

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

Hmeljarski bilten

Hop Bulletin

26(2019)



Žalec, 2019

Hmeljarski bilten / Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

Izdaja / Issued by	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) / Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS) Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija / Slovenia
Urednika / Editors	dr. Barbara Čeh in dr. Boštjan Naglič
Uredniški odbor / Editorial board	dr. Barbara Čeh (IHPS), izr. prof. dr. Andreja Čerenak (IHPS), prof. dr. Anton Ivančič (Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru / Faculty of Agriculture and Life Sciences University of Maribor – FKBV UM), izr. prof. dr. Jernej Jakše (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani / University of Ljubljana, Biotechnical Faculty – BF UL), prof. dr. Branka Javornik (redna profesorica v pokoju / retired professor), dr. Josef Ježek (Hop Research Institute, Žatec, Czech Republic), doc. dr. Iztok Jože Košir (IHPS), doc. dr. Rok Mihelič (BF UL), dr. Boštjan Naglič (IHPS), prof. dr. Martin Pavlovič (IHPS in FKBV UM), 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 Srećec (Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Hrvaška / College of Agriculture at Križevci, Croatia), prof. dr. Anton Tajnšek (redni profesor v pokoju / retired professor), prof. dr. Dominik Vodnik (BF UL)
Naslov uredništva, politika / Editorial office and policy	Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija / Slovenia; e-pošta / e-mail: barbara.ceh@ihps.si Člani uredniškega odbora so tudi recenzenti prispevkov. Prispevki so najmanj dvojno recenzirani. Za jezikovno pravilnost odgovarjajo avtorji. S poslanim člankom se avtorji strinjajo tudi za spletno objavo revije. / Articles are reviewed and revised. Authors are fully responsible for linguistic structure of the text. By sending an article, the authors agree for the online and printed publication of the journal.
Recenzenti Reviewers	v tej številki izven uredniškega odbora: outside the Editorial Board for this number: dr. Marko Flajšman (BF UL), dr. Miha Ocvirk (IHPS), izr. prof. dr. Tatjana Rijavec (Naravoslovnotehniška fakulteta / Faculty of Natural Sciences and Engineering), doc. dr. Ludvik Rozman , prof. dr. Denis Stajnko (FKBV UM), Janez Sušin (Kmetijski inštitut Slovenije / Agricultural Institute of Slovenia), Marjeta Zagožen (IHPS), doc. dr. Vesna Zupanc (BF UL)
Domača stran / Home page	http://www.ihps.si/raziskave-in-razvoj/publikacije/hmeljarski-bilten/
Bilten zajemajo / Indexed and abstracted by	COBISS, CABI Publishing, EBSCO Publishing
Tisk / Printed by	Grafika Gracer d.o.o.
Avtorske pravice / Copyright	© 2019 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije / © 2019 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

Branka JAVORNIK

Genetske raziskave hmelja in njegovih škodljivih organizmov v Sloveniji – pogled nazaj

Genetic studies of hop and its pathogens in Slovenia – a retrospective5

Martina KUNST, Anton IVANČIČ in Andreja ČERENAK

Določanje perspektivnih starševskih kombinacij križanj hmelja (*Humulus lupulus* L.) za povečanje odpornosti potomcev na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo

Determination of superior parental hop (*Humulus lupulus* L.) crossing combinations for achieving higher progeny resistance to powdery mildew and downy mildew23

Tanja GUČEK, Jernej JAKŠE in Sebastjan RADIŠEK

Preizkušanje različnih metod okuževanja rastlin s CBCVd

Testing of different methods for mechanical inoculation of plants with CBCVd.....36

Boštjan NAGLIČ, Rozalija CVEJIČ, Damijana KASTELEC, Špela ŽELEZNIKAR in Marina PINTAR

Vpliv različnih načinov namakanja na kakovost hmelja (*Humulus lupulus* L.)

Quality response of hop (*Humulus lupulus* L.) to different irrigation approaches50

Pavel DONNER in Josef JEŽEK

Fertigation experiment on Saaz hops in 2017-2019

Poskus ferigacije hmelja na sorti Saaz v letih 2017 do 201961

J. van CALCAR in Fernando EBLAGON

Sustainable hop crop support using compostable PLA twines

Trajnostna opora hmelju z uporabo PLA vodil69

Barbara ČEH, Lucija LUSKAR in Bojan ČREMOŽNIK

Hmeljevina kot vhodni material za kompostiranje

Hop biomass after harvest as input material for composting81

Ksenija RUTNIK, Iztok Jože KOŠIR in Miha OCVIRK

Vpliv staranja na kemijsko sestavo hmelja

Impact of aging on hop chemical composition.....91

Douglas MACKINNON in Martin PAVLOVIČ Global hop market analysis within the international hop growers' convention Globalna analiza hmeljskega trga v okviru svetovne hmeljarske organizacije	99
Karmen PAŽEK in Martin PAVLOVIČ Simulation model for economic analysis in organic agriculture Simulacijski model za gospodarsko presojo ekološke pridelave.....	109
Marko FLAJŠMAN in Darja KOCJAN AČKO Vpliv rastnih razmer na pridelok stebel in morfološke lastnosti 12 sort navadne konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.) v letih 2018 in 2019 Influence of growing conditions on stem yield and morphological characteristics of 12 hemp varieties (<i>Cannabis sativa</i> L.) in years 2018 and 2019	119
Marko FLAJŠMAN Metode žlahtnjenja industrijske konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.) Breeding methods in hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	129
Marko FLAJŠMAN Opis žlahtniteljskih poti pridobitve nakaterih evropskih sort industrijske konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.) in registracija novih sort Description of breeding paths of some hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.) varieties and the registration of new varieties.....	146
Marjeta ZAGOŽEN, Samo KREFT in Andreja ČERENAK Terpeni v navadni konoplji (<i>Cannabis sativa</i> L.) Terpenes in hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	157
Martin PAVLOVIČ, Borut GRAŠIČ in Karmen PAŽEK Ekonomsko ovrednotenje pridelave industrijske konoplje Economic evaluation of industrial hemp production	168
Sebastjan RADIŠEK in Jaka RAZINGER Preiskovanje biotičnih pripravkov za zatiranje verticilijske uvelosti in fuzarijskih obolenj paradižnika Testing of biofungicides against verticillium wilt and fusarium diseases of tomato	176

GENETSKE RAZISKAVE HMELJA IN NJEGOVIH ŠKODLJIVIH ORGANIZMOV V SLOVENIJI – POGLED NAZAJ

Branka JAVORNIK¹

Pregledni članek / review paper
Prispelo / received: 23. 10. 2019
Sprejeto / accepted: 2. 12. 2019

Izvleček

V prispevku je opisan pregled genetskih raziskav hmelja in nekaterih njegovih škodljivih organizmov, fitopatogene glive *Verticillium nonalfalfae* ter viroidov HLVd in CBCVd, v katere sem bila vključena v preteklih letih. Predstavljen je osebni pogled na opravljeno delo na področju razvoja molekularskih markerjev in vrednotenja genetske variabilnosti hmelja, ter izdelave genskih kart hmelja. Opisane so nekatere diagnostične metode hmeljnih patogenih organizmov, temeljne študije interakcij med hmeljem in povzročiteljem hmeljeve uvelosti, genomske in proteomske študije virulence glive *V. nonalfalfae* ter karakterizacija potencialnih efektorskih proteinov odgovornih za virulenco.

Ključne besede: hmelj, molekularna genetika, *Verticillium nonalfalfae*, HLVd in CBCVd

GENETIC STUDIES OF HOP AND ITS PATHOGENS IN SLOVENIA – A RETROSPECTIVE

Abstract

The paper presents a personal overview of the genetic research of hop and hop pathogens (*Verticillium nonalfalfae* and viroids HLVd in CBCVd) in which I was involved in past years. This includes the development of hop molecular markers, assessment of hop genetic variability and genetic mapping. Some pathogen diagnostic methods are described, together with basic studies of hop-pathogen interactions, proteomic and genomic studies of *V. nonalfalfae* virulence and characterization of its effector proteins.

Key words: hop, molecular genetics, *Verticillium nonalfalfae*, HLVd in CBCVd

¹ Zaslužna profesorica Univerze v Ljubljani, Kongresni trg 12, 1000 Ljubljana, e-pošta: branka.javornik@bf.uni-lj.si

1 UVOD

Pri genetskih raziskavah hmelja in njegovih škodljivih organizmih, ki so potekale v zglednem sodelovanju med Biotehnično fakulteto (BF) in Inštitutom za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), sem sodelovala skoraj 25 let. V tem času se je od skromnih začetkov okoli leta 1994 pa do leta 2019 samo na omenjenem področju nabralo obsežno število izvernih znanstvenih člankov (57), preglednih znanstvenih in strokovnih člankov (13), kratkih znanstvenih prispevkov (5), vabljenih predavanj na znanstvenih konferencah (19), objavljenih znanstvenih prispevkov na konferencah (47) in več kot 100 objavljenih povzetkov znanstvenih prispevkov na konferencah (Javornik, B.: <https://bib.cobiss.net/bibliographies/si/>). Raziskave so bile financirane s strani preko 15 temeljnih, aplikativnih in strokovnih projektov ter v letih 1999–2018 iz obsežnega raziskovalnega programa Kmetijske rastle – genetika in sodobne tehnologije (Javornik, B.: <https://www.sicris.si>). Na problematiki hmelja in njegovih škodljivih organizmih je bilo samo pod mojim mentorstvom vključenih 8 mladih raziskovalcev in opravljeni so bili 3 magisteriji ter 11 doktoratov (Javornik, B.: <https://www.sicris.si>).

V začetku 90 let prejšnjega stoletja se je izkazalo, da lahko sodobni molekularni genetski pristopi bistveno prispevajo k učinkovitejši vzgoji izboljšanih novih kultivarjev kmetijskih rastlin. Zato smo tudi pri hmelju zastavili molekularni genetski program, ki naj bi prispeval k boljšemu poznavanju lastnosti, pomembnih za ekonomsko opravičeno pridelovanje hmelja ter za razvoj molekularnih orodij, ki bi lahko neposredno služila v žlahtnjenju hmelja. Vabilo IHPS k sodelovanju in uvajanju sodobnejših metod pri raziskavah hmelja je bilo zame, genetičarko, velika čast in privilegij glede na bogato žlahtniteljsko prakso inštituta in razpoložljiv obsežen genski material. Hmelj v Sloveniji pridelujemo že več kot 100 let in je pomemben kmetijski pridelek, ki je večinoma namenjen izvozu. Svetovni trg narekuje vedno nove zahteve po kakovosti hmelja, zato so potrebe po novih sortah stalno prisotne. Željeni so na primer določeni tipi hmelja (visok odstotek alfa-kislin, aromatični ali dišavni hmelj), spreminjajo se tehnologije pridelovanja, se pojavijo nove bolezni in škodljivci. Pri hmelju enostavna introdukcija iz drugih hmeljarskih območij dostikrat ni uspešna, zato na IHPS poteka žlahtnjenje hmelja že od leta 1952. Pod vodstvom vrhunske žlahtniteljice dr. Dragice Kralj je bilo v letih 1971–1990 potrjenih 11 novih, pretežno aromatičnih sort hmelja, med katerimi izstopa sorta Aurora, ki se še zdaj predeluje na okoli 60 % hmeljišč. Žlahtniteljska tradicija inštituta se je nadaljevala pod vodstvom dr. Andreje Čerenak, uspešne žlahtniteljice z 9 novimi, pretežno dišavnimi sortami hmelja, potrjenimi v obdobju 2009–2018.

Molekularni genetski program hmelja se je začel oblikovati s prihodom Jelke Šuštar Vozlič, takrat zaposlene na IHPS, v naš laboratorij in na pobudo dr. Dragice Kralj, ki mi je leta 1995 predlagala udeležbo na IHGC – Scientific-Technical Commission

v Strasbourgu, kjer sem predstavila naše prve molekulske rezultate na kultivarjih hmelja. Na teh srečanjih smo bili pozneje vedno zaželeni in cenjeni udeleženci. Program, ki sem ga pozneje vodila oz. pri njem aktivno sodelovala, se je med leti dopolnjeval glede na doseženo predhodno znanje in je bil sestavljen iz posameznih med seboj povezanih sklopov:

1. Razvoj molekulskih markerjev hmelja
2. Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja
3. Izdelava genskih kart hmelja za identifikacijo markerjev vezanih z visoko vsebnostjo alfa kislin, pridelkom in odpornostjo na hmeljevo uvelost
4. Diagnostika hmeljnih patogenih organizmov
5. Temeljne študije interakcij med hmeljem in povzročiteljem hmeljeve uvelosti (*Verticillium nonalfalfae*)
6. Genomske in proteomske študije virulentnih dejavnikov povzročitelja hmeljeve uvelosti (*V. nonalfalfae*)
7. Karakterizacija potencialnih efektorskih proteinov povezanih z virulenco *V. nonalfalfae*

Za izvajanje tega programa je bilo potrebno razviti ustrezna znanja in priskrbeti potrebno raziskovalno opremo, da smo lahko večino dela opravili v domačem laboratoriju. Razvite platforme so služile tudi pri proučevanih drugih kmetijskih rastlin in škodljivih rastlinskih organizmih ter za izobraževanje dodiplomskih in podiplomskih študentov. Delo smo usklajevali na rednih sestankih ožje skupine za »genetiko« v okviru raziskovalne programske skupine, na katerih smo se seznanjali z doseženimi rezultati, reševali nastale probleme, izmenjavali mnenja in ideje ter planirali prihodnje korake v raziskavah, ki bi vodile do zastavljenih ciljev. Razvili smo tudi dobro mednarodno sodelovanje na področju hmelja preko Mednarodne hmeljarske organizacije IHGC - Scientific-Technical Comission ter z drugimi uveljavljenimi raziskovalnimi skupinami na področjih posameznih znanstvenih problematik.

2 RAZVOJ MOLEKULSKIH MARKERJEV HMELJA

S pričetkom raziskovalnega dela pri hmelju smo razpolagali predvsem z metodološko preprostejšimi molekulskimi metodami, kot je na primer RAPD metoda (naključno namnožena polimorfna DNA; RAPD markerji), za razvoj katere ima največ zaslug dr. Bojka Kump, ki je sicer delala na genestki variabilnosti ajde. Z RAPD markerji, ki so se izkazali ustrezni pokazatelji polimorfizma, smo vrednotili raznolikosti in sorodstvene odnose tako med domačimi sortami (Jakše in sod., 1994) kot tudi med genotipi, zbranimi v obsežni kolekciji kultivarjev hmelja IHPS (Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999). Zaradi večje informacijske vrednosti drugih molekulskih markerjev smo pričeli najprej z uporabo mikrosatelitov (SSR markerji), ki so jih razvili za hmelj avstralski raziskovalci (Jakše in sod., 2004) in nato z razvojem in karakterizacijo lastnih mikrosatelitskih lokusov hmelja (Jakše in

Javornik, 2001, Jakše in sod. 2002, Štajner in sod. 2005, Jakše in sod. 2008, Jakše in sod. 2011). Izolacija in karakterizacija mikrosatelitskih markerjev hmelja se je izkazala kot delovno in finančno obsežna naloga, vendar je odtehtalo spoznanje, da so to visoko informativni vrstno specifični markerji, nepogrešljivi predvsem za kartiranje genoma heterozigotnih rastlin kot je hmelj. Sedaj razpolagamo z več kot 300 SSR markerji hmelja, žal pa nismo uspeli izdelati javno dostopnega kataloga markerjev ter pri vseh ovrednotiti njihove informacijske vrednosti. Gonilna sila pri pri izolaciji SSR je bil kolega dr. Jernej Jakše, ki je skupaj s kolegicami dr. Natašo Štajner, dr. Zlato Luthar in dr. Dunjo Bandelj, opravil veliko delo in si zasluži izrecno pohvalo za izkazane napore. Tudi sicer je bil Jernej Jakše duša genetskega in genomskega laboratorija, saj se je korajžno lotil novih in zahtevnih metodoloških pristopov ter je nesebično pomagal in svetoval drugim kolegom in kolegicam pri njihovih raziskavah.

Vzporedno s SSR markerji je bil vpeljan tudi AFLP markerski sistem; najprej z barvanjem s srebrom (Jakše in sod., 2001) in nato z avtomatsko fluorescenčno detekcijo (Štajner in sod., 2003), ki omogoča relativno hitro analizo genoma brez predhodnega poznavanja nukleotidnih zaporedij. Za uporabo AFLP (dolžinski polimorfizem amplificiranih fragmentov) markerjev pri različnih organizmih pa so bile potrebne posamezne optimizacije postopkov (Radišek in sod., 2001).

Za uspešnejše odkrivanje genov, ki pogojujejo odpornost hmelja na hmeljevo uvelost ali druge bolezni in škodljivce, smo proučevali in razvili nekaj markerjev (RGA, analogi rezistenčnim genom) neposredno vezanih z odpornostnimi geni (Kozjak in sod., 2009; Majer in sod., 2014).

V sodelovanju z mednarodnim DArT konzorcijem za hmelj pa smo uvedli tudi visoko zmogljivo metodo za genotipizacijo hmelja z DArT markerji (Howard in sod., 2011).

Zaključimo lahko, da smo pri razvoju molekularskih markerjev hmelja naredili dober metodološki napredek ter da smo razpolagali z zadovoljivo opremo in znanjem tudi za zahtevnejše molekulske analize rastlin in rastlinskih patogenov. Razviti markerji hmelja so bili vzporedno praktično uporabljeni med drugim za identifikacijske namene pri določanju pristnosti kultivarjev hmelja z RAPD (Jakše in sod., 1994) in s SSR markerji (Čerenak in sod., 2003), določevanju spola hmeljnih rastlin z RAPD markerji (Čerenak in sod., 2000), z SSR markerji (Jakše in sod., 2008, Škof in sod., 2012) in markerji razvitimi s pomočjo DArT genotipizacije (Čerenak in sod., 2019). Uporabili smo RAPD markerje v povezavi z odpornostjo na hmeljevo uš (Čerenak in Javornik, 2002), pri nejasnostih označb akcesij divjega hmelja v genski banki (Jakše in sod., 2000) in pri diagnosticiranju patotipov *V. nonalfalfae* z AFLP markerji (Radišek in sod., 2003).

3 VREDNOTENJE GENETSKE VARIABILNOSTI HMELJA

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

Za opis kolekcij hmelja in vrednotenje genetske diverzitetete hmelja so se največ uporabljali morfološki in kemijski podatki. Te vrste raziskav so opredelile razdelitev hmeljnih akcesij na dve osnovni veliki, geografsko ločeni skupini, ameriški grenčični hmelj in evropski aromatični hmelj (Small, 1978; Stevens in sod., 2000) ter kultivarje hmelja v skupine, ki so odražali njihovo geografsko poreklo in njihove kakovostne lastnosti (Kralj in sod., 1991; Henning in sod., 2003).

Prva vrednotenja genetske diverzitetete akcesij hmelja z molekulskimi markerji je izvedla naša skupina, ki so ji sledile še druge študije (Jakše in sod., 1994; Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999; Seefelder in sod., 2000; Jakše in sod., 2001; Patzak, 2001). RAPD in AFLP analize so nedvoumno potrdile ločitev dednine hmelja v dve geografski skupini, evropsko in severno-ameriško, ter znotraj evropske skupine genetsko opredelile grupiranje kultivarjev hmelja v podskupine, ki so odražale preteklo žlahtniteljsko prakso v posameznih regijah (Anglija, Bavarska, Češka) ali značilnosti žlahtniteljskih programov (Slovenija, ZDA, Anglija, Japonska, Nova Zelandija, Avstralija). Molekulsko genetske študije so relativno dobro opredelile raznolikosti in variabilnosti ženskih kultiviranih akcesij v kolekcijah hmelja. Manj raziskav pa je bilo opravljenih na divjem hmelju ter moških akcesijah. Za žlahtnitelje pa je lahko zanimiv podatek o stopnji raznolikosti med kultiviranim in divjim hmeljem, kar je analizirala naša skupina (Jakše in sod., 2004). Za evropski hmelj je bilo ugotovljeno, da se divji in kultiviran hmelj sicer signifikantno razlikujeta, vendar se nahaja vsa diverziteteta znotraj obeh skupin, ki izkazujeta približno enako stopnjo variabilnosti. Ali povedano drugače, variabilnost med kultivarji hmelja je enako velika kot variabilnost med divjimi akcesijami, vendar se obe razlikujeta, s čimer se nakazuje, da divji hmelji vsebujejo še neuporabljen vir genetske variabilnosti. Nadalje smo opravili analizo strukture genoma hmelja s

pomočjo večjega števila SSR markerjev na setu izbranih divjih in kultiviranih akcesij hmelja (Štajner in sod., 2008). Rezultati te analize, ki je ena najbolj temeljiti študij variabilnosti dednine hmelja, je pokazala delitev hmeljev v sedem jasno ločenih genskih skupin, in sicer na štiri skupine divjih hmeljev (akcesije z izvorom iz Altaja, Gruzije, Severne Amerike in območja nekdanje Jugoslavije) ter na tri skupine kultiviranih hmeljev (evropski kultivarji, žlahtnjeni v Nemčiji in Češki; kultivarji, žlahtnjeni v Angliji in Sloveniji; kultivarji s pretežno severno ameriško dednino). Iz rezultatov analize je tudi bilo mogoče razbrati deleže posamezne dednine v hibridnih kultivarjih, kar je sovpadalo z znanimi rodovniki teh kultivarjev hmelja ter introgresijo dednine kultivarjev v divjih hmeljih kot posledica križanja med kultiviranimi in divjimi hmelji. Ta znanja o populacijski strukturi bodo lahko v pomoč pri učinkoviti uporabi diverzitete s pomočjo asocijacijskih študij ter za identifikacijo in pravilno interpretacijo povezav med funkcijsko in molekulsko diverziteti.

Iz problematike razvoja molekulskih markerjev in vrednotenja genske variabilnosti hmelja so doktorirali Jelka Šuštar Vozlič (1997), Jernej Jakše (2003), Nataša Štajner (2003) in Petra Kozjak (2006).

4 KARTIRANJE GENOMA HMELJA

Za kartiranje genoma hmelja smo se odločili, ker smo želeli poiskati markerje, vezane za kvantitativne lokuse, ki so povezani z visoko vsebnostjo alfa-kislin, pridelkom ter za določitev markerjev, vezanih z odpornostjo na hmeljevo uvelost. Uspešna identifikacija takšnih markerjev bi lahko služila neposredno v žlahtnjenju hmelja in bi lahko bistveno doprinesla k učinkovitosti in krajšemu času vzgoje novih sort hmelja.

Genske karte so uporabne za kartiranje monogenih lastnosti kot tudi za razčlenitev kvantitativnih lastnosti (več genov skupaj na kromosomski regiji). Osnovni princip kartiranja za obe vrsti lastnosti je podoben, to je tesna vezanost med markerjem in fenotipom ter skupna segregacija pri kontroliranem križanju. Monogene lastnosti z lahko določljivim fenotipom, kot na primer nekatere bolezni, je relativno enostavno vključiti v gensko karto, medtem ko je kartiranje kvantitativnih lastnosti bolj kompleksno, ker jih pogojuje več genov, katerih ekspresija je večkrat odvisna od zunanjih dejavnikov.

Za kartiranje kvantitativnih lokusov za vsebnost alfa-kislin smo uporabili družino potomcev križanja Magnum x 2/1 (visoka ter nizka vsebnost alfa kislin) ter AFLP in SSR markerje. Ta družina je segregirala kvantitativno glede vsebnosti alfa-kislin v letih 2002-2004. Najprej smo izdelali moško in žensko gensko karto vezanih markerjev, nato pa smo z analizo kvantitativnih lastnosti določili štiri kvantitativne lokuse kot pokazatelje visoke vsebnosti alfa-kislin (Čerenak in sod. 2006). To karto

smo nato nadgradili z dodatnimi SSR markerji in merjenjem vsebnosti alfa-kislin in parametrov pridelka v nadaljnjih dveh letih (Čerenak in sod., 2009). Določili smo kvantitativni lokus z mejnima AFLP markerjema za vsebnost alfa-kislin, ki je bil povezan tudi z do 36 % višjo vsebnostjo alfa-kislin ter locirali kandidatne kvantitativne lokuse za parametre pridelka.

Za kartiranje lokusov za odpornost na hmeljevo uvelost je bila vzgojena družina križancev iz odporne sorte Wye Target in domače občutljive moške žlahtniteljske linije 2/1.

Za izdelavo genske karte smo genotipizirali 156 križancev z okoli 200 različnimi molekulskimi markerji, za analizo kvantitativnih lokusov pa smo uporabili fenotipske podatke ocenjevanja bolezenskih znakov hmeljeve uvelosti pri 90 križancih. Identificirali smo signifikantni kvantitativni lokus na eni sami kromosomski regiji, ki je povezan z odpornostjo na hmeljevo uvelost. Mendelska analiza fenotipskih podatkov (neobjavljeno) je nakazala vključenost dveh genov v odpornost hmelja na hmeljevo uvelost, kar je v skladu s predhodnimi dognanji (Darby, 2001). Kvantitativna analiza vsebnosti alfa-kislin in parametrov pridelka na tej karti je potrdila predhodne kvantitativne lokuse, dobljene na potomcih staršev Magnum x 2/1 in pod drugačnimi ravnimi pogoji (Jakše in sod., 2013).

Rezultati kvantitativnega kartiranja so vzpodbudni, škoda je le, da je nadaljnje delo za izdelavo vezanih markerjev za analizirane fenotipske lastnosti uporabnih v žlahtnjenju zastalo.

Izdelava genskih kart in iskanje vezanih markerjev je relativno zahteven projekt zaradi obsežnosti dela pri vzgoji in vzdrževanju družine križancev, merjenju fenotipskih lastnosti ter laboratorijskih in statističnih analiz. Kolegica dr. Andreja Čerenak in sodelavci IHPS so opravili gigantsko delo pri kontroliranem križanju izbranih staršev in vzdrževanju družine križancev na polju skozi več let ter pri analizi fenotipskih lastnosti. Andreja, ki je leta 2004 doktorirala iz prvih dveh genskih kart, si zasluži veliko zahvalo za vloženo delo in vztrajnost pri delu na genskih kartah, ki so, vsaj po moji oceni, ene najboljših do sedaj izdelanih genskih kart hmelja. Na tem mestu si posebno zahvalo zasluži tudi kolega dr. Sebastjan Radišek, ki je opravil obsežno in pomembno delo, ko je marljivo in natančno ocenjeval bolezenske znake hmeljeve uvelosti na razmnoženih in z *V. nonalfalae* umetno okuženih okoli 1000 potaknjencih.

Pomembno delež pri izdelavi genskih kart hmelja je s svojo ekspertizo na področju genomske statistike prispeval dr. Zlatko Satović iz Agronomske fakultete v Zagrebu.

5 DIAGNOSTIKA PATOGENIH ORGANIZMOV HMELJA

Molekulske metode so se razširile tudi na področje diagnostike škodljivih organizmov in ponujajo odlično dopolnitev uveljavljenim in standardiziranim metodam. Za uspešno aplikacijo molekulskih metod v diagnostiki patogenov pa sta potrebna dober fitopatolog in usposobljen molekulski laboratorij. V primeru diagnostike hmeljnih škodljivih organizmov je to kombinacijo tvoril dr. Sebastjan Radišek z IHPS, ki se je skozi leta razvil v uglednega fitopatologa in dr. Jernej Jakše v našem laboratorij na BF. Od začetnih diagnostičnih analiz predvsem na patotipih fitopatogene glive *V. nonalfalfae* in viroida HLVd smo raziskave razširili na temeljna proučevanja interakcije patogen-gostitelj ter na natančnejše opredelitve virulentnih dejavnikov *V. nonalfalfae*.

Zgodba se je intenzivirala po izbruhu letalne hmeljeve uvelosti v slovenskih hmeljiščih leta 1997 in s prihodom Sebastjana v naš laboratorij za opravljanje magisterija in doktorata na tej problematiki. Sebastjan je na IHPS vzpostavil vse ustrezne razmere za rokovanje z izolati *V. nonalfalfae*, kamor med drugim sodijo izolacija, gojenje in hranjenje izolatov, testiranje virulence izolatov z umetnim okuževanjem testnih kultivarjev hmelja in ocenjevanje bolezenskih znakov. Pri tem delu mu je bilo v pomoč predhodno znanja in prakse, ki jih je razvila odlična fitopatologinja IHPS mag. Marta Dolinar. V okviru njegovega izobraževanja pa smo si zastavili naslednje okvirne cilje:

- Razviti molekulsko metodo za ločevanje blagih in letalnih patotipov *V. nonalfalfae*
- Izdelati molekulsko metodo za specifično določanje letalnih patotipov *V. nonalfalfae*
- Ovrednotiti genetsko variabilnost in virulenco pri izolatih iz evropskih hmeljišč

Vsi zastavljeni cilji so bili doseženi, seveda pa ni manjkalo vzponov in padcev, premagovanje dvomov in neprespanih noči, ki so običajni sopotniki izdelave vsakega doktorata. Sebastjan je zaključil doktorat leta 2004.

Z razvitimi AFLP markerji smo kot prva raziskovalna skupina uspeli razločiti blage in letalne patotipe *V. nonalfalfae* (Radišek in sod., 2003), poiskati letalno specifične AFLP markerje in na njihovi osnovi izdelati poenostavljen protokol za določanje letalnih patotipov (Radišek in sod., 2004), ki je bil objavljen tudi v obliki mednarodnega diagnostičnega standarda z angleškimi raziskovalci (Down s sod., 2007). Z AFLP smo uspeli primerjati virulenco med izolati *V. nonalfalfae* iz evropskih hmeljišč, kar je služilo tudi za ugotavljanje izvora letalnih izolatov, ki so se pojavili v slovenskih hmeljiščih (Radišek in sod., 2006).

Prvotno mnenje glede zadnjega je bilo, da imajo predvsem angleški in slovenski letalni izolati različen izvor ter da so se verjetno razvili iz blagih patotipov *V. nonalfalae*, ki so že dolgo prisotni v hmeljiščih, vendar so zaradi blagih bolezenskih znakov neopazni in gospodarsko manj pomembni. Podobno mnenje smo imeli tudi po izbruhu letalne hmeljeve uvelosti v nemških hmeljiščih in na osnovi tega smo nadalje gradili proučevanja med blagimi in letalni patotipi s proteomskimi in genomskimi pristopi. To mnenje je bilo podkrepljeno tudi s primerjalno proteomsko analizo micelijskih proteinov blagega in letalnega patotipa iz Slovenije in Anglije, ki je pokazala geografsko ločitev obeh skupin patotipov in jasne razlike v njihovi virulenci (Mandelc in sod., 2009).

Pri latentnem hmeljnem viroidu HLVd se je zgodba začela s problemi dr. Jelke Šuštar Vozlič s tkivnimi kulturami hmelja, kjer se je pojavil sum na prisotnost viroida. Za njegovo določitev je bilo potrebno privzeti metodo detekcije, ki je bila takrat uveljavljena v svetu (elektroforeza), vendar so bili prvi poskusi manj uspešni. Pozneje se je te problematike z veliko entuziazma lotila Vlasta Knapič z IHPS v okviru svojega magistrerja (Knapič in Javornik, 1999), vendar se je pozneje odločila za odhod na Ministrstvo za kmetijstvo in gozdarstvo RS (MKGP). Leta 2002 smo pridobili Ciljni raziskovalni projekt za razvoj metode za določevanje viroida, pri katerem sta Jernej in Sebastjan vzpostavila molekularno metodo RT-PCR in Dot-blot za rutinsko določanje HLVd (Jakše in sod., 2003). Problematika viroida, kot potencialnega povzročitelja bolezni, se je vrnila v naš laboratorij s pojavom hude zakrnelosti rastlin v hmeljiščih in z ugotavljanjem povzročitelja te bolezni. Trajalo je kar nekaj časa za identifikacijo povzročitelja te bolezni, potem pa se je uporabila novejša metoda določanja nukleotidnega zaporedja (NGS) in dopolnjujoče potrdilne metode, ki so razkrile in potrdile prisotnost novega viroida na hmelju CBCVd (slo. viroid razpokanosti skorje agrumov, angl. citrus bark cracking viroid), ki povzroča hudo viroidno zakrnelost rastlin hmelja (Jakše in sod., 2015). Hmelj predstavlja novega gostitelja za CBCVd, ki se je prenesel iz agrumov in povzroča zelo hudo neozdravljivo bolezen hmelja, zato so bila izdana tudi navodila in določeni uradni ukrepi za preprečevanje vnosa in širjenja te bolezni v Sloveniji (Radišek in sod., 2017). Določitev novega patogena v gostitelju je lahko zelo kompleksna naloga, včasih tudi neuspešna, vendar je možnost za uspešno rešitev problema večja ob poznavanju in uporabi novejših metodoloških pristopov.

Raziskovanje problematike viroidov uspešno nadaljujejo nekdanji mlajši sodelavci v sodelovanju s češkimi eksperti na tem področju.

6 TEMELJNE ŠTUDIJE INTERAKCIJ MED HMELJEM IN POVZROČITELJEM HMELJEVE UVELOSTI (*Vverticillium nonalfalfae*)

Namen teh študij je bil pridobiti osnovna znanja o mehanizmih interakcije med hmeljem in fitopatogeno glivo *V. nonalfalfae*, ki povzroča letalno obliko bolezni hmeljeve uvelosti. Vprašanja, ki smo si jih zastavili pri teh študijah, sta bili:

- ali lahko zaznamo hmeljne gene / proteine, ki se izrazijo ali utišajo po okužbi z *V. nonalfalfae* v primerjavi z neokuženi rastlinami, na osnovi česar bi lahko sklepali o njihovi vpletenosti v obrambo oz. občutljivost rastline na okužbo;
- ali je mogoče zaznati kakšne glivne proteine / gene v rastlini, ki bi lahko predstavljali njene potencialne virulentne dejavnike.

Za izvedbo teh študij je bilo najprej potrebno vzpostaviti eksperimentalni sistem okuževanja, za kar smo izbrali na *V. nonalfalfae* odporen (Wye Target - WT) in občutljiv (Celeia - CE) kultivar hmelja ter nato merili odzive v različnih tkivih (korenine in steblo) ter v različnih časovnih točkah okuženih in neokuženih rastlin. Za izvedbo tega obsežnega eksperimenta, ki smo ga večkrat ponavljali, je odlično poskrbel Sebastjan. Za merjenje odziva odpornih in neodpornih rastlin na okužbo smo izbrali več globalnih pristopov:

- transkriptomiko – to je analiza mRNA molekul, ki so prvi produkt genov; izbrali smo tri različne metode: cDNA-AFLP, RNA-seq in qRT-PCR posameznih genov,
- proteomiko – to je analiza proteinov, ki so končni produkt genov; izbrali smo 2D-DIGE povezano s sekvenciranjem proteinov.

Za vrednotenje rezultatov merjenja odziva pa smo uporabili različna bioinformacijska orodja.

Kot številne ekspresijske analize tudi naše niso dale jasnih odgovorov. Rezultati teh študij se zaenkrat ne skladajo preveč dobro, predvsem pa ne ponujajo dokončnega odgovora, kateri geni WT bi lahko bili vključeni v obrambno reakcijo, tako da bo za ta odgovor potrebno še kar nekaj proučevanj. Proteomska študija na koreninah WT in CE ugotavlja akumulacijo genov za obrambo v občutljivem kultivarju CE in ne zazna nobenih infekcijsko specifičnih sprememb v odpornem kultivarju WT, s čimer sklepamo, da je pri WT konstitutivna in ne inducirana odpornost (Mandelc in sod., 2013). Podobne zaključke glede ekspresije genov ponuja tudi globalna študija 23.755 izraženih genskih modelov v koreninah in stebelu v WT in CE, merjenih v štirih različnih časovnih točkah po okuževanju (Progar in sod., 2017), medtem ko študija qRT-PCR posameznih (9) diferencialno izraženih genov povezanih s splošnim imunskim odzivom ugotavlja, da so višje izraženi ti geni v WT kot v CE (Švara in sod., 2019). Pri študiju ekspresije genov s

cDNA-AFLP pa je podana ugotovite, da so značilni geni za odpornostni odgovor induciranih pri obeh kultivarjih, izpostavlja pa močno izražene gene v odpornem kultivarju WT in utišane v CE, to je genov, ki so vpleteni v razgradnjo proteinov (Cregeen in sod., 2015). Zanimivo je, da sta v zadnjih dveh študijah predstavljena precej različna kolonizacijska vzorca glive pri WT in CE, kar bi si zaslužilo vsaj ustrezno interpretacijo, še bolje pa bi bilo ponoviti poskus in primerjati kolonizacijo glive rastlin WT in CE, določeno z qRT-PCR in z morfološkimi prerezi trt obeh kultivarjev.

Je pa zadnja študija Cregeen in sod. (2015) identificirala tri glivne gene v transkriptomu hmelja, od katerih je eden (CBD) kazal zelo visoko ekspresijo posebno v občutljivem kultivarju CE. Zaradi visoke ekspresije je ta *V. nonalfalfae* gen / protein pritegnil našo pozornost in smo ga uvrstili v analize karakterizacije glivnih efektorjev (Volk in sod., 2019).

Na tem mestu velja predstaviti tudi eno naših prvih proteomskih študij, to je študije proteinov v ksilemskem soku okuženih rastlin hmelja. Leta 2005 smo namreč pridobili projekt za študijo proteinov in z nabavo nove opreme smo vzpostavili proteomski laboratorij pri katerem ima največ zaslug dr. Slavko Mandelc, ki je temeljito obvladal vse skrivnosti proteomske analize. Pri tej prvi proteomski analizi je Slavko na IHPS dneve in dneve potrpežljivo po kapljicah zbiral ksilemski sok z *V. nonalfalfae* okuženih rastlin Celeie. Proteine ksilema je analiziral z 2D elektroforezo in diferencialno izražene proteine smo nato poslali na identifikacijo v tujino, ki pa je bila bolj ali manj ponesrečena. Vendar smo le prejeli nekaj rezultatov in pozneje se je izkazalo, da so trije od identificiranih proteinov ksilemskega soka proteini glive *V. nonalfalfae*. Dva od njih smo v nadaljnjih analizah dokazali kot prve virulentne dejavnike *V. nonalfalfae* (Flajšman in sod., 2016).

Iz študij interakcij med hmeljem in povzročiteljem hmeljeve uvelosti je Sara Cregeen diplomirala 2010 (mentor Jernej Jakše), Švara Anže je zaključil M.Sc. diplomu 2016 (mentorica Nataša Štajner), Vasja Progar je doktoriral 2017, Stanislav Mandelc pa je vključno še z dvema tematikama doktoriral leta 2010.

7 GENOMSKE IN PROTEOMSKE ŠTUDIJE VIRULENTNIH DEJAVNIKOV POVZROČITELJA HMELJEVE UVELOSTI (*V. nonalfalfae*)

Pri iskanju odgovorov za razloge povišane virulence letalnega (L) patotipa v primerjavi z blagim (B) patotipom *V. nonalfalfae* smo, poleg domneve, da so se letalni patotipi razvili iz blagih s privzemom virulentnih dejavnikov, izhajali iz sledečih predhodnih rezultatov:

- Izolati obeh patotipov iz geografsko različnih območij se ne ločijo po morfologiji.
- Izolati obeh patotipov iz geografsko različnih območij se ločijo
 - o v virulenci (Radišek in sod., 2003),
 - o na DNA nivoju (Radišek in sod., 2006),
 - o na proteomskem nivoju (Mandelc in sod., 2009).

Za nadaljnja proučevanja iskanja odgovorov za razloge povišane virulence letalnega patotipa smo se odločili za primerjalno proteomsko in genomsko analizo treh blagih in treh letalnih patotipov *V. nonalfalfae* iz Slovenije, Anglije in Nemčije.

Primerjalna proteomska analiza sekretornih proteinov pridobljenih iz izolatov gojenih na mediju podobnemu rastlinskemu ksilemskemu soku je sicer razkrila arzenal encimov za razgradnjo celične stene in potencialne efektorje, ki so bistveni za procese patogeneze in tvorijo sedaj pomemben nabor sekretornih proteinov *V. nonalfalfae*. Nismo pa našli skupnih proteinov prisotnih v vseh treh letalnih patotipih in odsotnih v blagih patotipih. Ti rezultati so nakazovali, da povečana virulenca vseh treh letalnih izolatov nima veliko skupnega glede na blage izolate in da je pomembnejša povišana ekspresija specifične skupine proteinov posameznega letalnega izolata (Mandelc in Javornik, 2015). To je bilo sicer rahlo razočaranje, vendar smo bili mnenja, da ima proteomska analiza 2D-DIGE verjetno prenizko resolucijo zajemanja globalne vsebnosti proteinov.

Nekoliko več sreče smo imeli pri genomski analizi, v katero smo prav tako vključili tri letalne (L) in tri blage (B) izolate in sekvencirali njihove celotne genome ter naredili transkriptom domačih izolatov *V. nonalfalfae* (Rec in T 2), gojenih na mediju podobnemu rastlinskemu ksilemskemu soku (Jakše in sod., 2018). Ta pristop, ki vključuje vrsto (zapletenih) bioinformacijskih postopkov, je bil velik zalogaj za začetnike, vendar smo z dobro zgodbo in vztrajanjem tekom obdelave in analize podatkov ter s pomočjo bolj izkušenih sodelavcev pridobili dragocena znanja in veščine ter se opremili s prepotrebnimi bioinformacijskimi orodji, ki so, širše gledano, prispevala k premiku vsaj dela raziskovalne skupine na drugačen pristop k raziskovalni problematiki. Pri tem delu je bil najbolj angažiran dr. Jernej Jakše, ki se je tekom procesa razvil v dobrega bioinformatika.

In kaj nam je pokazala primerjalna analiza treh L in treh B izolatov *V. nonalfalfae* na ravni genomov? Poleg množice bioinformacijskih podatkov, ki so bogat vir informacij za različna proučevanja in so urejeni v bioinformacijskih platformah (JBrowner in Marton in sod., 2018), smo s primerjalno genomsko analizo določili letalno specifične regije, prisotne samo v genomih letalnih izolatov in odsotne v blagih izolatih.

Najbolj zanimivo je, da so si bile te letalno specifične regije med seboj zelo podobne v nukleotidnem zaporedju v vseh treh analiziranih genomih letalnih izolatov. To razkritje postavlja pod vprašaj našo predhodno domnevo o različnem izvoru slovenskih, angleških in nemških letalnih izolatov *V. nonalfalfae*. Namreč, zelo mala je verjetnost, da bi se isti mutacijski dogodki, to je razvoj nukleotidno podobnih regij genoma, dogodili v treh različnih geografskih regijah in v treh različnih časovnih obdobjih. Iz tega je mogoče sklepati, da se je verjetno letalni patotip *V. nonalfalfae* prenesel z Anglije, kjer se je prvič pojavil leta 1933, v Slovenijo (izbruh letalne hmeljeve uvelosti 1997), v Nemčijo (2005) in pozneje na Češkem, najverjetneje s sadilnim materialom. Vsekakor fitopatologi, ki delajo na hmelju, ne marajo takšnih špekulacij.

Naše raziskave pa so pokazale tudi možnosti nastanka L patotipa. V teh letalno specifičnih regijah genoma smo namreč zasledili zaporedja genov, ki so sovpadala z zaporedji genov druge fitopatogene glive iz rodu *Verticillium*, *V. dahliae*. To nakazuje na možnost horizontalnega prenosa genov oz. na možnost, da je blag patotip *V. nonalfalfae* privzel gene iz *V. dahliae* (preko, pri nitastih glivah znanega paraseksualnega ciklusa) in tako povečal svojo virulenco, ter se torej spremenil v letalni patotip. Vendar je to le domneva, ki bi jo bilo potrebno eksperimentalno dokazati, kar smo tudi načrtovali. Žal pa to delo, ki bi lahko rezultiralo v zelo izvirnih dosežkih, v tem trenutku ostaja nedokončano.

Pri analizi transkriptoma domačega L in B patotipa pa smo na samem začetku naše genomske bioinformacijske avanture naključno izbrali 8 najvišje izraženih genov oz. genskih modelov v transkriptomu L patotipa iz letalno specifične regije genoma, ki smo jih nato vključili v mutacijsko analizo za potrditev njihove vpletenosti v virulenco.

8 KARAKTERIZACIJA POTENCIALNIH EFEKTORSKIH PROTEINOV POVEZANIH Z VIRULENCO *V. nonalfalfae*

Za uspešno okužbo in kolonizacijo rastlin ter razvoj bolezenskih znamenj patogene glive izločajo tako imenovane virulentne dejavnike, med katere uvrščamo encime za razgradnjo celične stene, toksine in proteinske molekule imenovane efektorji, ki zavrejo ali modulirajo imunski odziv gostiteljske rastline ali pa jih rastlina prepozna in sproži obrambni odziv (avirulenčni efektorji). Za efektorje je najbolj

značilno, da se izražajo v rastlini in da so manjše molekule brez značilnih proteinskih struktur, manj pa je znanega o mehanizmih njihovega delovanja, čeprav v zadnjem času na tem področju potekajo številne raziskave. Mnenja so, da bi identifikacija efektorjev in odkrivanje mehanizmov njihove virulentnosti lahko omogočila postavitev učinkovitih strategij zaščite rastlin pred škodljivimi organizmi.

V našem primeru smo si za odkrivanja efektorjev *V. nonalfalfae* postavili sledeče kriterije:

- Izražanje glivnega proteina v okuženi hmeljni rastlini ali v gojišču podobnemu ksilemskemu soku

Iz predhodnih raziskav se je nabralo kar nekaj kandidatov: 2 proteina iz ksilemskega soka (Mandelc, 2010), CBD protein iz transkriptoma 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).

- Mutacijska analiza kandidatnih efektorjev

Za nedvoumno potrditev virulentnih lastnosti efektorjev smo v letalnem patotipu *V. nonalfalfae* mutirali (izbili) kandidatni efektorski gen, z mutirano glivo okužili rastline hmelja in spremljali razvoj bolezenskih znamenj. V primeru, da so se pri mutantu pojavila bolezenska znamenja v manjšem obsegu kot pri divjem tipu glive, smo sklepali o vpletenosti kandidatnega efektorja v virulenco *V. nonalfalfae*. Mutacijsko analizo, ki je zapleten postopek, je v našem laboratoriju uspešno vzpostavil dr. Marko Flajšman in je za 16 kandidatnih genov pripravil več neodvisnih mutantov (Flajšman, 2016), ki so bili testirani na občutljivih rastlinah Celeie pod budnim nadzorom Sebastjana. Za 7 mutantov se je izkazalo, da imajo znižano virulenco, en mutant je imel povišano virulenco v primerjavi z divjim tipom (verjetno avirulentni gen), ostali mutanti pa so povzročili podobne simptome na rastlini kot divji tip glive.

Proteina iz ksilemskega soka (peroksidaza in majhen sekretorni protein SSP) sta nedvoumno pokazala vpletenost v virulenco in sta prva identificirana virulentna dejavnika pri glivi *V. nonalfalfae* (Flajšman in sod., 2016). Ostalih pet kandidatnih genov pa še čaka na ustrezno nadaljnjo obravnavo.

- Biokemijska karakterizacija kandidatnih efektorjev

Nadaljnja stopnja analize kandidatnih efektorjev je njihova biokemijska karakterizacija (interakcije z drugimi molekulami, lokalizacija v celici, struktura molekule, itd.) z namenom osvetliti mehanizme delovanja efektorja v rastlini. To delo uspešno izvaja kolegica dr. Sabina Berne.

Do sedaj smo analizirali glivni CBD protein iz transkriptoma hmelja, katerega mutant sicer ni kazal zmanjšane virulence, vendar je bil zanimiv zaradi drugih lastnosti. Po obsežni karakterizaciji CBD proteina iz *V. nonalfalfae*, ki jo je pod somentorstvom Sabine izvajala mlada raziskovalka Helena Volk, se je izkazalo, da je to nov efektorski protein v fitopatogenih glivah, ki ima sposobnost vezave hitina v rastlini po okužbi in zaščiti glivo pred rastlinskimi hitinazami ter zavre s hitinom inducirano rastlinsko imunost (Volk in sod., 2019). Objava je bila deležna posebne pozornosti v ugledni fitopatološki reviji.

Za SSP, ki se trenutno intenzivno analizira, pa se nakazuje, da se veže z enim lipidom v rastlinski membrani in tvori pore v njej ter tako omogoča vstop drugim efektorjem v celico. Upajmo, da bodo deležni ustrezne karakterizacije tudi ostali identificirani kandidatni efektorji *V. nonalfalfae*.

Na gornji tematiki, h kateri so doprinesli nova znanja in vzpostavili nove metode, so doktorirali Marko Flajšman (2016), Kristina Marton (2018) in Helena Volk (2019).

