča 1 smo dalje uporabili za izolacijo protoplastov. Pri tem smo sledili protokolu Kielkowske in Adamus (2012) za izolacijo protoplastov iz listov in

hipokotilov zelja, ter spreminjali sestavo encimske raztopine za uspešno izolacijo protoplastov iz listov hmelja. Za ta poskus smo uporabili tri različne koncentracije celulaz (1,5 %, 2,0 % in 2,5 %) in dve koncentraciji macerocima (0,5 % in 0,7 %). Vpliv koncentracije encimov na uspešnost izolacije protoplastov smo preverili na listih sorte Celeia.



**Slika 2:** Uspešno izolirani protoplasti hmelja. Levo – izolirani protoplasti pod svetlobnim mikroskopom, desno – protoplasti, obarvani z barvilom FDA pod fluorescenčnim mikroskopom, zeleno svetijo živi protoplasti.

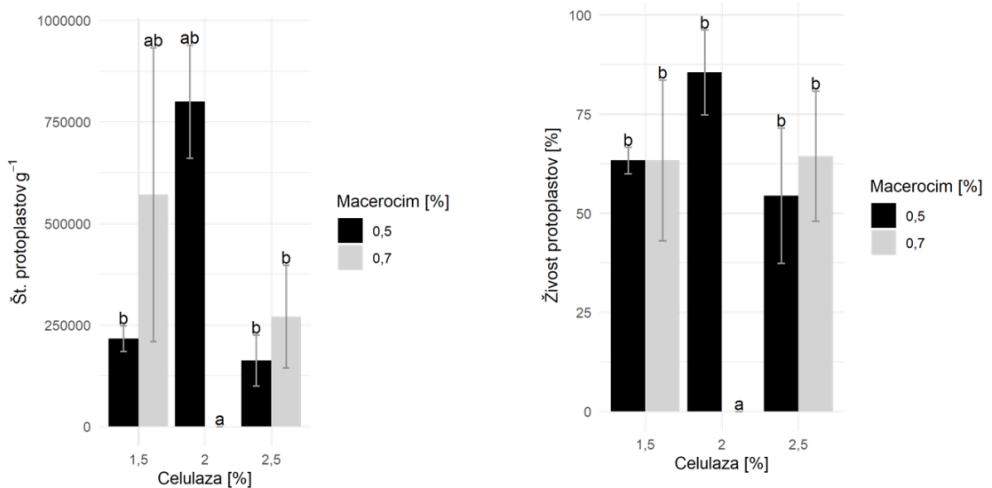
Protoplaste smo uspešno izolirali z uporabo 5 od 6 preizkušenih encimskih mešanic (Slika 2), pri čemer smo najvišji donos izoliranih protoplastov dosegli z uporabo encimske mešanice ER2, ki je vsebovala 1,5 % celulazo in 0,7 % macerocim ( $5,7 \times 10^5$  protoplastov na g tkiva) ter ER3, ki je vsebovala 2,0 % celulazo in 0,5 % macerocim ( $8,0 \times 10^5$  protoplastov na g tkiva) (Preglednica 1).

**Preglednica 1:** Sestava encimskih mešanic in njihov vpliv na donos in živost izoliranih protoplastov iz listov sorte Celeia. Različne črke v posameznem stolpcu označujejo statistično značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ) med povprečji.

Encimska raztopina	Koncentracija encimov	Donos izoliranih protoplastov ( $\times 10^5$ ) na g tkiva $\pm$ SD	Živost izoliranih protoplastov $\pm$ SD [%]
ER1	1,5C + 0,5M	$2,2 \pm 0,3$ b	$63 \pm 3$ b
ER2	1,5C + 0,7M	$5,7 \pm 3,6$ ab	$63 \pm 2$ b
ER3	2,0C + 0,5M	$8,0 \pm 1,4$ ab	$86 \pm 11$ b
ER4	2,0C + 0,7M	$0 \pm 0$ a	$0 \pm 0$ a
ER5	2,5C + 0,5M	$1,6 \pm 0,6$ b	$54 \pm 17$ b
ER6	2,5C + 0,7M	$2,7 \pm 1,3$ b	$64 \pm 16$ b

Naši rezultati donosa izoliranih protoplastov so primerljivi z objavo pri konoplji, pri kateri so z uporabo 1,25 % celulaze in 0,3 % macerocimom pridobili  $9,1 \times 10^5$  protoplastov na gram tkiva (Beard in sod., 2021). Pri encimski mešanici ER4 z 2,0 % celulazo in 0,7 % macerocimom nismo dobili dovolj protoplastov, da bi lahko vrednotili uspešnost izolacije.

Pri 0,5 % koncentraciji macerocima smo z zvišanjem koncentracije celulaze iz 1,5 % na 2,0 % pridobili več protoplastov, nato pa se je pri 2,5 % celulazi donos izoliranih protoplastov znižal. Podobno so opazili tudi Wang in sod. (2021) pri izolaciji protoplastov iz sladkornega trsa, ki so z naraščanjem koncentracije celulaze do 2,5 % zvišali donos izoliranih protoplastov, pri 3 % koncentraciji celulaze pa so pridobili manj protoplastov v primerjavi z 2,5 % celulazo pri 0,5 % koncentraciji macerocima. Do tega lahko pride zaradi toksičnosti encimov pri visoki koncentraciji (Ren in sod., 2020). Za višje koncentracije encimov so zato priporočljive krajše (nekaj urne) inkubacije (Naing in sod., 2021).



**Slika 3:** Vpliv sestave encimske mešanice na donos (levo) in živost (desno) izoliranih protoplastov iz listov hmelja. Različne črke označujejo statistično značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ) med povprečji.

Med uporabljenimi encimskimi raztopinami, pri katerih smo vrednotili živost izoliranih protoplastov (ER1, ER2, ER3, ER5 in ER6), ni bilo statistično značilnih razlik. Pri 0,5 % koncentraciji macerocima smo pri živosti opazili podoben trend kot pri donosu protoplastov – ta se je najprej z zvišanjem koncentracije celulaze povečala (iz 63 % pri 1,5 % celulazi na 86 % pri 2,0 % celulazi), nato pa znižala (iz 86 % pri 2,0 % celulazi na 54 % pri 2,5 % celulazi).

Pri encimski raztopini ER2, s katero smo tudi dosegli visok donos protoplastov, je bila variabilnost med ponovitvami pri donosu in živosti zelo visoka, kar za vzpostavitev zanesljivega protokola ni priporočljivo, zato smo na podlagi dobljenih rezultatov zaključili, da je za izolacijo protoplastov iz listov sorte Celeia najbolj primerna encimska raztopina ER3 z 2,0 % celulazo in 0,5 % macerocimom, s katero smo dosegli tudi visoko živost izoliranih protoplastov (86 %), ki je ključna za nadaljnjo uporabo protoplastov (Priyadarshani in sod., 2018).

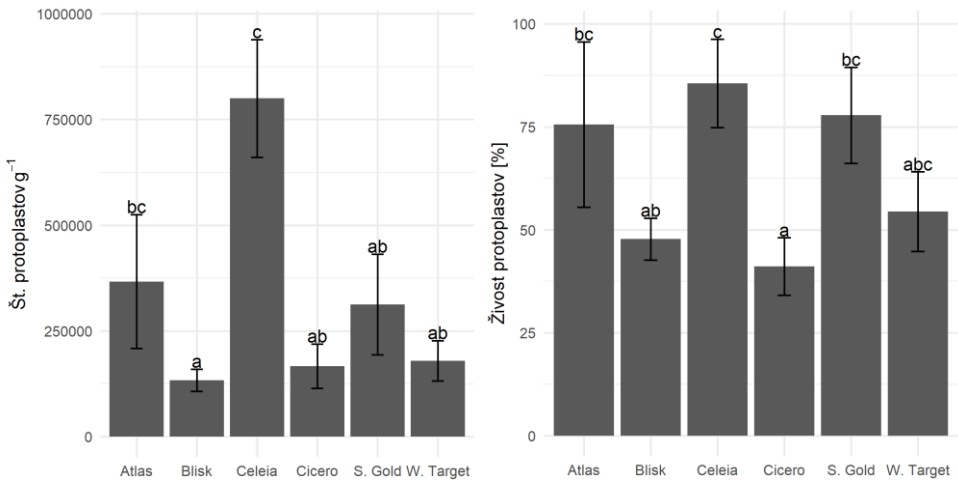
### 3.3 Izolacija protoplastov pri različnih sortah hmelja

Encimsko raztopino 3 smo nato uporabili za izolacijo protoplastov iz listov različnih sort hmelja (Atlas, Blisk, Celeia, Cicero, Wye Target, Styrian Eureka in Styrian Gold), ki smo jih gojili v tkivni kulturi na gojišču 1.

**Preglednica 2:** Donos in živost izoliranih protoplastov iz listov različnih sort hmelja z encimsko raztopino ER3. Različne črke v posameznem stolpcu označujejo statistično značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ) med povprečji.

Sorta	Donos izoliranih protoplastov ( $\times 10^5$ ) na g tkiva $\pm$ SD	Živost izoliranih protoplastov $\pm$ SD [%]
Atlas	3,7 $\pm$ 1,6 bc	76 $\pm$ 20 bc
Blisk	1,3 $\pm$ 0,3 a	48 $\pm$ 5 ab
Celeia	8,0 $\pm$ 1,4 c	86 $\pm$ 11 c
Cicero	1,7 $\pm$ 0,5 ab	41 $\pm$ 7 a
Styrian Gold	3,1 $\pm$ 1,2 ab	78 $\pm$ 12 bc
Wye Target	1,8 $\pm$ 0,5 ab	54 $\pm$ 10 abc

Protoplaste smo uspešno izolirali pri vseh izbranih sortah, razen pri sorti Styrian Eureka, pri kateri po flotaciji nismo dobili dovolj protoplastov, da bi lahko vrednotili uspešnost izolacije. Med izbranimi sortami smo opazili velike razlike tako v donosu ( $1,3\text{--}8,0 \times 10^5$  protoplastov na g tkiva), kot tudi v živosti (41–86 %) izoliranih protoplastov (Preglednica 2). Encimska mešanica ER3 z 2,0 % celulazo in 0,5 % macerocimom je bila najbolj primerna za izolacijo protoplastov iz listov sorte Celeia in Atlas, pri katerih smo dosegli najvišji donos (Slika 4). Živost protoplastov je bila visoka pri sortah Atlas, Celeia in Styrian Gold (76–86 %), medtem ko je bila pri sortah Blisk, Cicero in Wye Target nizka (41–54 %) (Slika 4). Pri slednjih bi za nadaljnjo uporabo protoplastov, protokol izolacije morali še optimizirati.



**Slika 4:** Primerjava donosa (levo) in živosti (desno) izoliranih protoplastov iz listov različnih sort hmelja. Različne črke označujejo statistično značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ) med povprečji.

Razlike v uspešnosti izolacije protoplastov pri različnih sortah so na podlagi literature pričakovane, podobno poročajo tudi Meyer in sod. (2009) ter Assani in sod. (2002). Uspešnost izolacije je lahko odvisna od občutljivosti genotipa na uporabljene encime (Reed in Bargmann, 2021) in razlik v rasti v tkivni kulturi, kar vpliva na njihovo fiziološko stanje (Navrátilová, 2004).

#### 4 ZAKLJUČEK

Protoplasti imajo veliko uporabnost, vendar pa protokoli prehodne transformacije protoplastov temeljijo na velikem številu protoplastov z visoko živostjo, ki jih lahko pridobimo le iz vitalnih rastlin. Za uspešno izolacijo protoplastov pri hmelju smo zato najprej vzpostavili tkivno kulturo hmelja na gojišču brez hormonov, na katerem so imele rastline najhitrejšo rast in najlepše razvite liste. Nato smo z optimizacijo sestave encimske mešanice uspešno izolirali protoplaste pri šestih slovenskih sortah hmelja. Furze in sod. (1987) so prvi objavili protokol za izolacijo protoplastov pri hmelju, vendar iz suspenzijskih celic. V naših poskusih smo protoplaste prvič izolirali iz mezofilnega tkiva listov hmelja, saj lahko na ta način pridobimo veliko število izenačenih protoplastov (Pasternak in sod., 2020). Vzpostavljena metoda izolacije protoplastov bo uporabna ne samo za transformacije protoplastov, temveč tudi za bazične študije na celičnem nivoju.

**Zahvala.** Avtorji se za finančno podporo zahvalujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077).



Zahvala za rastlinski material gre tudi Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

## 5 VIRI

- Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F., Côte F. X., Ducreux G., Ambroise A., Grapin A. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science*. 2002; 162, 3: 355-362.
- Beard K. M., Boling A. W. H., Bargmann B. O. R. Protoplast isolation, transient transformation, and flow-cytometric analysis of reporter-gene activation in *Cannabis sativa* L. *Industrial Crops & Production*. 2021; 164: 113360.
- De Souza R., Adams C. R., de Melo R. C., Guidolin A. F., Michel A., Coimbra J. L. M. Growth regulators and their reflection on different hop genotypes cultivated under *in vitro* conditions. *Brazilian Journal of Biology*. 2021; 147: 379-387.
- Furze J. M., Rhodes M. J. C., Richard J. R. The use of agarose bead culture for the regeneration of single cell-derived colonies from protoplast isolated from suspension cultures of *Humulus lupulus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1987; 8: 17-25.
- Hirakawa T. in Tanno S. *In Vitro* Propagation of *Humulus lupulus* through the Induction of Axillary Bud Development. *Plants*. 2022; 11, 1066.
- Hrnčič M. K., Spaninger E., Košir I. J., Knez Z., Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*. 2019; 11, 2: 275.
- Kielkowska A. in Adamus A. An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 2012; 48: 265-273.
- Menczel L., Nagy F., Kiss Z. R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor Appl Genet*. 1981; 59:191-195.
- Meyer L., Serek M., Winkelmann T. Protoplast isolation and plant regeneration of different genotypes of *Petunia* and *Calibrachoa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2009; 99: 27-34.
- Murashige T. in Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-497.
- Nadakuduti S. S., Starker C. G., Ko D. K., Jayakody T. B., Buell C. R., Voytas D. F., Douches D. S., Evaluation of methods to assess *in vivo* activity of engineered genome-editing nucleases in protoplasts. *Front. Plant Sci*. 2019; 10.
- Naing A. H., Adedeji O. S., Kim C. K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. *Scientia Horticulturae*. 2021; 283.
- Navrátilová B. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae – a review. *Horticultural Science*. 2004; 31, 4: 140-157.
- Pasternak T., Lystvan K., Betekhtin A., Hasterok R. From Single Cell to Plants: Mesophyll Protoplasts as a Versatile System for Investigating Plant Cell Reprogramming. *Int J Mol Sci*. 2020; 21, 12: 4195.
- Priyadarshani S. V. G. N., Hu B., Li W., Ali H., Jia H., Zhao L., Ojolo S. P., Azam S. M., Xiong J., Yan M., ur Rahman Z., Wu Q., Qin Y. Simple protoplast isolation system for

- gene expression and protein interaction studies in pineapple (*Ananas comosus* L.). *Plant Methods*. 2018; 14: 95.
- Reed K. M. in Bargmann B. O. R. Protoplast Regeneration and Its Use in New Plant Breeding Technologies. *Front. Genome Ed.*. 2021; 3: 734951.
- Ren R., Gao J., Yin D., Li K., Lu C., Ahmad S., Wei Y., Jin J., Zhu G., Yang F. Highly Efficient Leaf Base Protoplast Isolation and Transient Expression Systems for Orchids and Other Important Monocot Crops. *Front. Plant Sci.* 2021; 12.
- Roy A. T., Legget G., Koutoulis A. Shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2001; 37: 79-83.
- Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Bohanec B. Studies of Somaclonal Variation in hop (*Humulus lupulus* L.). *Phyton-Annales Revis Botanica*. 1999; 39: 283-287.
- Wang Q., Yu G., Chen Z., Han J., Hu Y., Wang K. Optimization of protoplast isolation, transformation and its application in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.). *The Crop Journal*. 2021; 9: 133-142.

## UPORABA IZOTERMNIH METOD POMNOŽEVANJA NUKLEINSKIH KISLIN ZA DOLOČANJE VIROIDOV NA TERENU

Tanja GUČEK<sup>1</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>2</sup>

Pregledni članek / Review paper

Prispelo / Received: 1. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 2. 12. 2022

### Izvleček

Intenzivna monokulturna pridelava kmetijskih rastlin, podnebne spremembe, globalno trgovanje in evolucijska sposobnost patogenov prilagajanju na spremembe so glavni dejavniki pojava rastlinskih epidemij. Neozdravljive bolezni rastlin, ki jih povzročajo viroidi, lahko omejijo količino in kvaliteto pridelka in povzročijo velike izgube. Pri tem pomemben dejavnik preprečevanja širjenja predstavljajo diagnostične metode s katerimi lahko hitro in zanesljivo odkrivamo viroidne okužbe. Zaradi narave viroidov, ki so gola RNA brez kodirajočega potenciala, njihovo določanje na podlagi prepoznavanja antigen-protitelo ni mogoče. Zato se lahko uporabljajo le metode na osnovi določanja nukleinskih kislin. Nekatere med njimi so lahko zamudne, zahtevajo uporabo drage opreme in izkušeno osebje, kar je ovira za izvajanje detekcije na terenu. Alternativni način je uporaba testov pri konstantni temperaturi, kot sta metoda izotermnega pomnoževanja, posredovanega z zanko (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) in pomnoževanje z rekombinazno polimerazo (recombinase polymerase amplification, RPA). Izotermni testi so preprosti, enostavni za izvedbo in zanesljivi ter se jih lahko izvede s hitrimi testi. Uporaba hitrih testov ima prednost pri testiranju na terenu, ker zahtevajo minimalno pripravo vzorcev in se izvajajo pri konstantni nizki temperaturi (37–42 °C) brez uporabe zahtevne opreme. V preglednem članku so predstavljeni izotermni testi (LAMP in RPA), ki so primerni za detekcijo na terenu in njihov potencial za določanje viroidov.

**Ključne besede:** LAMP, RPA, detekcija na terenu, viroid

## ON SITE DETECTION OF VIROIDS USING METHODS FOR ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS

### Abstract

Intensive monoculture production of agricultural plants, climate change, global trade and the evolutionary ability of pathogens to adapt rapidly are main source of current emergences. Incurable plant diseases caused by viroids can limit crop production and

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

<sup>2</sup> Dr., IHPS, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

quality and can result in significant losses. An important factor in preventing the spread is represented by diagnostic methods that can rapidly and reliably detect viroid infections. The nature of viroids, which are naked RNA without any coding potential, restricts its detection based on antigen-antibody recognition. Therefore, only nucleic acid detection methods can be applied. Some of them can be time-consuming, require the use of expensive equipment and technical skills, which may be an obstacle for field detection. An alternative way is the use of isothermal tests, such as the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and recombinase polymerase amplification (RPA). Isothermal tests are simple, easy to perform, and reliable and can be performed using lateral flow devices. This technology has the advantage to be implemented in field-based scenarios because tests require a minimal sample preparation, and are performed at constant low temperature (37–42°C) without the use of sophisticated equipment. Here we briefly describe isothermal assays (LAMP and RPA), that are suitable for onsite detection and their potential for viroid detection.

**Key words:** LAMP, RPA, field detection, viroid

## 1 UVOD

Rastline so občutljive na številne patogene, kot so virusi in viroidi, ki lahko povzročijo velike izgube pridelka. Za hitro odkritje povzročiteljev je potrebno razviti zanesljive diagnostične metode, da se te izgube zmanjša. Najenostavnejši način detekcije predstavlja določitev bolezenskih znamenj in kroga gostiteljev. Težavo predstavlja dejstvo, da virusi in viroidi ne povzročajo samo enega tipičnega bolezenskega znamenja, kot to da je lahko pri eni bolezni prisotnih več povzročiteljev (Bhat in sod., 2022). Zato obstaja potreba po metodah, ki omogočajo hitro, zanesljivo in hkrati specifično določanje rastlinskih patogenov.

*In vitro* pomnoževanje nukleinskih kislin, oziroma umetna replikacija genetskega materiala, se je z razvojem PCR metode (Mullins in sod., 1986) vključilo v vsa področja znanosti o življenju, od detekcije patogenov, raziskav raka, kloniranja, sekvenciranja, genskega inženiringa, sintezne biologije, forenzike, do razvoja zdravil in številnih drugih (Li in sod., 2019). Ne glede na široke možnosti uporabe je PCR metoda, ki za svoje delovanje potrebuje izkušeno osebje in sofisticirano opremo. Posledično se jo lahko uporablja le znotraj zidov laboratorija. Hkrati je izvedba PCR metod zahtevna, saj je najprej potrebno izvesti izolacijo nukleinskih kislin, ki ji nato sledi pomnoževanje in na koncu analiza rezultatov na agaroznem gelu (Bhat in sod., 2022).

Po drugi strani za pomnoževanje nukleinskih kislin pri stalni temperaturi z uporabo izotermnih metod ne potrebujemo termocikličnih inštrumentov (Li in sod., 2019). Ker nenehno segrevanje in ohlajanje ni več potrebno se skrajša čas analize. Prav tako

so rezultati vidni že s spremembo obarvanosti produkta, ko se reakcijski mešanici doda fluorescentno barvilo (npr. etidijev bromid, SYBR Green I, Picogreen, propidijev jodid) in je sprememba barve vidna že s prostim očesom, zato agarozna gelska elektroforeza ni več potrebna (Panno in sod., 2020). Te metode se lahko izvajajo na terenu in v laboratorijih, ki so slabše finančno preskrbljeni, vzamejo manj časa, proizvedejo pa rezultate primerljive PCR metodam (Bhat in sod., 2022). Zaradi enostavne uporabe, cene in hitrosti so se tako razvile številne metode izotermnega pomnoževanja. Med največkrat uporabljene sodijo: NASBA (nag. nucleic acid sequence-based amplification), SMART (ang. signal-mediated amplification of RNA technology), HDA (ang. helicase-dependent amplification), RPA (ang. recombinase polymerase amplification), RCA (ang. rolling circle amplification), MDA (ang. multiple displacement amplification), LAMP (ang. loop-mediated isothermal amplification), SDA (ang. strand displacement amplification) in druge (Li in Macdonald, 2015; Craw in Balachandran, 2012, Li in sod., 2019) (preglednica 1). LAMP in RPA sta metodi, ki se pogosto uporabljata za detekcijo in diagnostiko rastlinskih povzročiteljev bolezni, med njimi tudi virusov in viroidov, zato jih bomo obravnavali v nadaljevanju.

### *Preglednica 1: Seznam izotermnih metod in njihovih značilnosti*

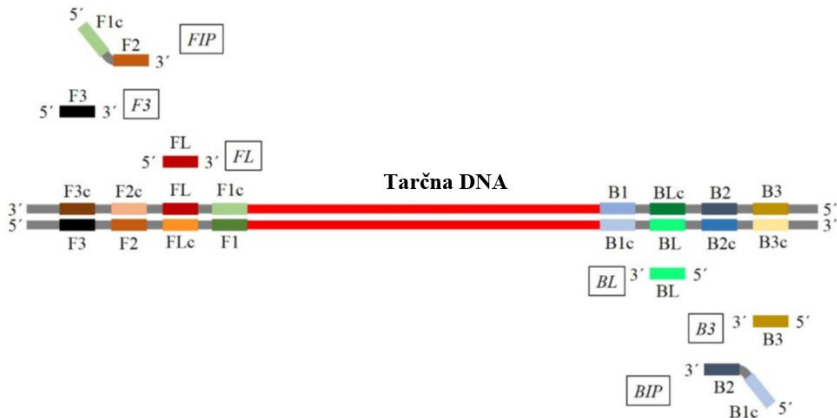
Izotermna metoda	Tarča	Začetni oligonukleotidi	T [°C]	Čas [min]	LOD* [kopije]	Sočasno pomnoževanje	Liofilizirani reagenti
NASBA	RNA	2	41	60-180	1	DA	DA
SDA	RNA	4	30-55	60-120	10	DA	NE
RCA	DNA/RNA	1	30-65	60-240	10	NE	NE
HDA	DNA	2	65	30-120	1	DA	NE
LAMP	DNA/RNA	4-6	60-65	20-60	5	DA	NE
RPA	DNA/RNA	2	37-42	20-40	1	DA	DA

\*LOD, meja detekcije (ang. limit of detection)

## **2 LAMP**

Metoda izotermnega pomnoževanja, posredovanega z zanko (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) je metoda pomnoževanja nukleinskih kislin pri konstantni temperaturi, ki se uporablja kot alternativa PCR metodam. Uporaba LAMP je razširjena v medicini, kmetijstvu in živilski industriji s postopki, ki vključujejo analizo mutacij, mikro RNA, identifikacije vektorjev rastlinskih patogenov, odkrivanje gensko spremenjenih organizmov in številne druge aplikacije (Notomi in sod., 2000; Panno in sod., 2020). Razlog za razvoj LAMP metodologije je temeljil na poskusu premagovanja nekaterih pomanjkljivosti PCR metod, ki med drugim zahtevajo uporabo dragih inštrumentov. Zaradi potrebe po visoki natančnosti temperatur ogrevanja in hlajenja PCR reakcije lahko pri določanju izbranih tarč prihaja do izgube specifičnosti. Prav tako je encim polimeraza zelo občutljiv na inhibitorje, ki so lahko prisotni v rastlinskih ekstraktih. Nasprotno uporaba LAMP ne zahteva drage opreme, hkrati pa zagotavlja visoko specifičnost, zaradi uporabe

štiri do šest začetnih oligonukleotidov in robustnosti encima, ki je veliko bolj odporen na inhibitorje. Zaradi omenjenih razlogov, visoke robustnosti, enostavnosti in uporabnosti v kontekstu omejenih finančnih virov se LAMP pogosto uporablja kot diagnostična metoda, ki se lahko uporablja tudi na terenu (Panno in sod., 2020).



**Slika 1:** Prikaz začetnih oligonukleotidov (ZO) za LAMP. Položaji lokacije naleganja začetnih oligonukleotidov so označeni z ustreznimi barvami (FIP: smerni notranji ZO; F3: smerni zunanji ZO; FL: ZO zanke F-Loop; BL: ZO zanke B-Loop; B3: protismerni zunanji ZO; BIP: protismerni notranji ZO) (povzeto po Panno in sod., 2020).

Metoda LAMP je osnovana na aktivnosti *Bst* DNA polimeraze iz *Geobacillus stearothermophilus*, ki omogoča samo-pomnoževanje in izpodrivanje DNA pri stalni temperaturi (Notomi in sod., 2000). Reakcija je sestavljena iz dveh korakov: začetni korak in kombinacija cikličnega pomnoževanja s podaljševanjem oziroma recikliranjem (Mori in Notomi, 2009). Med pomnoževanjem se temperatura giblje od 60 do 65 °C, kar je optimalno za delovanje *Bst* DNA polimeraze. V začetni korak so vključeni štirje glavni začetni oligonukleotidi, dva para zunanjih (F3 in B3) in dva para notranjih (FIP in BIP) (slika 1). Slednja sta sestavljena iz dveh različnih zaporedij, ki prepoznata smerno in protismerno verigo tarčne DNA, in sta odgovorna za iniciacijo reakcije (Notomi in sod., 2000). F3 in B3 sodelujeta v koraku sinteze in izpodrivanju DNA. Za večjo občutljivost in hitrost reakcije se uporabljata še dva dodatna začetna oligonukleotida zanke (F-Loop in B-Loop) (slika 1), ki se specifično vežeta na zanke in sta del koraka elongacije. Načrtovanje LAMP začetnih oligonukleotidov je zelo zahtevno in ročno praktično nemogoče, zato so na voljo številni programi kot na primer Primer Explorer version 5. Če reakciji dodamo encim reverzno transkriptazo (navadno je to AMV oziroma »avian myeloblastosis virus«), dobimo RT-LAMP, ki nam omogoča detekcijo RNA patogenov (Panno in sod., 2020).

Med LAMP reakcijo nastane velika količina ciljne DNA in stranskega produkta. Obstajata dva osnovna načina vizualizacije rezultatov. Metode, ki temeljijo na odčitavanju rezultatov na koncu reakcije in metode, pri katerih rezultat spremljamo v realnem času. Ker je za LAMP značilna visoka občutljivost in omogoča preprosto vizualno analizo rezultatov (s prostim očesom), se v večini primerov uporabljajo metode na končni točki vizualizacije, kot so agarozna gelska elektroforeza (AGE), spremljanje spremembe barve ob uporabi barvil (kolorimetrija), spremembe motnosti zaradi uporabe ionskih indikatorjev ali interkalirajočih fluorescentnih barvil (npr. SYBR Green I). V realnem času se lahko meri motnost ali fluorescenco že med potekom reakcije, ne da bi čakali do konca procesa (Panno in sod., 2020).

V zadnjih 20 letih odkar je bila metoda LAMP razvita, so v uporabo stopile številne izboljšave in prilagoditve. Zaradi enostavnosti, zanesljivosti, občutljivosti, specifičnosti in dostopnosti preprostih inštrumentov so v zadnjih letih uporabo LAMP usmerili tudi v slabo opremljene laboratorije držav v razvoju (Panno in sod., 2020). Da bi še dodatno poenostavili metodo segrevanja za LAMP reakcijo so zasnovali grelnik, ki za svoje delovanje ne potrebuje električne energije (LaBarre in sod., 2011). Večje izboljšave LAMP metode ne temeljijo samo na uporabi v neznanstvenem kontekstu temveč tudi na raziskavah in razvoju, tako so bile v zadnjih letih razvite številne različice. Med drugimi so to: LAMP za sočasno določanje več tarč (Multiplex LAMP, mLAMP), mikro LAMP za manjše volumne vzorcev (micro LAMP,  $\mu$ LAMP), digitalni LAMP, ki omogoča kvantifikacijo (digital LAMP, dLAMP), električni LAMP (electric LAMP, eLAMP), liofiliziran LAMP (lyophilized LAMP) in številni drugi (Panno in sod., 2020).

Ena izmed zelo uporabnih različic je povezava LAMP metode s hitrimi testi detekcije (lateral flow assay, LFA), ki je zelo primerna za uporabo na terenu, ker bistveno skrajša čas analize brez uporabe sofisticirane opreme. Ta test je po občutljivosti podoben detekciji z agarozno gelsko elektroforezo, vendar je hitrejši in preprostejši za uporabo. Ta metoda je osnovana na metodi hibridizacije in reakcije antigen-protiteleso. Uporabi se set štirih začetnih oligonukleotidov: dva zunanja (F3 in B3) in z biotinom/ DIG (digoksigenin)/ Tex Red/ FITC (fluorescein izotiocianat) na 5'-koncu označena FIP in BIP. Rezultat dobimo po petih minutah, kot obarvano črto na hitrem testu, ki vsebuje obarvane sintetične kroglice ali zlate nanodelce vezane na protitelesa proti biotinu/DIG/FITC. Kompleks LAMP reakcije potuje skozi vpojno blazinico na hitrem testu, dokler ne doseže testne črtice in se veže na protitelesa. Rezultati so vidni v nekaj minutah z vizualizacijo ploščice (Soliman in El-Matboulin, 2010; Rigano in sod., 2014). Ta metoda je zato zelo primerna za uporabo na terenu, saj je hitra in ne potrebuje sofisticirane opreme. Metoda kombinacije LAMP in LFA je bila razvita za določanje številnih rastlinskih virusov, za viroide pa po naših informacijah še ne (Bhat in sod., 2022).

Prednosti LAMP so v hitrosti, delovanju pri konstantni temperaturi, v robustnosti (določanje neposredno iz surovih rastlinskih izvlečkov), vizualizaciji s prostim

očesom, občutljivost in specifičnost je primerljiva z drugimi metodami pomnoževanja DNA/RNA (kot npr. PCR, RT-PCR, RT-qPCR) hkrati pa za delovanje potrebuje samo vodno kopel ali grelnik. Glavna omejitev metode LAMP je zahtevno načrtovanje začetnih oligonukleotidov, zato je razvitih zelo malo mLAMP. Pri vizualizaciji z elektroforezo obstaja velika verjetnost za kontaminacijo, ker je nastali LAMP produkt zelo stabilen in se ne razgradi zlahka, to pomeni možnost prenosa in kontaminacije. Za zmanjšanje verjetnosti za kontaminacijo je potrebno glavno mešanico LAMP reakcije pripraviti na ledu v manj kot 30 minutah (Panno in sod., 2020).

**Preglednica 2:** Seznam razvitih metod RT-LAMP za določanje viroidov (povzeto po Bhat in sod., 2022)

Viroid (angleško ime; rod; družina)	Gostitelj	Analiza rezultatov	Čas pomnoževanja (min)	T (°C)	Občutljivost	Reference
<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (CChMVd) (Pelamoviroid; Avsunviroidae)	krizantema	AGE, SYBR Green I	90	65	-	Park in sod., 2013
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (CSVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	krizantema	AGE	60	63	1000-krat bolj kot RT-PCR	Liu in sod., 2014
<i>Coconut cadang-cadang viroid</i> (CCCVd) (Cocadviroid; Pospiviroidae)	oljna palma	AGE	60	60	-	Thanarajoo in sod., 2014
<i>Columnea latent viroid</i> (CLVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paradižnik	AGE, SYBR Green I	60	65	100 do 2000-krat bolj kot RT-PCR	Bhuvitarkor n in sod., 2019
<i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd) (Pelamoviroid; Avsunviroidae)	breskev, sliva, marelica, hruška, kutina	AGE	32	63	100-krat bolj kot RT-PCR	Boubourak as in sod., 2009
<i>Pepper chat fruit viroid</i> (PCFVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paprika, paradižnik	AGE, SYBR Green I, v realnem času	40	65	10-100-krat bolj kot RT-PCR	Tangkanch anapas in sod., 2018
<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	krompir	AGE, SYBR Green I, v realnem času	20-50	65	10-krat bolj kot RT- PCR	Lenarčič in sod., 2013; Tsutsumi in sod., 2010
<i>Plum viroid I</i> (PIVd-I) (viroid like RNA)	sliva	kolorimetrično, v realnem času	60	65	enaka kot RT-PCR	Bester in Maree, 2022

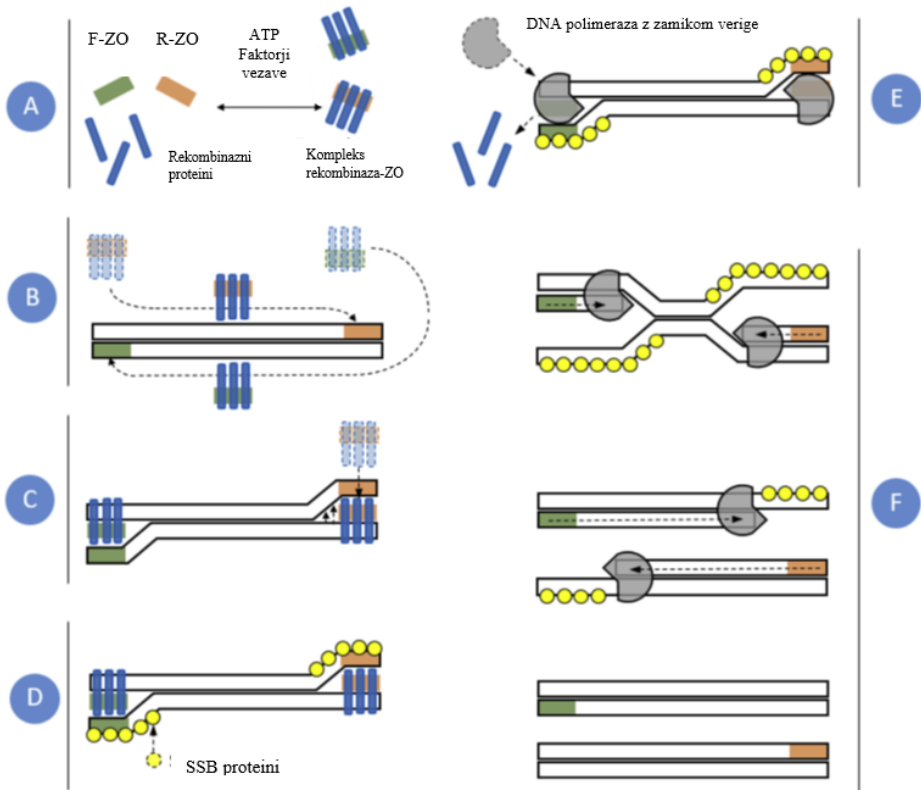


Metoda RT-LAMP je bila po naših informacijah razvita za osem viroidov (preglednica 2). Med njimi so Lenarčič in sod. (2013) razvili metodo za določanje PSTVd na terenu, ki omogoča določitev v manj kot 1 uri. Pri metodi so uporabili inštrument za uporabo na terenu (Genie II), ki poleg same izvedbe testa omogoča tudi odčitavanje rezultatov v realnem času. Za metode RT-LAMP za določanje viroidov je čas detekcije skrajšan na 60 min, hkrati pa je občutljivost od 10 do 2000-krat večja kot z RT-PCR (preglednica 2). Med zadnjimi je bil razvit RT-LAMP za določanje slivovega viroida I (ang. *Plum viroid I*, PIVd-I), ki omogoča hitro detekcijo brez dolgoročne RNA izolacije (Bester in Maree, 2022). Prav tako so v omenjeni raziskavi preizkusili združevanje vzorcev, kar lahko tudi do 5-krat zmanjša stroške analize. Omenjene razvite metode RT-LAMP so hitre in specifične, hkrati pa imajo zaradi številnih hitrih testov za vizualizacijo velik potencial učinkovite detekcije viroidov in drugih patogenov kar na terenu.

### 3 RPA

Metoda pomnoževanja z rekombinazno polimerazo (ang. recombinase polymerase amplification, RPA) je bila razvita leta 2006 (Piepenburg in sod., 2006) in se od takrat vedno pogosteje uporablja. Razlog za uporabo na številnih diagnostičnih področjih je v ugodni ceni (~ 4,2 €/ test), preprosti uporabi, hitrosti (5–20 min) in občutljivosti (od 1 do 10 kopij tarče) (Daher in sod., 2016). RPA je zaradi minimalnih priprav vzorca, nizkih temperatur reakcije (37–42 °C) in komercialno dostopnih liofiliziranih reagentov primerna za uporabo na odročnih lokacijah in delo na terenu. Uporaba RPA je razširjena za pomnoževanje različnih tarč, ki vključujejo RNA, miRNA, ssDNA in dsDNA iz gliv, bakterij, virusov in viroidov, ki lahko okužijo živali, ljudi in rastline (Lobato in O`Sullivan, 2018).

RPA za svoje delovanje uporablja mešanico polimeraz in DNA rekombinaznih proteinov. Za razliko od koraka denaturacije pri PCR (95 °C), RPA za denaturacijo uporablja *Escherichia coli* RecA rekombinazo in protein, ki se veže na enoverižno DNA (ang. single-strand DNA binding protein, SSB). RPA reakcija se začne z vezavo rekombinaznih proteinov iz bakteriofaga T4 na začetne oligonukleotide v prisotnosti ATP (adenozin trifosfat) in faktorjev vezave (slika 2). Tvorijo kompleks rekombinaze in začetnih oligonukleotidov, ki na tarčni DNA išče homologna zaporedja. Z vezavo kompleksa na tarčno DNA se tvori struktura v obliki D-zanke, ki jo stabilizirajo SSB proteini. V naslednjem koraku se rekombinaza razstavi in pusti 3`-koncu dostopen za DNA polimerazo (iz *Staphylococcus aureus*, Sau DNA polimeraza) z aktivnostjo zamika verige, ki podaljša začetne oligonukleotide (slika 2). Eksponentno pomnoževanje je doseženo s cikličnimi ponovitvami RPA reakcije v manj kot 30 minutah (Babu in sod., 2018; Lobato in O`Sullivan, 2018; Li in sod., 2019).



**Slika 2:** Mehanizem delovanja RPA reakcije. Rekombinazni proteini tvorijo kompleks z vsakim začetnim oligonukleotidom (ZO; F-ZO: smerni ZO; R-ZO: protismerni ZO) (A), ki na tarčni DNA išče homologno zaporedje (B). ZO se vežejo na tarčno DNA z aktivnostjo zamika verige rekombinaze (C). SSB proteini stabilizirajo vezavo (D). Rekombinaza se nato razstavi in pusti 3`-konec prost za DNA polimerazo z zamikom verige (E), ki podaljša ZO (F). Eksponentno pomnoževanje je doseženo s cikličnimi ponovitvami reakcije (povzeto po Lobato in O`Sullivan, 2018).

Za razliko od PCR reakcij, ki za delovanje potrebujejo stroge temperaturne pogoje, RPA reakcija lahko deluje pri konstantni temperaturi okrog 37 °C, zato za svoje delovanje ne potrebuje sofisticiranih inštrumentov. Reakcija je lahko zaključena v 5 do 20 minutah, odvisno od začetne količine tarčnih zaporedij. Za pomnoževanje RNA tarč se v reakcijsko mešanico doda reverzno transkriptazo (RT-RPA) in reakcijo izvede pri 40 do 42 °C, kar omogoča določitev tarče v 20 minutah (Babu in sod., 2018). Za uspešen potek reakcije je potrebno specifično načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond, ki nimajo enakih značilnosti kot začetni oligonukleotidi za PCR. Začetni oligonukleotidi so navadno precej daljši (od 30 do 35 nukleotidov),

sonde pa so označene s fluoroforom in dušilcem med katerim je modificiran nukleotid (tetrahidrofuran (THF)/ dSpacer/ dR skupina). To je mesto kjer sondo prereže eksonukleaza (Nfo/ *E.coli*...), kar povzroči, da se fluorofor in dušilec ločita. Posledično se generira fluorescentni signal, ki ga lahko zaznamo z uporabo fluorometra (Li in sod., 2019; Bhat in sod., 2022).

Metode detekcije RPA produkta so enake kot pri LAMP metodi, in obsegajo agarozno gelsko elektroforezo (AGE), hitre teste (LFA) in v primeru detekcije v realnem času različne detektorje fluorescence (Piepenburg in sod., 2006; Lobato in O`Sullivan, 2018). V primeru uporabe agarozne gelske elektroforeze je potrebno RPA produkte pred nanosom na gel očistiti zaradi prisotnosti proteinov, ki lahko zakrijejo prisotnost produkta (Babu in sod., 2018). Z uporabo z biotinom označenih začetnih oligonukleotidov ali dNTP je možna tudi določitev RPA produkta s spremembo barve (Lobato in O`Sullivan, 2018).

Za RPA detekcijo se pogosto uporabljajo hitri testi (LFA), kar je idealno za določanje na terenu, saj lahko tako viruse in viroide določimo v 15 do 30 minutah z občutljivostjo od 1 do 10 kopij tarče (Lobato in O`Sullivan, 2018). Za določanje s hitrimi testi se navadno uporablja dva začetna oligonukleotida in sonda, ki je na 5`-koncu označena z antigensko oznako (npr. FAM) in modificirana s THF nukleotidom. Na tem mestu pride do razreza z Nfo nukleazo, kar spremeni sondo v začetni oligonukleotid. Poleg sonde mora biti na nasprotnem koncu tarče začetni oligonukleotid označen na 5`-koncu z drugo oznako (npr. biotinom). Tako nastane DNA amplikon označen z dvema oznakama, ki ga zmešamo z barvilom in nanesimo na LFA. Barvilo se veže na amplikon, ki potuje po traku in se s pomočjo protiteles veže na testno črto. Odvečno barvilo se ujame na protitelesa na kontrolni črti. Kot pozitiven rezultat dobimo obarvano testno in kontrolno črto (Lobato in O`Sullivan, 2018; Bhat in sod., 2022).

Metoda RPA v kombinaciji z LFA (RPA-LFA) je bil razvita za številne rastlinske viruse (Bhat in sod., 2022) in viroide, kot so HSVd, PSTVd in TCDVd (preglednica 3) (Hammond in Zhang, 2016; Kappagantu in sod., 2017; Ivanov in sod., 2020). Poleg omenjenih je bila RT-RPA metoda razvita tudi za ASSVd, PLMVd in TASVd viroide (preglednica 3). V omenjenih primerih so za detekcijo uporabili AGE, fluometer oziroma kombinacijo s Crispr/Cas 12a. V vseh primerih jim je uspelo viroide določiti v 5–30 minutah, kar je veliko hitreje kot pri uporabi RT-PCR. Kljub hitrejši analizi je v večini primerov občutljivost ostala primerljiva z RT-PCR, tudi v primeru uporabe hitrega testa pri TCDVd (Hammond in Zhang, 2016).

**Preglednica 3: Seznam RT-RPA metod za določanje viroidov (povzeto po Bhat in sod., 2022)**

<b>Viroid (angleško ime; rod; družina)</b>	<b>Gostitelj</b>	<b>Analiza rezultatov</b>	<b>Čas pomnoževanja (min)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Občutljivost</b>	<b>Reference</b>
<i>Apple scar skin viroid</i> (ASSVd) (Apscaviroid; Pospiviroidae)	jablana	AGE	10	42	10-krat bolj kot RT-PCR	Kim in sod., 2021
	jablana	Crisp/C as 12a	20	37	enaka kot RT-qPCR	Jiao in sod., 2020
<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd) (Hostuviroid; Pospoviroidae)	hmelj	LFA	20	39	manj kot RT-PCR	Kappagantu in sod., 2017
<i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd) (Pelamoviroid; Avsunviroidae)	breskev	AGE	5	42	1000-krat bolj kot RT- PCR	Lee in sod., 2020
<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	krompir	LFA	30	39	do 10 <sup>6</sup> kopij	Ivanov in sod., 2020
<i>Tomato apical stunt viroid</i> (TASVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paradižnik	Fluoro- meter	20	39	81- kratna redčitev rastlinskega ekstrakta	Kovalskaya in Hammond, 2022
Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paradižnik	LFA	19	39	enako kot RT-PCR	Hammond in Zhang, 2016

Metoda RPA ima številne prednosti, med drugim da za razliko s PCR ni potrebe po talilni temperaturi začetnih oligonukleotidov in sond, ker le-ti niso vezani na temperaturo ampak na encime. Metoda prav tako ne potrebuje sofisticiranih termocikličnih instrumentov in je primerna za uporabo v platformah pomnoževanja nukleinskih kislin brez instrumentov (Babu in sod., 2018; Li in sod., 2019). Zato je še posebej primerna za uporabo na terenu. Dodatna prednost je tudi, da so RPA reagenti liofilizirani, zato za transport in hranjenje ni potrebno hlajenje (Babu in sod., 2018). Obstaja tudi možnost, da se RPA metoda uporabi za sočasnega določanje več tarč (multiplex RPA), kar še dodatno zmanjša stroške analize (Bhat in sod., 2022).

Z uporabo fluorescentnih sond lahko rezultate dobimo v realnem času po 5 do 15 minutah, brez nevarnosti za kontaminacijo. Prav tako prednost predstavlja direktno

določanje DNA in RNA tarč iz rastlinskih ekstraktov, brez zamudne izolacije nukleinskih kislin. Ne glede na hitrost in preprostost izvedbe RPA reakcije je občutljivost RPA in RT-RPA reakcij primerljiva PCR in RT-PCR (Babu in sod., 2018). Prednost RPA predstavlja tudi toleranca na inhibitorje, DNA iz ozadja in neujemanja (do 9 nukleotidov razlike med vezavnim mestom začetnih oligonukleotidov in sond).

Neujemanje ne predstavlja vedno prednosti, ker lahko posledično prihaja do nespecifične določitve sorodnih vrst (Li in sod., 2019). Med slabosti RPA reakcije spada detekcija z agarozno gelsko elektroforezo, ker je potrebna velika previdnost in odstranitev proteinov, kar vzame čas in predstavlja dodatne stroške. Velika težava pri RPA so aerosoli, ki ob odprtju mikrocentrifugirke s produktom predstavljajo veliko nevarnost za kontaminacijo (Babu in sod., 2018). Ne glede na omenjene slabosti metoda RPA predstavlja velik potencial za hitro in zanesljivo določanje patogenov tako v slabše opremljenih laboratorijih kot na terenu.

#### 4 ZAKLJUČEK

Bolezni rastlin predstavljajo velike omejitve pri vzgoji kmetijskih pridelkov v vseh pridelovalnih regijah na svetu. Eden od pomembnih dejavnikov preprečevanja bolezni je zanesljiva identifikacija patogenov in razumevanje njihovih mehanizmov prenosa. Metode na osnovi določanje nukleinskih kislin so trenutno najpogosteje uporabljene diagnostične metode v rastlinski patologiji. Med njimi je zagotovo najbolj pogosto uporabljen PCR. Z razvojem izotermnih metod kot sta LAMP in RPA je določanje virusov in viroidov postalo precej enostavnejše. Omenjeni testi se lahko uporabljajo na terenu, z uporabo rastlinskih ekstraktov in brez uporabe sofisticirane opreme. Rezultati obeh testov so vidni v realnem času z uporabo prenosnih fluorometrov ali s hitrimi testi (LFA).

V prihodnosti bo potrebno usmeriti razvoj v cenovno ugodne in robustne metode, ki se bodo lahko uporabljala ne samem mestu vzorčenja. Prav tako bo potrebno razviti cenovno ugodne prenosne naprave za uporabo na terenu, hitre metode izolacije nukleinskih kislin in možnost sočasnega določanje več tarč hkrati. Z izboljšavami in prenosom tehnologije v enostavne in hkrati cenovno dostopne teste lahko izotermne metode kot sta LAMP in RPA predstavljajo revolucijo v določanju patogenov na terenu.

**Zahvala.** Avtorja se za finančno podporo zahvaljujeta Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077).

## 5 LITERATURA

- Babu, Binoy, Francisco M. Ochoa-Corona, and Mathews L. Paret. 2018. "Recombinase Polymerase Amplification Applied to Plant Virus Detection and Potential Implications." *Analytical Biochemistry* 546: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>.
- Bester, Rachele, and Hans J. Maree. 2022. "A Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for the Detection of Plum Viroid I (PIVd-I)." *Journal of Virological Methods* 306 (May). <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114543>.
- Bhat, Alangar I., Rashid Aman, and Magdy Mahfouz. 2022. "Onsite Detection of Plant Viruses Using Isothermal Amplification Assays." *Plant Biotechnology Journal* 20 (10): 1859–73. <https://doi.org/10.1111/pbi.13871>.
- Bhuvitarkorn, S., S. Klinkong, and K. Reanwarakorn. 2019. "Enhancing Columnea Latent Viroid Detection Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)." *International Journal of Agricultural Technology* 15 (2): 215–28.
- Boubourakas, I N, S Fukuta, and P E Kyriakopoulou. 2009. "Sensitive and Rapid Detection of Peach Latent Mosaic Viroid by the Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification." *Journal of Virological Methods* 160 (1–2): 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.021>.
- Craw P, Balachandran W. 2012. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*. 12(14):2469-2486. DOI: 10.1039/c2lc40100b. PMID: 22592150.
- Hammond, Rosemarie W., and Shulu Zhang. 2016. "Development of a Rapid Diagnostic Assay for the Detection of Tomato Chlorotic Dwarf Viroid Based on Isothermal Reverse-Transcription-Recombinase Polymerase Amplification." *Journal of Virological Methods* 236: 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.06.013>.
- Ivanov, Aleksandr V., Irina V. Shmyglya, Anatoly V. Zherdev, Boris B. Dzantiev, and Irina V. Safenkova. 2020. "The Challenge for Rapid Detection of High-Structured Circular Rna: Assay of Potato Spindle Tuber Viroid Based on Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Tests." *Plants* 9 (10): 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants9101369>.
- Jiao, Jian, Kangkang Kong, Jimeng Han, Shangwei Song, Tuanhui Bai, Chunhui Song, Miaomiao Wang, et al. 2020. "Field Detection of Multiple RNA Viruses/Viroids in Apple Using a CRISPR/Cas12a-Based Visual Assay." *Plant Biotechnology Journal*, 1–12. <https://doi.org/10.1111/pbi.13474>.
- Kappagantu, M, D E V Villamor, J M Bullock, and K C Eastwell. 2017. "A Rapid Isothermal Assay for the Detection of Hop Stunt Viroid in Hop Plants (*Humulus Lupulus*), and Its Application in Disease Surveys." *Journal of Virological Methods* 245: 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.002>.
- Kim, Na Kyeong, Hyo Jeong Lee, Tae Ho Ryu, In Sook Cho, Ho Jong Ju, and Rae Dong Jeong. 2021. "Detection of Apple Scar Skin Viroid by Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay." *Research in Plant Disease* 27 (2): 79–83. <https://doi.org/10.5423/RPD.2021.27.2.79>.
- Kovalskaya, Natalia, and Rosemarie W. Hammond. 2022. "Rapid Diagnostic Detection of Tomato Apical Stunt Viroid Based on Isothermal Reverse Transcription-Recombinase

- Polymerase Amplification.” *Journal of Virological Methods* 300: 114353. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114353>.
- LaBarre, Paul, Kenneth R. Hawkins, Jay Gerlach, Jared Wilmoth, Andrew Beddoe, Jered Singleton, David Boyle, and Bernhard Weigl. 2011. “A Simple, Inexpensive Device for Nucleic Acid Amplification without Electricity-toward Instrument-Free Molecular Diagnostics in Low-Resource Settings.” *PLoS ONE* 6 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019738>.
- Lee, Hyo Jeong, Hyun Ju Kim, Keumhee Lee, and Rae Dong Jeong. 2020. “Rapid Detection of Peach Latent Mosaic Viroid by Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification.” *Molecular and Cellular Probes* 53 (May): 101627. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101627>.
- Lenarcic, R, D Morisset, N Mehle, and M Ravnkar. 2013. “Fast Real-Time Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by RT-LAMP.” *Plant Pathology* 62 (5): 1147–56. <https://doi.org/10.1111/ppa.12017>.
- Li J, Macdonald J. 2015. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron.* 64:196-211. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.069.
- Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix Von Stetten. 2019. “Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification.” *Analytist* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>.
- Liu, X L, X T Zhao, I Muhammad, B B Ge, and B Hong. 2014. “Multiplex Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Simultaneous Detection of CVB and CSVd in Chrysanthemum.” *Journal of Virological Methods* 210C: 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.008>.
- Lobato, Ivan Magriñá, and Ciara K. O’Sullivan. 2018. “Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
- Lu, W X, Z X Zhang, P S Xu, S X Liu, H Q Wang, D M Jiang, and S F Li. 2012. “Simultaneous Detection of Three Viroid Species Infecting Hops in China by Multiplex RT-PCR.” *Journal of Phytopathology* 160 (6): 308–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01898.x>.
- Mori, Yasuyoshi, and Tsugunori Notomi. 2009. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Accurate, and Cost-Effective Diagnostic Method for Infectious Diseases.” *Journal of Infection and Chemotherapy* 15 (2): 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51:263-73. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Notomi, T, H Okayama, H Masubuchi, T Yonekawa, K Watanabe, N Amino, and T Hase. 2000. “Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA.” *Nucleic Acids Research* 28 (12): E63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871386>.
- Panno, Stefano, Slavica Matić, Antonio Tiberini, Andrea Giovanni Caruso, Patrizia Bella, Livio Torta, Raffaele Stassi, and Salvatore Davino. 2020. “Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology.” *Plants* 9 (4): 1–28. <https://doi.org/10.3390/plants9040461>.
- Park, J, Y Jung, E J Kil, J Kim, D Thi Tran, S K Choi, J Y Yoon, W K Cho, and S Lee. 2013. “Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of Chrysanthemum

- Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd).” *Journal of Virological Methods* 193 (1): 232–37. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.016>.
- Piepenburg, Olaf, Colin H. Williams, Derek L. Stemple, and Niall A. Armes. 2006. “DNA Detection Using Recombination Proteins.” *PLoS Biology* 4 (7): 1115–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- Rigano, Luciano A., Florencia Malamud, Ingrid G. Orce, Maria P. Filippone, Maria R. Marano, Alexandre Morais Do Amaral, Atilio P. Castagnaro, and Adrian A. Vojnov. 2014. “Rapid and Sensitive Detection of Candidatus Liberibacter Asiaticus by Loop Mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral Flow Dipstick.” *BMC Microbiology* 14 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-86>.
- Soliman, H. in El-Matbouli, M. 2010. “Loop mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of cyprinid herpes virus-3”, *Molecular and Cellular Probes*, 24: 38-43.
- Tangkanchanapas, P, M Höfte, and K De Jonghe. 2018. “Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Designed for Fast and Sensitive on-site Detection of Pepper Chat Fruit Viroid (PCFVd).” *Journal of Virological Methods* 259: 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.003>.
- Thanarajoo, S S, L L Kong, J Kadir, W H Lau, and G Vadamalai. 2014. “Detection of Coconut Cadang-Cadang Viroid (CCCVD) in Oil Palm by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP).” *Journal of Virological Methods* 202: 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.024>.
- Tsutsumi, N, H Yanagisawa, Y Fujiwara, and T Ohara. 2010. “Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification.” *Research Bulletin Of The Plant Protection Service Japan* 46: 61–67.



## A SNAPSHOT OF MESO- AND MACROORGANISMS IN COMPOSTING HOP WASTE BIOMASS

Ana KARNIČNIK KLANČNIK<sup>1</sup>, Magda RAK CIZEJ<sup>2</sup> and Barbara ČEH<sup>3</sup>

Professional paper / Strokovni članek

Received / Prispelo: 20. 10. 2022

Accepted / Sprejeto: 30. 11. 2022

### Abstract

This study offers a snapshot of meso- and macroorganisms inside the composting pile of hop biomass after harvest (stems and leaves of hop plants) after five months of on-site composting. Three composting piles (three treatments) were prepared right after the harvest in September 2021. Composting technology was performed the same way for all of them (turning the pile according to the daily measurements of the temperature, after turning the pile is formed back into a trapezoidal shape each time, covering with a permeable membrane after the thermophilic phase), differences among piles were in the initial size of the plant particles, in composting additives added at the piles preparation (biochar, effective microorganisms, no additive) and in the number of pile turnings. In January 2022, eight different meso- and macrofauna species were detected. Phylum Arthropoda species were the most dominant in all piles. The mesofauna was dominated by Springtails (Collembola) in size between 100 µm and 2 mm and Mites. The macrofauna was dominated by Springtails (Collembola) in size 2 mm to 20 mm wide, Spiders, Centipedes, Soldier flies, and larvae of Fungus Gnats. In the pile with biochar there was lower diversity than in the composting pile with effective microorganisms and in the one without additive, probably because temperatures in the thermophilic phase in this pile were reaching above 65°C. There were just springtails, mites and larvae present in that pile. The highest diversity was in the composting pile with small parts of hop stems and with effective microorganisms added at the beginning.

**Keywords:** *Humulus lupulus* L., hop waste biomass, composting biomass, compost fauna, Arthropoda, biodiversity, LIFE project, BioTHOP

## MEZO- IN MAKROORGANIZMI V KOMPOSTIRAJOČI HMELJEVINI

### Izveček

Študija podaja vpogled na mezo- in makrofavno v kompostirajoči hmeljevini (stebila

---

<sup>1</sup> M. Sc. Biotech., Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS), e-mail: ana.karnicnik@ihps.si

<sup>2</sup> PhD, IHPS, e-mail: magda.rak-cizej@ihps.si

<sup>3</sup> PhD, IHPS, e-mail: barbara.ceh@ihps.si

in listi hmelja - biomasa, ki ostane po obiranju hmelja) po petih mesecih kompostiranja. V septembru 2021, dan po obiranju hmelja, smo pripravili tri kompostne kupe (obnavanja). Pri vseh je bila tehnologija kompostiranja izvedena enako (obračanje kupa glede na dnevne meritve temperatur v kupu, kup vsakič po obračanju oblikovan nazaj v trapezoidno obliko, pokrivanje s permeabilno membrano po termofilni fazi), razlike med njimi pa so bile v začetni velikosti delcev biomase, v dodatkih za kompostiranje, ki so bili dodani ob pripravi kupov (bioogljje, učinkoviti mikroorganizmi, brez dodatka) in v številu obračanja kupa. V januarju 2022 smo odkrili osem različnih skupin mezo- in makrofavne, med njimi so v vseh kupih prevladovali predstavniki debela členonožcev. Najbolj pogosti predstavniki mezofavne so bili skakači velikosti 100  $\mu\text{m}$  do 2 mm in pršice, makrofavne pa skakači velikosti 2 mm do 20 mm, pajki, stonoge, mrtvaške mušice ali žalovalke in ličinke muh. V kupu z bioogljem je bila pestrost manjša kot v kupu z učinkovitim mikroorganizmi in v kupu brez dodatkov, verjetno zato, ker so temperature v termofilni fazi v tem kupu večkrat presegle 65°C. V tem kupu so bili le skakači, pršice in ličinke žuželk. Največja pestrost mezo- in makrofavne je bila v kompostnem kupu z majhnimi začetnimi delci stebel in dodanimi učinkovitim mikroorganizmi.

**Ključne besede:** *Humulus lupulus* L., hmeljevina, rastlinska biomasa, kompostiranje, kompost, favna komposta, členonožci, biodiverziteteta, LIFE projekt, BioTHOP

## 1 INTRODUCTION

Composting is a process in which the organic matter gets degraded by microbes under aerobic conditions to obtain a stable material that can be used as organic fertilizer (Bustamante et al. 2010). The trend towards more efficient methods of compost production and handling requires a complete understanding of the process, the materials involved, and the physical parameters of the materials such as moisture content, bulk density, and various mechanical properties (Agnew, 2003). However, to obtain a high-quality compost it is necessary to understand the process involved as well as to evaluate the most suitable performance conditions for certain biomass (Khater, 2015).

Composting hop waste biomass (stems and leaves of hop plants that stay next to the harvest hall after the cones harvest) on hop farms and use the compost for fertilization is one of the ways to close the nutrient cycle in hop farms, as well as introduce circular economy. Within the European project LIFE BioTHOP, biodegradable and compostable twine made from polylactic acid (PLA) was being developed as a replacement for plastic twine, which serves for climbing hop plants support during growth nowadays. This makes post-harvest biomass processing

easier, as the whole mixture of biomass and BioTHOP twine degrades together at proper composting conditions and there are no artificial leftovers in the final product. The guidelines for proper on-farming composting have to be defined to get good and safe compost. Luskar et al. (2021) found out that under controlled on-farm conditions composting hop waste biomass intertwined with BioTHOP PLA twine exceeded the minimum limit temperature (55°C) for PLA degradation and biomass hygeinization. The final composts in that reaserch exceeded the average concentration of macronutrients (C, N, P, K) for hop biomass compost and compost's water extracts had a good effect on cress seed germination, meaning that composts were not toxic, contrary they had positive effect. Luskar and Čeh (2021) reported, that hop biomass composting approach has a significant impact on compost microbiological properties.

Compost is normally populated by three general categories of microorganisms: bacteria, actinomycetes and fungi. It is primarily the bacteria, and specifically the thermophilic bacteria (Sánchez et al., 2017). While processes of nutrient cycling are governed directly by microbes, such as bacteria and fungi, they are also affected by soil animals that live alongside them. Soil fauna affect decomposition processes both directly, through fragmentation and comminution of litter material, and indirectly by altering microbial function through grazing of the soil microbial biomass and through excretion of nutrient rich wastes. The movement of animals through soil influences the dispersal of microbial propagules attached to the animal body surfaces or transiting through their guts (Cole et al., 2006). Invertebrates co-exist with the microbes and are essential to a healthy compost pile. One classification into three groups (micro-, meso- and macroorganisms) derives from their size and the way they interact with their habitats (Anderson, 1988).

Microfauna are protozoa and invertebrates of less than 100 µm, mostly nematodes. The participants of diverse group of mesofauna, invertebrates, are of sufficient size to overcome the surface tension of water on soil particles but are not large enough to disrupt the soil structure in their movement through soil pores (body width between 100 µm and 2 mm). They include Acari (mites), Collembola (springtails), enchytraeid worms, small Diplopoda (millipedes), and many small larval and adult insects. Acari, and Collembola are being by far the most abundant and diverse (Culliney, 2013). Studies of the mesofauna have concentrated on springtails and mites. This group consists principally of species of the acarine taxa Oribatida, Prostigmata, and Mesostigmata, and the Collembola. Large numbers of microarthropods are found in most soils in a variety of environments from equatorial to polar regions and from temperate and tropical forests and grasslands to hot and cold deserts. As part of the mesofauna, the microarthropods comprise the important middle links of soil food webs, serving, in their role as both predator and prey, to channel energy from the soil microflora and microfauna to the macrofauna on higher trophic levels (Culliney, 2013).

Macrofauna consists of species large enough to disrupt the soil by their burrowing and feeding (2 mm to 20 mm wide). The most important taxa are Isopoda (woodlice), larger Diplopoda, earthworms, Isoptera (termites), Coleoptera (beetles), Diptera (flies), ants, and molluscs (snails, slugs). They are more active in the later stages of the composting process, when temperatures have dropped but decomposition is not complete (Culliney, 2013). Arthropods function are on two of the three broad levels of organization of the soil food web (Lavelle, 1995): they are “litter transformers” or “ecosystem engineers.” Litter transformers, of which the microarthropods comprise a large part, fragment, or comminute, and humidify ingested plant debris, improving its quality as a substrate for microbial decomposition and fostering the growth and dispersal of microbial populations. Ecosystem engineers are those organisms that physically modify the habitat, directly or indirectly regulating the availability of resources to other species. In the soil, this entails altering soil structure, mineral and organic matter composition, and hydrology (Culliney, 2013).

These organisms play a very important role in ecosystems. A food web is a complex interaction of food chains in a biological community. In order to understand the decomposition process within an ecosystem, it is essential to assess the populations of these groups. The microbial mineralization of nutrients may be stimulated by arthropod grazing. Several studies have demonstrated that grazing by Collembola has a strong stimulatory effect on fungal growth and respiration (Filser, 2002; Culliney, 2013).

The microbial world of final compost from hop biomass (no other biomass added) in one of the early investigations by Luskar and Čeh (2021) was dominant by bacteria and it lacked microbial diversity, which is an important property of quality compost. Fast changing conditions in compost demand fast adaptation of microbes that can only be tackled by diversity. The most biodiverse compost was the one with biochar added at the beginning, followed by compost with no additive and finally by the compost with effective microorganisms added. Compost with no additive and compost with biochar had many amoebae, while compost with effective microorganisms lack these organisms. Bacteria are preyed upon by protozoa and nematodes, while fungi are preyed upon amoebae, nematodes, and micro-arthropods. Part of mycelium was found only in compost where biochar was added and, in the compost, with no additive. In general, all composts lacked diversity, which is main property of quality compost. Due to their fast reproduction, the number does not play such important role as their diversity.

The goal of composting would be compost, rich in nutrients, safe and also rich in microorganisms and in fauna. The aim of this study was to take a snapshot of diversity of mesofauna and macrofauna in composting hop biomass (stems and leaves of hop plants after hop cones harvest, no other biomass added) in winter - after four months of on-site composting (in January 2022).

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Experiment layout and weather conditions

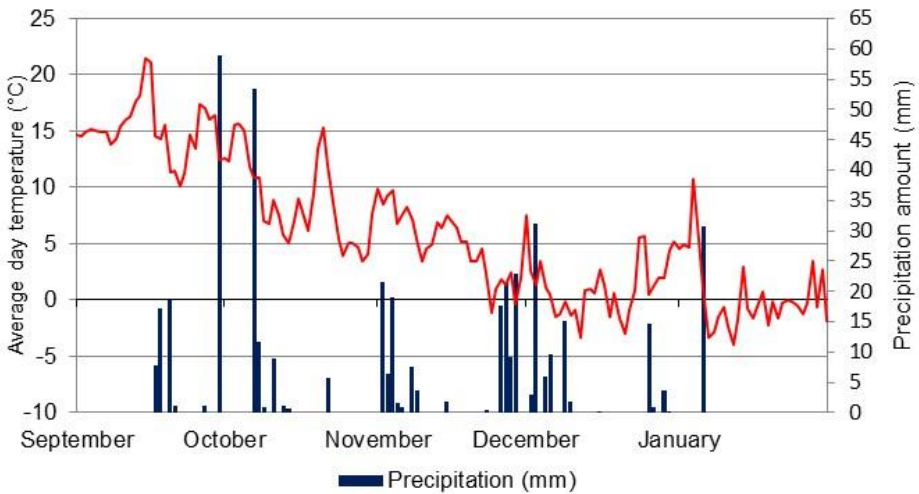
Experiment was conducted in September 2021 in Lower Savinja Valley, Slovenia (Žalec). Each of three composting piles was prepared right after hop cones harvest in Sept. 2021 in a trapezoidal shape with a height of 2 m from approximately 15 tonnes of biomass. Differences among piles were in the initial size of the biomass particles, in composting additives which were added at the beginning of composting (biochar, effective microorganisms - EM<sup>TM</sup>, no additive) and in the number of pile turnings, which were done in correspondence to the regular temperature measurements (Table 1). Biochar named Biočar from Slovenian company C-produkt d.o.o. (activated carbon prepared from soft wood varieties) and EM<sup>TM</sup> from company named Multikraft is a mixture of bran mixed with molasses (sugar and water), enriched with beneficial microorganisms (lactic acid bacteria, yeasts, photosynthetic organisms, enzymatically active fungi - over 80 different species of aerobic and anaerobic microorganisms; Multikraft, 2022) were used.

*Table 1: Composting pile parameters*

Compo- sting pile	Initial size of hop stems (cm)	Additive, mixed in at the conduction of the pile	Pile turning	Duration of thermophilic phase* (days)	Average T in thermophilic phase* (°C)	Max measured T (°C)
A	2-5	Biochar (3,3 kg/t)	7 times	85	74,4	79,2
B	1-5	Effective micro- organisms (EM <sup>TM</sup> ) (2 L/t)	4 times	52	71,8	76,1
C	2-10	No additive	4 times	29	57,5	68,9

\* Temperatures in the pile above 50 °C.

Regular temperature measurements were performed in the first three months by inserting the thermometer 50 and 100 cm deep into the pile. Piles were turned / mixed when temperature was above 65 °C. The temperature in piles was measured by a modified compost digital thermometer probe. Because of different properties T was raising differently and that is also why the number of turnings, present in Table 1, is different related to the treatment. At the end of November 2021, we covered the piles with semipermeable cover until April 2022. Precipitation is not expected to interfere with composting process, because in the thermophilic phase, temperature and humidity inside the pile are key to successful composting, while most of the rain ran off the surface of a properly constructed pile and the pile was drying each time we turned/mixed it.



**Figure 1:** Precipitation amount and average daily temperatures in the first four months of composting (from september 2021 to February 2022) (ARSO, 2022)

## 2.2 Sampling and classification of fauna

For the present study, we made sampling of composting biomass twice in January 2022 at all three composting piles. Samples were handpicked randomly from two different levels in the piles (50 cm and 100 cm deep) and at different piles sides (north, south, east, west). Appr. 0.5 kg of biomass was collected at each pile this way for the study. A visual evaluation of the biomass was made at sampling as well, including smell, colour, estimation of biomass degradation, moisture content and PLA twine degradation observation. The mechanical method including hand sorting was used along with direct stereomicroscope observations for separation of insect fauna on petri dish. The collected biomass sample from each pile was well mixed and put on a tray (d= 33 cm). The biomass was split into four parts. From each quarter, we selected samples of about 2 grams biomass on 4 different places (marked with red circles on the Figure 1), shown on Figure 2. Sample of each quarter was putted on petri dish (d=7cm) and viewed under a Stereomicroscope. The results of observations were then summed at the end (8 g sample from 1 compost pile).

The present organisms were further identified and classified using identification keys. The references and keys used for the study were: *Živali naših tal* (The Animals of our Soil) by N. Mršič and *A general textbook of Entomology* by A.D. Imms (tenth edition 1977). Along with these two major references, some internet references (<https://www.gbif.org/>) were also used for the identification purpose. At the end, the results of observations were summed (8 g sample from 1 compost pile).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Temperature in the piles and visual evaluation

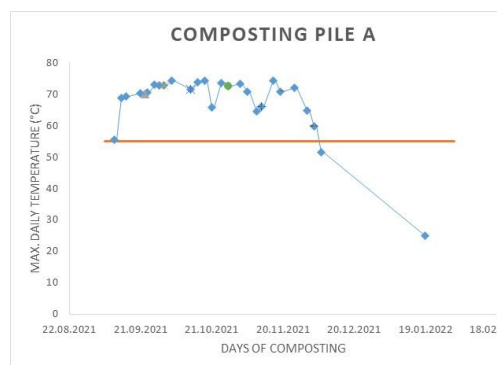
The thermophilic phase is not only important for elimination of plant pathogens and inactivation of weed seeds (Bollen and Volker, 1996) but also for PLA hydrolysis to lactic acid (Drumright et al., 2000; Garlotta, 2002; Kawai, 2010). However, too high temperatures on the other side can negatively affect compost parameters, including microorganisms. Thermophilic conditions were established one day after pile conduction already; the temperature increased up to 70 °C in the composting piles A and B (both with additives). The longest period of the thermophilic phase (temperatures above 75 °C) was detected in the pile A (Table 1). The temperatures reached in this pile were relatively high. Optimal temperatures in the thermophilic phase range between 45-65 °C (Amlinger, 2009).

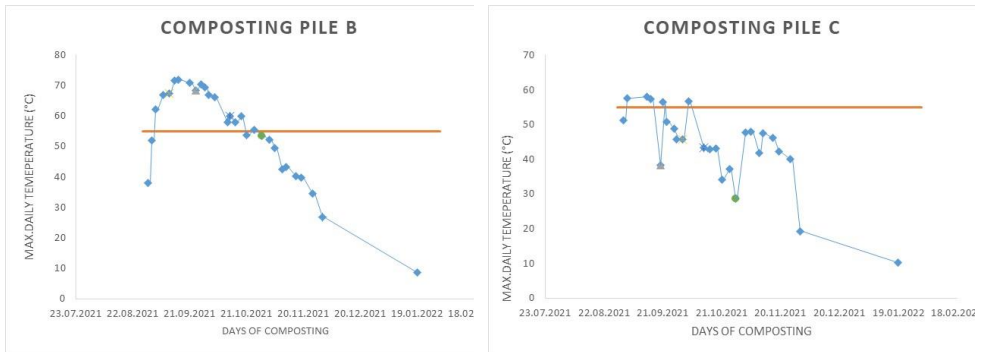
In January 2022, in the time of taking samples, the temperature in composting piles B and C was app. 10 °C, while in the composting pile A was 45 °C and 12°C in the depth of 100 cm and 50 cm respectively. Material in composting piles with larger input particle sizes (A and C) was less degraded than material in the composting pile with smaller input particle size (B) at visual observation (Figures 4). BioTHOP PLA twine was still visible and poorly degraded (marked with blue ellipse on the Figure 5), while in the composting pile with smaller particle input size and effective organisms added (B) there were only some remnants of the twine.

Composting piles B and C had an earthy smell, while sample from the pile A had a non-earthy, but not unpleasant smell, and it was darker.



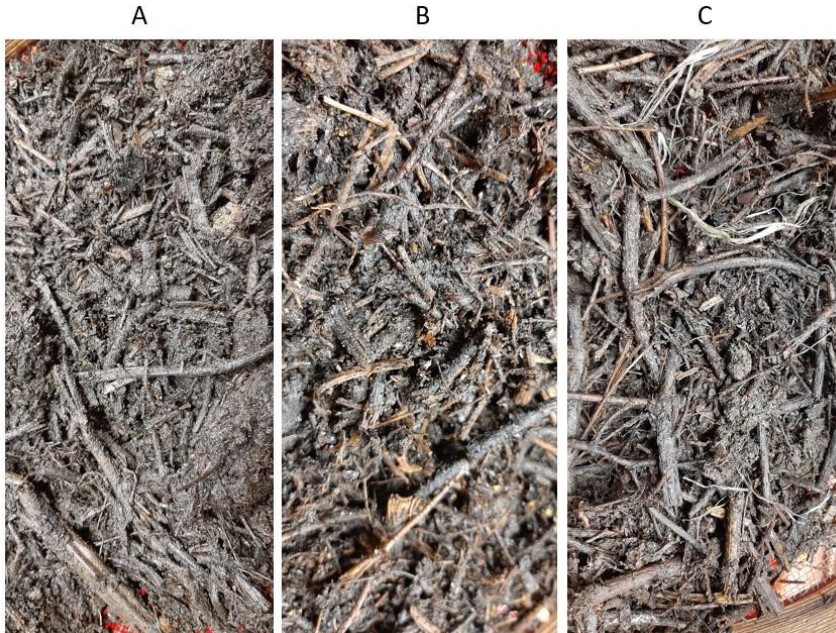
Figure 2: Sampling method.





**Figures 3:** Maximum daily temperature in the core of the composting pile, during first four months of composting in composting pile A (up right, composting pile B (down left) and composting pile C (down right). Horizontal line is hygienisation threshold.

Visual observation showed that the most optimally degraded compost was composting pile B. Also, Luskar et al. (2021) stated that the most suitable particle size for composting hop biomass is 5 cm or less. All compost had suitable temperatures to satisfy criteria for hygienisation and PLA hydrolysis to lactic acid.



**Figure 4:** Composting biomass samples – closer look after 5 months of composting related to the composting pile (A, B and C)





**Figure 5:** Composting biomass samples after 5 months of composting in piles A, B and C. The presence of the BioTHOP PLA twine is marked with ellipse.

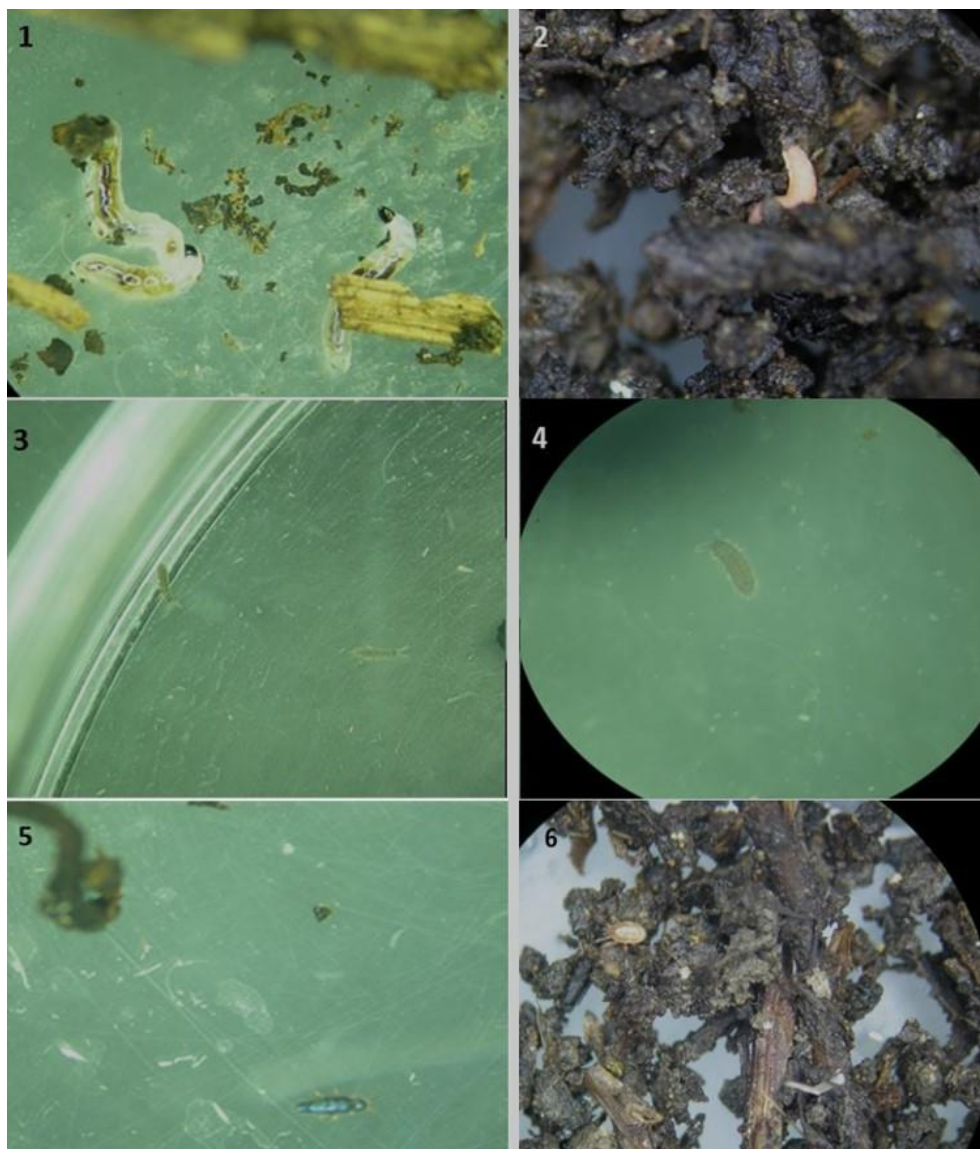
### 3.2 Identification of fauna

Table 2 presents results of detected mesofauna and macrofauna in the samples.

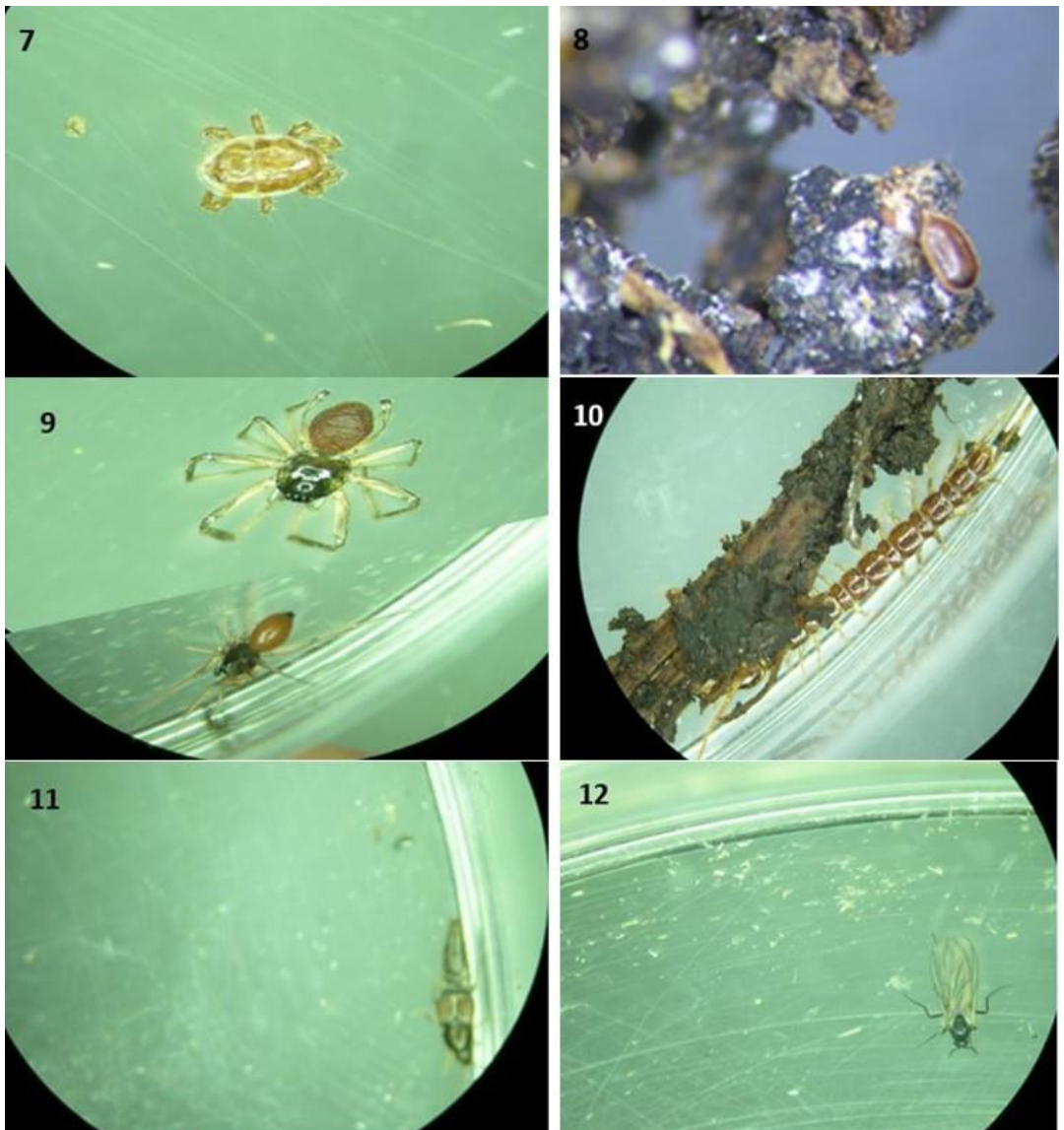
**Table 2:** Organisms visually detected in the investigated composting piles in 8 g composting biomass samples.