9 ZAKLJUČEK

Predstavljen je moj osebni pogled in spomini na preteklo delo pri genetiki hmelja in njegovih škodljivih organizmih. V te raziskave je bilo vključenih veliko sodelavcev in sodelavk, ki so doprinesli k rezultatom dela. Opravičujem se vsem, ki jih nisem posebej izpostavila ali omenila, s čimer ne zmanjšujem njihovega vrednega prispevka. Iskrena hvala vsem za zanimivo in lepo obdobje!

10 VIRI

- Cregeen S., Radišek S., Mandelc S., Turk B., Štajner N., Jakše J., Javornik B. 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*. 2015; 33: 689-704.
- Čerenak A., Jakše J., Javornik B. Application of sex-linked marker in hop (*Humulus lupulus* L.) breeding. V: 2nd Congress of Genetic Society of Slovenia with International Participation 2000, Bled, Congress Proceedings. 2000; 371-372.
- Čerenak A., C. Analysis of DNA markers for damson hop aphid resistance in hop. *Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo*. 2002; 79:361-369.
- Čerenak A., Jakše J., Javornik B. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2003; 62: 1-7.
- Čerenak A., Šatović Z., Javornik B. Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content. *Genome*. 2006; 49(5):485-494.

- Čerenak A., Kolenc Z., Sehur P., Whittock S., Koutoulis A., Beatson R., Buck E., Javornik B., Škof S., Jakše J. New male specific markers for hop and application in breeding program. *Scientific Reports*. 2019; 9:1-9.
- Darby P. Single gene traits in hop breeding. In: *Proceedings of Scientific Commission of the International Hop Growers Convention IHGC*. Canterbury, UK. 2001; 76–80.
- Down G., Barbara D., Radišek S. *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. *Bulletin OEPP*. 2007; 37: 528-535.
- Flajšman M. Določanje virulentnih dejavnikov fitopatogene glive *Verticillium albo-atrum* z mutacijsko analizo : doktorska disertacija. 2016; pp 139.
- Flajšman M., Mandelc S., Radišek S., Štajner N., Jakše J., Košmelj K., Javornik, B. Identification of novel virulence - associated proteins secreted to xylem by *Verticillium nonalfalfae* during colonization of hop plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2016; 29: 362-373.
- Henning J.A., Steiner J.J., Hummer K.E. Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA. *Crop Sci*. 2003; 44:411-417.
- Howard E., Whittock S., Jakše J., Carling J., Matthews P., Probasco G., Henning J.A., Darby P., Čerenak A., Javornik B., Kilian A., Koutoulis A. High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT). *Theoretical and Applied Genetics* 2011; 122: 1265-1280.
- Jakše J., Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B. Identification of hop cultivars by RAPD markers. V: *Proceedings of the International Colloquium IPBA*, Rogla, Slovenia. 1994; 147-151.
- Jakše J., Čerenak A., Javornik B. 2000. Molekularni markerji pri proučevanju genskih virov hmelja (*Humulus lupulus* L.) V: *Novi izzivi v poljedelstvu 2000*. Zbornik simpozija. Moravske Toplice. 2000; 144-148.
- Jakše J., Javornik B. High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*. 2001; 19: 217-226.
- Jakše J., Kindlhofer K., Javornik B. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome*. 2001; 44: 773-782
- Jakše J., Bandelj-Mavsar D., Javornik B. Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Ecology Notes*. 2002; 2-4:544-546
- Jakše J., Radišek S., Javornik B. Detection of hop latent viroid (HLVd) using dot-blot hybridisation assay and RT-PCR. V: *3rd Congress of Genetic Society of Slovenia with International Participation 2003*, Bled, Congress Proceedings. 2003; 63-65.
- Jakše J., Šatovič Z., Javornik B. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome*. 2004; 47:889-899
- Jakše J., Luthar Z., Javornik B. New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L. *Molecular Ecology Resources*- 2008; 8: 769-772.
- Jakše J., Štajner N., Luthar Z., Jeltsch J-M., Javornik B. Development of transcript-associated microsatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*. 2011; 28: 227-239.
- Jakše J., Čerenak A., Radišek S., Šatovič Z., Luthar Z., Javornik B. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2013; 126:1431-1443.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*. 2015; 64: 831-842.

- Jakše J., Jelen V., Radišek S., De Jong R., Mandelc S., Majer A., Curk T., Zupan B., Thomma B. P. H. J., Javornik B. Genome sequence of a lethal strain of xylem-invading *Verticillium nonalfalfae*. *Genome Announcements*. 2018; 6 (2): 1-2.
JBrower: <http://vert.fri.uni-lj.si/browser>
- Knapič V., Javornik B. Viroidi v slovenskem hmelju. *Hmeljar*. 1999; 68: 43-47.
- Kozjak P., Jakše J., Javornik B. Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogues from hop *Humulus lupulus* L. *Plant Science*. 2009; 176: 775-782.
- Kralj D., Zupanec J., Vasilj Đ., Kralj S., Pšeničnik J. Variability of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Institute of Brewing*. 1991; 97:197-206.
- Majer A., Javornik B., Čerenak A., Jakše J. Development of novel EST-derived resistance gene markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*. 2014; 33: 61-74.
- Mandelc S., Radišek S., Jamnik P., Javornik B. Comparison of mycelial proteomes of two *Verticillium albo-atrum* pathotypes from hop. *European Journal of Plant Pathology*. 2009; 25: 159-171.
- Mandelc S. Proteomska analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) in diferencialno izraženih proteinov v hmelju po okužbi s patotipom PG2 *Verticillium albo-atrum*. Doktorska disertacija. 2010; 98.
- Mandelc S., Timperman I., Radišek S., Devreese B., Samyn B., Javornik B. Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013; 68: 23-31.
- Mandelc S., Javornik B. The secretome of vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum* in simulated xylem fluid. *Proteomics*. 2015; 5: 787-797.
- Marton K., Flajšman M., Radišek S., Košmelj K., Jakše J., Javornik B., Berne S. Comprehensive analysis of *Verticillium nonalfalfae* in silico secretome uncovers putative effector proteins expressed during hop invasion. *PloS one*. 2018; 13: 1-28.
- Patzak J. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*. 2001; 121: 9-18.
- Progar V., Jakše J., Štajner N., Radišek S., Javornik B., Berne S. Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports*. 2017; 36: 1599-1613.
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*). *Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo*. 2001; 77:139-146.
- Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease*. 2003; 87:633-638
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*. 2004; 88:1115-1122.
- Radišek S., (avtor, fotograf, urednik), Guček T., Leskovšek G., Benko-Beloglavec A., Jakše J., Javornik B. Huda viroidna zakrnelost hmelja. *Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije*, 2017.
- Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G., Seigner E. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hops, *Humulus lupulus*, as determined

- by amplification fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breeding*. 2000; 119: 257-233.
- Small E. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*. 1978; 3:37-76.
- Stevens J.F., Taylor A.W., Nickerson G.B., Ivancic M., Henning J., Hanunold A., Deinzer M.L. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry*. 2000; 53:759-775
- Škof S., Čerenak A., Jakše J., Bohanec B., Javornik B. Ploidy and sex expression in monoecious hop (*Humulus lupulus*). *Botany*. 2012; 90: 617-626.
- Štajner N., Javornik B., Bandelj-Mavsar D. Protocol used for AFLP by automatic laser fluorescence analysis. *Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo*. 2003; 81:39-45.
- Štajner N., Jakše J., Kozjak P., Javornik B. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*. 2005; 168:213-221.
- Šuštar-Vozlič J., Javornik B. Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding*. 1999; 118: 75-181.
- Švara A., Jakše J., Radišek S., Javornik B., Štajner N. Temporal and spatial assessment of defence responses in resistant and susceptible hop cultivars during infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Journal of Plant Physiology*. 2019; 240: 1-12.
- Volk H., Marton K., Flajšman M., Radišek S., Tian H., Hein I., Podlipnik Č., Thomma B., Košmelj K., Javornik B., Berne S. Chitin binding protein of *Verticillium nonalfalfae* disguises fungus from plant chitinases and suppresses chitin-triggered host immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2019; 32: 1378-1390.

**DOLOČANJE PERSPEKTIVNIH STARŠEVSKIH KOMBINACIJ
KRIŽANJ HMELJA (*Humulus lupulus* L.) ZA POVEČANJE ODPORNOSTI
POTOMCEV NA HMELJEVO PEPELOVKO IN HMELJEVO
PERONOSPORO**

Martina KUNST¹, Anton IVANČIČ² in Andreja ČERENAK³

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 23. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 5. 12. 2019

Izveček

Žlahtnjenje rastlin je ena izmed najpomembnejših gospodarsko-kmetijskih dejavnosti. V prispevku je prikazan del žlahtniteljskega programa Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije oz. selekcijo sejančkov hmelja (*Humulus lupulus* L.) v rastlinjaku na hmeljevo pepelovko (*Podosphaera macularis*) in hmeljevo peronosporo (*Pseudoperonospora humuli*) iz let 2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2014, 2016 in 2018. V raziskavi je bilo izpostavljenih tudi nekaj superiornih maternih in očetnih komponent ter 55 najboljših kombinacij križanj, kar bi lahko predstavljalo zelo koristno in praktično informacijo za nadaljnje žlahtnjenje hmelja v smeri odpornih sort na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo.

Ključne besede: sejančki hmelja, odpornost, žlahtnjenje, hmeljeva pepelovka, hmeljeva peronospora

**DETERMINATION OF SUPERIOR PARENTAL HOP (*Humulus lupulus* L.)
CROSSING COMBINATIONS FOR ACHIEVING HIGHER PROGENY
RESISTANCE TO POWDERY MILDEW AND DOWNY MILDEW**

Abstract

Genetic breeding is one of the most important agro-economical activities. In the article, a part of the breeding program at the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing, associated with the selection of hop (*Humulus lupulus* L.) seedlings for resistance to powdery mildew (*Podosphaera macularis*) and downy mildew (*Pseudoperonospora humuli*) in the years 2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2014, 2016 and 2018 is presented. As a result of the research, some superior female and male parental components were exposed, together with 55 most promising crossing

¹ Študentka, e-naslov: klincmartina@gmail.com

² Prof. dr., Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Katedra za genetiko, Pivola 10, SI-2000 Maribor, e-naslov: anton.ivancic@um.si

³ Izr. prof. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za rastline, tla in okolje, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: andreja.cerenak@ihps.si

combinations, which could represent a highly valuable information for further practical work associated with the improvement of resistance to powdery and downy mildews.

Key words: hop seedlings, resistance, breeding, powdery mildew, downy mildew

1 UVOD

Program vzgoje odpornih sort hmelja na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) je, poleg visoke kakovosti in količine pridelka, osredotočen predvsem na odpornost na ekonomsko najpomembnejše škodljivce in bolezni, kamor spadata tudi hmeljeva pepelovka (*Podosphaera macularis* Wallr. U. Braun & Taukam) in hmeljeva peronospora (*Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G. W. Wils.) (Radišek in sod., 2007). Za vzgojo in registracijo nove sorte hmelja je potrebno od deset do petnajst let sistematičnega žlahtniteljskega dela (Haunold, 1980). Slovenski žlahtnitelji hmelja so v zadnjih šestdesetih letih razvili kar 21 različnih slovenskih sort (Slovenska sortna..., 2019). Danes je z njimi zasajenih nad 98 % slovenskih hmeljišč, na katerih največji delež predstavlja sorta Aurora (60 %) (Čerenak in sod., 2019b). Številni žlahtniteljski cilji, kot je npr. odpornost na bolezni in škodljivce, so velikokrat težje dosegljivi. Ustrezne gene lahko najdemo v dednini že obstoječih sort in jih s klasičnim križanjem vnesemo v potomce (Bohanec, 2004). Klasičnemu žlahtnjenju so se v zadnjih letih pridružile številne nove metode molekularne genetike, ki skrajšujejo čas vzgoje novih sort (Čerenak in sod., 2019a; Javornik, 2005).

Izbiro ustrezne metode žlahtnjenja narekujejo specifične lastnosti hmeljne rastline. Zaradi dvodomnosti so hmeljne rastline genetsko zelo različne (heterozigotne). Potomstvo rastlin, vzgojenih iz semena, je tudi močno raznoliko (heterogeno). Hmelj na pridelovalnih nasadih razmnožujejo vegetativno, s sadikami in ne s semenom, da se obdrži ista genetska struktura rastlin in z njo povezana homogenost populacije (Šuštar-Vozlič in sod., 2002). Pogosto uporabljena metoda žlahtnjenja v Sloveniji je rekurentna selekcija, ki je v osnovi usmerjena v izboljšavo populacij. Ta predstavlja postopek žlahtnjenja v ciklikih, katerega cilj je povečati frekvenco genov, ki imajo pozitiven vpliv na oblikovanje večjega števila željenih lastnosti. V vsakem ciklu se odberejo najboljši osebki, ki se križajo med seboj, iz nastalega potomstva pa nastane populacija novega cikla (Ivančič, 2002). S tem postopkom so ozko povezana ciljna križanja, s katerimi sistematično izboljšujemo ključne lastnosti kot so to npr. kvaliteta pridelka, odpornost proti boleznim ali neugodnim abiotskim dejavnikom (Neve, 1991; Oset in sod., 2009).

Križanja na IHPS se izvajajo na polju in temeljijo na ročnem oprraševanju ženskih socvetij izbranih maternih komponent. Naslednje leto v kontroliranih razmerah v rastlinjakih poteka vzgoja sejančkov hmelja iz semen. Sledi selekcija na hmeljevo

pepelovko, pri kateri se odberejo odporne rastline, čemur sledi umetna okužba sejančkov s spori hmeljeve peronospore. Izločijo se občutljivi genotipi. Vsem pozitivno odbranim križancem po obeh selekcijah na bolezen se z molekulsko metodo določi spol (Čerenak in sod., 2019b; Čerenak in sod., 2015).

1.1 Hmeljeva pepelovka in selekcija

Žlahtnjenje rastlin na odpornost proti hmeljevi pepelovki (*Podosphaera macularis*) se je začelo razvijati v zgodnjem obdobju 20. st. in predstavlja pomemben cilj žlahtniteljskih programov po svetu (Neve, 1991). Hmeljeva pepelovka je ena izmed najstarejših bolezni hmelja, ki je bila opisana že pred 400 leti. Pojav in obseg bolezni je močno odvisen od vremenskih razmer in odpornosti posameznih sort na to bolezen (Darby, 2005). Tipična bolezenska znamenja se na listih opazi v obliki belih prašnih kolonij. Najbolj nevarne so okužbe cvetov in razvijajočih storžkov, saj povzročijo izrazite deformacije in zakrnelost tkiva ter lahko popolnoma uničijo pridelek (Hmelj, 2019; Radišek in Oset Luskar, 2012). Med glivo in hmeljno rastlino je potrjena »gen za gen« interakcija, v kateri so odkriti različni geni odpornosti (RB, R1, R2, R3, R4, R5, R6; RBu) in njim ustrezni patotipi (Čerenak in sod., 2009; Kozjak in Javornik, 2008; Neve, 1991; Wolfenbarger, 2016). Selekcijo na hmeljevo pepelovko izvajajo na mladih sejančkih, saj se R geni izražajo tudi v mladem tkivu. Kot vir okužbe se uporabi več izolatov, dobljenih iz nabranih storžkov v okuženih hmeljiščih na različnih območjih v prejšnjem letu. Izolat se namnoži na hmeljnih rastlinah občutljivih sort, ki so posajene v loncih. V zadnjih letih se sejančke okužuje s suspenzijo spor, kar zagotavlja enakomernije razporeditve in koncentracije inokuluma. Približno po 2-3 tednih sledi selekcija in ocenjevanje sejančkov (Radišek in sod., 2007). Družine in posamezne sejančke ocenijo glede na delež okuženosti listne površine s hmeljevo pepelovko z lestvico od 0 do 4 (0 = 0 %, 1 = ≤ 10 %, 2 = 11-30 %, 3 = 31-60 %, 4 = > 60 %). Vse rastline ocenjene s 3 ali 4 se uničijo, z ostalimi pa se postopek nadaljuje. Selekcionirane rastline posadijo v lončke s svežim substratom in ker ni povsem odpornih genotipov, se po selekciji vsa populacija križancev poškropi s fungicidi (Čerenak in sod., 2019b). V študiji iz leta 2009 je bilo ugotovljeno, da občutljive sorte na hmeljevo pepelovko večinoma vključujejo severnoameriško dednino, medtem ko odpornejše sorte izvirajo iz evropske dednine (Čerenak in sod., 2009).

1.2 Hmeljeva peronospora in selekcija

Hmeljevo peronosporo so prvič identificirali na Japonskem leta 1905, po letu 1930 je postala svetovni problem (Woods, 2016). Povzročajo jo plesnivka (oomiceta) *Pseudoperonospora humuli*. Bolezen lahko okuži vsa rastlinska tkiva in se vsako leto pojavlja pri večini sort. Prezimatev in ohranjanje ji omogoča micelij v okuženi koreniki, ki je spomladi vir primarne okužbe. Povzročajo lokalizirane okužbe listja, cvetov in storžkov ter sistemske okužbe, katerih rezultat so prizadeti poganjki

(kuštravci) in propadanje koreninskega sistema. Rastlina s prizadeto koreniko lahko daje tudi do 30 % nižji pridelek, v primeru občutljivih sort pa prihaja do propadanja in odmiranja celotne rastline (Neve, 1991; Radišek in Oset Luskar, 2012; Radišek in sod., 2012). Na IHPS se selekcija na hmeljevo peronosporo izvaja na sejančkih po končani selekciji na hmeljevo pepelovko. Vir okužbe predstavljajo sistemsko okuženi primarni in sekundarni poganjki (kuštravci), ki se spomladi naberejo v hmeljiščih. Sporangije sperejo z listov s sterilno vodo in nato suspenzijo umerijo s Thoma števno komoro (Brand GMBH+CO KG; Nemčija) na koncentracijo 50.000 sporangijev/ml. S tako pripravljenim inokulumom umetno okužijo sejančke hmelja. Selekcija se izvede po razvitju terminalnih kuštravcev, nekje po 14-21 dneh. Vse sejančke z razvitimi kuštravci ali visoko okuženostjo listov izločijo, odpornost družin sejančkov pa se zabeleži kot odstotek selekcioniranih rastlin. Pri rastlinah so znani različni tipi genetske odpornosti na oomicete, ki so določeni na podvrstnem ali sortnem nivoju (specifična odpornost sorte na sev), ali na vrstnem oz. rodovnem nivoju (negostiteljska ali nespecifična odpornost) (Javornik, 2008; Leach, 2014; Rozman, 2003;). Znana je različna izražena odpornosti hmeljnega tkiva, saj so nekatere sorte precej odporne na sistematične infekcije korenike in hkrati občutljive na okužbo storžkov ali obratno (Čerenak in sod., 2019a; Radišek in sod., 2007). V primerjavi z odpornostjo sort iz Amerike, Japonske, Avstralije in Nove Zelandije je visoka stopnja izražene odpornosti na hmeljevo peronosporo bolj povezana s sortami z evropsko dednino (Woods, 2016). Japonski hmelj, *Humulus japonicus*, sorodnik *H. lupulus*, je skoraj v celoti odporen na hmeljevo peronosporo (Hoerner, 1940).

2 MATERIAL IN METODE

Iz podatkovne baze IHPS smo dobili številne podatke o križancih, ki so nastali v procesu žlahtnjenja hmelja v zadnjih dveh desetletjih. Cilj žlahtniteljskega dela so bila križanja, usmerjena v pridobivanje visoko produktivnih, visoko kvalitetnih in na boleznih odpornih genotipov in ne oblikovanje potomstva z namenom statistične obdelave. Obravnavali smo podatke iz let 2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2014, 2016, 2018 in jih uredili tako, da so ustrezali za osnovno statistično obdelavo in so primerni za nadaljnje statistične obravnave. Prikazali smo temeljne razlike/povezanost posameznih opazovanih lastnosti hmelja v fazi sejančka med leti in določili perspektivne kombinacije križanj, ki bi jih bilo smiselno uporabiti v procesu žlahtnjenja s ciljem pridobivanja odpornejših sort hmelja.

Podatke smo analizirali v programskem paketu Excel 2013. Med leti je bilo zelo različno število uporabljenih semen in s tem povezano tudi število sejančkov, ki so bili vključeni v selekcijski program. Iz danih podatkov smo najprej izpostavili vsa križanja, ki so bila vezana na iste moške komponente, enako smo storili za kombinacije križanj ženske komponente. Nato smo združili iste kombinacije križanj moškega in ženskega genotipa, ki smo jih skupaj z njihovi potomci označili

za družino. Za celotno populacijo različnih kombinacij križanj, posamezne ženske in moške komponente ter družine smo izračunali osnovne statistične parametre kot so srednja vrednost, minimum, maximum, standardna deviacija in koeficient variabilnosti. Z uporabo Pearsonovega koeficienta smo določili linearno korelacijo med opazovanimi parametri. Izračunali smo tudi odstotke preživelih sejančkov po selekcijah na omenjeni bolezni za določanje superiornih kombinacij križanj. V članku smo predstavili zgolj najpomembnejše rezultate in izsledke analize podatkov iz skupnih in posameznih let povezanih s selekcijo hmeljevih sejančkov na odpornost na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo, koristnih za nadaljnje žlahtnjenje.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

V osmih opazovanih letih je bilo v statistično raziskavo vključenih 140.882 sejančkov, potomcev več kot 1000 različnih kombinacij križanj hmelja. Po tretiranju s hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo je preživelo 46.297 sejančkov, kar predstavlja 33 % delež vseh preživelih sejančkov dane populacije. Variabilnost je zelo visoka pri vseh preučevanih parametrih (preglednica 1), kar pomeni, da je genetska pestrost zelo velika in s tem povezana količina genetskega materiala, ki omogoča prilagoditev rastlin na različne okoljske dejavnike (spreminjanje klimatskih razmer, pojav novih bolezni in škodljivcev, ipd.). Želimo čim več preživelih sejančkov, potomcev izbrane družine ($\text{♀ A} \times \text{B} \text{♂}$) ali posamezne matrne/očetne komponente, ki ima izraženo nizko variabilnost kot odziv na omenjeni bolezni. Ne moremo pa trditi, da nižja variabilnost pomeni večjo toleranco na dan patogen, večja pa občutljivost.

Rezultati korelacijske analize iz preglednice 2 so pričakovani in statistično značilni. Večje je število sejančkov, večja je možnost, da preživi večje število sejančkov po selekciji na omenjeni bolezni. Večje je število semen, več je tudi vzgojenih sejančkov.

Preglednica 1: Osnovna deskriptivna statistika, povezana z variabilnostjo celotne analizirane populacije sejančkov hmelja v letih 2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2014, 2016, 2018

	N	Min.	Maks.	Sr. vr.	St. dev.	C.V. (%)
Št. sejančkov	140882	0	1144	118,190	147,695	124,965
Sel. hl. pep.	83303	0	724	69,885	88,504	126,642
Sel. hl. per.	46297	0	351	38,840	46,980	120,960

(N - vsota sejančkov; Min. – minimum; Maks. – maksimum; Sr. vr. – srednja vrednost; C. V. - koeficient variabilnosti; Št. sejančkov – število sejančkov; Sel. hl. pep. – selekcija na hmeljevo pepelovko; Sel. hl. per. – selekcija na hmeljevo peronosporo)

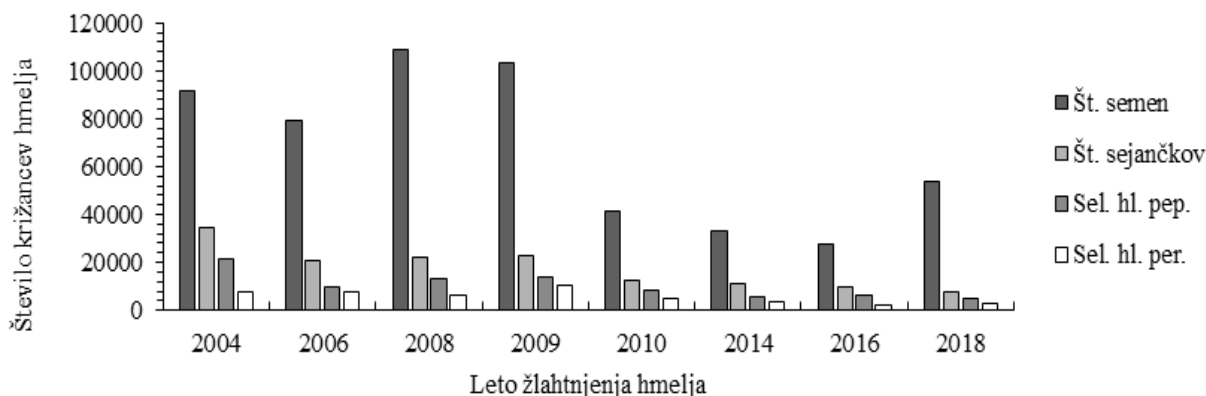
Preglednica 2: Korelacijska povezanost med opazovanimi kvantitativnimi lastnostmi celotne analizirane populacije sejanchkov hmelja v letih 2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2014, 2016, 2018

	Št. semen	Št. sejanchkov	Sel. hl. pep.
Št. semen			
Št. sejanchkov	0,736**		
Sel. hl. pep.	0,703**	0,942**	
Sel. hl. per.	0,669**	0,824**	0,843**

**P < 0.01

Št. sejanchkov – število sejanchkov; Sel. hl. pep. – selekcija na hmeljevo pepelovko; Sel. hl. per. – selekcija na hmeljevo peronosporo)

S slike 1 so razvidne razlike med posameznimi leti. Žlahtniteljsko delo bi lahko razpolovili na dve časovni obdobji. Leta 2004, 2006, 2008 in 2009 sodijo v obdobje, za katero je značilno večje število semen in tudi statistično značilno večje število sejanchkov. V drugo obdobje bi lahko združili leta 2010, 2014, 2016 in 2018, ker so si v statističnem pogledu bolj podobna. Rezultat je bil pričakovan. Pri večjem obsegu križanj do leta 2009 je bilo posledično posajenih v hmeljišča večje število križancev, ki jih je v nadaljnjem žlahtniteljskem postopku bilo potrebno ovrednotiti še glede na ostale lastnosti, kot so vsebnost in sestava grenčic, eteričnih olj ter odpornost na verticilijsko uvelost hmelja, kar pa je zahtevalo visok finančni vložek. Zaradi omejenih finančnih sredstev žlahtniteljskega programa so v letu 2010 pričeli z vzgojo manjšega števila sejanchkov letno, ki jih je bilo v nadaljevanju postopka v okviru finančnih možnosti mogoče kvalitetno ovrednotiti.



Slika 1: Grafičen prikaz uspešnosti žlahtnjenja hmelja po letih

Izraz družina smo uporabili za poimenovanje potomstva križanja neke matrne in neke očetne komponente oz. potomstva križanja nekega ženskega genotipa z nekim moškim genotipom ($\text{♀ A} \times \text{♂ B}$). Mladi potomci takega križanja so sejanchki, ki predstavljajo nov vir genetskih informacij. Število podatkov za posamezne

kombinacije križanj se zelo razlikuje po letih. Potomstva hipotetično perspektivnejših križanj so bila, kar je tudi logično, mnogo večja. V družinah so med leti vidna velika nihanja števila semen. Število semen je odvisno od izbire opravitve (naravna ali umetna), okoljskih dejavnikov, uskladitve cvetenja moške in ženske rastline, izbire staršev, odločitev žlahtnitelja. Vzgoja sejančkov hmelja iz semen in njihova selekcija se izvede samo v primeru zadostnega števila semen različnih kombinacij križanja, ki so ekonomsko opravičljiva in zanimiva, kar pojasnjuje različno dolgo časovno obdobje med leti žlahtnjenja in s tem povezano število semen. Delež kalivosti semen v družini nismo analizirali, saj je število vzgojenih sejančkov odvisno od hitrosti kalitve, ki je časovno omejena. Potek selekcije na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo pa je omejen na letni čas in razvoj bolezni. Družina z največ preživelih sejančkov po tretiranju s hmeljevo pepelovko je kombinacija križanja 'Taurus' × 63021 (srednja vrednost = 144 sejančkov), ki je tudi najbolj variabilna glede števila sejančkov vključenih v selekcijo na omenjeni bolezni, ki so variirali med 192 in 445 sejančkov/družino (CV = 42,1 %), seveda je to odvisno od največjega števila vključenih sejančkov v selekcijo. 'Taurus' je občutljiv na hmeljevo pepelovko in srednje odporen na hmeljevo peronosporo (Oset in sod., 2009), zato je največje število preživelih sejančkov po tretiranju s hmeljevo pepelovko odraz odpornega očeta 63021. Razviden pa je izrazit upad števila sejančkov po selekciji na hmeljevo peronosporo (-70 %), ki je značilen za vključeno moško komponento 63021 (-74 %), kar pomeni, da so potomci opazovanega križanja občutljivi na okužbo s hmeljevo peronosporo. Moški genotip 63021 ima značilno veliko nižje vrednosti korelacijskega koeficienta med številom sejančkov po hmeljevi peronospori v povezavi z vsemi ostalimi opazovanimi lastnostmi, kar nakazuje močno občutljivost na hmeljevo peronosporo. To potrjujejo tudi vizualna opažanja žlahtniteljev, opravljena v več letih.

Sorte 'Aurora', 'Savinjski golding', 'Magnum' in 'Taurus' kot ženski genotipi so bili v križanjih z različnimi moškimi genotipi skozi opazovana žlahtniteljska leta največkrat uporabljeni. Rezultati teh križanj pa ponujajo širši vpogled v odziv njihovih potomcev na izzvani bolezni, hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo. Za optimalno oceno značilnih lastnosti določene kombinacije križanja ali posamezne komponente ostaja večje število sejančkov zelo zaželeno v žlahtniteljskih programih. Pri potomcih sort 'Magnum' in 'Aurora' prihaja do spreminjanja značilnih lastnosti maternih komponent glede odpornosti oz. občutljivosti, kar bi lahko povezali z vnosom pozitivnih/negativnih alelov moške komponente v potomce. Preračunano v odstotkih preživelih potomcev je 'Magnum', ki je občutljiv na hmeljevo pepelovko in visoko odporen na hmeljevo peronosporo (Oset in sod., 2009), na podlagi analize sejančkov bolj toleranten na hmeljevo pepelovko (57 %) kot na hmeljevo peronosporo (50 %). 'Aurora', ki velja za visoko odporno na hmeljevo pepelovko in sekundarno okužbo na hmeljevo peronosporo (Oset in sod., 2009) ima višji delež preživelih sejančkov na hmeljevo peronosporo

(65 %) in manj na hmeljevo pepelovko (58 %). S tem so potrjeni tudi rezultati žlahtnjenja na odpornost, saj se pri obeh zanimivih sortah s križanji v potomstvu dvigne odpornost na bolezní glede na materni komponenti. Za potomstvo 'Aurore' je značilen večji delež preživelih sejančkov po tretiranju z omenjenima boleznima, kakor tudi za vse ostale sorte, ki veljajo za visoko odporne.

Moške rastline so pomemben del žlahtniteljskih programov, namenjenih razvijanju novih sort, z nadzorovanim in ciljno usmerjenim križanjem (Neve, 1991). Moški genotipi so ključnega pomena za doseganje večjega števila potomcev in višje srednje vrednosti (oz. bolj izražene odpornosti) preživelih sejančkov, kar je razumljivo, saj se moške rastline izbira na podlagi večjega števila socvetij, samega habitusa (npr. olistanost, oblika razrasti) in odpornosti na različne patogene in škodljivce. Po izračunanih deležih je med opazovanimi moškimi genotipi v križanjih najuspešnejši moški genotip 56/136 (53 % vseh preživelih sejančkov po selekcijah na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo, 64 % po selekciji na hmeljevo pepelovko in 83 % po selekciji na hmeljevo peronosporo). V programu žlahtnjenja je veliko odbranih ženskih rastlin, ki so potomci križanj s to moško komponento, kar potrjuje dobre lastnosti tega moškega križanca (neobjavljeno Čerenak, Arhiv IHPS, 2019).

Moški genotipi Prosto-Plevna, MM in MG, ki so uporabljeni v križanjih v obliki mešanice približno enakih količin peloda različnih moških rastlin, imajo visok koeficient variabilnosti in nizke srednje vrednosti po tretiranju s hmeljevo peronosporo, kar lahko povežemo z občutljivostjo večjega števila vključenih moških rastlin na obstoječi patogen. Za MIX1, MIX1, M2 in M2/137 (moški genotipi iz iste skupine kot je navedena v prejšnjem stavku) velja, da imajo srednje vrednosti vključenih sejančkov na posamezno kombinacijo križanja manjše ali enako 40, obstaja verjetnost, da je to morda povezano z manjšim številom socvetij. S križanjem dobimo nov vir različnih genov tudi za druge pomembne lastnosti, ki so potrebne za nastajanja novih sortnih materialov.

Superiorne kombinacije križanj smo izbrali na podlagi odstopanj od povprečnega števila preživelih sejančkov na kombinacijo križanja po selekciji s hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo. Število preživelih sejančkov po hmeljevi peronospori na kombinacijo križanja smo označili kot število vseh preživelih sejančkov po zaporednem tretiranju z omenjenima boleznima. Povprečna vrednost števila vseh preživelih sejančkov na kombinacijo križanja po selekcijah celotne preučevane populacije iz vseh opazovanih let žlahtnjenja je bila enaka 39. Kombinacije križanj, ki so imele večje število preživelih sejančkov od omenjene vrednosti smo združili v novo populacijo, ki je imela srednjo vrednost 51. Iz dane populacije smo nato izločili 223 različnih kombinacij križanj, ki so imeli enako ali več kot 51 vseh preživelih sejančkov. Z gotovostjo lahko trdimo, da ima kombinacija križanja z več potomci tudi več preživelih sejančkov. Problem pa

nastane, ko moramo kombinacijo križanja ovrednotiti in je sama srednja vrednost preživelih sejančkov premalo za oceno. Zaradi tega je smiselno upoštevati delež preživelih sejančkov po vsaki opravljeni selekciji na omenjeni boleznih. Ta je v našem primeru verjetno najbolj ustrezen pokazatelj odziva potomcev določene kombinacije križanja na patogen. S tem v zvezi smo določili povprečno mejo odstotkov preživelih sejančkov na opazovano lastnost in odstopanja od teh vrednosti v pozitivnem smislu označili kot superiorne kombinacije križanj. Tako smo dobili 55 superiornih kombinacij križanj z najvišjim deležem preživelih potomcev na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo, ki so predstavljene v preglednici 3.

Preglednica 3: *Superiorne kombinacije križanj, določene na podlagi deležev preživelih potomcev po tretiranjih s hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo*

♀ A × B ♂	Preživali sejančki (%)	Sel. hl. pep	Sel. hl. per.	Preživali sej.
		65*	72*	47*
'Admiral' × 24/80	93	72	66	
'Admiral' × 25/255	100	73	73	
'Aurora' × 272/93	75	77	58	
'Aurora' × 305/28	73	82	59	
'Aurora' × 284/113	82	86	70	
'Cascade' × 25/234	74	75	56	
'Dana' × 19058	83	98	81	
'Hallertauer Tradition' × 162/75	97	64	63	
'Hercules' × 57/238	76	78	59	
'Herkules' × Prosto	70	74	52	
'Magnum' × 21426	78	81	63	
'Northern Brewer' × 277/120	88	96	85	
'Nugget' × 55/252	66	72	48	
'Nugget' × 284/73	67	92	61	
'Nugget' × 75/122	91	86	78	
'Osvaldov klon' 72 × 56/136	66	86	56	
'Osvaldov klon' 74 × 272/93	77	83	64	
'Outeniqua' × M2/137	88	69	61	
S-AH/17 × Plevna	67	91	61	
S-AH/39 × 3/3	80	83	67	
S-AH/42 × 3/3	66	85	56	
S-AH/7 × Plevna	80	78	63	
S-AH/31 × 3/3	68	96	65	
'Sladek' × 49/116	85	85	72	
'Sladek' × 300/166	81	90	73	
'Wye Challenger' × 305/27	83	76	63	
'Žateški polurani červenjak' × 300/156	74	77	57	
A4/30 × 19058	82	73	59	

Nadaljevanje preglednice na naslednji strani

Nadaljevanje preglednice s prejšnje strani:

♀ A × B ♂	Preživali sejančki (%)	Sel. hl. pep	Sel. hl. per.	Preživali sej.
		65*	72*	47*
A4/30 × 21430	68	88	59	
A4/124 × 21340	83	86	71	
A11/175 × 25/234	71	94	66	
16/7 × 56/136	80	84	68	
16/7 × 119/8	71	77	55	
16/28 × 296/44	74	80	59	
16/28 × 19058	75	94	71	
20/27 × 141/109	73	73	54	
20/27 × 284/113	79	81	64	
20/27 × 310/48	77	83	64	
25/266 × Prosto	80	75	60	
25/278 × 271/9	94	82	77	
31/87 × 25/234	74	77	57	
35/158 × 24/80	65	78	51	
40/39 × 21343	78	74	58	
79/80 × 185/5	92	75	69	
124/33 × 305/34	90	78	70	
151/146 × 279/122	78	73	57	
174/58 × 305/27	88	92	81	
181/212 × 197/116	82	75	62	
221/83 × 213/16	88	71	63	
276/163 × 19058	90	78	71	
279/104 × O3U 3/2	76	75	58	
285/79 × 24/80	70	73	51	
285/79 × 310/48	74	74	55	
288/75 × 56/136	82	90	74	
312/78 × 284/113	70	96	67	

(Sel. hl. pep. – selekcija na hmeljevo pepelovko; Sel. hl. per. – selekcija na hmeljevo pepelovko; Preživali sej. – delež vseh preživelih selekcioniranih sejančkov na omenjeni bolezn; * = povprečna meja odstotka preživelih sejančkov na opazovano lastnost)

4 ZAKLJUČEK

Potomstva zelo velikega števila različnih kombinacij križanj, ki so bila opravljena s ciljem oblikovanja genetsko variabilnih populacij, namenjenih za selekcijski proces, je bilo najpomembnejše merilo odpornosti na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo. Število potomcev posameznih križanj se je zelo razlikovalo in mnogo je bilo premajhnih, da bi jih lahko statistično ovrednotili. Zaradi zaporednega tretiranja z omenjenima boleznima ne moremo z gotovostjo trditi, da je večje število preživelih sejančkov po tretiranju s hmeljevo pepelovko neposredni vzrok za večje število preživelih sejančkov po tretiranju s hmeljevo peronosporo.

Velikost populacije je pomemben dejavnik pri klasični selekciji na omenjeni bolezni, saj z večjim številom sejančkov lahko realneje ocenimo odziv določene kombinacije križanja na dane patogene in pridemo do potencialno vrhunskih osebkov. S sistematično uporabo molekulskih markerjev, ob zanesljivih podatkih o genomski strukturi starševskih komponent, bo velikost populacije potomstev posameznih križanj verjetno manj pomembna, saj bo križanja možno bolje načrtovati in natančneje predvidevati genetsko ter genotipsko strukturo potomstev. Ko govorimo o današnji stopnji žlahtnjenja hmelja, je treba upoštevati, da so podatki o superiornih nosilcih alelov odpornosti na omenjeni bolezni še vedno zelo nepopolni.

Rekurentna selekcija omogoča akumulacijo tako alelov odpornosti kot tudi pozitivnih alelov, povezanih z gensko ekspresijo drugih gospodarsko pomembnih lastnosti. Iz ciklusa v ciklus (oz. iz generacije v generacijo) se frekvenca pozitivnih alelov povečuje, tem pa tudi stopnja požlahtnjenosti. Za današnji genski material, ki se uporablja v žlahtnjenju hmelja, še vedno ne bi mogli z zanesljivostjo trditi, da je visoko 'požlahtnjen' in molekulsko natančno obdelan. Zaradi tega je velikost potomstev križanj še vedno ključnega pomena za uspeh selekcije in celotnega procesa žlahtnjenja. Žlahtnjenje hmelja tudi danes v veliki meri temelji na klasičnem fenotipskem vrednotenju posameznih osebkov. Pri enostavnejše dedovanih lastnostih, kamor spada tudi odpornost na omenjeni bolezni in s tem povezan odnos »gen-za-gen« (med hmeljem in patogenom), je fenotipsko vrednotenje sorazmerno enostavno in dokaj zanesljivo. Tudi tehnike vrednotenja so zelo dodelane. Povsem drugače je pri kompleksnih kvantitativnih lastnostih z nizko dednostjo.

Visoka variabilnost v potomstvih križanj ostaja še naprej zelo zaželeno, saj je na eni strani ključna za evolucijo vrste kot celote (in z njo povezanega ohranjanja biotske pestrosti ter dinamičnega prilagajanja stalnemu spreminjanju okolja), na drugi strani pa omogoča maksimalno genetsko cepitev in pojavljanje vrhunskih genotipov (rastlin), katerih frekvenca je običajno zelo nizka. V raziskavi je bilo izpostavljenih tudi nekaj superiornih maternih in očetnih komponent ter 55 najboljših kombinacij križanj, kar bi lahko predstavljalo zelo koristno in praktično informacijo za nadaljnje žlahtnjenje hmelja v smeri odpornih sort na hmeljevo pepelovko in hmeljevo peronosporo.

5 VIRI IN LITERATURA

- Bohanec B. Osnove rastlinske biotehnologije. Gensko spremenjena hrana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Združenje živilske industrije pri Gospodarski zbornici Slovenije. 2004; s. 1-28.
- Čerenak A., Jakše J., Kolenc Z., Škof S., Koutoulis A., Whittock S., Javornik B. Support of molecular approaches in classical hop breeding. 7th Congress of the Genetic Society of

- Slovenia and 7th Meeting of the Slovenian Society of Human Genetics. Genetic Society of Slovenia. Rogaška Slatina, 20.-23. september 2015. 2015; s. 11.
- Čerenak A., Kolenc Z., Sehur P., Whittock S. P., Koutoulis A., Beatson R., Buck E., Javornik B., Škof S., Jakše J. New male Specific Markers for Hop and Application in Breeding Program. Scientific reports. 2019a; 9: 14223.
- Čerenak A., Košir I. J., Radišek S., Oset Luskar M., Gajšek H. Žlahtnjenje hmelja. Program dela za leto 2019b, Republika Slovenija, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. 2019.
- Čerenak A., Kralj D., Javornik B. Compounds of essential oils as markers of hop resistance (*Humulus lupulus*) to powdery mildew (*Podosphaera macularis*). Acta agriculturae Slovenica. 2009; 93(3): 267-273.
- Darby P. The History of Hop Breeding and Development. Brewing and science. 2005; 121:94-112.
- Haunold A. Hop production, Breeding, and Variety Development in Various Countries. ASBC Journal. 1980. Dostopno na: http://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/producao_de_lupulo_em_varios_paises_-_ing.pdf (6. 6. 2019).
- Hoerner G. R. The infection capabilities of hop downy mildew. J. Agric. Res. 1940; 61:334-334.
- Hmelj. Dostopno na: <https://www.ivr.si/rastlina/hmelj/#1526307026258-566d9114-be0b> (11. 4. 2019).
- Katalog sort hmelja IHPS. Dostopno na: <https://view.publitas.com/ihps-sihrb/the-legend-of-noble-aroma/page/8-9> (6. 10. 2019).
- Ivančič, A. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. Maribor: Fakulteta za kmetijstvo. 2002; s. 69-85.
- Ivančič A. Osnove rastlinske hibridizacije. Maribor: Fakulteta za kmetijstvo. 2002; s. 170-171.
- Javornik B. Molekularne genetske raziskave hmelja. Hmeljarski bilten. 2005; 12: 71-77.
- Kozjak P., Javornik, B. Geni za odpornost proti škodljivim organizmom pri rastlinah. Acta agriculturae Slovenica. 2008; 91(1): 139-156.
- Neve R. A. Hops. London: Chapman and Hall, 1991.
- Leach J. E., Leung, H., Tisserat, N. A. Plant disease and resistance. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. 2014; 4: 360-374.
- Oset M., Čerenak A., Radišek S. Opisna sortna lista za hmelj 2009. Ljubljana: Republika Slovenija Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. 2009; 2: 6-7.
- Radišek S., Oset Luskar M. Bolezni in škodljivci hmelja. Hmelj od sadike do storžkov. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 2012; s: 21-23.
- Radišek S., Čerenak A., Javornik B. Žlahtnjenje hmelja na odpornost na bolezni: Postopki in tehnike pri selekciji križancev. Hmeljarski bilten. 2007; 14: 5-10.
- Radišek S., Leskošek G., Rak Cizej M., Ferlež Rus A. Hmeljeva peronosora (*Pseudoperonospora humuli*): biologija, strategija varstva in osnove prognoze. Hmeljarski bilten. 2012; 19: 72-79.
- Rozman L., Možnosti in pomen žlahtnjenja rastlin na odpornost proti boleznim. Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Zreče, 4.-6. marec 2003. 2003; s. 457-462.

- Slovenska sortna lista Hmelj. Dostopno na: https://www.gov.si/assets/organi-v-sestavi/UVHVVR/Rastlinski-semenski-material/Publikacija-Sortna-lista/SL_2019_splet.pdf (28.10.2019)
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. Priročnik za hmeljarje. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 2002; s. 31-38.
- Wolfenbarger S. N., Massie S. T., Ocamb C., Eck E. B., Grove G. G., Nelson M. E., Probst C., Twomey M. C., Gent, D. H. Distribution and Characterization of *Podosphaera macularis* Virulent on Hop Cultivars Possessing R6-Based Resistance to Powdery Mildew. *Plant Disease*. 2016; 100(6):1212-1221.
- Woods J. L., Gent, D. H. Susceptibility of Hop Cultivars to Downy Mildew: Associations with Chemical Characteristics and Region of Origin. *Plant Health Progress*. 2016; 17(1): 42-48.

PREIZKUŠANJE RAZLIČNIH METOD OKUŽEVANJA RASTLIN S CBCVd

Tanja GUČEK¹, Jernej JAKŠE² in Sebastjan RADIŠEK³

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Received / prispelo: 23. 10. 2019

Accepted / sprejeto: 5. 12. 2019

Izvleček

Z namenom določitve najboljšega načina okuževanja hmelja s CBCVd smo primerjali različne načine vnosa inokuluma na različnih testnih rastlinah in hmelju. Na dveh sortah paradižnika in kumar, jajčevcu in hmelju smo rastline okužili z razmazom in injiciranjem. Kot najbolj uspešen način okužbe hmelja s CBCVd smo določili injiciranje celokupnih nukleinskih kislin v steblo. Med testnimi rastlinami je bila stopnja okužbe najvišja pri paradižniku sorte Heinz 1370. Preizkušali smo tudi različne pufre, ki se uporabljajo za stabilizacijo rastlinskega ekstrakta, vendar se je uporaba le-teh izkazala za neuspešno. Z analizo porazdelitve CBCVd po rastlini smo zaznali viroide v listih, steblo, koreninah in plodu, razen v starejšem tkivu in tanjših koreninicah ne. Vzpostavljena metoda za umetno okuževanje rastlin z viroidi omogoča testiranje gostiteljske specifičnosti, odpornosti sort, epidemiološke študije in analizo interakcij med rastlinami in patogeni.

Ključne besede: viroidi, patogeni testi, gostiteljska specifičnost

TESTING OF DIFFERENT METHODS FOR MECHANICAL INOCULATION OF PLANTS WITH CBCVd

Abstract

In order to determine the best way to infect hops with CBCVd, we compared different means of inoculation on different test plants and hop. On two varieties of tomatoes and cucumbers, eggplant and hop, the plants were infected by smearing and injection. Injection of whole nucleic acids into the stem has been identified as the most successful way of hop infection with CBCVd. Among test plants, the infection rate was the highest in tomato variety Heinz 1370. At the same time, the effect of different buffers, which are used for stabilization of the plant extract, was tested, but their use proved as unsuccessful. By analyzing the distribution of

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

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

³ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

CBCVd in plant, viroids were detected in leaves, stem, roots and fruits, except in older tissue and thinner roots. The described method for artificial infection of plants with viroids enables biological indexing of host plants, resistance screening, epidemiological studies and analysis of plant-pathogen interactions.

Key words: viroids, biological indexing, host specificity

1 UVOD

CBCVd spada v skupino osmih viroidov, ki so bili do sedaj odkriti na agrumih (Wang in sod., 2018), okužbe pa so bile potrjene tudi v nasadih hmelja (Jakše in sod., 2015) in pistacije (Al Rwahnih in sod., 2018). Poleg omenjenih rastlin je bilo z umetnimi okužbami potrjeno, da lahko okužuje tudi paradižnik, kumare in nekatere okrasne rastlin (Semancik in Vidalakis, 2005). CBCVd je bil odkrit leta 1988 v Kaliforniji pri raziskavi določanja povzročiteljev bolezni eksokortis agrumov (Duran-Vila in sod., 1988). Najpogosteje se pojavlja v obliki mešanih okužb z drugimi viroidi, pri čemur na večini sort agrumov in pistaciji ne povzroča vidnih bolezenskih znamenj, zato spada med manj proučene viroide (Semancik in Vidalakis, 2005; Wang in sod., 2018; Al Rwahnih in sod., 2018).