	Type	Composting pile A	Composting pile B	Composting pile C
Springtails	Mesofauna	More than 10 and different colours		
Mites	Mesofauna	More than 10	More than 10	More than 10
Centipedes	Macrofauna	Not detected	2	Not detected
Spiders	Macrofauna	Not detected	1	1
Soldier Fly	Macrofauna	Not detected	1	1
Rove Beetle	Macrofauna	Not detected	1	Not detected
Larve of Fungus Gnats	Macrofauna	2-5	2-5	2-5
Diptera Larva	Macrofauna	Not detected	1	Not detected

Figure 6 presents the detected organisms visually under stereomicroscope. In the investigated biomass samples, eight different fauna species were found. Phylum Arthropoda was dominant, among them phylum, class Insecta and class Arachnida.



is continuing on the next page ...



**Figure 6:** Organisms in the investigated composting piles under a Stereomicroscope: 1 - Larvae of Fungus gnats: Mycetophilidae of Sciaridae, 2 - Diptera Larvae, 3 and 4 and 5 - Springtails (Collembola), 6 and 7 - Mites (Gamasina), 8 - Mite (Uropodina), 9 - Spiders (Araneae), 10 - Centripedes (Lithobiomorpha), 11 - Rove Beetles (Staphylinidae), 12 - Soldier Fly (Diptera)

### 3.2.1 Springtails (Pictures 4 and 5 in Figure 6)

**Phylum:** Arthropoda; **Sub-phylum:** Hexapoda; **Class:** Entognatha; **Order:** Collembola

Springtails were found in all samples; they were extremely numerous and different colours in all samples. They are very small wingless insects and can be distinguished by their ability to jump when disturbed. They are usually less than 5 mm and the smallest do not exceed 1 mm. Surface species are often brightly coloured (blue-violet, green, grey-brown, etc.), while deep-coloured species are colourless, white (Mršić, 1977). They run in and around the particles in the compost and have a small spring-like structure under the belly that catapults them into the air when the spring catch is triggered. They chew on decomposing plants, pollen, grains, and fungi. They also eat nematodes and droppings of other arthropods and then meticulously clean themselves after feeding. They are primarily detritivores and microbivores thus help in controlling overgrowth of microbial population in compost (Mršić, 1997).

### 3.2.2 Mites (Pictures 6, 7 and 8 in Figure 6)

**Phylum:** Arthropoda; **Sub-phylum:** Chelicerata; **Class:** Arachnida; **Sub-Class:** Acari; **Order:** Mesostigmata; **Suborder:** Monogynaspida; **Infraordo:** Gamasina and Uropodina

Mesostigmatas were found in all compost samples and were extremely numerous. Mites were the second most common invertebrate found in all our samples of composts. They have eight leg-like jointed appendages. Some can be seen with the naked eye and others are microscopic. Some scavenge on leaves, rotten wood, and other organic debris. Some species eat fungi, yet others are predators and feed on nematodes, eggs, insect larvae and other mites and springtails. Some are both free living and parasitic. One very common compost mite is globular in appearance, red-orange in colour- Mesostigmata and have been found in all composts- A, B and C.

Adult epedaphic Gamasina are large (ca. 0.8–1.5 mm) and long-legged, well sclerotized. They hunt on the soil surface in the litter layer for other small arthropods, particularly Collembola. Gamasina do not change soil structure or plant productivity directly. However, as predators, they influence population growth of other organisms and thereby have an indirect effect on overall ecosystem performance. In the last few decades, they have gained an increasing interest in the context of bioindication, pests and pest control, decomposition, and human health. Because of their abundance, species richness and distribution as well as from their position in the web of interactions within the agroecosystem, Gamasina are good indicators of soil conditions, ecological disturbance and anthropogenic impact (Koehler, 1999).

### 3.2.3 Centipedes (Picture 10 in Figure 6)

**Phylum:** Arthropoda; **Sub-phylum:** Myriapoda; **Class:** Chilopoda; **Order:** Lithobiomorpha

Centipede is fast moving predator. There were a few of them found in the top few inches of the compost pile B. The species is app. 15 millimetres long and 1 millimetre wide. It is pale brown in colour with 15 pairs of legs. Centipede have formidable claws behind their head which possess poison glands that paralyze small red worms, insect larvae, newly hatched earthworms, and arthropods mainly insects and spiders. Controls insect growth in compost. Centipedes are sensitive to pollution, mainly affected by the bio-accumulation of individual pollutants, especially metals-zinc, cadmium, copper (Mršić, 1997).

### 3.2.4 Spiders (Picture 9 in Figure 6)

**Phylum:** Arthropoda; **Sub-phylum:** Chelicerata; **Class:** Arachnida; **Sub-Clas:** Acari; **Order:** Araneae

Spiders were present in sample B and C, but not in the sample A. Spiders are attracted by ready source of food such as invertebrates in composts. Most spiders in compost are harmless and work as scavengers (Mršić, 1997).

### 3.2.5 Soldier fly (Picture 12 in Figure 6)

**Phylum:** Arthropoda; **Sub-phylum:** Hexapoda; **Class:** Insecta; **Sub-Clas:** Pterygota; **Order:** Diptera

Soldier fly was present in the samples of the composting piles B and C. They are an important animal group for pedogenetic processes. This is especially true for larvae, as adult animals do not live in the soil. Larvae are saprophagous scavengers, voraciously eat the debris, while the adult fly feeds upon vegetable trash. They take part in many important biological processes in soil such as the decomposition of plant litter and nutrient cycling. Soil dwelling Diptera include groups and species that vary in size as well as in food and ecological demands (Frouz, 1999).

### 3.2.6 Rove beetle (Picture 11 in Figure 6)

**Phylum:** Arthropoda, **Class:** Insecta, **Order:** Coleoptera, **Suborder:** Polyphaga, **Infraorder:** Staphyliniformia, **Superfamily:** Staphylinioidea, **Family:** Staphylinidae

Rove beetle was found in the compost pile B. They concentrate in fallen decomposing fruits, the space under loose bark of fallen, decaying trees, drifted plant materials on banks of rivers and lakes, and dung, carrion, and nests of vertebrate animals. They suppress populations of pest insects and mites in numerous crops (agricultural, horticultural, and forest entomology), and of biting flies (including mosquitoes), and fleas. Staphylinidae form a substantial part of the world's biodiversity (Howard, 1999).

### **3.2.7 Larvae of fungus gnats: Mycetophilidae (Picture 1 in Figure 4) and Diptera Larva (Picture 2 in Figure 6)**

Larvae of Fungus Gnat was present in all samples of compost. Diptera Larva was found in the composting pile B. About 75% of all insect species go through the four stages of complete metamorphosis - egg, larva, pupa, and adult. The larva is a specialized feeding stage that looks very different from the adult. Fortunately, there are just a few basic larval types and they are relatively easy to recognize. Thicker thoracic legs, a more box-shaped head, and wider abdomen. Fungus gnat larvae resemble midge larvae but do not have fleshy legs. They live in moist, decaying organic matter, especially accumulations of fallen leaves or dead grass (Mršić, 1997).

## **4 CONCLUSIONS**

Mesofauna and macrofauna comprise diverse organisms of various shapes and sizes right from tiny mites to large insects in the investigated composting biomass. Their role is to crush/break down organic material that than provide nutrients for the entire food web and thus restore natural balance in the compost. In the presented research, we wanted to found out mesofauna and macrofauna witch include predators, scavengers and decomposers are housed by composting hop biomass in winter.

Mesofauna and macrofauna in the composting process have a role as regulators for microbial activity and as microbial feeders. The fauna abundance in our investigated composting piles after five months of the composting process star, in January 2022, was dominated by Springtails, Mites, Spider, Centipeds, Soldier flies, Larves. The diversity of mesofauna and macrofauna in this stage was higher in the composting piles B and C compared to composting pile A. In the compost pile A, there were just springtails, mites and larvae. This could be attributed to higher temperatures (too high obviously) in the thermophilic phase.

Small particle size, through its effect on increased surface area, encourages microbial activity and increases the rate of decomposition, potentially the diversity of the mesofauna, macrofauna will increase; this was reflected in composting pile B.

However, the higher diversity in this pile can also be a consequence of added effective microorganisms at the composting pile formation.

In this stage of composting process, numerically the most abundant in all composting piles were Springtails and Mites.

A deeper understanding of diversity of fauna in compost mixtures of hop waste biomass is necessary, in order to assess the effect of composting which may further improve soil structure. We would like to gain mature compost, rich in nutrients, safe and also rich in microorganisms and in fauna. The composting hop biomass contained invertebrates in this phase majorly Arthropods which are helpful for the formation of quality compost. There was the most diverse presence of Springtails, Mites, Spiders, Centipeds, Soldier flies, Rove Beetle, Larvae in the composting pile with added effective microorganisms EM at the start of composting. In the pile with added biochar, the diversity was the lowest among investigated piles; we found only a Springtail, Mites and Larvae. This was by our opinion the circumstance of very high temperatures, that appear in this pile during the thermophilic phase. In the pile with no additive, the diversity was almost comparable with composting pile with added EM; we found a Springtail, Mites, Soldier flies, Spiders and Larvae. We will repeat the investigation when the composts will be mature, finished.

Arthropods are an important part of the complex ecosystem that is required to decompose organic waste. It is important that the structure of this food chain keeps different populations (meso, macrofauna) under control, maintaining a healthy and balanced compost pile. We anticipate that the number and diversity of organisms will increase by the end of the composting process, which will be a matter of our further research. However, already on this stage it can be suggested that compost from hop waste biomass is a niche for diversity and the abundance of compost mesofauna and macrofauna.

**Acknowledgements.** This research and paper were produced with the contribution of the EU LIFE programme, in the frame of the LIFE project BioTHOP. The contents are the sole responsibility of authors and do not necessarily reflect the opinion of the European Commission. We also thank to all other co-financers of the project: Ministry of the Environment and Spatial Planning of republic Slovenia, municipalities of Lower Savinja Valley: Braslovče, Polzela, Prebold, Tabor, Vranksko, Žalec and Association of Slovenian Hop Growers.

## 5 REFERENCES

- Agnew, J. M., Leonard, J.J., 2003. The Physical Properties of Compost, *Compost Science & Utilization*, 11:3, 238-264, DOI: 10.1080/1065657X.2003.10702132
- Agnew, J.M.; Leonard, J.J. The physical properties of compost. *Compost Sci. Util.* 2003, 11,

- 238–264.
- Amlinger F., Peyr S., Müsken J., 2009. State of the art of Composting. Austrian Ministry for Agriculture and Forestry, Environment and Water Management.
- Anderson, J.M., 1988. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. , 6(3), 216–227. doi: 10.1007/bf00260818
- Bhagawati, S., B. Bhattacharyya, B.K. Medhi, S. Bhattacharjee and H. Mishra: 2020. Diversity and density of Collembola as influenced by soil physico-chemical properties in fallow land ecosystem of Assam, India. *J. Environ. Biol.*, 41, 1626-1631
- Bollen G. J. and Volker D. 1996. Phytohygienic aspects of composting. V: The science of composting. Springer, Dordrecht. 233-246.
- Brussaard, L., 1998. Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes. *Applied Soil Ecology* 9. 123-135.
- Bustamante MA, Suárez-Estrella F, Torrecillas C, Paredes C, Moral R, Moreno J (2010) Use of chemometrics in the chemical and microbiological characterization of composts from agroindustrial wastes. *Bioresour Technol* 101:4068–4074
- Christiansen, K. (1964) Bionomics of Collembola. *Annual Reviews of Entomology* 9, 147–178. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.09.010164.001051>
- Cole L., Bradford A.M., Shaw P. J.A.; Bardgett R. D., 2006. The abundance, richness and functional role of soil meso- and macrofauna in temperate grassland—A case study, 33(2), 0–198. doi:10.1016/j.apsoil.2005.11.003
- Culliney, T.W., Role of arthropods in maintaining soil fertility. *Agriculture* 2013, 3, 629–659. -<https://doi.org/10.3390/agriculture3040629>
- Drumright R. E., Gruber P. R. in Henton D. E. 2000. Polylactic acid technology. *Advanced materials*, 12(23): 1841-1846.
- Epstein, E. 1991. Basic Concepts. V: The Science of Composting. Epstein E., 1997. Lancaster, Technomic Publishing Inc., p. 19-52.
- Filser, J. The role of Collembola in carbon and nitrogen cycling in soil. *Pedobiologia* 2002, 46, 234–245. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00130>
- Frouz, J., 1999. Use of Soil Dwelling Diptera (Insecta, Diptera) as bioindicators: a review of ecological requirements and response to disturbance, Editor: M.G. Paoletti, *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes*, elsevier, 167-186, <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50019-9.50013-3>.
- Garlotta D. 2002. A Literature review of Poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9: 63-84.
- Hopkin, S.P. 1997. *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. 1 Edn., Oxford University Press, Oxford, UK
- Howard, J. F., Thomas M.C., 1999. Rove Beetles of the World, Staphylinidae (Insecta: Coleoptera: Staphylinidae). EDIS. DOI:10.32473/edis-in271-2002
- International Hop Growers' Convention – IHGC. 2020. Economic Commission - Summary Reports. Available at: [http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/2020\\_NOV\\_IHGC\\_EconCommReport.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/2020_NOV_IHGC_EconCommReport.pdf)
- International Hop Growers' Convention. 2020. Economic Commission - Summary Reports. Available at: [http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/2020\\_NOV\\_IHGC\\_EconCommReport.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/2020_NOV_IHGC_EconCommReport.pdf)
- Kawai F. 2010. Polylactic acid (PLA)-degrading microorganisms and PLA depolymerases. *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials* American Chemical Society, p. 405-414.



- Khater, ES.G., 2015. Some Physical and Chemical Properties of Compost. *Int J Waste Resources* 5: 172. DOI: 10.4172/2252-5211.1000172
- Koehler, H.H. 1999. Predatory mites (Gamasina, Mesostigmata). 74(1-3), 395–410. DOI:10.1016/S0167-8809(99)00045-6
- Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D. *et al.* 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant Soil* 170, 23–33 (1995). <https://doi.org/10.1007/BF02183052>
- Luskar, L., Čeh, B., 2021. Hop Biomass Composting Approach Impact on Compost Microbiological Properties. *Agricultural Research & Tehnology Open Access Journal*. 26, 2. <https://juniperpublishers.com/artoaj/pdf/ARTOAJ.MS.ID.556329.pdf>
- Luskar, L., Polanšek, J., Čeh, B., 2021. On-site composting of hop biomass with biobased polymeric twine *Environ. 18TH International symposium on Waste Management and Sustainable Landfilling*
- Meghvansi, M.K., Varma, A., 2020. Biology of compost. *Soil Biology*. Springer, Cham. 58. 217-245. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-39173-7>
- Mršič, N., 1997. Živali naših tal. Uvod v pedozoologijo; Sistematika in ekologija s splošnim pregledom talnih živali. Tehniška založba Slovenije, 01.416
- Multikraft. 2022. <https://www.multikraft.com/en/>
- Reddy, N. and Yang Y. Properties of natural cellulose fibres from hop stems. *Carbohydrate Polimers*. 2009; 77(4): 898-902.
- Richards O.W., Davies R.G., 1977. The Classification and Phylogeny of Insects. In: Imms' General Textbook of Entomology. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0472-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0472-4_1)
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., and Swings, J. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (1): 127-137. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01800.x>.
- Sánchez, Ó. J., 2017. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Stork, N.E., Eggleton, P. 1992. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7, pp 38-47 doi:10.1017/S0889189300004446
- Zeppelini, D., B.C. Bellini, A.J. Creao-Duarte and M.I.M. Hernández. 2009. Collembola as bioindicators of restoration in mined sand dunes of North eastern Brazil. *Biodiver. Conser.*, 18, 1161-1170 (2009)

## PRIMERJAVA GNOJENJA S SVEŽO HMELJEVINO V PRIMERJAVI Z ZRELIM KOMPOSTOM IZ HMELJEVINE – LONČNI POSKUS

Barbara ČEH<sup>1</sup>, Žan TROŠT<sup>2</sup> in Ana KARNIČNIK KLANČNIK<sup>3</sup>

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 25. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 8. 12. 2022

### Izvleček

Namen lončnega poskusa je bil ugotoviti, kakšen vpliv ima gnojenje s svežo hmeljevino na vznik ter rast kitajskega kapusa (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis* (L.) Hanelt) v primerjavi z zrelim kompostom iz hmeljevine. Poskus smo zastavili kot lončni poskus s tremi obravnavanji v 7 ponovitvah (premer lončkov 11 cm). Obravnavanja: K (kontrola): 185 g substrata; SH (sveža hmeljevina): 27 g sveže hmeljevine + 148 g substrata; ZK (zrel kompost): 27 g zrelega komposta + 148 g substrata. Po 4 dneh je bilo vzniklih rastlin značilno manj pri SH v primerjavi z ZK in K, kasneje pa med obravnavanji v številu vzniklih rastlin ni bilo značilnih razlik. Masa nadzemnega dela rastlin je bila po 47 dneh, ko smo poskus vrednotili, statistično značilno največja pri ZK, medtem ko v masi med K in SH ni bilo značilne razlike, so pa bili listi pri K bolj blede zelene barve. Vsebnost nitrata v listih je bila značilno večja pri ZK (130 mg/L) kot pri K in SH (19 mg/L oz. 36 mg/L). Vsebnost nitrata v substratu je bila značilno večja pri SH (3,8 mg/L) v primerjavi z ZK in K (<3 mg/L), vsebnost amonijskega dušika pa je bila značilno nižja pri K (0,3 mg/L) v primerjavi z SH in ZK (0,7 mg/L). Gostota in razvejanost koreninskega sistema je bila največja pri ZK in najslabša pri SH.

**Ključne besede:** hmeljevina, gnojenje, lončni poskus, vznik, pridelek, nitrati

## COMPARISON OF FERTILIZATION WITH FRESH HOP PLANT BIOMASS VERSUS MATURE HOP BIOMASS COMPOST - A POT EXPERIMENT

### Abstract

The purpose of the experiment was to determine the effect of fresh hop biomass on the emergence and growth of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis* (L.) Hanelt) compared to mature hop biomass compost. The experiment was set up as a pot experiment with three treatments in 7 replications (pots with diameter of 11

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: barbara.ceh@ihps.si

<sup>2</sup> Mag. inž. hort., IHPS, e-naslov: zan.trost@ihps.si

<sup>3</sup> Mag. biotehn., IHPS, e-naslov: ana.karnicnik@ihps.si

cm). Treatments: K (control): 185 g substrate, SH (fresh hop biomass): 27 g fresh hop biomass + 148 g substrate and ZK (mature compost): 27 g mature compost + 148 g substrate. After 47 days, there were significantly fewer plants emerged in SH compared to ZK and K, but later there were no significant differences between the treatments in the number of emerged plants. The above ground biomass of the plants after 47 days, when we evaluated the experiment, was statistically significantly the highest in ZK, which leaves were the most intensely green at the same time. There was no significant difference in biomass weight between K and SH, but the leaves of K were of paler green colour. The content of nitrate in the leaves was significantly higher in ZK (130 mg/L) compared to K and SH (19 mg/L and 36 mg/L). The content of nitrate in the substrate was significantly higher in SH (3.8 mg/L) compared to ZK and K (<3 mg/L). The content of ammonium nitrogen was significantly lower in K (0.3 mg/L) compared to SH and ZK (0.7 mg/L). The density and branching of the root system was the highest in ZK and the worst in SH.

**Key words:** hop biomass, fertilization, pot experiment, emergence, harvest, nitrates

## 1 UVOD

Hmeljevina je biomasa hmelja (listi in stebila), ki ostane po obiranju storžkov na obiralnih strojih. Z njive je do obiralnega stroja odpeljan skoraj celoten nadzemni del rastlin hmelja z vrstico, ki služi za oporo hmelju med rastno dobo. Povprečna masa hmeljevine je 15 t/ha (Čeh in sod., 2019). Je dober vir rastlinskih hranil in organske snovi, zato je upravičeno njeno vračanje na kmetijske površine.

Kompostiranje je aeroben proces, pri katerem poteka razgradnja organskih snovi s pomočjo mikroorganizmov (Ayilara in sod., 2020). Pri pravilno izvedenem procesu kompostiranja (Čeh in sod., 2022), v dobrega pol leta nastane zrel, kvaliteten kompost, katerega ena tona z vsebnostjo 20 % vlage vsebuje 5,4 kg dušika (N), 2,2 kg kalija (K) in 0,8 kg fosforja (P) (Luskar in sod., 2022). Predvsem z vidika zdravstvenega varstva rastlin je kompostiranje dobra rešitev, saj se ustvari termofilna faza, v kateri se biomasa higienizira (uničenje patogenih organizmov in kalivosti semen plevelov) (Čeh in sod., 2022). Čeprav se raziskujejo novi načini uporabe hmeljevine, kot je na primer izraba njenega antioksidativnega in protimikrobnega delovanja (Abram in sod., 2015) ter izdelava različnih biorazgradljivih izdelkov, kot so vrtnarski lončki, embalaža za steklenice, papir in podobno (LIFE BioTHOP, b.d.), kompostiranje še vedno ostaja najbolj smiseln način predelave biomase za zaključek krogotoka hranil na hmeljarskih kmetijah. Ko je kompostiranje končano, mora biti kompost stabilen in zrel, kar pomeni, da je mikrobna aktivnost znatno zmanjšana in je kompost netoksičen za rastline. Organski razgradni produkti, amonijski dušik, težke kovine in ostanki pesticidov, se med kompostiranjem metabolizirajo ali imobilizirajo, tako da kompost izgubi fitotoksične lastnosti (Sæbø in Ferrini, 2006). Nadzorovano kompostiranje se izvaja za vzdrževanje temperature, ki omogoča

razmnoževanje različnim mikrobnim združbam, kot so bakterije, aktinomicete, glive (Amlinger in sod., 2009).

Kljub vrsti pozitivnih lastnosti, ki jih ima kompostiranje in uporaba zrelega komposta za gnojenje, nekateri hmeljarji še vedno na kmetijske površine vozijo svežo hmeljevino.

Namen lončnega poskusa je bil prikazati oziroma ugotoviti, kakšen vpliv ima gnojenje s svežo hmeljevino na vznik ter rast kitajskega kapusa (*Brassica rapa L. subsp. chinensis (L.) Hanelt*) v primerjavi z zrelim kompostom iz hmeljevine.

## 2 MATERIALI IN METODE DE LA

Poskus smo zastavili kot lončni poskus s tremi obravnavanji v 7 ponovitvah (lončkov premera 11 cm). Obravnavanja so bila:

- K (kontrola): 185 g substrata
- SH (sveža hmeljevina): 27 g sveže hmeljevine + 148 g substrata (razmerje 1:4)
- ZK (zrel kompost): 27 g zrelega komposta + 148 g substrata (razmerje 1:4)

Za vsa obravnavanja smo kot osnovo uporabili profesionalni substrat S25-Biotray+ Eco-mix 70L/45EP—Gramoflor (Vechta, Germany) (pH v CaCl<sub>2</sub>: 5,4–6,2; sestava: 38–90 mg N/l, 106–248 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/l, 362–846 mg K<sub>2</sub>O/l).

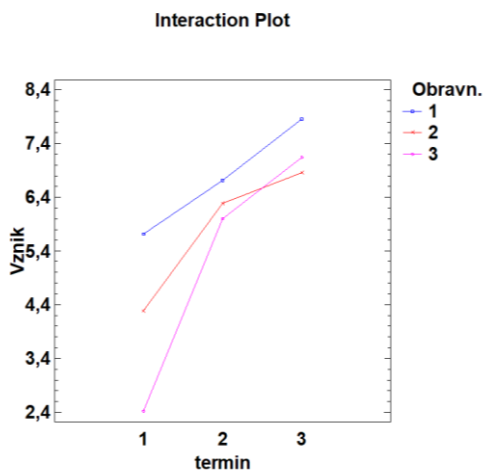
V vsak lonček smo posejali 10 semen kitajskega kapusa (*Brassica rapa subsp. Pekinensis*) in dali lončke v rastno komoro na dnevno temperaturo 24 °C ter nočno 17 °C. Dan je trajal 13 ur, noč pa 11 ur. Relativna zračna vlaga je bila 65 % (Warman, 1999). Po 17 dneh smo ugotovili, da so rastline nekoliko izdolžene, predvidoma zaradi previsokih temperatur, zato smo dnevno temperaturo znižali na 20 °C, nočno pa na 12 °C. Dan je trajal 12 ur, tako kot noč. Zračna vlaga je ostala nespremenjena. Rastline so v takšnih razmerah rastle še 30 dni. Zalivali smo po potrebi z vodovodno vodo, običajno vsak drugi dan, da je bil substrat navlažen, ni pa stala voda v podstavku.

V času trajanja poskusa smo opazovali dogajanje in posebnosti zabeležili. Po 47 dneh smo poskus vrednotili. Prešteli smo število vzniklih rastlin v vsakem posameznem lončku, stehtali maso nadzemnega dela rastlin, ovrednotili pokritost površine substrata s plesnijo, izmerili vsebnost NO<sub>3</sub> v listih s hitrim rastlinskim testom ter vsebnost NH<sub>4</sub> in NO<sub>3</sub> v substratu s hitrim talnim testom RQ-flex (Eijkelkamp, 2022). Podatke smo statistično obdelali z analizo variance, razlike med obravnavanji smo zaznavali z Duncanovim testom (p=0,05).

### 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

#### 3.1 Opazovanja v času trajanja poskusa

Prvo štetje vzniklih rastlin smo izvedli 30. 9. 2022. Značilno manjši vznik je bil pri obravnavanju SH v primerjavi z obravnavanema ZK in K. 10. 10. 2022 in po 47 dneh, ko smo poskus vrednotili, pa med obravnavanji v številu vzniklih rastlin ni bilo značilnih razlik. Po drugi strani pa Luskar in sod. (2022) poročajo, da je bil vznik v lončnem poskusu pri kontroli (substrat brez dodatkov) nekoliko slabši (92,5 %) kot pri obravnavanju substrat + zreli kompost (100 %). Njihov poskus je bil prav tako zastavljen kot lončni poskus s kitajskim kapusom, spremljali so kontrolo (samo substrat) in mešanico substrata z zrelim kompostom v razmerju 3 : 1, medtem ko je bilo v našem poskusu razmerje 4 : 1. Če analiziramo podatke kot faktorski poskus, ugotovimo, da je bil vznik značilno največji pri kontroli (K), sledilo je obravnavanje ZK, značilno najmanjši vznik je bil pri obravnavanju SH (slika 1).



**Slika 1:** Število vzniklih rastlin (vznik) glede na obravnavanje ( $K = 1$ ,  $ZK = 2$ ,  $SH = 3$ ) in datum/termin vrednotenja (30. 9. 2022 = 1, 10. 10. 2022 = 2 in 10. 11. 2022 = 3)

**Slika 2:** Pokritost s plesnijo v času vrednotenja poskusa, ko smo že odstranili nadzemni del (47 dni po nastavitvi) glede na obravnavanje (z leve proti desni: kontrola – obravnavanje K, obravnavanje ZK in obravnavanje SH)

Na začetku so rastline pri vseh obravnavanjih rastle enakomerno, v listni masi, velikosti in barvi ni bilo vizualnih razlik. Po 17 dneh so bile vse rastline pri vseh obravnavanjih pretegnjene, zato smo spremenili dnevni cikel. Znižali smo temperaturo in skrajšali dan (cikel dan/noč na 12 h, relativno vlažnost na 65 %).

Po 19 dneh so se pojavili prvi znaki pokritosti substrata z belo plesnijo pri kontroli, in sicer ob robovih. Ta pokritost se je v nadaljevanju poskusa še razširila. Pri obravnavanjih ZK in SH bele plesni v tem času ni bilo zaznati. Pri obravnavanju SH se je belkasta plesen v manjšem obsegu pojavila po 23 dneh in se je s časom širila, vendar v manjšem obsegu kot pri obravnavanju K (slika 2). Tudi ob koncu poskusa pri obravnavanju ZK ni bilo prisotne plesni.

Vidne razlike med obravnavanji v velikosti listov in bujnosti listne mase so se začele kazati po 30 dneh, in sicer je bila velika razlika v velikosti rastlin in intenziteti zelene barve. Največje ter najbolj zelene rastline so bile pri obravnavanju ZK. Ob koncu poskusa je bila listna masa pri obravnavanju ZK temno zelene barve in bistveno bujnejša kot pri ostalih dveh obravnavanjih. Obravnavanji SH in K sta imeli vizualno primerljivo bujno listno maso, vendar je bila le-ta pri obravnavanju K blede zelene, rumenkaste barve (sliki 4 in 5).

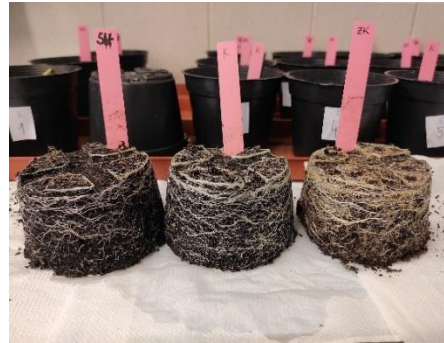
Na sliki 3 je vidna razlika v gostoti in razvejanosti koreninskega sistema, ki je bil najbolj bujen pri obravnavanju ZK in najmanj pri obravnavanju SH.

### **3.2 Masa rastlin in parametri, izmerjeni v substratu po 47 dneh od setve**

V preglednici 1 so navedeni rezultati vrednotenja poskusa po 47 dneh od setve. Kakor se je nakazovalo že tekom poskusa, je bila masa nadzemnega dela rastlin statistično značilno največja pri obravnavanju ZK, medtem ko v masi med kontrolo in obravnavanjem SH značilne razlike v masi nadzemnega dela ni bilo. Tudi Görl in sod. (2021) so v poskusu, v katerem so preučevali vpliv različnih organskih gnojil in odmerkov na rast motovilca (*Valerianella locusta* L.) v balkonskih loncih prostornine 2 m<sup>3</sup>, ugotovili, da je bil gnojilni učinek dušika, pognojenga s kompostom, značilno večji kot učinek gnojenja s svežimi hmeljevimi trtami. Sveža masa poganjkov motovilca je bila značilno večja pri gnojenju s kompostom kot pri gnojenju s svežimi trtami.



**Slika 4:** Opazovane rastline ob koncu poskusa (47 dni od setve poskusa) (zgoraj obravnavanje SH, v sredini obravnavanje ZK, spodaj kontrola – obravnavanje K)



**Slika 3:** Koreninski sistem v času vrednotenja (z leve proti desni: obravnavanje SH, kontrola – obravnavanje K in obravnavanje ZK)



**Slika 5:** Rastline pred vrednotenjem (47 dni od nastavitve poskusa) (z leve proti desni: obravnavanje SH, obravnavanje ZK in kontrola – obravnavanje K)

Boulter in sod. (2002) so dokazali, da višje koncentracije komposta zmanjšajo razvoj snežne plesni (*Typhula ishikariensis* in *Monographella nivalis*). Pokritost zelenice s plesnijo je bila pri kontroli med 10–20 %, pokritost pri zelenici, pognojeni s kompostom, pa med 0–10 %. Kompost so dodali v dveh količinah, in sicer 4,9 t/ha in 9,7 t/ha. Pri količini dodanega komposta 9,7 t/ha je bil pojav bolezn pod 5 %. V našem poskusu je bila površina lončka, pokrita s plesnijo, presenetljivo dosti večja v lončkih kontrole v primerjavi z drugima dvema obravnavanjema. Morebiti so prišle spore v substrat po odprtju vreče v tistem delu, kjer smo substrat vzeli za obravnavanje K.

**Preglednica 1: Rezultati vrednotenja poskusa 47 dni od nastavitve**

Obravnavanje	Masa listov (g)	Površina, pokrita s plesnijo (1-10)	Št. vzniklih (od 10)	Vsebnost nitrata v listih (mg/L)	Vsebnost nitrata v substratu (mg/L)	Vsebnost amonijskega N v substratu (mg/L)
Sveža hmeljevina	11,8 a*	1,0 a	7,1 a	36 a	<3,8 b	0,7 b
Zrel kompost	36,5 b	0,1 a	6,9 a	130 b	<3 a	0,7 b
Kontrola	14,0 a	4,4 b	7,9 a	19 a	<3 a	0,3 a

\*Enaka črka v stolpcu pomeni, da med obravnavanema ni značilne razlike (Duncanov test,  $p=0,05$ ).

Vsebnost nitrata v listih je bila značilno večja pri obravnavanju ZK kot pri drugih dveh obravnavanjih. Očitno je bil gnojilni učinek zrelega komposta dober, rastline so imele velik potencial za nadaljnjo rast in razvoj. V poskusu Görl in sod. (2021) pa je bila vsebnost nitrata v motovilcu podobna ne glede na to, ali so gnojili s kompostom ali s svežimi trtami hmelja.

Vsebnost nitrata v substratu po koncu poskusa je bila značilno največja pri dodani sveži hmeljevini v primerjavi z drugima dvema obravnavanja, vsebnost amonijskega dušika pa je bila značilno nižja pri kontroli v primerjavi z drugima dvema obravnavanjema.

#### 4 SKLEPI

Rezultati poskusa so pokazali vrednost zrelega komposta v primerjavi z gnojenjem s svežo hmeljevino. Pri gnojenju s svežo hmeljevino smo z lončnim poskusom potrdili zaviranje začetnega vznika kitajskega kapusa, obenem pa se je tovrstno gnojenje v primerjavi z gnojenjem z zrelim kompostom nakazalo s slabše razvitim koreninskim sistemom in značilno manjšo maso nadzemnega dela ter značilno manjšo vsebnostjo nitrata v listih.

#### 5 LITERATURA

- Abram, V., Čeh, B., Vidmar, M., Hercezi, M., Lazic, N., Bucik, V., Smole Možina, S., Košir, I.J., Kač, M., Demšar, L. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Ind. Crops Prod.* 2015, 64, 124–134.
- Amlinger F., Peyr S., in Müsken J. State of the art of Composting. Austrian Ministry for Agriculture and Forestry, Environment and Water Management. 2009.
- Ayilara, M. S., Olanrewaju, O. S., Babalola, O. O., & Odeyemi, O. (2020). Waste management through composting: Challenges and potentials. *Sustainability*, 12(11), 4456.
- Boulter, J. I., Boland, G. J., & Trevors, J. T. (2002). Assessment of compost for suppression of Fusarium Patch (*Microdochium nivale*) and Typhula Blight (*Typhula ishikariensis*) snow molds of turfgrass. *Biological control*, 25(2), 162-172.



- Čeh, B., Čremožnik, B., Oset Luskar, M. (2019) Nutrients uptake with hop (*Humulus lupulus* L.) as the basis for fertilization rate determination and hop biomass after harvest. Proceedings of new challenges in agronomy 2019 – Ljubljana. Slovenian Agronomy Society 2019: 63-69.
- Čeh, B., Flis, J., Luskar, L., Polanšek, J. Trošt, Ž. 2022. Smernice za ravnanje s hmeljevino in njeno predelavo v kompost na kmetijskem gospodarstvu, ki se ukvarja s hmeljarstvom. Dostopno na: [https://www.life-biohop.eu/wp-content/uploads/2022/08/Smernice\\_hmeljevina-AVGUST-2022\\_FINAL-VERZIJA-1.pdf](https://www.life-biohop.eu/wp-content/uploads/2022/08/Smernice_hmeljevina-AVGUST-2022_FINAL-VERZIJA-1.pdf)
- Eijkkelkamp, 2022. <https://www.royaleijkkelkamp.com/media/chzmgjeo/handleiding-18-41-reflectometer-rq-flex.pdf>
- Görl, J., Lohr, D., & Meinken, E. (2021, March). Nitrogen release from aerobically composted hop bines. In *V International Humulus Symposium 1328* (pp. 121-126).
- LIFE BioTHOP. (b.d.) <https://www.life-biohop.eu/sl/projekt/aktivnosti/>
- Sæbø, A., Ferrini, F. The use of compost in urban green areas—A review for practical application. *Urban forestry & urban greening*. 2006; 4(3-4), 159-169.
- Luskar, L., Polanšek, J., Hladnik, A., & Čeh, B. (2022). On-Farm Composting of Hop Plant Green Waste—Chemical and Biological Value of Compost. *Applied Sciences*, 12(9), 4190.
- Warman, P.R. Evaluation of seed germination and growth tests for assessing compost maturity. *Compos. Sci. Util.* 1999, 7, 33–37.

## PRICE DYNAMICS IN THE MARKET OF HOPS

Douglas MACKINNON<sup>1</sup> and Martin PAVLOVIČ<sup>2</sup>

Original scientific paper / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 11. 10. 2022

Accepted / Sprejeto: 11. 11. 2022

### Abstract

This research measures the correlation between season average prices for hops with hop stocks and hop hectarage. The Hop Equilibrium Ratio, a measure of the supply/demand relationship for U.S. hops, was introduced. Through the Bayesian inference method, the authors used these data to calculate the effect of an incremental change to one metric had on the probability of directional changes of future U.S. season average prices (SAP). Between 2010 and 2020, the dominance of trademarked and patented varieties created unique powers for supply and price management. Research results enable more accurate price forecasting in the hop industry.

**Keywords:** hop market, alpha-acids, brewing industry, Bayesian theorem, equilibrium, economies of scale

## DINAMIKA CEN NA TRGU S HMELJEM

### Izveček

V raziskavi merimo korelacijo med sezonskimi povprečnimi cenami hmelja, zalogami hmelja in površinami hmeljišč. Uvajamo merilo razmerja med ponudbo in povpraševanjem - ravnotežno razmerje hmelja. S pomočjo Bayesovega sklepanja avtorja te podatke uporabita za izračun učinka, ki ga ima postopna sprememba ene statistike na verjetnost sprememb prihodnjih sezonskih povprečnih cen hmelja v ZDA. Med letoma 2010 in 2020 je prevlada blagovnih znamk in patentiranih sort ustvarila edinstvene možnosti za upravljanje ponudbe in cen. Rezultati raziskave omogočajo natančnejšo oceno gibanja cen hmelja.

**Ključne besede:** trg hmelja, alfa-kislina, pivovarstvo, Bayesov izrek, ravnovesje, ekonomija obsega

---

<sup>1</sup> PhD in Agric. Econ., MacKinnonReport, e-mail: doug@demackinnon.com

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

## 1 INTRODUCTION

Without hops, beer cannot be made, causing on a market its inelastic demand. Breweries consume 98% of global hop production (Cooberg and Hintermeier, 2012). Small volumes of hops can bitter, preserve and flavor large volumes of beer meaning the market can quickly fall into disequilibrium. Substitutability between competing hop varieties produced solely for their high alpha-acid contents creates cross elasticity between producer groups, the largest of which were the U.S. and Germany in 2019 (George, 2019). In 2018, the U.S. hop industry represented 48.3% of the global alpha acid supply (BarthHaas, 1948-2019).

Large buyers use their bargaining power to lower input prices (OECD, 2012). The world's largest brewing conglomerates (big brewers) consolidated during the 20th century. The ten largest controlled 72.5% of beer production by 1981 (BarthHaas, 1948-2019). This created an oligopsonistic dynamic between brewers and hop merchants. Big brewers used their influence to get favorable pricing. Pricing under an oligopsony, however, does not behave the same as under free market competition. Prices can increase as supply increases (Chen and Lent, 1992). Hop merchants often match a competitor's price via tacit collusion to retain or capture market share in a zero-sum game. A Nash equilibrium of the Bertrand model often prevailed as competition was primarily price based (Hermalin, 2003).

With the development of higher-yielding hop varieties in the 1980's and 1990's, merchants differentiated themselves through lines of proprietary processed products. These new products provided a temporary advantage to the innovator while creating a Bertrand Supertrap (Cabral and Villas-Boas, 2005) as they decreased the size of the overall market.

Prior to the shortage of 2007, increases in SAP began as early as 2004. An accurate forecasting model to measure the disequilibrium could have prevented the 2007 shortage, which cost brewers hundreds of millions of dollars. SAP increased 45% in a single year (NHR, 2019). The volume of forward contracts in 2009 (IHGC, 2009) was 65% greater than in 2005 (IHGC, 2005). By 2010, the production of privately owned patented and branded varieties expanded rapidly. Constrained Pareto optimality led to the counterintuitive expansion of varieties with greater inelasticity while more elastic varieties were restricted (Stiglitz et al., 1977). U.S. production increased 15 603 MT (57%). A global surplus of alpha-acids developed (BarthHaas, 1948-2019). By 2012, many contracts had been renegotiated. SAP decreased 30% from its 2008 high while production returned to 2007 levels (NHR, 2019).

Empirical evidence between 2010 and 2012 suggested American craft brewers wanted a closer working relationship with their suppliers and would pay premium prices, unlike the big brewers. Craft brewers represented an opportunity to

circumvent the big brewer oligopsony. Non-price competition between branded proprietary varieties exploded in response to soaring demand by craft brewers between 2010-2016 (NHR, 2019). Between 2011 and 2019, American hop acreage increased 97.8% (George, 2019).

In the most extreme cases, craft brewers used even 500-700 times more hops per hectoliter than the big brewers. The growing size of the maturing segment combined with the premium prices they paid granted them a disproportionate influence on the market. The number of craft breweries in the U.S. surged from 1,813 in 2010 to nearly 8,000 in 2019 (Brewers Association, 2020). Their effect on global hop usage was significant (BarthHaas, 1948-2019; MacKinnon and Pavlovič, 2021). The craft revolution, as it became known, was led in the U.S. by rapidly increasing demand for India Pale Ales (IPAs) (Watson, 2015). The rapid reorientation toward proprietary hop varieties between 2010 and 2019 represented efforts by growers and craft brewers to differentiate themselves from their competitors (MacKinnon and Pavlovič, 2019). Production of proprietary hop varieties rose from zero in 1997 to 66% of the 51,256 MT produced in the U.S. in 2019 (NHR, 2019). These were primarily the Intellectual Property (IP) of six entities. The demand for new varieties created incentives for private breeders to invest in innovation, because they could define it and thus seek to protect and enforce their rights in it (Bugos and Kevles, 1992). IP facilitated cartel-like power among a very few the Federal Marketing Orders (FMOs) of the previous generation could never have offered. The presence of IP constrained the market in new ways, which affected planting decisions (Stiglitz et al., 1977). Rather than restrict growth of proprietary varieties to their farms, IP owners license 3<sup>rd</sup> party farms as production units. They controlled production, marketing, and in some cases, retained ownership of the plant material produced. Between 2000 and 2019, proprietary varieties, each of which enjoyed a monopoly, became a vector for regulating production and saleable quantities. Prices soared.

Like other commodities, hops have significant seasonalities and require a far more elaborate time-series specification of the price dynamics of the underlying asset (Foster and Whiteman, 1999). A useful model would be designed to allow for subjective judgment according to Cromarty and Meyers (1975). A statistical forecasting approach that could be implemented in concert with a priori knowledge would create a more thorough understanding of hop market dynamics. The goal of this research was to quantify for the first time the relationship between different publicly available statistics and determine which could be used in building such a model.

## 2 MATERIAL AND METHODS

We referenced annual season average price, production and acreage data for the U.S. market converted into hectareage (USDA NASS, 2013). For other production regions,

we referred to annual BarthHaas Reports (BarthHaas, 1948-2019) and International Hop Growers Convention (IHGC) economic committee reports (IHGC, 2005; IHGC, 2009).

To analyze the effects of change on the change in raw prices from year to year, we used SAP data unadjusted for inflation from 1948-2019. We analyzed three sets of data: (i) the total data set, 1948-2019, (ii) the subset of 1980-2019, a period after which the third FMO was dysfunctional and (iii) the subset of 2000-2019, the period documenting the rise of proprietary varieties in the U.S.

## 2.1 Bayesian analysis

We used Bayes' theorem and Bayesian inference to calculate probabilities due to the accuracy of the test and the richness of the data provided. We applied the theorem to industry data in 266 Bayesian analyses. Season average price was used as both the dependent and independent variable resulting in 25,802 calculations using Microsoft® Excel for Mac version 16.42. Each analysis contained three unique independent variables and three unique dependent variables through a series of calculations including prior, conditional, joint, marginal and posterior probability values for each set of circumstances measured. Ultimately, a Bayesian hierarchical modeling offers the opportunity to combine estimates based on historical data together with information gathered via ex ante methods and weight them based on their perceived importance (Cabrini et al., 2010).

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)}{P(B)} P(A) \quad (1)$$

Where  $P(A|B)$  is the probability of A occurring given that B is true

Where  $P(B|A)$  is the probability of B occurring given that A is true

Where  $P(B)$  is the probability of observing B

Where  $P(A)$  is the probability of observing A

Where A and B are unique events

For example:

Probability (SAP Increase | Increase in Sept. 1 Stocks)

$$= \frac{\text{Probability (Increase in Sept. 1 Stocks | SAP Increase)}}{\text{Probability (Increase in Sept.1 Stocks)}} \text{Probability (SAP Increase)} \quad (2)$$

We used the Bayesian inference method to calculate the probabilities of directional changes in our dependent variable for possible future years based on consecutive identical changes to our independent variable. We focused on SAP in the role of both

dependent and independent variable and measured identical changes to dependent variables after two, three and four years of successive identical changes.

## 2.2 Hop Equilibrium Ratio

We created the Hop Equilibrium Ratio (HER) to measure the appropriateness of the supply from year  $n$  relative to the demand in year  $n+1$ , a measurement previously lacking. The HER yielded the distance from market equilibrium in percent, from which an aggregate surplus or deficit could be calculated. The ratio may be used as an early indicator of the effects of demand on the price of years  $n$  and  $n+1$ .

The HER for any given year  $n$  is as follows, where  $D$  is the depletion rate and  $C'$  represents the volume of the crop produced post processing:

$$HER^n = \frac{D^n}{C'^{n-1}} \quad (3)$$

To achieve this, we calculated the depletion rate of U.S. inventory by taking the September U.S. hop stocks value for the previous year  $n-1$ , ( $S^{n-1}$ ) adding in the total production of the U.S. crop (accounting for processing loss) for year  $n-1$ , ( $C'^{n-1}$ ), and finally subtracting the September U.S. hop stocks value for year  $n$ , ( $S^n$ ).

$$D^n = S^{n-1} + C'^{n-1} - S^n \quad (4)$$

To account for the quantity of hop production lost during processing for any given year  $n$ , referred to herein as ( $C'^n$ ), we estimated three percent of the crop remained in bale form for which we assumed no loss. We estimated 97% of hops produced were processed into pellets and experienced a three percent loss during processing. These assumptions may be adjusted as necessary to test an alternate set of beliefs. Because we did not feel comfortable assuming a similar ratio of processed hops to raw hops prior to 1979 due to the change in varietal characteristics at that time, we calculated the HER from 1979-2019. We did not add any additional loss for processing pellets into extract or downstream products as we believed those calculations would not materially affect the results. The formula we used for calculating the crop available post processing was as follows:

$$C'^n = ((C^n * 0.97) * 0.97) + (C^n * 0.03) \quad (5)$$

When we calculated the HER for each year using the data from 1948-2019, we observed that the HER value of 0.98 yielded the highest probability of accurate results when forecasting the direction of future pricing.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

We calculated the probability of a positive, negative, or zero change, in our dependent hop industry variables such as U.S. Stocks, U.S. hectarage and U.S. Hop Equilibrium Ratio (HER) following a positive, negative or zero change of the independent variable, U.S. Season Average Price. We determined results to be significant if a change in the independent variable yielded a change to the posterior probability of the dependent variable by 10% or more in a single year, or if a multi-year series of identical changes lead to a change of 25-30% of the posterior probability relative to the original prior probability of year  $n$ . As part of the Bayesian process, our calculations also yielded the probability of the correctness of the test result. We omitted results regardless of the apparent significance of the posterior probability if the probability of a correct test result was 60% or less. Twelve situations met these criteria and were worthy of greater attention as research results (Table 1).

**Table 1.** Significant probabilities of variable changes and trends 1948-2019.

DESCRIPTION	Prior Probability of Change	Posterior Probability of Change	Probability of Correct Result
Stocks* year $n$ decrease, SAP increase	0.6479	0.8077	0.8077
Stocks decreases 2 years, SAP increase	0.8077	0.9004	0.8148
Stocks decreases 3 years, SAP increase	0.9004	0.9522	0.8214
Stocks decreases 4 years, SAP increase	0.9522	0.9782	0.8276
HER year $n > 0.98$ , SAP increases year $n$	0.6571	0.8261	0.8261
HER $> 0.98$ for 2 years, SAP increases year $n$	0.8261	0.9238	0.8333
HER $> 0.98$ for 3 years, SAP increases year $n$	0.9238	0.9695	0.8400
HER $> 0.98$ for 4 years, SAP increases year $n$	0.9695	0.9885	0.8462
SAP year $n$ increase, hectarage increase	0.5352	0.6304	0.6304
SAP increases 2 years, hectarage increase	0.6304	0.7181	0.6383
SAP increases 3 years, hectarage increase	0.7181	0.7931	0.6458
SAP increases 4 years, hectarage increase	0.7931	0.8531	0.6531

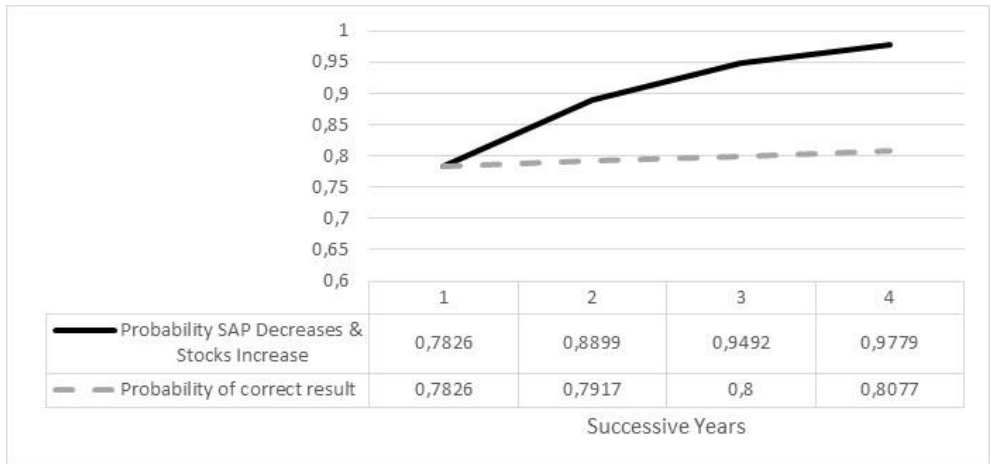
\*All Stock figures refer to September 1 hop stocks reported by the USDA NASS; data pertains to the U.S. only unless otherwise mentioned; HER - Hop Equilibrium Ratio; SAP - Season Average Price.

Source: Own study results based on USDA NASS (2013, 2014)

#### 3.1 Correlation between U.S. September 1 Hop Stocks and U.S. SAP

The increase in September 1 U.S. hop stocks represents the amount of hops produced and waiting in reserve for breweries. The increase or decrease of the stocks number must be analyzed in concert with production figures, export numbers, the HER and other factors to paint a more complete picture of the appropriateness of the supply situation.

When we use stocks as the independent variable and SAP as the dependent variable, the results demonstrated the strength of the positive correlation (Table 1). When stocks decreased one year, the probability of a decrease in SAP rose from 64.79% to 80.77%. After two, three and four consecutive years of price decreases, the probability of SAP decreasing was 90.04%, 95.22% and 97.82% respectively. The probability of these results being correct was 80.77% for year one, 81.48% for year two, 82.14% for year three, and 82.76% for year four (Figure 1).



**Figure 1:** Probability SAP decreases after successive Sept. 1 U.S. stock increase and the probability of correct test results for each period based on 1948-2019 data.

Source: Own research

The significance of the correlation between U.S. September 1 stocks and SAP cannot be understated. It is the only known statistic that provides clues to the appropriateness of the supply situation, which, due to the inelastic demand for hops, affects price and the supply situations of foreign countries.

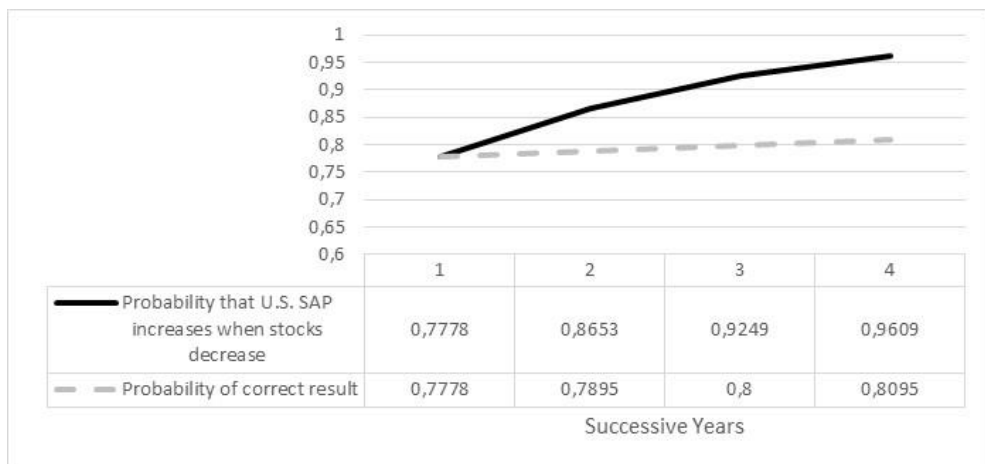
### 3.2 Correlation between U.S. Hop Equilibrium Ratio and U.S. SAP

In Table 1, the HER for year n, our independent variable, demonstrated a value greater than 0.98 in year n. The probability of an increase in SAP in year n+1, our dependent variable, changed from 66.67% to 77.78% in year one. With two, three and four consecutive years of HER displaying a value greater than 0.98, the probability SAP increases were 86.53%, 92.49% and 96.09% respectively. The probability of these results being correct was 77.78% for year one, 78.95% for year two, 80.00% for year three, and 80.95% for year four (Figure 2).



The HER provides a method for evaluating the appropriateness of the supply from year  $n$  for year  $n+1$ , the year for which it was produced, which has a subsequent effect on price.

Decreases in SAP resulted in the probability of increased stocks from 61.43% to 78.26% in the first year alone. Following consecutive years of decreasing SAP, the probability increased further. This signals that SAP had a counterintuitive inverse relationship to stock levels (i.e., when prices are higher, customers take delivery of more product). This is evidence of the lagged supply response in the wake of a price spike. The lag quantifies the degree to which breweries over contract for product and is responsible for a perpetual state of disequilibrium.



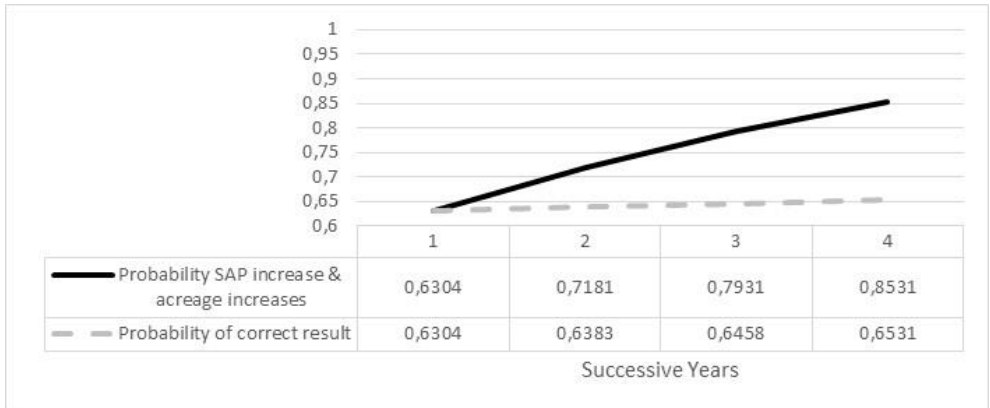
**Figure 2:** Probability U.S. SAP increases after successive U.S. HER values  $> 0.98$  and the probability of correct test results for each period based on 1948-2019 data. Source: Own research

Forecasting directional changes of price movements one year in advance is possible with a high degree of confidence by measuring the balance of the U.S. hop production of year  $n$  relative to demand for hops in the U.S. in year  $n+1$ . Using the HER value of 0.98 revealed a method to measure annual surpluses and deficits.

### 3.3 Correlation between U.S. Hectarage and U.S. SAP

In Table 1, the SAP for year  $n$ , in this case our independent variable, increased. The probability of U.S. hectarage increasing changed from 53.52% to 63.04% in year one. With two, three and four consecutive years of price increases, the probability of U.S. hectarage increased to 71.81%, 79.31% and 85.31% respectively. The

probability of these results being correct was 63.04% for year one, 63.83% for year two, 64.58% for year three, and 65.31% for year four (Figure 3).



**Figure 3:** Probability U.S. hectares increases after successive increases of SAP and the probability of correct test results for each period based on 1948-2019 data. Source: Own research

There was a weaker relationship between SAP and U.S. hectareage. We assessed it was worth highlighting due to the counterintuitive nature of the trend, where supply and price are both moving together in unison. This happened for two reasons (i) small increases in season average price corresponded with increases in hectareage prior to a price spike that were insufficient to satisfy any existing deficit led to a situation where price and planting were increasing prior to and during price spikes caused by large deficits or shortages, and (ii) SAP and hectareage behaved differently after price spikes due to the macro buyer oligopsony, the over contracting going into a deficit and their ability to renegotiate contracts following the markets subsequent decline once a surplus has developed. This led to falling prices as the production area was decreasing during surplus times.

#### 4 CONCLUSIONS

Publicly available statistical hop data provide sufficient information to forecast future directional movements of hops prices, the threat of upcoming shortages and the scale of surpluses. The ability to accurately track hop inventory will enable an observer to determine the degree of disequilibrium in the market, to anticipate shortages and foresee price spikes. The lack of such a forecasting model in the past has cost the brewing industry and hop producers hundreds of millions of dollars during the past 20 years alone.

Several authors including Cyert and Degroot (1970), and Kihlstrom and Mirman (1975) have explored using the Bayes process and historical data to infer values of unknown parameters when dealing with an incomplete world view. Bayesian calculations produce an ex post perspective and offer the probability of an event occurring based on historical data. A procedure that makes use of numerical Bayes techniques to develop an underlying predictive density holds significant promise according to Foster and Whiteman (1999). Bayesian estimation provides much richer information than the NHST t test and sometimes comes to different decisions (Kruschke, 2013).

The calculations yielded from the shorter time periods yielded stronger probabilities than those for the 1948-2019 period. To err on the side of generating more conservative forecasts, we focused on reporting only the results from the total data set in this article. Data showed a strong positive correlation between September 1 U.S. hop stocks when used as the independent variable and U.S. SAP as the dependent variable. A positive change in stocks one year meant an 80.77% likelihood that U.S. SAP increased for that year with higher probabilities for such an increase in subsequent years demonstrating similar movements in stocks. The positive correlation between the U.S. HER and the U.S. SAP demonstrated a 77.78% chance in an increase in the U.S. SAP of the following year ( $n+1$ ) increasing with an increase of September 1 stocks in year  $n$ . This is the first known documented case of future price prediction ability in the hop industry. Forecasts are limited to directional price movements due to the use of aggregate data reported by the USDA.

The owner of a proprietary variety with complete control and access to price and sales data for a variety could produce forecasts with greater accuracy. Beyond the economic turmoil created by Covid-19 that will cause thousands of American craft breweries to close (Watson, 2020), there will be opportunities for growth of proprietary variety market share at the expense of public varieties. The challenges and variability associated with producing an agricultural commodity will always remain. A forecasting model employing the Bayesian method offers the best opportunity to calculate probabilities of future events. These data, however, when combined with an a priori knowledge of market dynamics, make hop market forecasting future price movements possible.

## 5 REFERENCES

- BarthHaas (1948-2019): The Barth Report. BarthHaas, Nürnberg, Germany. Available at [https://www.barthhaas.com/en/downloads?tx\\_barthdownloads\\_pi1%5Baction%5D=show&tx\\_barthdownloads\\_pi1%5Bseries%5D=4&cHash=b94b6159d3770613c4dc866fe19b847e](https://www.barthhaas.com/en/downloads?tx_barthdownloads_pi1%5Baction%5D=show&tx_barthdownloads_pi1%5Bseries%5D=4&cHash=b94b6159d3770613c4dc866fe19b847e) (accessed March 20, 2020).
- Brewers Association (2020): National Beer Sales & Production Data. Brewers Association, Denver, Colorado. Available at <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/> (accessed February 22, 2020).

- Bugos G., Kevles D. (1992): Plants as Intellectual Property. *Osiris*, 7: 74-104.
- Cabral L., M. Villas-Boas, M. (2005): Bertrand Supertraps. *Management Science*, 51: 559-613.
- Chen Z., Lent, R. (1992): Supply Analysis in an Oligopsony Model. *American Journal of Agricultural Economics*, 74: 973-979.
- Cabrini S, Irwin S, and Good, D. (2010): Should Farmers Follow the Recommendations of Market Advisory Services? A Hierarchical Bayesian Approach to Estimation of Expected Performance. *American Journal of Agricultural Economics*, 92: 622-637.
- Cooberg H., Hintermeier P. (2012): Market report April 2012. Working paper, Economic Committee of the International Hop Growers' Convention. Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. Nürnberg, Germany. Available at: [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2012\\_NOV\\_IHGC\\_Hop\\_Market\\_Report.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2012_NOV_IHGC_Hop_Market_Report.pdf) (accessed February 22, 2020).
- Cromarty W, Meyers W. (1975): Needed Improvements in Application of Models for Agricultural Commodity Price Forecasting. *American Journal of Agricultural Economics*, 57: 172-177.
- Cyert R, Degroot M. (1975): Bayesian Analysis and Duopoly Theory. *Journal of Political Economy*, 78: 1168-1184.
- Folwell R.J., Mittelhammer R.C., Hoff F.L., Hennessy P.K. (1985): The Federal Hop Marketing Order and Volume-Control Behavior. *Agricultural Economics Research* 37: 17-32.
- Foster D, Whiteman C. (1999): An Application of Bayesian Option Pricing to the Soybean Market. *American Journal of Agricultural Economics*, 81: 722-727.
- George A. (2019): Hop Growers of America. Statistical Packet 2006-2019. HGA Annual Convention, United States.
- Hermalin B.E. (2003): Introduction to Game Theory & The Bertrand Trap.: University of California. Berkeley: 1-19.
- IHGC (2005): Economic Commission Summary Reports, Lanzhou, China. July 26, 2005. International Hop Growers' Convention, Lanzhou, China. Available at [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2005\\_JUL\\_IHGC\\_EC\\_Report.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2005_JUL_IHGC_EC_Report.pdf)
- IHGC (2009): Economic Commission Summary Reports, Munich, Germany. November 9, 2009. International Hop Growers Convention, Munich, Germany. Available at <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/09%20NOV%20IHGC%20EC%20reports.pdf>
- Kihlstrom R, Mirman, L. (1975): Information and Market Equilibrium. *The Bell Journal of Economics*, 6: 357-376.
- Kruschke J. (2013): Bayesian Estimation Supersedes the t Test. *Journal of Experimental Psychology*, 142: 573-603.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2019): Global hop market analysis within the International Hop Growers' Convention. Slovenian Institute of Hop Research and Brewing. *Hop Bulletin* 26: 99-108.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2021): Review of hop market characteristics. Slovenian Institute of Hop Research and Brewing. *Hop Bulletin* 28: 34-47.
- NHR (2019): National Hop Report, Hop statistics 2002-2019. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service. Olympia, WA, USA.
- OECD (2012): Competition and Commodity Price Volatility. Directorate for Financial and Enterprise Affairs Competition Committee. Paris, France.
- Stiglitz J.E., Dixit A.K. (1977): Monopolistic Competition and Optimum Product Diversity. *The American Economic Review* 67: 297-308.

- USDA NASS (2013): WA Hops 1915-2013. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service. Olympia, Washington. Available at [https://www.nass.usda.gov/Statistics\\_by\\_State/Washington/Publications/Historic\\_Data/hops/wahops.pdf](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Historic_Data/hops/wahops.pdf) (accessed October 1, 2022).
- USDA NASS (2014): Hop Stocks Held by Growers, Dealers, and Brewers, United States (1,000 Pounds). United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service. Washington D.C. Available at [https://www.nass.usda.gov/Statistics\\_by\\_State/Washington/Publications/Historic\\_Data/hops/ushopstk.pdf](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Historic_Data/hops/ushopstk.pdf)
- Watson B. (2015): What's the Next IPA? *Brewers Association*. Denver, Colorado. Available at <https://www.brewersassociation.org/insights/the-next-ipa/> (accessed January 31, 2022).
- Watson B. (2020): Brewery Sales Dropping Sharply, Many Set to Close. *Brewers Association*. Available at <https://www.brewersassociation.org/insights/brewery-sales-dropping-sharply-many-set-to-close/> (accessed May 10, 2022).

**STUDY OF MARKET SUPPLY STATISTICS IN TRADING OF HOPS**Martin PAVLOVIČ<sup>1</sup>, Douglas MACKINNON<sup>2</sup> and Boštjan NAGLIČ<sup>3</sup>

Original scientific paper / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 11. 10. 2022

Accepted / Sprejeto: 23. 11. 2022

**Abstract**

The International Hop Growers' Convention (IHGC), is the only international body representing the interests of members of the hop industry from around the globe. Part of its duties within its Economic Committee are to report data from 21 hop producing countries three times each year. Data collection methods and methods unique to the U.S. and Germany are discussed. The U.S. and Germany produced 40.18 and 33.74 percent of the world's hop acreage respectively in 2020. The balance of global acreage (i.e. 26 percent of total global acreage) was divided by 19 producing countries. Reporting methods are demonstrated and data unique to the IHGC is highlighted. The qualitative value of the organization to the industry is also revealed.

**Key words:** hops, market analysis, supply parameters, prices, alpha-acids, IHGC

**ŠTUDIJA TRŽNIH STATISTIK PONUDBE HMELJA****Izvleček**

Svetovna hmeljarska organizacija (IHGC) je edino mednarodno združenje, ki zastopa interese hmeljarjev in trgovcev s hmeljem z vsega sveta. V aktivnostih Ekonomske komisije analizira trikrat letno tržne statistike ponudbe hmelja iz 21 držav pridelovalk. V članku ilustriramo metodologijo analize ponudbe hmelja in izpostavimo statistike za ZDA in Nemčijo, ki sta 2020 obsegali 40,18 oz. 33,74 % svetovnih površin hmelja. Preostali delež svetovnih površin (tj. 26 %) je porazdeljen še na 19 držav proizvajalk. Predstavljena je metodologija zbiranja, analize in poročanja tržnih statistik v okviru IHGC in kvalitativni doprinos organizacije za svetovno hmeljarstvo.

**Ključne besede:** hmelj, analiza trga, parametri ponudbe, cene, alfa-kislina, IHGC

---

<sup>1</sup> Prof. dr., University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Sciences (UM FKBV) and Institute of Hop Research and Brewing (IHPS), e-mail: martin.pavlovic@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., UM FKBV, e-mail: doug@demackinnon.com

<sup>3</sup> Dr., IHPS, e-mail: bostjan.naglic@ihps.si

## 1 INTRODUCTION

Hops (*Humulus lupulus* L), along with malt and water, are the basic raw materials used for beer production. The basic role of hops is to provide beer with a pleasantly bitter taste and a hoppy aroma (Štěrba et al., 2015). They will grow under most conditions in most countries as an ornamental. It is native to Europe, Asia and North America (Roy et al., 2001). Commercial production takes place in latitudes greater than 35 degrees in both the Northern and Southern Hemispheres due to strong photoperiodism requirements for flowering (Henning et al. 2015). The female hop plant produces cones in which resins and oils are found. The cones contain many lupulin glands, which are located on the adaxial surfaces of the cone bracts (Castro, 2008). Alpha-acids such as humulone, adhumulone and cohumulone and beta-acids such as lupulone, adlupulone and colupulone are found in the lupulin glands along with other prenylflavonoids and essential oils (Haunold, 1981). These compounds are important in the brewing industry (Matoušek et al., 2016).

There are only several areas where hops produce yields that make them a commercially viable product. Hops are international trading commodity in the agricultural market. Their potent bitterness and pungent flavor ensured the limited market for hops. Beer production remains the only market requiring hops in significant since breweries consume 98% of global hop production (Cooberg and Hintermeier, 2012). There are other products that use hops in very small quantities. Teas, pillows and other sleep aids made with hops exist as homeopathic remedies around the world in amount of around 2%. However, none of these products require enough hops to affect the supply produced in a meaningful way (MacKinnon and Pavlovič, 2020).

In 2021, there were globally 298 commercially grown hop varieties (IHGC, 2021a). Hops take a very small part (about 1%) in the structure of costs in brewing industry (Pavlovič, 2014). Used in the production of beer, they contribute greatly to the sensory profile of a beer. Aroma hops give off scents as varied as grass, grapefruit, chocolate, pepper, mint, apricot, and tangerine (Helphand, 2014). Craft brewers producing Indian Pale Ales (IPAs) worldwide sought these flavors during the double-digit growth of craft beer production between 2009 and 2015 (Watson, 2015).

In 2020 approximately 62,104 ha of hops were cultivated worldwide with a world crop of 123,025 metric tons of hops. Estimated production of alpha-acids, the most important significant shared attribute among all hop varieties, was 13.302 metric tons (IHGC, 2021b). The International Hop Growers' Convention i.e. IHGC tracks the world's commercial hop production data and provides an invaluable service to the industry. Valuable commentary on the global supply and demand situation is often provided by the German Hop Merchant Association (Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V., also referred to as DHWV). For example, in its

November 2021 report to the body, the impact of the pandemic on global demand for hops and hop products was summarized (DHWV, 2021).

As of October 2022, there were 21 country members (hop producers' organizations) and 14 corporate members (hop trading companies) of the IHGC. The statistics the organization collects and disseminates to its members embrace data regarding production of hops, aggregating the world's variety structure and analyzing hop market trends. In November 2021, North American and European countries produced 89,78 percent of total IHGC-tracked production in 2020 and reportedly accounted for 91,78 percent in 2021. U.S. and German production alone were responsible for 76,74 percent in 2020 and an estimated 77,20 percent in 2021 (IHGC, 2021b).

## 2 MATERIAL AND METHODS

The International Hop Growers' Convention holds meetings three times each year, in April, July-August and November. The timing of these meetings is strategic to allow updates on planting activity in the spring, progress of the crop prior to harvest and a recap of yields and production in November. The data reported during Economic Committee meetings are collected by the chairman of the committee during the weeks leading up to the meeting with some members submitting their data only days prior to the event. Oftentimes, collecting such data necessitates more than one contact between the economic committee chairman and the reporting country delegate. These data consist of acreage, quantity of hops produced, an estimate for the quantity of alpha produced, hop variety structure, the volume of hops sold ahead each year by each member country and average prices (MacKinnon and Pavlovič, 2019). Some countries are reluctant to report. When this happens, it is acceptable to collect data regarding a hop producing country from third parties. In the past, members of the DHWV have provided country data regarding non-reporting countries unofficially during meetings.

IHGC member country delegates have been regularly encouraged to provide official hop supply statistics from their countries for decades prior to meetings of the Economic Committee emailing them to the IHGC Secretariat. All data on member country level were processed and prepared for the coming IHGC meetings. The collected hop supply statistics are a part of the IHGC archives (IHGC, 2022).

During IHGC meetings, representatives from each country present are encouraged to stand and give an oral report regarding the situation in their home country during the previous years. While these reports always cover the data submitted, they may also include other useful information explaining why the numbers are as reported and issues that growers dealt with during the previous season. Other members in



attendance are allowed and encouraged to ask questions for clarification, or for other information from the reporting country representative.

Since the largest hop producing countries, the U.S. and Germany, dominate the global market, this research focused on analyzing hop supply data from these two countries between 2007 and 2021. We collected and analyzed data regarding the following parameters: (i) hop acreage (ha), (ii) production of hops (t), production of alpha-acids (t), (iv) value of hops sold ahead (USD, EUR) and (v) SAP i.e. season average prices of hops (USD, EUR).

We sourced data from the IHGC Economic Committee November reports from the subsequent year (e.g. 2021) to represent data regarding the n-1 year (e.g. 2020). These data had the highest accuracy regarding the previous year's data and better estimates regarding the current year data than the spring or summer reports from the current year due to the existence of official data by that time. Current year reporting was often based on estimates from representatives of member countries as official government related sources were not yet available. As these estimates occurred following the harvest and members were acutely aware of the situation in their home countries, data needed only slight revision in subsequent years.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

Research results are focused on the three main hop market supply elements such as acreage of hops, production of hops and production of alpha-acids. In addition, season average prices and value of hops sold ahead are discussed.

The U.S. and Germany produced 40.18 and 33.74 percent of the world's hop acreage respectively in 2020. The balance of global acreage (i.e. 26 percent of total global acreage) was divided by 19 producing countries. Furthermore, the U.S. and German hop growers supplied 38.64 and 38.10 percent of hops while related to the production of alpha-acids, as the most important brewing quality parameter, even 41.35 and 40.88 percent (IHGC, 2021b).

Data reported by the IHGC regarding the U.S. (Figure 1) is very similar to that which is available from other sources in historical context sometimes only months after the fact. The timeliness of year-specific data and evidence of the formation of trends over time is valuable information. American representatives have long had the practice of estimating the situation on the ground in the U.S. at the moment the report is offered. These have been the numbers they have reported to the IHGC.

The reports by member countries to the IHGC are provided in the same format offering continuity in the method of data collection. This continuity in data collection over the decades offers a valuable service in that it may be compared year on year

with previous seasons to establish trends over longer periods. In their November report, data reported by American representatives to the IHGC is valuable as a recap of the situation during the year even though it may not represent statistics collected by the USDA NASS.

For the spring report, typically held in April, American reports provide a valuable estimate of acreage planted for harvest before such information is available elsewhere.

For the summer report, Americans seldom update their data regarding acreage as there often have been no significant changes since the spring report. Rather, the discussion in the summer pertains to recent weather events, as well as pests and other challenges. The anticipated effects of these and other events upon yield for the current year are offered to the group and lively discussion often occurs. As many of these details are non-quantifiable, they cannot be included in the summary report.



**Figure 1:** U.S. Hop Acreage, Hop Production and Alpha Acid Production 2007-2021.

German representatives regularly attend IHGC events and provide hop acreage, hop production and alpha-acid production data in a similar format (Figure 2). Contrary to the Americans, the German delegation only reports government approved figures, which are updated annually in their IHGC reports. The German November reports are updated with current year official data. German delegates do not speculate on the current situation in spring and summer official reports, reducing the value of IHGC reported data at those two meetings. They do not submit speculative data in writing

in an official capacity to the IHGC. Those in attendance, however, are quite helpful during meetings with regards to providing insight on the current situation in Germany and regularly do so in when asked by other members present.

There have been periods in the past when the extreme oversupply of hops and alpha-acid dominated discussions. This was more typical in the period when homogenous products were produced by all member countries with alpha-acid being the similar characteristic among all hop varieties. The most recent severe surplus began in the mid-1980s with the introduction of higher alpha yielding varieties without a corresponding reduction in the acreage planted. The supply situation remained largely unchanged until approximately 2004 when the earliest signs of a recovery began to emerge to those with access to the proper data. During these periods of extreme over supply, discussion among the group's members often centered around what could be done to remedy the situation. The November 2004 Economic Committee report although only a summary offers a rare glimpse into the concerns of the industry at that difficult time.

Most spot bitter hops have been consigned to pools both in Europe and in the US with no or only minimal pre-payments to growers. Based on the current market development one cannot count on any significant additional payments. It can only be hoped that this clear market signal will convince growers everywhere to reduce their bitter hop acreage in order to bring the bitter hop segment back into balance. For that purpose, Germany is offering an acreage idling and reduction program to its growers in order to reinforce the message and to alleviate the financial burden. Only a continuous reduction of acreage can maintain long-term prices above production costs as overall demand for hops continues to decline as a consequence of reduced hopping rates worldwide. A conversion of existing bitter hop acreage into aroma varieties would be very counter-productive.

The industry trend towards increased emphasis on the spot market continues unabated. Brewers are reluctant to enter into long-term contracts as market trends change and their brand portfolio adjusts. They are also afraid of losing out to their more reckless competitors who speculate on low spot market prices. It is also obvious that the trend towards further consolidation in the brewing industry will continue and that smaller, independent brewers will be taken over by the larger groups. This development is clearly not to the benefit of the hop industry as the big groups show no loyalty to growing regions and their bargaining power becomes ever stronger (IHGC, 2004).

As with any group containing such diverse membership, the difficult times of the 2007-08 hop shortage revealed a lack of unity regarding the vision of the industry between some of the group's members that appeared to stem largely from differing business philosophies. In the July 2008 market report, the DHWV published the

following statement. As a consequence of the behavior of the Eastern European growers and trading companies, virtually no forward contracts are likely to have been placed in their region. The historically favorable opportunity to obtain long-term security was sacrificed in these countries for the sake of short-term profit (DHWV, 2008).

Sixteen months later, the global market situation had changed. Once again, the industry was confronted with an extreme oversupply of hops. The DHWV, in turn, released the following assessment regarding the market. The surplus in crop 2009 amounting to at least 2,500 mts alpha-acids will contribute to a further increase in stocks. Within a very short time frame the world hop industry finds itself in a menacing oversupply crisis. Markets prove this. Breweries who have too many contracts try to roll their contracts into later years or to cancel them to control their stock situation (DHWV, 2010).

Whether the DHWV or the Eastern European growers were correct in their actions or not, is beyond the scope of this article. The IHGC provided a forum for these discussions to take place. It is the belief of the author that facilitating a free and open discussion between industry members, regardless of the issue or the outcome, is always a positive force for good.

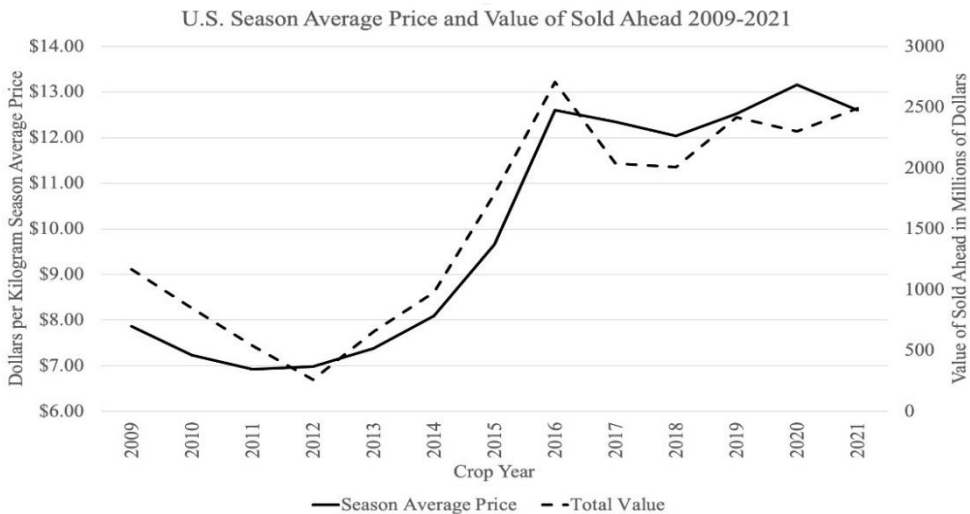


**Figure 2:** German Hop Acreage, Hop Production and Alpha Acid Production 2007-2021.

A data point scarcely available elsewhere in the world hop industry is volume of the crop sold ahead. The IHGC provides estimates of this figure from its member

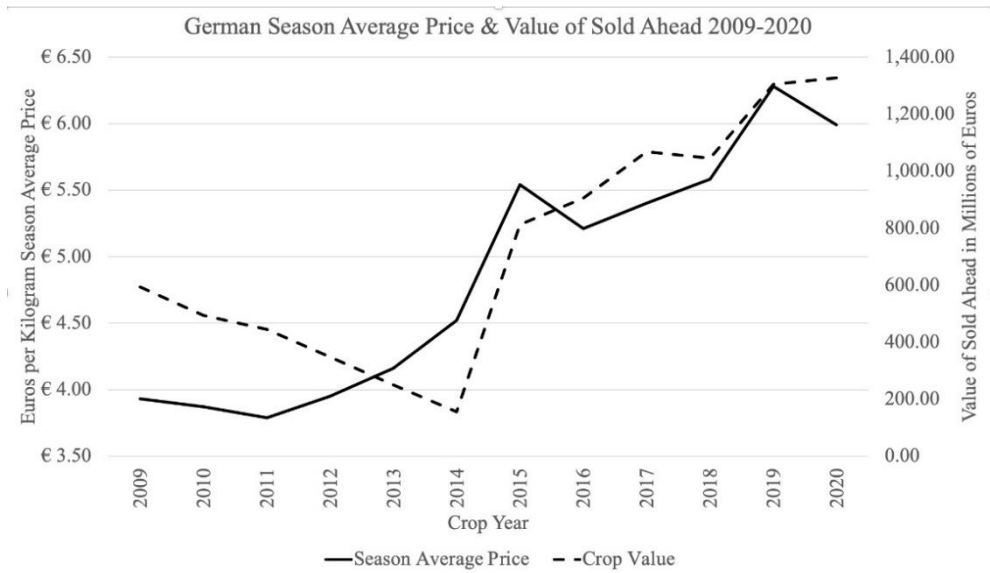
countries annually. In the case of the U.S., when this figure is combined with the U.S. season average price, a figure provided by the United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service (USDA NASS) to the hop industry each December, an approximate value for the quantity of American hops sold ahead may be calculated. When this is applied to successive years, the trend in the value of the crop sold ahead becomes apparent (Figure 3).

The value of U.S. and German forward contracts were \$204 million (equivalent to 180 million Euros) and 300.1 million Euros in 2001 respectively. The value of German forward contracts grew significantly in the next two decades. As of 2020, German sold ahead contracts set record highs worth an estimated 1.33 billion Euros. The German season average price for 2021 was not yet available at the time of publication. U.S. forward contract value, however, soared to still higher heights and at a much quicker rate than the value of German hops sold ahead. From approximately \$200 million in 2001 the value of U.S. hops sold ahead soared to a record of \$2.7 billion in 2016 (the equivalent of 2.5 billion Euros at the time) after which they began to stabilize. The value of U.S. sold ahead contracts stabilized somewhat after 2016. Between 2016 and 2021, the value of the U.S. crop sold ahead stayed above two billion dollars registering its second highest value in recorded history in 2021 of an estimated \$2.49 billion (the equivalent of approximately 2.3 billion Euros in December 2021). Figures 4 and 5 display the total value of contracted hops for the U.S. and Germany during this time also increased.



**Figure 3:** U.S. season average price and value of contracted hops as reported to IHGC. Source: IHGC Economic committee November reports 2009-2021.