Z odkritjem CBCVd v hmelju v Sloveniji (Jakše in sod., 2015) in povzročanjem agresivnih bolezenskih znamenj se je uvrstil med pomembne patogene s statusom karantenskega organizma na hmelju v skladu z Odločbo o nujnih ukrepih za preprečevanje vnosa in širjenja viroidnih zakrnelosti hmelja (Uradni list RS, št. 21/15). Hkrati je CBCVd v Evropi prepoznan kot škodljiv organizem, ki lahko močno prizadene celotno evropsko hmeljarstvo in je kot tak uvrščen na opozorilno listo Evropske organizacije za varstvo rastlin (EPPO). CBCVd je v letih 2007-2018 v Sloveniji prizadel več kot 150 ha hmeljišč, v letu 2019 pa so bile okužbe zaznane tudi v nasadih hmelja v Nemčiji (EPPO, 2019).

Umetne okužbe (biološki testi) rastlin z viroidi se uporabljajo za identifikacijo bolezni in njihovih povzročiteljev v gostiteljih z vidnimi bolezenskimi znamenji ter določanje gostiteljske specifičnosti. Osnova je uporaba testnih rastlin, ki omogočajo vizualizacijo biološke aktivnosti, potrditev infektivnosti in analizo agresivnosti viroidov (Singh in Ready, 2003). Omogočajo tudi študije vpliva posameznih viroidov, kjer z uporabo specifičnih gostiteljskih rastlin, ki jih lahko okuži samo posamezen viroid, dobimo inokulum za nadaljnje umetno okuževanje. Omenjeni postopki lahko vzamejo veliko časa in vključujejo večje število gostiteljskih rastlin (Singh in Ready, 2003). Za okuževanje rastlin s posameznimi viroidi se zato pogosteje uporabljajo cDNA konstrukti monomerov in dimerov viroidov (Cress in sod., 1983; Verhoeven in sod., 2009; Adkar-Purushothama in sod., 2015; Guček in sod., 2017). Testne rastline se največkrat okuži mehansko, ker se tudi v naravi viroidi najpogosteje širijo z mehanskim kontaktom. Za mehanski

prenos viroidov v rastline se najpogosteje uporablja inokulum na osnovi rastlinskega soka, celokupnih nukleinskih kislin, očiščene RNA, prepisov viroidne cDNA ali RNA (Cress in sod., 1983; Vernière in sod., 2006; Verhoeven, 2010; Verhoeven in sod., 2010; Adkar-Purushothama in sod., 2015). Metode za vnos viroida v rastlino so lahko različne, od cepljenja, rezanja, injiciranja, razmaza inokuluma, agroinokulacije do biolistike (Matoušek in sod., 2004; Barbosa in sod., 2005; Verhoeven in sod., 2010; Pallas in sod., 2012). Na potek okužbe vplivajo številni faktorji, kot so stabilnost, koncentracija in različica viroida, občutljivost testne rastline (kultivar, starost rastline), metoda vnosa inokuluma, sočasne okužbe z več viroidi in virusi, okolje (temperatura, svetilnost, dolžina dneva, količina hranil v zemlji) in čas da pride do razvoja bolezenskih znamenj (Singh in Ready, 2003). Viroidi preferirajo visoke temperature in veliko svetlobe, do okužbe pa pogosteje pride ob uporabi rezanja in injiciranja inokuluma, kot v primeru razmaza na listno površino (Singh in Ready, 2003; Nie in Singh, 2017).

Zaradi velike variabilnosti viroidov in pogostih sočasnih okužb z več viroidi lahko pride do sprememb v izražanju bolezenskih znamenj (Reanwarakorn in Semancik, 1999; Kovalskaya in Hammond, 2014). Po drugi strani pa lahko različni viroidi na istem gostitelju izražajo podobna bolezenska znamenja (Malfitano in sod., 2005). Uporaba umetnih okužb spada med dolgotrajnejše metode, predvsem zaradi večtedenske dobe, ki je potrebna za namnožitev viroidov do meje detekcije ali pa do pojava bolezenskih znamenj, ki lahko traja tudi več mesecev (Nie in Singh, 2017). V preteklosti so se biološki testi uporabljali za določanje viroidov v rastlinah, danes se večinoma uporabljajo kot podpora epidemiološkim in interakcijskim študijam (Singh in Ready, 2003).

2 MATERIAL IN METODE

V okviru preizkušanja različnih metod za umetno okuževanje rastlin z viroidi smo želeli izbrati zanesljiv način umetnega okuževanja s CBCVd na hmelju in hkrati določiti najboljšo testno rastlino za CBCVd. V prvem poskusu smo tako preizkušali različne načine okuževanja testnih rastlin na različnih sortah iste rastlinske vrste. Testirali smo različne načine okuževanja in kot inokulum uporabili rastlinske ekstrakte in nukleinske kisline. V okviru prvega poskusa smo analizirali tudi kolonizacijo viroidov v posameznih delih rastlin. V drugem poskusu smo preizkušali različne pufre, ki omogočajo stabilizacijo rastlinskega ekstrakta in preprečijo delovanje inhibitorjev. V tretjem poskusu pa smo preizkušali različne načine okuževanja za hmelj.

2.1 Rastlinski material

Hmelj in testne rastline smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 25°C v času osvetljevanja in 18°C v času teme. Rastline smo redno gnojili in zalivali z

vodovodno vodo. Testne rastline smo vzgojili iz semen, hmelj pa iz sadik A certifikata (IHPS). Vpliv posameznih načinov okuževanja smo analizirali na hmelju sorte Celeia. Vir inokulov za okuževanje so predstavljale naravno okužene rastline hmelja iz hmeljišča, ki so bile glede na RT-PCR pozitivne na HLVd in CBCVd. Zaradi možnih razlik v občutljivosti rastlin smo okužili 10 rastlin posamezne rastlinske vrste glede na obravnavanje. Rastline smo okužili v fenološki fazi 4-6 pravih listov. Inokulirane rastline smo po okuževanju vzdrževali v rastni komori, opazovali pojavljanje bolezenskih znamenj ter jih po 8-16 tednih analizirali. Vzorčili smo mlajše liste (3-4), ki so se po možnosti razvili po inokulaciji. Vzorce smo izolirali z uporabo CTAB metode in testirali na CBCVd z RT-PCR. V testiranje smo vključili tudi kontrolne rastline, ki smo jih okužili z destilirano vodo in so služile kot osnova za določanje bolezenskih znamenj.

2.1.1 Testne rastline

Z namenom izbora najbolj uspešne umetne okužbe rastlin s CBCVd smo analizirali naslednje testne rastline (10 rastlin/obravnavanje):

- a) kumara (*Cucumis sativus*), sorta Pariški kornišon
- b) kumara (*Cucumis sativus*), sorta Levine F₁
- c) paradižnik (*Solanum lycopersicum*), sorta Heniz 1370
- d) paradižnik (*Solanum lycopersicum*), sorta Marmande
- e) jajčevac (*Solanum melongena*), sorta Halflange Violette

2.2 Prvi poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja testnih rastlin

Na testnih rastlinah smo analizirali infektivnost 4 različnih inokulov v okviru naslednjih obravnavanj:

1. razmaz surovega rastlinskega soka,
2. razmaz rastlinskega soka v fosfatnem pufri,
3. injiciranje ekstrakta celokupnih nukleinskih kislin (TNA),
4. injiciranje ekstrakta celokupne RNA.

V primeru inokulov na osnovi rastlinskega materiala (1 in 2) smo rastline okužili z razmazom inokula preko listov, v primeru inokulov na osnovi nukleinskih kislin (3 in 4) pa z injiciranjem inokuluma v steblo rastlin. Omenjena obravnavanja smo izbrali glede na v literaturi najpogosteje uporabljene metode umetnega okuževanja, s poudarkom na posnemanju naravnega poteka širjenja viroidov. V primeru razmaza smo liste posipali s karborundom (SiC z granulacijo 180) in s tem povzročili mikropoškodbe, ki viroidom olajšajo vstop v rastlinske celice. Na prve tri prave liste tretirane s karborundumom smo s kapalko nanесли 3-4 kapljice inokuluma in jih s prstom razmazali tako, da je bil s sokom prepojen cel list. Po 15 minutah smo liste nežno sprali z destilirano vodo in rastline za dva dni pokrili s prozorno vrečko, da smo povišali vlago. V primeru injiciranja smo TNA oziroma

RNA v indikatorske rastline vnesli tako, da smo v steblo na 2-4 mestih po sredini navpično zarezali s skalpelom in v posamezno zarezo s pipeto vnesli 15 μ L TNA/RNA. V posamezno indikatorsko rastlino smo vnesli \sim 80 μ g TNA/RNA. Vstopna mesta smo zavili s parafilmom, da je inokulum ostal v stebelu in da se rana ni izsušila.

Z namenom, da bi analizirali kolonizacijo viroida CBCVd smo pri paradižniku določili prisotnost viroida v posameznih delih rastline. Po okuževanju smo zato rastline paradižnika sorta Heniz 1370 testirali na prisotnost viroida CBCVd tako v zelenih, mlajših listih, kot tudi starejših, rumenih. V primeru, da je bil po RT-PCR analizi v rastlini viroid CBCVd prisoten, smo vzorčili še preostali del rastline, od stebela, listov, plodov do korenin. Po vzorčenju smo izvedli izolacijo celokupnih nukleinskih kislin z uporabo CTAB metode (Kump in Javornik, 1996) in vzorce analizirali z RT-PCR na prisotnost CBCVd.

2.2.1 Okuževanje z razmazom surovega rastlinskega soka

Tkivo donorske okužene rastline hmelja smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto (Meku, Nemčija) v vodi brez RNaz v razmerju 1:5. Rastlinski sok smo precedili skozi gazo in tako pridobili homogen inokulum, ki smo ga v rastline vnesli z razmazom.

2.2.2 Okuževanje z razmazom rastlinskega soka v fosfatnem pufru

Fosfatni pufer smo pripravili po protokolu Verhoeven in Roenhorst (2000) (0.02 M fosfatni pufer, pH 7.4, 2% (w/v) polivinilpirolidon (PVP; MW 10000)). Tkivo donorske okužene rastline hmelja smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto v fosfatnem pufru v razmerju 1:5. Rastlinski sok v fosfatnem pufru smo precedili skozi gazo in tako pridobili homogen inokulum, ki smo ga v rastline vnesli z razmazom.

2.2.3 Okuževanje z injiciranjem ekstrakta celokupnih nukleinskih kislin

Inokulum na osnovi celokupnih nukleinskih kislin (TNA) smo iz donorskih okuženih rastlin hmelja izolirali z uporabo CTAB metode (Kump in Javornik, 1996). Za posamezno izolacijo smo uporabili 100 mg listov in pelet raztopili v 50 μ l vode brez RNaz (Sigma-Aldrich, ZDA). TNA smo v rastline vnesli z injiciranjem.

2.2.4 Okuževanje z injiciranjem ekstrakta celokupne RNA

Inokulum na osnovi RNA ekstrakta (RNA) smo iz okuženih rastlin hmelja izolirali z uporabo kompleta Spectrum[®] Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich,

ZDA). Za posamezno izolacijo smo uporabili 100 mg listov in pelet raztopili v 50 μ l vode brez RNaz. Inokulum na osnovi RNA smo v rastline vnesli z injiciranjem.

2.3 Drugi poskus: Preizkušanje okuževanja z rastlinskim sokom v različnih pufrih

Z namenom izbora najbolj infektivnega inokuluma rastlinskega soka v pufri smo primerjali tri različne pufre, ki se uporabljajo za mehansko okuževanje rastlin z viroidi. Pufri se uporabljajo za stabilizacijo in uravnavanje pH rastlinskega soka in tako preprečijo negativen vpliv inhibitorjev.

Primerjali smo naslednje pufre:

- a) fosfatni pufer (0,02 M fosfatni pufer, pH 7,4, 2% (w/v) polivinilpirolidon (PVP; MW 10000)) (Verhoeven in Roenhorst, 2000),
- b) TKM pufer (10 mM Tris, 10 mM KCl, 0,1 mM MgCl₂) (Škorić, 2015),
- c) kalijev pufer (0,01 M kalijev fosfatni pufer, 0,01 M β -merkaptoetanol, 0,2 % Na₂SO₃ · 7H₂O) (Bogaert in sod., 2015).

Tkivo donorske okužene rastline hmelja smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto v posameznem pufri v razmerju 1:5. Rastlinski sok v pufri smo precedili skozi gazo in tako pridobili homogen inokulum. Kot testne rastline smo uporabili paradižnik sorte Heinz 1370, ki smo ga pred okuževanjem zalili in ranili s karborundumom. Okužili smo 10 rastlin na posamezen pufer. Na prve tri prave liste tretirane s karborundumom smo s kapalko nanesti 3-4 kapljice rastlinskega soka in jih s prstom razmazali tako, da je bil s sokom prepojen cel list. Inokulum smo v rastlino vnesli tudi preko stebela, tako da smo steblo na 2 mestih po sredini navpično zarezali s skalpelom in v posamezno zarezo s pipeto vnesli 50 μ L inokuluma. Vstopna mesta smo zavili s parafilmom, da je inokulum ostal v stebelu in da se rana ni izsušila. Po 15 minutah smo liste nežno sprali z destilirano vodo in rastline za dva dni pokrili s prozorno vrečko, da smo povišali vlago.

2.4 Tretji poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja za hmelj

Z namenom izbora optimalnega načina okuževanja hmelja s CBCVd, smo analizirali vpliv načina vnosa inokuluma.

V ta namen smo uporabili 4 različne vrste inokuluma (poglavje 2.2):

- surov rastlinski sok,
- rastlinski sok v fosfatnem pufri,
- ekstrakt celokupnih nukleinskih kislin (TNA),
- ekstrakt celokupne RNA.

Inokulum smo v rastline vnesli na dva načina:

a) z injiciranjem

V primeru injiciranja smo rastlinski sok oziroma nukleinske kisline v steblo vnesli tako, da smo steblo na 4 mestih po sredini navpično zarezali s skalpelom in v posamezno zarezo s pipeto vnesli 15 μ L inokuluma. Rastlini smo odrezali vrh in iglo s sokom zapičili v steblo ter v njegovo notranjost spustili 15 μ L inokuluma. Vstopna mesta smo zavili s parafilmom, da je inokulum ostal v steblu (slika 1).



Slika 1: Injiciranje inokuluma v steblo hmelja. Levo: prerez stebela s skalpelom. Sredina: Vnos inokuluma v steblo s pipeto. Desno: vnos inokuluma v steblo z iglo.

b) z razmazom

V primeru razmaza smo rastline predhodno po listih posipali s karborundum. Na prve tri prave liste tretirane s karborundumom smo s pipeto nanесли inokulum (100 μ L soka/ 15 μ L nukleinskih kislin) in jih s prstom razmazali tako, da je bil z inokulum prepojen cel list. Po 15 minutah smo liste nežno sprali z destilirano vodo in rastline za dva dni pokrili s prozorno vrečko, da smo povišali vlago.

2.5 RT-PCR in agarozna gelska elektroforeza

Obratno prepisovanje in PCR smo izvajali v enem koraku (RT-PCR) s kompletom One Step RT-PCR (Qiagen, Nemčija) v inštrumentu Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Nemčija). Z RT-PCR smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi analizirali prisotnost CBCVd v rastlinah (preglednica 1) (Guček in sod., 2019). Namnožene produkte smo analizirali z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu v 1x TBE pufru obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 μ g/ml) pod UV lučjo (Syngene, ZDA). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 160 V in 180 mA.

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje CBCVd iz hmelja z RT-PCR

Viroid	Začetni oligonukleotid	Zaporedje 5' - 3'	Velikost produkta [bp]	Vir
<i>Viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd)</i>	CVd-IV-F1_1	GGGGAAATCTCTTCAGAC TC	284	spremenjeno glede na (Bernad in Duran-Vila, 2006)
	CVd-IV-R1	GGGGATCCCTCTTCAGGT		

3 REZULTATI Z RAZPRAVO**3.1 Prvi poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja testnih rastlin**

V okviru prvega poskusa smo primerjali v literaturi najbolj pogosto uporabljene metode mehanske inokulacije in inokulum na osnovi surovega rastlinskega soka in celokupnih nukleinskih kislin (Hadidi in sod., 2003). Testne rastline smo izbrali glede na rezultate predhodnih testiranj gostiteljske specifičnosti CBCVd (Duran-Vila in Semancik, 2003; Semancik in Vidalakis, 2005). Glede na rezultate okuževanja (preglednica 2) lahko sklepamo, da je za CBCVd najboljša indikatorska rastlina paradižnik Heinz 1370 in zanj najboljša metoda okuževanja injiciranje z uporabo RNA ekstrakta.

Preglednica 2: Primerjava metod za umetno okuževanje s CBCVd na kumarah, paradižniku in jajčevcu.

Obravnavanje	Število uspešno okuženih rastlin/ število vseh okuženih rastlin					Št. uspešno okuženih rastlin/ št. vseh okuženih rastlin
	Kumare Pariški kornišon	Kumare Levine F ₁	Paradižnik Heinz 1370	Paradižnik Marmande	Jajčevcec Halflange Violette	
Razmaz surovega rastlinskega soka	2/10	1/10	2/10	1/10	1/10	7/50
Razmaz rastlinskega soka v fosfatnem pufu	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/50
Injiciranje celokupnih nukleinskih kislin (TNA)	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	3/50
Injiciranje ekstrakta celokupne RNA	0/10	0/10	3/10	2/10	0/10	5/50
Število vseh uspešno okuženih rastlin/ število vseh okuženih rastlin	2/40	1/40	7/40	4/40	1/40	15/200

Skupno je bila za testne rastline najboljša metoda okuževanja z razmazom surovega rastlinskega soka, kjer smo uspešno okužili kumare, paradižnik in jajčevce. Pri paradižniku se je kot enako uspešna izkazala metoda okuževanja z uporabo TNA in kot neprimerna uporaba soka v fosfatnem pufru. Skupno smo od okuženih 200 rastlin uspešno okužili 15 rastlin, od tega 2 kumari sorta Pariški kornišon, 1 kumaro sorta Levine F₁, 7 paradižnikov sorta Heinz 1370, 4 paradižnike sorta Marmande in 1 jajčevac sorta Halflange Violette. V primeru rastlinskega soka v fosfatnem pufru nismo bili uspešni, vzrok je bil mogoče neustrezen pH. Za nadaljnjo okuževanje s CBCVd je tako primerna uporaba tako razmaza kot injiciranja, medtem ko se za indikatorsko rastlino lahko uporablja paradižnik sorte Heinz 1370. Vse kontrolne rastline so bile vzorčene in na CBCVd testirane kot negativne.

Rastline smo spremljali 16 tednov po okužbi in v tem času nismo zaznali vidnih bolezenskih znamenj, tako da so bile vse rastline glede na skalo ocenjene z 0. Pri kumarah smo na plodovih opazili nenavadno zbitost, zgubanost in zvijanje, vendar so bili omenjena bolezenska znamenja prisotna tudi pri na CBCVd negativnih rastlinah, tako da znamenja pripisujemo fiziološkemu stresu v rastlinjaku. Pri paradižniku sorta Heinz 1370 prav tako nismo zaznali vidnih bolezenskih znamenj, kar v primeru indikatorskih rastlin ni optimalno, vendar ne glede na to uporaba paradižnika glede na hmelj zaradi možnosti gojenja čez celo leto in hitrejše rasti omogoča lažje izvajanje raziskav.

Po okužbi paradižnika Heinz sorta 1370, smo pozitivne rastline vzorčili po delih: liste, stebela, plodove in korenine. V posameznih rastlinah pozitivnih na CBCVd smo zaznali razliko med mladimi zelenimi listi, ki so imeli nedvoumne pozitivne signale pomnoženih fragmentov in starejšimi, rumenimi listi, ki so bili na CBCVd negativni. Zaradi omenjenih razlik smo naknadno pri pozitivnih rastlinah vzorčili še preostale dele, tako da smo analizirali celo rastlino (preglednica 3, slika 2). Ugotovili smo, da je viroid prisoten po celi rastlini v vseh zelenih in mladih delih, medtem ko ga v rumenih (starejših) listih ne zaznamo, prav tako pa ga nismo zaznali v stranskih nediferenciranih koreninicah. Viroid je bil prisoten tudi v zelenem plodu. Iz omenjenih rezultatov lahko sklepamo, da so viroidi homogeno razporejeni po celotnem zelenem delu rastline in da jih v starejših tkivih ne moremo več zaznati, ker RNA razpade oziroma se dušik vsebujoče molekule s sokom prenesejo v druge dele rastline (Hadidi in sod., 2003). To je lahko posledica fiziološkega stanja rastline, ki je vse hranilne snovi usmerila v rast listov in razvoj plodov, kjer smo lahko tudi zaznali viroide. V primeru ko se rastline, kot je hmelj, pripravljajo na dormanco, se sokovi vrnejo v korenine in zato lahko takrat najverjetneje viroide zaznamo po celem koreninskem sistemu. Problem detekcije pa lahko predstavlja tudi samo koreninsko tkivo, ki vsebuje veliko inhibitorjev, ki lahko motijo RT-PCR analize.

Preglednica 3: Prisotnost viroida CBCVd v posameznem delu rastlin paradižnika sorta Heinz 1370. (+) viroid je prisoten v delu rastline; (-) viroid v delu rastline ni prisoten

Del rastline	CBCVd
steblo	+
1. list (od spodaj navzgor) - rumen	-
2. list- zelen	+
3. list - zelen	+
4. list - zelen	+
5. list - zelen	+
6. list - zelen	+
7. list – vrh, mlado tkivo	+
zelen plod	+
glavna korenina	+
stranske nediferencirane korenine	-

3.2 Drugi poskus: Preizkušanje okuževanja z rastlinskim sokom v različnih pufrih

Zaradi prisotnosti inhibitorjev v rastlinskih ekstraktih se za stabilizacijo viroidnega inokuluma uporabljajo različni pufri in ustrezen pH (Verhoeven in Roenhorst, 2000). Rastlinski sok smo v našem primeru stabilizirali z uporabo fosfatnega, TKM in kalijevega pufra (poglavje 2.3). Okužili smo paradižnik sorta Heinz 1370 z razmazom in injiciranjem rastlinskega soka v posameznem pufri. Kljub temu, da smo posamezno rastlino okužili z več kot 100 μ L inokuluma, v nobenem primeru ni prišlo do okužbe. Svež rastlinski sok je z dodanim pufrom najverjetneje pridobil neustrezen pH.



Slika 2: Posamezni deli rastlin paradižnika sorta Heinz 1370 okuženi s CBCVd: listi, zelen plod in korenine

3.3 Tretji poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja za hmelj

V okviru tretjega poskusa smo okužbo z različnimi vrstami inokuluma testirali na hmelju z uporabo injiciranja in razmaza (preglednica 4).

Preglednica 4: Rezultati okuževanja hmelja s CBCVd z injiciranjem in razmazem

Inokulum	Št. uspešno okuženih rastlin/ št. vseh okuženih rastlin			
	60 dpi*		120 dpi	
	Injiciranje	Razmaz	Injiciranje	Razmaz
Surov rastlinski sok	1/10	0/10	1/10	0/10
Rastlinski sok v fosfatnem puftru	0/10	0/10	0/10	0/10
Celokupne nukleinske kisline (TNA)	6/10	1/10	10/10	1/10
Ekstrakt celokupne RNA	3/10	0/10	10/10	0/10
Št. vseh uspešno okuženih rastlin/ št. vseh okuženih rastlin	10/40	1/40	21/40	1/40

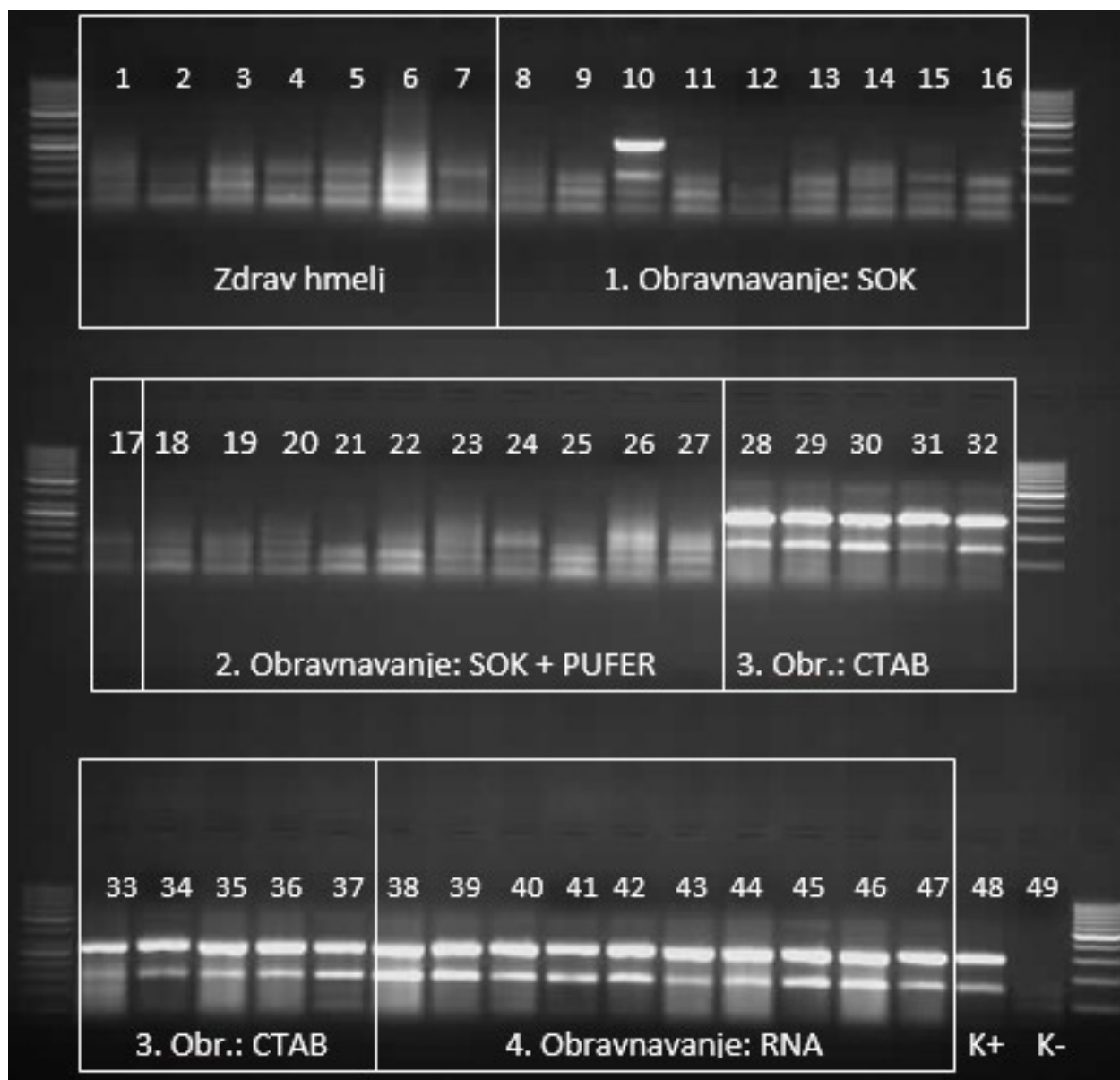
*dpi, število dni po okužbi (ang. days post infection)

Omenjene rastline so bile dvakrat vzorčene, prvič 2 meseca (60 dpi) in drugič 4 mesece (120 dpi) po okužbi. Po 2 mesecih je bilo s TNA okuženih 6/10 in z RNA 3/10 rastlin. V primeru injiciranja smo z uporabo rastlinskega soka uspešno okužili 1/10 rastlin, v primeru uporabe rastlinskega soka v fosfatnem puftru nam okužba ni uspela. V primeru TNA in celokupne RNA pa je bila po 4 mesecih okužba 100 % (slika 3), kar pomeni, da je za uspešno potrditev okužbe rastline potrebno vzorčiti 4 mesece po okužbi. V primeru razmaza je bila okužba s CBCVd uspešna samo s TNA pri 1/10 (preglednica 4). Iz rezultatov lahko sklepamo, da je za hmelj primernejša uporaba injiciranja kot razmaza in inokuluma na osnovi nukleinskih kislin (TNA oziroma RNA). Pridobljeni rezultati se ujemajo s predhodnimi raziskavami, ki pri hmelju preferirajo uporabo injiciranja (Adams in sod., 1996).

4 ZAKLJUČEK

Bolezen huda viroidna zakrnelost hmelja predstavlja za pridelovalce hmelja veliko težavo, ker negativno vpliva na količino pridelka in s hitro dinamiko širjenja pomeni odmiranje velikega števila rastlin in posledično krčenje pridelovalnih površin hmeljišč. V letu 2019 se je bolezen zelo razširila in bila prvič potrjena tudi izven meja Slovenije, v Nemčiji (EPPO, 2019). Da bomo lahko bolezen omejili in preprečili njeno nadaljnje širjenje moramo poznati biologijo viroida CBCVd, pri čemer je še posebej pomembno poznavanje njegove infektivnosti. V ta namen smo razvili metodo za umetno okuževanje hmelja s CBCVd, da bomo lahko izvajali epidemiološke študije, študije odpornosti sort, testirali gostiteljsko specifičnost in

interakcije med rastlinami in viroidi. Določili smo tudi testno rastlino, ki je paradižnik sorta Heinz 1370 in hkrati analizirali tudi razporeditev viroidov po rastlini, kar je ključnega pomena za pravilno izvajanje vzorčenj.



Slika 3: Analiza RT-PCR rezultatov na 2 % agaroznem gelu za hmelj okužen s CBCVd z injiciranjem viroidnega inokuluma 120 dpi. Pozitiven signal je pomnožen fragment viroida CBCVd velikosti 284 bp. Ostali fragmenti so nespecifični pomnožki. Od 1-7: zdrav hmelj. Od 8-17: hmelj okužen z injiciranjem rastlinskega soka (1 okužena rastlina). Od 18-27: hmelj okužen z injiciranjem rastlinskega soka v fosfatnem pufri (brez okužbe). Od 28-37: hmelj okužen z injiciranjem TNA izoliranih po CTAB metodi (100 % okužba). Od 38-47: hmelj okužen z injiciranjem celokupne RNA (100 % okužba). Oznaka 48: pozitivna kontrola reakcije. Oznaka 49: negativna kontrola reakcije.

S preizkušanjem različnih metod okuževanja smo določili zanesljiv način okuževanja hmelja s CBCVd in določili testno rastlino, ki nam bo olajšala nadaljnje raziskave. Za prihodnost hmeljarstva bo zelo pomembno poznavanje sort, ki so na viroid CBCVd odporne, kot tudi rastlin, ki so lahko njegovi gostitelji in pomenijo nevarnost za nenadzorovano širjenje. Uporaba omenjenih metod umetnega okuževanja bo zato za nadaljnje raziskave ključnega pomena.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (MR štipendija št. 36371 in raziskovalni program P4-0077). Hkrati se avtorji za nasvete pri izvajanju okužb zahvaljujemo dr. Jaroslavu Matoušek (Institute of Plant Molecular Biology, Česke Budějovice, Češka), dr. Darji Škorić (University of Zagreb, Zagreb, Hrvaška) in dr. Noémi Van Bogaert (Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, Melle, Belgija).

5 LITERATURA

- Adams A.N., Barbara D.J., Morton A., Darby P. The experimental transmission of hop latent viroid and its elimination by low temperature treatment and meristem culture. *Ann. Appl. Biol.* 1996. 128: 37-44.
- Adkar-Purushothama C. R., Zhang Z., Li S., Sano T. Analysis and application of viroid-specific small RNAs generated by viroid-inducing RNA silencing. *Methods Mol Biol.* 2015; 1236:135-70.
- Barbosa C.J., Pina J.A., Perez-Panades J., Bernad L., Serra P., Navarro L., Duran-Vila N. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease.* 2005.89 (7):749-754.
- Bernad L. in Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes.* 2006; 20 (2):105-13.
- Bogaert N. Van, Smaghe G., De Jonghe K. The role of weeds in the epidemiology of pospiviroids. *Weed Research.* 2015. 55 (6):631-638.
- Cress D. E., Kiefer M. C., Owens R. A. Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11 (19):6821-35.
- Duran-Vila N., Pina J.A., Ballester J. F., Juarez J., Roistacher C. N., Rivera-Bustamante R., Semancik J. S. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists.* 1988.
- Duran-Vila N., in Semancik J.S. Citrus viroids. V *Viroids*, recenzenti A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles in J.S. Semancik, Collingwood Australia: CSIRO Publishing. 2003. 178-194.
- EPPO. First report of Citrus bark cracking viroid in Germany. *EPPO Reporting Service* 2019 no. 8- Diseases. 2019. 2019/165.
- Guček T., Jakše J., Javornik B., Radišek S. Razvoj metode umetnega okuževanja hmelja z monomerom in dimerom CBCVd= Development of a method for artificial inoculation of hops with monomeric and dimeric CBCVd. *Hmeljarski bilten/ Hop Bulletin.* 2017. 24:5-16.
- Guček T., Jakše J., Matoušek J., Radišek S. One-Step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viroids from hop (*Humulus lupulus* L.). *European Journal of Plant Pathology* 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01654-2>.

- Hadidi A., Flores R., Randles J., Semancik J. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 2003.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*. 2015; 64 (4):831-842.
- Kovalskaya N. in Hammond R. W. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci*. 2014. 228:48-60.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114:149-158.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N., Alioto D. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 2005. 87 (2):115-121.
- Matoušek J., Orctová L., Steger G., Riesner D. Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J Virol Methods*. 2004; 122 (2):153-64.
- Nie X. in Singh R.P. Detection and Identification by Bioassay. V *Viroids and Satellites*, recenzenti A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, Palukaitis P. Academic press. 2017. 347-356.
- Pallas V., Martinez G., Gomez G. The interaction between plant viroid-induced symptoms and RNA silencing. *Methods Mol Biol*. 2012. 894:323-43.
- Reanwarakorn K. in Semancik J.S. Discrimination of cachexia disease agents among citrus variants of hop stunt viroid. *Annals of Applied Biology*. 1999.135 (2):481-487.
- Semancik J. S. in Vidalakis G. The question of Citrus viroid IV as a cocadviroid. *Arch Virol*. 2005. 150 (6):1059-67.
- Singh R. P., Ready K.F.M. Biological indexing. V *Viroids*, recenzenti A. Hadidi, Flores, R., Randles, J., in Semancik, J.S. CSIRO Publishing. Cllingwood, Australia. 2003. 89-94.
- Škorić D. Osebna komunikacija. International Conference on Viroids and Viroid-Like RNAs, Češke Budejovice, Češka Republika. 2015.
- Verhoeven J. Th. J. Identification and epidemiology of pospiviroids. Wageningen University. 2010.
- Verhoeven J.Th.J. in Roenhorst J.W. Herbaceous test plants for the detection of quarantine viruses of potato. *EPPO Bulletin*. 2000; 30: 463-467.
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C., Roenhorst J.W., Flores R., de la Pena M. Pepper chat fruit viroid: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*. 2009; 144 (1-2):209-214.
- Verhoeven J.Th.J., Hüner L., Virscek Marn M., Mavric Plesko I., Roenhorst J.W. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *Eur J Plant Pathol*. 2010.128: 417- 421.
- Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella, L. Chabrier C., Bové J. M., Duran Vila N. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology*. 2006; 96 (4):356-68.
- Wang Y., Atta S., Wang X., Yang F., Zhou C., Cao M. Transcriptome sequencing reveals novel Citrus bark cracking viroid (CBCVd) variants from citrus and their molecular characterization. *PLoS One*. 2018. 13 (6):e0198022.

VPLIV RAZLIČNIH NAČINOV NAMAKANJA NA KAKOVOST HMELJA (*Humulus lupulus* L.)

Boštjan NAGLIČ¹, Rozalija CVEJIC², Damijana KASTELEC³, Špela
ŽELEZNIKAR⁴ in Marina PINTAR⁵

Originalni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 10. 12. 2019

Izveček

V prispevku smo ovrednotili vpliv različnih načinov namakanja na kakovost pridelka hmelja (vsebnost α -kislin). Dvoletni poljski poskus je bil izveden v split plot zasnovi in je vključeval dva tehnična načina namakanja (namakanje na vrhu žičnice in po grebenu) ter različne količine namakanja: polno (100 % ETc), deficitno (80 % ETc) in nenamakano. Namakanje se je izvajalo po napovedi Agencije RS za okolje (ARSO). Rezultati so pokazali, da je bil pridelek α -kislin na poskusnih parcelah večji v letu 2017 kot v 2018. Statistično značilne razlike v pridelku hmelja so bile le med obravnavanimi leti, ne pa med obravnavanji z različno postavitvijo namakalne opreme in količino namakanja. Vremenske razmere v nobenem od poskusnih let niso bile primerne za določanje vpliva polnega in deficitnega namakanja na kakovost pridelka hmelja.

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

QUALITY RESPONSE OF HOP (*Humulus lupulus* L.) TO DIFFERENT IRRIGATION APPROACHES

Abstract

In the paper the influence of optimal and deficit drip irrigation on the quality of hop yield (α -acid content) is evaluated. The two-year field trial was conducted in a split plot design and included two technical irrigation methods (irrigation at the top of the hop trellis and on the ridge) and different amounts of irrigation water (full,

¹ Dr., univ. dipl. inž. agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: bostjan.naglic@ihps.si

² Dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: rozalija.cvejic@bf.uni-lj.si

³ Prof. dr., univ. dipl. meteorol.; mag. kmet. znanosti., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: damijana.kastelec@bf.uni-lj.si

⁴ Mag. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: spela.zeleznikar@bf.uni-lj.si

⁵ Prof. dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marina.pintar@bf.uni-lj.si

deficit, and non-irrigation). Irrigation was carried out according to the Slovenian Environment Agency (ARSO) forecast. The results showed that the yield of α -acids on the experimental plots was higher in 2017 compared to 2018. Statistically significant differences in hop yield quality were observed only during two considered years and not between treatments with different technical irrigation methods and the amount of applied water. The weather conditions were not optimal in any of the experimental years to determine the impact of full and deficit irrigation on the quality of hop yield.

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

1 UVOD

Globina korenin hmelja je lahko 2,4 m ali več. Za potrebe namakanja v Sloveniji pri hmelju upoštevamo globino korenin 40 cm, kjer hmelj črpa 90 % vode (Majer, 2000) in se po fenofazah ne spreminja, saj je hmelj trajnica. Pri hmelju je zadostna količina vode v tleh pomembna za količino in kakovost pridelka. Pomanjkanje vode v tleh, ki je lahko tudi posledica nestrokovnega namakanja hmelja, se lahko odraža še v naslednjih dveh rastnih obdobjih in sicer v manjšem pridelku, neenakomernem dozorevanju, neenakomerni velikosti storžkov ter manjši količini lupulina, ki predstavljajo glavno tržno vrednost hmelja. Škoda v nenamakanih nasadih je še posebej značilna v mlajših nasadih ali v nasadih na plitkih tleh in tleh z majhno vodnozadrževalno sposobnostjo (Evans, 2003). Količina in kakovost pridelka sta v kompleksni povezavi s časom in količino dodane vode. Hmelj porablja manj vode na začetku rastne sezone, poraba se nato povečuje do polne razvitosti in je bolj odvisna od količine listne mase rastoče rastline hmelja kot od vremenskih razmer (Middleton, 1963; Williams in Brown, 1959, cit. po Majer, 2000).

V Sloveniji se namaka 794 ha hmeljišč (Zgodovina namakanja v Sloveniji, 2019) od skupno 1596 ha vseh hmeljišč (IHGC, 2019). Namakanje hmelja včasih da zelene rezultate (Slavik in Kopecky, 1997, cit. po Svoboda in sod., 2008)), včasih pa ne (Thompson, 1967 (cit. po Majer, 2000); Zattler in Maier, 1968 (cit. po Majer, 2000); Brooks, 1961 (cit. po Majer, 2000)). Pretirano zgodnje namakanje lahko škoduje koreninam, saj lahko povzroča hmeljevo peronosporo in koreninske gnilobe (Evans, 2003; Zepp in sod., 1995). Prvo kritično obdobje je v času cvetenja (prva polovica julija) in drugo med rastjo storžkov (od druge polovice julija do prve polovice avgusta) (Rybaček, 1991). Dovoljeno znižanje vode oz. količina vode, pri kateri rastlina začuti sušni stres, je 0,5 oz. 50 % razpoložljive vode v tleh (Allen in sod., 1998).

Na Češkem so v 7 let trajajoči raziskavi na genotipu hmelja K-31 primerjali uspešnost napovedi namakanja z uporabo meteorološkega in fiziološkega pristopa. Ugotovili so, da je na vsebnost α -kislilin pomembno vplivalo leto pridelave, ne pa

toliko sama varianta namakanja, ki so jo preizkušali (Sasin, 1990). Hacin in sod. (1989) so poročali, da je namakanje sicer imelo pozitiven vpliv na pridelek pri več sortah hmelja, a je na povečanje vsebnosti α -kislin pozitivno vplivalo le pri sorti Savinjski golding. Pri raziskavah, ki sta jih izvedla Simončič in Knapič (2004) pri določanju celokupnega deleža α -kislin med obravnavanji nista ugotovila statistično značilnih razlik. Kišgeci (1974) je primerjal učinke različnih načinov vodenja namakanja (brez namakanja, namakanje na osnovi količine vode v zgornjih 60 cm tal, namakanje na osnovi kritičnih obdobj razvoja rastlin, namakanje na osnovi fizioloških pokazateljev) na kakovost pridelka hmelja. Ugotovil je, da ima namakanje na osnovi vlažnosti tal pozitiven vpliv na vsebnost α -kislin, namakanje na osnovi fizioloških pokazateljev pa negativen vpliv na kakovost pridelka. V Nemčiji so Graf in sod. (2016) zaključili, da je namakanje imelo pozitiven vpliv na kakovost hmelja le v najbolj sušnem letu trajanja poskusa.

Enakomerno dodajanje majhnih obrokov vode skozi celotno sezono rasti hmelja lahko ima negativen vpliv na količino in kakovost pridelka. Rastline hmelja namreč relativno dobro prenašajo pomanjkanje vode v tleh in bodo na dobrih globokih tleh, ob ustrezni časovni razporeditvi dodane vode z namakanjem (npr. namakanje v začetku rastne sezone in spet v začetku julija in avgusta), razvile kvaliteten in obilen pridelek. V primeru, da je gladina podzemne vode visoko (t.j. od 120 do 150 cm) pod površino tal, lahko med rastno sezono zadosti večini potreb hmelja po vodi in znatno zmanjša potrebo po namakanju (Evans, 2003; Kišgeci, 1974). Hmelj lahko nekaj vode sprejme tudi skozi liste oz. nadzemne dele, in sicer 5000 rastlin preko noči z roso sprejme 3465–8870 l vode in na ta način krije 20 % dnevnih potreb po vodi.

V Sloveniji imamo s strokovno pravilnim izvajanjem in uravnavanjem kapljičnega namakanja hmelja malo izkušenj. Pri strokovno pravilnem vodenju namakanja se zaradi habitusa rastline pri hmelju pojavlja še nekaj dodatnih izzivov. Čeprav imamo K_c (faktor rastline) vrednosti relativno dobro določene in imamo razmeroma dobre podatke o ETo (referenčna evapotranspiracija), pa predvsem za kapljično namakanje pri hmelju nimamo jasno določene najboljše metode določitve, koliko segajo rastline hmelja v medvrstno razdaljo in kako pri tem upoštevati »V« obliko nasada oz. projekcijo krošnje.

Namen tega prispevka je ovrednotiti vpliv optimalnega in deficitnega kapljičnega namakanja hmelja na kakovost pridelka oz. vsebnost α -kislin.

2 MATERIAL IN METODE

Dvoletni poljski poskus se je izvajal v Spodnji Savinjski dolini, na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu (46°14'48,44"N,15°9'41,46"E) na nadmorski višini 255 m. Tla na poskusu se uvrščajo v glineno ilovnata do ilovnata.

Za določitev vodnozadrževalnih lastnosti tal so bili odvzeti neporušeni vzorci tal na vsakem od treh obravnavanih blokov. Iz treh krivulj je bila izrisana povprečna krivulja, na osnovi katere sta se določili poljska kapaciteta tal za vodo (PK) in točka venenja (TV) (preglednica 1). Vodnozadrževalne krivulje so bile narejene s sistemom Hyprop (UMS, 2018). PK je bila določena pri vrednosti matričnega potenciala -33 kPa, TV pa je bila modelirana s Hyprop sistemom.

Preglednica 1: *Tekstura tal, točka venenja (TV) in poljska kapaciteta tal (PK) za vodo za lokacijo poskusa namakanja hmelja na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu*

Lokacija meritve	Globina odvzema (cm)	% peska	% melja	% gline	Teksturni razred	PK (vol %)	TV (vol %)
IHPS SN9	0-20	30,9	41,5	27,6	GI-I	38,8	28,2
	20-40	29,9	40,1	30	GI		

Poskusna lokacija se je nahajala znotraj mej velikega namakalnega sistema Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Vodni vir je predstavljala podzemna voda. Za namen izvajanja poskusa smo od primarne cevi do razdelilne konzole položili sekundarno $\varnothing 60$ cev, ki smo jo za diskastim filtrom (Irritec) razdelili na štiri odcepe – za vsak način namakanja svoj odcep. Na konzoli je bil vsak odcep sestavljen iz elektromagnetnega ventila (Irritec) z možnostjo regulacije pretoka, vodomera (Maddalena DS-TRP) in manometra. Elektromagnetni ventili vseh odcepov so bili povezani z baterijskim programatorjem (Hunter Node 400), ki je omogočal avtomatizacijo namakanja (slika 1).

Razvod dovodnih cevi $\varnothing 25$, ki je potekal od razdelilne konzole do kapljičnih namakalnih cevi, je bil speljan po vrhu žičnice na višini 7 m. Pri parcelah, kjer se je kapljično namakanje izvajalo na vrhu žičnice, so bile na dovodno cev s T-spojki priključene kompenzacijske kapljične namakalne cevi Irritec Multibar $\varnothing 16$, s pretokom kapljača 2,1 l/h in 60 cm razdalje med kapljači. Kapljične cevi so bile z obešali obešene na dodatno nosilno žico, ki je bila nameščena na vrhu žičnice nad vrstami hmelja

Pri kapljičnem namakanju po grebenu so bile na dovodno cev na vrhu žičnice preko T-spojki do površine tal spuščene dovodne cevi $\varnothing 16$, na katere so bile priključene kapljične namakalne cevi.

Lokacija, kjer se je izvajal poskus, ima zmerno celinski padavinski režim. Največ padavin pade poleti, in sicer v obliki ploh in neviht. V letu 2017 smo na območju Žalca v treh poletnih mesecih (junij, julij, avgust) zabeležili le 214 mm dežja, kar je 166 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje. V letu 2018 smo v treh poletnih

mesecih (junij, julij, avgust) zabeležili 356 mm dežja, kar je 31,2 mm manj kot znaša dolgoletno povprečje (preglednica 2).