When a similar procedure is applied to the German IHGC data, trends in the value of the German crop sold ahead are also visible (Figure 4). These figures represent a snapshot in time at which an approximation is made every year and contain some inherent limitations.



**Figure 4:** German season average price and value of contracted hops as reported to IHGC. Source: IHGC Economic committee November reports 2009-2021.

The sold ahead percentages for year n+1 through n+5 are based on year n production as future production cannot be known at the time of the report in year n. For example, if country X produced 100 metric tons of hops in year n and 95 metric tons of hops were sold ahead in year n+1 and n+2, those years would be reported sold at 95 percent. When year n+1 and n+2 arrive, production for country X may be 110 and 130 metric tons respectively.

During that time, however, the reported sold ahead figures are updated for year n+1 as it becomes the new year n. The same methods for using the sold ahead percentages for future years are again used.

#### 4 CONCLUSIONS

The value of the IHGC to the hop industry is not only its collection of valuable production, acreage, yield and other hop related information from over 20 countries around the globe. The frequency of the meetings and this data collection makes it the

premiere organization in the hop industry where growers and merchants may come together to discuss industry specific events. The ability to report these data in a timely manner as events are unfolding provides exceptional value to its members as such data is often not available except to large multinational organizations. Data reported by the U.S. therefore reprints the best publicly-available real time information at the time of the report.

The value of the data may be questioned by some as some country reports represent only the best estimate of developments at the time of the report. The value of IHGC data is precisely in its representation of data at a snapshot in time. IHGC data for the current year should not be interpreted as specific data with 100 percent accuracy. Such data is only possible, when it is possible at all, only months after the fact. The value of IHGC as an organization as a whole as well as the data it reports is the timeliness of the information disseminated periodically throughout the year. Since over time as more accurate data becomes available the organization's reports are update, the value of IHGC data over time is in the trends that emerge. A non-quantifiable effect of the regularity of the meetings is the camaraderie and familiarity it fosters between members of this small industry.

Despite the great value the organization provides, during periods of extreme oversupply, which do not favor the hop industry, its limitations are revealed. The IHGC shares many of the same weaknesses from which the United Nations suffers. While its participation is active regular and encouraging, the individual members of the group do not all have the authority to return to their home countries and implement the reforms discussed during the meetings. Many are simply messengers whose only recourse is to return to their home country and share the information they gathered while attending the IHGC meetings. Those individuals in attendance who do enjoy such powers at home have often been reluctant to implement changes discussed at the meetings due to their awareness that other members cannot or will not act in a similar manner. As with the United Nations, this is not a reason to disband the IHGC. The benefits of the camaraderie and freedom to discuss the issues of the day, whatever they may be, far outweigh the costs and limitations of such an organization. In fact, the greater the understand by members of the IHGC about their cohorts and their situation in the global market creates a more cohesive industry. It increases awareness of members regarding the global market situation of the day providing information to which they may not otherwise have access so they may act and respond should they so choose. These actions may not stem directly from the organization itself as a result of a resolution or decree, but they are indirectly influenced by the contacts and understanding fostered by such regular meetings between peers.

## 5 REFERENCES

- Castro B., Whittock L., Whittock S.P., Leggett G., Koutoulis A. (2008): DNA Sequence and Expression Variation of Hop (*Humulus lupulus* L) Valerophenone Synthase (VPS), a Key Gene in Bitter Acid Biosynthesis. *Annals of Botany*, 102(2): 265-273.
- Cooberg H., Hintermeier P. (2012): Market report April 2012. Working paper. Nürnberg, Germany, Economic Committee of the International Hop Growers' Convention. Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. Available at: [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2012 NOV IHGC Hop Market Report.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2012_NOV_IHGC_Hop_Market_Report.pdf) (accessed Feb 22, 2022).
- DHWV. (2008): Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. IHGC-Market Report July 30, 2008, 2 p. [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/08 JUL IHGC Market report.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/08_JUL_IHGC_Market_report.pdf) (accessed Nov 29, 2021).
- DHWV. (2010): Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. IHGC-Market Report November 9, 2010, 2 p. [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2010-11 Market Report IHGC.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2010-11_Market_Report_IHGC.pdf) (accessed Nov 29, 2021).
- DHWV. (2021): Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. IHGC-Market Report November 15, 2021, 2 p.
- Haunold A. (1981): Hop Production, Breeding, and Variety Development in Various Countries. *The American Society of Brewing Chemists, Inc.*, Vol. 31, No. 1: 27-34.
- Helphand K. (2014): Grids and Garlands: The Landscape of Hops. *A Journal of Place*, Vol. 10, No. 1: 14-16.
- Henning J.A., Gent D.H., Twomey M.C., Townsend M.S., Pitra N.J., and Matthews P.D. (2015): Precision QTL mapping of downy mildew resistance in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 202: 487-498.
- IHGC. (2004): International Hop Growers Convention, Economic Commission Summary Reports (accessed Mar 29, 2022, [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/IHGC EC report XI-04.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/IHGC_EC_report_XI-04.pdf)
- IHGC. (2021a): International Hop Growers' Convention, IHGC Hop Variety List 2021, [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2021\\_NOV\\_IHGC\\_HopVarietyList21.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2021_NOV_IHGC_HopVarietyList21.pdf) (accessed Nov 29, 2021).
- IHGC. (2021b): International Hop Growers Convention, Economic Commission Summary Reports 2009-2021. Available at <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/obj.htm> (accessed Mar 29, 2022).
- IHGC. (2022): International Hop Growers Convention, IHGC Secretariat. Available at <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/mem.htm> (accessed Mar 28, 2022).
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2019): Global hop market analysis within the International Hop Growers' Convention. *Slovenian Institute of Hop Research and Brewing. Hop Bulletin*, 26: 99-108.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2020): A Bayesian analysis of hop price fluctuations. *Agric. Econ. – Czech*, 66: 519-526.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2022): The delayed surplus response for hops related to market dynamics. *Agric. Econ. – Czech*, 68(8): 293-298.
- Matoušek J., Kocabek T., Patzak J., Jindrich B., Kristyna S., Ajay K.M., Ganesh S.D., Anna T., Eiichiro O., and Karel K. (2016): The "putative" role of transcription factors from HIWRKY family in the regulation of the final steps of prenylflavonoid and bitter acid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology*, 92: 263-277.



- Pavlovič M. (2014): Hop Industry - Quality Management, Decision Support Modelling. Verlag Dr. Kovač, Hamburg, ISBN 978-3-8300-7537-0, 103 p.
- Roy A.T., Leggett G., and Koutoulis A. (2001): Development of a Shoot Multiplication System for Hop (*Humulus lupulus* L.). In *Vitro Cellular & Developmental Biology*, Vol. 37, No. 1: 79-83.
- Štěrba K., Pavel Čejka P., Čulík J., Jurková M., Krofta K., Pavlovič M., Mikyška A., Olšovská J. (2015): Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 73(2): 151-158.
- Watson B. (2015): What's the Next IPA? Brewers Association. [www.brewersassociation.org-insights-the-next-ipa/](http://www.brewersassociation.org-insights-the-next-ipa/) (accessed Jan 30, 2022).

## OBVLADOVANJA HMELJEVEGA BOLHAČA (*Psylliodes attenuatus* Koch) NA HMELJU (*Humulus lupulus* L.) Z UPORABO ALTERNATIVNIH PRIPRAVKOV

Magda RAK CIZEJ<sup>1</sup> in Franček POLIČNIK<sup>2</sup>

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 30. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 8. 12. 2022

### Izvleček

Hmeljev bolhač (*Psylliodes attenuatus* Koch) je pomemben škodljivec hmelja. Ima eno generacijo letno z dvema pojavoma, spomladanskim in poletnim. Prvi prezimili osebki se pojavijo spomladi v času intenzivne rasti hmelja, prva generacija odraslih osebkov pa poleti, v času oblikovanja hmeljevih storžkov. Ko preseže prag gospodarske škode, uporabimo insekticide. Na hmelju imamo trenutno za obvladovanje hmeljevega bolhača dovoljeni dve aktivni snovi, in sicer ciantraniliprol in lambda-cihalotrin. Slednja bo v EU kmalu prepovedana. Zato smo v raziskavo za obvladovanje hmeljevega bolhača v spomladanskem času vključili metode z nizkim tveganjem, kot so gnojila, regulatorji rasti, biostimulanti, repelenti, ipd. Nekateri pripravki, uporabljeni v raziskavi, naj bi imeli stimulativen učinek na rast in razvoj hmelja. Slednji niso dali zelenih učinkov v smislu hitre rasti in zmanjšani pojavnosti poškodb od hmeljevega bolhača. Najmanj hmeljevih bolhačev smo zasledili na parcelah, kjer smo uporabili insekticida Karate Zeon 5 CS (a. s. lambda-cihalotrin) in Exirel (a.s. ciantraniliprol). Med alternativnimi pripravki so bili doseženi dobri rezultati, kjer smo večkrat uporabili pripravek Algo-Plasmin. Poškodbe na listih hmelja so bile statistično značilno najmanjše na parcelah, kjer smo uporabili kontaktna insekticida Karate Zeon 5 CS in Exirel, med alternativnimi pripravki pa Algo-Plasmin, CutiSan in Envelope. Z nekaterimi alternativnimi pripravki lahko delno omejimo poškodbe od hmeljevega bolhača na hmelju v spomladanskem času.

**Ključne besede:** hmelj, *Humulus lupulus*, hmeljev bolhač, *Psylliodes attenuatus*, alternativni pripravki, učinkovitost

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: magda.rak-cizej@ihps.si

<sup>2</sup> Mag. inž. hort., IHPS, e-pošta: franci.policnik@ihps.si

## CONTROL OF HOP FLEA BEETLE (*Psylliodes attenuatus* Koch) ON HOPS (*Humulus lupulus* L.) USING ALTERNATIVE PREPARATIONS

### Abstract

The hop flea beetle (*Psylliodes attenuatus* Koch) is the most common pest on hops (*Humulus lupulus* L.). It has one generation per year with two occurrences. The first overwintered specimens appear in the spring during the intensive growth of hop. First generation of hop flea beetle occurs in the summertime when the plants formulate hops. When the hop flea beetle exceeds the economic threshold, it is recommended to use insecticides. Preparations with active ingredient (a. i.) cyantraniliprole and lambda-cyhalothrin are currently registered for hop. The a. i. lambda-cyhalothrin will soon be banned in the EU. That's why we included preparations such as fertilizers, growth regulators, biostimulants, and repellents in the research for the possibility of controlling the hop flea beetle in the spring time with alternative methods. Some preparations used in the research are known to have a stimulating effect on the growth and development of hop. But they have no effects on reducing the damage caused by the hop flea beetle. The lowest numbers of hop flea beetles were found on the plots where the insecticides Karate Zeon 5 CS (a. s. lambda-cyhalothrin), Exirel (a. s. cyantraniliprole) were used. Among the alternative preparations, we had good results on the plots, where we used preparation Algo-Plasmin in several times. Damages on hop leaves was statistically significantly the smallest in plots where the contact insecticides Karate Zeon 5 CS and Exirel were used. Among the alternative preparations, there were minor damages on the hop leaves where we used Algo-Plasmin, CutiSan and Envelope. This research indicates that some alternative preparations can partially limit the damage caused by hop flea beetles in springtime.

**Key words:** hops, *Humulus lupulus*, hop flea beetle, *Psylliodes attenuatus*, alternative products, efficacy

### 1 UVOD

Hmeljev bolhač (*Psylliodes attenuatus* Koch) je znan škodljivec hmelja pri nas in tudi v drugih evropskih državah, kjer pridelujejo hmelj (Kač, 1957; Neve, 1991). V zgodnjih 50 letih ni povzročal posebnih težav v rodnih nasadih hmelja, ki so bili dobro oskrbovani. Hmeljarji so imeli z njim več težav predvsem v prvoletnih nasadih hmelja in v ukoreniščih, kjer so ga morali zatirati z ustreznimi insekticidi (Kač, 1957). Njegovi glavni gostiteljski rastlini sta hmelj (*Humulus lupulus* L.) in navadna konoplja (*Canabis sativa* L.), občasno pa se prehranjuje tudi na veliki koprivi (*Urtica dioica* L.) (Guo in sod., 2022). Ima eno generacijo letno in sicer s spomladanskim in poletnim pojavljanjem (Rak Cizej in Žolnir, 2003; Weihrauch in sod., 2019). V sredini aprila se običajno pojavijo bolhači, ki so prezimili pod odpadlimi rastlinskimi deli, kamenjem, grudami zemlje ali v zgornji plasti tal. Spomladi se hrošči pričnejo

prehranjevati na komaj vzniklem hmelju. Poškodbo povzročajo z izjedanjem povrhnjice listov, ki v spomladanskem času hitro prirašča in hkrati z njo se večajo tudi izjede. Tako poškodovan list izgleda kot sito z velikimi luknjami, kar zmanjša fotosintetsko aktivnost. Pri močnejšem napadu spomladi hrošči hmeljevega bolhača objedajo tudi stebela hmelja, tako da poganjki hmelja lahko v celoti propadejo. Spomladanski rod lahko povzroči precej škode zlasti v toplih in suhih letih (Kač, 1957; Žolnir, 2002).

Nova generacija hroščev hmeljevega bolhača se pojavi poleti, običajno v sredini julija. Poletni pojav hroščev povzroča škodo na listih in storžkih. Škoda nastane predvsem na storžkih, poškodbe listov v poletnem času so manj pomembne. Poškodovani storžki ostanejo razprti, zato je večja verjetnost izpada lupulinskih žlez.

Za zatiranje hmeljevega bolhača je že dlje časa registrirana aktivna snov (a.s.) lambda-cihalotrin, ki je kontaktna – neselektivna aktivna snov z omejeno uporabo, hkrati pa je aktivna snov okoljsko problematična. Posledično bo aktivna snov na EU nivoju v kratkem odstranjena s seznama dovoljenih sredstev za uporabo ne samo na hmelju, temveč tudi na ostalih kmetijskih rastlinah. To je bil povod za izvajanje raziskave za obvladovanje hmeljevega bolhača spomladanskega pojava, s katero smo želeli preveriti učinek metod z nizkim tveganjem, kot so gnojila, regulatorji rasti, biostimulanti, repelenti, ipd.

## **2 MATERIALI IN METODE**

### **2.1 Lokacija izvajanja poskusov v letih 2021 in 2022**

Poskus je bil v letih 2021 in 2022 izveden v hmeljišču na območju Savinjske doline in sicer na lokaciji Letuš, na površini cca. 768 m<sup>2</sup>. V poskusnem hmeljišču je bil v letu 2021 posajen hmelj sorte Celeia, in sicer s certificiranimi sadikami hmelja A. Vsaka poskusna parcela je bila dolga 10,5 m, široka 2,4 m, na vsaki parceli je bilo po 10 rastlin hmelja. Poskus je bil bločno zasnovan v štirih ponovitvah.

### **2.2 Uporabljeni pripravki v poskusu**

Pripravki, ki smo jih uporabili v poskusih v letih 2021 in 2022, so bili različni glede na vsebnost aktivne snovi in načina delovanja. Med njimi smo uporabili tudi insekticidne pripravke, ki so služili kot standard. Preučevali smo učinkovitost različnih sredstev, in sicer gnojil, biostimulantov, repelentov, insekticidov.

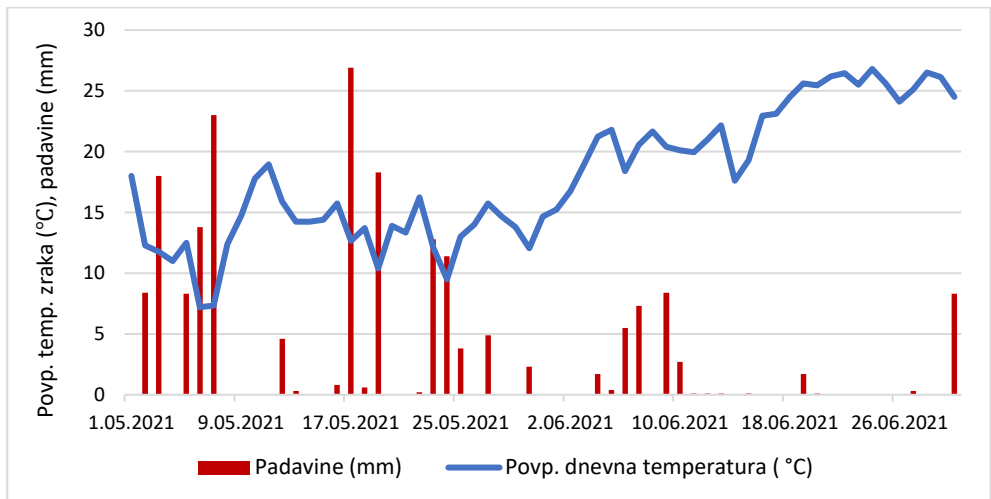
V letu 2021 smo uporabili gnojila z biostimulativnim ali odvrčalnim učinkom, in sicer: Algo-Plasmin (3-4 kg/ha), Fructol bio (1 l/ha), Vitanica Si (2 l/ha), CutiSan (30 kg/ha), Invelop (30 kg/ha) ter insekticida Karate Zeon 5 CS (0,01 % konc.) in Exirel (0,45 l/ha) ob dodatku močila Codacide (1,5 l/ha). Večino pripravkov za

obvladovanje hmeljevega bolhača smo na hmelju v letu 2021 uporabili 2-krat, pripravke Algo-Plasmin, CutiSan in Invelop 3-krat, Exirel 1-krat, kar je bilo v skladu z navodili za uporabo. Ob prvi aplikaciji, ki smo jo izvedli 1. junija 2021, smo uporabili vse pripravke. Rastline hmelja so imele v povprečju razvite 4 do 5 parov listov (BBCH 14–15). Pri drugi aplikaciji smo aplicirali vse pripravke, razen insekticida Exirel. Drugo aplikacijo smo izvedli 8. dan po prvi aplikaciji in sicer 9. junija 2021. Rastline hmelja so imele v povprečju 7 do 8 parov listov (BBCH 17–18). Tretjo aplikacijo, pri kateri smo uporabili zgolj Algo-Plasmin, CutiSan in Invelop smo izvedli 15. junija 2021 (rastline v fenofazi BBCH 19). Vse tri aplikacije smo izvedli z nahrbtno škropilnico Solo. Pri prvi aplikaciji smo uporabili 200 l vode/ha, pri drugi in tretji pa 300 l vode na ha. Pri vseh treh škropljenjih smo uporabili 3 bare tlaka. Temperatura zraka v času prve aplikacije je bila 20 °C.

Na podlagi rezultatov, pridobljenih v letu 2021, smo poskus zatiranja oziroma zmanjševanja populacije hmeljevega bolhača spomladanske generacije ponovili na isti lokaciji tudi v letu 2022. V poskusu nismo uporabili le tiste pripravke, ki so dali obetajoče rezultate v letu 2021, in sicer Algo-Plasmin (3 kg/ha), CutiSan (15 kg/ha), Invelop (15 kg/ha); pri slednjih dveh smo odmerek, ki je bil uporabljen v letu 2021, zmanjšali za polovico. V poskus smo vključili standardna insekticida (Karate Zeon 5 CS) z dodatkom močila Nu- film in Exirel v dveh različnih odmerkih in sicer 0,45 l/ha in 0,75 l/ha skupaj z močilom Codacide (1,5 l/ha). Prav tako smo v letu 2022 v poskusu uporabili nove pripravke in sicer Piper (1,2-1,5 l/ha) in Coralite KR+ (1,5 kg/ha). Piper, ki je gnojilo na osnovi bora, in je ekstrakta čilija, naj bi imel repelentno delovanje. Gnojilo Coralite KR+ smo vključili v poskus, da preverimo njegovo delovanje na rast in razvoj hmelja in jačanje povrhnjice listov, kar naj bi imelo za posledico manjše poškodbe od hmeljevega bolhača. V letu 2022 se je hmeljev bolhač spomladanskega pojava pojavil že v aprilu, vendar je bila njegova populacija zelo nizka. Posledično smo prvo aplikacijo izvedli šele v začetku druge dekade maja in sicer 12. 5. 2022, ko je bil hmelj v povprečju visok med 120 in 170 cm (BBCH 17). Pri drugoletnih nasadih hmelja sta značilna neenakomeren razvoj in posledično višina rastlin. Pri prvi aplikaciji smo uporabili 400 l vode/ha, uporabili smo nahrbtno škropilnico Solo, s tlakom 3 bare. Drugo in tudi hkrati zadnjo aplikacijo smo v letu 2022 izvedli 11 dni po prvi aplikaciji, in sicer 23. maja 2022. Za daljši razmik med aplikacijami smo se odločili, ker ni bilo padavin, ki bi izprale nanesena sredstva ob prvi aplikaciji, hkrati pa tudi populacija bolhačev ni bila velika. Drugo aplikacijo smo izvedli z nahrbtno škropilnico Solo, ob uporabi 500 l vode/ha in tlaka 3 barov. Rastline hmelja ob drugi aplikaciji so bile v fenofazi razvoja po BBCH 19 (razvitih 9 parov listov), rastline hmelja so bile visoke preko 200 cm. Pri drugi aplikaciji smo uporabili vse pripravke, razen insekticida Exirel, ki ga smemo v skladu z navodili za uporabo na isti površini uporabiti zgolj 1-krat letno. V času aplikacije so bile ugodne vremenske razmere za aplikacijo. Temperatura zraka v času druge aplikacije je bila 23°C; relativna zračna vlaga zraka pa 50 %.

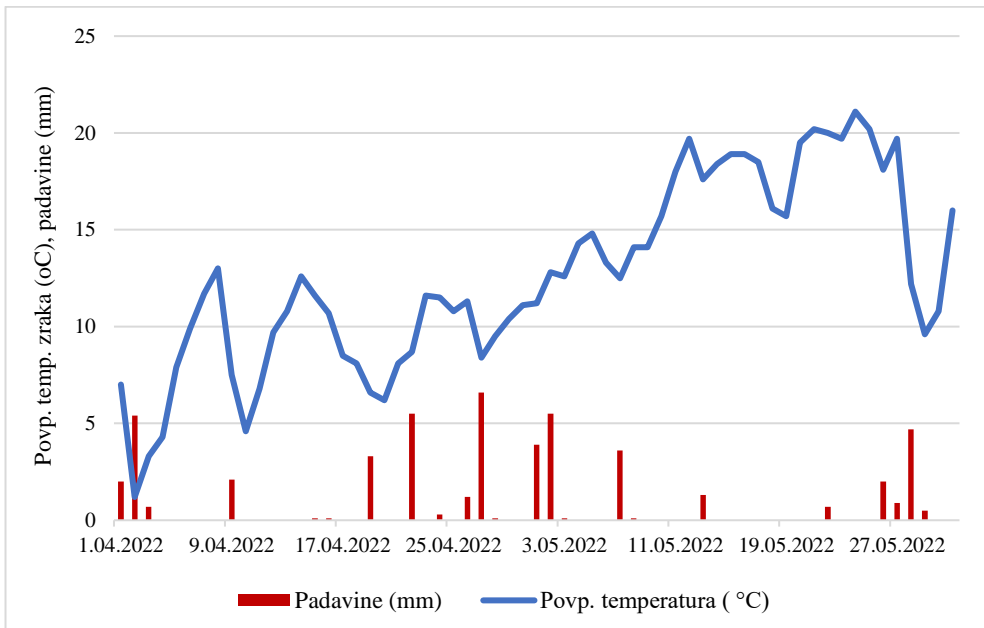
### 2.3 Vremenski podatki v letih 2021 in 2022

Za poskus smo v letih 2021 in 2022 uporabili meteorološke podatke izmerjene s pomočjo vremenske postaje Netatmo, ki je locirana v Letušu in je od lokacije izvajanja poskusa oddaljena cca. 300 m. V maja 2021 je bila povprečna temperatura zraka 13,5 °C, kar je pod dolgoletnim povprečjem (slika 1). Posledično nizke temperature in večja količina padavin v maju (skupno 158 mm/m<sup>2</sup>) niso ustrezale hmeljevemu bolhaču, ki se v maju ni pojavil v večjem številu. V juniju je temperatura zraka naraščala in v času izvajanja poskusa dosegla povprečje blizu 20 °C. V drugi polovici junija je povprečna temperatura zraka preseгла 25°C. Količina padavin in njena razporeditev ter intenziteta niso imeli posebnega vpliva na morebitno izpiranje uporabljenih pripravkov in njihovo učinkovitost v poskusu.



**Slika 1:** Meteorološki podatki za lokacijo Letuš od 1. maja do 30. junija 2021 (vir: Netatmo, 2021)

Aprila 2022 je bila povprečne temperature zraka na lokaciji poskusa 8,9 °C, kar je bilo pod dolgoletnim povprečjem. Nizke temperature niso bile ugodne za zgoden pojav prezimnih osebkov hmeljevega bolhača. V prvi dekadi maja je bila povprečna temperatura zraka 13 °C, v drugi dekadi 18 °C. V času izvajanja poskusa je padlo zgolj 10,1 mm padavin, kar je bilo ugodno s stališča, da nam ni izpiralo pripravkov (slika 2).



**Slika 2:** Agrometeorološki podatki za lokacijo Letuš od 1. aprila do 31. maja 2022 (vir: Netatmo, 2022)

## 2.4 Ocenjevanje in vrednotenje poskusa

Poskus je bil bločno zasnovan v 4 ponovitvah. Vsaka poskusna parcela je vsebovala eno vrsto hmelja, ki je bila dolga 10,5 m in široka 2,4 m (25,2 m<sup>2</sup>), torej za eno obravnavanje smo uporabili cca. 100 m<sup>2</sup> površine. Znotraj vsake parcele je bilo 10 rastlin hmelja. V letu 2021 je bila posamezna rastlina hmelja napeljana na eno vodilo, v letu 2022 na dve vodili. Obe leti smo ocenjevali delež poškodovanih listov hmelja od hmeljevega bolhača na enem vodilu, prav tako smo merili višino rastlin na enem vodilu. Tako je bila metodika obe leti izvajanja poskusa enaka.

Populacijo bolhačev smo ocenili pred aplikacijo, 7 in 14 dan po aplikaciji. Na vsaki poskusni parceli smo na 10 rastlinah prešteli število bolhačev/rastlino. Ob vsakem ocenjevanju smo izmerili višino rastlin na enem vodilu, na vseh 10 rastlinah na posamezno parcelo smo ocenili delež poškodovanih listov hmelja na 10 listih, kar je skupno 400 listov/obravnavanje (10 rastlin po 10 listov x 4 ponovitve). Ker so bile rastline hmelja v letu 2022 v višji fenološki fazi razvoja, smo na posamično rastlino ocenili 14 listov, kar je v letu 2022 na obravnavanje skupno predstavljalo 560 listov (10 rastlin po 14 listov x 4 ponovitve). Ocenjevali smo poškodbe na zgodnjih, najmlajših listih na katerih se bolhači najraje prehranjujejo. Ocenjevanje je potekalo v skladu s priporočili (EPPO, 2014).

Pridobljene podatke o višini rastlin, številu bolhačev na rastlino, deležu poškodovanih listov hmelja od hmeljevega bolhača, smo računalniško obdelali s programom Excel ter statističnim programom R 4.2.2.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 Rezultati ocenjevanja poskusa v letu 2021

##### 3.1.1 Število hmeljevih bolhačev na rastlini hmelja v letu 2021

Na vsaki poskusni parceli smo prešteli število hmeljevih bolhačev na posamično rastlino. Število hmeljevih bolhačev se med obravnavanji ni statistično značilno razlikovalo. Pri ocenjevanju 8. junija 2021 jih je bilo največ na kontrolnih parcelah in sicer 3,4 bolhača na rastlino. Najmanj hmeljevih bolhačev in sicer 1,9 bolhača/rastlino je bilo na parcelah, kjer je bil uporabljen insekticid Karate Zeon 5 CS (a.s. lambda-cihalotrin) (preglednica 1). Nekaj manj hmeljevih bolhačev smo zaznali tudi na obravnavanju, kjer smo uporabili gnojilo Algo-Plasmin. Pri ocenjevanju 22. junija 2021 je bil hmeljev bolhač na rastlinah prisoten v zelo majhnem številu, namreč v tistem času se je že zaključeval spomladanski pojav. Ker je bila temperatura zraka v času drugega ocenjevanja visoka, je bila mobilnost bolhačev velika, posledično bolhačev tudi ni bilo mogoče realno prešteti na rastlinah.

**Preglednica 1:** Povprečno število hmeljevih bolhačev/rastlino v letu 2021. Enaka črka pomeni, da med obravnavanji ni bilo statistično značilnih razlik, Duncanov test mnogoterih primerjav  $p=0,05$

Obravnavanje - pripravek (odmerek/ha); št. uporab	Povprečno število hmeljevih bolhačev/rastlino; 8. 6. 2021	Povprečno število hmeljevih bolhačev/rastlino; 22. 6. 2021
Algo-Plasmin (3-4 kg/ha); 3x	2,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
CutiSan (30 kg/ha); 3x	4,3 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
Exirel (0,45 l/ha)+ Codacide (1,5 l/ha); 1x	4,2 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
Fructol bio (1 l/ha); 2x	2,9 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>
Invelop (30 kg/ha); 3x	3,6 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
Karate Zeon 5 CS (0,01 % konc.); 2X	1,9 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>
Kontrola - neškropljeno	3,4 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
Vitanica Si (2 l/ha); 2x	2,7 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>



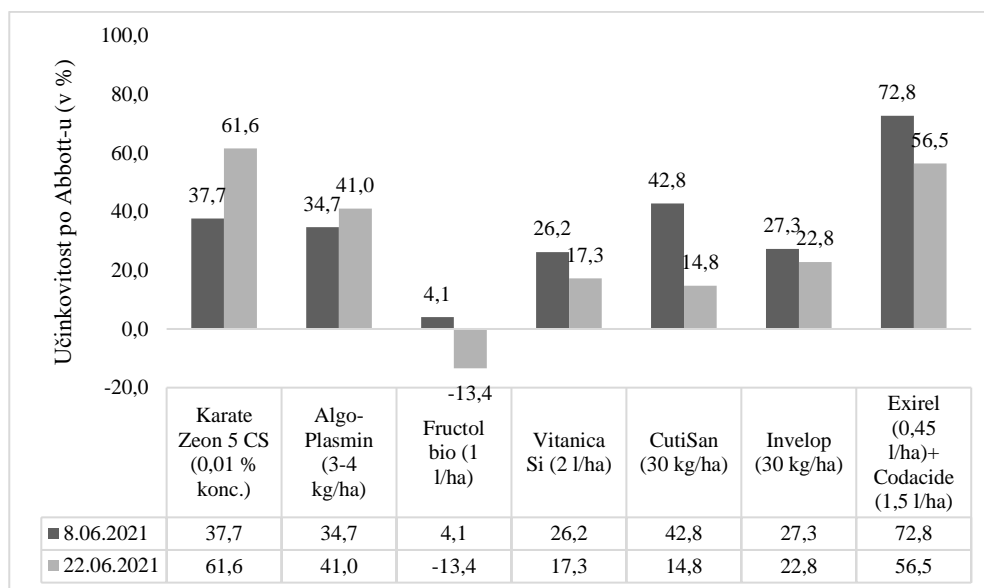
### 3.1.2 Delež poškodovanosti listne površine hmelja v letu 2021

Ocenjevanje poškodovanosti listov hmelja je bilo v letu 2021 opravljeno 8. in 22. junija 2021. Rezultati obeh ocenjevanj so prikazani v preglednici 2, kjer je razvidno, da je bila poškodovanost listne površine hmelja statistično značilno najmanjša, kjer smo uporabili insekticid Exirel v odmerku 0,45 l/ha ter ob dodatku močila Codacide (1,5 l/ha). Prav tako so bile poškodbe na listih hmelja v primerjavi s kontrolnimi parcelami statistično značilno manjše pri obravnavanjih, kjer smo uporabili pripravke Karate Zeon 5CS (0,01 % konc), Algo-Plasmin (3 kg/ha oziroma 4 kg/ha), CutiSan (30 kg/ha) in Invelop (30 kg/ha). Pripravek Fructol bio (1 l/ha) v primerjavi s kontrolo ni statistično značilno zmanjšal poškodb od hmeljevega bolhača na listih hmelja.

**Preglednica 2:** Delež poškodovanosti listne površine hmelja od hmeljevega bolhača (*Psylliodes attenuatus*) v letu 2021. Enaka črka pomeni, da med obravnavanji ni bilo statistično značilnih razlik, Duncanov test mnogoterih primerjav  $p=0,05$

Obravnavanje - pripravek (odmerek/ha); št. uporab	Poškodbe na listih hmelja; 8. 6. 2021	Poškodbe na listih hmelja; 22. 6. 2021
Algo-Plasmin (3-4 kg/ha); 3x	5,7 <sup>b</sup>	1,5 <sup>ab</sup>
CutiSan (30 kg/ha); 3x	5,0 <sup>b</sup>	2,1 <sup>ab</sup>
Exirel (0,45 l/ha)+ Codacide (1,5 l/ha); 1x	2,4 <sup>c</sup>	1,1 <sup>b</sup>
Fructol bio (1 l/ha); 2x	8,3 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>
Invelop (30 kg/ha); 3x	6,3 <sup>b</sup>	1,9 <sup>ab</sup>
Karate Zeon 5 CS (0,01 % konc.); 2x	5,4 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>
Kontrola - neškropljeno	8,7 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>
Vitanica Si (2 l/ha); 2x	6,4 <sup>b</sup>	2,1 <sup>ab</sup>

Učinkovitost delovanja dveh insekticidnih pripravkov Karate Zeon 5 CS (0,01 % konc) in Exirel (0,45 l/ha) po Abbott-u je bila v primerjavi z ostalimi pripravki precej višja in se je gibala med 30 in 60 %, odvisno od časa ocenjevanja. V primerjavi s kontrolo je imel zelo slabo učinkovitost pripravek Fructol bio (1 l/ha). Prav tako je razlike v delovanju pripravkov proti hmeljevim bolhačem pokazal tudi Algo-Plasmin (3–4 kg/ha). Učinkovitost delovanja pripravka Algo-Plasmin je bila pri drugem ocenjevanju (22. 6. 2021) 41 %. Pripravek CutiSan je imel pri prvem ocenjevanju (8. 6. 2021) dobro delovanje (42,8 %), nato pa se je njegova učinkovitost zmanjšala. Več smo pričakovali tudi od pripravka Invelop, vendar je bila njegova učinkovitost pod našimi pričakovanji in predvidevanji (slika 3).



**Slika 3:** Učinkovitost delovanja pripravkov na hmeljevega bolhača (*Psylliodes attenuatus*) (po Abbott-u v %) glede na poškodovanost listov hmelja v različnih terminih ocenjevanja v letu 2021

## 3.2 Rezultati ocenjevanja poskusa v letu 2022

### 3.2.1 Število hmeljevih bolhačev na rastlini hmelja v letu 2022

Povprečno število bolhačev ob prvem ocenjevanju, 18. 5. 2022, 6 dni po prvi aplikaciji, se je statistično značilno razlikovalo glede na uporabljena sredstva oziroma obravnavanja. Najmanj bolhačev smo zaznali na parcelah, kjer je bil uporabljen insekticid Exirel v odmerku 0,75 l/ha, največ pa na kontroli (12,7 bolhačev/rastlino) (preglednica 3). Bistvenih statistično značilnih razlik med ostalimi uporabljenimi pripravki glede na število bolhačev ni bilo. Ker so hmeljevi bolhači zelo mobilni, je njihovo ocenjevanje oziroma štetje oteženo, zato število prisotnih bolhačev na rastlino ni vedno relevanten podatek glede učinkovitosti uporabljenih sredstev.

**Preglednica 3:** Povprečno število hmeljevih bolhačev (*Psylliodes attenuatus*) na rastlini hmelja v letu 2022. Enaka črka pomeni, da med obravnavanji ni bilo statistično značilnih razlik, Duncanov test mnogoterih primerjav  $p=0,05$

Obravnavanje - pripravek (odmerek/ha); št. uporab	Povprečno število hmeljevih bolhačev/rastlino; 18. 5. 2022	Povprečno število hmeljevih bolhačev/rastlino, 31. 5. 2022
Algo-Plasmin (3 kg/ha); 2x	6,9 <sup>abc</sup>	3,9 <sup>a</sup>
Coralite KR+ (1,5 kg/ha); 2x	5,7 <sup>bcd</sup>	2,6 <sup>a</sup>
CutiSan (15 kg/ha); 2x	7,3 <sup>abc</sup>	2,8 <sup>a</sup>
Exirel (0,45 l/ha)+Codacide (1,5 l/ha); 1x	5,3 <sup>cd</sup>	3,4 <sup>a</sup>
Exirel (0,75 l/ha)+Codacide (1,5 l/ha); 1x	3,6 <sup>d</sup>	3,5 <sup>a</sup>
Invelop (15 kg/ha); 2x	7,2 <sup>abc</sup>	2,9 <sup>a</sup>
Karate Zeon 5 CS (0,01 %) + Nu film (0,025 %); 2x	7,8 <sup>ab</sup>	2,3 <sup>a</sup>
Kontrola	8,6 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>
Piper (1,2 l/ha oz. 1,5 l/ha); 2x	6,6 <sup>abc</sup>	4,0 <sup>a</sup>

### 3.2.2 Delež poškodovanosti listne površine hmelja v letu 2022

Najbolj merodajen in lažje merljiv podatek glede učinkovitosti pripravkov je delež poškodovane listne površine hmelja. Osmi dan po uporabi sredstev je bil najmanjši delež poškodovane listne površine pri insekticidu Exirel ne glede na uporabljen odmerek (uporabljen v zmanjšanem – 0,45 l/ha ali polnem odmerku - 0,75 l/ha), sledil je Karate Zeon 5 CS (0,01 % konc.) (preglednica 4). Med alternativnimi pripravki se je pri prvem ocenjevanju v letu 2022 najbolje izkazal Algo-Plasmin, ki pa se ni statistično značilno razlikoval med ostalimi pripravki (CutiSan, Invelop, Coralite KR+, Piper).

**Preglednica 4:** Delež poškodovanosti listne površine hmelja od hmeljevega bolhača (*Psylliodes attenuatus*) v letu 2022. Enaka črka pomeni, da med obravnavanji ni bilo statistično značilnih razlik, Duncanov test mnogoterih primerjav  $p=0,05$

Obravnavanje - pripravek (odmerek/ha); št. uporab	Povprečna poškodovanost listne površine; 18. 5. 2022	Povprečna poškodovanost listne površine; 31. 5. 2022
Algo-Plasmin (3 kg/ha); 2x	9,7 <sup>bc</sup>	5,5 <sup>ab</sup>
Coralite KR+ (1,5 kg/ha); 2x	10,0 <sup>bc</sup>	4,4 <sup>abc</sup>
CutiSan (15 kg/ha); 2x	10,7 <sup>b</sup>	5,5 <sup>ab</sup>
Exirel (0,45 l/ha)+Codacide (1,5 l/ha); 1x	4,7 <sup>d</sup>	3,0 <sup>bc</sup>
Exirel (0,75 l/ha)+Codacide (1,5 l/ha); 1x	4,3 <sup>d</sup>	3,0 <sup>bc</sup>
Invelop (15 kg/ha); 2x	10,5 <sup>b</sup>	3,4 <sup>bc</sup>
Karate Zeon 5 CS (0,01 %)+Nu film (0,025 %); 2x	8,1 <sup>c</sup>	1,8 <sup>c</sup>
Kontrola	12,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>
Piper (1,2 l/ha oz. 1,5 l/ha); 2x	10,3 <sup>b</sup>	5,9 <sup>ab</sup>

Učinek sredstev glede na poškodovanost listne površine pri drugem ocenjevanju (31. 5. 2022), se ni bistveno spremenil, še vedno je bila najmanj poškodovana listna površina, kjer smo uporabili insekticid Exirel in Karate Zeon 5 CS. Med alternativnimi pripravki je bil najmanjši delež poškodovane listne površine, kjer smo uporabili pripravek Invelop ter Coralite KR+ in Algo-Plasmin ter CutiSan med katerimi pa ni bilo statistično značilnih razlik.

#### 4 RAZPRAVA

Pri preskušanju pripravkov smo za zmanjševanje poškodb, ki jih povzročata hmeljev bolhač, uporabili alternativne pripravke, ki delujejo kot biostimulanti, sredstva za krepitev rastlin, z izjemo dveh pripravkov, ki smo jih uporabili kot standard in sicer insekticid Karate Zeon 5 CS in Exirel. Delovanje alternativnih pripravkov je v precejšnji meri odvisno od vremenskih dejavnikov predvsem temperature zraka in količine padavin. Pripravki Algo-Plasmin, CutiSan in Invelope so v poskusu pokazali, da z njihovo večkratno uporabo lahko zmanjšamo delež poškodovane površine listov, ki jih povzročajo hmeljevi bolhači spomladanskega pojava. Pri obravnavanju, kjer smo uporabili pripravek CutiSan in Invelope, smo imeli povprečno število hmeljevih bolhačev celo v podobnem številu kot pri neškropljeni kontroli, vendar so bile poškodbe statistično značilno manjše od kontrole. Predvidevamo, da sta kaolinska glina in smucek preprečevala prehranjevanje

hmeljevih bolhačev na mladih listih. Pri obravnavanju z uporabljenim insekticidnim pripravkom Exirel z dodanim močilom Codacide je bilo v povprečju več hmeljevih bolhačev na listih kot na kontroli, vendar so bile poškodbe statistično značilno najmanjše. Gnojili Fructol bio in Coralite KR+ nista dala zelenega učinka. Pripravek – gnojilo Piper naj bi imel repelentno delovanje. V poskusu v letu 2022 tega nismo potrdili. Na listih hmelja, kjer smo uporabili Piper, smo zasledili večje število hmeljevih bolhačev, posledično je bila listna površina hmelja bolj poškodovana, podobno kot na kontrolnih parcelah. Pri raziskavi smo ugotovili, da polovični odmerek pripravka CutiSan (15 kg/ha) in Envelope (15 kg/ha) delujeta primerljivo kot polni odmerek (30 kg/ha), saj rastline hmelja spomladi nimajo veliko listne mase, zato ni potreb po uporabi višjih odmerkov. Bolj pomembno je, da te pripravke pogosto nanašamo na rastline, še posebej, če jih izpere dež.