Slika 1: Razdelilna konzola za namakanje hmelja

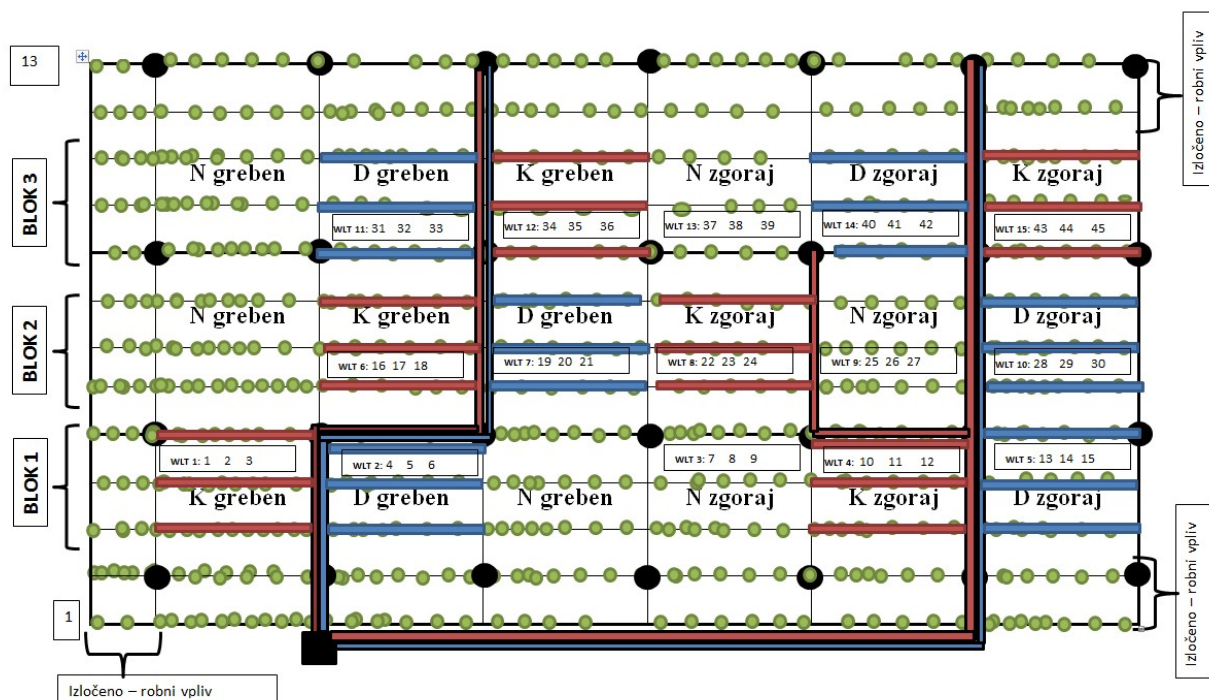
Preglednica 2: Mesečne padavine med vegetacijo za lokacijo Žalec: povprečne mesečne padavine (mm) v obdobju 1971–2000 in mesečne padavine (mm) v letih 2017 in 2018

	April	Maj	Junij	Julij	Avgust	September	Skupaj
1961 - 2010	81,3	92,7	130,4	129,3	127,5	112,4	674
2017	126	38	102	39	73	225	603
2018	62,2	113,8	119,2	135,8	101,2	74,8	607

Podzemna voda je na območju dna Spodnje Savinjske doline zelo plitvo pod površjem. Nivo gladine podtalnice v Spodnji Savinjski dolini niha med 0,88 m in 3,57 m pod površjem. Povprečna globina do nivoja podzemne vode je 2,8 m, kar je zelo malo. Globina podzemne vode se lahko ob obilnejših deževjih dvigne tudi do površja (Milavec in Verbovšek, 2012). Za območje dna je značilna enotna geološka zgradba, prekrivajo ga kvartarne usedline, ki so večinoma sedimenti z medzrnsko poroznostjo (večinoma prod) in so zelo dobro prepustne. Sorta Bobek, ki je bila vključena v poskus, je srednje zgodna, ki je optimalno zrela od 25. avgusta do 1. septembra (Čeh in sod., 2012).

Poskus je bil izveden v split plot poskusni zasnovi (slika 2, preglednica 3). Ponovitev je predstavljal en blok z dvema glavnima parcelama (dva tehnična načina namakanja: cev s kapljači je položena na greben, cev s kapljači je pritrjena na žičnico nad hmeljem), vsaka glavna parcela je bila razdeljena na tri podparcele

(količina namakanja: nenamakano, namakano 100 % po napovedi ARSO (Agencija RS za okolje), namakano 80 % po napovedi ARSO).



Slika 2: Shema in izvedba poskusa v nasadu hmelja, Žalec. Legenda: greben – Kapljična cev položena po grebenu oz. površini tal, zgoraj – Kapljična cev položena po vrhu žičnice (na višini cca 7m), K – polno kapljično namakanje (100 % ETC), D – deficitno kapljično namakanje (80 % ETC), N – nenamakano.

Imeli smo 6 obravnavanj (2 tehnična načina namakanja × 3 načini namakanja), pri čemer je nenamakano zgoraj enako kot nenamakano na grebenu, zato je poimenovanj v preglednici 3 le pet. Vsako obravnavanje je bilo ponovljeno na treh parcelah: 6 obravnavanj × 3 bloki (ponovitve) = 18 parcel (blok je obsegal tri vrste hmelja). Poimenovanje in opis obravnavanj je v preglednici 3. Vsaka parcela je imela 3 vrste hmelja dolžine 10,4 m (27 rastlin).

Preglednica 3: Poimenovanje in opis obravnavanj v poskusu hmelja na poskusnem polju Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

Oznaka	Način namakanja	Pokrivanje ETC (potencialna evapotranspiracija rastline) opis	(%)	Lokacija namakalne opreme
NN	nenamakano			
NKP_zgoraj	kapljično	polno*	100	na vrhu žičnice
NKD_zgoraj	kapljično	deficitno**	80	na vrhu žičnice
NKP_greben	kapljično	polno*	100	položeno na greben
NKD_greben	kapljično	deficitno**	80	položeno na greben

Opomba: * po napovedi Agencija Republike Slovenije za Okolje; ** preračunano v skladu z napovedjo ARSO

Nastop fenofaz, ki so pomembne pri namakanju hmelja in je v njih rastlina lahko tudi različno občutljiva na sušo, je za sorto Bobek prikazan v preglednici 4.

Preglednica 4: Fenofaze hmelja sorte Bobek v letu 2017 in 2018 na lokaciji Žalec in občutljivost na sušo

Faza			Datum nastopa fenofaze		Občutljivost na sušo
Št. faze v TriN	BBCH	Opis faze	v letu 2017	v letu 2018	
1	9	Pojav prvih poganjkov	07. 04.	22. 04.	srednja
2	11	Prvi par listov je razgrnjen	09. 05.	04. 05.	srednja
3	21	Prvi par stranskih poganjkov	26. 05.	30. 05.	majhna
4	38	Rastlina je dosegla vrh opore	09. 06.	15. 06.	majhna
5	61	Začetek cvetenja	29. 06.	05. 07.	velika
6	71	Pojav storžkov	31. 07.	30. 07.	velika
7	79	Storžki - končna velikost	21. 08.	20. 08.	velika
8	89	Zrelost storžkov, pobiranje pridelka	05. 09.	03. 09.	majhna

Na ARSO smo tekom namakalne sezone javljali podatke o poteku fenofaz hmelja, ki so pomembne za namakanje. Na osnovi tega se je modelirala vodna bilanca za 'polno' namakanje na lokaciji poskusa in tudi prognoza (napoved) namakanja za pet dni v naprej. Trajanje namakanja smo nato določili glede na karakteristike kapljičnih namakalnih cevi (razdalje med kapljači in pretok), glede na površino rastlinskega pokrova oz. glede na to, koliko je krošnja hmelja segala v medvrstni prostor na vsaki strani, ter napoved, ki jo je izdal ARSO. Pri trajanju kapljičnega namakanja smo upoštevali 8 % izgube vode. Pri deficitnem kapljičnem namakanju smo upoštevali 80 % količine dodane vode glede na polno namakanje.

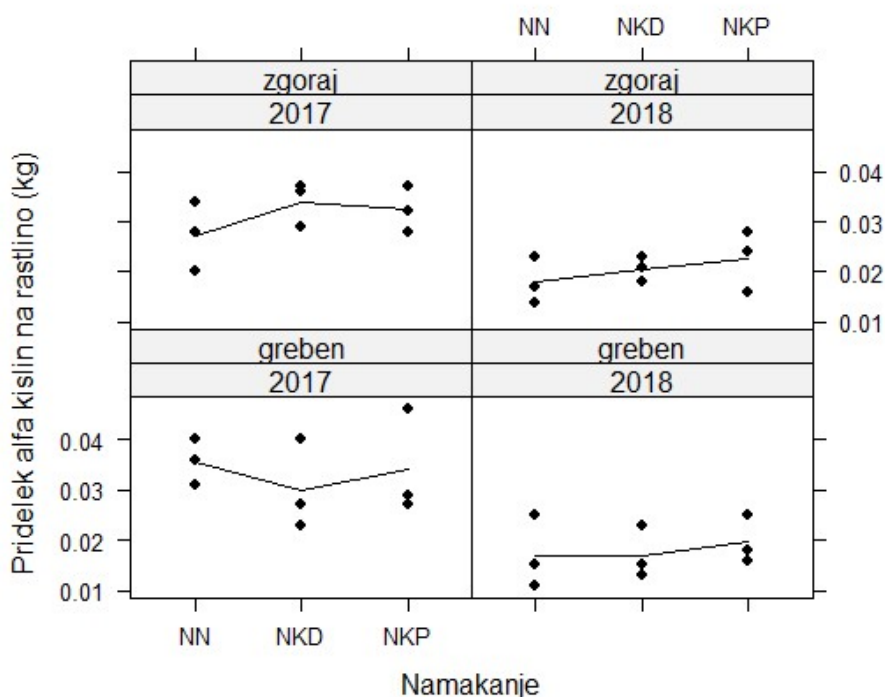
V storžkih smo določali sestavo sekundarnih metabolitov hmelja, ki so pokazatelji njegove uporabnosti in določajo njegovo ceno na trgu. V primeru hmeljnih smol smo se osredotočili na α -kislino, ki smo jih določali s tekočinsko kromatografijo z UV detekcijo po standardni metodi Analytica EBC.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Zaradi problemov z dobavo namakalne in merilne opreme je bil poskus v letu 2017 vzpostavljen pozno v namakalni sezoni. V letu 2018 so bile zaradi specifičnosti pridelave hmelja kapljične namakalne cevi na greben položene šele 6. 6. 2018. Zaradi pogostih padavin in nasičenih tal so namreč zaostajala redna tehnološka opravila, med njimi osipanje hmelja, ki ogrne zemljo k rastlini. S tem se fiksira trte, prekrije in zaduši plevela ter omogoči rast nadomestnih (adventivnih) korenin. Hmelj je bil tako osut šele 5. 6. 2018, pred tem pa polaganje cevi ni smiselno, saj

greben v vrsti hmelja še ni v celoti formiran, prav tako pa bi osipanje zasulo že položene kapljične cevi.

S slike 3 je razvidno, da sta način in količina namakanja imela proti pričakovanjem majhen vpliv na kakovost pridelka v posameznem letu izvajanja poskusa. Pridetek hmelja sorte Bobek običajno vsebuje od 3,5 do 7,8 % α -kislina (ut. %) (Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

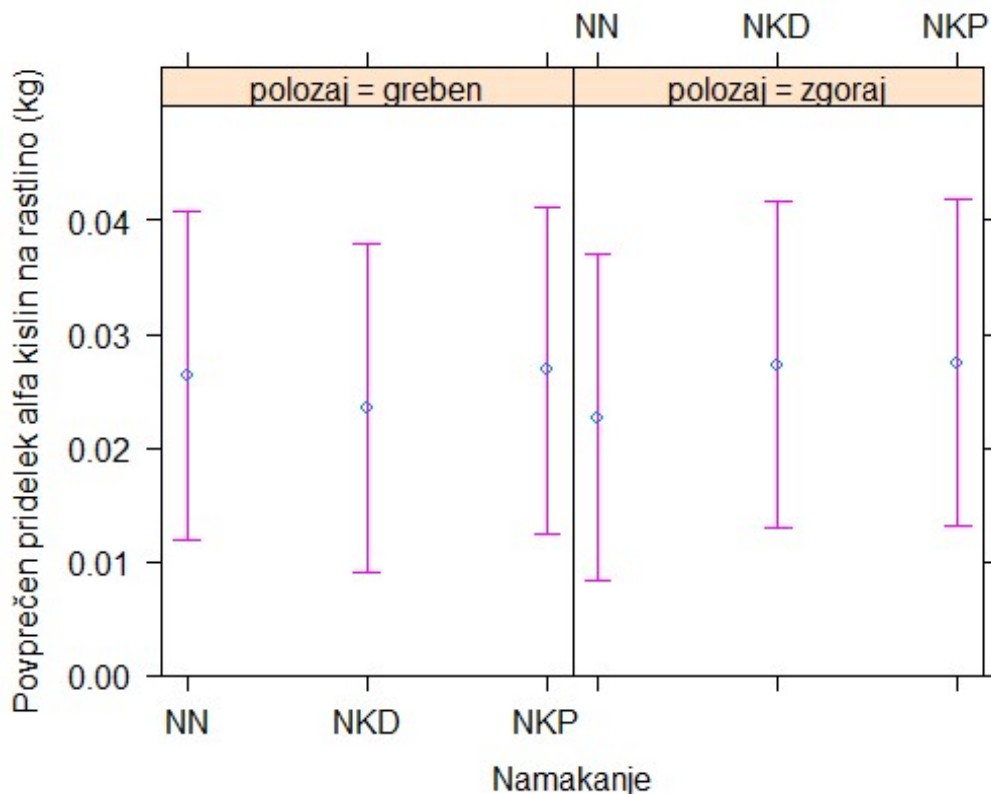


Slika 3: Pridetek α -kislina v suhi snovi storžkov hmelja (kg/rastlino) glede na način in količino namakanja v letih 2017 in 2018. Legenda: NN – nenamakano zgoraj, NKD – deficitno kapljično namakanje, NKP – polno kapljično namakanje. Črta povezuje povprečja po obravnavanjih

Povprečne vrednosti α -kislina v suhi snovi (SS) pridelkov (storžkov) hmelja pri vseh obravnavanjih so v letu 2017 znašale od 3,4 do 4,6 %, v letu 2018 pa od 3,1 do 4,0 %. Za namen analize podatkov smo izračunali pridelke α -kislina v pridelku suhe snovi storžkov na rastlino (kg), za kar smo povprečen pridelok na posamezni parceli pomnožili s povprečno vsebnostjo α -kislina (%) v SS pridelka ter preračunali na posamezno rastlino. V povprečju so količine α -kislina v pridelku hmelja za vsa obravnavanja v letu 2017 znašala 0,032 kg/rastlino, v letu 2018 pa 0,019 kg/rastlino. Nižje povprečne vsebnosti količin α -kislina so po posameznih obravnavanjih v letu 2018 jasno razvidne iz slike 3. Povprečni pridelki α -kislina na rastlino so bili v letu 2017 pri vseh obravnavanjih višji kot v letu 2018. V letu 2017 je bil najvišji povprečni pridelok α -kislina na rastlino dosežen pri obravnavanju NN (nenamakano) greben, najnižji pa pri NN zgoraj (na vrhu žičnice). V letu 2018 je bil najvišji povprečen pridelok α -kislina na rastlino dosežen pri obravnavanju NKP

(polno kapljično namakanje) zgoraj, najnižji pa pri obravnavanjih NN greben in NKD (deficitno kapljično namakanje) greben.

Analiza pridelka α -kislín v storžkih hmelja je v obeh letih izvajanja poskusa pokazala, da ni statistično značilnih razlik v povprečni vsebnosti α -kislín glede na način (greben ali zgoraj) in količino namakanja (polno, deficitno ali nenamakano) (slika 4).



Slika 4: Povprečna količina α -kislín v suhi snovi storžkov hmelja (kg/rastlino) s pripadajočimi 95 % intervali zaupanja glede na način in količino namakanja ocenjen na podlagi dvoletnega poskusa v letih 2017 in 2018. Legenda: NN – nenamakano zgoraj, NKD – deficitno kapljično namakanje, NKP – polno kapljično namakanje

Predvidevamo, da bi se pričakovane razlike pokazale v letih z manj padavinami. Vremenske razmere (razporeditev in količine dežja) v nobenem od poskusnih let niso bile primerne za določanje vpliva polnega in deficitnega namakanja na kakovost pridelka hmelja.

Kakovost pridelka hmelja je v obravnavanih letih proti pričakovanjem, saj je bilo leto 2018, zaradi količine padavin, primernejše za pridelavo hmelja in bi pričakovali večji pridelek α -kislín. Predvidevamo, da je razlog takšnih rezultatov zastajanje vode v hmeljišču, predvsem v kolesnicah, zaradi pogostih padavin v letu 2018. Zastajanje vode je bilo prisotno kljub bistveno manjšim količinam porabljene vode za namakanje kot je bilo predvideno po napovedi ARSO.

4 ZAKLJUČKI

V splošnem je bila količina α -kislina v suhi snovi pridelka hmelja na poskusnih parcelah večja v letu 2017 kot v letu 2018, kar je proti pričakovanjem, saj je bilo leto 2018 zaradi količine padavin optimalno za pridelavo hmelja. Predvidevamo, da je razlog takšnih rezultatov neoptimalna razporeditev padavin tekom rastne sezone, kar je privedlo v letu 2018 do zastajanja vode v hmeljišču, predvsem v kolesnicah. Prav tako se sorta hmelja Bobek po naših predvidevanjih slabo odziva na prekomerno vlažnost tal, predvsem v prvih dveh tretjinah rastne sezone. Statistično značilne razlike v pridelku α -kislina so bile le med obravnavanimi leti ne pa med obravnavanji z različno postavitvijo namakalne opreme (na žičnico, ali na greben) in količino namakanja (polno ali deficitno).

Vremenske razmere v nobenem od poskusnih let niso bile optimalne za določanje vpliva polnega in deficitnega namakanja na kakovost pridelka hmelja.

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

5 VIRI

- Allen R, Pereira L. S, Raes D, Smith M. 1998. Crop evapotranspiration. Irrigation and drainage paper No. 56. Rome, FAO, 300 s.
- Brooks S. N., Horner, C. E. Hop Production. U.S.D.A. Agric. Information Bulletin No. 240; 1961: 20-22.
- Čeh, B., Čerenak, A., Čremožnik, B., Ferant, N., Friškovec, I., Knapič, M., Košir, I. Jože, Leskošek, Gregor, Livk, Joško, Dušica M., Naglič, B., Oset Luskar, M., Pavlovič, M., Radišek, S., Rak Cizej, M., Rovan, A., Zmrzлак, M., Žolnir, M., Žveplan, S. 2012. Hmelj od sadike do storžkov: zbirka vsebin za izobraževanje za Nacionalno poklicno kvalifikacijo (NPK) Hmeljar/hmeljarka. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 135 s.
- Evans R. Hop management in water-short periods. EM4816, Drought Advisory; 2003.
- Graf T. Tröpfchenbewässerung im Hopfenbau - Feldversuche, Physiologie und Rhizosphäre, (Drip irrigation in hop production - field trials, physiology and rhizosphere), Doctoral dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan. 2016
- Hacin J. Prispevek k poznavanju vpliva dejavnikov okolja na rast in razvoj ter na pridelek in vsebnost alfa kislina pri hmelju. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 1989, str.70-74
- IHGC Economic Commission Summary Report, November, 2019 (<http://ihgc.org/>)
- Kišgeci J. Vodni režim biljaka hmelja u različitim uslovima navodnjavanja i mineralne ishrane. Doktorska disertacija, Novi Sad; 1974.
- Majer D. Vodni stres pri hmeljnih rastlinah ali O pomenu vode za življenje rastlin, o stresu pri rastlinah, o namakanju in o vplivu vodnega stresa na hmeljne rastline. Žalec:

- Hmeljarsko združenje Slovenije; Ljubljana: Ministrstvo za znanost in tehnologijo; Celje: Probi MM, 2000.
- Meier, U. 2001. Growth stages of mono-and dicotyledonous plants BBCH Monograph
- Middleton J.E. Irrigation needs of hops. Washington Agricultural Experiment Stations, Institute of Agricultural Sciences, Washington State University, Stations Circular 417. 1963.
- Milavec, K., Verbovšek, T. 2012. Večkriterijsko vrednotenje vodonosnika Spodnje Savinjske doline za pridobivanje toplotne energije. V: Ciglič, R., Perko, D., Zorn, M., (ur.). Geografski informacijski sistemi v Sloveniji 2011–2012. Ljubljana, Založba ZRC SAZU, str. 33–43
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. In: Priročnik za hmeljarje. Majer, D. (eds). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, 2002, str. 21-30
- Rybacek V. Hop production. Developments in Crop Science Volume 16, Elsevier, Amsterdam, New York; 1991: 211-219.
- Sasin A. Evaluation and determination of irrigation requirements in the Piestany production region. *Chmelarstvi*. 1990: 63(5): 72-73.
- Simončič A, Knapič M. The influence of different irrigation and fertilisation systems on weed development and hop yield = Vpliv različnih postopkov namakanja in gnojenja na pridelek hmelja ter razvoj plevelov. *Hmeljarski bilten*, 2004, letn. 11, str. 5-15.
- Slavik L., Kopecky J. Efficacy of hop irrigation under year with different precipitation levels. *Chmelarstvi*. 1997; 70: 44-46.
- Svoboda P., Hniličková H., Hnilička F. Changes in yield and quality of hop depending on the irrigation. *Cereal Res. Commun*. 2008; 36: 891-894.
- Thompson F.C., The influence of various factors on the a-acid content of hop cones. University of London, Wye College, Department of Hop Research, Annual Report. 1967: 38-39.
- UMS Hyprop. 2018. The University of Manchester. Multiphase flow and porous media. <https://personalpages.manchester.ac.uk/staff/nima.shokri/LabFacilities.html>
- Williams H., Brown J.F. Hop irrigation. Progress report. University of London, Wye College, Department of Hop Research, Annual Report. 1959: 70-81.
- Zattler F., Maier J., Über den Einfluss künstlicher Bodenbewässerung auf Ertrag und Qualität des Hopfens. *Hopfen-Rundschau*. 1968; 6: 2-7.
- Zepp G, Smith S, Harwood J. Hops: an economic assessment of the feasibility of providing multiple-peril crop insurance - Prepared by the Economic Research Service, USDA, for the Consolidated Farm Service Agency, Office of Risk Management; 1995.
- Zgodovina namakanja v Sloveniji. Agrometeorološki portal Slovenije. http://agromet.mko.gov.si/index.asp?ID=Namakanje/default_zgodovina.asp (29. jan. 2019)

FERTIGATION EXPERIMENT ON SAAZ HOPS IN 2017-2019Pavel DONNER¹ and Josef JEŽEK²

Professional article / strokovni članek

Arrived / prejeta: 25. 10. 2019

Accepted / sprejeta: 10. 12. 2019

Abstract

The three year (2017–2019) fertigation experiment with fine aroma hop variety Saaz was established in the Czech Republic in Saaz hop growing region. The control treatment included the contemporary growing technology without fertigation, just soil and foliar fertilization with 300 kg/ha of ammonium sulphate, 300 kg/ha of ammonium phosphate and 300 kg/ha of potassium chloride in the early spring, followed by 250 kg/ha of ammonium nitrate with limestone in May. Foliar fertilization mainly consisted of N, P, K, Zn and Mg application. The treatment with fertigation got basic dose of fertilizers (640 kg/ha of fertilizer containing NPK 20-7-10 + 4 % S, 2 % MgO) during sprouting, followed by fertigation 5-times (42,5 kg/ha of fertilizer containing NPK 12-12-36 + micro) and foliar application during vegetation period (various fertilizers containing mainly N, P, K, Zn, Mg, B, S). The amount of applied nitrogen, phosphorus and potassium was lower at the treatment with fertigation by 8,3 % N, 53,6 % P and 22,5 % K. The experiment proved the significant increase of yield by 27 %, 33 % and 16 % in 2017, 2018 and 2019 respectively at treatment with fertigation compared to control treatment and also the alpha-bitter acids content in hop cones was significantly higher in 2018 (by 14 %) at treatment with fertigation compared to control treatment. Nevertheless, in the years 2017 and 2019 there was no significant difference in alpha-bitter acids content between treatments. The results suggest that fertigation can intensify hop cultivation.

Key words: hop, irrigation, fertigation, water-soluble fertilizers

**POSKUS FERIGACIJE HMELJA NA SORTI SAAZ
V LETIH 2017 DO 2019****Izveček**

Triletni poskus (2017–2019) na področju fertigacije hmelja je bil postavljen v hmeljarski regiji Saaz na Češkem. Preučevana sorta je bila fina aromatična sorta hmelja Saaz. Kontrolno obravnavanje je vključevalo klasično pridelavo hmelja

¹ PhD student, Hop Research Institute Co., Ltd., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec, Czech Republic, e-mail: donner@chizatec.cz

² PhD, Hop Research Institute Co., Ltd., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec, Czech Republic, e-mail: jezek@chizatec.cz

brez fertigacije, samo gnojenje preko tal in foliarno gnojenje: 300 kg/ha amonsulfata, 300 kg/ha amonfosfata in 300 kg/ha kalijevega klorida zgodaj spomladi ter 250 kg/ha amonitrata v maju. Foliarno gnojenje je vključevalo v glavnem hranila N, P, K, Zn in Mg. Obravnavanje s fertigacijo je vključevalo osnovni odmerek 640 kg/ha NPK 20-7-10 + 4 % S, 2 % MgO med vznikom, sledila je fertigacija 5-krat v sezoni (42,5 kg/ha NPK 12-12-36 + mikrohranila) in foliarno gnojenje z različnimi gnojili, ki so vsebovala v glavnem N, P, K, Zn, Mg, B in S. Količina apliciranih N, P in K je bila pri obravnavanju s fertigacijo manjša za 8,3 % N, 53,6 % P in 22,5 % K. Obravnavanje s fertigacijo je doseglo v letih 2017, 2018 in 2019 za 27 %, 33 % oziroma 16 % večji pridelek kot kontrolno obravnavanje. Vsebnost alfa-kislin v storžkih je bila pri obravnavanju s fertigacijo v letu 2018 značilno večja (za 14 %) kot pri kontrolnem obravnavanju, v letih 2017 in 2019 pa med obravnavanjema ni bilo značilne razlike v vsebnost alfa-kislin. Rezultati nakazujejo, da s fertigacijo lahko intenziviramo pridelavo hmelja.

Ključne besede: hmelj, namakanje, fertigacija, vodotopna gnojila

1 INTRODUCTION

Hop growing success depends, among other factors, on natural precipitation. The need of hops for additional water is crucial especially during hot and dry years. When using drip irrigation with drippers above the hop rows, the water is distributed directly to the hop roots. Under rainfed conditions, the soil directly below plants is usually not wet after light rain, because hop's biomass shades the row from the rain and most of the water stays on the leaves or flows down the leaves and lands around the plant, not directly under it. With drip irrigation the area below the hop plant, with a width of ca 1-1.2 m and with uneven rainwater distribution at ground level, becomes irrigated. Since hop is grown in different soils types, it is hard to state universal pattern of irrigation water distribution in the soil. The experiment was held on loamy fluvisol, where the irrigation water moving in the soil – both vertically and horizontally – forms an onion shape of damp soil around the plant root system. The sandier the soil is, the narrower (and more “carrot” shaped) the damp soil pattern is (Hillel, 1997; Goldy, 2015).

The usual way of mineral nutrition of Czech hops consists of application of industrial mineral fertilizers in autumn or early spring around the time of pruning. It is followed by application of nitrate in form of nitrogen-based mineral fertilizers right before first hill-building ploughing. There is optional third fertilization (usually nitrate nitrogen only) before second hilling, but it is based on leaf analysis and is not practiced every year. Foliar application of micronutrients (also based on leaf analysis) together with plant protection products also occurs during vegetation. This way of fertilization is used on farms without drip irrigation.

The aim of the experiment was to test the effect of water-soluble fertilizers on hop yield and alpha-bitter acids contents compared to control treatment practiced by hop growers without irrigation system.

2 MATERIAL AND METHODS

Experimental area was located in a hop garden of Hop Research Institute's Farm in Stebník (Saaz hop growing region) which is 8 km from the town Žatec (Saaz). Hop variety Saaz was used for this experiment. The hop rhizomes were planted in 2004. Distance between rows and plants was 3 m x 1 m, the hop bines were trained in V-shape. Theoretical number of plants reached 3333 plants per hectare. Soil type at the experimental hop garden was fluvisol on alluvial sediments located close to river Ohře (Eger), where average annual precipitation doesn't exceed 500 mm and average annual temperature ranges between 8–9°C. Experiment was set up in a hop garden called „Zastávka V“ (0.52 ha). One treatment covered area of 0.11 ha – seven 55 m long rows. A unified cultivation technology, including plant protection, was held on the whole experiment the same. The whole experiment was irrigated (as required) by a drip irrigation placed on the wiring of hop garden (above the hop plants). Irrigation system consists of one dripline above a row with emitters 1m away from each other, each emitter discharges 2 l/h. Irrigation terms and dosages are shown in Table 1, weather conditions during vegetation periods are shown in Table 2. The hop gardens were irrigated as required, based on the decision of a skilled hop grower. The fertigation took 2 hours and was done at the end of (usually) 24 h long irrigation cycle (2 l/hour = 48 l/cycle).

There were two treatments: Control and Fertigation. The used fertilizers with regard to the treatment and contents of nutrients in fertilizers are summarized in Tables 3, 4 and 5. The control treatment, which is currently managed by a skilled hop grower, is presented in Table 3, the Fertigation treatment with water-soluble fertilizers is shown in Table 4. The sum of net content of selected macronutrients and zinc added in fertilizers are calculated in Table 5. Doses and terms of fertigation correspond with the demand on nutrients of hop plants concerning nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, sulphur and microelements such as zinc and boron. The basic dose of fertilizers was applied during sprouting, followed by fertigation 5-times and foliar application during vegetation period.

Table 1: Irrigation terms and dosages in 2017–2019

2017	
1. 6. 2017	22 l/plant (= 11 h x 2 l/h)
5. 6. 2017	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
9. 6. 2017	28 l/plant (= 14 h x 2 l/h)
13. 6. 2017	86 l/plant (= 43 h x 2 l/h)
21. 6. 2017	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
27. 6. 2017	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
4. 7. 2017	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
9. 7. 2017	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
total 2017	376 l/plant
2018	
8. 6. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
16. 6. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
21. 6. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
29. 6. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
6. 7. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
9. 7. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
18. 7. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
21. 7. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
27. 7. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
12. 8. 2018	48 l/plant (= 24 h x 2 l/h)
total 2018	480 l/plant
2019	
08. 06. 2019	88 l/plant (44 h x 2 l/h)
19. 06. 2019	36 l/plant (18 h x 2 l/h)
20. 06. 2019	40 l/plant (20 h x 2 l/h)
28. 06. 2019	48 l/plant (24 h x 2 l/h)
30. 06. 2019	40 l/plant (20 h x 2 l/h)
06. 07. 2019	48 l/plant (24 h x 2 l/h)
07. 07. 2019	40 l/plant (20 h x 2 l/h)
15. 07. 2019	40 l/plant (20 h x 2 l/h)
22. 07. 2019	40 l/plant (20 h x 2 l/h)
05. 08. 2019	40 l/plant (20 h x 2 l/h)
total 2019	460 l/plant

Table 2: *Weather conditions during 2017–2019 vegetation period*

	Temperatures (month avg.) [°C]				Precipitation (month sums) [mm]		
	2017	2018	2019		2017	2018	2019
April	8.9	13.7	10.6	April	47.2	15.6	28.4
May	15.6	17.7	12.4	May	21.4	41.8	60.4
June	19.8	19.3	22.8	June	48.6	48.2	19.8
July	20.4	22.1	20.9	July	67.2	17.0	31.0
August	20.1	22.4	20.4	August	65.8	10.2	47.2
Average	17.0	19.0	17.4	Sum	250.2	132.8	186.8

Table 3: *Control (hop growing in 2017–2019)*

BBCH	Month	Fertilizer	Dose	Application
01	March	ammonium sulphate (21% N; 13% S)	300 kg/ha	mounted spreader (m.s.)
		ammonium phosphate (12% N; 52% P ₂ O ₅)	300 kg/ha	
		potassium chloride (60% K ₂ O)	300 kg/ha	
31-35	May	ammonium nitrate with limestone (27% N)	250 kg/ha	m. s.
34	May	zinc (700 g/l)	0.5 l/ha	spraying machine (sp.m.)
		magnesium sulphate (15% MgO)	5 kg/ha	sp. m.
36-38	June	zinc (700 g/l)	0.5 l/ha	sp. m.
		magnesium sulphate (15% MgO)	5.0 kg/ha	sp. m.
		leaf fertilizer 'A' (6% N; 5,7% P ₂ O ₅ ; 6% K ₂ O)	10.0 l/ha	sp. m.
51& 55	July	leaf fertilizer 'A'	10.0 l/ha	sp. m.
63-67	July	leaf fertilizer 'A'	10.0 l/ha	sp. m.

In the middle of each August, we selected 32 random plants from both experimental and control plots. Those plants were selected only from inner rows. Number of bines on each wire was counted. All plants were harvested in the period of technological maturity. Hops harvested from each plant was weighed and recalculated on weight from one bine and weight of dry hops from 1 ha. The conversion ratio was set on the value of 4.1 (raw > dry hops). A sample of hops was taken from each harvested plant and analysed for alpha-acids content (ČSN 46 2520-15, Determination of alpha bitter acid by the conductometric method). The data were compared statistically using 'Microsoft Excel' software (Estimation and Testing > Two Sample Analysis).

Table 4: Fertigation (hop growing in 2017–2019)

BBCH	Month	Fertilizer (f.)	Dose	Application
09 & 11	April	'A' f. (20% N; 7% P ₂ O ₅ ; 10% K ₂ O; 4% S; 2% MgO)	640 kg/ha	row spreading
35	June	'B' f. (12% N; 12% P ₂ O ₅ , 36% K ₂ O; + micro)	42.5 kg/ha	fertigation I (fert.)
35	June	'C' leaf f. (29,5% P ₂ O ₅ ; 5% K ₂ O; 4,5% MgO; 3,1% Zn)	3.0 l/ha	spraying machine
		'D' leaf f. Boron (10,95% B; 150 g/l)	1.0 l/ha	sp. m.
36	June	'B' f.	42.5 kg/ha	fert. II
37	June	'E' leaf f. Zinc (40% Zn; 700 g/l)	0.5 l/ha	sp. m.
39	June	'C' leaf f.	3.0 l/ha	sp. m.
		'D' leaf f.	1.0 l/ha	sp. m.
39	June	'B' f.	42.5 kg/ha	fert. III
51 & 55	June	'B' f.	42.5 kg/ha	fert. IV
63	July	'B' f.	42.5 kg/ha	fert. V
65-69 & 71	July	'F' leaf f. (15,2% N; 22,8% S; 300 g S/l)	5.0 l/ha	sp. m.

Table 5: Sum of net amount of selected macronutrients and zinc added in fertilizers

[kg/ha]	N	P	K	Mg	S	Zn
Control	168	69	151	1.5	39	0.7
Fertigation	154	32	117	7.9	26	0.5

3 RESULTS AND DISCUSSION

The yields (averages of all 32 harvested plants) are shown in Table 6. The results of alpha-acid content (averages of 32 samples) are presented in Table 7. The significance difference between the treatments is shown in Tables 6 and 7.

The experiment with fertigation proved the increase of yield by 27 %, 33 % and 16 % in years 2017, 2018 and 2019 (Table 6). The aimed application of fertilizers (with mounted spreader and spraying machine) in connection with water-soluble fertilizers can assure an effective use of the nutrients. These results are closely related with the experiment in the USA (Delahunty and Johnston, 2015), where the increase of yield by fertigation, although it was done only in organic hop growing, was also confirmed. Hop growers in Hallertau (Germany) started to use fertigation in lower extent only few years ago after EU support on irrigation systems. The first results from Germany are summed up in master's thesis of Stampfl (2016), who published one-year results of experiment with fertigation from cultivars Perle and Herkules, stating, that statistical analysis didn't show expected results because of

weather conditions in 2016, when the effect of fertigation was limited due to sufficient amount of precipitation water and should be investigated more in the future.

Table 6: Average yield of hop cultivar Saaz (dry hops after conversion; 32 plants evaluated)

Year	Control	Experiment	Index	Statistics
	[t/ha]	[t/ha]	[%]	[significance]
2017	1.44	1.83	+27	Yes
2018	1.04	1.39	+33	Yes
2019	1.82	2.11	+16	Yes

Treatment did not have influence on alpha-acids content in hop cones in 2017 and 2019. The exception was the year 2018, when the significant increase of 14 %, compared to the Control, was recorded in Fertigation treatment. It seems to be caused by the unpredictable weather circumstances, where the negative effect on alpha-acids content is caused by high air temperatures (tropical days with over 30 °C) during second half of July and August (Türkott, 2005; Pokorný, 2011; Srećec et al., 2013). June, July and August in 2018 in the Czech Republic experienced several very hot periods. The fertigated plants seem to thrive better under hot weather conditions. The influence on alpha-acids' synthetic process is still hardly identifiable.

Table 7: Average content of alpha acids in hop cones of cultivar Saaz (Determination of alpha bitter acid by the conductometric method, according to the Czech norm ČSN 46 2520-15)

Year	Control	Experiment	Index	Statistics
	[% C-value]	[% C-value]	[%]	[significance]
2017	3.31	3.22	-3	No
2018	3.51	4.01	+14	Yes
2019	4.60	4.63	+1	No

4 CONCLUSIONS

Hop irrigation is an important stabilizing factor of profitable hop growing and enables the supply of nutrients in connection with water soluble (mineral) fertilizers (fertigation). In our experiment fertigation (5-times in the season) in combination of foliar fertilization (6-times in a season) significantly increased the hop yield in years 2017–2019 compared to the control treatment with no fertigation, just soil fertilization and foliar fertilization. The amount of applied nitrogen, phosphorus and potassium was lower at the fertigation treatment by 8,3%

N, 53,6% P and 22,5% K compared to control treatment. The year 2018 proved the significant impact on the alpha-acids content in hop cones at the Fertigation treatment by 14% compared to control treatment, however, in 2017 and 2019 alpha-acids content remained unaffected by the treatment.

Acknowledgement. The work was supported by Czech Ministry of Agriculture within the Research Project No. MZE-RO1319.

5 REFERENCES

- ČSN 46 2520-15 Determination of alpha bitter acid by the conductometric method. Czech Standardization Agency. Valid norm into force in December 1997
- Delahunty, K., Johnston, J. Investigating best practices for timing and amount of organic soluble nitrate fertigation of hops in the Northeast. USDA Northeast SARE Final Report: FNE 14-796, 2015. Retrieved from <https://projects.sare.org/project-reports/fne14-796/> [cited 2019-10-23]
- Goldy, R. Hop fertigation and nutrient management <online>. MSUE Southwest Michigan Research and Extension Center, 2015. Available at https://www.canr.msu.edu/uploads/236/71505/Hop_fertigation.pdf
- Hillel, D. Small-scale irrigation for arid zones – principles and options. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 1997, p. 21. ISSN 1020-0819
- Meier, U. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph. Julius-Kühn Institut, Quedlinburg, 2018, 97-101, 184-185. DOI: 10.5073/20180906-074619
- Pokorný, J. Influence of locality and year on hop production and quality. [in Czech] Ph.D. Thesis, 2011, Prague, Czech University of Life Sciences
- Stampfl, J. Auswirkungen von Fertigation und Tropfschlauchpositionierung auf den Ertrag und die Inhaltsstoffe von Hopfen (*Humulus lupulus*) – Masterarbeit. Technische Universität München, 2016. Available at https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ipz/dateien/masterarbeitstampfl_feb2017.pdf
- Srećec, S., Čeh, B., Savić Ciler, T., Ferlež Rus, A. Empiric mathematical model for predicting the content of alpha-acids in hop (*Humulus lupulus* L.) cv. Aurora. SpringerPlus, ISSN 2193-1801, 2013, vol. 2, 59, p. 1-5, DOI: 10.1186/2193-1801-2-59
- Türkott, L. Vliv povětrnostních podmínek na růst a vývoj ozdravených a neozdravených klonů chmele [in Czech]. Bioklimatologie současnosti a budoucnosti, Křtiny 12. – 14.9.2005, ISBN 80-86 690-31-08

SUSTAINABLE HOP CROP SUPPORT USING COMPOSTABLE PLA TWINES

J. van CALCAR¹ and Fernando EBLAGON²

Professional paper / strokovni članek

Received / prispelo: 25. 10. 2019

Accepted / sprejeto: 28. 11. 2019

Abstract

This report outlines the state of the art of plant guiding systems, their usage in protected and outdoor crops and typical requirements. Compostable twine guides based on man-made fibres have been in use now for the best part of a decade whilst their adoption and particulars with regards to their development and end of life options are discussed. The hop crop places a particularly interesting challenge, due to the fact that the loads experienced by the twine are higher than any crop in which the compostable bio-twines have been used before, but also because the growing season for the crop is very short when compared to the typical 11-month long seasons used in greenhouses for crops such as tomato or peppers. The crop also poses a new dimension for the product namely due to the specifics of the installation of the twine and that the production is outdoors. The report of results of the first growth season testing in hop fields and harvesting machines within LIFE BioTHOP project is also included. The tests point toward a clear pathway for the rational design and optimization of BioTHOP PLA based twines for an economically and environmentally sustainable hop crop.

Key words: hop, compostable, plant support, polylactic acid

TRAJNOSTNA OPORA HMELJU Z UPORABO PLA VODIL

Izvešček

To poročilo povzema pregled sistemov vodil za rastline, njihovo uporabo in tipične zahteve v zaprtih prostorih in na prostem. Kompostabilne vrvice iz naravnih vlaken so v uporabi že več kot desetletje, zato smo opisali njihove zahteve glede razvoja in možnosti ob koncu sezone. Hmelj predstavlja precejšen izziv za razvoj vrvic, saj je masa obremenitve vodil skoraj dvakrat tolikšna kot pri drugih rastlinah, pri katerih se bio-vrvice že uporabljajo, poleg tega pa je rastna sezona hmelja zelo kratka v primerjavi z drugimi rastlinami, ki imajo 11-mesečno rasno sezono, npr. paradižnik

¹ Ing, Lankhorst Euronete Portugal S.A., Prinsengracht 2, Sneek, Netherlands, e-mail: jorisvancalcar@lankhorsteuronete.com

² MSc, BEng, Lankhorst Euronete Portugal S.A., Rua da Cerfil, Nogueira – Maia, Portugal, e-mail: fernandoeblagon@lankhorsteuronete.com

ali paprika v rastlinjaku. Specifična je tudi namestitev vrvic in proizvodnja na prostem. Poročilo vključuje rezultate prve sezone testiranja BioTHOP PLA vrvic na hmelju v okviru projekta LIFE BioTHOP. S poskusom smo pridobili podatke, ki bodo omogočili racionalno oblikovanje in optimizacijo vrvic iz PLA za ekonomsko, okolju prijazno in trajnostno pridelavo hmelja.

Ključne besede: hmelj, kompostiranje, opora rastlinam, polimlečna kislina

1 INTRODUCTION

Plant training has been carried out since ancient times, with the aid of posts, frames and as of late, with trellis systems. The goal of the support is to optimize the exposure of the plant to sun, facilitate pruning and harvesting, and to maximize the available crop area for maximum yields.

During the 20th century and with the widespread adoption of synthetic polymers, there was a significant increase in the usage of first polyethylene (PE) and then polypropylene (PP) fibres, tapes and twines for the supporting of crops. There were significant advantages for the new materials. The natural fibre twines that were used had a tendency to rot and sometimes couldn't last a whole season, could be attacked by fungi, eaten by rodents, were hard to handle and in some cases due to issues in the natural fibre crops, there could be not enough natural fibre available for supporting plants.

The introduction of PP twines removed most of the aforementioned issues, even though the fibre also had its own set of problems. PP is sensitive to UV-radiation, meaning that once the polymer is exposed to sun light, the fibre would degrade and it'd quickly lose its strength and plants would fall. With time, UV stabilisers were developed and these in time became better and more effective (Sedlar, 1982).

The good performance of PP twines as a plant support brought nevertheless a new problem. Whilst twines from natural fibres could be disposed together with the plant waste and left to decompose naturally, the PP yarn would not degrade so easily and could not be composed together with the green waste. There were three solutions to this problem:

- 1) **Separation.** The plants should be separated from the PP twine. The PP twine would then go to landfill and the green waste to a composting process. This is a labour intensive and very expensive process. It could be done in small parcels but it quickly became obvious that this was not an option as the harvested areas started growing and the size of the farms increased.
- 2) **Landfill.** If the waste could not be separated, then it'd all be sent to landfill. This was acceptable in the past but once that landfill quotas started to

become scarcer, the price per ton of waste to be managed started to climb and this also became more difficult as an end-of-life option.

- 3) **Burning.** Finally, the last option was burning, either in a controlled manner for the production of energy, with checks and balances on emission, or just burning the waste by the producers. This last option is becoming more difficult as the controls on emission are becoming more stringent.

By the end of the 20th century, high molecular weight polylactic acid (PLA) became available in industrial quantities after Natureworks developed the ring-opening polymerization method (Farrington D. W., 2005).

PLA is well suited for support plants since it is compostable and could be managed as one together with the green waste. Lankhorst Euronete Portugal started working on the development of PLA twines in 2002. The development of this product took 5 years and the first prototypes were placed in greenhouses in the 2007-2008 season and launched commercially by Lankhorst Euronete as Elite[®] BIO twine in the Horti Fair in Amsterdam in 2010. The Elite[®] BIO twine has been used mainly as plant support in greenhouses and in its first 8 years an estimated 38.4 million plants have been supported using this compostable twine. This translates roughly onto 100 000 tons of green waste that was directly sent for composting without further treatment.

Hop crops offer a new challenge to the Elite[®] BIO due to the fact that the crop is outdoors, exposed to wind, rain and hail, which imposes significant both static and dynamic loads, not existing in protected crops. The weight of the plant is also significantly higher than pepper and cherry tomato plants that weigh around 1.5 - 2 kg, heavy tomato varieties up to 6 kg per plant, but hop plants can reach up to 11 kg (B. Čeh, 2019).

All these aspects are analysed in this article individually in order to propose the rational development of a PLA-based compostable supporting twine well suited for the hop industry. The development is focused both in the added value that the twine brings to the crop and the reduction of its environmental impact, but also to added-value options for the waste stream generated during the production of hops.

2 GREENHOUSE PROTECTED CROPS VERSUS OUTDOOR CROPS

In the European Union, in 2017, 64.8 million tonnes of vegetables were produced. From those, just over a quarter were tomatoes (Eurostat, 2018). Tomato plants are typically supported in order to maximize their productivity.

The production of tomatoes in greenhouses has reached very high yields, surpassing 100 tons of tomato per hectare (Ruijs, 2011). This high yields are

obtained most notably in protected crops in high tech glass-houses with controlled environments. These greenhouses are highly specialized and located in northern Europe where labour costs are high (FAO, 2013). Due to the high labour costs, additional costs in high compostable yarns could be offset by reduction in costs associated with segregation of waste plant and twine at the end of the season. This led to the development of a twine based on PLA (Elite[®] BIO) which is the only available polymer with a good resistance to UV rays, has acceptable mechanical properties, reasonable cost and is readily compostable.

Besides the mechanical and chemical requirements, there are functional requirements for twines that need to be addressed. First, the twine must be able to show a free-fall behaviour, needed during the installation of the twine. Other functional requirements include a soft characteristic in order to minimize damage on the stem of the plants and last but not least, the product should be approved for contact with foodstuffs according to the applicable EU and FDA regulations.

Beyond the aforementioned requirements, outdoor crops have higher requirements with regards to the properties of a twine. The influences of these factors are as follows:

- 1) **Temperature.** There are two factors to take into account when considering temperature and PLA twine. The first one is hydrolysis. Hydrolysis will become an issue for PLA at temperatures nearing 55 °C in the presence of humidity. Normally, in greenhouses these temperatures are not found since very high temperatures, the same as very low ones, are detrimental to the yield and survivability of crops. The second factor to take into account is that most properties in polymers show a non-linear response to temperature. In the range where plants can grow, this effect is not significant since the polymer will still be well below the glass transition temperature and well above the ductile to brittle transition temperature (M. R. Kaiser, March 2013).
- 2) **Rain.** Plants have a hydrophilic, high specific surface area which readily adsorbs water. This can lead to a static load increase during rainfall. Considering a typical surface area of leaves for the hop plant of 2 m², and a water film thickness of 100 µm (Hove E.H., 1996), the maximum weight that the plant will have due to rain is in the order of 1 kg, though it can be as high as 4 kg for the heavier Celeia hop variety. This is a significant load that will affect the creep behaviour on the yarns if plenty of rain is observed for extended periods of time, especially at the end of the season.
- 3) **Hail.** Even though the load from rain is a static load that increases steadily and reaches a plateau, hail will cause short lived dynamic loads on the twine. Assuming an average hail ball diameter of 33 mm, a terminal velocity of 14.5 m/s (NOAA, 2019) and a shock absorption distance of 2 to 5 cm, the load on the twine will be in the order of 3.50 to 8.50 kg per impact if the hail

speed is reduced by half upon impact (ToolBox, 2019). This of course can be increased significantly since many such impacts can occur at the same time.

- 4) **Wind.** Finally, wind can also lead to dynamic loads which can be calculated using certain assumptions from literature (J. A. Gillies, 2002). For wind speeds of up to 30 km/h, assuming a plant distance of 0.5 m, one stem per plant, 4 m high trellis and a drag coefficient (C_d) of 0.4, the tensile load on the twine is around 30 N for a tomato plant which is in the order of the weight of the plant. For hop plants, with the higher plant height and considering the same C_d , the dynamic tensile load can be as high as 140 N for gusts of 50 km/h, to which a static 110 N load should be added to account for the weight of the plant.

3 PLANT LOADS

In greenhouses the main focus on the development of a twine is static load. This due to the lack of dynamic load except for the sacking and harvesting operations and, in the case of tomato hooks, the lowering of the plants.

As a starting point, a comparison of strength of different twines in use can be made, where several alternatives can be found in the market and are in use in different areas nowadays.

In the USA, the most common solution is the use of coir of linear density 80 m/kg. Coir on the aforementioned runnage has an average breaking load of 450 N. In discussion with growers, it was found that due to the large variation in diameter along the length of the coir twine caused by the inherent unevenness of the fibre, a very high strength was needed in order to sustain the loads of the hop plants. Coir twine on the other hand has a very high elongation at break, in the range from 25% to 40%, due to the high twist construction so dynamic load due to wind and hail can be easily accommodated. Some growers also use paper twine but dipping in a copper solution is needed in order to prevent the paper twine from rotting at the base of the plant.