## 5 VIRI

- EPPO PP 1/283(1). (2014). *Psylliodes attenuata* on hop. 44 (3); 306-308
- Guo L., Tang C., Gao C., Li Z., Cheng Y., Chen J., Wang T., Xu J. Bacterial and fungal communities within and among geographic samples of the hemp pest *Psylliodes attenuata* from China. *Front. Microbiol.* 2022; 13(964735): 1-16 doi: 10.3389/fmicb.2022.9647355
- Kač M. Bolezni in škodljivci na hmelju, Kmetijska proizvodna in poslovna zveza v Žalcu, 1957; 201 str
- Rak Cizej, M., Žolnir, M., Hmeljev bolhač (*Psylliodes attenuatus* Koch) vse pogostejši škodljivec hmelja v Sloveniji.- Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Zreče, 4.-6. marec 2003. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije, s. 233-238
- Rak Cizej M., Oset Luskar M. 2012. Bolezni in škodljivci hmelja. V: Hmelj od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.), Žalec: 21-37
- Weihrauch F., Baumgartner A., Laupheimer S. Mühlbauer M. Hop-flea beetle revisited: In search for attractants- Proceedings of the Scientific-Technical Commission. Bischoffsheim, Alsace, France 7-11 July 2019. Weihrauch F.(ur.).Wolnzach, International Hop Growers' Convention I.H.G.C., s 70
- Žolnir, M. 2002. Priročnik za hmeljarje - Hmeljevi škodljivci. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, Žalec: 73-74.

## SOCIO-ECONOMIC IMPACT OF INTRODUCING BIODEGRADABLE TWINE IN THE HOP FIELDS

Alenka DOLER<sup>1</sup>

Professional article / Strokovni članek

Received / Prispelo: 30. 10. 2022

Accepted / Sprejeto: 8. 12. 2022

### Abstract

This article presents the results of survey, implemented within the LIFE BioTHOP project. It was carried out in summer 2022, 3 years after the project start, as an online survey. A total of 509 respondents (N=509) participated; 162 responses from outside of Slovenia and 347 from Slovenia. Questions on agriculture, attitudes and opinions on the introduction of BioTHOP biodegradable products in agriculture, sustainable development and circular economy with a focus on project results were included. The highest percentage of the respondents were hop growers (20%), followed by mechanical engineers (16%), other professions (15%), 13% amateur gardening, specialists in agriculture (11%), nature lovers (11%), and winemakers (10%). 61% were well acquainted with the concept of circular economy. 83% agree that agriculture has a big impact on the cultural landscape. 74% think that by 2035 the use of biodegradable plastics will increase. 73% considered the reduction of conventional plastics in the agriculture as very important. 76% were interested in biodegradable products as a more sustainable alternative. 56% consider that we could act better with the waste from agricultural production and 31% that we *must* act better. 50% believe that the waste material should be returned to the seller and the seller should arrange its proper treatment, while 40% think each waste producer must take care of it themselves. 43% of hop-growers will start composting on their farms, now when the guidelines are available, 35% of them think about it, while 9% of them already do it.

**Keywords:** public opinion survey, stakeholders, circular economy, biodegradable product, hop waste, hop fibre, PLA twine, planting pots, bottle packaging

## SOCIOEKONOMSKI VIDIK VPVELJAVE BIORAZGRADLJIVE VRVICE V HMELJIŠČE

### Izveček

V članku so predstavljeni rezultati spletne ankete, ki je bila pripravljena in izvedena v okviru projekta LIFE BioTHOP. Izvedena je bila v obliki spletne ankete poleti

---

<sup>1</sup> Dipl. upr. org., Development Agency Savinja, Žalec, Slovenia, e-mail: ra.savinja@ra-savinja.si

2022, tri leta po začetku projekta. V njej je sodelovalo 509 anketirancev (N=509); 162 odgovorov je prišlo izven Slovenije, 347 pa iz Slovenije. Vključena so bila vprašanja o kmetijstvu, stališčih in mnenjih o uvajanju biorazgradljivih izdelkov BioTHOP v kmetijstvo, trajnostnem razvoju in krožnem gospodarstvu s poudarkom na rezultatih projekta. Največji delež anketirancev so predstavljali hmeljarji (20%), sledijo strojni inženirji (16%), drugi poklici (15%), 13% ljubiteljsko vrtnarjenje, strokovnjaki s področja kmetijstva (11%), ljubitelji narave (11%) in vinarji (10%). 61% vprašanih je bilo dobro seznanjenih s konceptom krožnega gospodarstva. 83% vprašanih se strinja, da ima kmetijstvo velik vpliv na kulturno krajino. 74 % vprašanih meni, da se bo do leta 2035 povečala uporaba biorazgradljive plastike. 73 % vprašanih meni, da je zmanjšanje uporabe konvencionalne plastike v kmetijstvu zelo pomembno. 76% vprašanih se je zanimalo za biorazgradljive izdelke kot bolj trajnostno alternativo. 56% vprašanih meni, da bi lahko bolje ravnali z odpadki iz kmetijske proizvodnje, 31% pa, da moramo bolje ravnati. 50% vprašanih meni, da je treba odpadni material vrniti prodajalcu, ta pa mora poskrbeti za njegovo ustrezno obdelavo, medtem ko jih 40% meni, da mora vsak proizvajalec odpadkov za to poskrbeti sam. 43% hmeljarjev bo začelo kompostirati na svojih kmetijah zdaj, ko so na voljo smernice, 35% jih o tem razmišlja, 9% pa jih to že počne.

**Ključne besede:** javnomnenjska raziskava, deležniki, krožno gospodarstvo, biorazgradljiv izdelek, hmeljevina, hmeljeva vlakna, PLA vrstica, sadilni lončki, embalaža za steklenice

## 1 INTRODUCTION

In July 2019, a three-and-a-half-year project LIFE BioTHOP was launched. The aim of this project was to replace the polypropylene (PP) twine on the hop fields with the biodegradable and compostable twine made of renewable material polylactic acid (PLA), which can be degraded by composting to simple monomers (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, and biomass). With this, hop plant biomass after harvest can be used as the main ingredient of composting and also as material to produce biodegradable products; within the project bio-composite, planting pots, packaging trays and some other products were developed). By that, circular economy was implemented in hop production – when products are composted, compost is applied to the agricultural fields and by this, nutrients and organic mass is returned.

Development agency Savinja (DAS) was a project partner in the LIFE BioTHOP project, which was coordinated by the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing. Together with 5 more partners from 5 EU states (Portuguese Lankhorst Euronete Group, German, Zelfo Technology, TRIDAS from the Czech Republic, Spanish Tecnopackaging, and Slovenian Technological centre TECOS) we spread the word about our LIFE BioTHOP results / solutions among stakeholders, the general public and the mass media. One of the key goals of the project was to raise

social awareness and acceptance of the environmental benefits and behavioural influence in the life of current and future members of the communities as well. The role of DAS was to directly and indirectly involve the general public in the project, especially the inhabitants of the Lower Savinja Valley, the project demo region, and to follow the response of different stakeholders.

The aim of the survey, presented in this article was to obtain information on the perception of the:

- ✓ cross-sectional information on the state of knowledge of conventional plastics and
- ✓ public awareness, acceptance, and support of the BioTHOP solutions and various measures for the transformation of biodegradable products / solutions and the circular economy.

We were interested in public awareness, acceptance, and monitoring of the socio-economic impacts of the project - stakeholder opinion on sustainability and the circular economy, in relation to the concrete results / solutions of the project, which are an excellent alternative to conventional plastics.

## 2 MATERIALS AND METHODS

**Sample frame, size, and method of sampling.** The sample population of the survey included the population of Slovenia, Europe, and wider, ages between 18 and 66, younger than 18 and above 66. The intended sampling method was stratified random sampling. It was anticipated that the sample would be representative in terms of age and gender structure.

**Survey design.** We were focused on implementing alternative biodegradable materials in different fields of agriculture. People were asked to define themselves into interest groups: hop growers, farmers, gardeners, mechanical engineers, other professions, specialists in agriculture, nature lovers, winemakers and the industrial – plastic and packaging sector. The questionnaire was designed in three parts: (1) the introduction of new BioTHOP bioplastic products in the agriculture sector, sustainable development, and the circular economy, (2) basic socio-demographic characteristics of the respondents and (3) general recognition of the LIFE BioTHOP project. Participation was anonymous. The survey was prepared in Slovenian and English language. The questions were of the quantitative type, which the respondents answered with the help of ranking scales, and some were also qualitative, where the respondents gave descriptive answers of the open type or chose from pre-prepared categories. The last part of the questionnaire included questions on the socio-demographic characteristics of the respondents (gender, age, level of education achieved, etc.). The sample was constructed in such a way that it can be taken as

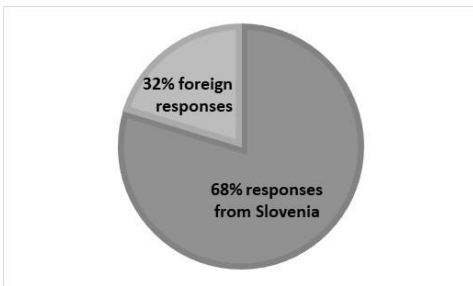


representative of the entire studied population and allows statistically reliable inference on this basis.

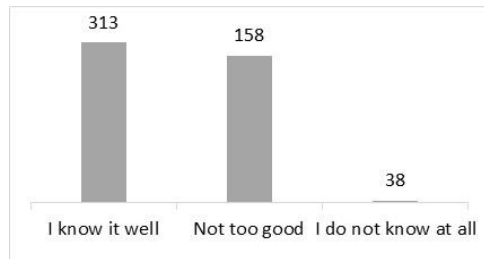
**Performing the survey.** The questionnaire was prepared in a computer (e-format), suitable for implementation online. Answers were collecting from 1 June 2022 to 15 July 2022. We received 509 completed questionnaires.

### 3 RESULTS OF THE PUBLIC OPINION SURVEY

There were 162 responses from outside of Slovenia and 347 from Slovenia (Figure 1). 55% of respondents were male.

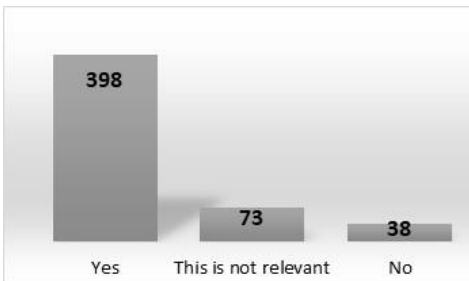


**Figure 1:** No. of received responses

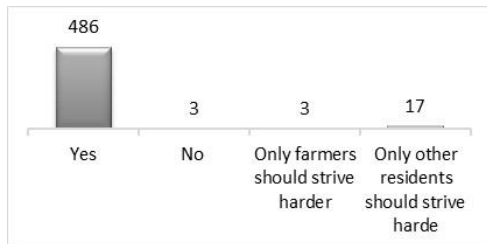


**Figure 2:** Respondent's acquaintance with the term circular economy

In the first part, we asked about biodegradable plastics, the introduction of new BioTHOP bioplastic products in the agriculture sector, sustainable development, and the circular economy.



**Figure 3:** Number of responds on question 'Does agriculture have a big impact on the appearance of the cultural landscape?'



**Figure 4:** Number of responds on question, if everybody in rural areas should strive for quality coexistence

Because the goal of the LIFE BioTHOP project was to introduce the circular economy into hop growing sector, we asked them “*How acquainted are they with the term circular economy*”. More than half of the respondents were well acquainted with the concept of circular economy (61%; Figure 2). More than 83% of respondents agree that agriculture has a big impact on the appearance of the cultural landscape (Figure 3).

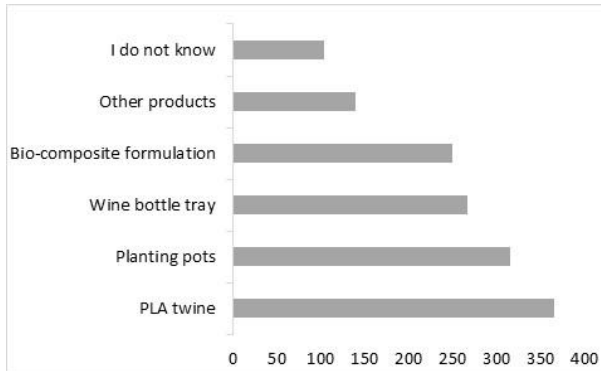
The majority of respondents (74%) think that by 2035 the use of biodegradable plastics for the needs of the economy and everyday life will increase. 18% of them do not know, because they think that this will depend on the economic situation in the future. 65 % of the respondents already use biodegradable products and 12% of the respondents have never used biodegradable products.

In the second part, we were asked about recognition of the BioTHOP project, in particular its solutions / products, which were listed on the sketch attached (Figure 5). Most of the respondents were familiar with the key products of the project, e.g., PLA twine (70%), planting pots (62%), and bottle packaging (52%) (Figure 6).



**Figure 5:** BioTHOP products

The majority of respondents (73%) consider the reduction of conventional plastics in the agriculture industry, by replacing them with more sustainable solutions as very important). All respondents (100%) know that a biodegradable product can be degraded by microorganisms into natural substances which do not burden the environment. Most respondents are interested in biodegradable products as a more sustainable alternative (76%), 18% of respondents are very interested. 56% of respondents consider, that we could act better with the waste from agricultural production. However, 31% of respondents think that we *must* act better.



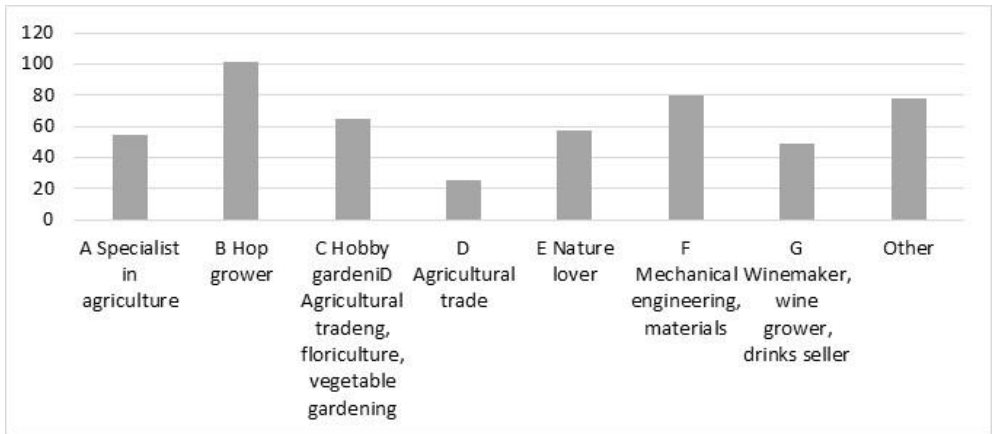
**Figure 6:** Most recognised LIFE BioTHOP project's products

In the continuation we were interested in “Who should, in your opinion, take care of plastic waste from the agricultural sector, which is mostly contaminated with soil and plant biomass and therefore unsuitable for recycling?” 50% of respondents believe that the waste material should be returned to the seller and the seller should arrange for proper treatment according to the law. While 40% of respondents think each waste producer must take care of it themselves according to the law. The following proposals appeared:

- ✓ Material should be sent to the specialist processor, funded by a levy on both supplier and use
- ✓ Plastic products can also be useful in situations where you require longevity of a product so it can be used continually for years
- ✓ State organizations should offer waste recycling services. Farmers who use plastic free and or biodegradable stuff should receive an extra price. Farmers who do not do this and neither do recycling should be fine.

As an end consumer, 37% of respondents linked the willingness to pay more for a biodegradable pot with the financial situation (a conventional plastics planting pot is 4 cents). 28% of respondents are willing to pay five times the cost of a conventional plastic pot. 8% of respondents are not willing to pay a higher price at all.

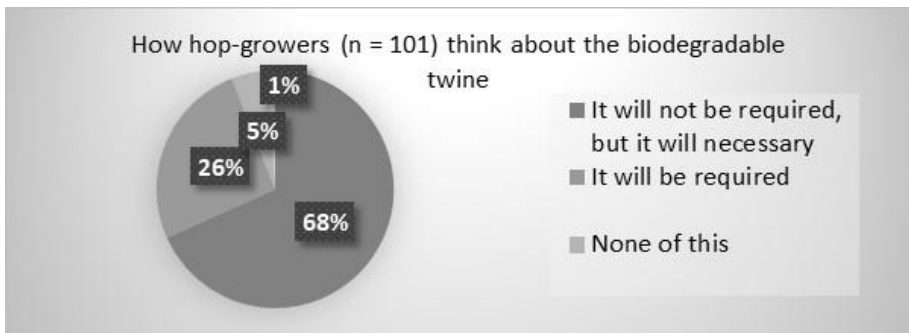
31% of respondents will contact Development Agency Savinja if interested in business models within the BioTHOP business plan or regarding hop fibres/composites.



**Figure 7:** Number of responders related to the interest groups they defined themselves to

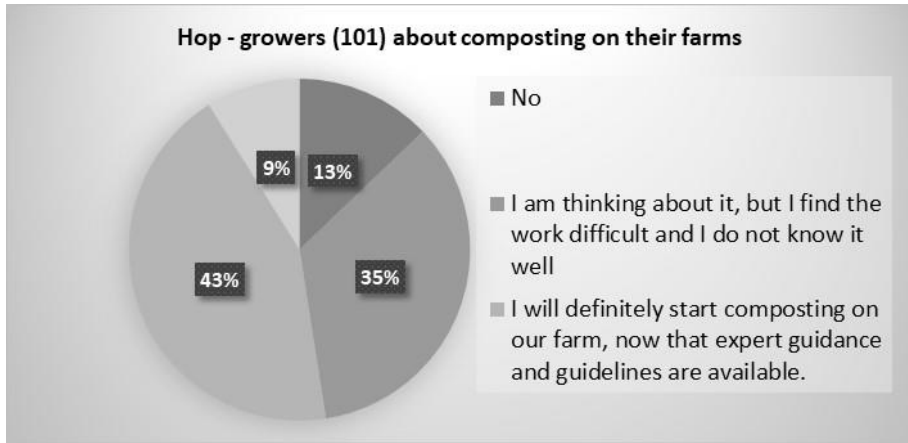
The highest percentage of the respondents were hop growers (20%), followed by mechanical engineers (16%), other professions (15%), 13% amateur gardening, specialists in agriculture (11%), nature lovers (11%), and winemakers (10%) (Figure 7).

Among the hop growers interviewed (101), 68% do not think that biodegradable twine will be required, but it will be necessary for the long term (Figure 8).



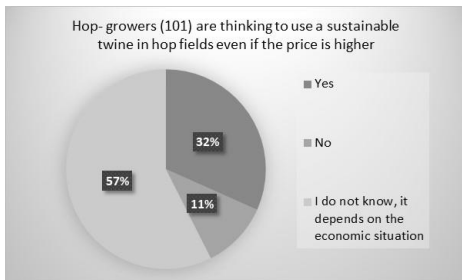
**Figure 8:** What hop-growers think about biodegradable twine implementation

43% of hop-growers will definitely start composting on their farms, especially now that expert guidance and guidelines are available. 35% of them think about it, while 9% of them already compost on their farms (Figure 9).

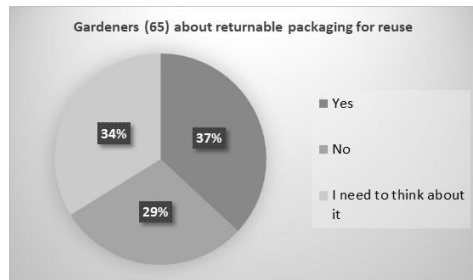


**Figure 9:** Hop-growers are thinking about composting on their farms

32% of hop growers are interested in using sustainable biodegradable twine in their hop fields, despite the higher price, while more than half (57%) are held back by fear of the uncertain economic situation (Figure 10).



**Figure 10:** What do hop-growers think about using a sustainable twine in hop fields if its price is higher

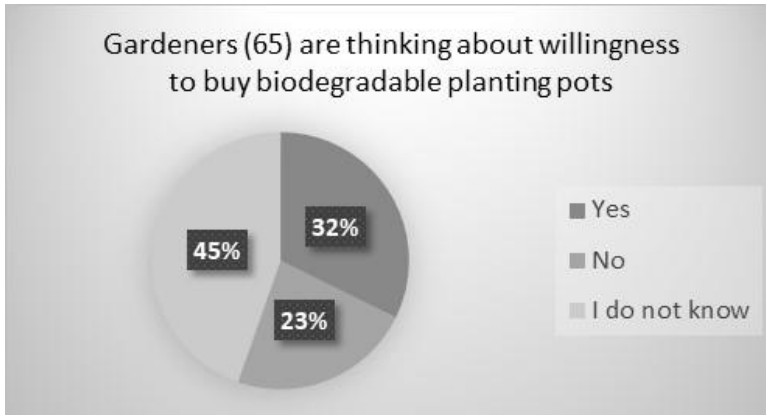


**Figure 11:** Hop-growers willingness to pay for biodegradable twine

More than half of the hop growers surveyed (54%) would be willing to pay twice the price of a conventional twine for a compostable biodegradable twine. 17% would pay three times the price. 15% would pay the same price as a conventional twine (Figure 11).

Among people that deal with *hobby gardening, floriculture, vegetable gardening*, 32% are considering buying biodegradable, compostable planting pots at a production cost of e.g. 40 cents each to sell their plants in it (Figure 12). 37% of them are willing to accept conventional plastic planting pots as returnable packaging

for reuse. Almost the same proportion would have to think it over. 29% would not reuse them.



**Figure 12:** Gardeners are thinking about willingness to buy biodegradable planting pots

Similarly, 84% of wine growers surveyed (10%) support the purchase of biodegradable packaging for wine bottles. Most of the winemakers would be willing to pay €1-2 for a biodegradable pack (67%) and only a small percent of them €2.1-3 (12%) or even €3.1-4 (4%).

#### 4 CONCLUSION

The BioTHOP project has contributed to greater awareness of the society of the use of biodegradable, compostable materials for the production of sustainable and environmentally friendly products (hop waste compost, hop fibres, packaging, planting pots, ...). The results of surveys shed light on aspects of the conventional plastics issue to which the target groups will pay more attention in the future.

The activities carried out under the BioTHOP project and the new products produced have shown that we have raised awareness that LIFE BioTHOP biodegradable, compostable material based on hops fibre and the new products are an excellent example and incentive for the development of green economic growth, improved well-being and quality of life. It is important to recognize that this is a long-term commitment to the environment. Based on the results of survey, it has become clear that stakeholders, the general public and the media are increasingly aware of the need and importance of a circular economy. As the three-and-a-half-year project has progressed, awareness of its content, and in particular of products such as twine, compost, planting pots and wine bottle packaging, has also improved. We are therefore pleased that, despite the current situation, participants are increasingly

willing to use new, more environmentally friendly biodegradable materials in their daily and professional lives as a more sustainable alternative, even if they are slightly more expensive. We hope that we have sparked a spark and that stakeholders will continue to follow our work after the end of the project.

In addition to the socio-economic impact analysis of the project, new policy recommendations need to be taken into account by including updated indicators of good results practices, and how best to protect the results of the BioTHOP project to ensure an effective collaborative strategy for the commercialization of the products and services created.

**Acknowledgement.** The LIFE BioTHOP project has received funding from the LIFE Programme of the European Union and it is co-financed by all six municipalities Braslovče, Polzela, Prebold, Tabor, Vransko, and Žalec. The content reflects only the author's view and exempts the European Commission for any use that may be made of the information it contains.

## 5 REFERENCES

- LIFE project BioTHOP webpage. Available at: <https://www.life-biothop.eu/>
- Smernice za ravnanje s hmeljevino in njeno predelavo v kompost na kmetijskem gospodarstvu, ki se ukvarja s hmeljarstvom: Available at: [https://www.life-biothop.eu/wp-content/uploads/2022/08/Smernice\\_hmeljevina-AVGUST-2022\\_FINAL-VERZIJA-1.pdf](https://www.life-biothop.eu/wp-content/uploads/2022/08/Smernice_hmeljevina-AVGUST-2022_FINAL-VERZIJA-1.pdf)
- LIFE project BioTHOP Layman`s report. Available at: <https://www.life-biothop.eu/wp-content/uploads/2019/12/Laymans-report-EN-4.pdf>
- LIFE project BioTHOP short videos illustrating the socio-economic impact of the project. Available at: Videos | BioTHOP ([life-biothop.eu](https://www.life-biothop.eu/))

## VPLIV HLADNEGA HMELJENJA PIVA NA VSEBNOST POLIFENOLOV IN GREŃČICE

Miha OCVIRK<sup>1</sup>, Ksenija RUTNIK<sup>2</sup>, Zarja MEDVED<sup>3</sup> in Iztok Jože KOŠIR<sup>4</sup>

Originalni znanstveni članek / Scientific article

Prispelo / Received: 8. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 8. 12. 2022

### Izvleček

Hladno hmeljenje piva ali »dry hopping«, je tehnika hmeljenja pivine, primerna predvsem za ale tipe piva, s katero izrazito povečamo intenziteto arome, hkrati pa lahko v pivo vnesemo alfa-kislino, ki so neprijetnega grenkega okusa, ker ne pride do izomerizacije. Od časa doziranja in časa kontakta hmelja z vodno fazo je odvisno koliko hmeljnih komponent eteričnega olja bo prešlo in ostalo v pivini, mladem pivu in končnem produktu pivu.

**Ključne besede:** Hmelj, pivo, alfa-kislino, polifenoli, grenčica

## INFLUENCE OF DRY HOPPING ON BEER BITTERNESS AND POLYPHENOLS CONTENT

### Abstract

Dry hopping of beer is a hopping technique, suitable especially for ale types of beer, which can significantly increase the intensity of the aroma, at the same time alpha-acids can be introduced into the beer, which have an unpleasant bitter taste because isomerization does not occur. How many hop components of the essential oil will pass through and remain in the wort, young beer and the final beer product depends on the dosing time and the contact time of the hops with the water phase.

**Key words:** Hop, beer, alpha-acids, polyphenols, bitterness

## 1 UVOD

Pivu se z namenom pridobivanja tipične pivske arome in okusa, v različnih fazah procesa varjenja piva, običajno dodajajo posušeni storžki hmelja ali hmeljni briketi. Hmelj se dodaja pivu predvsem zaradi intenzivne arome in grenčice, saj odlično

---

<sup>1</sup> Dr., univ. dipl. kem. teh., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: miha.ocirk@ihps.si

<sup>2</sup> Mag. inž. kem. teh., IHPS, e-pošta: ksenija.rutnik@ihps.si

<sup>3</sup> Dipl. inž. kem. inž., Univerza v Ljubljani, fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

<sup>4</sup> Dr., univ. dipl. kem., IHPS, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si



kompenzira sladek okus ječmenovega slada z grenkobo alfa-kislin. Nosilec grenkega okusa so mehke smole, natančneje alfa-kislina: humulon, kohumulon in adhumulon ter beta-kislina lupulon, kolupulon in adlupulon. Hmelj ima pomembno vlogo pri pripravi piva tudi zaradi močnih antimikrobnih učinkov beta-kislin, zato je pivo pijača, ki ne vsebuje konzervansov. Polifenolne spojine iz hmelja imajo antioksidativne lastnosti, hkrati pa so pomembne za stabilnost pene, negativno pa lahko vplivajo na koloidno stabilnost piva. Polifenolne spojine, ki izvirajo iz hmelja, pomembno prispevajo k trpkosti, grenčici in polnosti piva (Roberts in Wilson, 2006; Oladokun in sod., 2016). Polienolne spojine predstavljajo 3 – 6 % suhe mase hmeljnih storžkov. Razdelimo jih lahko v tri večje skupine: flavonoide (flavonoli, flavan-3-oli), fenolne kisline in ostale fenolne spojine (fenilflavonoidi, stilbenoidi itd.) (Karabín in sod., 2016). Pivovarji, ki uporabljajo aromatične vrste hmelja z majhno vsebnostjo alfa-kislin, morajo za doseg željene grenčice uporabiti večje količine hmelja, s tem pa vnesejo v vrelo sladico več polifenolnih spojin kot pivovarji, ki uporabljajo novejša različica sort hmelja, bogatih z alfa-kislinami. Polifenolne spojine zaradi svoje kemijske sestave dobro ščitijo pivo pred oksidacijo in s tem nastankom oksidacijskih produktov, ki imajo za posledico t.i. negativne privonje (Humia in sod., 2019; Jurić in sod., 2015; Mikyška in sod., 2002). Alfa-kislina niso glavni nosilec grenkega okusa, saj so težko topne v vodi in prav tako v sladici, zato jih je v pivu zelo malo. Nosilec grenkega okusa so njihove izomerizirane oblike, ki so mnogo bolj topne v vodi oz. pivu in te dajejo pivu značilno, prijetno grenkobo. Izomerizacija je tako najpomembnejša reakcija v kemiji hmelja. Glavni razlog vrenja sladice z dodanim hmeljem je reakcija pretvorbe alfa-kislin v njihove izomerizirane oblike. Gre za kemijski proces, kjer se določena molekula pod posebnimi pogoji, največkrat zaradi povišanja toplote ali izpostavljenosti svetlobi, pretvori v drugo molekulo, sestavljeno iz istih atomov vendar so ti v molekuli v drugačnem položaju. Malowicki in Shellhammer (2005) sta ugotovila, da je izomerizacija reakcija prvega reda, hitrost reakcije pa je odvisna od temperature. Trajanje toplega hmeljenja, tj. vrenja pivine z dodanim hmeljem je odvisno od časa, potrebnega za potek izomerizacije. Z namenom doseganja značilne hmeljne grenčice v pivu, je hmelj potrebno dodati že na začetku vrenja sladice, če pa želimo pripraviti piva z močnejšo aromo se dodaja hmelj še v končnih fazah vrenja ali celo v procesu fermentacije oz. zorenja. Tak način hmeljenja imenujemo hladno hmeljenje ali »dry hopping«. Z njim izrazito povečamo intenziteto arome piva, hkrati pa lahko v pivo vnesemo alfa-kislina, ki so neprijetnega grenkega okusa. Od časa doziranja in časa kontakta hmelja z vodno fazo je odvisno koliko hmeljnih komponent eteričnega olja bo prešlo in ostalo v pivini, mladem pivu in končnem produktu pivu. Poznavanje dinamike prenosa in stabilnosti teh spojin je zato izrednega pomena za pivovarsko industrijo.

## 2 METODE DELA

### 2.1 Priprava piva

Za namen raziskave smo 200 mL osnovnega piva dodali 1 g zmletega hmelja (5 g/L). Uporabili smo 5 različnih sort hmelja: Styrian Wolf, Citra, Palisade, Cascade in Chinook. Eksperiment smo izvajali pri nizki temperaturi v hladilnici (2 °C) in pri visoki temperaturi v rastni komori (10 °C). Pri obeh temperaturah smo hladno hmeljenje izvajali brez stresanja in s stresanjem (uporaba stresalnika IKA KS 4000i), nastavljenega na 150 rpm). Za vzorec piva, ki smo ga stresali, smo uporabili 500 mL reagenčne steklenice za mirujoče vzorce pa 250 mL steklenice. Vzorčili smo vsak dan poskusa, štiri dni zapored, zadnji vzorec je bil odvzet sedmi dan, kot ekstremno dolg čas hladnega hmeljenja. Eksperiment smo izvajali v paralelkah, torej smo za vsako sorto hmelja pripravili 10 steklenic za posamezen režim. Vzorce smo nato prelili iz reagenčnih steklenic in jih prefiltrirali skozi filter papir – črni trak. Tako smo odstranili zmlate delce hmeljnih peletov ter prekinili proces hladnega hmeljenja.

### 2.2 Analiza alfa- in izo-alfa kislin

Alfa- in izo-alfa-kislina v pivu smo določali po metodi Analytica-EBC 9.50 (Analytica-EBC, 2020). Razplinjeno pivo, smo prefiltrirali čez 0.45 µm PET filter v HPLC vijale. Določitev smo izvedli na tekočinskem kromatografu Agilent 1200 (Agilent, ZDA), z DAD detektorjem pri 270 nm. Ločitev je potekala na kromatografski koloni Nucleodur® 5–100 C18, 125×4 mm (Macherey-Nagel, Nemčija). Kot mobilno fazo smo uporabili izokratsko mešanico metanola, vode in ortofosforne kisline (77,5 : 21 : 0,9).

### 2.3 Analiza skupnih polifenolnih spojin

Določitev koncentracije skupnih polifenolnih spojin v pivu je bila izvedena po metodi Analytica-EBC 9.11 (Analytica-EBC, 2016). Odpipetirali smo 10 mL razplinjenega vzorca v 25 mL bučko, v katero smo dodali 8 mL CMC/EDTA reagenta (5 g CMC + 1 g EDTA/ 500 mL destilirane vode) in 0,5 mL raztopine amonijaka (amonijak:voda, 1:2). V vzorec smo dodali še 0,5 mL raztopine barvila (3,5% raztopina amonijevega železovega(III) citrata), v kontrolni vzorec (slepi vzorec) pa ne. Nato smo do oznake dopolnili z destilirano vodo, vzorec in slepi vzorec dobro pretresli in izvajali meritve po 10 minutah. Meritve smo izvajali na Shimadzu UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu, Japonska) pri valovni dolžini 600 nm. Za izračun koncentracije skupnih polifenolov smo uporabili sledečo formulo:

$$c = A \times 820$$

kjer je:

$c$  – koncentracija polifenolov [mg/L]

$A$  – absorbanca izmerjena pri 600 nm.

## 2.4 Analiza grenčice

Določitev grenčice v enotah IBU je potekala po metodi Analytica-EBC 9.8 (Analytica-EBC, 2020). Odpipetirali smo 10 mL razplinjenega piva v centrifugirko, dodali smo 3 steklene kroglice, 0,5 mL raztopine 6 mol/L HCl in 20 mL izooktana. Nato smo vzorec stresali 15 min. Po končanem stresanju smo vzorec centrifugirali 3 minute na 3000 obratov/minuto. Po 30 minutah smo izvajali meritve. Za slepo meritev smo uporabili čisti izooktan. Iz vzorca smo odpipetirali izooktansko fazo ter pomerili absorbanco na Hewlett Packard UV-VIS spektrofotometru (Hewlett Packard, ZDA) pri 275 nm. Za izračun IBU smo uporabili sledečo formulo:

$$c = A \times 50$$

kjer je:

$c$  – število grenčičnih enot [IBU]

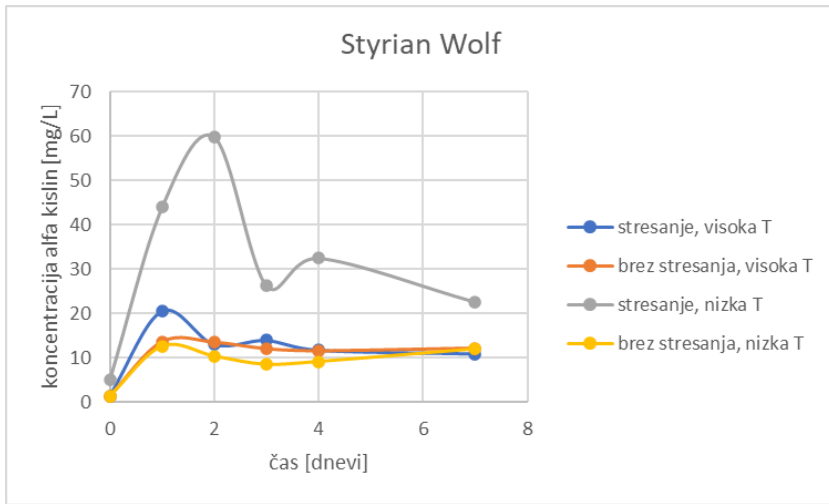
$A$  – absorbanca izmerjena pri 275 nm

## 3 REZULTATI

Predstavljeni rezultati se nanašajo na sorto Styrian Wolf. Pri vseh ostalih sortah opazimo podobne trende in oblike krivulj ekstrakcije. Štiri, na grafu predstavljene krivulje, predstavljajo štiri režime hladnega hmeljena (stresanje pri visoki temperaturi; brez stresanja pri visoki temperaturi; stresanje pri nizki temperaturi; brez stresanja pri nizki temperaturi). Določali smo koncentracijo alfa-kislin (kohumulon, n-humulon in adhumulon) in izo-alfa-kislin, koncentracijo skupnih polifenolnih spojin ter grenčico.

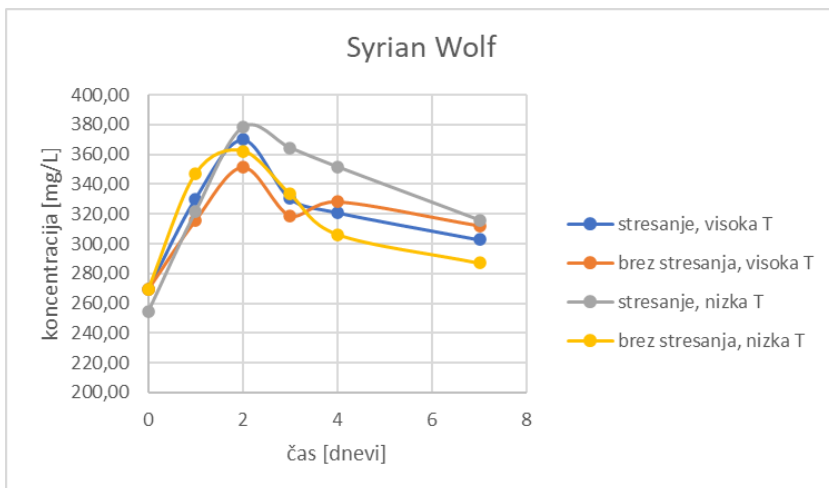
Ker se vse paralelke niso izvajale v istem tednu z istim izhodnim vzorcem piva, smo za primerljivost meritve vsakokrat normirali na uporabljeno pivo, ki ni bilo hladno hmeljeno. To pomeni, da smo vsaki meritvi odšteli vrednosti izmerjene v osnovnem pivu. To je bilo potrebno le pri določevanju alfa- in izo-alfa-kislin. Vrednosti grenčice in polifenolnih spojin v začetnem pivu so bile konstantne.

Slika 1 prikazuje graf koncentracije alfa kislin v odvisnosti od časa ekstrakcije. Opazimo lahko, da se koncentracija alfa-kislin v prvih dveh dneh ekstrakcije poveča, nato pa začne koncentracija padati. Ta trend je opazen predvsem pri hmeljenju s stresanjem in pri nizki temperaturi. Vsebnost alfa kislin pri ostalih načinih se nato ustali, pri stresanju pri nizki temperaturi pa je zaznati blag padec alfa kislin.



**Slika 1:** Koncentracija alfa kislin v odvisnosti od časa ekstrakcije. Koncentracija alfa kislin je normirana na pivo pred dodatkom hmelja.

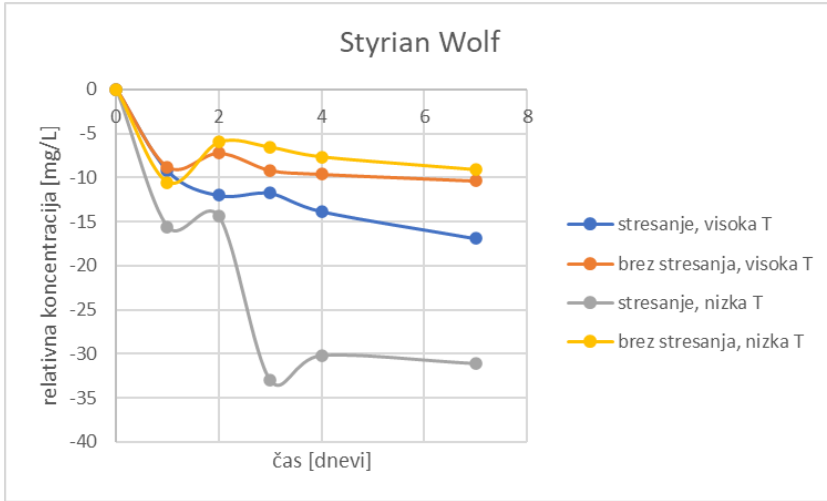
Dinamiki prenosa in vsebnosti alfa-kislin sledi tudi dinamika ekstrakcije polifenolnih spojin, vendar z občutno manjšimi razlikami med različnimi načini hmeljenja kot pri alfa-kislinah. Prenos polifenolnih spojin iz hmelja v pivo je tako manj občutljiv na način hmeljenja kot prenos alfa kislin.



**Slika 2:** Koncentracija polifenolnih spojin v pivo v odvisnosti od časa ekstrakcije.

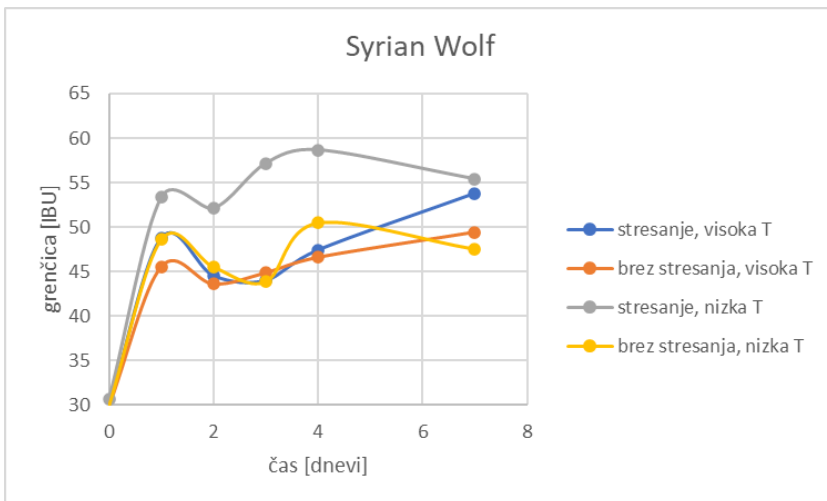
Zanimiva je ugotovitev, da med procesom hladnega hmeljenja koncentracija izo-alfa- kisline pada, kar je posledica adsorpcija le-teh na tkive ostanke (kvasa in slada in hmelja), na večje makromolekule kot je npr. CO<sub>2</sub> in se z njimi vred izločijo. Upad

izo-alfa kislin je prikazan na sliki 3. Iz rezultatov vidimo, da je ekstrakcija polifenolnih spojin in alfa-kislin uspešnejša pri nizkih temperaturah s stresanjem, medtem ko je vpliv temperature pri vzorcih brez stresa zanemarljiv.