In Slovenia, different qualities of twine were sampled, all of them in polypropylene. Table 1 below shows a summary of the tested twines and fibres. There seems to be three different qualities of twine in use, 700 m/kg (monofilament), 1000 m/kg and 1200 m/kg. These nevertheless fall in two categories, one with a higher strength of 450 to 500 N and another one with 300 N. These are in line with the requirements placed on the coir used for hops in the US, though the lower strength twine might be better suited for the lighter hop varieties. For the 1000 m/kg sample recovered in 2018, a very low elongation at break was measured. This can lead to premature failure in dynamic loads caused by a large stress concentration in the knot area. This stress concentration cannot be

accommodated by plastic deformation on twines with low elongation at break (Pieranski P., 2001).

Table 1: Mechanical properties of polypropylene twines used in hop fields in Slovenia. Samples recovered from two different seasons.

Year	Sample	Linear density [tex]	Tenacity [N/tex]	Elongation [%]	Twist level	Average breaking load
2018	Monofilament	1320	36.9	10.9	None	478.8 N
2018	1200 m/kg	951	31.5	14.8	38Z	294.3 N
2018	1000 m/kg	1040	44.1	7	33Z	449.3 N
2015	1000 m/kg	1000	45.0	11.6	50S	441.4 N
2015	Monofilament	1420	36.0	11.4	None	500.3 N

A further step requires us to compare the typical twine strength with the loads placed on them. In Table 2 there is a summary of the varieties of hops typically grown in Slovenia and the associated load on the twine.

Table 1: Hop variety and plant weight (B. Čeh, 2019)

Variety	Plant weight[kg]
Styrian Golding	6.5
Aurora	7.6
Bobek	8.4 (estimated)
Celeia	9.3 – 11

Since Elite[®] BIO has a reasonably high elongation at break that can better absorb energy at dynamic loads, potentially lower runnage could be used in the guiding of hop plants, though this needs to be tested on site and in different hop varieties, growers and regions. The hop varieties affect the static load as a function of the plant weight. The region can affect the dynamic loads due to stronger winds or probabilities of hail.

During the 2019 season, four different Elite[®] BIO types were tested in hop fields in Slovenia in the Lower Savinja Valley region, a demo region of the BioTHOP project. A summary of type and mechanical properties is included in Table 3.

Table 3: A summary of type and mechanical properties of the four different Elite[®] BIO types tested in 2019 in hop fields of Lower Savinja Valley

Elite [®] BIO type	Average dynamic breaking load [N]
700 m/kg	250
600 m/kg	300
500 m/kg	360
400 m/kg	440

From the tested samples, the most likely qualities to be used in the future are the types 500 m/kg and 400 m/kg due to the strength being closer to the requirements normally placed in PP twines. Both these qualities also showed a survivability that was > 99.5% during the tests carried out in the field in 2019. Even though 100% is aimed for, there are circumstances in which the twine breaks due to reasons that cannot be easily elucidated.

4 END OF LIFE

There are a handful of options for the disposal of green waste at the end of the season. Ideally, a twine to be used in this application will be suitable to be used in all of them. Below is a summary of the most relevant end of life options and the compatibility of the currently developed Elite[®] BIO twine for each.

Industrial composting. Elite[®] BIO has been engineered in accordance to the EN 13432 standard in order to make a twine that is compostable in industrial composting environments. The main requirements for the EN 13432 is that all the components in the product must be biodegradable in industrial composting conditions, whereas up to 5 wt% can be included of materials which may not be compostable. With regards to the composting processes, the main types are briefly described below.

Windrow composting. In this system the green waste is arranged onto windrows, with or without a core. The core is normally an inflatable tube which is later on used to pump air into the pile in order to control the evolution of the composting process. This process takes anywhere between 6 to 12 weeks, depending on different variables. This is a reasonably simple process, with relatively low initial investment. On the other hand, air and soil contamination is an issue with these processes as dust, foul smells and spores become airborne and can cause issues in the areas surrounding the composting facilities.

Static pile. This is also normally an open air process, differing from the windrow composting in that the piles are not arranged in windrow configuration but instead in concrete compartments as shown in Figure below. Static pile processes can be carried out both in a central composting center but also on site. In Figure, a static pile composting operation is shown wherein a pepper grower in Belgium does his own composting and then reuses the compost in his own fields.

Aerated tunnel. This is the preferred system with regards to emission control. The first part of the process is done in an aerated tunnel with forced ventilation. The process is controlled via a closed loop system which manages the temperature of the process by the injection of air and humidity by a water spray located on the roof of the tunnel. In this process, all emissions are carefully controlled and the air is

filtered and processed in order to avoid any foul smells or spores to be sent into the atmosphere. These kind of processes can take place in populated areas due to the good level of emissions control.



Figure 2: *Windrow composting.*
(Greenville County Soil and Water Conservation District, 2019)



Figure 3: *Static compost pile with pepper plant green waste after 6 months*

Anaerobic degradation. Anaerobic degradation is a waste valorisation process wherein the degradation takes place in the presence of limited amounts of oxygen. In these conditions, biogas and a fertilizer are produced. The biogas can be reused for the production of heat or energy, and the resulting CO₂ produced can also be used to accelerate growth of species such as tomato plants in high tech greenhouses. If the right conditions are not met during a composting process and the composting pile does not get enough oxygen, the conditions for anaerobic digestion could be met, leading to the production of methane and risk of explosion. Also, the quality of the compost is not met since the outside of the pile might not get the same exposure to the high temperatures found inside the pile, leading to an inhomogeneous quality compost and only partially degraded twine and plants.

Home composting. There is another composting process which is carried out typically in garden bins or small enclosures. Typically in home composting bins the maximum temperature tends to be lower than that found in industrial composting operations and can be as high as 45 °C, which is well below the glass transition temperature of PLA (European Bioplastics, 2015). In these conditions, the degradation of PLA can take significant amounts of time. Since home composting bins can also suffer from lack of proper maintenance and the quality and frequency of addition of green waste can vary significantly, the quality of the compost cannot be guaranteed. Nevertheless, a comparative study of compost produced in home composting bins versus industrial composting plants has shown that comparable quality compost can be obtained from both processes (R Barrena, 2014). There are also home composting certifications although no standards or regulation are currently available (European Bioplastics, 2016).



Figure 4: Compost tunnel with automatic filling system in operation



Figure 5: Indoor compost maturation stage

Biodegradation performance of Elite[®] BIO twine. Green waste containing Elite BIO twine has been reported to successfully degrade under windrow, static pile and aerated tunnel composting processes. Most of the composting is done in northern Europe in both static pile and aerated tunnel by composting companies. Some growers do effectively carry out composting on site which allows them to produce and reuse their compost, notably in Belgium and also in France in the northern region of Brittany.

There have been no reports from the market regarding the use of Elite BIO twine in anaerobic digestion processes industrially. Nevertheless, PLA has been reported in the literature as digestible in these conditions (S Hobbs, 2019). The ideal conditions for PLA are when the temperature in the reactor is above the glass transition temperature for the polymer, i.e. 55 °C. The potential for methane production of PLA twine was measured to be in the order of 55 % of PLA transformed onto methane (H Yagi, 2009).

5 UV DEGRADATION

Considering UV degradation, the Elite BIO twine has been used in a high UV radiation area (Canary Islands) for two consecutive seasons, i.e. two years. After the two seasons, the twine was returned to the lab and tensile tested. The reduction in strength was negligible confirming the fact that the raw material is not affected by UV radiation. Two years is well beyond the time needed for the support of hop plants but clearly shows the extent of the stability of the polymer.

6 INSTALLATION AND REMOVAL

Due to the high runnage twine needed for hop crops, larger bobbins are better suited in order to minimize the change-over time needed during installation.

Furthermore, joining bobbins of twine using knots is discouraged due to the low knot efficiency achieved and the possibility for premature twine failure at this stress concentration points.

Most of the hop growers hire seasonal workers to do the field work, including the training of the twines in the spring. The twine is attached on the upper side to the wire of the construction by knot, made by the workers on a tractor-pulled platform, driving at a constant speed along the hop rows. The lower part of the twine is also knotted and the knot is pushed into the soil by a steel probe. The action of knotting has to be fast therefore the consistency of the twine matters to the farmers as it costs less if the workers are efficient at their work. The twine shouldn't be neither too hard nor too soft and should not be rough, so it sleeps easily from its packaging. Too hard twine can be hard to tie. Too soft a twine can split on the wire and would be too supple in the hands of a worker. The twine has to meet the needs of both.

The hop harvest process consists of several operations, namely cutting the plants on the field approximately 0.5 m above the soil by the device on the front part of the tractor, their removal from the trellis straight afterwards, feeding the plants onto the separation machine, separation of the cones from the rest of the plant parts in the harvest machine and finally chopping of the hop biomass after harvest.

7 SUMMARY AND CONCLUSION

The main characteristics of protected and open air crops have been identified and discussed in detail. With regards to the specifics of open air crops, there are a series of challenges which are new to the product and that can be tackled with modifications to the product.

Besides the fact that the twine needs to be used in outdoor crops, hop plants pose a much higher static load on the twine than we have ever encountered on crop supports. This static load by itself means extending the range of twine to beyond the runnage currently in use for Elite BIO twine in order to place a reasonable safety coefficient on the support of these plants. Based on the safety coefficient used nowadays for tomato and pepper crops, the twine would be greatly over specified considering comparable PP products used as hop guides. Extensive testing will be needed in order to develop a twine that can guarantee a well-supported crop and at a minimum cost for the farmers.

The installation and harvest stages for hops are expensive, labour intensive operations. In order to maintain the profitability of the hops crops, the twine must guarantee minimum impact on these operations. Two important attention points were identified. The first one focused on the impact of the twine configuration and

its effect on the knotting operation. The second issue was the stiffness of the twine. This vital information will help minimize the impact on the cost of the installation and removal operation.

Acknowledgements. This work was partially supported by the EU LIFE program under contract BioTHOP LIFE18 ENV/SI/000056. The contents of this publication are the sole responsibility of authors and do not necessarily reflect the opinion of the European Commission. The authors thank dr. Barbara Čeh and Lucija Luskar from Slovenian Institute of Hop Research and Brewing for valuable comments and input for this paper.

8 REFERENCES

- Araújo A., Oliveira M., Oliveira R., Botelho G., Machado A. Biodegradation assessment of PLA and its nanocomposites. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013; 21(16): 9477-9486.
- Barrena R., Font X., Gabarrell X., Sánchez A. Home composting versus industrial composting: Influence of composting system on compost quality with focus on compost stability. *Waste Management*. 2014; 34(7): 1109-1116.
- Čeh B. Odvzem hranil s hmeljem (*Humulus lupulus* L.) kot osnova za določanje gnojilnih odmerkov in masa hmeljevine glede na sorto = Nutrients uptake with hop (*Humulus lupulus* L.) as the basis for fertilization rate determination and hop biomass after harvest rela. *Proceedings of new challenges in agronomy 2019 - Ljubljana: Slovenian Agronomy Society*. 2019:63-69.
- Čeh, B. Plant protection - Introduction. Retrieved from Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2016/10/plant-protection-products-in-hop_SI-2019-13.5.2019.pdf. 2019, Accessed May 13, 2019
- Engineering ToolBox, (26. 11 2019). Impact Force. Pridobljeno iz Engineering Toolbox: https://www.engineeringtoolbox.com/impact-force-d_1780.html
- European Bioplastics. HOME COMPOSTING - FACT SHEET 2015. Berlin: European Bioplastics e.V. 2015
- European Bioplastics. Position of European Bioplastics - HOME COMPOSTING OF COMPOSTABLE BIOPLASTICS. Berlin: European Bioplastics e.V. 2016
- Eurostat. Agriculture, forestry and fishery statistics - 2018 Edition. Luxembourg: European Commission. 2018
- FAO. Good Agricultural Practices for greenhouse vegetable crops. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2013
- Farrington D. W., L. J. (2005). Poly(lacti acid) fibres. V B. R. S., Biodegradable and sustainable fibres (p. 191-220). Leeds, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Greenville County Soil and Water Conservation District. Aerated (Turned) windrow composting. Retrieved from Greenville County Soil and Water Conservation District: <http://www.greenvillesoilandwater.com/composting/aerated-turned-windrow-composting/>. 2019, Accessed September 9th 2019
- Hobbs S., Parameswaran P., Astmann B., Devkota J., Landis A. Anaerobic Codigestion of Food Waste and Polylactic Acid: Effect of Pretreatment on Methane Yield and Solid Reduction. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2019(2):1-6 .

- Huang, S. J. Poly Lactic Acide and Copolyesters. In C. Bastioli, Handbook of Biodegradable Polymers (p. 287-302). Shawbury: Rapra Technology Limited. 2005
- Gillies J. A., Nickling W. G., King J. Drag coefficient and plant form response to wind speed in three plant species: Burning Bush (*Euonymus alatus*), Colorado Blue Spruce (*Picea pungens glauca.*), and Fountain Grass (*Pennisetum setaceum*). Journal Of Geophysical Research. 2002; ACL 10-1-ACL 10-15.
- Kawai F. Polylactic Acid (PLA)-Degrading Microorganisms and PLA Depolymerases. In F. Kawai, Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials. American Chemical Society. 2010; 405-414
- Kaiser M., Anuar H., Razak S.B.A. Ductile–brittle transition temperature of polylactic acid-based biocomposite. Journal of Thermoplastic Composite Materials 2013; 26(2):216-226.
- NOAA, N. S. Severe weather 101: Hail basics. Retrieved from NOAA National Severe Storms Laboratory: <https://www.nssl.noaa.gov/education/svrwx101/hail/>. Accessed on September 9th 2019.
- Pieranski P., K. S. (2001). Localization of breakage points in knotted strings. New Journal of Physics, 10.1-10.13.
- Ruijs M. Soilless culture in Dutch greenhouse tomato;. Szentes, Hungary: Wageningen UR Greenhouse Horticulture and LEI Wageningen UR. 2011
- Sedlar, J. M. Photostabilisng mechanisms of HALS: A critical review. Polymer photochemistry. 1982: 175-207.
- Yagi H., Ninomiya F., Funabashi M., Kunioka M. Anaerobic Biodegradation Tests of Poly (lactic acid) under Mesophilic and Thermophilic Conditions Using a New Evaluation System for Methane Fermentation in Anaerobic Sludge. International Journal of Molecular Science. 2009; (10):3824-3835.
- Van Hove L.W.A., Adema E.H. The effective thickness of water films on leaves. Atmospheric Environment. 1996; 30(16):2933-2936.

HMELJEVINA KOT VHODNI MATERIAL ZA KOMPOSTIRANJE

Barbara ČEH¹, Lucija LUSKAR² in Bojan ČREMOŽNIK³

Izvirni znanstveni članek / scientific article

Prispelo / received: 23. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 16. 12. 2019

Izveček

Hmeljevina je ostanek zelene mase rastlin hmelja, ki ostane po strojnem obiranju storžkov (listi in stebela). Ker se v času obiranja iz hmeljišča odpelje skoraj celotna nadzemna masa hmelja, predstavlja hmeljevina dragocen vir organske mase in hranil za vračanje na kmetijske površine. V prispevku smo predstavili hmeljevino kot vhodni material za kompostiranje. Skupno je v letu 2019 v Sloveniji ostalo po obiranju hmelja približno 23.762 t hmeljevine. Tudi kmetije, ki imajo le ≤ 5 ha hmeljišč, razpolagajo z dovolj hmeljevine za dovolj velik kompostni kup (okoli 39 t). Manj bujna sorta hmelja Savinjski golding je v preučevanih letih 2014 in 2018 v primerjavi s sortama Aurora in Celeia vsebovala v hmeljevini statistično značilno manj kalija, v vsebnosti ostalih analiziranih hranil (fosfor, magnezij, žveplo in dušik) pa med sortami ni bilo značilnih razlik. Tako smo z enega hektarja dobili v masi hmeljevine 21–22 kg P₂O₅, 50–71 kg K₂O, 32–41 kg MgO, 5,5 kg S in 88–99 kg N. V količini zajetih hranil ni bilo značilnih razlik med preučevanima letoma, razen v količini MgO. Zaradi ozkega razmerja C : N = 13 : 1 je smiselno razmisliti o dodajanju materialov z večjim deležem ogljika, kot sta slama in žagovina, če kompostiramo skupaj trte in liste hmelja. Glede na razmerje C : N = 23 : 1 je sama trta hmeljevine brez listja boljša za kompostiranje, vendar bi jo morali rezati na manjše dele (1 cm).

Ključne besede: hmeljevina, kompostiranje, hranila, organska gnojila

HOP BIOMASS AFTER HARVEST AS INPUT MATERIAL FOR COMPOSTING

Abstract

After harvest of hops beside the hop cones we get also a huge amount of biomass that is left behind (leaves and stems). In the process of hop harvest, the whole hop plants are taken from the field. Hop biomass after harvest presents a valuable source of organic mass and nutrients; in this paper we evaluate it as a substrate for

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: barbara.ceh@ihps.si

² Mag. biotehnologije, isti naslov, e-pošta: lucija.luskar@ihps.si

³ Dipl. inž. agr. in hort., isti naslov, e-pošta: bojan.cremoznik@ihps.si

composting. In Slovenia, there was about 23,762 tons of hop biomass after harvest in 2019. Even small hop producers, that grow hops on ≤ 5 , produce enough biomass for enough big compost pile (about 39 tons). The hop biomass after harvest of variety Savinjski golding, in comparison to varieties Aurora and Celeia, contained statistically less potassium while there was no statistical difference in other analysed nutrients (phosphorus, magnesium, sulphur and nitrogen) in the investigated years (2014 and 2018). Hop biomass after harvest produced on 1 ha contained 21–22 kg P_2O_5 , 50–71 kg K_2O , 32–41 kg MgO , 5.5 kg S and 88–99 kg N. Apart from MgO , there were no statistically significant differences in nutrients content regarding the year of experiment (2014 and 2018). The hop biomass after harvest had C : N ratio of 13 : 1. When composting the whole hop biomass (stems and leaves), the addition of substrates with high carbon content might be needed. Composting only stems ratio would be better (C : N = 23 : 1), but the stems should be cut on smaller, 1 cm pieces.

Key words: hop biomass after harvest, composting, nutrients, organic fertilizers

1 UVOD

Kompostiranje je biološka razgradnja organskih snovi pod kontroliranimi aerobnimi pogoji (Epstein, 1997), naraven proces, pri katerem mikroorganizmi razgradijo organsko snov na vodo, CO_2 , stabilne produkte in mikrobnno biomaso. Namen kompostiranja je časovno in ekonomično optimalna razgradnja bioloških odpadkov do stabilnih humusnih kompozitov. Kompostiranje rastlinskega odpada je najboljši način za njegovo ponovno uporabo v hortikulturi in poljedelstvu (Boldrin in sod., 2009), saj pride ob zagotovljeni dovolj visoki temperaturi v kompostni gmoti med postopkom do eliminacije fitopatogenih bakterij in gliv (Suárez-Estrella in sod., 2006; Herrmann in sod., 1994), poleg tega se uničijo semena plevelov. Kakovost končnega produkta je odvisna od sestave vstopnega substrata, mikrobne populacije in načina kompostiranja (Neher in sod., 2013). Kompostiranje predstavlja pomembno rešitev za trajnostno ravnanje z organskimi odpadki. Na tak način sicer odvečno oz. neuporabljeno biomaso spreminjamo v bogate organske dodatke za kmetijstvo, hortikulturo in urejanje okolice (Neher in sod., 2013).

V literaturi najdemo zelo različne podatke o hranilih v vhodnih substratih za kompostiranje. Rynk (1992) navaja, da je priporočljivo razmerje za kompostiranje med ogljikom (C) in dušikom (N) 20–40, medtem ko Brodie (1993) svetuje nekoliko širše razmerje C : N, in sicer 30–50 : 1. Podobno razmerje navajajo tudi Román in sod. (2015), in sicer od 35 na začetku kompostiranja do 15 na koncu. Cooperband in sod. (2003) navajajo povprečne kemijske lastnosti vhodnih substratov, med katerimi je tudi listje, ki ima razmerje C : N = 27 : 1, medtem ko

Hitman in sod. (2013) poročajo o uspešnem kompostiranju rastlinskega materiala z nekoliko ožjim razmerjem C : N, to je 22.

Dve najpomembnejši hranili za kompostiranje sta ogljik in dušik. Za mikrobnost rast potrebujemo približno 25–30 enot ogljika na eno enoto dušika (Epstein, 1997). Bakterije vsebujejo od 7–11 % dušika (od suhe biomase), glive pa od 4–6 % (Anderson, 1956). V primeru ožjega razmerja med C in N lahko pride do uhajanja amonijaka iz kompostnega kupa, k čemur lahko pripomore tudi alkalno okolje ali anaerobni pogoji razgradnje (Knuth, 1970). V primeru preširokega razmerja med C in N pa lahko pride do upočasnjene rasti mikrobov, saj jim primanjkuje N. Uporaba komposta izboljša strukturno stabilnost tal in prispeva k imobilizaciji ogljika (Som in sod., 2009).

Hmeljevina je ostanek zelene mase rastlin hmelja, ki ostane po strojnem obiranju storžkov (listi in stebela, prepletena z vrvico, ki služi hmelju tekom rastne dobe kot opora). Ker se v času obiranja iz hmeljišča odpelje celotna nadzemna masa hmelja, predstavlja hmeljevina dragocen vir organske mase in hranil za vračanje na kmetijske površine. Po raziskavi Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (Čeh in sod., 2019b), je bila masa sveže hmeljevine v letu 2014 pri sorti Savinjski golding 14,4 t/ha, pri sorti Aurora 16,4 t/ha in pri sorti Celeia 16,3 t/ha, v letu 2018 pa pri sorti Savinjski golding 14,5 t/ha, pri sorti Aurora 13,4 t/ha in pri sorti Celeia 19,8 t/ha. V letu 2014 razlika v masi hmeljevine med sortami ni bila značilna, v letu 2018 pa je bila značilno večja masa hmeljevine izmerjena pri sorti Celeia v primerjavi s sortama Savinjski golding in Aurora. V povprečju dveh let med sortami v masi hmeljevine ni bilo značilnih razlik, povprečno je bila 15,7 t/ha (Čeh in sod., 2019b).

Problem ravnanja s hmeljevino je polipropilenska vrvica, prepletena s hmeljevino, ki se tudi s kompostiranjem ne razgradi in ostaja trdno prepletena in nerazgrajena tudi po več mesecih. Po navodilih IHPS (Čeh in sod., 2019a) je potrebno hmeljevino kompostirati in po tem procesu presejati, da se izločijo vrvice z materialom, ki je z njimi še vedno prepleten. Presejane ostanke polipropilenske vrvice se obravnava kot odpadki, ki se ga odpelje na urejene deponije, kjer so pooblaščen za ravnanje z odpadki. Kompostiranje doda vrednost hmeljevini, ki bi sicer predstavljala rastlinski odpad, saj s procesom kompostiranja pride do mineralizacije hranil in nastajanja humusa, ki predstavlja substrat za rast rastlin. Vendar se zaradi zamudnega in dragega procesa hmeljarji postopku presejevanja polipropilena iz organske mase izogibajo in hmeljevina ostaja neizkoriščen potencial. Problem bo rešen z vpeljavo biorazgradljive vrvice kot vodila v hmeljarstvo, ki ga preučujemo v okviru projekta LIFE BioTHOP, ki poteka od 1. julija 2019 do 30. junija 2022 in katerega demo regija je Spodnja Savinjska dolina.

V prispevku želimo predstaviti hmeljevino kot vhodni material za kompostiranje – potencial za pretvorbo v organsko gnojilo potem, ko bo vseboval biorazgradljivo vrstico, narejeno iz obnovljivih virov, in sicer vsebnost makrohranil, razmerje C : N in količino, pridelano v Sloveniji.

2 MATERIAL IN METODE

Podatke o površinah hmeljišč v Sloveniji in velikosti hmeljišč po kmetijah smo pridobili iz baze podatkov MKGP in opisujejo stanje na dan 4. 9. 2019 (Livk, 2019).

Za pridobitev podatka o količini hranil, zajetih v hmeljevini, smo v času tehnološke zrelosti posamezne sorte (Celeia, Aurora, Savinjski golding) v letu 2014 ročno potrgali po 30 zaporednih rastlin in po 5 zaporednih rastlin hmelja v letu 2018 pri vseh omenjenih sortah na petih različnih lokacijah in jih pripeljali do obiralnega stroja IHPS. Vsak vzorec smo ločeno strojno obrali na obiralnem stroju, ki loči storžke, trto in liste. Vsako frakcijo smo ulovili posebej, jo stekali ter takoj vzeli vzorce za analizo na vsebnost vlage ter kemijsko analizo na vsebnost dušika, fosforja, kalija, žvepla in magnezija. Vzorce smo sproti dostavljali v laboratorij IHPS. Vsebnost vlage so določili po metodi A-EBC:1997, 7.2, vsebnost N po metodi ISO 11261, Soil quality: Determination of total nitrogen – Modified Kjeldahl method, vsebnost fosforja (P), kalija (K) in magnezija (Mg) po metodi Hodnik (1988; Univerza v LJ, Katedra za pedologijo, prehrano rastlin in ekologijo: Kemične analize talnih vzorcev, rastlinskih vzorcev in odcednih vod, Ljubljana, 1988 (modificirana metoda)), vsebnost žvepla (S) po metodi Official Analytical Chemists, edited by Kenneth Helrich, 15th Edition, 1991, Sulfur in plants, Magnesium Nitrate Method.

Glede na podatke o pridelku sveže mase in vsebnosti vlage smo izračunali maso suhe snovi posamezne frakcije. Podatke o količini hranil v trti in listih (hmeljevini) smo preračunali na hektar glede na dejanske gostote nasadov posameznih sort, od koder smo vzorčili (3.200 do 3.300 rastlin/ha pri sortah Savinjski golding in Styrian Gold, 3.200 do 3.570 rastlin/ha pri sorti Aurora, 2.780 do 3.250 rastlin/ha pri sorti Celeia). Ker se količina pridelane hmeljevine v letu 2014 ni značilno razlikovala med sortami, v letu 2018 je bila značilno večja od sort Savinjski golding in Aurora le pri sorti Celei, med preučevanima letoma se ni značilno razlikovala (Čeh in sod., 2019b), smo za nadaljnje preračunavanje vzeli povprečen podatek o pridelani masi hmeljevine, to je 15,7 t/ha.

Za določanje razmerja med C in N smo ob koncu sezone obiranja v letu 2019 na več mestih vzorčili sedem različnih kupov hmeljevine (pet kupov celotna hmeljevina (listi in trta) in dva kupa samo trta). Vzorce smo dostavili v laboratorij IHPS, kjer so jih do analize zamrznili. Določanje organskega ogljika je potekalo s

spektrofotometrično metodo po metodi Hodnik (1988; Univerza v LJ, Katedra za pedologijo, prehrano rastlin in ekologijo: Kemične analize talnih vzorcev, rastlinskih vzorcev in odcednih vod, Ljubljana, 1988 (modificirana metoda)), vsebnost celokupnega dušika pa po metodi ISO 11261, Soil quality: Determination of total nitrogen – Modified Kjeldahl method. Za določanje razmerja smo delili vsebnost organskega ogljika z vsebnostjo celokupnega dušika.

Rezultate smo obdelali z računalniškima programoma Excel in Statgraphics Centurion XVI. Ekonomsko vrednost hranil smo izračunali s pomočjo podatkov, povzetih po Román in sod. (2015) in World Bank (2013).

3 REZULTATI

3.1 Površina hmeljišč v Sloveniji in velikost hmeljišč po kmetijah

V letu 2019 je bilo v Sloveniji 1.595 ha površin, namenjenih pridelavi hmelja (preglednica 1). V tem letu sta po površini prevladovali dve sorti, in sicer Aurora na 35 % ter Celeia na 34 % površin hmeljišč (Livk, 2019). Večji delež sta predstavljali še sorti Savinjski golding (11 %) in Bobek (10 %). Hmelj je pridelovalo 124 kmetov. Med njimi je največ takih, ki imajo ≤ 5 ha hmelja (45). Sledi 26 kmetov, ki prideluje hmelj na 5–10 ha, in 22 takih, ki pridelujejo hmelj na 10–15 ha. Ostali imajo večje površine hmeljišč (preglednica 2).

Preglednica 1: Površina hmeljišč v letu 2019 glede na sorto

	Površina (ha)	Delež %
Aurora	563	35
Celeia	536	34
Savinjski golding	172	11
Bobek	157	10
Styrian Wolf	42	3
Styrian Gold	40	3
Styrian Cardinal	16	1
Ostalo	68	4
Skupaj v letu 2019	1.595	100

3.2 Količina pridelane hmeljevine

Iz podatkov o količini dobljene hmeljevine glede na sorto (Čeh in sod., 2019b) smo izračunali standardni odklon po sortah. Povprečna masa hmeljevine je 15,7 t/ha in je lahko za skoraj 4 t/ha večja ali manjša glede na sorto; standardni odklon sorte Aurora je 3,1 t/ha, sorte Savinjski golding 3,6 t/ha in sorte Celeia 4 t/ha.

Kmetije, ki imajo od ≤ 5 ha hmeljišč, razpolagajo letno z okoli 39 t hmeljevine (preglednica 2), kar je dovolj za en kompostni kup. Hmeljarji, ki obdelujejo 5–10 ha hmeljišč, imajo na razpolago letno okoli 118 t hmeljevine, hmeljarji s 20–25 ha hmeljišč pa okoli 353 t. Skupno je bilo v letu 2019 v Sloveniji pridelano približno 23.762 t hmeljevine (preglednica 2).

Preglednica 2: Število hmeljarjev v Sloveniji v letu 2019 glede na površino in izračunana masa pridobljene hmeljevine

Površina (ha)	Število hmeljarjev	Masa hmeljevine na kmetijo* (t)
140–145	2	2198–2277 (2237)
35–50	3	549,5–785 (589)
30–35	4	471–550 (510)
25–30	4	393–471 (432)
20–25	11	314–393 (353)
15–20	7	236–314 (275)
10–15	22	157–236 (196)
5–10	26	79–157 (118)
0–5	45	0,05–79 (39)
Skupaj	124	23.762

* Masa hmeljevine je izračunana s podatkom Čeh in sod. (2019b), ki navajajo, da z 1 ha dobimo 15,7 t hmeljevine. V stolpcu je prikazan razpon mas za posamezno skupino, v oklepaju pa povprečna masa.

3.3 Količina hranil, odvzetih s hmeljevino

V preglednici 3 je predstavljena količina posameznih rastlinskih hranil, odvzetih s hmeljevino z enega hektarja. Manj bujna sorta hmelja Savinjski golding v primerjavi s sortama Aurora in Celeia vsebuje v hmeljevini statistično značilno manj kalija, v vsebnosti ostalih analiziranih hranil (fosfor, magnezij, žveplo in dušik) pa med sortami ni bilo značilnih razlik. Tako z enega hektarja dobimo v masi hmeljevine 21–22 kg P₂O₅, 50–71 kg K₂O, 32–41 kg MgO, 5,5 kg S in 88–99 kg N. V količini odvzetih hranil s hmeljevino v glavnem ni bilo značilnih razlik med letoma, razen v količini MgO, ki ga je bilo v hmeljevini enega hektarja značilno več v letu 2018 kot v letu 2014.

Preglednica 3: Količina rastlinskih hranil, odvzetih s hmeljevino (kg/ha) glede na sorto v letih 2014 in 2018

		P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	S	N
Sorta	Sav. golding	22 a*	50 ab	41 a	5,5 a	99 a
	Aurora	22 a	71 b	32 a	5,4 a	99 a
	Celeia	21 a	67 b	38 a	5,4 a	88 a
Leto	2014	20 a	61 a	31 a	4,7 a	90 a
	2018	24 a	65 a	43 b	6,2 a	101 a

*Enaka črka v stolpcu znotraj enega dejavnika (sorta, leto) pomeni, da med obravnavanjema razlika ni statistično značilna (Duncanov test, p=0,05).

3.4 Ekonomska vrednost hranil v hmeljevini

V preglednici 4 je predstavljen izračun ekonomske vrednosti hranil, ki jih ob koncu sezone s hmeljevino odpeljemo z njive, ovrednotena skozi ceno mineralnih gnojil. Vrednost makrohranil (N, P in K) v hmeljevini enega hektarja je 126 €. V primeru nadomeščanja N bi za 1 ha potrebovali 207 kg uree (46 %), kar bi pomenilo 117 € (Cenik mineralnih gnojil – RWA, 2019).

Preglednica 4: Povprečna masa odvzetih hranil s hektarja in cena hranil

	Enota	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	Skupaj
Hmeljevina	kg/ha	22*	63*	95*	
Cena mineralnih gnojil	€/kg	1	0,6	0,7	
Skupaj	€/ha	22	37,8	66,5	126 €

*Povprečje sort iz preglednice 3

3.4 Potencial hmeljevine za kompostiranje

V analiziranih vzorcih je imela hmeljevina razmerje C : N 13 (preglednica 5). Razmerje je precej ozko, kar pomeni, da je v hmeljevini v primerjavi s C veliko N, zaradi česar lahko pride do uhajanja N v obliki amonijaka iz komposta. Zaradi tega lahko pride tudi do zgodnjih pregrevanj komposta. O ozkem razmerju C : N v hmeljevini pišejo tudi Majer in sod. (2002). Román in sod. (2015) v takšnem primeru priporočajo dodajanje substratov z veliko vsebnostjo C, kot so suhi listi, žagovina ali drevesne obreznine. To je v diplomskem delu preizkušal Vipotnik (1993), ki je hmeljevini dodajal slamo ali žagovino, v volumskem razmerju s hmeljevino 1 : 1. Kompostni kup, v katerem je bila le hmeljevina, je imel razmerje C : N 11, hmeljevina s primešano slamo 19 ter hmeljevina s primešano žagovino 31. Kompostiranje v sodih je trajalo 80 dni, v tem času pa so spremljali

temperaturo, vlago in razmerje C : N.. Ugotovili so, da dodajanje organske mase z veliko vsebnostjo C izboljša proces kompostiranja hmeljevine.

Preglednica 5: Razmerje med C in N (C : N) v analiziranih vzorcih

	Št. vzorcev	C : N
Hmeljevina (listi in trta)	5	13 ± 1
Trta hmelja	2	23 ± 0,35

* ± Standardni odklon vzorca

Glede na širše razmerje C : N (23) analiziranih vzorcev nudi sama trta hmelja (preglednica 5) boljše pogoje za kompostiranje. V tem primeru ne bi bilo potrebno dodajati substratov, bogatih s C. Težava pri kompostiranju trt nastane, ker so trte običajno narezane na 15 cm dolge kose, kar v kompostnem kupu oblikuje veliko prostora za kisik, s tem pa omogoča (pre)hitro sušenje in oksidacijo na robovih velikih kosov. Aktivna površina je pri velikih kosih majhna in posledično je razgradnja organske snovi slabša. Z rezanjem trte na manjše dele (1 cm) bi lahko omogočili boljše kompostiranje trt. Vlakna trte vsebujejo velik delež celuloze (84 %) in lignina (6 %) (Reddy in Yang, 2009), ki predstavljata kompleksne ogljikove hidrate, zato lahko pride do pomanjkanja lahko dostopnega ogljika, ki je potreben za začetno segrevanje kompostnega kupa (Epstein, 1997).

4 ZAKLJUČKI

Z enega hektarja dobimo v masi hmeljevine 21–22 kg P₂O₅, 50–71 kg K₂O, 32–41 kg MgO, 5,5 kg S in 88–99 kg N. V količini zajetih hranil ni bilo značilnih razlik med preučevanima letoma (2014 in 2018), razen v količini MgO. V Sloveniji se letno proizvede dobrih 23 tisoč ton hmeljevine, kar v ekonomskem smislu pomeni okoli 200 tisoč €, če upoštevamo vrednost makrohranil (N, P, K).

Če kompostiramo skupaj trte in liste hmelja, je smiselno zaradi ozkega razmerja C : N 13 razmisliti o dodajanju materialov z visokim deležem ogljika, kot sta slama in žagovina. Če kompostiramo le trte, dodajanje drugih, z ogljikom bogatih snovi, ni potrebno, saj je razmerje C : N okoli 23. V tem primeru je potrebno zagotoviti, da so delci trt čim manjši, da preprečimo izsuševanje.

Hmeljevina ima potrebne karakteristike za uspešno kompostiranje (ustrezna vsebnost hranil in razmerje C : N), vendar je trenutno problem polipropilenska vrvica, ki je prepletena v biomasi. Vrvica PLA, ki jih uvajamo v demo regijo Spodnja Savinjska dolina v okviru projekta LIFE BioTHOP, so narejene iz polimerizirane mlečne kisline, ki ob vlagi in povečani temperaturi (>55°C) hidrolizira, s čimer hranila postanejo dostopna mikrobom (Karamanlioglu in

Robson, 2013; Wilfred in sod., 2018). Z uporabo takšnih vodil v pridelavi hmelja bo hmeljevina postala primerna surovina za kompostiranje na kmetijah, s čimer bo omogočeno pridobivanje kakovostnega organskega gnojila in s tem sklenitev krogotoka hranil oziroma krožno gospodarstvo na hmeljarskih kmetijah. Kompostiranje sicer ni odvisno le od vsebnosti hranil v vhodnem materialu, temveč tudi od pH, dostopnosti kisika, vlage in temperature (Epstein, 1997), zato je pridobitev kvalitetnega komposta potreben nadzor vseh parametrov, kar bo predmet nadaljnjega preučevanja v okviru projekta LIFE BioTHOP.

Zahvala. Članek je nastal v okviru projekta LIFE BioTHOP (www.life-biothop.eu). Projekt je sofinanciran v okviru programa LIFE Evropske Unije, s strani Ministrstva za okolje RS, občin Spodnje Savinjske doline (Braslovče, Polzela, Prebold, Tabor, Vransko in Žalec) in Združenja hmeljarjev Slovenije. Podatke o masi hmeljevine in odvzemu hranil s hmeljevino smo pridobili v okviru strokovne naloge Tehnologija pridelave in predelave hmelja, ki jo financira Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS.

Vsebina članka ne odraža nujno stališča ali mnenja Evropske komisije.

5 LITERATURA

- Andreson, M. S. Compost as means of garbage disposal. *The Soil and Crop Sci.Soc. of Florida Proc.* 1956; 16:134-144.
- Boldrin A., Andersen J. K., Møller J., Christensen T. H. in Favoino E. Composting and compost utilization: accounting of greenhouse gases and global warming contributions. *Waste Management & Research.* 2009; 27.8: 800–812.
- Brodie, H. L. Multiple component compost recipe maker. *American Society of Agricultural Engineers. Meeting (USA).* 1994; 94:3020-3063.
- Cooperband L. R., Stone A. G., Fryda M. R. in Ravet, J. L.. Relating compost measures of stability and maturity to plant growth. *Compost Science and Utilization.* 2003; 11(2): 113–124.
- Čeh, B., Radišek S., Friškovec I. Navodila za ravnanje s hmeljevino. IHPS. 2019a. Dostopno na: http://www.ihps.si/wp-content/uploads/2019/05/Navodila-za-ravnanje-s-hmeljevino-RS_BČ_MRC_IF.pdf (oktober, 2019)
- Čeh, B., Čremožnik, B., Oset Luskar, M. 2019b. Odvzem hranil s hmeljem (*Humulus lupulus* L.) kot osnova za določanje gnojilnih odmerkov in masa hmeljevine glede na sorto. V: ČEH, Barbara (ur.), et al. *Novi izzivi v agronomiji 2019 : zbornik simpozija, Laško, 2019 = New challenges in agronomy 2019 : proceedings of symposium.* Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo. 2019, str. 63–69.
- Epstein E. *Basic Concepts. V: The Science of Composting.* Epstein E. 1997. Lancaster, Technomic Publishing Inc. 1991: 19–52.
- Herrmann I., Meissner S., Bächle E., Rupp E., Menke G. in Grossmann, F. Einfluß des Rotteprozesses von Bioabfall auf das Überleben von phytopathogenen Organismen und von Tomatensamen/Impact of the rotting process of biodegradable material of household garbage on the survival of phytopathogenic organisms and of tomato

- seeds. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*. 1994; 48–65.
- Hitman A., Bos K., Bosch M. in Kolk A. Fermentation versus composting. *Feed innovation Services*, Wageningen. 2013: 1–25.
- Karamanlioglu, M. in Robson, G. D. The influence of biotic and abiotic factors on the rate of degradation of poly(lactic) acid (PLA) coupons buried in compost and soil. *Polymer Degradation and Stability*, 2013; 98(10):2063–2071.
- Livk J., ustni vir, po podatkih MKGP (oktober 2019)
- Majer D., Zmrzлак M., Knapič M., Obiranje hmelja. V: *Priročnik za hmeljarje*. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec, 2002: 175–194.
- Neher D. A., Weicht T. R., Bates S. T., Leff J. W. in Fierer N. Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times. *PLoS ONE*. 2013; 8(11): 79512.
- Reddy, N. in Yang, Y. Properties of natural cellulose fibers from hop stems. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 77(4): 898–902.
- Román P., Martínez M. M. in Pantoja A. *Farmer's compost handbook Experience in Latin America*. Dostopno na: <http://www.fao.org/3/a-i3388e.pdf> (oktober 2019)
- Rynk R., Van de Kamp M., Willson G. B., Singley M. E., Richard T. L., Kolega J. J. in Hoitink H. A. *On-Farm Composting Handbook (NRAES 54)*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 1992.
- RWA Slovenija, *Cenik mineralnih gnojil 2019*. (november 2019)
- Singh A. in Sharma S. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresource Technology*. 2002; 85(2): 107–111.
- Som M. P., Lemée L. in Amblès A. Stability and maturity of a green waste and biowaste compost assessed on the basis of a molecular study using spectroscopy, thermal analysis, thermodesorption and thermochemolysis. *Bioresource Technology*. 2009; 100: 4404–4416.
- Suárez-Estrella F., Vargas-García M. C., Ló Pez M. J. in Moreno J. Effect of horticultural waste composting on infected plant residues with pathogenic bacteria and fungi: Integrated and localized sanitation. 2007; 27.7: 886–892 .
- Vipotnik S., *Kompostiranje hmeljevine*. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 1993.
- World Bank. *Agricultural Production Statistics*. 2013. Dostopno na: <https://www.worldbank.org/en/research/commodity-markets> (oktober 2013)

VPLIV STARANJA NA KEMIJSKO SESTAVO HMELJA

Ksenija RUTNIK¹, Iztok Jože KOŠIR² in Miha OCVIRK³

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 25. oktober 2018

Sprejeto / accepted: 9. december 2018

Izveček

Med obdelavo in skladiščenjem je hmelj izpostavljen številnim neugodnim dejavnikom, na primer visoki temperaturi, kisiku ter svetlobi. Ti dejavniki v hmelju sprožijo procese, ki povzročijo spremembo kemijske sestave hmelja, ter s tem padec kakovosti hmelja. Najpomembnejši kakovostni parametri so alfa- in beta-kisline ter eterično olje hmelja, ki s časom razpadejo ali pa tvorijo oksidacijske produkte, ki negativno vplivajo na okus in aromo piva. Vsebnost oksidacijskih produktov je odvisna od načina skladiščenja, za najprimernejšega se je izkazalo skladiščenje pri anaerobnih pogojih ter nizkih temperaturah. Zelo uporaben pokazatelj kakovosti oziroma svežine hmelja je indeks staranja hmelja (HSI). Ta se tekom staranja viša, hmelj z visokim indeksom staranja pa je za proizvodnjo piva neuporaben. Tako je za hmeljarje in prodajalce hmelja velikega pomena poznavanje vpliva različnih načinov skladiščenja na spremembo kemijske sestave hmelja.

Ključne besede: hmelj, staranje, skladiščenje, alfa-kisline, beta-kisline, eterična olja, polifenoli, indeks staranja hmelja

IMPACT OF AGING ON HOP CHEMICAL COMPOSITION

Abstract

During the processing and storage, hops are exposed to numerous unpleasant factors, such as high temperature, aerobic conditions and light. These factors initiate processes that cause changes in the hop chemical composition and consequently decreasing of the hop quality. Main quality parameters of hops are alpha-acids, beta-acids and essential oils, which decay over time or form oxidizing products, which adversely affect beer flavor and aroma. Content of oxidizing decomposition products depends on storage method and among different methods, storage at anaerobic conditions and low temperatures turned out to be most

¹ Mag. inž. kem. teh., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: ksenija.rutnik@ihps.si

² Dr., univ. dipl. kem., prav tam, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

³ Dr., univ. dipl. kem. teh., prav tam, e-pošta: miha.ocirk@ihps.si

appropriate. Recently, the hop storage index (HSI) has become a very useful indicator of hop freshness for brewers. Hop storage index increases during aging hops and hops with high storage index are useless for the brewing industry. Therefore, knowing the impact of different storage methods on the hop chemical composition is of great importance for hop growers, merchants and brewers. **Keywords:** hop, aging, hop storage, alpha-acids, beta-acids, essential oils, polyphenols, hop storage index

1 UVOD

Spremljanje kakovostnih parametrov hmelja je za pivovarje že od nekdanj velikega pomena, saj jim ti parametri podajo oceno kakovosti kupljenega hmelja. Med klasične parametre kakovosti spadata vsebnost grenčic (alfa- in beta-kislina), ter količina in sestava eteričnega olja. Za pivovarje je vedno večjega pomena tudi starost hmelja, saj pri daljšem in neprimernem skladiščenju hmelja kakovost tega hitro pada, kar vpliva na okus in aromo piva. Staranje hmelja lahko spremljamo z indeksom staranja hmelja (Hop storage index - HSI). Med procesom staranja hmelja prihaja do oksidacijskih in razpadnih procesov, s čimer se spreminja sestava in količina grenčičnih hmeljnih smol, eteričnega olja, polifenolov, ter posledično tudi vrednost indeksa staranja hmelja. Hitrost spreminjanja parametrov je odvisna od vpliva več faktorjev, med odločilnejše pa spadajo temperatura skladiščenja, prisotnost kisika in svetlobe ter sama sorta hmelja (Čerenak in Košir, 2016).

Alfa-kislina, ki v osnovi niso grenkega okusa, med vrenjem pri proizvodnji piva izomerizirajo. Ta oblika izo-alfa-kislina pa pivu doda značilen grenak okus. V kolikor so alfa-kislina tekom staranja hmelja izpostavljene kisiku, ta povzroči njihovo oksidacijo in s tem preprečuje reakcijo izomerizacije alfa-kislina. Alfa-kislina lahko oksidirajo do različnih maščobnih kislina, ki dajejo hmelju privonj po sesirjenem (Roberts, 2016). Eterično olje hmelja daje pivu zanj značilen vonj in aromo. Med obdelavo in skladiščenjem hmelja hlapne komponente eteričnega olja izhlapevajo, zaradi česar se spreminja sestava eteričnega olja, poleg tega pa prihaja do oksidacijskih procesov, ki sestavo še dodatno spremenijo. Stopnja sprememb v sestavi in količini je poleg osnovnih faktorjev, kot so temperatura, prisotnost kisika in svetlobe, ter sorta hmelja, odvisna tudi od stopnje poškodb, ki jih utrpijo lupulinska zrna med obiranjem, sušenjem in pakiranjem (Eyres in Dufour, 2009). Z vse večjim zavedanjem pozitivnih učinkov polifenolov na zdravje, se večja tudi obseg raziskav na tematiko le-teh v hmelju. Polifenoli zlahka oksidirajo, zato delujejo kot antioksidanti. Nizko molekularni polifenoli v hmelju delujejo kot naravni antioksidanti in ščitijo pivo pred oksidacijo, hkrati pa izboljšujejo stabilnost okusa piva. Višje molekularni polifenoli prispevajo k barvi piva in povzročajo njegovo motnost (Almaguer in sod., 2014).

2 VPLIV STARANJA NA PARAMETRE KAKOVOSTI HMELJA

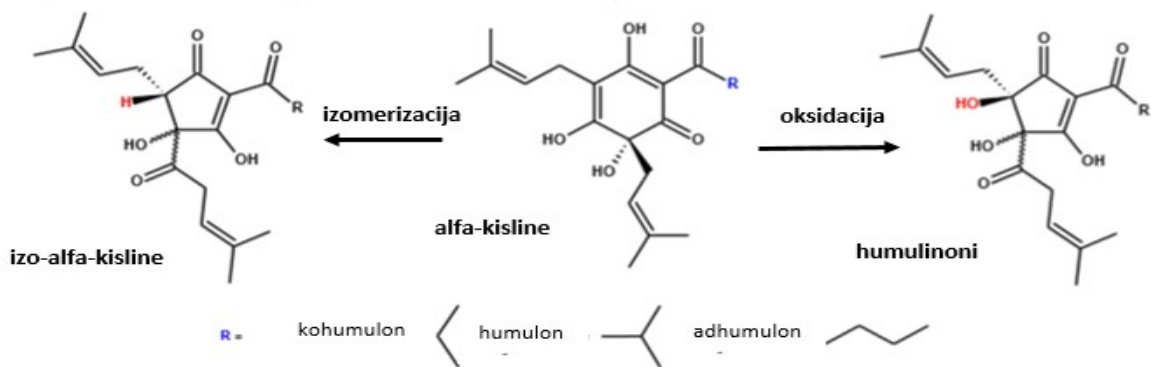
V nadaljevanju so predstavljeni bistveni parametri, ki se tekom staranja spreminjajo in tako vplivajo na kakovost hmelja, s tem pa posledično na kakovost, okus in aromo piva.

2.1 Alfa- in beta-kislina

Alfa- in beta-kislina v hmelju prištevamo med hmeljne smole, natančneje med mehke hmeljne smole. Glavni predstavniki alfa-kislin so humulon, kohumulon in adhumulon, poleg njih pa še prehumulon in posthumulon. Njihovo razmerje je odvisno od sorte hmelja. V vodi so zelo slabo topni, zato imajo na okus piva v takšni obliki zelo malo vpliva. Med samim postopkom proizvodnje piva, se pri dodatku hmelja v sladico alfa-kislina ekstrahirajo, zaradi termične obdelave med vretjem pa izomerizirajo v pripadajoče izo spojine, ki so dobro topne v vodi in dajejo pivu grenak okus. Podobno kemijsko strukturo kot alfa-kislina imajo tudi beta-kislina, katerih glavni predstavniki so lupulon, kolupulon in adlupulon. Beta-kislina so v vodi zelo slabo topne in v večini ne prispevajo h grenčici piva, saj so za njihovo izomerizacijo potrebni ekstremni pogoji (Roberts, 2016).

Splošno znano dejstvo je, da vsebnost alfa- in beta-kislin prične upadati takoj po obiranju hmelja, upad pa se nadaljuje tudi med samim skladiščenjem. Različni avtorji navajajo do 25 % upad alfa-kislin tekom enega leta pri skladiščenju hmeljnih briketov pri sobni temperaturi, brez prisotnosti kisika. Pri skladiščenju na zraku pri sobni temperaturi se vsebnost alfa-kislin lahko zmanjša do 90 % od začetne vsebnosti. Pri skladiščenju na hladnem, brez prisotnosti kisika, je upad alfa-kislin izrazito manjši. Beta-kislina so se izkazale za zelo obstojne pri anaerobnih pogojih, ob prisotnosti kisika pa njihova vsebnost zelo hitro pada. Poleg pogojev skladiščenja na znižanje vsebnosti alfa- in beta-kislin močno vpliva sorta hmelja, saj se nekatere sorte starajo in s tem izgubljajo vsebnost kislin bistveno hitreje kot druge (Mikyška in Krofta, 2012; Čerenak in Košir, 2016).

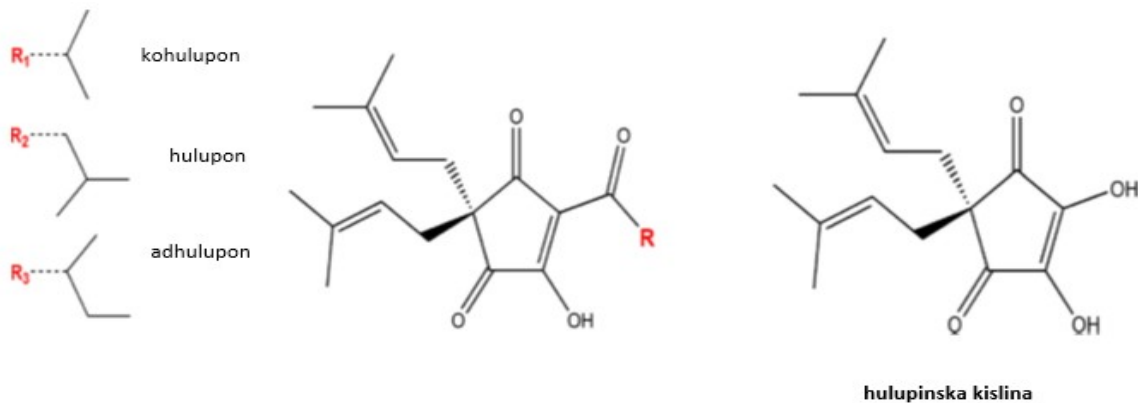
Glavni razlog za razpad alfa- in beta-kislin med skladiščenjem je reakcija oksidacije (Mikyška in Krofta, 2012). Primarni razpadni produkti alfa-kislin, ki jih imenujemo tudi humoloni, so humulinoni. Humulinoni so po kemijski strukturi skoraj identični izo-alfa-kislinam, razlika je le v dodatnem kisikovem atomu na ogljikovem obroču. Zaradi dodatne hidroksilne skupine je molekula humulinona bolj polarna, višja polarnost pa privede do večje topnosti v vodi, oziroma v pivu. Nastanek izo-alfa-kislin in humulinonov je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Tvorba izo-alfa-kislin in humulinonov iz alfa-kislin (Maye in sod., 2016)

V primerjavi z izo alfa-kislinami so humulinoni za 34 % manj grenki, vendar zaradi večje topnosti lažje prehajajo v pivo (Maye in sod., 2016). Iz tega vidika bi lahko bil hmelj z višjo vsebnostjo humulinona zelo zanimiv predvsem za pivovarje, ki pivo pripravljajo po postopku hladnega hmeljenja.

Razpadni produkti beta-kislin so huluponi, prikazani na sliki 2.



Slika 2: Struktura huluponov in hulupinske kisline (Almaguer in sod., 2014)

Huluponi, za razliko od beta-kislin, dajejo pivu grenak okus, zato so za pivovarje bolj zanimivi kot same beta-kislina. Študije navajajo, da dajejo pivu le 26 % manj grenkobe kot izo-alfa-kislina (Algazzali in Shellhammer, 2016). Hulupone lahko okarakteriziramo tudi kot intermediarne oksidacijske produkte, saj se z nadaljnjo oksidacijo pretvorijo v hulupinsko kislino. Hulupinska kislina ne povzroča grenkega okusa, njena vsebnost pa narašča s staranjem hmelja.

Alfa- in beta-kislina ter njune razpadne produkte v hmelju določamo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) v povezavi z DAD detektorjem. Prvi korak v analizi je ekstrakcija z mešanico dietiletra, metanola in razredčene klorovodikove kisline. Željene komponente v postopku ekstrakcije preidejo v etno

fazo, ekstrakciji pa sledita ločitev s tekočinsko kromatografijo in detekcija (Analytica-EBC 7.7, 2005).

2.2 Eterično olje in njegova sestava

Eterično olje hmelja prispeva k okusu in aromi piva. Sestavljeno je iz več kot 1000 komponent, v grobem pa jih lahko razdelimo na ogljikovodike, spojine s kisikom in spojine z žveplom (Almaguer in sod., 2014). Ogljikovodiki zlahka oksidirajo in polimerizirajo, med samim vrenjem pa ponavadi izhlapijo in so v pivu prisotni v majhnih količinah. Najbolj zastopan predstavnik je mircen. Spojine s kisikom so za pivovarje večjega pomena, saj le-te lažje preidejo v končni produkt, pivo. Žveplo vsebujoče spojine so v hmelju zastopane v sledovih, vendar imajo zelo nizko mejo zaznavnosti pri vonju in okusu, zato imajo lahko na aromo in okus piva velik vpliv. Komponente v eteričnem olju hmelja lahko po skupinah razdelimo tudi glede na tip arome. Povzročijo lahko sadno, citrusno, zeliščno, cvetlično ali pa tipično hmeljno aromo (Almaguer in sod., 2014).

S staranjem hmelja se izgublja hlapna frakcija, s tem pa se niža količina eteričnega olja pridobljenega iz hmelja. Raziskave navajajo, da se lahko v 6 mesecih količina eteričnega olja hmelja, skladiščenega pri sobni temperaturi, zniža za kar 90 % odstotkov. Izguba je manjša v kolikor hmelj skladiščimo v hladnih prostorih (Canbaş in sod., 2001). S spreminjanjem količine eteričnega olja se spreminja tudi njegova sestava in v nadaljevanju aroma in okus, ki jo hmelj daje pivu. Dosedanje raziskave navajajo, da se s staranjem hmelja zmanjša količina ogljikovodikov. Najbolj zastopan ogljikovodik v svežem hmelju, mircen, se tekom staranja, ob prisotnosti zraka, oksidira in pretvori v več kot 40 različnih spojin, mednje pa spadata tudi linalol in geraniol. Tako se na račun zmanjšanja količine ogljikovodikov zviša vsebnost kisikovih spojin. Kljub temu, da lahko svežemu hmelju glede na sestavo eteričnega olja določimo tip arome, se lahko ta tekom staranja spremeni v drug tip arome, na račun spremembe razmerij komponent v eteričnem olju (Roberts, 2016; Liu in sod., 2017). Intenziteta teh sprememb je odvisna tudi od sorte hmelja.

Količino eteričnega olja v hmelju določamo s klasično destilacijo z vodno paro. Destilacija poteka 3 ure, iz pridobljenega olja pa nato izvedemo analizo sestave s pomočjo plinske kromatografije, povezane s plamensko-ionizacijskim detektorjem (Analytica-EBC 7.10, 2002; Analytica-EBC 7.12, 2006).

2.3 Polifenoli

Hmelj vsebuje med 2 - 6 % polifenolov, za katere velja, da imajo visok antioksidativni učinek. Polifenolne spojine v hmelju veljajo za stabilizatorje grenčice in pene v pivu. Nekatere delujejo kot inhibitorji oksidaz alfa-kislin, ki

katalizirajo oksidacijo alfa-kislin. Kljub nekaterim pozitivnim učinkom, so polifenoli v pivu nezaželeni. Ti se med varjenjem piva povežejo z beljakovinami in tvorijo agregate, ki povzročajo motnost piva (Krottenthaler, 2009; Zhao in Sun-Waterhouse, 2019).

Večina študij, ki obravnava tematiko staranja hmelja je osredotočena na grenčice in eterična olja, le redke so pozornost posvetile polifenolom. Raven polifenolov skozi čas pada, posebej zanimiva pa je dinamika zniževanja njihove vsebnosti. V začetni fazi hrambe se porabi določena količina polifenolov, ki nato nekaj mesecev ostaja stabilna. V tem času se tudi vsebnost alfa-kislin ne znižuje z visoko hitrostjo (pri skladiščenju na hladnem). Po nekaj mesecih se pojavi nenaden padec količine polifenolov, s tem pa se začne tudi upad alfa-kislin. Velja omeniti, da ima na vsebnost polifenolov način skladiščenja minimalen vpliv, medtem ko je za alfa-kislino izjemno pomemben parameter (Mikyška in Krofta, 2012).

Skupne polifenole določujemo z UV-VIS spektrofotometrično metodo (Analytica-EBC 7.14, 2016).

2.4 Indeks staranja hmelja

Indeks staranja hmelja je za hmeljarje in pivovarje uporaben indikator kakovosti hmelja. Vrednost HSI nam podaja stopnjo oksidacije alfa- in beta-kislin tekom skladiščenja. Določanje poteka z UV-VIS spektrofotometrično analizo hmelja. Alfa- in beta-kislina absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 325 nm, njuni oksidacijski produkti pa pri valovni dolžini 275 nm. Indeks staranja hmelja predstavlja razmerje med absorbanco pri 275 nm in absorbanco pri 325 nm (A_{275}/A_{325}), torej razmerje med oksidacijskimi produkti kislin, ter med samimi kislinami (Analytica-EBC 7.13, 2007). Glede na vrednost HSI, lahko hmelj razporedimo v 5 kategorij starosti, prikazanih v preglednici 1 (Foster, 2001).

Preglednica 1: Kategorizacija hmelja glede na vrednost indeksa staranja hmelja (Foster, 2001)

Kategorija hmelja	Indeks staranja hmelja (HSI)
Svež	< 0,32
Rahlo postaran	0,33 – 0,40
Star	0,40 – 0,50
Močno star	0,51 – 0,60
Prestar	> 0,61

Hitrost naraščanja indeksa staranja hmelja je odvisna od treh dejavnikov: temperature skladiščenja, časa skladiščenja in poškodb hmelja med procesom obdelave in skladiščenja.

Pri izbiri temperature je optimalna izbira hramba v hladilnici pod 4 °C, vendar se s časom kljub nizki temperaturi vrednost HSI viša (Virant in Majer, 2003). Prav tako se vrednost zviša pri postopku briketiranja, saj je hmelj tekom obdelave izpostavljen visokim temperaturam in mehanskim silam. Poleg teh dejavnikov je HSI odvisen tudi od same sorte ter od klimatike letnika pridelave hmelja. Jasne meje med hmeljem, ki je še uporaben za hmeljenje in med tistim, ki to ni, raziskovalcem še ni uspelo začrtati.

3 ZAKLJUČEK

Pravilnost načina skladiščenja se izkaže za zelo pomembno zlasti v obdobjih s presežki hmelja na tržišču. V takšnih obdobjih so pridelovalci in prodajalci hmelja primorani ohraniti kakovost hmelja, saj s padcem kakovosti pada tudi cena hmelja. Kljub temu je nemogoče preprečiti nekatere procese, ki se odvijajo med skladiščenjem hmelja skozi daljše časovne obdobje. Tako s časom pada vsebnost alfa- in beta- kislin, spreminjata se količina in sestava eteričnega olja, vsebnost polifenolov, posledično s staranjem pa narašča vrednost indeksa staranja hmelja. V naboru raziskav na tematiko skladiščenja in obstojnosti hmelja manjka tista, ki bi med sabo povezala vse parametre kakovosti hmelja in podala jasno primerjavo med tistimi načini skladiščenja, ki so danes v uporabi. Da zapolnimo vrzel, bomo na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v naslednjih letih spremljali navedene parametre kakovosti petih sort hmelja, pri različnih načinih skladiščenja, ter poskušali ovrednotiti vpliv staranja hmelja na senzorično pivo.

4 LITERATURA

- Algazzali V., Shellhammer T. Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 74(1): 36-43, 2016.
- Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt E.K., Becker T. *Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. Journal of the Institute of Brewing*, 120: 289-314, 2014.
- Analytica-EBC/European Brewery Convention. Section 7 Hops, Method 7.7, Hop storage index of hops and hop pellets, The Brewers of Europe, Bruselj, 2005
- Analytica-EBC/European Brewery Convention. Section 7 Hops, Method 7.10, Hop storage index of hops and hop pellets, The Brewers of Europe, Bruselj, 2002
- Analytica-EBC/European Brewery Convention. Section 7 Hops, Method 7.12, Hop storage index of hops and hop pellets, The Brewers of Europe, Bruselj, 2006
- Analytica-EBC/European Brewery Convention. Section 7 Hops, Method 7.13, Hop storage index of hops and hop pellets, The Brewers of Europe, Bruselj, 2016
- Analytica-EBC/European Brewery Convention. Section 7 Hops, Method 7.14, Hop storage index of hops and hop pellets, The Brewers of Europe, Bruselj, 2007
- Canbaş A., Erten H., Özşahin F. The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets, *Process Biochemistry*, 36: 1053-2058, 2001.
- Čerenak A., Košir I.J. Skladiščna obstojnost slovenskih dišavnih sort hmelja, *Hmeljarski bilten*, 23: 5-13, 2016.

- Eyres G., Dufour J.P. Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics Beer in Health and Disease Prevention, 239–254, 2009.
- Foster A. The quality chain from hops to hop products. Proceedings of the Technical Commission IHGC of the 48th IHGC Congress. Canterbury. 2001.
- Krottenhaler M. Hops, Handbook of brewing, 85-104, 2009.
- Liu Z., Wang L., Liu Y. Analyzing Differences in Freshness of SA-1 Hops by Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Chemometrics, J. Am. Soc. Brew. Chem., 75(3):193-200, 2017
- Maye J.P., Smith R. Dry Hopping and Its Effects on the International Bitterness Unit Test and Beer Bitterness, MBAA TQ, 53(3): 134-136, 2016.
- Mikyska A., Krofta K. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage, Journal of the Institute of Brewing, 118: 269–279, 2012.
- Virant M., Majer D. Hop storage index – indicator of a brewing quality. Proceedings of the Technical Commission IHGC of the 49th IHGC Congress. Sofia, 2003.
- Zhao H., Sun-Waterhouse D. Interactions Between Proteins and Polyphenols in Beer, Encyclopedia of Food Chemistry, 550-553, 2019.

GLOBAL HOP MARKET ANALYSIS WITHIN THE INTERNATIONAL HOP GROWERS' CONVENTION

Douglas MACKINNON¹ and Martin PAVLOVIČ²

Original scientific paper / izvorni znanstveni članek

Received / prispelo: 23. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 10. 12. 2019

Abstract

This paper analyzes global market statistics and identifies trends in hop production and usage that occurred during the period 2009 to 2019. It discusses also the rise of intellectual property in the form of proprietary hop varieties, the increase in demand for craft beer and their effects on hop prices. By 2019, the activities of hop growers and merchants around the globe were driven primarily by the demand for proprietary varieties. The production of the world's largest supplier of hops, the U.S., was heavily influenced by intellectual property with 57% of its production containing some form of intellectual property protection. The International Hop Growers' Convention (IHGC) is one of the few neutral bodies in existence and therefore facilitated communication between global industry members during this time of rapid change.

Key words: hop market, hop varieties, intellectual propriety, prices, IHGC

GLOBALNA ANALIZA HMELJSKEGA TRGA V OKVIRU SVETOVNE HMELJARSKE ORGANIZACIJE

Izveleček

Članek analizira globalne tržne statistike in ugotavlja trende v pridelavi in rabi hmelja med 2009 in 2019. Obravnava rast intelektualne lastnine na področju lastništva sort hmelja, dvig povpraševanja po craft pivu in njun vpliv na cene hmelja. V 2019 je pretežna dejavnost hmeljarjev in trgovcev s hmeljem pogojena s povpraševanjem po sortah v privatni lasti. Pridelavo hmelja v največji hmeljarski državi ZDA izrazito zaznamuje zaščita intelektualne lastnine, ki se nanaša na 57 % pridelka hmelja. Svetovna hmeljarska organizacija (IHGC) omogoča v obdobju spreminjajočih se tržnih razmer nevtrarno globalno komunikacijo med hmeljarji in trgovci s hmeljem.

Ključne besede: hmeljski trg, sorte hmelja, intelektualna lastnina, cene, IHGC

¹ Prof. dr., University of Maribor & IHPS, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-mail: martin.pavlovic@ihps.si

² MSc, Hop Industry Expert, PhD Student University of Maribor, e-mail: doug@demackinnon.com

1 INTRODUCTION

From 2010 to 2019, historic and unprecedented changes occurred to both the supply and demand side of the global hop market that changed the role of hops for a generation. A wave of new proprietary varieties developed and released by private breeding programs in the U.S. over the previous decade increased in popularity.

By 2019, proprietary varieties solidified their majority position in the U.S. world hop market. Hop production in the U.S. was comprised of 57% proprietary varieties according to the German hop industry association (Piroué, 2019). The rapid growth of proprietary aroma varieties attracted the attention of media and hopheads worldwide. In 1997, the industry was comprised only of open source varieties (Pavlovič, 1997). By 2019, a majority of global production was proprietary. This change originated, in part, from the need for supply management, differentiation among competitors and greater added value, all of which warranted long-term sustainable prices.

This change and differentiation emerged from a decades-long trend of largely homogenous beer and hop production. Between 1985 until 2006, large breweries producing primarily lager- and pilsner-style beers grew larger. They consolidated global beer production gaining greater economies of scale along the way (NBWA, 2013). The brewers' pursuit of efficiency, trickled down to the hop industry in the form of prices that remained at or near the marginal cost of production. Among hop industry members worldwide, fierce price competition for an ever-shrinking market share ensued.

It was on that backdrop, in 2001, that one of the first proprietary varieties tracked as such by the United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service, reported the Warrior® Brand YCR5 as "YCR5 (Warrior-TM)" in 2001 (USDA NASS, 2018). The USDA NASS had previously been tracking Columbus/Tomahawk® (aka: C/T/Z®) and Zeus for several years, but did not acknowledge or list them as the proprietary varieties they were with the requisite symbols (i.e., ® or ™). Due to disputes over intellectual property (IP) ownership between John I. Haas, Hopsteiner, and Yakima Chief, IP rights on these varieties were not strictly enforced among growers. In 2001, the companies reached an amicable solution, a compromise from which everybody got something of roughly equal value. The experience was the industry's first introduction to the importance and perceived value of proprietary varieties. During the years that followed, hop prices reached their nadir. Nevertheless, private breeding programs continued developing new varieties. The Simcoe®, YCR 14 and Citra® HBC 394 varieties, which together accounted for 19.2% of U.S. production in 2018, only crossed the USDA NASS reporting requirement threshold, which requires a variety to be

produced by three growers before it must be publicly reported, in 2008 and 2009 respectively (USDA NASS, 2018).

Between 2009 and 2019, U.S. growers increasingly focused on producing aroma varieties. They quickly abandoned the alpha market they had dominated for decades to develop relationships with customers who offered longer-term sustainable prices. During this time, the majority of the world's production of alpha-acids, often used by large global brewing companies, shifted from the U.S. to Germany, which had traditionally been known for its fine aroma hop varieties.

The craft beer trend spread quickly across the globe. Development of new proprietary varieties accelerated. Varieties like Styrian Wolf® in Slovenia, Mandarina Bavaria in Germany, Galaxy™ in Australia and Nelson Sauvin™ Brand 85-03-06 in New Zealand represented attempts by other producer groups to capitalize on the global popularity of craft beer and offer up unique hop flavors of their own. Brewers worldwide, emulated the changes they saw in American beer drinkers craving new interesting flavors, but this often meant using American varieties due to the flavors that terroir imposed on the hops themselves. There were several exceptions, most notably the Nelson Sauvin™ Brand 85-03-06 of New Zealand. Few other new proprietary varieties out of the hundreds available enjoyed similar unicorn-like success.

2 MATERIALS AND METHODS

Hop market data collection. As a global commodity traded over the counter between buyers and sellers, opportunities for public discussion regarding market information were traditionally rare. Prices were seldom discussed openly among members. Secrecy was paramount. Among merchants, discussing pricing strategy was illegal due to anti-trust legislation. The information the industry enjoyed about the international hop supply situation came largely from the three sources: (i) The Barth Report, published by the Barth-Haas, (ii) Hop Guidelines published by Hopsteiner, and (iii) the International Hop Growers' Convention i.e. IHGC.

While the Barth Report and Hop Guidelines offered a comprehensive look at the industry as a whole once each year, the IHGC offered a smaller glimpse into the mechanics of the hop market, but on a more regular basis. Furthermore, it was the only non-merchant group that collected and disseminated global hop. The IHGC has always met three times each year and has published statistical and industry related updates subsequent to each meeting. The statistical data reported was largely comprised of estimates from its members, which, in 2019 included merchants, growers and associations from around the world (IHGC, 2019).

Merchant estimations of hop acreage around the globe were by far some of the most valuable contributions to the IHGC meetings. Although some of the estimates provided were only a merchant's best guess based on their intimate feel for the local situation, they provided data that did not differ greatly from more rigorous statistical survey data when such data became available. An incredibly useful addition to each IHGC meeting are the German hop industry association's reports (DHWV, 2019). They often provided a very useful and unique perspective on global market conditions from a very macro level.

The IHGC is the equivalent of the United Nations (UN) of the hop industry. It has no authority to enforce decisions made there upon individual members or member organizations. Nevertheless, the discussions that take place are incredibly valuable to all who participate (Pavlovič and Koumboulis, 2004; Pavlovič, 2014). Rapid changes necessitated increased communication between members of any industry to facilitate increased understanding of market dynamics and better decision making. From 2009-2019, the level of participation in IHGC activities increased, not only among existing members, but through the acceptance of new members into the fold. The IHGC provided a rare forum for open communication and a regular finger on the pulse of the market at meaningful periods during the production season. Without such communication, the opportunity for true clarity might otherwise only be possible after the fact, if ever. Although the IHGC considers membership requests from any party with an interest in hops, not everybody recognizes or fully appreciates the advantages the organization offers. Therefore, membership and attendance at meetings, typically around 30 people, enables professional hop market trends assessments. As it evolved together with the changing industry, the IHGC enacted new bylaws (Compliance Rules) to formalize and clarify the organization's activities while regulating the topics discussed during meetings (Pavlovič, 2019).

As of the November 18, 2019, there were 20 country members and 14 organization members. Under the umbrella of each of these organizations and countries, there were typically multiple members in attendance. The primary goal stated in the constitution of the IHGC, which may be found on the organization's web site www.ihgc.org is "... to safeguard the interests of the hop growers and of the whole hop industry in the member countries" (IHGC, 2019).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Between 2009 and 2019, craft beer production skyrocketed in response to an unquenchable thirst for the different beer flavors and styles produced by craft brewers (Watson, 2019).

American hop acreage increased 93.8% between 2011 and 2019 as seen in figure 1 (USDA NASS, 2019). Global hop acreage, as also seen in figure 1, increased by only 6.5% during that same time (Barth-Haas, 2019). Proprietary alpha varieties like C/T/Z® in the U.S. and Herkules in Germany were no less significant to the privatization of the genetic material within the industry. The intellectual property movement spread quickly across the globe. New varieties like Styrian Wolf® in Slovenia, Mandarin Bavaria in Germany, Galaxy® in Australia, Nelson Sauvin™ Brand 85-03-06 in New Zealand, and many more all vied for a share of the craft beer market with its lucrative and sustainable pricing (IHGC, 2019). Twenty-one years earlier, there were no proprietary hop varieties in the United States (USDA NASS, 2018).

From 2011 through 2018, the U.S. and German share of global production grew. By 2019 the U.S. and Germany produced 39% and 38% of the global crop respectively as seen in figure 1 (IHGC, 2019). Among the 18 other countries tracked by the IHGC, half had developed proprietary varieties of their own (IHGC-STC, 2019). The rapid reorientation by the industry toward proprietary varieties represented the efforts by the players in the brewing and hop markets to differentiate themselves from their competition. The attraction to the private breeding programs was also, in part, the strength of IP law.

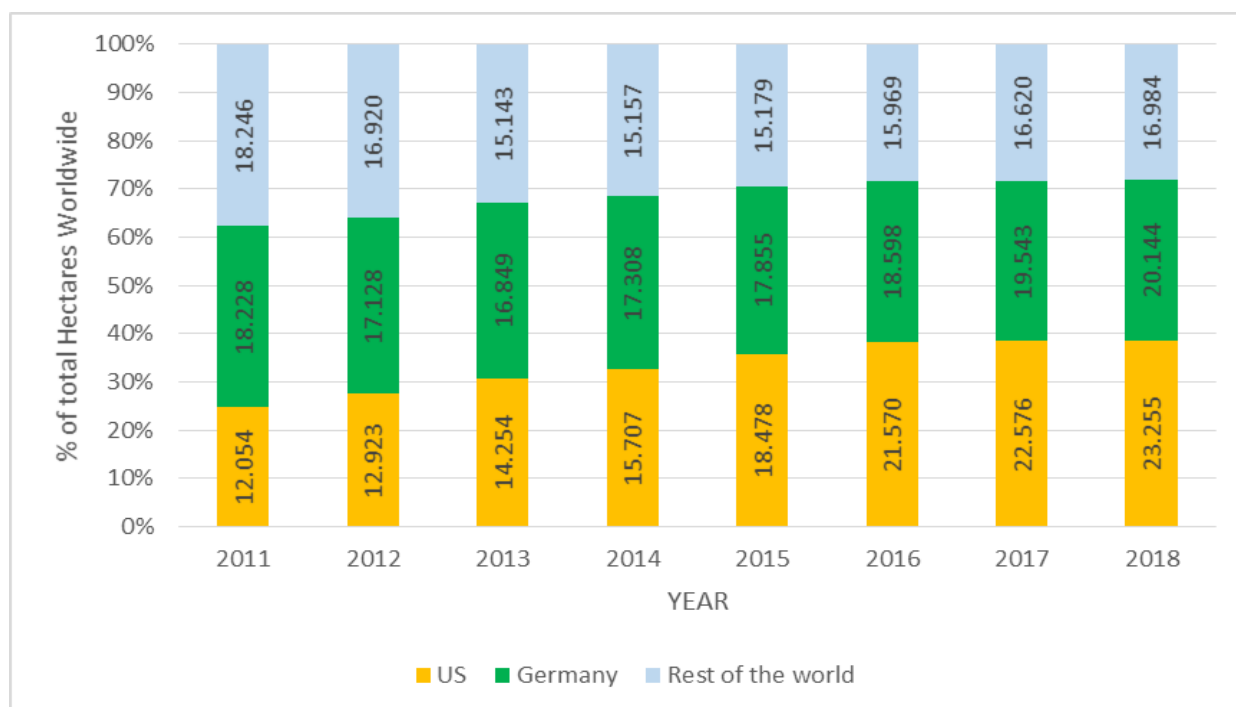


Figure 1: Production Region of Global Hop Acreage by % (Source: IHGC, 2019).

With many proprietary varieties, production, harvest timing, cultural practices and sales were controlled by the owners of the IP as terms of their licensing. In some cases, owners of IP retained title to the genetic material produced on third party

farms. This protected their massive long-term investments into creating new genetic material. Then there were the royalties. Paid per kilogram of hops produced, they could range from \$0.55 - \$0.88 per kilogram. Not only did this create extra profit for the owners during times when prices were profitable. Should prices ever return to a level where they covered only variable costs, it created a two-sided deadweight loss for the companies owning IP (Economides and Katsamakas, 2006).

Figure 2 demonstrates the levels to which season average prices in the U.S. dropped during the period from 1985 until 2006. During that time, both the hop and brewing industries suffered from the characteristics of a Bertrand trap where price was the primary means of competition (Cabral and Villas-Boas, 2005). In the hop industry, under such conditions, the growers or merchants that enjoyed greater economies of scale delivered product at lower prices. When prices were closer to marginal cost levels the grower or merchant with the greatest economies of scale (i.e., who produced more product at a lower fixed cost per unit) lost less money per unit. This counterintuitive strategy translated to survival as low-cost producers outlasted higher-priced competitors (USDA Agricultural Marketing Service, 2003). The data revealed exactly that in the attrition of brewers and growers in the U.S. during the 20th century. In the U.S., between 1950 and 2001, the number of hop farms shrank by 93% (MacKinnon, 2006). Many did not survive.

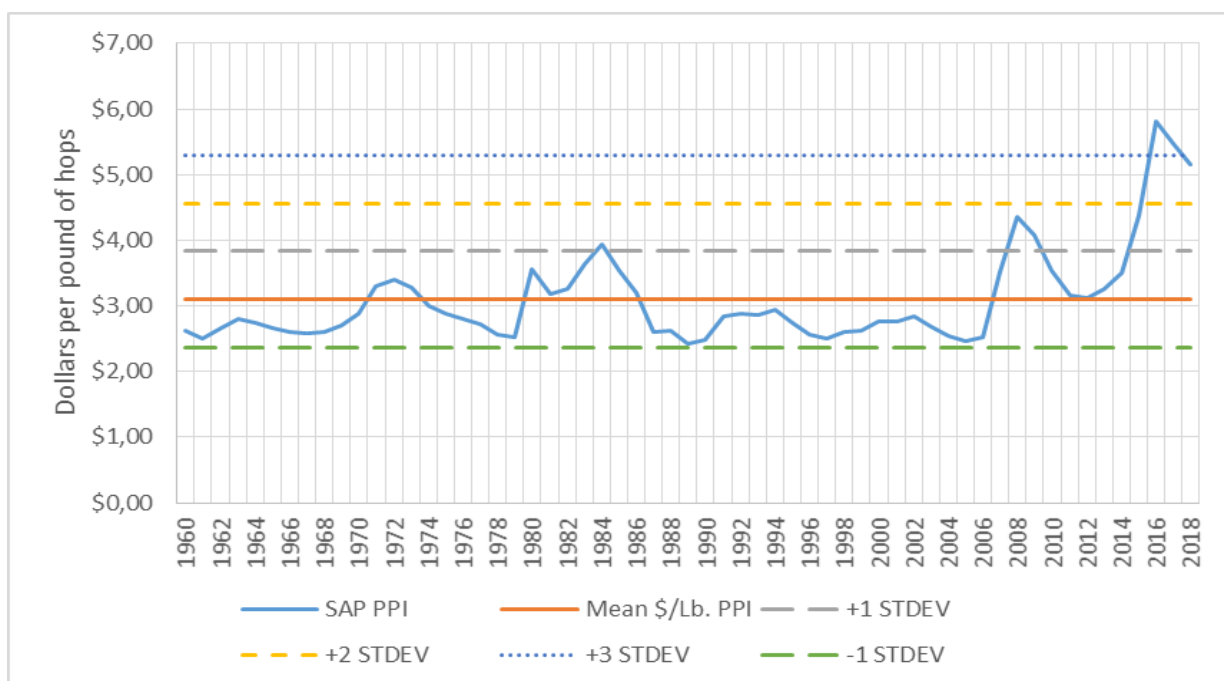


Figure 2: Season Average Price in the U.S. Adjusted for Inflation using the Producer Price Index PPI 1960-2018 (Source: USDA NASS, Federal Reserve Bank of St. Louis).

During that same period, production increased nearly 13% and acreage decreased by 10% (Barth-Haas, 2019). Two Federal marketing orders, enacted to regulate the volume of hops sold into the market, were terminated. Hop industry members worldwide suffered similarly devastating rates of attrition. The industry writhed under the freedom imposed by a completely open market and struggled to find a method to better manage supply.

The craft beer revolution, as many came to call it, was led by rapidly increasing demand for the India Pale Ale (IPA), a hop forward beer style (Brewers Association, 2019). In some cases, IPA style beers used 5-6 times the quantity of hops of a pilsner or lager. The surge in demand for craft beer styles with their high hopping rates was so powerful that it drastically altered the course of global hop usage as can be seen in figure 3 (Barth-Haas, 2019).

For the first time, in the U.S., proprietary aroma varieties like Citra®, HBC 394, Simcoe®, YCR 14, Mosaic®, HBC 369, Amarillo®, VGXP01 and Pahto®, HBC 682, were responsible for nearly 60% of total U.S. production (IHGC, 2019). Much of the rest of American production of public aroma and high alpha-acid producing varieties, like Cascade or Zeus respectively, were also produced primarily for the craft beer industry. By 2019, Germany produced 50% more alpha-acids than the U.S., primarily from the Herkules variety (IHGC, 2019).

Demand for American craft beer and production soared. With it, demand American varieties for use in U.S. craft beer production decreased exports of American hops by 27% from 71 million pounds in 2009 to a low of 51.6 million pounds in 2014 (Hop Growers of America, 2019). As a result, the adjusted season average price for American hops and the average price reported for German hops increased between 2009 and 2018 in response to intense demand (IHGC, 2019).

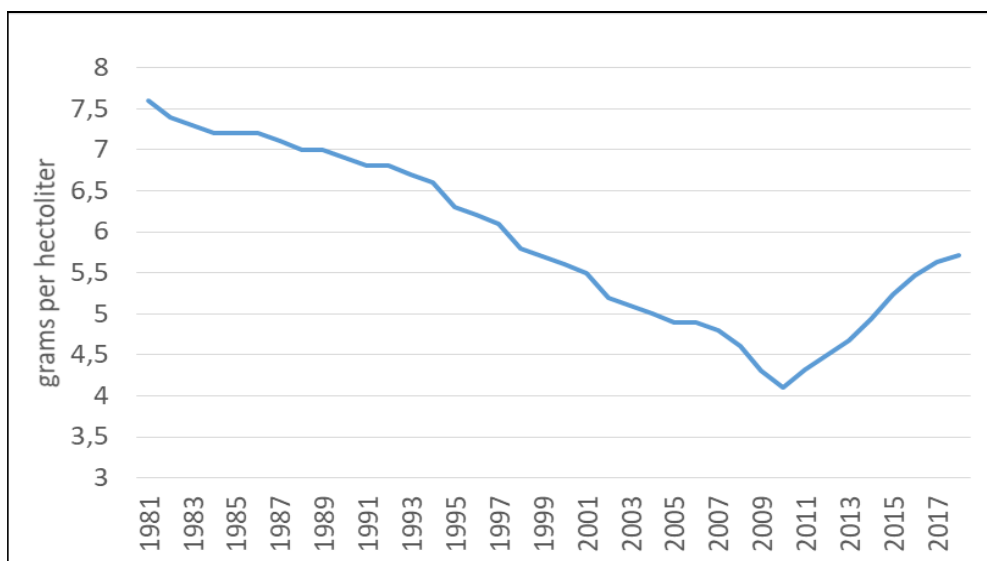


Figure 3: Hopping rate of alpha-acids per hl of beer – globally 1981-2018.

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. U.S. forward contract value soared to a peak of \$2.7 billion (2.52 billion euros) in 2016, after which they began to decline. The value of German forward contracts continued to grow and as of 2018 were valued at 1.06 billion Euros. Figure 4 displays the total value of contracted hops for the U.S. during this time also greatly increased (IHGC, 2019). All of this occurred despite the fact that global beer production plateaued in 2016 (Barth-Haas, 2019).

An accurate demand estimate for hops has always been elusive. Brewers large and small distribute requests for offers for hops across multiple hop merchants and increasingly common directly to growers seeking the best terms in an attempt to satisfy their needs. The IHGC has always made an effort to open a window onto both the supply and demand sides of the industry in the form of member discussion and debate.

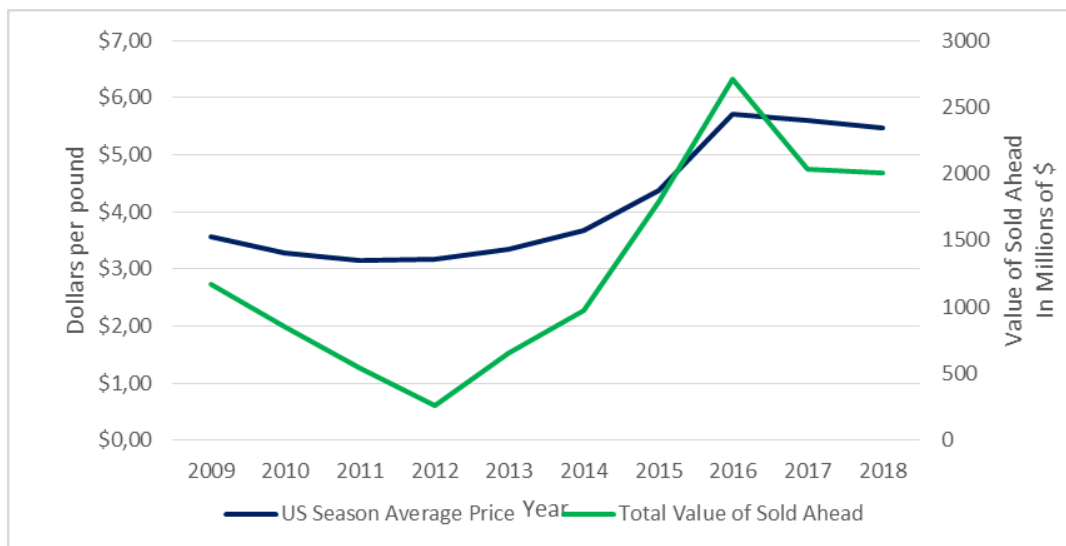


Figure 4: US Season Average Price & Value of Sold Ahead as reported to IHGC.

4 CONCLUSION

The future of the organizations rests in its ability to collect accurate and useful information and to convey that information to its members in a timely manner. The IHGC is in a constant battle to elicit more accurate information regarding supply and demand. Proprietary varieties, which in 2019 constituted a significant portion of the annual global production, represented the most recent chapter. Never before has so much information been concentrated among so few people. The change truly represents an opportunity for increased harmony within the industry resulting in long-lasting stable market conditions that are favorable for IHGC members, something which would fulfill its primary objective.

American participation is another perennial question for consideration by the organization. Given the relative size of producers within the U.S., should larger farms controlling substantial acreage be encouraged to join and participate in IHGC meetings at some level to further improve the accuracy of the data? Is such participation realistic, or even possible? These issues and more will determine the face of the IHGC and its ability to collect and report information in the future.

5 REFERENCES

- Barth-Haas GmbH & Co. KG. (1950-2019). *Barth Report*. Nuremberg, 2019.
- Brewers Association. <https://www.brewersassociation.org/insights/the-next-ipa/> (18.11.2019)
- Cabral L., Villas-Boas, M. Bertrand Supertraps. *Management Science*. 2005; 51(4): 559-613.
- DHWV, Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. Marktberichte 2005-2019. International Hop Growers' Convention (IHGC) = Internationales Hopfenbaubüro (IHB) = Comité international de la culture du houblon (CICH). 2019.
- Economides N., Katsamakas E. Two-Sided Competition of Proprietary vs. Open Source Technology Platforms and the Implications for the Software Industry. *Management Science*. 2006; 52(7): 1057-1071.
- Federal Reserve Bank of St. Louis. (2019). Producer Prices Index: Total Consumer Goods for the United States. Retrieved from <https://fred.stlouisfed.org/series/PITGCG01USA661N>. (18.11.2019).
- Hop Growers of America. Statistical Packets 2006-2018. 2019. Yakima, WA. USA.
- IHGC. Economic Commission Summary Reports Nov. 2009-2019. International Hop Growers' Convention, 2019. Retrieved from <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/act.htm> (29.11.2019).
- IHGC-STC. IHGC Scientific-Technical Commission. Hop variety list 2019. November 2019. Retrieved from [http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2019 NOV IHGC Hop variety list.pdf](http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2019%20NOV%20IHGC%20Hop%20variety%20list.pdf) (20.11.2019).
- Jones L. Beer by the numbers. A look inside the global beer market. National Beer Wholesalers Association. Retrieved from <https://www.nbwa.org/resources/look-inside-global-beer-market> (10.12.2019).
- NBWA. *National Beer Wholesalers Association*. Feb. 2013. Retrieved from <https://www.nbwa.org/americas-beer-distributors-economic-impact> (18.11.2019).
- Pavlovič M. Systemanalyse internationaler Hopfenwirtschaft: Entwicklung des Simulationsmodells für die technologisch-ökonomische Analyse auf Hopfenanbau-betrieben in Slowenien, (Schriftenreihe Agraria, Studien zur Agrarökologie, Bd 24). Hamburg: Verlag Dr. Kovač, 1997.
- Pavlovič M., Koumboulis F.N. Methodology of an IHGC market supply data collation = Metodologija analize tržnih podatkov ponudbe v okviru MHZ. *Hop bulletin = Hmeljarski bilten*. 2004; 11: 17-24.
- Pavlovič M. Hop industry: quality management, decision support modeling, (Schriftenreihe Agrarwissenschaftliche Forschungsergebnisse, Bd. 53). Hamburg: Dr. Kovač, 2014: 103.

- Pavlovič M. IHGC Executive Committee minutes. International Hop Growers' Convention. Ljubljana, Slovenia, 1 Aug. 2019. Retrieved from [http://www.hmeljgiz.si/ihgc/doc/2019 AUG IHGC ExecComm.pdf](http://www.hmeljgiz.si/ihgc/doc/2019_AUG_IHGC_ExecComm.pdf) (15.9.2019).
- Piroué P. Market review July 2019. Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. (DHWV). Economic Committee of the IHGC. July 30, 2019. Žalec, Slovenia. 2p.
- MacKinnon D. Hop Growers of America. Statistical Packet 2000-2005. 2006. Yakima, WA, USA.
- USDA NASS. National Hop Reports 2002-2018. 2018. Olympia, WA, USA.
- USDA NASS. Press Release. June 2019. Olympia, WA, USA.
- USDA Agricultural Marketing Service. October 2003. Yakima, WA, USA.
- Watson B. Historical Craft Brewery Production by Category. 2019. Retrieved from <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/> (18.11.2019).

SIMULATION MODEL FOR ECONOMIC ANALYSIS IN ORGANIC AGRICULTURE

Karmen PAŽEK¹ and Martin PAVLOVIČ²

Original scientific article / izvorni znanstveni članek

Arrived / prispelo: 23. 10. 2019

Accepted / sprejeto: 2. 12. 2019

Abstract

The simulation system KARSIM 1.0 consists of 148 deterministic production simulation models that enable different types of economic and financial feasibility evaluation for organic production and food processing. The KARSIM 1.0 was applied on a sample organic farm for the simulation of 3 different business alternatives. The simulation model results are further evaluated with two methods: analytical hierarchical process (Expert Choice Decision Support System software) and DEX-i expert system. Business alternative 3 (spelt grain processing) results with the highest multi-objective decision evaluation (Expert Choice = 0.275 and DEX-i evaluation = very good).

Key words: simulation model, KARSIM 1.0, MCDA, DEX-i, Analytical hierarchical process, Expert Choice, transition to organic farming.

SIMULACIJSKI MODEL ZA GOSPODARSKO PRESOJO EKOLOŠKE PRIDELAVE

Izvelek

Sistem simulacije KARSIM 1.0 sestavlja 148 determinističnih proizvodnih simulacijskih modelov, ki omogočajo oceno ekonomike in finančne upravičenosti investicije za ekološko pridelavo in predelavo hrane. KARSIM 1.0 je bil testiran na vzorčni ekološki kmetiji s simulacijo treh različnih poslovnih možnosti. Rezultati simulacijskega modela so nadalje ovrednoteni z dvema metodama: (i) analitičnim hierarhičnim procesom AHP (programska oprema strokovnjakom za podporo pri izbiri) in (ii) ekspertnim sistemom DEX-i. poslovna alternativa 3 (predelava pira) prejme najvišjo oceno večkriterijskega odločitvenega ocenjevanja (strokovna izbira = 0,275 in ocena DEX-i = zelo dobra).

Ključne besede: simulacijski model, KARSIM 1.0, MCDA, DEX-i, analitični hierarhični proces, izbira strokovnjakov, prehod na ekološko kmetovanje

¹ Prof. PhD., University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Sciences Maribor, Pivola 10, 2311 Hoče, Slovenia, e-mail: karmen.pazek@um.si

² Prof. PhD., the same address, e-mail: martin.pavlovic@um.si

1 INTRODUCTION

Since the beginning of the 1990s, organic farming has rapidly developed in almost all European countries. More than 5.4 million hectares were managed organically by almost 143,000 farms in the 25 countries of the European Union. This constituted till 2007 3.3% of the agricultural area and 3.2% of the farms in the EU. However, the total area under organic farming in the EU continues to increase, and in 2017 covered 12.6 million hectares of agricultural land. Organic area made up 7% of total EU agricultural land in 2017 (FiBL, 2019).

Converting to organic production necessitates changes in farm management which in turn can be expected to have consequences for a farm's characteristics and output. In order to plan a transition to organic production, basic information about expected changes in all framework is required. i.e. management of soil fertility in the organic crop rotations is one of important concept in organic agriculture (Doltra et al., 2019). The economics of transition and its consequences have been closely studied by Nauta et al. (2005) and different modelling approaches have been used such as model enterprise budgets. On the other side determining the market potential and exploring consumers preference for the "transitional" label could help farmers to market their products better and receive the financial rewards during the three-year traditional period. This would not only provide a financial reward to those in transition but also motivate more farmers who were hesitating about adopting the organic operations to make the change and adopt organic farming (Chen et al, 2018). In the last two decades, computer simulation has become an indispensable tool for understanding the dynamics of business systems (Kljajić et al., 2000). Experiences described in literature (Hester & Cacho, 2003; Recio et al., 2003; De Toro & Hansson, 2003; Lisson et al., 2003 & Romera et al., 2003, Rozman et al., 2013) emphasize that a variety of agricultural problems can be solved with computer modelling.

The article describes the methodology and procedure of implementation of cost simulation method in combination with MCDA for solving the organic farm planning problem for the 3 business alternatives.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Integrated deterministic simulation model KARSIM 1.0

For the financial and technological analyses of the organic production on Slovene farms, the integrated deterministic computer simulation model KARSIM 1.0 was developed. The model consists of 74 sub-models representing each organic crop, animal, and fruit production with related processing products. The sub-models are based upon deterministic technologic-economic simulation (Csaki, 1985; Rozman et

al. 2002; Pažek, 2004). Technical relations in the system are expressed with a set of equations or with functional relationships.

The whole system represents a complex calculation system. Through a special interface, the system enables simulation of different business alternatives at a farm level. Furthermore, based on enterprise budgets, cash flow projections can be conducted together with investment costs (Cost Benefit Analysis, CBA) for each business alternative, and the net present values (NPV) for each simulated alternative can be computed. All iterations (calculations for individual alternative) are saved into a database, which is finally used as one of the data sources for multi-criteria analysis. The simulation system is built in an Excel spreadsheet environment and upgraded with the Visual Basic code in order to ensure better functionality of a user-friendly calculation system.

2.2 The DEX-i multi-attribute decision model

The goal of a DEX-i decision model development is to provide answers which business alternative is the best solution for the given sample organic farm. In the first stage of DEX-i decision model development, the possible alternatives are identified (the alternatives are described in section 2.4) and the problem is decomposed into individual less complex problems (hierarchical tree of objectives – criteria).