**Slika 3:** Relativna koncentracija izo-alfa kislin v odvisnosti od časa ekstrakcije.

Na sliki 4 so prikazane grenčične enote v odvisnosti od časa reakcije. Pri vzorcih, ki smo jih stresali, je izkoristek v grenčičnih enotah približno 10 % višji, kot pri vzorcih, ki jih nismo stresali. Iz predstavljenega sledi, da lahko pivovarji za doseganje željene grenčice svojega produkta skrajšajo čas hladnega hmeljenja z mešanjem pивine.



**Slika 4:** Grenčične enote v odvisnosti od časa ekstrakcije.

#### 4 ZAKLJUČEK

S primernimi spremembami tehnoloških postopkov, kot sta npr. sprememba temperature in/ali stresanje, lahko dinamično prehoda sekundarnih metabolitov hmelja v pivo pospešimo ali upočasnimo. S stresanjem pri nizkih temperaturah dosežemo najvišjo grenčico in prav tako najvišjo vsebnost alfa-kislin in polifenolnih spojin. Zaradi filtracije piva skozi zelo fine filtre, lahko izgubimo precejšen del alfa-kislin, polifenolnih spojin in s tem splošno grenčice. Kot tehnološki postopek je zato primernejša sedimentacija, kjer grenčične snovi in polifenolne spojine sedimentirajo na dno tanka.

#### 5 LITERATURA

- European Brewery Convention, Analytica-EBC, 9.8, 2020, Bitterness units (BU) in (IM).
- European Brewery Convention, Analytica-EBC, 9.50, 2020, Bitter compounds in dry-hopped beer by HPLC (IM).
- European Brewery Convention, Analytica-EBC, 9.11, 2002 Total polyphenols in beer by spectrophotometry.
- Humia B. V., Santos K. S., Barbosa A. M., Sawata M., Mendonça M. d. C., Padilha F. F. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*. 2019; 24(8), 1568.
- Ikram S., Huang L., Zhang H., Wang J., Yin M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*. 2017; 82(10), 2232-2242.
- Jurić A., Čorić N., Odak A., Herceg Z., Tišma M. Analysis of Total Polyphenols, Bitterness and Haze in Pale and Dark Lager Beers Produced under Different Mashing and Boiling Conditions. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015; 121(4), 541-547.
- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(3), 542-567.
- Mikyška A., Hrabák M., Hašková D., Šrogl J. The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 2002; 108(1), 78-85.
- Terpinc, P. Usoda fenolnih spojin med proizvodnjo piva. *Hmeljarski bilten*. 2020; 27, 112-127

## IZBIRA SNP POZICIJ GENOMA ZA DOLOČITEV GENETSKE RAZNOLIKOSTI PRI NAVADNI KONOPLJI (*Cannabis sativa* L.)

Marjeta ERŽEN<sup>1</sup>, Andreja ČERENAK<sup>2</sup>, Tjaša CESAR<sup>3</sup>, Lucija LUSKAR<sup>4</sup> in Jernej JAKŠE<sup>5</sup>

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 7. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 24. 11. 2022

### Izvleček

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je starodavna rastlina, ki vsebuje številne sekundarne metabolite, med drugimi tudi kanabinoide, ki so značilni predvsem za to vrsto. Rastline so heterozigotne, sorte populacijske, česar posledica je pojav številnih fenotipov znotraj sorte, kar se kaže na neizenačenosti rastlin znotraj populacije. Da bi preverili raznolikost fenotipov tudi na genetskem nivoju, smo na referenčni genom konoplje CDBRx kartirali transkriptomske NGS (angl. new generation sequencing, nove generacije sekvenciranja) podatke sort Finola, Purple Kush in Santhica 27. Poiskali smo SNP pozicije skupne vsem trem sortam in po dvema sortama skupaj. Določili smo heterozigotne SNP (angl. single-nucleotide polymorphism, polimorfizem posameznega nukleotida). Izdelali smo pregled vseh polimorfizmov ter porazdelitev polimorfizmov po kromosomih. Največ polimorfizmov je bilo pri sorti Purple Kush (782.406). Sorta Finola je imela največ polimorfizmov na kromosomu 4 (31.587), sorta Santhica 27 na kromosomu 1 (18.337) in sorta Purple Kush prav tako na kromosomu 1 (124.049). Med vsemi variantami polimorfizma je bilo največ SNV (angl. single-nucleotide variants, variant posameznega nukleotida). Glede na presek vseh treh sort se največ polimorfizmov pojavlja na prvem kromosomu. Za izbrane SNP pozicije smo naročili izdelavo komercialnega kompleta oligonukleotidnih sond za lovljenje. Od skupno 4.631 izbranih SNP pozicij je bilo izdelanih 4.086 sond za lovljenje. Z uporabo SNP polimorfizmov in tehnologijo visoko zmogljivega sekvenciranja je možnosti za analize konoplje na genetskem nivoju še veliko.

**Ključne besede:** *Cannabis sativa* L., genom, konoplja, SNP, sonde za lovljenje

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

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

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

<sup>4</sup> Mag. biotehnol., IHPS, e-pošta: lucija.luskar@ihps.si

<sup>5</sup> Prof. dr., BF UL, e-pošta: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

## DETERMINATION OF SNP GENOME POSITIONS FOR CAPTURE PROBES DESIGN FOR IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN HEMP (*Cannabis sativa* L.)

### Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is an ancient plant which contains many different secondary metabolites, among others also cannabinoids known especially for *Cannabis* plants. Plants are heterozygous and varieties are population which usually leads to different phenotypes within varieties. In order to determine differentiation of phenotypes also on genetic level, transcriptome NGS (angl. new generation sequencing) data of varieties 'Finola', 'Purple Kush' in 'Santhica 27' were mapped on reference hemp genome of 'CBDRx'. Common SNPs (angl. single-nucleotide polymorphism) positions of all three varieties and two and two varieties together were determined and heterozygous SNPs were also determined. Overview of polymorphism and distribution of SNPs on individual chromosomes were determined. The highest number of SNPs were at variety 'Purple Kush' (782.4060). 'Finola' has the highest number of polymorphisms on chromosome 4 (31.587), 'Santhica 27' on chromosome 1 (18.337), and 'Purple Kush' also on chromosome 1 (124.049). Of all variants of polymorphisms SNVs (angl. single-nucleotide variants) have the highest number. According to all three varieties the highest number of polymorphisms were on chromosome 1. Selected SNPs were used for commercial set of oligonucleotides design for capture probes. Of the 4.631 SNP positions determined, 4.086 capture probes were designed. With SNP polymorphisms and high throughput sequencing there is still a lot of possibilities for hemp analysis on genetic level.

**Keywords:** *Cannabis sativa* L., capture probes, genome, hemp, SNP

### 1 UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je starodavna kmetijska rastlina, ki spada v družino Cannabaceae in izvira iz centralne Azije (Hillig, 2005). Uporablja se za pridelavo vlaken, pridelavo semen, za prehrano ljudi in živali, v medicini za zdravljenje različnih bolezni. Je dvodomna rastlina, nekatere sorte pa so lahko tudi endomne (Barcaccia in sod., 2020).

Konoplja vsebuje številne sekundarne metabolite (več kot 500 različnih) (Namdar in sod., 2018), kamor spadajo kanabinoidi, terpeni, flavonoidi, steroidi, alkaloidi in lignani (Janatová in sod., 2018). Med najpomembnejše spadajo kanabinoidi in terpeni, ki imajo številne terapevtske učinke na zdravje ljudi in živali. Do danes je bilo določenih več kot 100 različnih kanabinoidov. Med najpomembnejše spadajo kanabidiol (CBD),  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabinol ( $\Delta$ -9-THC), kanabigerol (CBG), kanabikromen (CBC) in njihove karboksilne oblike (Namdar in sod., 2018). Največ



kanabinoidov se nahaja v trihomih na ženskih socvetjih, v koreninah in semenih kanabinoidov ni (Russo in Marcu, 2017).

Konoplja je diploidna rastlina ( $2n = 20$ ), sestavljena iz devetih avtosomnih kromosomov in enega para spolnih kromosomov. Ženski haploidni genom je ocenjen na velikost 818 mega baznih parov (Mbp), moški haploidni genom pa 843 Mbp (Kovalchuk in sod., 2020). Z namenom ugotavljanja genetske variabilnosti in razlik na genetskem nivoju med različnimi tipi konoplje kot so *Cannabis sativa* spp. *sativa*, *Cannabis sativa* spp. *indica*, *Cannabis sativa* spp. *ruderalis* je bilo narejenih že kar nekaj študij (Gao in sod., 2014; Sawler in sod., 2015; Shirley in sod., 2013). Soler in sod., (2017) so z gSSR markerji ugotavljali razlike znotraj sorte in med sortami. Ugotovili so visoko informativnost markerjev pri preučevanju variabilnosti izražanja sekvenc THC-A in CBD-A sintaz. Za razlikovanje indijske in navadne konoplje na genemskem nivoju so Sawler in sod., (2015) z uporabo SNP markerjev dokazali značilno razliko in ugotovili, da je raven heterozigotnosti pri navadni konoplji višja kot pri indijski konoplji, kar kaže na to, da so sorte navadne konoplje pridobljene iz širše genetske osnove. S sekvenciranjem dolgih in kratkih odčitkov je bilo posekvenciranih 100 različnih genomov konoplje z namenom izdelave genetske karte in identifikacije lokusov kvantitativnih lastnosti (Grassa in sod., 2018). Za sorti Purple Kush in Finola je bila izdelana kombinirana genetska in fizična karta (Laverty in sod., 2019). Van Bakel in sod., (2011) so izdelali osnutek genoma in transkriptoma z namenom preučevanja ekspresije genov za kanabinoide in prekursorske poti pri sortah Finola in Purple Kush, medtem ko so Grassa in sod., (2021) sestavili genom na nivoju kromosomov.

Ker je konoplja tujeprašna vrsta in sorte populacijske, prihaja velikokrat do genetsko neizenačenih sort, znotraj sort pa se pojavijo številni fenotipi, kot posledica heterozigotnosti (Barcaccia in sod., 2020). V preteklosti je bilo veliko genetskih študij narejenih na podlagi izboljšanja pridelka, prehranske kvalitete in zmanjšanja dovzetnosti rastlin za bolezni in škodljivce (Aardema in DeSalle, 2021). Vedno bolj pa so pri konoplji zanimive genetske raziskave na področju sinteze kanabinoidov, predvsem CBD in THC, razlike med tipi konoplje (Gilmore in sod., 2003; Soler in sod., 2017) ter odbira markerjev za določanje spola in kemotipa pri konoplji (Toth in sod., 2020).

Cilj naše raziskave je bil poiskati večje število heterozigotnih SNP (angl. Single-nucleotide polymorphisms, polimorfizem posameznega nukleotida) pozicij, ki bi služile za nadaljnjo izdelavo sond za lovljene, na podlagi katerih bi lahko ugotovili populacijsko strukturo in genetsko diverzitetno različnih fenotipov konoplje.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Izbira referenčnega genoma in transkriptomskih podatkov konoplje

V podatkovni zbirki NCBI (National Center for Biotechnology Information) smo na podlagi iskalnih parametrov izbrali referenčni genom za konopljo CBDRx (BioProject PRJEB29284), ki je sestavljen na nivoju kromosomov. Nato smo v podatkovni zbirki SRA (Sequence Read Archive) izbrali transkriptomске NGS podatke sort Finola (SRR351933, SRR7630403, SRR351932), Purple Kush (SRR352210, SRR352208, SRR352205) in Santhica 27 (SRR5210008, SRR5209988, SRR5209953), jih uvozili v program CLC Genomic Workbench Version 20.0.4. Iskali smo predvsem transkriptomске podatke navadne konoplje pri čemer so bili v trenutku raziskav na voljo samo podatki sort Finola in Santhica 27. Nato smo dodali še sorto Purple Kush, ki pa je sicer opredeljena kot indijska konoplja. Naše predvidevanje je bilo, če bodo polimorfizmi skupni trem izbranim sortam iz SRA podatkovne baze, bomo povečali verjetnost prisotnosti polimorfizma tudi v naših vzorcih. Vsako sorto posebej smo kartirali na izbrani genom konoplje z orodjem Map Reads to Reference. Poiskali smo polimorfna mesta in tarčne regije pri kartiranih odčitkih, kjer smo uporabili orodje Basic Variant Detection. Izbirali smo samo heterozigotne SNP pozicije. Z orodjem Venny 2.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) smo na podlagi Vennovega diagrama poiskali skupne SNP pozicije vsem trem izbranim sortam ter pozicije SNP za dve in dve sorti skupaj. Za preverjanje delovanja SNP na naših vzorcih smo določili skupno 60 SNP pozicij, 30 skupnih vsem tem sortam in 30 skupnih sortama Finola in Santhica 27 naključno po kromosomih. Določili smo sekvence SNP v skupni dolžini 501 bp (levo in desno od SNP pozicije 250 bp). Z orodjem BLAST smo nato poiskali homologna zaporedja in kratka ujemanja med dvema zaporedjema iz katerih to zaporedje naredi lokalne poravnave. Pozicije, ki so vsebovale odčitke, ki so imeli več mest prileganja v genomu, smo izločili iz analize. V programu Primer 3 smo izdelali končnih 14 parov začetnih oligonukleotidov (preglednica 1) s katerimi smo preverili ustreznost izbire SNP pozicij na naših vzorcih.

**Preglednica 1:** Začetni oligonukleotidi, njihove pozicije na kromosomih in sekvence parov začetnih oligonukleotidov.

Začetni oligonukleotid	Kromosom	Pozicija na kromosomu	Sekvence parov začetnih oligonukleotidov	
SNP 1	kromosom 1	443869	L: CCGTAGAAGGTGGCAAATGT R: TGCTTGTTCCTTGGTTTTAGG	Pozicije skupne sortam Finola, Santhica 27, Purple Kush
SNP 2	kromosom 2	7186803	L: AGCCATTCCAAAAGCATTCC R: TTACAGCTTGTGCCAGCAAT	
SNP 3	kromosom 3	1187767	L: TAGGAATTGAACCGGATTGC R: TCAGCCTGCAATAATCGAAA	
SNP 4	kromosom 4	26919313	L: TTTTAGCGGGAACAACAACC R: AAGGAGGGAATTGGAAGAGC	
SNP 5	kromosom 4	66059933	L: AACTTGCAGCTCAAGGGAAA R: AAATCCACCATGGAAGGACA	

SNP 6	kromosom 6	78288161	L: GAAAACAGGTGTGGGAAGGA R: CCCGTTTGCAACATTTCTCT	<i>Pozicije skupne sortama 'Finola' in 'Santhica 27'</i>
SNP 7	kromosom 9	3445493	L: TTCGTTTTGATGTATGCACTCC R: TGCATGCTTAGACCCATCTG	
SNP 8	kromosom 10	55429963	L: TTCAGCACACCACGACATAA R: AGGGTTGGGTGAATGAATGA	
SNP 9	kromosom 1	5266236	L: TCTCCTTGATCAGCAACCAA R: TGCTCTCCCTCCCTCAACAGT	
SNP 10	kromosom 1	1037237	L: AAGCTTCACCTTCTGCGAAA R: CAAATGCCGGAGTTTACTT	
SNP 11	kromosom 3	7382936	L: TTTCCCCGATCTTAGGGTTT R: TGGGAAAGTGAGGAGACTGG	
SNP 12	kromosom 4	69568690	L: TTCGCTGAAAACGACAAATG R: CCCGTCTAATCGGAAATTGA	
SNP 13	kromosom 6	70711381	L: ACTGCCTTCGTTTTACCAG R: ATTCAGGGCCATGTCAAAAAG	
SNP 14	kromosom 8	42763723	L: GCACAAGAATAATGGGCTGT R: ATATGGTGTTGGTGCGGTTT	

Pozicije SNP smo izbrali tako, da so bile enakomerno porazdeljene po kromosomih. Med njimi je bilo približno 100.000 bp razlike. Izbrane pozicije smo v obliki BED datoteke posredovali podjetju Arbour Bioscience za izdelavo sond za lovljenje.

## 2.2 Statističen pregled podatkov in odbira SNP pozicij

Glede na dobljene podatke izbranih SNP smo v programu Excel 2013 naredili statistiko števila vseh polimorfizmov in posameznih tipov polimorfizma ter porazdelitev SNP po posameznih kromosomih.

## 2.3 Testiranje delovanja SNP na vzorcih

Z namenom ugotoviti primernost postopka izbire SNP pozicij in strategijo izbire heterozigotnih SNP smo 14 naključno izbranih SNP pozicij (preglednica 1) uporabili za preverjanje njihove polimorfnost na osmih izbranih vzorcih konoplje in sicer na dveh različnih genotipih sorte Carmagnola CS, treh različnih genotipih sorte Tiborszallasi in treh različnih genotipih sorte selekcije Finola.

Izbrane pare začetnih oligonukleotidov smo pomnožili z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR). PCR produkte smo nato očistili z ExoSAP-IT™ in inkubirali v cikličnem termostatu z naslednjim temperaturnim profilom; začetna denaturacija je potekala 3 minute pri 95°C, nato je sledilo 99 ciklov pri 96°C (10 s), 50°C (10 s) in 60°C (4 min). Namnoževanje je potekalo 7 minut pri 72°C. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili kit BigDye Terminator 3.1 z naslednjo PCR mešanico: 2 µL 5x pufra, 0,5 µL pripravljene mešanice BigDye Terminator v3.1, 0,2 µL začetnih oligonukleotidov, 3,8 µL vode. PCR mešanici smo dodali 3,5 µL vzorca. Končno čiščenje sekvenčne reakcije smo opravili z etanolom in EDTA. Pripravljene vzorce smo poslali na sekvenčno analizo na Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete.

Končne rezultate smo obdelali v programu CodoneCode Aligner 9.0.1, kjer so bili elektroforegrami sekvenciranja tudi ročno pregledani.

### 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

SRA je prosto dostopna baza podatkov surovih sekvenčnih odčitkov pridobljenih z NGS (angl. Next generation sequencing; tehnologija visoko zmogljivostnega sekvenciranja) tehnologijo (Kodama, Shumway in Leinonen, 2012). V podatkovni bazi smo našli podatke masovnega paralelnega sekvenciranja transkriptov za sorte Finola, Purple Kush in Santhica 27, ki smo jih kartirali na genom konoplje CBDRx (BioProject PRJEB29284). Na podlagi analize SNP regij je bila narejena statistika na kartiranih odčitkih. Iz preglednice 2 je razvidno, da je bilo največ polimorfizmov pri sorti Purple Kush (782.406), najmanj pa pri sorti Santhica 27 (122.033). Pri sorti Finola je bilo največ SNP na kromosomu 4 (31.587), pri sorti Santhica 27 na kromosomu 1 (18.337) in pri sorti Purple Kush prav tako na kromosomu 1 (124.049). Pri sortah Santhica 27 in Purple Kush je bilo največ heterozigotnih SNP, medtem ko je imela sorta Finola največ homozigotnih SNP. Med vsemi variantami SNP je bilo največ SNV (angl. single nucleotide variants; variant posameznega nukleotida), sledili so MNV (multi-nucleotide variants; več-nukleotidne variante), delecije, insercije, najmanj pa je bilo zamenjav. Daleč največ SNV je bilo pri sorti Purple Kush.

**Preglednica 2:** Porazdelitev SNP po posameznih kromosomih pri treh različnih sortah konoplje.

Sorta	Variante	Porazdelitev SNP po kromosomih										Homozigotnost	Heterozigotnost
		<i>krom1</i>	<i>krom2</i>	<i>krom3</i>	<i>krom4</i>	<i>krom5</i>	<i>krom6</i>	<i>krom7</i>	<i>krom8</i>	<i>krom9</i>	<i>krom10</i>		
Finola	295.651	45.969	29.713	26.448	31.587	24.201	28.505	23.099	30.789	23.845	31.495	149.967	145.684
Santhica 27	122.033	18.337	11.758	10.717	14.012	9.515	12.037	8.159	13.401	10.686	13.411	59.590	62.443
Purple Kush	782.406	124.049	83.625	77.684	78.340	66.134	74.202	55.965	81.805	70.486	70.116	320.849	461.557

Legenda: *krom*- kromosom.

V podatkovni zbirki NCBI lahko najdemo 13 različnih genomskih podatkov za konopljo, od tega je pet takšnih, ki so sestavljeni na nivoju kromosomov, ostali so sestavljeni le na nivoju sosesk (angl. Contig) ali ogrodij (angl. Scaffold). Referenčni genom, uporabljen v naši raziskavi, je do sedaj najboljši sestavljen genom (Grassa in sod., 2021).

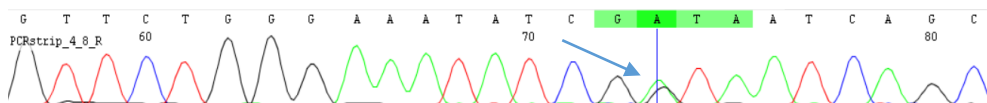
S funkcijo »SNP calling« (iskanje pozicij SNP) smo določili na kateri poziciji se polimorfizem nahaja ali na kateri poziciji se vsaj ena od baz razlikuje od referenčne sekvence (Nielsen in sod., 2011).

**Preglednica 3:** Porazdelitev heterozigotnih SNP po kromosomih, glede na presek dveh ali treh sort konoplje.

Št. Kromosoma in njegova dolžina/ skupina sort	Kromosom 1 (101.209 kb)	Kromosom 2 (96.347 kb)	Kromosom 3 (94.671 kb)	Kromosom 4 (91.941 kb)	Kromosom 5 (88.182 kb)	Kromosom 6 (79.355 kb)	Kromosom 7 (71.238 kb)	Kromosom 8 (64.622 kb)	Kromosom 9 (61.561 kb)	Kromosom X (104.666 kb)
F, S27, PK	176	75	83	84	72	113	67	116	85	89
F, S27	327	175	216	262	174	195	155	253	213	251
F, PK	635	394	333	357	307	345	292	416	293	286
S27, PK	361	184	221	218	171	253	144	275	217	171
Skupaj po kromosomih	1499	828	853	921	724	906	658	1060	808	797
Porazdelitev	67,5 kb/SNP	116,4 kb/SNP	111,9 kb/SNP	99,8 kb/SNP	121,8 kb/SNP	87,6 kb/SNP	108,4 kb/SNP	61,0 kb/SNP	76,2 kb/SNP	131,3 kb/SNP

F-'Finola', S27- 'Santhica 27', PK- 'Purple Kush'.

Pri vseh kombinacijah se največ heterozigotnih SNP nahaja na prvem kromosomu, kjer se SNP povprečno nahaja na vsake 67,5 kb (preglednica 3), najmanj heterozigotnih SNP pa se nahaja na kromosomu X, kjer se SNP pojavi povprečno šele na vsake 131,3 kb. Največ heterozigotnih SNP je bilo v kombinaciji med sortama Finola in Purple Kush na prvem kromosomu (635). Najmanj SNP pa v kombinaciji vseh treh sort na kromosomu 7 (67). Skupni polimorfizmi več sort hkrati nam dajo večjo možnost, da se bodo pojavili tudi v naših vzorcih.



**Slika 1:** Elektroforegram in prikaz potrditve heterozigotnosti SNP. Nukleotid na poziciji G (puščica) ima prisoten tudi vrh za A, kar pomeni heterozigotnost rastline na tem lokusu.

Z izdelanimi 14 pari začetnih oligonukleotidov smo potrdili pomnoževanje izbranih lokusov najprej s PCR reakcijo in gelsko elektroforezo na vseh osmih izbranih vzorcih. Pomnožke smo nato še sekvencirali po Sangerju in preverili heterozigotnost oz. homozigotnost analiziranih rastlin za izbrane lokuse. Od skupno 14 parov začetnih oligonukleotidov je bilo 8 heterozigotnih (57 %), kar je potrdilo primernost postopka izbiranja SNP pozicij. Na sliki 1 je prikazana sekvenca dela pomnožka s heterozigotnim SNP. S tem se potrdi variabilnost znotraj določenega vzorca/sorte.

V izdelavo smo poslali 4.631 anotiranih SNP pozicij na podlagi katerih so izdelali 4.086 sond za lovljenje dolžine 80 bp, ki imajo 100 % kvaliteto pokritosti. Vsak SNP je pokrit s tremi sondami. Petit in sod. (2020) so za pojasnjevanje genetske arhitekture kvalitete konopljinih vlaken določili 612.452 SNP, kar je precej več kot v naši raziskavi, namreč uporabili so 6 sort na podlagi katerih so pridobili NGS podatke, medtem ko smo mi uporabili samo 3 sorte.

Uporaba genomike pri analizah konoplje se je začela približno pred 25 leti z uporabo RAPD, AFLP in RFLP markerjev, nato so jih nadomestili bolj informativni SSR markerji (Barcaccia in sod., 2020). Leta 2011 so van Bakel in sod. objavili prva osnutka genoma dveh sort in s tem odprli pot sodobnim tehnikam molekularnega žlahtnjenja tudi z uporabo SNP markerjev. Soorni in sod. (2017) so v analizi različnih iranskih vzorcev konoplje našli 24 tisoč visoko informativnih SNP markerjev. Markerji so zelo uporabni pri analizah genetske raznolikosti različnih sort konoplje, pri odkrivanju polimorfizmov v povezavi z geni (npr. kanabinoidna sintaza) in pri žlahtniteljskih programih.

#### 4 ZAKLJUČEK

Z uporabo SNP markerjev se bo povečalo znanje o genetski raznolikosti konoplje in s tem boljše razumevanje za izboljšanje sort. S SNP lahko hitro in učinkovito analiziramo variabilnost genetskih regij, razmerja med genotipi rastlin in njihove željene lastnosti. Kar nekaj genetskih analiz je že bilo narejenih na konoplji v povezavi z genetsko variabilnostjo med rastlinami konoplje (med podvrstama *C. sativa* in *C. indica*), z geni za kanabinoide in njihovo izražanje. Še vedno pa je veliko neznanega na področju razlikovanja in povezave med fenotipi in genotipi, pri čemer bo uporaba SNP polimorfizmov in tehnologije visoko zmogljivega sekvenciranja lahko pomembno doprinesla k takšnim raziskavam.

#### 5 LITERATURA

- Aardema M. L., DeSalle R. Can public online databases serve as a source of phenotypic information for Cannabis genetic association studies? *PLoS One*. 2021; 16.
- Barcaccia G., Palumbo F., Scariolo F., Vannozzi A., Borin M., Bona S. Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars. Vol. 11, *Frontiers in Plant Science*. 2020.
- Gao C., Xin P., Cheng C., Tang Q., Chen P., Wang C., Zang G., Zhao L. Diversity analysis in Cannabis sativabased on large-scale development of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *PLoS One*. 2014; 9(10): 1-7.
- Gilmore S., Peakall R., Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in Cannabis sativa: Implications for forensic investigations. *Forensic Science International*. 2003; 131(1): 65–74.
- Grassa C. J., Weiblen G. D., Wenger J. P., Dabney C., Poplawski S. G., Timothy Motley S., Michael T. P., Schwartz C. J. A new Cannabis genome assembly associates elevated cannabidiol (CBD) with hemp introgressed into marijuana. *New Phytologist*. 2021;230(4): 1665–79.

- Grassa C., Wenger J., Dabney C., Poplawski S., Motley S. T., Michael T., Schwartz C. J. A complete Cannabis chromosome assembly and adaptive admixture for elevated cannabidiol (CBD) content. *New Phytologist*. 2018; 230: 1665-1679.
- Hillig K.W. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2005; 52(2): 161–80.
- Janatová A., Fraňková A., Tlustoš P., Hamouz K., Božik M., Klouček P. Yield and cannabinoid contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. *Industrial Crops and Products*. 2018; 112: 363–7.
- Kodama Y., Shumway M., Leinonen R.. The sequence read archive: Explosive growth of sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40: 2011–2013.
- Kovalchuk I., Pellino M., Rigault P., Van Velzen R., Ebersbach J., Ashnest J.R., MAu M., Schranz M. E., Alcorn J., Laprairie R. B., McKay J. K., Burbridge C., Schneider D., Vergara D., Kane N. C., Sharbel T. F. The Genomics of Cannabis and Its Close Relatives. *Annual Review of Plant Biology*. 2020; 71: 713–39.
- Laverty K. U., Stout J. M., Sullivan M. J., Shah H., Gill N., Deikus G., Sebra R., Hughes T. R., Page J. E., van Bakel H. A physical and genetic map of Cannabis sativa identifies extensive rearrangement at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Research*. 2019; 29: 146–56.
- Namdar D., Mazuz M., Ion A., Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops Products*. 2018; 113: 376–82.
- Nielsen R., Joshua S. P., Albrechtsen A., Song Y. S. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Review Genetic*. 2011; 12(6): 443–51.
- Petit J., Salentijn E. M. J., Paulo M. J., Denneboom C., van Loo E. N., Trindade L. M. Elucidating the Genetic Architecture of Fiber Quality in Hemp (*Cannabis sativa* L.) Using a Genome-Wide Association Study. *Frontiers in Genetic*. 2020; 11: 1–17.
- Russo E.B., Marcu J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. 1st ed. Vol. 80, *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2017. 67–134.
- Sawler J., Stout J. M., Gardner K. M., Hudson D., Vidmar J., Butler L., Page J. E., Myles S. The genetic structure of marijuana and hemp. *PLoS One*. 2015; 10(8):1–9.
- Shirley N., Allgeier L., Lanier T., Coyle H.M.. Analysis of the NMI01 Marker for a Population Database of Cannabis Seeds. *Journal of Forensic Science*. 2013; 58: 176–82.
- Soler S., Gramazio P., Figàs M. R., Vilanova S., Rosa E., Llosa E. R., Borrás D., Plazas M., Prohens J. Genetic structure of Cannabis sativa var. indica cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. *Industrial Crops and Products*. 2017; 104: 171–8.
- Soorni A., Fatahi R., Haak D. C., Salami S. A., Bombarely A. Assessment of Genetic Diversity and Population Structure in Iranian Cannabis Germplasm. *Scientific Report*. 2017; 7: 1–10.
- Toth J. A., Stack G. M., Cala A. R., Carlson C. H., Wilk R. L., Crawford J. L., Vainds D. R., Philippe G., Smart C. D., ROse J. K. C., Smart L. B. Development and validation of genetic markers for sex and cannabinoid chemotype in Cannabis sativa L. *Bioenergy*. 2020; 12(3): 213–22.
- van Bakel H., Stout J. M., Cote A. G., Tallon C. M., Sharpe A. G., Hughes T. R., PAGE J. E. The draft genome and transcriptome of Cannabis sativa. *Genome Biology*. 2011; 12(10): 1-17.

## PRENOS ŠALOTKE V TKIVNO KULTURO S PREGLEDOM ZDRAVSTVENEGA STANJA ČEBULIC PRI SORTI POHORKA

Julija POLANŠEK<sup>1</sup>, Lucija LUSKAR<sup>2</sup>, Darko VERNIK<sup>3</sup>,  
Irena MAVRIČ PLEŠKO<sup>4</sup> in Andreja ČERENAK<sup>5</sup>

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 4. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 5. 12. 2022

### Izvleček

Slovenske sorte semenskega česna in šalotke so močno okužene z virusi, kar posledično vodi k zmanjšanim količinam pridelka. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) smo se celotnega *in vitro* postopka vzgoje šalotke (*Allium cepa* var. *Aggregatum* G. Don.) slovenske sorte Pohorka lotili na podlagi že znanih uspešnih praks *in vitro* vzgoje česna na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS). Šalotke so bile testirane na prisotnost virusov s serološkimi (ELISA) in v primeru nejasnih rezultatov dodatno še z molekularnimi metodami (RT-PCR). Rezultati testiranja na prisotnost virusov so na večini analiziranih vzorcev potrdili prisotnost latentnega virusa šalotke – SLV (shallow latent virus). Semenski material je bil predhodno okužen z glivo *Aspergillus niger* Tiegh. Dodatek fungicida Luna® Experience osnovnemu gojišču se je izkazal za najučinkovitejši postopek zatrtja prisotne glive v *in vitro* razmerah. Avtohtono slovensko sorto Pohorka smo uspešno prenesli v *in vitro* razmere in jo ohranjamo na gojišču Gamborg B5 z dodanimi avksini in jasmonsko kislino ter na MS gojišču za debeljenje čebulic. V nadaljevanju bo delo osredotočeno na eliminacijo SLV iz semenskega materiala sorte Pohorka.

**Ključne besede:** šalotka, tkivne kulture, virusi, SLV

## SHALLOT TRANSFER INTO TISSUE CULTURE WITH AN EXAMINATION OF BULBS' HEALTH CONDITION OF VARIETY POHORKA

### Abstract

Slovenian varieties of garlic and shallot that are produced for seeds are heavily infected with viruses which lead to a consequent reduction in yields. At the

<sup>1</sup> Mag. inž. hort., Kmetijski inštitut Slovenije (KIS), e-naslov: julija.polansek@kis.si

<sup>2</sup> Mag. biotehnol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: lucija.luskar@ihps.si

<sup>3</sup> KIS, Selekcijsko poskusni center Ptuj, e-naslov: darko.vernik@kis.si

<sup>4</sup> Dr., KIS, e-naslov: irena.mavricplesko@kis.si

<sup>5</sup> Izr. prof. dr., IHPS, e-naslov: andreja.cerenak@ihps.si



Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS), the entire process of *in vitro* cultivation of shallot (*Allium cepa* var. *Aggregatum* G. Don.) of the Slovenian variety Pohorka was undertaken based on already known successful practices of *in vitro* cultivation of garlic at the Agricultural Institute of Slovenia (KIS). The shallot was serologically (ELISA) tested for the presence of viruses and, in case of unclear results, additionally by molecular methods (RT-PCR) for more accurate detection. The results of tests for the presence of viruses confirmed the presence of only shallot latent virus - SLV in most of the analyzed samples. The material was previously also infected with the fungus *Aspergillus niger* Tiegh. The addition of the fungicide Luna® Experience into the base medium proved to be the most effective method to inhibit the fungus *in vitro*. The autochthonous Slovenian variety Pohorka was successfully transferred to *in vitro* conditions and is maintained on Gamborg B5 medium with added auxins and jasmonic acid and on MS medium for bulbs to swell. Following, the research will be focused on the elimination of SLV from the seed material of the variety Pohorka.

**Keywords:** shallot, tissue cultures, viruses, SLV

## 1 UVOD

Šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don.) spada med čebulnice, kamor sodijo tudi čebula, česen, por, zimski luk, drobnjak in druge (Černe, 1992). Od čebule se loči po načinu rasti, saj oblikuje večje število manjših čebulic in po okusu, ki je pri šalotki milejši (Swamy in Veere Gowda, 2006). Rastline iz rodu lukov (*Allium*), ki ga uvrščamo v družino lukovk (Alliaceae), so pogosto okužene z virusi. Velik problem pa virusne okužbe predstavljajo predvsem pri česnu in šalotki, saj njuno razmnoževanje poteka izključno vegetativno, kar pa vodi v kopičenje virusov v sadilnem materialu (Katis in sod., 2012). Virusi, ki okužujejo te rastline povzročajo izgube in slabšanje kakovosti pridelka (Cafrune in sod., 2006; Conci in sod., 2003; Lunello in sod., 2007). Slovenska semenarska pridelava česna in šalotke se sooča z izjemno okuženostjo semenskega materiala slovenskih sort, kar ima za posledico tudi zmanjšane količine pridelka. Najpogosteje zastopani virusi na česnu in šalotki so virus rumenenja in pritlikavosti čebule (OYDV, rod *Potyvirus*), virus rumene črtavosti pora (LYSV, rod *Potyvirus*), navadni latentni virus česna (GarCLV, rod *Carlavirus*), latentni virus šalotke (SLV, rod *Carlavirus*), virus česna A (GarV-A, rod *Allexivirus*), virus česna B (GarV-B, rod *Allexivirus*), virus česna C (GarV-C, rod *Allexivirus*), virus X šalotke (ShVX rod *Allexivirus*) (Perotto in sod., 2010; Vršiček Marn in sod., 2017a; Vršiček Marn in Mavrič Pleško, 2017). Zaradi razširjenosti in škode, ki jo povzročajo virusi, sta gospodarsko najpomembnejša virusa na čebulnicah virusa iz rodu *Potyvirus*, to sta OYDV in LYSV (Katis in sod., 2012). Pri česnu se lahko v primeru okužbe z LYSV pridelek zmanjša za 54 % ter tudi do 69 % pri okužbi z OYDV (Perotto in sod., 2010). Viruse iz rodov *Potyvirus* in *Carlavirus* prenašajo listne uši, kar lahko vodi v hitro širjenje okužbe. Latentni

virus šalotke (SLV) na rastlinah ob okužbi ne povzroča vidnih simptomov. V kolikor je na rastlini prisoten še kateri od potivirusov pa v sinergiji lahko povzročita znatne izgube pridelka (Sako, 1989). V rod *Carlavirus* uvrščamo tudi GarCLV, ki pa se na šalotki ne pojavlja pogosto. Brez očitnih simptomov se na šalotki pojavljata še ShVX in s pršicami prenosljivi latentni virus šalotke (SMbLV). Uvrščamo ju med aleksiviruse, katerih prenašalke so pršice šiškarice. V primeru hkratne okužbe z virusi iz ostalih rodov, prav tako prihaja do medsebojnih sinergističnih učinkov in znatnih izgub pridelka (Katis in sod., 2012). Rastline brez virusov, pridobljene s kombinacijo termoterapije in krioterapije, so pokazale izboljšanje vegetativne rasti in pridelek čebulic (Wang in sod., 2021).

Z namenom izboljšanja zdravstvenega stanja semenskega materiala slovenskih sort čebulnic smo z EIP projektom ciljali na vzpostavitev vzdrževalne selekcije čebulnic za pridelavo zdravega semenskega materiala slovenskih sort česna in šalotke. V tkivne kulture smo prenesli avtohtono sorto Pohorka ter testirali obstoječ sadilni material na prisotnost različnih virusov. S tako imenovano brezvirusno semensko šalotko bi poskrbeli za povečanje pridelka pri pridelovalcih zelenjave. Sočasno bi s tem tudi pripomogli k ohranjanju avtohtone slovenske sorte šalotke, ki zaradi slabše donosnosti v pridelavi izginja. Z raziskavami vezanimi na šalotko smo se osredotočili na sorto Pohorka, ki je od leta 2019 edina vpisana v Sortni listi RS (FURS, 2022) in za katero vzdrževalec sorte navaja, da je prijetno aromatična, z odlično kulinarično lastnostjo in dobro skladiščno sposobnostjo.

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

### 2.1 Rastlinski material in sterilizacija

Za vzpostavitev metode prenosa šalotke v tkivno kulturo smo uporabili komercialne sorte, ki so prosto dostopne na tržišču. Preliminarno smo v *in vitro* razmere najprej prenesli semenski material treh različnih sort šalotke (Golden gourmet (dva različna dobavitelja), Red sun in Pohorka). Sledila je usmerjena *in vitro* vzgoja edine slovenske sorte šalotke – Pohorka za namen vzgoje brezvirusnega slovenskega sadilnega materiala Rastlinski material te sorte je zagotovil Selekcijsko-poskusni center Ptuj.

Predhodno smo odbrali najvitalnejše rastline sorte Pohorka, gojene v zemlji (na njivi ali v rastlinjaku), jih označili (zagotovljen sistem sledljivosti) in prenesli v laboratorij. Pred začetkom vnosa rastlinskega materiala v tkivne kulture je bila potrebna sterilizacija tkiva. Celotno gnezdo smo olupili in ločili na posamezne čebulice. Čebulicam smo porezali odmrle dele in porjaveli koreninski del. Z detergentom in ščetko smo jih dobro očistili pod tekočo vodo. Zgornji del smo s skalpelom odrezali, ustrezno označili in zapakirali. Ta del smo uporabili za testiranje na viruse, ki je potekalo na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS). Med rezjo

posameznih vzorcev smo skalpel razkužili. Spodnji – bazalni del smo uporabili za nadaljnje delo v tkivni kulturi.

Priprava *in vitro* kulture je potekala po modificiranem protokolu Vršiček Marn in sodelavcev (2017). Pripravili smo magnetno mešalo, nanj postavili čaši s pripravljenim razkužilom. Za postopek razkuževanja smo pripravili 70 % raztopino etanola in 5 % raztopino dehidriranega natrijevega dikloroizocianurata (DICA), slednji smo dodali dve kapljici močila (Tween®). Bazalne plošče smo razkuževali 20 sekund v etanolu. Sledil je prenos v čašo s 5 % raztopino DICA za 15 minut. Po končanem razkuževanju smo jih prenesli v predhodno z UV lučko dezinficiran laminarij in jih trikrat sprali v sterilizirani destilirani vodi (SDW) (Hidayat, 2005).

## 2.2 Gojenje v *in vitro* razmerah

Posamezno bazalno ploščo smo po spiranju s SDW položili na sterilni filter papir. S pomočjo skalpela in pincete smo odstranili odvečno, porjavelo ali od razkuževanja požgano tkivo. Večje bazalne plošče smo razpolovili, manjše (velikosti cca 3 mm) pa pustili cele. Pravilno orientirane (spodaj del, iz katerega so izraščale koreninice) smo prenesli na gojišče. 1 liter osnovnega gojišča je vseboval 8 g/l agarja, 30 g/l saharoze, 3,16 g/l Gamborg B5 medija, 10 ml/l raztopljene indol-3-propanojske kisline (iPA) hormona (5 mg / 50 ml destilirane vode) in 50 µL/l jasmonske kisline, pH = 5.