The financial objective is composed into Net Present Value and Investment costs. Individual business alternatives can be related to different investment costs and therefore connected to the availability of farm investment capital, which as such represents one of the main constraints in the farm. Therefore, investment costs are included into the hierarchy. The human labor objective includes home and hired labor intensity. The technological objective is constructed from equipment and proceeding process requirements. The market objective is described as consumers' preference to an individual product related to each business alternative. The last objective is called risk and includes sensitivity of each alternative to spring frosts and hailstones.

In the next step, each attribute must be assigned with a set of qualitative values (scales). The database of alternatives generated by DSM is used for derivation of qualitative values for each attribute. Since simulation results are numerical, the categorization based on users' defined categorization rules must be performed. For instance, the categorization, for NPV is demonstrated using the following algorithm:

“ if $NPV > A$ and $NPV < B$ then NPV is assigned with qualitative value C “

Where: A - lower boundary of a categorization interval, B - upper boundary of a categorization interval, C - qualitative value for {A...B} interval

Table 1: Categorization table for numerically measured attributes.

Investment costs (€)	Qualitative Values
0-1000	Very low
1,001-3,000	Low
3,001-6,000	Average
6,001-9,000	High
9,001-12,000	Extra high
> 12,000	Extremely high
NPV (€)	
0-5,000	Low
5,001-10,000	Average
10,001-20,000	High
> 20,000	Extra high
Human labor (hours)	
0-50	Low
51-100	Average
101-200	High
> 200	Very high
Equipment requirements (equipment)	
0-2	Simple
3-4	Average
5-6	Demanding
> 6	Very demanding
Process (steps in processing technique)	
0-5	Simple
6-10	Average
11-15	Demanding
> 15	Very demanding

The numerical attributes for the DEX-i analysis were obtained by simulation using DSM, while the non-numerical attributes (Table 1) were estimated based on different data sources (i.e., past selling experiences). The following qualitative scales were used for non-numerical sub-attributes (Table 2).

Table 2: Qualitative scales for non-numerical attributes.

Market objective	poor; average; good; excellent
Spring frost frequency	high; average; low
Hailstone frequency	high; average; low

After each attribute has been assigned with its scales (qualitative value), the utility functions (knowledge base) are defined. This procedure is conducted for each level

in the hierarchy (partial utility function for aggregate attributes and overall utility function for the whole model except for the lowest level in the hierarchy).

Table 3: Decision rules for organic farm planning problem.

Financial objective	Human labor intensity	Technological objective	Market objective	Risk objective	Project evaluation
negative	*	*	*	*	unacceptable
<=bad	very high	*	poor	*	unacceptable
<=bad	<=high	unacceptable	poor	*	unacceptable
<=bad	<=average	*	poor	high	unacceptable
<=bad	*	unacceptable	poor	high	unacceptable
<=good	very high	unacceptable	poor	high	unacceptable
good	>=high	acceptable	excellent	low	very good
>=good	high; average	acceptable	excellent	low	very good
excellent	low	acceptable	excellent	low	excellent

The decision rules are presented in complex form where the asterisk “*” means any value and \geq equal or better (table 3). The relative importance of attributes can also be expressed by importance weights. In the DEX – i Expert System the estimation of weights is conducted either by multiple regression (the decision rules are interpreted as a set of points in a multidimensional space and approximated with the hyperplane) or by measure of normativity, a measure used in machine learning algorithms to identify most relevant attributes (Bohanec et al, 2000). Finally, attribute values for each alternative are put into the DEX-i evaluation table and the analysis is ultimately conducted.

2.3 The evaluation of alternatives with the Analytical Hierarchical Process

The Analytical Hierarchical Process (AHP) is best illustrated by Saaty (2008). The AHP is a decision support tool, which can be used for solving complex decision problems. It uses a multi-level hierarchical structure of objectives, sub-objectives, and alternatives. The variants are decomposed into specific parameters (criterion, attribute) and evaluated separately for each single parameter. Pros and cons as well as other influencing factors can be included as well. The final variant evaluation is provided with combine proceeding. Ratio comparisons are performed on a fixed ratio scale. The goal is defined as a statement of the overall objectives.

2.4 Selection of a sample organic farm and business alternatives

A sample organic farm in Northeast Slovenia was considered to apply the KARSIM 1.0, the DEX-i expert system, and the Expert Choice multi-objective decision model. The sample farm is a mixed organic farm (size = 10 ha) with a combination

of field crop, livestock and fruit production from a traditional grassland orchard. The organic farm regularly includes spelt, oil pumpkins, and buckwheat into crop rotation. Following business alternatives were identified:

Alternative 1: Traditional grassland orchard fruit processing. The average size of a grassland orchard is 2 ha (50% of apples, 30% of plums and 20% of pears). Possible processed organic fruit products are: apple vine, apple juice, apple cider, apple brandy, dry fruit (apples, plums and pears), and plum brandy.

Alternative 2: Goat milk processing into cheese (100 milking goats, average annual milkiness per goat 650 l).

Alternative 3: Spelt processing (the average annual harvest of un-husked spelt grain produced on 1 ha is 2,500 kg) into two equal share of spelt products – spelt grain and spelt flour.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The identified transition scenarios (see section 2.4) were evaluated with integrated DSM KARSIM 1.0 and the multi-objective models developed in DEX-i and AHP. In the first step, a financial CBA was computed for five different business alternatives on the organic farm. It should be mentioned here that the CBA was computed for 10 years at a 5% discount rate. The model also enables technological analysis – i.e. calculation of main inputs used, such as human labor (Table 4).

The CBA results (at 5% discount rate and after 10 years) show financial feasibility of alternatives 1 and 3 while alternative 2 is, at given simulation input parameters, not financially feasible (NPV = - 6,066 €; mainly due to significantly higher investment costs) (Table 4).

Table 4: DSM results (NPV calculated at a 5% discount rate; investment period of 10 years).

	Alternative 1	Alternative 2	Alternative 3
Investment costs (€)	4,942	41,492	2,917
NPV (€)	5,088	-6,066	10,461

The highest NPV value was observed for traditional grassland fruit processing (alternative 1), followed by spelt grain (NPV = 10,461 €), pumpkin oil (NPV = 5,895 €), and buckwheat processing (NPV = 2,540 €). A relatively high NPV value for alternative 1 can be explained by higher selling prices of different fruit products and higher quantity of processed fruit products that can be produced (apple cider,

juice, dry fruit, apple wine, plum brandy). In the next step the results of a simulation were further evaluated using the presented MCDA approach.

In addition to the CBA analysis, the KARSIM 1.0 model provides many technical data for each project. This data is further used for evaluation of some attributes' values. Numerical attribute values (qualitative as input for the DEX-i and AHP decision model) are assessed automatically by the KARSIM 1.0 computer model (based on the user defined costs intervals). The remaining attribute values are determined by the analyst, i.e. decision-maker. The assessment of sub-attributes NPV, investment costs, equipment, food processing techniques, and labor intensity was conducted by the computer model automatically according to the user defined categorization rules (Table 1). The sub-attributes spring frost probability and hailstone frequency and market objectives were assessed analytically (Table 5).

Table 5: DEX-i evaluation results for food processing business alternatives on the sample organic farm with importance weights of aggregate attributes.

Attribute	Alternative 1	Alternative 2	Alternative 3
Alternative evaluation:	<i>good</i>	<i>unacceptable</i>	<i>very good</i>
Financial objective (*W=42.6%)	excellent	negative	good
Net Present Value	very high	negative	high
Investment costs	average	extreme high	low
Human labor intensity (*W=7.3%)	very high	very high	high
Technological objectives (*W=11.8%)	unacceptable	unacceptable	acceptable
Equipment	very demanding	demanding	average
Food processing technology	very demanding	very demanding	average
Market objective (*W=25.0%)	good	average	excellent
Risk objective (*W=13.4%)	low	low	low
Spring frost probability	average	low	low
Hails frequency	low	low	low

As shown in table 5, **alternative 3** (spelt grain processing into two different spelt products) ranks with the highest project evaluation (very good), followed by **alternative 1** (good). **Alternative 2** (goat milk processing) yields with the lowest DEX-i assessment. The reason is in negative assessment of financial objectives (the estimated NPV value for this alternative was negative and according to the defined decision rules, any attribute value combination with a negative NPV value is to be rated as unacceptable; Table 3).

The applied AHP methodology should bring unequivocal clarity to the decision which food processing or business alternative should be favored and implemented on an organic farm (Table 6).

Table 6: Total priority calculations for the sample organic farm.

	Financial objective	Market objective	Technologic. objective	Risk objective	Human labor objective	Total
Weight (W)	0.415	0.259	0.117	0.132	0.077	
						ΣW_a
Alternative 1	0.396	0.218	0.063	0.201	0.078	0.260
Alternative 2	0.072	0.090	0.063	0.201	0.045	0.091
Alternative 3	0.272	0.384	0.149	0.257	0.150	0.275

*W – weight, *a - alternative priority, * ΣW_a - total alternative priority

4 CONCLUSIONS

The most suitable alternative in the research is alternative 3 (spelt grain processing), which got the highest EC evaluation (0.275), followed by alternative 1 (0.260), and finally alternative 2, which yields with the lowest evaluation (0.091). Compared to another applied MCDA decision approach (DEX-i), the AHP based Expert Choice model presents more detailed, but similar ranking of alternatives. The relative importance weights of aggregate attributes derived by AHP (as results of pair-wise comparisons) and DEX-i (derived on the basis of analyst estimated decision rules) are principally not different (Table 5). Furthermore, the AHP allows us to manage inconsistencies in pair-wise judgements, while inconsistencies in decision rules can sometimes be difficult to find, especially in the case of a very large number of decision rules (in the observed case there are 256 decision rules for the business project evaluation). On the other hand, the DEX-i with its qualitative modelling and the ability to handle inaccurate and/or incomplete data about options appears to be particularly convenient for decision problems that involve qualitative concepts and a great share of expert judgments. Likewise, the DEX-i assessment can be used for exclusion of “unacceptable” alternatives (as demonstrated in Table 3). In contrast, the AHP evaluation results in a single number (total priority) and does not exclude any alternatives. The shortcoming of DEX-i is also its inability (in contrast to AHP) to separate between alternatives with the same qualitative evaluation. The use of both approaches can bring additional information into the decision-making framework (for instance the “unacceptable” alternatives can be excluded with the use of the DEX-i model, while the precise ranking of remaining alternatives is based strictly on the AHP Expert Choice model). It should also be noted here that both MCDA methods favored alternative 3, while for alternative 1 the highest estimated NPV was revealed.

Further research could be made in combinations with the AHP resource allocation theory (Forman and Selly, 2002), where calculated priorities could be used for optimal allocation of organic farm resources at constrained investment capital; naturally the AHP hierarchy should be changed correspondingly. The categorization of numerical data (transformation of numerical attributes into qualitative scales (in this particular case user defined intervals were used) should be additionally examined (Žnidaršič et al., 2003). The proposed approach would also be suitable for simulation of different scenarios of transition of conventional farm into organic (DSM) and their multi-objective evaluation (DEX-i and AHP). Likewise, the decision model should be interrelated to the marketing information system (marketing attribute).

5 REFERENCES

- Bohanec M., Zupan B., Rajkovič V. Applications of qualitative multi-attribute decision models in health care. *International journal of medical informatics*. 2000; 58: 191-205.
- Csáki C. *Simulation and systems analysis in agriculture*. Elsevier, 2018.
- De Toro A., Hansson P. A. (2004). Analysis of field machinery performance based on daily soil workability status using discrete event simulation or on average workday probability. *Agricultural systems*. 2000; 79(1): 109-129.
- Doltra J., Gallejones P., Olesen J. E., Hansen S., Frøseth R. B., Krauss M., Pacini, G. C. Simulating soil fertility management effects on crop yield and soil nitrogen dynamics in field trials under organic farming in Europe. *Field crops research*. 2019; 1-11.
- FiBL - http://www.organic-europe.net/europe_eu/statistics.asp (2.10.2019).
- Expert Choice, Inc., *Expert Choice software and manual*. 4922 Elsworth Ave., Pittsburgh, PA 15213, USA.
- Forman E. H., Selly M. A. *Decision by objectives: how to convince others that you are right*. World Scientific. 2001.
- Hester S. M., Cacho O. (2003). Modelling apple orchard systems. *Agricultural systems*, 77(2), 137-154.
- Ihnatenko, M., & Novak, N. (2018). Development of regional programs for the development of agrarian enterprises with organic production on the basis of the European and international experience. *Baltic Journal of Economic Studies*. 2018; 4(4): 126-133.
- Jereb E., Bohanec, M. Rajkovic V. DEXi - Računalniski program za večparametrsko odločanje. Kranj, Moderna organizacija, 2003.
- Kljajic M., Bernik I., Skraba A. Simulation approach to decision assessment in enterprises. *Simulation*. 2000; 75(4): 199-210.
- Lisson S. N., Brennan L. E., Bristow K. L., Keating B. A., Hughes D. A. DAM EA \$ Y— software for assessing the costs and benefits of on-farm water storage-based production systems. *Agricultural Systems*. 2003; 76(1): 19-38.
- Nauta W. J., Baars T., Bovenhuis H. Converting to organic dairy farming: Consequences for production, somatic cell scores and calving interval of first parity Holstein cows. *Livestock Science*. 2006; 99(2-3): 185-195.
- Pažek K. *Integrated computer simulation model KARSIM 1.0*. Internal database, University of Maribor, Faculty of Agriculture, Slovenia, 2004.

- Romera A. J., Morris S. T., Hodgson J., Stirling W. D., Woodward, S. J. R. A model for simulating rule-based management of cow–calf systems. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2004; 42(2): 67-86.
- Rozman Č., Pažek K., Kljajić M., Bavec M., Turk J., Bavec F., Škraba, A. The dynamic simulation of organic farming development scenarios–A case study in Slovenia. *Computers and electronics in agriculture*. 2013; 96: 163-172.
- Rozman Č., Tojnko S., Turk J., Par V., Pavlovič M. Die Anwendung eines Computersimulationsmodells zur Optimierung der Erweiterung einer Apfelplantage unter den Bedingungen der Republik Slowenien. *Berichte über Landwirtschaft*. 2002; 80(4): 632-644.
- Saaty T.L. (2008). Decision making with the analytic hierarchy process. *International journal of services sciences*. 2008; 1(1): 83-98.
- Žnidaršič M., Bohanec M., Bratko, I. Categorization of numerical values for DEX hierarchical models. *Marcin Paprzycki*. 2003; 27: 405-409.

VPLIV RASTNIH RAZMER NA PRIDELEK STEBEL IN MORFOLOŠKE LASTNOSTI 12 SORT NAVADNE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.) V LETIH 2018 IN 2019

Marko FLAJŠMAN¹ in Darja KOCJAN AČKO²

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 2. 12. 2019

Izveček

V poljskem poskusu smo preučevali vpliv sorte in leta pridelave na morfološke lastnosti in pridelek stebel navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.). Vključili smo 12 sort (Antal, Carmagnola, Fedora 17, Futura 75, KC Dóra, Kompolti hibrid TC, Monoica, Santhica 27, Santhica 70, Tiborszallasi, Tisza in USO 31). Poskus je potekal kot bločni poskus v treh ponovitvah, gostota setve je bila 300 kalivih semen/m² in medvrstna razdalja 12,5 cm, velikost osnovne parcele je bila 18 m². Leto pridelave je imelo statistično značilen vpliv na pridelek svežih in suhih stebel, odstotek plevela, višino in premer rastlin. Leto 2019 se je izkazalo kot manj ugodno za pridelavo konoplje na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani, kjer so tla srednje globoka in težka. Sorta Carmagnola je dosegla največji povprečni pridelek suhih stebel (4750 kg/ha), sledile so sorte Antal (3429 kg/ha), Tisza (3300 kg/ha) in Tiborszallasi (3037 kg/ha). Kot manj primerne sorte z najmanjšimi pridelki suhih stebel so se pokazale USO 31 (1421 kg/ha), Santhica 70 (1396 kg/ha) in Santhica 27 (1279 kg/ha). Korelacijska analiza je pokazala, da je bil odstotek plevela v požeti rastlinski biomasi visoko negativno in statistično značilno povezan s pridelkom stebel konoplje.

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

INFLUENCE OF GROWING CONDITIONS ON STEM YIELD AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF 12 HEMP VARIETIES (*Cannabis sativa* L.) IN YEARS 2018 AND 2019

Abstract

In the field experiment, we studied the influence of the variety and the year of cultivation on the morphological characteristics and the stem yield of hemp (*Cannabis sativa* L.). 12 varieties was used (Antal, Carmagnola, Fedora 17, Futura

¹Asist. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marko.flajsman@bf.uni-lj.si

²Doc. dr., isti naslov, e-pošta: darja.kocjan.acko@bf.uni-lj.si

75, KC Dóra, Kompolti hybrid TC, Monoica, Santhica 27, Santhica 70, Tiborszallasi, Tisza and USO 31). The year of cultivation had a statistically significant influence on the yield of fresh in dry stems, on the percentage of weeds and on the height and diameter of the plants. Year 2019 turned out to be less favourable for the hemp production at the experimental field of the Biotechnical Faculty in Ljubljana, which has medium-deep and heavy soil. Carmagnola achieved the highest average yield of dry stems with 4750 kg / ha, followed by the Antal (3429 kg / ha), Tisza (3300 kg / ha) and Tiborszallasi (3037 kg / ha). Monoecious varieties achieved lower yields of dry stems, where the last three were USO 31 (1421 kg / ha), Santhica 70 (1396 kg / ha) and Santhica 27 (1279 kg / ha). Correlation analysis showed that percentage of weed (measured in whole plant biomass at harvest) was highly negative and statistically significant connected with the stem yield of hemp plants.

Key words: hemp, *Cannabis sativa*, growing conditions, stem yield, variety

1 UVOD

V Evropi je bila konoplja (*Cannabis sativa* L.) poleg lana med 16. in 18. stoletjem zaradi stebelnih vlaken, ki so dolga in imajo veliko natezno trdnost, najbolj pomembna predivnica (Struik in sod., 2000).

Pridelava industrijske konoplje je manj zahtevna, saj uporaba pesticidov ni potrebna, uspešno zavira rast plevelov in se dobro vključuje v poljedelski kolobar (van der Werf, 1994). Vseeno pa na uspešnost pridelave močno vplivajo pedo-klimatske razmere. Konoplja dobro uspeva na globokih, srednje težkih tleh, manj uspešno pa raste na težkih, hladnih in glinastih, kakor tudi na plitvih in peščenih tleh. Občutljiva je na tla, ki imajo slabo strukturo (Kocjan Ačko, 2015). Rodovitna tla za pridelavo konoplje za vlakna so tista, na katerih lahko dosežemo pridelek suhe snovi 10 t/ha (Bócsa in Karus, 1998).

Konoplja za vlakna najbolj uspeva v vlažnih podnebjih (Ranalli, 1999). Za 1 kg suhe snovi porabi 300 do 500 l vode. Skozi celotno rastno sezono je potrebnih 500 do 700 mm padavin, od tega 250 do 300 mm med vegetativno rastjo. Predvsem padavine v juniju in juliju močno vplivajo na končni pridelek stebel in vlaken (Bócsa in Karus, 1998). Velik negativen vpliv na njeno rast ima preveč ali premalo vode v zgodnjih stopnjah razvoja (Struik in sod., 2000). Že samo eno- ali dvodnevno zastajanje vode na površini močno negativno vpliva na rast (Bócsa in Karus, 1998). Na drugi strani pa pomanjkanje vode upočasni rast, zato je v suših obdobjih priporočeno namakanje (Kocja Ačko, 1999).

Hitra vegetativna rast se začne, ko rastlina požene peti par listov in ko povprečna dnevna temperatura doseže 16 °C, kar se lahko zgodi 35 dni po kalitvi. V takšnih

razmerah lahko konoplja priraste od 6 do 10 cm na dan (Bócsa in Karus, 1998). Rastline najbolj rastejo v temperaturnem razponu od 14 do 27 °C (Barron in sod., 2003). Že pri vsoti dnevni temperatur 400 do 450 °C zapre medvrstni prostor, medtem ko druge poljščine rastejo počasneje, npr. sladkorna pesa potrebuje vsoto dnevni temperatur od 600 do 700 °C (Struik in sod., 2000). Če jo pridelujemo za vlakna, mora biti vsota dnevni temperatur od kalitve do tehnične zrelosti od 1900 do 2000 °C (Bócsa in Karus, 1998).

Pridelek vlaken je v neposredni povezavi s pridelkom stebel (Hennik, 1994), na katerega pa vplivajo ne samo izbira sorte in uporaba agrotehnike, ampak tudi vremenske in rastne razmere. V prispevku bodo prikazani rezultati dvoletnega poljskega poskusa z 12 sortami industrijske konoplje z namenom pridelave za stebila.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Zasnova in izvedba sortnega poljskega poskusa

Poljski poskus je potekal na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani, kjer so tla srednje globoka, meljasto-glinasta, psevdoglejna in meliorirana. Tla so po teksturi težka (25 % peska, 42,6 % melja in 32,4 % gline). Kemijska analiza tal za posamezno leto je prikazana v preglednici 1.

***Preglednica 1:** Rezultati kemijske analize vzorcev tal pred postavitvijo poskusa v letih 2018 in 2019*

Leto	Globina (cm)	pH v KCl	P ₂ O ₅ (mg/100 g tal)	K ₂ O (mg/100 g tal)	Organska snov (%)
2018	0-25	6,8	19,5 C*	15,9 B*	3,9
2019	0-25	6,9	11,9 B*	9,3 A*	4,5

*Črke ob številčnih vrednostih označujejo stopnjo preskrbljenosti tal z določenim hranilom: A: siromašna tla, B: srednje preskrbljena tla, C: dobro preskrbljena tla, D: pretirano preskrbljena tla, E: ekstremno preskrbljena tla

V poskusu smo uporabili 5 enodomnih sort (Fedora 17, Santhica 27, Futura 75, USO 31 in Santhica 70) ter 7 dvodomnih sort (KC Dóra, Kompolti hibrid TC, Monoica, Tisza, Tiborszallasi, Antal in Carmagnola). Poskus je bil zastavljen kot bločni poskus v treh naključnih ponovitvah. Velikost osnovne parcele je bila 6 x 3 m. Osnovno gnojenje je v vsakem letu vključevalo 500 kg/ha NPK 0-14-28 in gnojenje tik pred setvijo z 260 kg/ha KAN. Pozneje posevka nismo dognojevali. Plevelov nismo zatirali. Setev smo opravili v maju (29.5.2018 in 8.5.2019) na medvrstno razdaljo 12,5 cm s sejalnico za strnjeno setev Wintersteiger. Uporabili

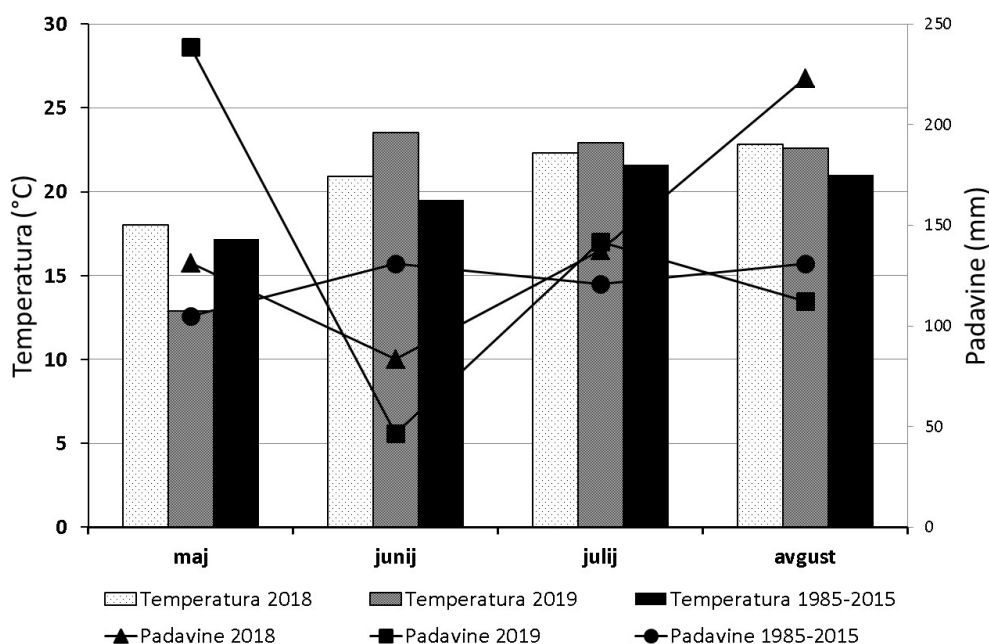
smo gostoto setve 300 kalivih semen/m². Takoj po setvi smo za zaščito pred ptiči celoten poskus pokrili s kopreno, ki smo jo kmalu po vzniku odstranili.

Vzorčenje rastlin za ugotavljanje pridelka stebel smo opravili v drugi polovici avgusta (28. 8. 2018, 22. 8. 2019). Vzorčenje stebel smo izvedli ročno. Na vsaki parceli smo ovrednotili rastline s površine 4 x 1 m². Celotno rastlinsko biomaso (konoplja in plevel) z vsakega m² smo takoj stehtali, nato pa smo iz skupne biomase prvega m² ločili plevel in rastline konoplje stehtali ter izračunali maso plevela v celotni rastlinski biomasi. Na ta način smo lahko nato določili odstotek plevela v biomasi. Rastline konoplje smo ločili in prešteli po spolu, nato smo odbrali po 25 rastlin (ženskih/enodomnih in moških) ter jih stehtali, določili premer in višino. Te rastline smo sušili na 55 °C za določanje zračno suhe snovi stebel.

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili program R (R Core Team, 2016). Proučevane spremenljivke, ki smo jih zajeli v analizo, so bile odstotek plevela v biomasi, pridelek svežih in suhih stebel ter višina in premer stebela rastlin. V korelacijski analizi smo našteje spremenljivke ovrednotili glede na gostoto rastlin, t.j. število rastlin na m² ob vzniku in število rastlin na m² ob žetvi.

2.2 Vremenske razmere v času poskusa

Meteorološke podatke za čas poskusa smo pridobili iz meteorološke postaje Ljubljana Bežigrad (ARSO, 2019). Povprečne mesečne temperature in vsote padavin za rasto dobo konoplje so prikazane na sliki 1.



Slika 1: Povprečne mesečne temperature in vsote padavin za mesece v času izvedbe poljskega poskusa v letih 2018 in 2019 ter za obdobje 1985–2015 v Ljubljani (ARSO, 2019)

Temperature so bile v vseh mesecih v obeh letih poskusa višje od dolgoletnega povprečja. Izjema je maj 2019, ki je bil za 4,3°C hladnejši od povprečja dolgoletnega obdobja. Nekoliko izstopa tudi junij istega leta, ko je bila povprečna temperatura 4°C višja od dolgoletnega povprečja. Trend padavin je bil v obeh letih poskusa skoraj enak; v maju in juniju je bilo padavin več, v juliju pa manj glede na dolgoletno povprečje. Maj 2019 tudi izstopa s količino padavin, saj je padlo 2,2-krat več dežja kot v obdobju 1985–2015 (238,6 mm), samo 8 dni v maju je bilo brez padavin. Nasprotno pa je bilo v juniju, ko je padla samo dobra tretjina padavin (46,4 mm) glede na dolgoletno obdobje. Mesec julij je imel v primerjavi z dolgoletnim povprečjem, v katerem je padlo 121 mm padavin, v obeh letih okoli 20 mm več padavin. Po povečani količini padavin izstopa tudi avgust 2018, ko je padlo 223 mm padavin, kar je 92 mm več od povprečja v letih 1985–2015.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

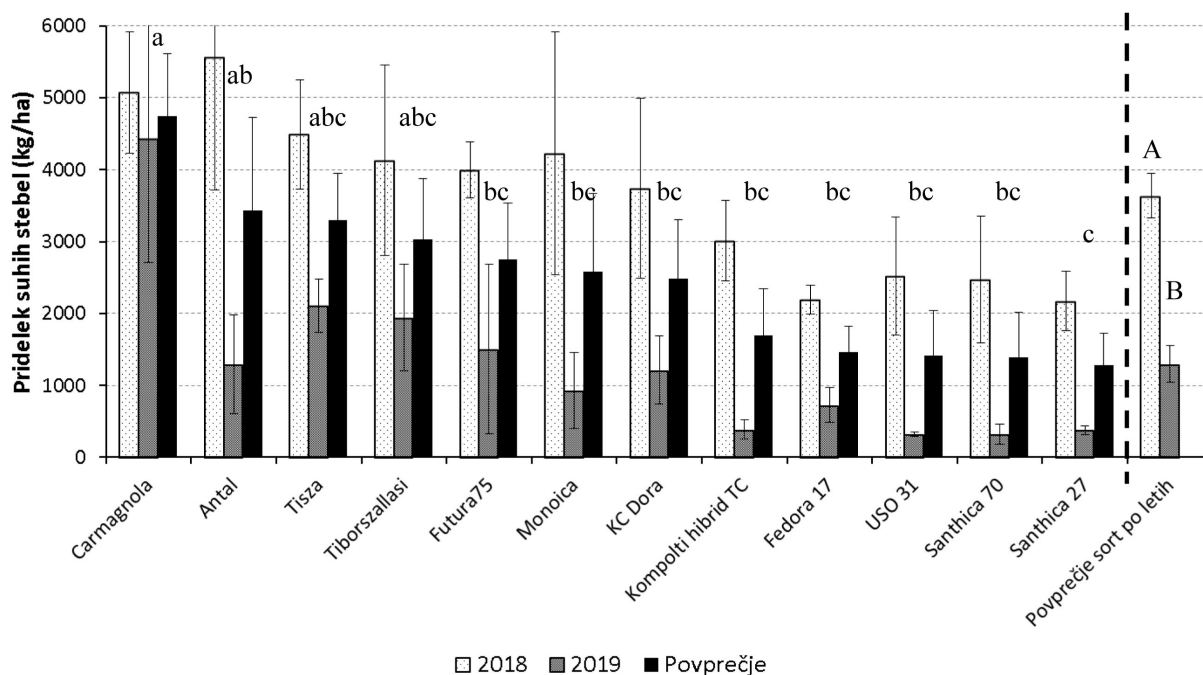
3.1 Pridelek suhih stebel

Na pridelek suhih stebel sta imela statistično značilen vpliv izbira sorte ($p < 0,01$) in leto pridelave ($p < 0,001$), medtem ko interakcija med obema dejavnikoma ni bila statistično značilna. Največji povprečni pridelek suhih stebel je dosegla sorta Carmagnola (4750 kg/ha), sledile so sorte Antal (3429 kg/ha), Tisza (3300 kg/ha) in Tiborszallasi (3037 kg/ha). Najmanjše pridelke suhih stebel smo ugotovili pri sortah USO 31 (1421 kg/ha), Santhica 70 (1396 kg/ha) in Santhica 27 (1279 kg/ha).

Tudi Čeh in sod. (2017) so ugotovili, da sta bili sorti Carmagnola in Antal najbolj rodni z 18 t/ha in 17 t/ha suhe snovi stebel. V poskusu Flajšmana in sod. (2017) na isti lokaciji leta 2017 je imela sorta Antal največji pridelek suhih stebel (9,9 t/ha), sledili sta Futura 75 (8,8 t/ha) in Tiborszallasi (8,7 t/ha). V poskusih Amaducci in sod. (2008) se je pokazalo, da je imela Futura 75 večje pridelke suhih stebel (10,7 t/ha – 13,1 t/ha) od sorte Tiborszallasi (8,4 t/ha - 10,6 t/ha). V našem poskusu med tema sortama ni bilo statistično značilne razlike, kjer je imela sorta Tiborszallasi povprečen pridelek suhih stebel 3037 kg/ha, sorta Futura 75 pa za 9,5 % nižji pridelek. Vsem tem omenjenim sortam je skupno to, da so zelo pozne ali pozne z rastno dobo od 145 do 160 dni (Flajšman in sod., 2018). Z izbiro poznih sort, ki začnejo pozneje cveteti, podaljšamo rastno dobo rastlinam in lahko vplivamo na večji pridelek stebel konoplje (Struik in sod., 2000), kar se je potrdilo tudi v omenjenih poskusih.

Prednost enodomnih sort pri pridelavi za vlakna je v tem, da so rastline med sabo bolj izenačene v rasti in s tem v kakovosti vlaken. To se je potrdilo tudi v našem dvoletnem poskusu; variabilnost v višini pri enodomnih sortah je bila manjša kot pri dvodomnih sortah, saj je bilo povprečje standarnih napak petih enodomnih sort

za višino 14,8 cm, povprečje standarnih napak sedmih dvodomnih sort za višino pa 16,6 cm. Glede kakovosti in količine stebel (vlaknen) pa so dvodomne sorte bolj primerne za pridelovanje v ta namen (Bosca, 1999). Tudi ta trditev se je potrdila v našem dvoletnem poskusu, saj je bil povprečen pridelek suhih stebel dvodomnih sort (3040 kg/ha) 1,8-krat večji od pridelka enodomnih sort (1662 kg/ha).



Slika 2: Pridetek suhih stebel glede na sorto in leto pridelave. Prekinjena črta ločuje oba glavna dejavnika (sorta in leto pridelave). Prikazana so povprečja, mere variabilnosti predstavljajo standardno napako. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med sortami (male črke) ali med letoma (velike črke) (Duncan, $p \leq 0,05$)

V letu 2018 je bil povprečen pridelek suhih stebel 2,8-krat večji (3634 kg/ha) kot v letu 2019 (1297 kg/ha) (slika 2). Za majhen pridelek stebel v letu 2019 je mogoče vzrok velika količina padavin v maju, ko je ponekod zastajala voda na površini in zaradi težkih ilovnatih tal tudi počasi odtekala, kar je za rastline predstavljal velik stres zaradi preobilice vlage (hipoksija). Rastline so bile vidno prizadete, saj bujne juvenilne rasti ni bilo, medtem pa so pleveli (predvsem navadna kostreba) uspešno rastle in dodatno zavirali rast rastlin konoplje. Tudi nizke temperature v tem mesecu niso ugodno vplivale na razvoj rastlin. Čeprav je bilo v juniju 2019 padavin malo (padla je samo dobra tretjina glede na dolgoletno obdobje), izrazitega vpliva suše nismo opazili, saj so bile rastline še pred nastopom pomanjkanja padavin nizke in slabo razvite.

3.2 Odstotek plevla, pridelek svežih stebel, višina rastlin in premer stebel

Preglednica 2 prikazuje rezultate meritev ostalih spremenljivk, na katere je imelo leto pridelave visoko statistično značilen vpliv ($p < 0,001$). Sorte so se med seboj statistično značilno razlikovale v vseh merjenih parametrih, razen v premeru stebela, kjer razlik ni bilo. Interakcije med sorto in letom pridelave ni bilo pri nobeni spremenljivki (preglednica 2).

Preglednica 2: Vrednosti merjenih spremenljivk glede na vpliv sorte in leta pridelave. Prikazana so povprečja \pm standardne napake ter p – vrednosti vpliva posameznega dejavnika (sorta ali leto) na merjene spremenljivke

Sorta	Odstotek plevla (%)	Pridelek svežih stebel (kg/ha)	Višina rastlin (cm)	Premer stebel (mm)
Carmagnola	28,7 \pm 7,9e	11710 \pm 2090a	138 \pm 13a	4,81 \pm 0,36a
Antal	51,6 \pm 12,4abcde	8354 \pm 3317ab	122 \pm 22a	4,19 \pm 0,56ab
Tisza	36,5 \pm 9,4de	8128 \pm 1565ab	119 \pm 10a	4,10 \pm 0,26ab
Tiborszallasi	47,6 \pm 11,6bcde	7411 \pm 1968ab	119 \pm 15a	4,09 \pm 0,44ab
Futura75	48,7 \pm 14,0bcde	7091 \pm 2048ab	102 \pm a22b	3,98 \pm 0,70ab
Monoica	53,1 \pm 16,2abcd	6627 \pm 2923ab	106 \pm 21ab	3,9 \pm 0,551ab
KC Dora	44,0 \pm 12,6cde	7424 \pm 2254ab	108 \pm 16ab	4,34 \pm 0,48ab
Kompolti hibrid TC	65,3 \pm a12,2bc	4159 \pm 1640b	99 \pm 19ab	4,47 \pm 0,74ab
Fedora 17	57,7 \pm 10,9abcd	3660 \pm 958b	76 \pm 11b	3,56 \pm 0,46b
USO 31	68,4 \pm 11,9ab	3845 \pm 1786b	79 \pm 13b	3,38 \pm 0,46b
Santhica 70	71,0 \pm 10,5ab	3626 \pm 1677b	78 \pm 16b	3,42 \pm 0,58b
Santhica 27	73,1 \pm 8,0a	3350 \pm 1288b	74 \pm 12b	3,39 \pm 0,45b
<i>p</i>	***	*	**	n.z.
Leto				
2018	32,5b	9392a	126,7a	4,75a
2019	75,2a	3172b	76,5b	3,19a
<i>p</i>	***	***	***	***

Legenda: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.z. – ni statistično značilnega vpliva ($p > 0,05$). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med sortami ali med letoma (Duncan, $p \leq 0,05$).

Največ plevla je bilo na površinah s sortama Santhica 27 in Santhica 70 (71,0 in 73,1 %), ki sta dosegli tudi najmanjši pridelek svežih stebel (3626 in 3350 kg/ha). Obe sta tudi v statistični skupini najnižjih rastlin z najmanjšim premerom stebel. Po morfoloških lastnostih je izstopala sorta Carmagnola z najvišjimi rastlinami (138 cm) in največjim premerom stebela (4,81 mm). Sorta je dala tudi največji pridelek svežih stebel (11,7 t/ha). Pri tej sorti je bil odstotek plevla najmanjši (28,7 %).

Konoplja je rastlina, ki je zaradi svoje višine zelo dober kazalec rastnih razmer. V letih 2018 in 2019 so bile rastne razmere slabe, saj so bile rastline visoke 126,7 cm in 76,5 cm. To je precej manj kot v raziskavi Čeh in sod. (2017), kjer so bile rastline 12 različnih sort ob cvetenju visoke povprečno 195 cm. Povprečna višina

rastlin 12 sort v poskusu na isti lokaciji leta 2017 je bila 151 cm (Flajšman in sod., 2017).

3.3 Korelacijska analiza

Število rastlin ob vzniku in število rastlin ob žetvi sta bili med sabo visoko ($r = 0,7718$) in statistično značilno ($p < 0,001$) povezana, kar pomeni, da so bili pogoji za rast med sortami izenačeni in pri nobeni sorti ni prišlo do povečanega odmiranja rastlin, kar se dogaja pri večjih gostotah setve (van der Werf in sod., 1995). Števili rastlin ob vzniku in ob žetvi z ostalimi spremenljivkami nista bili povezani (z izjemo premera stebel, kjer je korelacija s številom rastlin ob vzniku statistično značilna). Torej število rastlin ob žetvi ni bilo povezano s pridelkom suhih stebel. Tudi Amaducci in sod. (2008) so ugotovili, da število rastlin ob žetvi ni imelo vpliva na pridelok suhih stebel sort Tiborszallasi in Futura 75. Podobno so ugotovili tudi Struik in sod. (2000), ki so testirali 5 sort v treh državah v treh letih. Korelacijska analiza je pokazala negativen učinek plevela na rast konoplje. Zapljeveljenost, ki jo odraža odstotek plevela v rastlinski biomasi, je negativno vplivala na pridelok suhih stebel ($-0,8847$; $p < 0,001$) ter tudi na višino in premer stebel ($-0,8661$ in $-0,8291$; $p < 0,001$). Podobno so ugotovili tudi Vera in sod. (2006), da manjša gostota setve pri večji medvrstni razdalji pomeni večji pojav plevelov, ki zmanjšuje pridelok konopljne biomase in tudi semena. Visok odstotek plevela smo ugotovili v letu 2019, ko so neugodne vremenske razmere (veliko padavin in nizke temperature v maju, topel in suh junij) negativno vplivale na rast konoplje, pleveli (predvsem navadna kostreba) pa so dobro uspevali. Pridelok suhih stebel je bil visoko pozitivno koreliran z višino ter premerom stebel ($0,9248$ in $0,8233$; $p < 0,001$). Tudi med višino rastlin in premerom stebel je bila korelacija visoka ($0,9366$) in statistično značilna ($p < 0,001$) (preglednica 3).

Preglednica 3: Ocena Pearsonovega korelacijskega koeficienta r ter p -vrednosti dobljene po Holm'sovi metodi korekcije za hkratno testiranje izbranih spremenljivk

	Št. rastlin - vznik	Št. rastlin ob žetvi	Odstotek plevela	Pridelok suhih stebel	Višina rastlin
Št. rastlin ob žetvi	0,7718***				
Odstotek plevela	0,2289n.z.	-0,0520n.z.			
Prid. suhih stebel	-0,1790n.z.	0,0327n.z.	-0,8847***		
Višina rastlin	-0,2296n.z.	0,0034n.z.	-0,8661***	0,9154***	
Premer stebel	-0,3291*	-0,0926n.z.	-0,8291***	0,8069***	0,9366***

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.z. – ni statistično značilnega vpliva ($p > 0,05$)

Tanka in visoka stebila so zaželjena pri pridobivanju vlaken, saj imajo daljša in tanjša stebila večji delež vlaken, ki so boljše kakovosti (Bócsa and Karus, 1998). Na količino in kakovost vlaken, poleg rastnih razmer, najbolj vplivata gostota rastlin v posevku ter čas žetve (Amaducci in sod., 2008).

4 ZAKLJUČKI

Dvoletni poljski poskus na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani je pokazal, da je kombinacija neugodnih vremenskih razmer (veliko padavin in nizke temperature v času juvenilne rasti rastlin), skupaj s poskusnim poljem, kjer so tla težka in neodcedna, negativno vplivala na rast rastlin in s tem na pridelek stebel. Največji povprečni pridelek suhih stebel je dosegla sorta Carmagnola (4750 kg/ha), ki je bila najvišja (138 cm), imela je največji premer stebel (4,81 mm), njen posevek pa je bil najmanj zapleveljen (odstotek plevela v požeti biomasi je bil 28,7 %). V poskusu so imele dvodomne sorte večje pridelke stebel od enodomnih sort. Izjema je francoska sorta Futura 75, ki je bila s povprečnim pridelkom suhih stebel 2750 kg/ha uvrščena za Carmagnolo (4750 kg/ha), Antalom (3429 kg/ha), Tiszo (3300 kg/ha) in Tiborszallasijem (3037 kg/ha). Pokazalo se je, da imajo sorte, ki so zelo pozne ali pozne, večje pridelke stebel od zgodnjih sort. Odstotek plevela v rastlinski biomasi, določen ob žetvi rastlin, je imel visok in statistično značilen negativen vpliv na pridelek stebel konoplje.

Zahvala. Poljski poskus je bil izveden v okviru ciljnega raziskovalnega projekta (CRP) V4-1611 »Pridelava industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) v Sloveniji«, ki sta ga financirala ARRS in MKGP.

5 VIRI

- Amaducci S., Zatta A., Pelatti F., Venturi G. Influence of agronomic factors on yield and quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibre and implication for an innovative production system. *Field Crops Research*. 2008; 107(2): 161-169.
- ARSO. Agencija Republike Slovenije za okolje. 2017.
<http://www.arsp.gov.si> (okt. 2019)
- Barron A., Coutinho J., Gergely S., Lidouren E. Ecological agriculture I: Integrating hemp in organic farming system: A Focus on the United Kingdom, France and Denmark. København, The Royal Agricultural and Veterinary University; 2003: 134 str.
- Bócsa I. Genetic improvement: Conventional approaches. V: Ranalli P., ur. *Advances in hemp research*. The Haworth Press, New York; 1999: 153-184.
- Bócsa I., Karus M. The cultivation of hemp. botany, varieties, cultivation and harvesting. Hemptech, Sebastopol, CA, USA; 1998: 184 str.
- Čeh B., Čremožnik B., Kolenc Z. sorte konoplje z EU sortne liste v Sloveniji – površina, pridelek stebel in vsebnost eteričnega olja v socvetju. *Hmeljarski bilten*. 2017; 24: 99-108.

- Flajšman M., Kocjan Ačko D, Čeh B. Karakteristike sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) v pridelavi v Sloveniji. Hmeljarski bilten. 2018; 25: 44-58.
- Flajšman M., Kocjan Ačko D. Pridelek in morfološke lastnosti stebel 12 sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) v letu 2017. Hmeljarski bilten. 2017; 24: 109-120.
- Hennik S. Optimisation of breeding for agronomic traits in fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) by study of parent-offspring relationships. Euphytica. 1994; 78.1-2: 69-76.
- Kocjan Ačko D. Poljščine, pridelava in uporaba. Kmečki glas, Ljubljana. 2015: 187 str.
- Kocjan Ačko D. Pozabljene poljščine. Kmečki glas, Ljubljana. 1999: 187 str.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. Dostopno na: <https://www.R-project.org/>
- Ranalli P. Agronomical and physiological advances in hemp crops. V: Ranalli P., ur. Advances in hemp research. The Haworth Press, New York; 1999: 61-84.
- Struik P. C., Amaducci S., Bullard M. J., Stutterheim N. C., Venturi G., Cromack H. T. H. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. Industrial Crops and Products. 2000; 11(2): 107-118.
- van der Werf H. G. M. Crop physiology of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). PhD thesis Wageningen Agricultural. University, Wageningen, The Netherlands; 1994: 153 str.
- van der Werf H. M., Wijnhuizen M., de Schutter J. A. A. Plant density and self-thinning affect yield and quality of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). Field Crops Research. 1995; 40(3): 153-164.
- Vera C.L., Woods S.M., Raney J.P. Seeding rate and row spacing effect on weed competition, yield and quality of hemp in the Parkland region of Saskatchewan. Canadian journal of plant science. 2006; 86(3): 911-915.

METODE ŽLAHTNENJA INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)Marko FLAJŠMAN¹

Pregledni članek / review article

Prispelo / received: 24. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 5. 10. 2019

Izveček

Navadna konoplja ima zaradi široke uporabnosti vseh rastlinskih delov veliko različnih žlahtniteljskih ciljev, npr. višja vsebnost vlaken v stebelu z izboljšano kakovostjo, velik pridelek semena in njegova izboljšana hranilna sestava, specifičen profil kanabinoidov v ženskih cvetovih, idr., toda vsebnost Δ^9 -THC pod 0,2 % je skupen cilj vsem starejšim in novejšim sortam. Tujeprašnost, dvodomnost in velika genetska raznolikost navadne konoplje so razlogi za težave pri žlahtnjenju, ko je npr. nujnost gojenja v izolaciji zaradi prenašanja peloda z vetrom na dolge razdalje, težavna odbira moških rastlin pred cvetenjem in možnost medsebojnega opraševanja med vsemi rastlinami konoplje ter nerazvitost molekulskih metod žlahtnjenja (npr. žlahtnjenje s pomočjo molekulskih markerjev). Kljub vsem oviram je žlahtnjenje industrijske konoplje v Evropi zelo intenzivno, kar dokazuje vedno večje število sort vpisanih na evropsko sortno listo. V uporabi so klasični pristopi, ki se uporabljajo pri žlahtnjenju tujeprašnic, to so medsebojno opraševanje oz. križanje, samoopraševanje in pridobivanje hibridov s križanjem različnih sort. V prihodnosti čaka žlahtnitelje več izzivov, kot je npr. vzgoja sort z ustreznim kanabinoidnim profilom za uporabo v medicinske namene in pridelava takih sort preko feminiziranih semen ter pridobitev hibridov iz homozigotnih linij.

Ključne besede: industrijska konoplja, *Cannabis sativa* L., žlahtnjenje, enodomna sorta, dvodomna sorta

BREEDING METHODS IN HEMP (*Cannabis sativa* L.)**Abstract**

Hemp has a wide applicability therefore there are many objectives of hemp breeding, e.g. higher fiber content in stem with increased quality, high seed yield with improved nutritional composition, specific cannabinoid profile, etc., but Δ^9 -THC content below 0.2% is common to all old and new hemp varieties. Hemp is open-pollinated and dioecious plant with high genetic variability, what leads to many breeding problems, such as it needs to be maintained in isolation due to the

¹ Asist. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marko.flajsman@bf.uni-lj.si

strictly open pollinated plant species; the selection of male plants before flowering is difficult; cross-pollination among all cannabis plants exist and there is a lack of molecular breeding methods (e.g. marker-assisted selection). Despite all the obstacles, plant breeding is intensive in Europe, as evidenced by the increasing number of varieties listed on the Common catalogue of EU varieties. Breeding of hemp is caring on by using classical approaches, which are used for open-pollinated species, such as mass selection, cross-pollination, self-fertilization and hybrid breeding by crossing different varieties. In the future, breeders will be probably challenged by creation of varieties with the appropriate cannabinoid profile for medical use and cultivating such varieties through feminized seeds and obtaining hybrids from homozygous lines.