Epruvete z bazalnimi deli šalotk smo ustrezno označili in v stojalnih postavili v rastno komoro. Dnevna temperatura v rastni komori je bila 22 °C, nočna pa 20 °C. Dolžina dneva je znašala 16 ur. Po enem tednu smo preverili uspešnost sterilizacije. Vse epruvete z vidnimi okužbami smo redno odstranjevali.

Zaradi velikega izpada rastlin v *in vitro* pogojih v prvih serijah prenosa (okužbe rastlin z glivo *Aspergillus niger* Tiegh.) smo pri nadaljnjem delu osnovnemu gojišču po avtoklaviranju dodali 2 ml/l fungicida Luna® Experience (0,2 % koncentracija), ki se je izkazal za učinkovitega pri zatiranju okužbe.

Prvi zeleni poganjki so začeli izraščati približno po dveh tednih. Ko so bili dovolj veliki in imeli formirano čebulico, smo jih ločili in predstavili v posamezne epruvete z gojiščem za debeljenje čebulic, ki je vsebovalo 80 g/l saharoze, 8 g/l agarja in 4,43 g/l medija Murashige in Skoog (MS), pH umerjen na 5,9–6,0.

## 2.3 Določanje virusnih okužb

Vse rastline so bile ob vnosu v *in vitro* razmere testirane na prisotnost OYDV, LYSV, GarCLV, SLV, GarV-A, GarV-B, GarV-C in ShVX s serološko metodo ELISA (Perotto in sod., 2010; Vršiček Marn in sod., 2017a; Vršiček Marn in Mavrič

Pleško, 2017). Analize so bile opravljene s protitelesi proizvajalca DSMZ po njihovem protokolu. V primeru nejasnih rezultatov seroloških analiz smo opravili še testiranje z RT-PCR. Skupno RNA smo izolirali iz 10 mg tkiva s kitom MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo) po navodilih proizvajalca, 1,5 µl izolirane RNA pa smo uporabili v RT-PCR reakciji s kitom Qiagen One step RT-PCR kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Za testiranje OYDV smo uporabili začetna oligonukleotida CRCCARTTGGATAAYGC/ YTCCGTGTCCTCWTCCG prilagojena v okviru te naloge, za SLV pa CTTTTGGTTCACTTTAGG/GCACGCAATAGTCTACGG (Mituti in sod., 2011).

## 2.4 Termoterapija

Za postopek termoterapije smo uporabili najvitalnejše rastline, odgnane iz bazalnih plošč. Ko so imele rastline vsaj 4–5 cm dolg vitalni glavni poganjek in dobro razvit koreninski sistem, je sledila termoterapija. Rastline so bile najprej en teden izpostavljene temperaturi 30 °C in nato še 5 tednov 37 °C (Walkey in sod., 1987). 8 od 12 rastlin je termoterapijo uspešno preživelo. Dolžina dneva v rastni komori je znašala 16 ur, s 65 % zračno vlago.

## 2.5 Izolacija meristemov

Predhodno smo si pripravili gojišče za meristeme. 1 liter gojišča za izolacijo meristemov je vseboval 3,2 g/l Salt and Hildebrandt Basal Salt Mixture, 30 g/l saharoze, 7,5 g/l agarja, 5 ml/l hormonske raztopine 1- naftalen oetne kisline (NAA) in 20 ml/l hormonske raztopine 6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilamin purin (2iP), pH vrednost gojišča 5,9 – 6,0. Postopek smo izvedli pod sterilnimi pogoji. Preživele šalotke smo v laminariju prestavili iz epruvete in pod stereolupo s pomočjo koničastih igel pridobili meristem ter ga v sterilnih pogojih prestavili na navedeno gojišče.

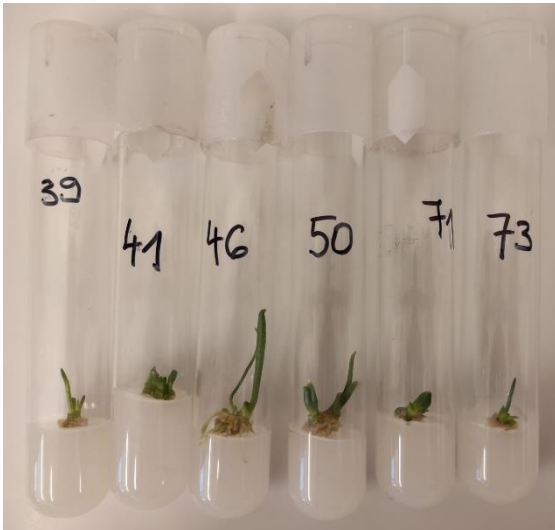
## 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Skupno je bilo do sedaj v tkivne kulture preneseno tkivo 102 šalotk (spodnji del posamezne čebulice), ki so bile vse testiranje tudi na prisotnost virusov (zgornji del posamezne čebulice). Med 102 čebulicami, je bila s serološko metodo okužba s SLV potrjena pri 92 čebulicah, 10 čebulic (9,8 %) je bilo brez prisotnosti analiziranih virusov. Smékalová in sod. (2017) poročajo o 93,4% okuženosti šalotke s SLV naključno testiranih zelenih listov šalotk z ELISA testi. Preostali del čebulic iz gnezda teh desetih zdravih čebulic smo prihranili, jih posadili v lončke in gojili v rastlinjaku (Slika 1). Sklepali smo, da je okuženost znotraj gnezda enaka. Ko so rastline odgnale in bile dovolj razvite za vzorčenje, smo zeleno maso vzorčili in testirali na prisotnost virusov z ELISA testi. V devetih vzorcih smo s serološkimi testi ugotovili prisotnost SLV, pri treh čebulicah iz istega gnezda pa smo potrdili tudi prisotnost OYDV (preglednica 1). Pri nekaj vzorcih smo na osnovi seroloških testov

sumili na okužb s SLV oziroma OYDV. Za gotovo potrditev virusov je sledilo še RT-PCR testiranje teh istih vzorcev. Okužbo enega vzorca s SLV smo potrdili, medtem ko okužbe z OYDV nismo potrdili.

**Preglednica 1:** Rezultati ELISA testiranj na prisotnost virusov pri 10 čebulicah šalotke po sajenju v rastlinjaku (razvita zelena listna masa).

Oznaka vzorca	OYDV	LYSV	GarCLV	SLV	GarV-A	GarV-B	GarV-C	ShVX
47/1	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
47/2	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
79/1	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
79/2	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
90	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
94	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96/1	<b>poz.</b>	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96/2	<b>poz.</b>	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96/3	<b>poz.</b>	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
99	neg.	Neg.	Neg.	<b>Poz.</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.



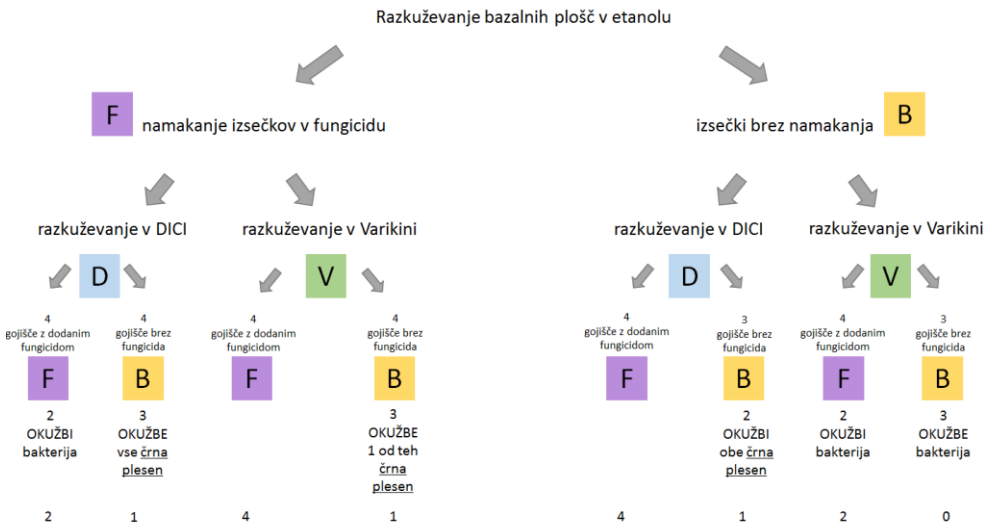
**Slika 1:** Levo odgnani izsečki šalotke sorte Pohorka v tkivni kulturi in desno presajene čebulice v substrat.

Sklepamo lahko, da je bila koncentracija virusov (predvsem SLV) pod mejo detekcije za ELISA test na prvem testiranju, ko se je testiralo zgornji del posamezne čebulice. Kasneje je sledilo ELISA in RT-PCR testiranje listov, odgnanih iz čebulic iz istega gnezda. Lahko, da je bil SLV prisoten tudi v predhodnih vzorcih, ki so izhajali iz iste serije glavic, a je bila njegova koncentracije pod mejo zaznave, z razvojem in rastjo rastlinic pa se je virus namnožil. Naši rezultati se skladajo s hipotezo, da koncentracija SLV z rastjo šalotke narašča. O višjih koncentracijah SLV v starejših listih so poročali Pauzi in sod. (2018), medtem ko je bila v šalotki za seme oz. Mlajših rastlinah koncentracija SLV nižja. Koncentracija je bistveno narastla že po 14 dneh od sajenja šalotke (Pauzi in sod., 2018).

Za razliko od predhodnega ELISA testiranja smo tokrat pri posameznih vzorcih poleg SLV zaznali tudi prisotnost OYDV, ki ga prej nismo zaznali. Po ponovnem testiranju razvitih zelenih delov, tokrat z RT-PCR smo okužbo z OYDV potrdili le pri vzorcih z oznako 96/1, 96/2 in 96/3, tudi v kasnejši fazi rasti. Vsi trije posajeni vzorci oz. Čebulice so izhajale iz istega gnezda. Podobno kot pri SLV je možno, da je bil OYDV prisoten tudi v začetnih vzorcih (ko smo testirali zgornji del čebulic), saj so izhajale iz istega gnezda, a je bila njegova koncentracije pod mejo zaznave, z razvojem in rastjo rastlinic pa se je virus namnožil. Možno pa je tudi, da je bil virus med čebulicami v gnezdu neenakomerno razporejen. Vršiček Marn in sod. (2017b) so poročali, da je na podlagi njihovih raziskav za zgodnejšo detekcijo OYDV, GarCLV in LYSV v tkivni kulturi primernejša uporaba molekularnih metod, saj so občutljivejše od seroloških. Prisotnost OYDV na šalotki lahko privede do večjih izgub pridelka (Katis in sod., 2012). Okužba s SLV ne predstavlja nevarnosti za sam pridelek, tudi simptomi pri okužbi niso izraženi. Problem predstavlja sočasna okužba z virusi iz rodu *Potyvirus*, saj se v tem primeru zaradi sinergističnega delovanja simptomi močneje izrazijo in lahko povzročijo veliko škodo na pridelku (Sako, 1989). Šalotka, okužena z obema virusoma, SLV in OYDV torej lahko predstavljajo resnejši problem za pridelavo. Pauzi in sod. (2015) so poročali, da je kombinacija okužbe s SLV in potivirusom na šalotki v Indoneziji dosegla 92,9 % okuženost pridelka v poljskih razmerah. Pri testiranih šalotkah v poskusu Smékalove in sod. (2017) so v 53,2 % primerkih potrdili okužbo z OYDV in v 59,9 % okužbo z LYSV. Okužene čebulice oz. Okužen sadilni material predstavlja glavni vir okužb na poljih (Pauzi in sod., 2018). Za uspešno eliminacijo virusov se je kombinacija kulture meristemov, termoterapije in kemoterapije izkazala za najučinkovitejšo za pridobitev brezvirusnega sadilnega materiala (Manjunathagowda in sod., 2017).

Zaradi okužbe rastlinskega materiala z glivo *Aspergillus niger* je prišlo do 100% izpada rastlin v *in vitro* pogojih v prvih serijah prenosa. Zatiranja glive smo se lotili z različnimi tehnikami, pripravili smo dve različni gojišči (Slika 2) – osnovno gojišče in enako gojišče, ki smo mu po avtoklaviranju dodali fungicid Luna® Experience. Sledilo je razkuževanje rastlinskega materiala. Osnova je ostala razkuževanje v 70 % etanolu. Nato smo polovico vzorcev namakali v 0,3 % fungicidu, polovice vzorcev

pa v fungicidu nismo predhodno namakali. Sledilo je razkuževanje v 5 % DICA oziroma nekaj izsečkov v 25 % Varikini®. V primeru razkuževanja z Varikino® je tkivo šalotke precej porumenelo in propadlo, ta metoda razkuževanja je bila za izsečke preveč intenzivna. Za najučinkovitejšo metodo se je izkazalo razkuževanje v etanolu, brez dodatnega namakanja v fungicidu. Razkuževanje z DICA in nanos rastlinskega materiala na gojišče z dodanim fungicidom pa se je izkazalo za učinkovito metodo pri zatiranju okužbe.



**Slika 2:** Shematski prikaz postopka razkuževanja rastlinskega materiala za preprečitev okužbe izsečkov s črno plesnijo (*Aspergillus niger*).

Na podlagi poskusov z dodajanjem različnih koncentracij fungicida (0,2 %, 0,3 % in 0,5 % koncentracije) osnovnemu gojišču smo ugotovili, da zadostuje že najnižja priporočena koncentracija, torej 0,2 %. Subkultivacija izsečkov na gojišče brez fungicida lahko sledi že po enem tednu v izogib morebitnim vplivom fungicida na rast rastlin.

Ker je večina čebulic, iz katerih smo izolirali bazalne plošče za tkivne kulture imela potrjeno prisotnost SLV, smo se odločili za eliminacijo virusov s termoterapijo. Za termoterapijo je potrebno odbrati le najvitalnejše in dobro razvite rastline s krepkim koreninskim sistemom. Pred termoterapijo smo z željo po okrepitvi koreninskega sistema osnovnemu gojišču dodali avksine (NAA (10 ml/l)), da bi spodbudili rast korenin. Na ta način bi bile rastline močnejše in so lažje kljubovale visokim temperaturam tekom termoterapije, vendar izboljšanja v koreninjenju nismo zaznali. 12 najvitalnejših odbranih rastlin je bilo termoterapiji izpostavljenih najprej en teden pri 30 °C, da so se privadile višjim temperaturam in niso doživele temperaturnega

šoka do te mere, da bi propadle. Walkey in sod. (1987) so poročali, da so rastline česna, ki so bile iz temperature 20 °C prenesene takoj na termoterapijo (36 °C) večinoma propadle. Po enem tednu smo rastline za 5 tednov izpostavili 37 °C, kar je rastline precej izčrpalo. To je bilo vidno tudi v rasti oz. Rjavenju konic listov (Slika 3). O večjem izpadu rastlin po termoterapiji poročajo tudi Wang in sod. (2020).



**Slika 3:** Levo vitalna šalotka sorte Pohorka v tkivni kulturi na osnovnem gojišču in desno šalotka po termoterapiji (30 °C za 1 teden in nato 37 °C še za 5 tednov).

Po šestih tednih je sledila izolacija meristemov iz osmih rastlin, ki so preživele termoterapijo, vendar je regeneracija šalotk iz meristemov še v izvajanju. Testiranje na prisotnost virusov bo sledilo po opravljeni termoterapiji, pri rastlinah regeneriranih iz izoliranih meristemov. Za dokončno potrditev odsotnosti virusov po opravljenem čiščenju bomo uporabili občutljivejše molekularne metode.

#### 4 SKLEPI

Na IHPS nam je pri šalotki sorta Pohorka uspelo prenesti na viruse testiran žlahtniteljski material v *in vitro* razmere. Iz bazalne plošče nam je na izbranem gojišču uspelo vzgojiti rastline. S serološkim testiranjem na prisotnost virusov, smo ugotovili 100 % okuženost rastlin s SLV. Medtem ko prisotnosti virusa na testiranih mladih čebulicah nismo zaznali, je bila prisotnost virusa zaznana v zelenih listih po mesecu dni rasti v loncih, kar kaže na to, da se med rastjo viša tudi koncentracija virusa. Zaradi prisotnosti spor glive *Aspergillus niger* na čebulicah in posledično tudi v tkivnih kulturah, smo vzpostavili protokol čiščenja in razkuževanja, ki se bo v prihodnje uporabljal za gojenje šalotke *in vitro*.



Naše delo bomo nadaljevali s postopkom izolacije meristemov pri rastlinah, ki so bile izpostavljene termoterapiji in njihovo regeneracijo. V kolikor bomo našli zdrave rastline, bomo nadaljevali s postopkom množenja iz bazalnih plošč. V nasprotnem primeru pa bomo nadaljevali zdravljenje s kemoterapijo. Za dokončno potrditev odsotnosti virusov po opravljenem čiščenju bomo uporabili molekularni test.

Okužba šalotke s SLV ne predstavlja večje gospodarske škode na posevkih, ob predpostavki, da je šalotka okužena le s tem virusom. V kombinaciji z ostalimi virusi, predvsem virusi iz rodu *Potyvirus* pa lahko pride do sinergističnega delovanja in posledično do velikega izpada pridelka. Z delom smo prispevali k prvemu vedenju o prisotnosti virusov v žlahtniteljskem materialu sorte Pohorka ter vzpostavili sistem prenosa iz *in vivo* v *in vitro* razmere ter vzpostavili sistem ohranjanja rastlin v tkivni kulturi.

## ZAHVALA

Delo je bilo opravljeno v okviru EIP projekta z naslovom Vzpostavitev vzdrževalne selekcije čebulnic za pridelavo zdravega semena slovenskih sort česna (*Allium sativa*) in šalotke (*Allium cepa* var. *aggregatum*). Projekt se je izvajal v okviru ukrepa M16 - Sodelovanje iz Programa razvoja podeželja 2014-2020, podukrepa M16.2 - Podpora za pilotne projekte ter za razvoj novih proizvodov, praks, procesov in tehnologij. Tanji Kokalj, Barbari Grubar in Aljoši Bebru se zahvaljujemo za izvedbo laboratorijskih testov za viruse.

## 5 LITERATURA

- Cafrune E. E., Perotto MC., Conci V. C. 2006. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. *Plant Disease*, 90: 898–904.
- Conci V. C., Canavelli A., Lunello P., Di Rienzo J., Nome S. F., Zumelzu G., Italia R. 2003. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease*, 87: 1411–1415.
- Černe M. 1992. Čebulnice: čebula, česen, por, zimski luk, drobnjak, šalotka. Ljubljana, Kmečki glas: 61 str.
- FURS. 2022. Citirano po: <http://spletni2.furs.gov.si/sorte/Index.htm> (20. 10. 2022)
- Hidayat I. M. 2005. In Vitro Plant Regeneration and Bulbet Formation of Shallots (*Allium ascalonicum* L.) 'Sumenep'. *Acta Hort.*, 688: 251–257.
- Katis N. I., Maliogka V. I., Dovas C. I. 2012. Viruses of the genus *Allium* in the Mediterranean region. *Adv. Virus Res.*, 84: 163–208.
- Lunello P., Di Rienzo J., Conci V. C. 2007: Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Disease*, 91: 153–158.
- Manjunathagowda D. C., Gopal J., Archana R., Asiya K. R. 2017. Virus-Free Seed Production of Garlic (*Allium sativum* L.): Status and Prospects. *Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci.*, 6: 2446–2456.

- Mituti T., Marubayashi J. M., Moura M. F., Krause-Sakate R., Pavan M. A. 2011. First report of shallot latent virus in garlic in Brazil. *Plant Disease*, 95: 227.
- Pauzi Y. S., Lestari S. M., Hidayat S. H. 2018. Variations of *Garlic Common Latent Virus* and *Shallot Latent Virus* Concentration on Shallot and Garlic. 8 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 197.
- Perotto M. C., Cafrune E. E., Conci V.C. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Alexiviruses. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 489–495.
- Sako I. 1989. Occurrence of Garlic latent virus in *Allium* species. *Plant Prot.*, 43: 389–392.
- Smékalová K., Stavělíková H., Dušek K. 2017. Distribution of viruses in the shallot germplasm collection of the Czech Republic – Short Communication. *Hort. Sci.*, 44: 49–52.
- Swamy K. R. M., Veere Gowda R. 2006. Leek and shallot. *Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 3: 365-389.
- Vršiček Marn M., Mavrič Pleško I., Ugrinović K., Škof M., Komatar E. 2017a. Vzgoja kakovostnega razmnoževalnega materiala česna sorte 'Ptujski jesenski'. Zbornik predavanj in referatov 13. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo Rimske Toplice, 7.-8. marec 2017.
- Vršiček Marn M. in Mavrič Pleško I. 2017. Integrirano varstvo rastlin. Virusi česna. Citirano po: <https://www.ivr.si/skodljivec/virusi-cesna/> (21. 10. 2022)
- Viršček Marn M., Ugrinović K., Škof M. 2017b. Pridobivanje in vzdrževanje zdravega semenskega materiala slovenskih sort česna. 10 str.
- Walkey D. G. A., Webb M. J. W., Bolland C. J., Miller A. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *The Journal of Horticultural Science*, 62: 211-220.
- Wang M., Zhibo H., Blystad D., Wang Q. 2020. Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. *Ann. Appl. Biol.*, 178: 442–449.
- Wang M., Zhibo H., Ma X., Blystad D., Wang Q. 2021. Double-edged effects of the cryogenic technique for virus eradication and preservation in shallot shoot tips. *Plant pathology* 71: 494-504.

## DEPOZICIJA NEKATERIH RASTLINSKIH HRANIL IN NATRIJA S PADAVINAMI

Žan TROŠT<sup>1</sup> in Barbara ČEH<sup>2</sup>

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Received: 25. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 2. 12. 2022

### Izvleček

Depoziciji dušika in žvepla s padavinami sta desetletja predstavljali kot kisli dež velik okoljski problem, po drugi strani pa je to predstavljalo pomemben del rastlinskih hranil, predvsem sulfata in dušika. V letih 1997–2000 je v Sloveniji s padavinami padlo med 10 kg/ha dušika (N) v manj urbanih in 12 kg/ha v urbanih območjih, žvepla (S) pa med 8 kg/ha v manj urbanih in 12 kg/ha v urbanih območjih. V zadnjih 30 letih (1990–2019) so se izpusti snovi, ki povzročajo zakisovanje in evtrofikacijo, zmanjšali za 80 %. V zadnjih štirih letih (2018–2021) znaša tako letna depozicija dušika s padavinami v obliki NH<sub>4</sub> in NO<sub>3</sub> okoli 6 kg/ha N in 2,5 kg/ha S. V zadnjih letih s padavinami torej pade za prehrano rastlin zanemarljiva količina dušika in žvepla, pa tudi drugih hranil (2–4 kg/ha Ca, manj od 1 kg/ha Mg in K, 1–4 kg/ha Na letno).

**Ključne besede:** mokra depozicija, padavine, rastlinska hranila, žveplo, dušik

## WET DEPOSITION OF ELEMENTS THAT ARE IMPORTANT FOR AGRICULTURE

### Abstract

The deposition of nitrogen and sulphur through precipitation was a big environmental problem for decades, but on the other hand, this deposition contributed to a significant part of plant nutrients, especially sulphate and nitrogen. In the period from 1997 to 2000, wet deposition in Slovenia was 10 kg/ha nitrogen (N) yearly in less urban area and 12 kg/ha of in urban area, and 8 kg/ha sulphur (S) in the less urban area and 12 kg/ha S in urban area. In the last 30 years, from 1990 to 2019, however, releasing of substances that cause acidification and eutrophication have decreased by 80%. In the last four years, from 2018 to 2021, N deposition through precipitation in the form of NH<sub>4</sub> and NO<sub>3</sub> was around 6 kg/ha N annually, and S deposition around 2.5 kg/ha. This shows that in terms of contribution to the nutrition of cultivated plants, in recent years a negligible amount of N and S falls

<sup>1</sup> Mag. inž. hort., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: zan.trost@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., IHPS, e-naslov: barbara.ceph@ihps.si

with precipitation, as well as other nutrients (2–4 kg/ha Ca, less than 1 kg/ha Mg and K, 1–4 kg/ha Na annually).

**Key words:** wet deposition, precipitation, plant nutrients, sulphur, nitrogen

## 1 UVOD

Človekove dejavnosti v prejšnjih desetletjih, predvsem uporaba fosilnih goriv, so povzročale naglo povečanje emisij dušika v zrak (Neff in sod., 2002). To je bil v preteklosti velik okoljski problem (Wałaszek in sod., 2013). Dušikovi oksidi imajo namreč negativne učinke na ekosistem, vplivajo na zakisovanje tal in povzročajo izgubo biodiverzitete, po drugi strani pa ima depozicija dušika pozitiven učinek na ohranjanje produktivnosti rastlin, saj se z vnosom dušika poveča količina dušika v tleh in rastlinah (Zhu in sod., 2015).

Tudi prekomerna depozicija žveplovih oksidov vpliva na zakisovanje tal in vode, negativne posledice pa se odražajo na vodnih ekosistemih ter na poškodovanosti gozdov, kmetijskih rastlin in druge naravne vegetacije (ARSO, 2018). Po drugi strani pa je tudi to pomembno rastlinsko hranilo. Tudi kalcij, magnezij in kalij so pomembna rastlinska hranila, natrij pa je v prehrani rastlin problematičen zaradi fitotoksičnosti in zaslanjevanja tal.

Izpusti snovi, ki povzročajo zakisovanje in evtrofikacijo, se od leta 1990 naprej zmanjšujejo. V obdobju 1990–2019 so se v Sloveniji zmanjšali za 80 %. Snovi, ki povzročajo zakisovanje, so žveplovci ( $\text{SO}_x$ ) in dušikovi oksidi ( $\text{NO}_x$ ) ter amonijak ( $\text{NH}_3$ ), dušikovi oksidi in amonijak pa povzročajo tudi evtrofikacijo (ARSO, 2021). Izpusti žveplovih oksidov so se zmanjšali za skoraj 100 %. Po letu 2006 v Sloveniji ni bilo zabeleženih preseganj vrednosti žveplovega dioksida v zraku. Izboljšanje stanja glede izpustov  $\text{SO}_2$  v zadnjem desetletju gre pripisati uvajanju tekočih goriv z nižjo vsebnostjo žvepla, nadomeščanju tekočih in trdnih goriv z zemeljskim plinom v industriji, pa tudi vgraditvi razžvepljevalnih naprav v večjih onesnaževalcih, npr. termoelektrarnah (ARSO, 2021). Tudi izpusti dušika so se v obdobju 1990–2017 zmanjšali; izpusti dušikovih oksidov za 60 %, izpusti amonijaka pa za 20 %. Izpusti amonijaka so se v zadnjih 30 letih zmanjšali predvsem zaradi zmanjšane staleža goveje živine (ARSO, 2021).

V prispevku smo predstavili količino različnih snovi ( $\text{SO}_4^{2-}$ -S,  $\text{NH}_4$ -N,  $\text{NO}_3$ -N,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), ki so padle na tla s padavinami v različnih obdobjih. Primerjali smo obdobje 1997–2000 z obdobjem zadnjih 4 let (2018–2021).

## 2 MATERIAL IN METODE

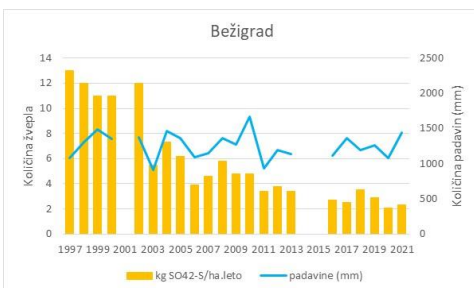
Iz letnih poročil Agencije RS za okolje (ARSO, 2022) smo po merilnih postajah, ki jih le-ta uporablja, povzeli podatke o vsebnosti različnih anorganskih snovi ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) v padavinah ter letne količine padavin. S pomočjo teh podatkov smo izračunali količino posameznih hranil na hektar (mokra depozicija v kg/ha).

Za obdobje 1997–2000 smo se osredotočili na tri lokacije, in sicer na Bežigrad, ki je na urbanem območju v Ljubljani, Iskrbo, ki leži na manj urbanem območju na Kočevskem, ter Rakičan, ki je na izrazito kmetijskem območju v bližini Murske Sobote. Za preračun glede mokre depozicije v zadnjih letih pa smo uporabili podatke s petih lokacij (Bežigrad, Iskrba, Rakičan, Škocjan na Dolenjskem in Rateče na Gorenjskem), kjer ARSO trenutno izvaja meritve.

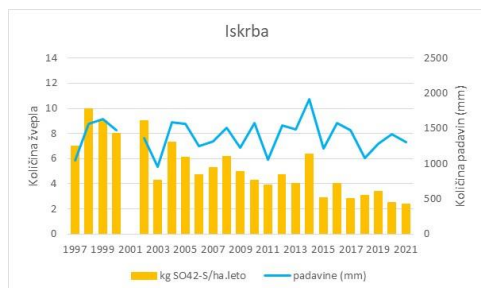
## 3 REZULTATI

### 3.1 Mokra depozicija žvepla

Najbolj očiten padec mokre depozicije žvepla v obdobju od leta 1981 do 1994 je bil na urbanem območju; v Bežigradu je mokra depozicija  $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$  padla za približno 60 kg - s približno 90 kg/ha v letu 1981 na 30 kg/ha v letu 1994 (Čeh, 1996). V naslednjem obdobju, med letoma 1997–2021, je v Bežigradu (slika 1) mokra depozicija  $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$  padla za 82 % - s 13 kg na 2,3 kg/ha letno. Padec je bil očiten tudi v manj urbanem območju; v Iskrbi (slika 2) je mokra depozicija žvepla padla za 66 %, in sicer s 7 kg na 2,4 kg/ha S letno. Na obeh območjih je bilo v letu 2021 občutno več padavin kot leta 1997, kljub temu pa je količina žvepla opazno padla, kar še dodatno nakazuje manjšo količino žvepla v zraku.

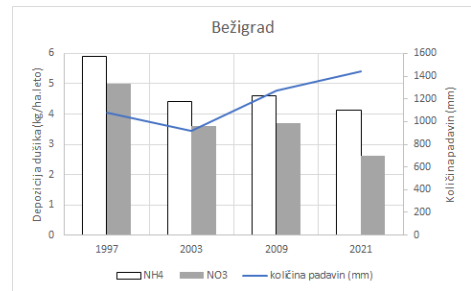
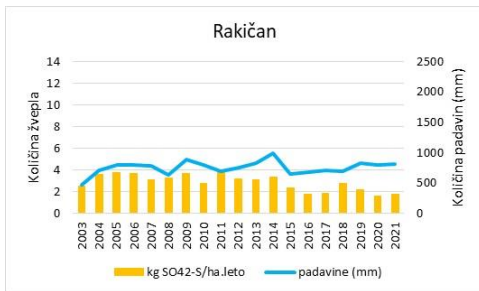


**Slika 3:** Mokra depozicija žvepla v letih 1997–2021 na merilnem mestu Bežigrad



**Slika 4:** Mokra depozicija žvepla v letih 1997–2021 na merilnem mestu Iskrba

Če primerjamo podatke med preučevanima obdobjema na lokaciji na kmetijskem območju (Rakičan), ugotovimo, da pa je bilo leto 2004 po količini padavin (708 mm) primerljivo z letom 2021 (820 mm), depozicija žvepla pa je bila v letu 2021 glede na leto 2004 za 50 % manjša; z že tako nizkih 3,6 kg/ha se je zmanjšala na 1,8 kg/ha S letno (slika 3).



**Slika 5:** Mokra depozicija žvepla v letih 2003–2021 na merilnem mestu Rakičan

**Slika 6:** Mokra depozicija dušika v letih 1997–2021 na merilnem mestu Bežigrad

V preglednici 1 so predstavljeni podatki o mokri depoziciji žvepla v obdobju 2018–2021 na petih lokacijah. Mokra depozicija žvepla je bila med 2 in 3 kg/ha letno, kar sicer delno pokrije določene potrebe kmetijskih rastlin, v večini primerov pa je žveplo potrebno dodajati z gnojenjem. Raziskave na IHPS so na primer pokazale, da je odvzem žvepla pri hmelju okoli 8 kg/ha S letno (IHPS, 2020).

**Preglednica 1:** Letno povprečje mokre depozicije dušika in žvepla (v kg/ha letno) v obdobju 2018–2021

	NH <sub>4</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S
Iskrba	2,9	2,5	2,8
Bežigrad	4,2	2,6	2,7
Škocjan	3,5	3,2	2,9
Rateče	3,0	2,1	2,1
Rakičan	3,4	1,9	2,1
Povprečje	3,4	2,5	2,5

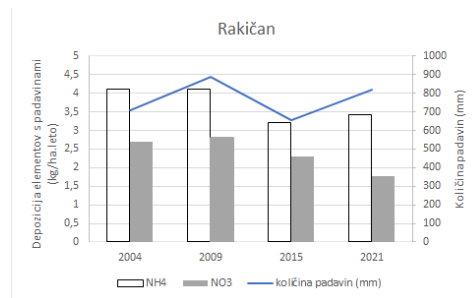
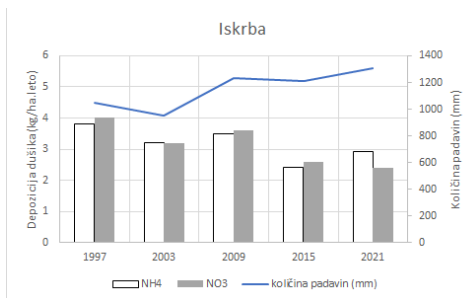
V preglednici 2 sta predstavljeni mokri depoziciji dušika in žvepla v obdobjih 1997–2000 ter 2018–2021 na dveh lokacijah (Bežigrad in Iskrba). Mokra depozicija dušika se je v obdobju 2018–2021 glede na obdobje 1997–2000 precej zmanjšala. Še bolj očitno pa je zmanjšanje mokre depozicije žvepla; padec je nekajkrat na obeh merilnih mestih.

**Preglednica 2:** Letno povprečje mokre depozicije dušika in žvepla (v kg/ha letno) v obdobju 2018–2021

	Bežigrad			Iskrba		
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> S	NH <sub>4</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> S	NH <sub>4</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N
1997–2000	11,8	6,6	5,8	8,5	5,2	4,8
2018–2021	2,7	4,2	2,6	2,9	2,9	2,4

### 3.2 Mokra depozicija dušika

V Sloveniji je padlo v obdobju 1980–1994 v povprečju s padavinami med 9 in 18 kg/ha N letno (Kvar, 1997). Cape in sod. (2012) poročajo, da je mokra depozicija amonijske oblike dušika v Evropi med 0,3–6,5 kg/ha letno, mokra depozicija dušika nitratnega izvora pa med 0,6–4,0 kg/ha letno. Tudi podatki z merilnih mest v Sloveniji so v tem območju. Mokra depozicija dušika amonijakalnega izvora se je na merilnem mestu Bežigrad (slika 4) zmanjšala z zaokroženo 6 kg/ha na leto v letu 1997 na 4 kg/ha na leto v letu 2021, v Iskrbi (slika 5) pa s 4 kg na 3 kg/ha na leto. Še za več se je zmanjšala mokra depozicija dušika nitratnega izvora, in sicer v Bežigradu s 5 kg na 3 kg/ha v enem letu, v Iskrbi pa s 4 kg na 2 kg/ha na leto. Na kmetijskem območju v Rakičanu (slika 6) velikih razlik ni bilo; v letu 2021 se je glede na leto 2004 mokra depozicija dušika amonijakalnega izvora zmanjšala s 4 kg na 3 kg/ha na leto, mokra depozicija dušika nitratnega izvora pa s 3 kg na 2 kg/ha na leto.



**Slika 7:** Mokra depozicija dušika v letih 1997–2021 na merilnem mestu Iskrba

**Slika 8:** Mokra depozicija dušika v letih 1997–2021 na merilnem mestu Rakičan

Mokra depozicija dušika v obdobju 2018–2021 na nobeni od petih lokacijah ne presega 10 kg/ha letno (preglednica 1). V povprečju je bila skupna mokra depozicija dušika z NH<sub>4</sub> in NO<sub>3</sub> le 6 kg/ha letno, kar nakazuje boljše kvaliteto zraka, hkrati pa se je potrebno zavedati, da je vnos dušika preko mokre depozicije zanemarljiv za prehrano rastlin v kmetijstvu.

### 3.3 Mokra depozicija drugih elementov

Preglednica 3 prikazuje mokro depozicijo drugih elementov, ki so pomembni za kmetijsko proizvodnjo ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) na petih merilnih mestih. Mokra depozicija kalcija je okoli 2–4 kg/ha letno, letne količine depozicije magnezija in kalija so manjše od 1 kg/ha, količina natrija pa je okoli 1–4 kg/ha letno. Med urbanim in kmetijskih okoljem ni večjih razlik. Če primerjamo te podatke s potrebami rastlin, ugotovimo, da so količine elementov z mokro depozicijo za rast in razvoj rastlin zanemarljive. Letni odvzem s hmeljem je na primer 80 kg/ha K in 25–30 kg/ha Mg (Čeh in sod., 2019), letni odvzem kalcija s kulturnimi rastlinami okoli 100–130 kg/ha (Mihelič in sod., 2010).

**Preglednica 3:** Mokra depozicija  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (v kg/ha) in količina padavin (mm) v letu 2021

	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	Količina padavin (mm)
Iskrba	3,9	0,7	3,7	0,5	1310
Bežigrad	3,8	0,6	3,0	0,5	1442
Škocjan	4,2	0,7	3,7	0,5	970
Rateče	3,6	0,5	1,4	0,5	1442
Rakičan	2,0	0,3	0,8	0,5	820

## 4 ZAKLJUČEK

Trend zmanjševanja vsebnosti elementov v zraku je vzpodbuden za kakovost zraka ter s tem okolja. Z vidika kmetijske pridelave pa se je potrebno zavedati, da s padavinami v Sloveniji pade le zanemarljiva količina hranil, ki so potrebni za rast in razvoj rastlin. V obdobju 2018–2021 je letno padlo med 3 in 4 kg/ha dušika v amonijski ter med 2 in 3 kg/ha dušika v nitratni obliki glede na merilno lokacijo.

Sedanje količine elementov, ki padejo s padavinami, so za kmetijsko proizvodnjo premajhne, da bi kakorkoli vplivale na rast in razvoj rastlin. Predvsem je treba biti pozoren na gnojenje z žveplom, katerega je pred 20 in več leti s padavinami padlo še dovolj, da se je povsem ali vsaj delno pokrilo potrebe kmetijskih rastlin po tem hranilu (med 9 in 12 kg/ha letno glede na merilno lokacijo), v zadnjih letih pa je njegova vsebnost v padavinah precej manjša in s tem tudi njegova mokra depozicija (med 2 in 3 kg/ha letno glede na merilno lokacijo).

## 5 VIRI

ARSO. 2018. Onesnaženost zraka z žveplovim dioksidom. Dostopno na: <http://kazalci.arslo.gov.si/sl/content/onesnazenost-zraka-z-zveplovim-dioksidom-5>



- ARSO. 2021. Izpusti snovi, ki povzročajo zakisovanje in evtrofikacijo. Dostopno na: <http://kazalci.arso.gov.si/sl/content/izpusti-snovi-ki-povzrocajo-zakisovanje-evtrofikacijo-1>
- ARSO. 2022. Kakovost zraka-letna poročila. Dostopno na: [https://www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/kakovost\\_letna.html](https://www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/kakovost_letna.html)
- Cape, J. N., Tang, Y. S., González-Beníez, J. M., Mitošinková, M., Makkonen, U., Jocher, M., & Stolck, A. Organic nitrogen in precipitation across Europe. *Biogeosciences*. 2012; 9(11): 4401-4409.
- Čeh, B. Vpliv in pomen za kmetijstvo relevantnih kemičnih elementov v padavinah v Sloveniji. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 1996; 60 str.
- Čeh, B., Čremožnik, B., & Luskar, M. O. Nutrients uptake with hop (*Humulus lupulus* L.) as the basis for fertilization rate determination and hop biomass after harvest related to variety. *Novi izzivi v agronomiji 2019, Laško, Slovenija, 31. januar in 1. februar 2019. Zbornik simpozija*, 63-69.
- IHPS. 2020. Tehnologije pridelave in predelave hmelja. Končno poročilo za leto 2019. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (Žalec). Dostopno na: [http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/08/Tehnologija-pridelave-in-predelave-hmelja-2019\\_KON%C4%8CNO-poro%C4%8Dilo\\_splet.pdf](http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/08/Tehnologija-pridelave-in-predelave-hmelja-2019_KON%C4%8CNO-poro%C4%8Dilo_splet.pdf)
- Kvar, T. Vpliv in pomen dušikovih spojin v padavinah v Sloveniji na pridelavo kmetijskih rastlin. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 1997; 95 str.
- Neff, J. C., Holland, E. A., Dentener, F. J., McDowell, W. H., & Russell, K. M. The origin, composition and rates of organic nitrogen deposition: a missing piece of the nitrogen cycle? *Biogeochemistry*. 2002; 57(1): 99-136.
- Mihelič, R., Čop, J., Jakše, M., Štampar, F., Majer, D., Tojnko, S., & Vršič, S. Smernice za strokovno utemeljeno gnojenje. *Ljubljana: Ministry of Agriculture, Forestry and Food of Republic of Slovenia*. 2010; 1-184.
- Wałaszek, K., Kryza, M., & Dore, A. J. The impact of precipitation on wet deposition of sulphur and nitrogen compounds. *Ecological Chemistry and Engineering*. 2013; 20(4): 733-745.
- Zhu, J., He, N., Wang, Q., Yuan, G., Wen, D., Yu, G., & Jia, Y. The composition, spatial patterns, and influencing factors of atmospheric wet nitrogen deposition in Chinese terrestrial ecosystems. *Science of the Total Environment*. 2015; 511: 777-785.