Key words: hemp, *Cannabis sativa* L., breeding, dioecious variety, monoecious variety

1 UVOD

Navadna konoplja je enoletna zelnata rastlina, ki se v naravi pojavlja v dvodomni spolni obliki (ženski in moški cvetovi se pojavijo na ločenih rastlinah), majhen delež rastlin v populaciji (ena na tisoč do ena na milijon dvodomnih rastlin) je enodomnih (moški in ženski cvetovi so na isti rastlini) (Berenji in sod., 2013). Je tujeprašnica (vetrocvetka) in kratkodnevnicna, ki je močno odvisna od fotoperiode; začetek cvetenja je močno odvisen tudi od temperature (Salentijn in sod., 2019).

Ne glede na to, da genetske in morfološke razlike med številnimi skupinami konoplje otežujejo taksonomsko opredelitev in da klasifikacija vrste ni poenotena, se je v zakonodaji in nato v vsakdanji rabi uveljavila laična delitev na dve skupini konoplje, in sicer glede na vsebnost psihoaktivnega kanabinoida Δ^9 -THC (delta-9-tetrahidrokanabinol); rastline (sorte, populacije, linije, genotipi, ekotipi), ki vsebujejo Δ^9 -THC nad 0,2 % v suhi snovi (v Kanadi in nekaterih EU državah je ta meja 0,3 % ali več), so uvrščene v t. i. medicinsko konopljo. Vse ostale skupine konoplje z vsebnostjo Δ^9 -THC pod 0,2 % pa spadajo med industrijsko konopljo in so dovoljene za pridelavo na prostem kot poljščina (Small in Cronquist, 1976; Fike, 2016). To ni delitev glede na uporabo, kot ime nakazuje, saj se v zadnjem času tudi industrijska konoplja (ki vsebuje Δ^9 -THC < 0,2 % in več CBD (kanabidiol) ali katerega drugega kanabinoida), uporablja v medicinske namene in se iz suhih socvetij v postopku ekstrakcije pridobiva fitokanabinoide z namenom uporabe proti različnim obolenjem in bolezenskim stanjem. Medicinska konoplja pa se uporablja izključno v medicinske namene (Janatova in sod., 2018).

Klasifikacija vrste navadna konoplja je težavna, saj nekateri raziskovalci vse rastline konoplje uvrščajo v eno vrsto z več podvrstami in varietetami, drugi pa v več vrst (Fike, 2016). Ne glede na težave pri taksonomski razvrstitvi konoplje pa

ostaja dejstvo, da se lahko rastline iz vseh pod/vrst in skupin med sabo prosto oprašujejo (Small, 1972). Pri medicinski konoplji je v novejši zgodovini prihajalo do načrtnih križanj med številnimi različnimi populacijami in sortami, zato se je genetska raznolikost močno povečala (Onofri in Mandolino, 2017). Vendar pa novi trendi gojenja rastlin medicinske konoplje iz potaknjencev (kloni) starševskih rastlin zmanjšujejo pomen klasičnega križanja in gojenja iz semen, kar omejuje tvorbo novih alelnih kombinacij in na ta način močno zmanjšuje genetsko variabilnost sort medicinske konoplje (Clarke in Merlin, 2017). Na drugi strani pa poteka žlahtnjenje industrijske konoplje izključno preko semen, t.j. s križanjem različnih sort in skupin konoplje (Clarke in Merlin, 2017). Primarni cilj žlahtniteljev je fiksacija željenih lastnosti preko povečevanja homozigotnosti na lokusu oz. lokusih za določeno lastnost, a hkrati ohranjati heterozigotnost na ostalih lokusih v genomu in s tem vigor take sorte (Clarke in Merlin, 2017). Žlahtnjenje industrijske konoplje v Evropi je v zadnjih letih intenzivno, kar dokazuje vedno več sort, ki so registrirane na EU sortni listi; leta 1995 je bilo registriranih 12 sort, leta 2004 45 sort in leta 2008 46 sort, 51 sort je bilo na evropski sortni listi leta 2013, trenutno pa je registriranih 72 sort navadne konoplje (Plant variety database ..., 2019).

V prispevku je prikazan pregled žlahtnjenja izključno industrijske konoplje s poudarkom na predstavitvi žlahtniteljskih ciljev in metod žlahtnjenja industrijske konoplje, ki so danes v uporabi in vodijo do pridobitve novih sort.

2 ŽLAHTNITELJSKI CILJI

Žlahtniteljski cilj je najbolj pomembno izhodišče v procesu žlahtnjenja kulturnih rastlin. Pri industrijski konoplji so zaradi specifičnosti uporabe različnih delov rastline žlahtniteljski cilji zelo različni. Ker se je skozi zgodovino uporaba konoplje spreminjala, so se skladno s potrebami spreminjali tudi žlahtniteljski cilji. Skupni in glavni cilj pri žlahtnjenju vseh sort industrijske konoplje, ne glede na namen uporabe, je nizka stopnja Δ^9 -THC, ki mora biti v Sloveniji pod zakonsko predpisano mejo 0,2 %. Pomembna skupna cilja sta še čim večja odpornost na bolezni in škodljivce ter čim večja stabilnost pridelka v različnih rastnih pogojih. Ostale morfološke in fiziološke lastnosti, npr. dolžina rastne dobe, dolžina cvetenja, stopnja enodomnosti ali dvodomnost, višina rastlin, vsebnost in sestava kanabinoidov, pridelek semena in vlaken, ipd., pa so lastne sortam, ki jih žlahtnimo glede na namen uporabe (Salentijn in sod., 2015).

2.1 Vlakena

Pri pridelavi konoplje za vlakna je cilj čim višja vsebnost vlaken. Genetski potencial dvodomnih sort glede na delež vlaken je ocenjen na 38 do 40 % vlaken v

stebelu, v praksi pa je mogoče realno pridobiti 28 do 30 % vlaken iz stebela dvodomne konoplje (Bócsa in Karus, 1998).

Pomembna je tudi ustrezna kakovost vlaken, kjer je cilj čim boljše razmerje med primarnimi in sekundarnimi vlakni v korist prvih. Za uporabo v papirni in tekstilni industriji so zaželena vlakna z visoko vsebnostjo celuloze, nizko stopnjo lignifikacije in z maloštevilni prečnimi povezavami pektinov in ostalih strukturnih elementov v celični steni celic, ki tvorijo vlakna (Mandolino in Carboni, 2004). Pri pripravi biokompozitov, ko se vlakna vmešajo v nek umetni nosilec, so zelo pomembne površinske lastnosti vlaken, njihova finost in natezna trdnost (Placet, 2009; Gamelas, 2013).

Pokazalo se je, da imajo vremenske in rastne razmere ter procesiranje stebel in ekstrakcija večji vpliv na kakovost vlaken kot pa sam genotip (Müssig, 2003). Zato imata način pridelave konoplje in ekstrakcija vlaken večji potencial za izboljšanje kakovosti pridobljenih vlaken konoplje kot pa žlahtnjenje novih sort (Finta-Korpelova in Berenji, 2007). Kljub temu je bilo na Nizozemskem pridobljenih nekaj sort, katerih vlakna so bolj odporna na mehansko procesiranje stebel pred in pri ekstrakciji, t.j. pri godenju in trenju, kar lahko vodi k izboljšani kakovosti vlaken in k enostavnejši ter cenejši ekstrakciji (Salentijn in sod., 2015).

2.2 Seme

Pridelek semena je pri konoplji nizek, od nekaj 100 kg/ha pa do največ 1,5 t/ha (Flajšman in sod., 2018), zato je eden izmed bolj pomembnih ciljev pri žlahtnjenju konoplje povečati pridelek semena. Ta cilj je bil delno dosežen s pridobitvijo enodomnih sort, ki imajo običajno večji pridelek semena od dvodomnih sort (Berenji in sod., 2013). Ker je pridelek semena kvantitativna lastnost, dedovana s številnimi geni na več lokusih, je napredek pri žlahtnjenju z uporabo tradicionalnih metod žlahtnjenja počasen (Clarke in Merlin, 2017). Zato ostaja konoplja glede količine pridelka semena nekonkurenčna drugim poljščinam, npr. žitom.

Drug vidik izboljšave vsebnosti semena je njegova hranilna sestava. Seme konoplje ima ugodno prehransko sestavo, saj je bogat vir beljakovin, nenasičenih maščobnih kislin, vlaknin ter posameznih vitaminov in mineralov (Kušar in sod., 2018). Pri žlahtnjenju konoplje za uporabo v prehrani se stremi predvsem k dvigu deleža proteinov in olja v semenih kot tudi izboljšanju maščobno kislinске (MK) sestave olja. Konopljino olje vsebuje okoli 80 % nenasičenih MK, zaradi česar ima nizko oksidativno stabilnost in je zaradi tega hitro kvarljivo na sobni temperaturi, kar bi radi z žlahtnjenjem izboljšali (Bielecka in sod., 2014). Cilj žlahtnjenja je tudi izboljšati sicer že ugodno razmerje med linolno in α -linolensko kislino (Ranalli, 2004) ter zvišati vsebnost gama linolenske kisline (Berenji in sod., 2013). Sintezna pot proteinov in MK je kodirana z manj geni, zato je selekcija primernih linij in

žlahtnjenje sort nekoliko manj zahtevno kot v primeru zviševanja pridelka (Clarke in Merlin, 2017).

2.3 Socvetja za ekstrakcijo kanabinoidov

Leta 2001 je prišla v EU zakonodaja, s katero so v industrijski konoplji omejili zgornjo dovoljeno mejo Δ^9 -THC na 0,2 %. Od takrat se je žlahtnjenje konoplje intenzivneje usmerilo v linije z zelo malo ali nič Δ^9 -THC (Grassi in McPartland, 2017).

V zadnjem času postajajo zanimive sorte industrijske konoplje z visoko vsebnostjo kanabinoidov (razen Δ^9 -THC, katerega vsebnost mora ostati pod 0,2 % v suhi snovi), predvsem CBD. Ideja je tudi pridobiti sorte, ki bi imele visoko vsebnost samo določenega kanabinoida, npr. CBG (kanabigerol), THCV (tetrahidrokanabivarin) in CBC (kanabikromen) za uporabo v farmaceutiki za pripravo zdravilnih učinkovin (Mandolino in Carboni, 2004). Industrijska konoplja postaja privlačna za gojenje z namenom pridobivanja kanabinoidov, ker jo je dovoljeno gojiti na prostem, kjer lahko ob ugodnih vremenskih in rastnih pogojih doseže svoj potencial glede izražanja (kvantitativno in kvalitativno) sekundarnih metabolitov. Genetsko ozadje dedovanja kemotipov (kemotip je kanabinoidni profil rastline) je dobro pojasnjeno (de Meijer in sod., 2003; de Meijer, 2014; Weiblen in sod., 2015). Toda na količino nastalih kanabinoidov vpliva več različnih genov, okoljski dejavniki in spol rastline (Grassi in McPartland, 2017), kar otežuje žlahtnjenje in natančno odbiro rastlin z željenimi lastnostmi, ki so posledica izključno genotipa.

3 METODE ŽLAHTNJENJA INDUSTRIJSKE KONOPLJE

3.1 Masovna selekcija

Masovna selekcija se izvaja tako, da se iz najboljših rastlin ohrani seme, ki se naslednje leto spet poseje, postopek pa se ponavlja leto za letom (Brown in sod., 2014). Z uporabo ponavljajoče se masovne selekcije so v preteklosti kmetje (nevede) iz divjih populacij ustvarili pokrajinske populacije (angl. landraces). Kmetje so povečevali homozigotnost populacij na lokusih za agronomsko pomembne lastnosti (npr. višina stebel, pridelek semena) s sejanjem semena iz rastlin z agronomsko željenimi lastnostmi, medtem ko sta se heterozigotnost na lokusih za odpornost in vigor rastlin krepila preko naravne selekcije (Clarke in Merlin, 2017). Masovna selekcija je učinkovita metoda pri izboljšavi enostavnih kvalitativnih lastnosti, ki imajo visoko dednost. Če se pa natančna masovna selekcija vrši dalj časa, lahko pride tudi do napredka pri bolj kompleksnih kvantitativnih lastnostih, ki imajo nizko stopnjo dednosti. Pri konoplji se masovna

selekcija uspešno uporablja za izboljšanje visoko dednih lastnosti, kot sta npr. delež vlaken v stebli in kanabinoidov v žlezah trihomov (Hennink, 1994).

Masovna selekcija se lahko izvaja iz rastlin, ki so zrasle iz mešanice semena več starševskih genotipov kot tudi na rastlinah, ki so potomke semena ene same starševske rastline, kar na koncu privede do genetsko bolj homogene žlahtniteljske linije. Masovna selekcija pri konoplji je bolj učinkovita, če samo odbranim moškim rastlinam pustimo, da cvetijo in oprašijo ženske rastline, nato pa samo iz odbranih ženskih rastlin shranimo seme. Na ta način so bile požlahtnjene in so še danes vzdrževane nekatere evropske dvodomne sorte (npr. Carmagnola, Kompolti, Lovrin in Novosadska konoplja) (Clarke in Merlin, 2017).

3.2 Medsebojno križanje (cross-breeding)

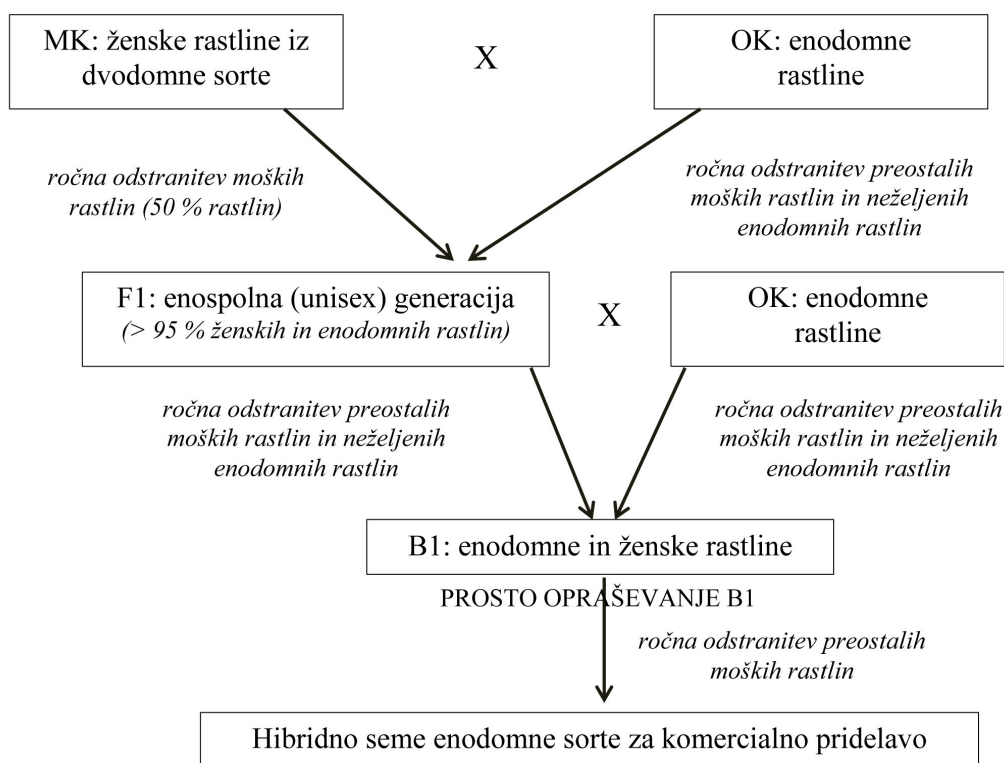
Pri tej metodi so žlahtnitelji za starša izbrali dve čim bolj izenačeni (vse rastline znotraj linije so morale biti morfološko čim bolj enake), a med sabo genetski različni liniji (pozneje so uporabili tudi sorte) in ju križali med sabo na prostem ter potomce odbirali glede na vsebnost vlaken, pridelok stebel in semen, glede na spol, fenološki razvoj, kakovost stebel, nizko vsebnost Δ^9 -THC, odpornost na bolezni, škodljivce in peganje. Do izboljšanih linij potomcev so prišli preko selekcije potomcev iz ene same matrne rastline, ki pa je bila oprašena z več različnimi očeti (angl. half-sib family). Selekcija je temeljila na splošni kombinacijski sposobnosti različnih kombinacij križanj (Salentijn in sod., 2015).

3.3 Žlahtnjenje s ciljem pridobivanja hibridov (hybrid breeding)

Žlahtnitelji konoplje so opazili, da načrtna križanja genotipov, ki so si med sabo močno različni, pripomorejo k večjemu vigorju potomcev, kar so pripisovali efektu heteroze oz. hibridnemu vigorju. Navadna konoplja je vrsta, kjer čistih homozigotnih linij (t.j. homozigotnih genotipov) ni, zato tudi pravih hibridov, ki nastanejo s križanjem čistih linij, še ni bilo pridobljenih (Berenji in sod., 2013). Zato pri konoplji hibridno žlahtnjenje poimenujemo križanja: a) med genetsko različnimi sortami, ki pa so čim bolj homogene; tako je bilo požlahtnjenih več sort, prve pridobljene na ta način so Uniko-B, Kompolti hibrid TC in YunMa 3 (Salentijn in sod., 2015); b) med različnimi homogenimi linijami, ki so večkrat samooprašene. 'Sintetik' je umetna populacija rastlin, ki je bila odbrana skozi masovno selekcijo in nato dalj časa vzdrževana v izolaciji (enodomne rastline so bile samooprašene skozi več generacij) z namenom čim večje genetske izenačitve. Najboljše linije (običajno med 4 in 10) se nato med sabo križa in pridobi t.i. sintetik. Opisan pristop so razvili v Franciji in ga uporabljajo za izboljševanje stržena stebela in pridelka semena (Berenji in sod., 2013).

Pridobivanje hibridnega konopljinega semena poteka podobno kot pri pravih hibridih, kjer potrebujemo materno komponento, ki nima moških cvetov in ne proizvaja peloda, in očetno komponento, ki služi kot oprasivalec. Pri dvodomnih sortah sicer poznamo ženske rastline, ki lahko služijo kot materna komponenta, vendar je problem v tem, da se med posejanim semenom dvodomne sorte pojavi okoli 50 % moških, ki jih je treba odstraniti pred cvetenjem, kar je praktično nemogoče izvesti v večjem obsegu, torej v namene pridobivanja večjih količin semena, kjer morajo biti posejane večje površine. Opisan problem je rešil Bócsa (1967) z odkritjem, da so F1 potomci križanja dvodomnih ženskih rastlin in enodomnih rastlin, ki so oprasivna linija, v 70 do 85 % ženske rastline, 10 do 15 % enodomne rastline in samo 1 do 2 % moške rastline. F1 generacijo so imenovali enospolne rastline (angl. unisexual). Ti F1 potomci so v procesu pridobitve hibridnega semena služili kot materna linija, iz katere je bilo še vedno potrebno odstranjevati moške rastline, toda v znatno manjšem obsegu. Finta-Korpelova in Berenji (2007) sta natančneje opisala pridobivanje tri-linijskega hibridnega semena na Madžarskem; križanje dvodomnih ženskih rastlin in enodomnih rastlin poteka na površini 1 ha, kjer mora biti razmerje med materno in očetno komponento 3:1 ali manj. Na ta način je mogoče v prvem letu pridobiti 400 do 500 kg F1 semena (50 do 100 g na žensko rastlino), kar služi kot materna komponenta za setev v vrste na 200 do 250 hektarih, kjer se nato v drugem letu pridobi končno tri linijsko hibridno seme na način, da se zraven poseje tudi očetno komponento. To je dvodomna linija, kjer moške rastline služijo kot oprasivalci. Tak tri-linijski hibrid je glede na spol sestavljen iz 50 % ženskih in 50 % moških rastlin. Iz ženskih rastlin matrne komponente je tako v drugem letu mogoče pridobiti 0,5 do 1 t/ha tri-linijskega hibridnega semena, ki je namenjeno komercialni pridelavi in zadostuje za setev 3000 ha, če je setvena količina 80 kg/ha (namen pridelave tovrstnih hibridov konoplje je bil za vlakna). Z izbiro genotipa očetne komponente (enodomna linija) v prvem letu žlahtnjenja kot tudi z izbiro očetne komponente v zadnjem letu križanja (dvodomna linija) so žlahtnitelji vplivali na lastnosti tri-linijskega hibridnega semena. Začetnik tovrstnega pridobivanja hibridnega semena je bil dr. Ivan Bócsa iz Kmetijskega raziskovalnega inštituta »Fleischmann Rudolf« v mestu Kompolt na Madžarskem (Finta-Korpelova in Berenji, 2007).

Francoske sodobne sorte konoplje so enodomne sorte. Vendar to ne pomeni, da so vse rastline enodomne, saj je sorta sestavljena iz 50 % ženskih in 50 % enodomnih rastlin, moških rastlin pa ni (Berenji in sod., 2013). Postopek pridobitve se nekoliko razlikuje od madžarskega, saj so francoske sorte dvo-linijski odprto opraseni hibridi (slika 1).



Slika 1: Shema pridobitve hibridnega semena in novih sort s križanjem enodomnih in dvodomnih rastlin. MK: materna komponenta; OK: očetna komponenta (prirejeno po Berenji in sod., 2013)

Pridobitev F1 enospolne generacije (angl. unisex) v prvem letu poteka na enak način kot na Madžarskem, in sicer s križanjem dvodomnih ženskih rastlin (moške rastline je treba pred cvetenjem odstraniti) in enodomnih rastlin, ki so opraševalna linija. V drugem letu se F1 rastline povratno križa z enodomno očetno komponento iste linije, kar vodi v pridobitev F2 semena. V obeh letih je treba v populaciji rastlin enodomne očetne komponente in tudi F1 potomcev odstranjevati preostale moške rastline in neželjene fenotipe ter atipične rastline (slika 2). V tretjem letu se F2 rastline med sabo prosto oprašijo, njihov pridelek pa je dvo-linijsko hibridno seme (50 % ženskih in 50 % enodomnih rastlin), namenjeno komercialni pridelavi (Finta-Korpelova in Berenji, 2007; Berenji in sod., 2013). To je način, kako je mogoče enostavneje pridobiti velike količine semena enodomne sorte z manj vloženega dela v primerjavi s klasičnim razmnoževanjem in ohranjanjem enodomnih sort (Berenji in sod., 2013). Tudi več enodomnih novejših sort iz Poljske je bilo pridobljenih na opisan način (Poniatowska in sod., 2019).



Slika 2: Primer dveh atipičnih rastlin; levo – rastlina z zavitim stebлом in dvema vrhovoma; desno – rastlina s prevelikim številom preozkih lističev v listih

3.4 Mutacijsko žlahtnjenje

Mutacijsko žlahtnjenje, kjer na različne načine (fizikalni in kemijski načini) induciramo mutacije v dednem zapisu rastline, posnema naravni proces spontanij mutacij (Liang, 2012). Enodomne rastline konoplje naj bi bile posledica spontane mutacije v dvodomnih rastlinah. Tudi rumena stebła konoplje, ki so jo v preteklosti uporabljali pri žlahtnjenju in se je po barvi stebła jasno ločevala od ostalih sort, so bila posledica naravne spontane mutacije (Berenji in sod., 2013). Sort konoplje, ki bi bile pridobljene na ta način, uradno ni registriranih. Grassi in McPartland (2017) omenjata, da so Di Candilo in sod. (2000) uporabili s ^{60}Co gama žarki obsevan pelod sort Carmagnola in Fibranova ter pridobili sorti Red petiole (rastline so imele rdeče obarvane petiole-listne peclje) in Yellow apex (rastline so imele rumeno obarvane lističe na vrhu rastline). Ker sta bili opisani lastnosti nepopolno dominantni, se po nekaj generacijah razmnoževanja nista ohranili in zelena barva se je povrnila. Tudi sorta Ermo je nastala tako, da so rastline sorte Ermes oprašili s pelodom moške rastline z nizko vsebnostjo kanabinoidov, ki so jo obsevali s ^{60}Co gama žarki (Grassi in McPartland, 2017). Nobene od opisanih sort danes ni na evropski sortni listi. Flajšman in sod. (2017) so obsevali semena treh sort

industrijske konoplje in določili odmerke obsevanja, ki bi bil primeren za uporabo v žlahtniteljske namene konoplje. Dela z mutacijskim žlahtnjenjem konoplje niso nadaljevali.

3.5 Genomske raziskave navadne konoplje in žlahtnjenje z uporabo molekulskih markerjev

Molekulski markerji za gene, ki so vpleteni v biosintezne poti posameznih metabolitov ali odgovorni za izražanje pomembnih agronomskih lastnosti, bi omogočili odbiro rastlin že v njihovi juvenilni fazi, torej precej pred cvetenjem, in bi bili v veliko pomoč žlahtniteljem (de Meijer, 2004). Za uporabo molekulskih markerjev pri žlahtnjenju rastlin mora biti vsaj delno znan genom preučevane rastline.

Velik napredek na področju genomskih raziskav navadne konoplje je pomenila objava osnutkov genoma in transkriptoma leta 2011. Van Bakel in sod. (2011) so z Illumina sekvenciranjem določili genomsko zaporedje ženskih rastlin medicinske konoplje (sorta Purple Kush) in industrijske konoplje (sorta Finola). Ugotovili so, da se med sortama pojavljajo številne razlike, npr. v medicinski konoplji je prisoten gen *THCAS* (angl. Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase) in odsoten gen *CBDAS* (angl. cannabidiolic acid synthase), ki sta odgovorna za sintezo THCA in CBDA. V industrijski konoplji je stanje obratno. Na ta način so delno (odkrili so tudi nekaj psevdogenov za oba encima) potrdili teorijo, da je kemotip konoplje kodiran z dvema tesno povezanima lokusoma. Ugotovili so tudi, da ima medicinska konoplja prisotnih mnogo kopij gena *AAE3*, ki bi lahko bil vključen v biosintezo kanabinoidov. V nadaljnjo genomsko analizo, kjer so želeli ugotoviti dodatne razlike med medicinsko in industrijsko konopljo, so vključili še USO-31 (sorta industrijske konoplje) in Chemdawg (sorta medicinske konoplje). Ugotovili so, da sta se medicinska in industrijska konoplja iz njihove raziskave značilno genetsko razlikovali. Transkriptom konoplje (določen iz korenin, stebela, poganjkov in cvetov sorte Purple Kush) obsega več kot 30 000 genov. Pri primerjavi izražanja genov biosintezne encimatske poti kanabinoidov med konopljama Purple Kush in Finola so ugotovili, da so geni omenjene poti $15 \times$ višje izraženi pri medicinski konoplji. Med višje izraženimi geni pri sorti Purple Kush so bili tudi številni transkripcijski faktorji, ki vplivajo na številne razvojne procese v žlezni trihomih (van Bakel in sod., 2011). Objavljen genom navadne konoplje je bil podlaga za identifikacijo 55 genov za encime sintaze v biosintezni poti terpenov, ki so bili tudi tkivno specifično izraženi (Allen in sod., 2019).

Weiblen in sod. (2015) so odkrili kvantitativni lokus (angl. quantitative trait locus – QTL), ki je povezan s skupno količino kanabinoidov in njihovim razmerjem (predvsem razmerjem med THCA in CBDA) v rastlini.

Sawler in sod. (2015) so s pomočjo 14 031 markerjev za polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP - angl. singel nucleotide polymorphism) uspešno ločili industrijsko (43 vzorcev) od medicinske konoplje (81 vzorcev), kjer samo 2 vzorca glede na izvor in ime nista ustrezala ugotovljenemu genetskemu profilu.

Lavery in sod. (2018) so na podlagi križanja medicinske (sorta Purple Kush) in industrijske konoplje (sorta Finola) izdelali fizično in genetsko karto. Iz sekvenčnih podatkov so sestavili 10 kromosomov. Ugotovili so, da sta gena za sintezo glavnih dveh kanabinoidov (*THCAS* in *CBDAS*) nepovezana oz. se nahajata na dveh različnih lokusih, toda zelo blizu na kromosomu 6. Kromosomi 5, 9 in 10 so telocentrični in eden izmed njih bi lahko bil spolni kromosom. Mapa še ni končana, saj na njo ni mogoče mapirati vseh poznanih transkriptov konoplje, med njimi so tudi markerji za določanje moškega spola.

Tudi Grassa in sod. (2018) so iz pridobljenih podatkov o nukleotidnem zaporedju konoplje sestavili 10 kromosomov. Objavili so natančno genetsko karto, pridobljeno s sekvenciranjem 100 različnih genomov konoplje staršev in potomcev ene družine križanja, s pomočjo katere so razkrili genetski mehanizem, ki je odgovoren za razmerje med CBDA in THCA v rastlinah konoplje. Ugotovili so, da se v genomu konoplje nahaja večje število kopij genov za encime sintaze, ki sintetizirajo kanabinoide. Predpostavili so, da je verjetno od števila kopij genov posamezne sintaze odvisno, kakšno je na koncu razmerje med kanabinoide. Poleg tega so sintazni geni pod nadzorom regulatornih elementov iz drugih regij genoma in imajo večji vpliv na količino proizvedenih kanabinoidov kot sintaze same. Lokusi s *CBDAS* geni (ne lokusi s *THCAS* geni) imajo verjetno glavni vpliv na CBDA/THCA razmerje.

Salentijn in sod. (2019) so naredili pregled možnih genov, ki v konoplji nadzirajo čas cvetenja, določajo spol in kakovost vlaken. S poznavanjem genetskih mehanizmov, ki nadzirajo opisane lastnosti, je mogoče izboljšati metode žlahtnjenja (uporaba molekularskih markerjev) in skrajšati čas za pridobitev novih izboljšanih sort.

Kljub številnim raziskovalnim naporom pri odkrivanju genetskega ozadja navadne konoplje pa je malo uporabnih rezultatov raziskav prešlo mejo bazičnega raziskovanja in se uveljavilo kot pomoč pri žlahtnjenju. Uporabnost molekularskih markerjev za žlahtnjenje se je zaenkrat pokazala pri določanju spola (Mandolino in sod., 1999; Törjék in sod., 2002; Kolenc in Čerenak, 2017) in pri določanju kemotipa. Pacifico in sod. (2006) so razvili PCR marker B1080/B1192, s katerim je bilo mogoče zanesljivo določiti kemotip rastline. Vendar pa se je pokazalo, da lahko pride pri genetskem določevanju kemotipa tudi do odstopanj (Weiblen in sod., 2015), kar kaže na kompleksnost sistema dedovanja in izražanja genov za sintezno pot kanabinoidov. Welling in sod. (2016) so z dvema SCAR markerjema z 98 % uspešnostjo predvideli kanabinoidne profile 22 različnih akcesij konoplje.

Še vedno ne obstaja markerski sistem, ki bi bil povezan z enodomnostjo rastlin (enodomne rastline imajo enak kariotip kot dvodomne ženske rastline), kljub temu da enodomne sorte pridobivajo na veljavi v smislu obsežnega žlahtnjena in razširjene pridelave. Prav tako npr. še niso razviti markerji, ki bi bili povezani z rastno dobo in odzivom na fotoperiodo, z zastopanostjo trihomov na cvetovih in s kakovostjo vlaken (Onofri in Mandolino, 2017). Taki markerji bi bili še posebej uporabni pri dvodomnih sortah za odbiro moških rastlin, ki niso nosilci pomembnih ekonomskih lastnosti (pridelek semena, kanabinoidi) in je njihov doprinos viden šele na izraženih lastnostih ženskih rastlin naslednje generacije (Clarke in Merlin, 2017). Razlog za počasen napredek pri razvoju markerskih sistemov za uporabo v žlahtnjenju je predvsem v tem, da je genetska variabilnost v navadni konoplji zelo velika in stopnja heterozigotnosti visoka, kar je posledica tujeprašnosti in medsebojnega opraševanja rastlin konoplje v preteklosti (Salentijn in sod., 2015).

4 TEŽAVE PRI ŽLAHTNJENJU NAVADNE KONOPLJE

Težave pri žlahtnjenju navadne konoplje izvirajo iz njenih lastnosti, kot so dvodomnost, tujeprašnost in medsebojno opraševanje. Konoplja ni rastlina, ki bi jo bilo enostavno žlahtniti, čeprav proizvede veliko peloda kot tudi semen. Uspešno žlahtnjenje tujeprašnic, ki se oprašujejo z vetrom, zahteva najprej odbiro rastlin z željenimi lastnostmi, potem pridobitev homozigotnih linij s ponavljajočo se odbiro in samooplodnjo, nato pa križanje različnih homozigotnih linij in testiranje njihovega potomstva na polju (Posselt, 2010). Pri dvodomni konoplji so ženske rastline tiste, ki so najbolj uporabne (vlakna, seme, socvetja), medtem ko se moške rastline, ki so pri križanjih nujno potrebne zaradi peloda, uporabljajo samo za vlakna. Zato je odbira moških rastlin pri konoplji težavna, saj jih ne moremo odbirati glede na fenotip in uporabno vrednost moških rastlin (izjema je odbira glede na vlakna, kar je znano kot Bredemannova metoda), ampak se šele na ženski populaciji potomcev vidijo dobre oz. slabe lastnosti moške starševske linije. Dvodomne rastline tudi ni mogoče po naravni poti samoopraševati (Clarke in Merlin, 2017). Na drugi strani pa so enodomne sorte težavne predvsem za vzdrževanje in razmnoževanje semena, saj so naravno nagnjene k povrnitvi v dvodomnost, kar zahteva velike napore pri odstranjevanju neželenih moških rastlin pri razmnoževanju semenskega materiala (Berenji in sod., 2013). Pelod konoplje se lahko z vetrom prenaša na velike razdalje (Small in Antle, 2003), zato je potrebno posamezne linije gojiti v izolaciji, da ne pride do neželenega opraševanja, saj se rastline konoplje ne glede na izvor prosto oprašujejo med sabo in je potomstvo v celoti fertilno (Small, 1972). Small in Antle (2003) sta preučevala širjenje peloda z vetrom in ugotovila, da je zakonsko določena meja 5 km več kot dovolj, saj je v njihovem poskusu število pelodnih zrn močno upadlo že v oddaljenosti 400 m od rastlin. Je pa res, da so imeli enodomno konopljo (moški cvetijo manj bujno), odvisno je bilo tudi od vetra.

Razvoj nove sorte je dolgotrajen proces, traja lahko tudi več kot 20 let (Poniatowska in sod., 2019). Kvantitativne lastnosti (pridelek, količina kanabinoidov, idr.) so običajno dedovane z velikim številom genov na različnih lokusih v genomu, kjer ima posamezen gen majhen učinek. Zato je dednost takih lastnosti nizka in napredek pri žlahtnjenju počasen, kar otežuje tudi genetski napredek pri žlahtnjenju konoplje (Clarke in Merlin, 2017). Za začetek žlahtnjenja nove sorte, kjer uporabimo ciljna križanja, je potrebno imeti veliko populacijo rastlin, iz katere lahko odberemo rastline z željenimi lastnostmi in jih potem uporabimo za nadaljnja križanja. Velika populacija rastlin je potrebna zato, da se lahko večina pomembnih alelnih oblik prenese na potomce; pri enodomnih sortah je potrebnih za eno starševsko komponento uporabiti vsaj 1000 odbranih rastlin, pri dvodomnih pa vsaj 2000 odbranih rastlin (Crossa in sod., 1993).

5 ZAKLJUČKI

Industrijska konoplja je rastlina s številnimi nameni uporabe, čemur je prilagojeno tudi žlahtnjenje. Številne sorte iz preteklosti se ne uporabljajo več, zamenjale so jih novejša sorte, ki imajo predvsem nizko vsebnost Δ^9 -THC in jih odlikujejo druge uporabne lastnosti. Vedno večje število sort na evropski sortni listi dokazuje, da poteka v Evropi intenzivno žlahtnjenje industrijske konoplje.

Industrijska konoplja se načrtno žlahtni zadnjih 100 let. Kljub številnim raziskavam v zadnjem času na področju genetike navadne konoplje, npr. objava osnutkov genoma in transkriptoma (van Bakel in sod., 2011), konstrukcija genetskih map (Grassa in sod., 2018; Lavery in sod., 2019), uporaba številnih markerjev za preučevanje genetske variabilnosti različnih skupin rastlin konoplje ter določanja spola in kemotipa (Onofri in Mandolino, 2017), učinkovitih molekularnih metod, ki bi omogočale žlahtnjenje s pomočjo markerjev, ni na voljo, z izjemo markerjev za spol in kemotip. Še vedno so največ v uporabi klasični pristopi, ki se uporabljajo pri žlahtnjenju tujeprašnic, kot so masovna selekcija, medsebojno oprasovanje ter vzgoja hibridnih sort. Zato je napredek pri pomembnih ekonomskih lastnostih navadne konoplje, kot so pridelek vlaken, semena in kanabinoidov, počasen.

Kljub temu so žlahtnitelji industrijske konoplje uspeli doseči nekaj pomembnih prebojev pri žlahtnjenju, kot je odbira moških rastlin pred cvetenjem za namene povečevanja deleža vlaken v steblih, pridobitev enodomnih sort, hibridno križanje dvodomnih in enodomnih sort ter pridobitev zgodnje sorte Finole, ki cveti neodvisno od fotoperiode, ima velik potencial za pridelek visoko kakovostnega semena in je primerna za strojno žetev.

Industrijska konoplja se zaradi pomembnosti kanabinoidov pri uporabi v medicini (Janatova in sod., 2018) že prideluje za uporabo v medicinske namene, v prihodnosti pa se bo verjetno še v večjem obsegu. Zato čaka žlahtnitelje pomemben izziv, kako pridobiti sorte, ki bi vsebovale čim več željenega kanabinoida (npr. CBD, CBG, THCV, CBC, idr.), a hkrati zakonsko dovoljeno vsebnost Δ^9 -THC-a. Drug vidik pridobivanja sort za uporabo v medicini je tudi pridobiti rastline z ustreznim razmerjem med določenimi kanabinoidi.

Uporabi industrijske konoplje v medicinske namene bo morala slediti tudi njena pridelava. Oprašene ženske rastline sintetizirajo nižje količine kanabinoidov, ker po cvetenju primarne metabolite preusmerijo v zorenje semen (Chandra in sod., 2017). Zato pri pridelavi za namene pridobivanja kanabinoidov moške in enodomne rastline niso zaželjene, saj s svojim pelodom oprašujejo ženske rastline in tako znižujejo pridelek kanabinoidov. V ta namen bi bilo potrebno pridobiti feminizirano seme industrijske konoplje, ki bi omogočalo pridelavo samo ženskih rastlin brez dolgotrajnega in naporenega odstranjevanja moških ali enodomnih rastlin.

Gotovo je eden izmed večjih izzivov tudi vzgoja homozigotnih linij konoplje in iz njih vzgojenih križancev.

Zahvala. Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa P4-0077 Kmetijske rastline - genetika in sodobne tehnologije, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije. Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Bohancu (Biotehniška fakulteta) za nasvete.

6 VIRI

- Allen KD, McKernan K, Pauli C, Roe J, Torres A, Gaudino R (2019) Genomic characterization of the complete terpene synthase gene family from *Cannabis sativa*. PLoS ONE. 2019; 14(9): e0222363.
- Berenji J., Sikora V., Fournier G., Beherec O. Genetics and selection of hemp V: Hemp: Industrial Production and Uses. Bouloc P. (ur.). London, CABI. 2013: 48-72.
- Bielecka M., Kaminski F., Adams I., Poulson H., Sloan R., Li Y., ..., Graham I.A. Targeted mutation of $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturase genes in hemp produce major alterations in seed fatty acid composition including a high oleic hemp oil. Plant biotechnology journal. 2014; 12(5): 613-623.
- Bócsa I. Kender fajtahibrid előállításához szükséges unisexuális (hímmentes) anyafajta nemesítése. Rostnövények. 1967: 3-7.
- Bócsa I., Karus M. The cultivation of hemp. Botany, varieties, cultivation and harvesting. HempTech, Sebastopol (ZDA.). 1998: 172 str.
- Brown J., Caligari P., Campos H. Plant Breeding, 2nd Edition. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, Združeno kraljestvo. 2014: 278 str. |

- Chandra S., Lata H., Khan I. A., ElSohly M.A. *Cannabis sativa* L.: Botany and Horticulture. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 76-100.
- Clarke R.C., Merlin M.D. Cannabis domestication, breeding history, present-day genetic diversity, and future prospects. *Critical reviews in plant sciences*. 2016; 35(5-6): 293-327.
- Crossa J., Hernandez C.M., Bretting P., Eberhart S.A., Taba S. Statistical genetic considerations for maintaining germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*. 1993; 86: 673-678.
- de Meijer E.P.M. 2004. The breeding of Cannabis cultivars for pharmaceutical end uses. V: The medicinal uses of cannabis and cannabinoids. G. W, Whittle B. A., Robson P. J. (ur). Pharmaceutical Press, London. 2004: 55-69.
- de Meijer E.P.M. The chemical phenotypes (chemotypes) of Cannabis. V: Handbook of Cannabis. Handbooks in Psychopharmacology. Pertwee R.G. (ur). Oxford University Press, London. 2014: 89-110.
- de Meijer E.P.M., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V.C., Ranalli P., Mandolino G. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*. 2003; 163(1): 335-346.
- Di Candilo M., Di Bari V., Giordano I., Grassi G., Pentagelo A., Ranalli P. Due nuovi genotipi di canapa da fibra: descrizione morfo-produttiva. *Sementi Elette*. 2000; 46: 25-31.
- Fike J. Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2016; 35(5-6): 406-424.
- Finta-Korpelova Z., Berenji J. Trends and achievements in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*. 2007; 39(80): 63-75.
- Flajšman M., Kocjan Ačko D., Bohanec B. Določanje odmerka obsevanja z X-žarki RD30 iz površine listov pri treh sortah navadne konoplje. V: ČEH, Barbara (ur.) in sod. *Novi izzivi v agronomiji 2017 : zbornik simpozija, Laško, 2017*. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo. 2017; 140-146.
- Flajšman M., Kocjan Ačko D., Čeh B. Karakteristike sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) v pridelavi v Sloveniji. *Hmeljarski bilten*. 2018; 25: 44-58.
- Gamelas J.A.F. The surface properties of cellulose and lignocellulosic materials assessed by inverse gas chromatography: a review. *Cellulose*. 2013; 20: 2675-2693.
- Grassa C.J., Wenger J.P., Dabney C., Poplawski S.G., Motley S.T., Michael T.P., Weiblen G.D. A complete Cannabis chromosome assembly and adaptive admixture for elevated cannabidiol (CBD) content. *BioRxiv*. 2018. doi: 10.1101/458083
- Grassi G., McPartland J.M. Chemical and morphological phenotypes in breeding of *Cannabis sativa* L. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 137-160.
- Hennink S. Optimization of breeding for agronomic traits in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) by study of parentoffspring relationships. *Euphytica*. 1994; 78: 69-76.
- Janatova A., Frankova 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 Production*. 2018; 112: 363-367.
- Kolenc Z., Čerenak A. Application of sex molecular markers in hemp plant (*Cannabis sativa* sp.). *Hmeljarski bilten*. 2017; 24: 121-128.

- Kušar A., Flajšman M., Kocjan Ačko D., Pravst I., Čeh B. Prehranska sestava industrijske konoplje glede na sorto. *Hmeljarski bilten*. 2018; 25: 76-84.
- Laverty K.U., Stout J.M., Sullivan M.J., Shah H., Gill N., Holbrook, L., ..., Van Bakel H.A. A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome research*. 2019; 29(1): 146-156.
- Liang Q. Foreword. V: Plant mutation breeding and biotechnology. Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H. (ur.). CABI, Oxfordshire. 2012: 608 str.
- Mandolino G., Carboni A. Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*. 2004; 140: 107-120.
- Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., Ranalli P. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1999; 98: 86-92.
- Müssig J. Quality aspects in hemp fiber production influence of cultivation, harvesting and retting. *Journal of Industrial Hemp*. 2003; 8(1): 11-32.
- Onofri C., Mandolino F. Genomics and Molecular Markers in *Cannabis sativa* L.. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 319-342.
- Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G. Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. *Molecular Breeding*. 2006; 17: 257-268.
- Placet V. Characterization of the thermo-mechanical behaviour of Hempfibers intended for the manufacturing of high performance composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2009; 40: 1111-1118.
- Plant variety database- European Commission. Dostopno na: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=A&species_id=240&variety_name=&listed_in=0&show_current=on&show_deleted (oktober 2019)
- Poniatowska J., Wielgus K., Szalata M., Szalata M., Ożarowski M., Panasiewicz K. Contribution of Polish agrotechnical studies on *Cannabis sativa* L. to the global industrial hemp cultivation and processing economy. *Herba Polonica*. 2019; 65(2): 37-50.
- Posselt U.K. Breeding methods in cross-pollinated species. V: Fodder Crops and Amenity Grasses. *Handbook of Plant Breeding*. Vol. 5. Boller B. (ur.). Springer Science and Business Media, LLC, New York. 2010: 39-87.
- Ranalli P. Current status and future scenarios of hemp breeding. *Euphytica*. 2004; 140(1-2): 121-131.
- Salentijn E.M., Petit J., Trindade L.M. The Complex Interactions Between Flowering Behavior and Fiber Quality in Hemp. *Frontiers in plant science*. 2019: 10.
- Salentijn E.M., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L.M. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. 2015; 68: 32-41.
- Sawler J., Stout J.M., Gardner K., Hudson D., Vidmar J., Butler L., ... , Myles S. The genetic structure of marijuana and hemp. *PloS one*. 2015; 10(8): e0133292.
- Small E. Interfertility and chromosomal uniformity in *Cannabis*. *Canadian Journal of Botany*. 1972; 50: 1947-1949.
- Small E., Antle T. A preliminary study of pollen dispersal in *Cannabis sativa* in relation to wind direction. *Journal of Industrial Hemp*. 2003; 8(2): 37-50.

-
- Small E., Cronquist A. Practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon. 1976; 25, 4: 405-435.
- Törjék O., Bucherna N., Kiss E., Homoki H., Finta-Korpelová Z., Bócsa I., Nagy I., Heszky L.E. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. Euphytica. 2002; 127(2): 209–218.
- 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): R102.
- Weiblen G.D., Wenger J.P., Craft K.J., ElSohly M.A., Mehmedic Z., Treiber E.L., Marks M.D. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. New Phytologist. 2015; 208: 1241–1250.
- Welling M.T., Liu L., Shapter T., Raymond C.A., King G.J. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. Euphytica. 2016; 208(3): 463-475.
- Zeven A.C., Zhukovsky P.M. Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity. Pudoc, Wageningen, Nizozemska. 1975: ISBN 9022005496.

OPIS ŽLAHTNITELJSKIH POTI PRIDOBITVE NAKATERIH EVROPSKIH SORT INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.) IN REGISTRACIJA NOVIH SORT

Marko FLAJŠMAN¹

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 24. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 5. 12. 2019

Izveček

Navadna konoplja izvira iz osrednje Azije. Prvi pridelovalci so nehote z odbiro divjih rastlin, ki so bile višje, imele večje seme in bolj smolnata socvetja, začeli proces domestifikacije. Nadaljna človeška odbira in okoljski selekcijski pritiski so vodili do razvoja pokrajinskih populacij (angl. landraces) in naprej do prvih sort. Predhodnik večine dvodomnih evropskih sort je stara italijanska pokrajinska populacija Carmagnola, ki izvira iz kitajske širokolistne pokrajinske populacije. Predhodnik večine enodomnih sort pa je Fibrimon, prva nemško-francoska enodomna sorta, nastala z natančnim žlahtniteljskim delom (samoopraševanje in križanje) in z odbiro. Navadna konoplja je poljščina in prijava novih sort zahteva 2-letno RIN in VPU testiranje. Na sortni listi trenutno ni slovenskih sort navadne konoplje.

Ključne besede: industrijska konoplja, *Cannabis sativa* L., enodomna sorta, dvodomna sorta, registracija novih sort

DESCRIPTION OF BREEDING PATHS OF SOME HEMP (*Cannabis sativa* L.) VARIETIES AND THE REGISTRATION OF NEW VARIETIES

Abstract

Hemp have originated in central Asia. The first cultivators inadvertently began the domestication process by sowing seeds from plants expressing favourable traits such as taller stalks, larger seeds and enhanced trichome production in the inflorescences. Continued human selection and natural selective pressures led to the development of landraces, until they reach the cultivar stage. The common ancestor of most dioecious European varieties is the old Italian landrace Carmagnola which originates from the Chinese broad-leaflet hemp landrace. The common ancestors of almost all monoecious European varieties is Fibrimon, the first German-French monoecious variety, created by precision breeding work (self-pollination and cross-breeding) and selection. Hemp is used as a crop. Therefore,

¹ Asist. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marko.flajsman@bf.uni-lj.si

2-year DUS and VCU test must be performed prior the application of new varieties. There are currently no Slovenian hemp varieties in the common catalogue of varieties.

Key words: hemp, *Cannabis sativa* L., dioecious variety, monoecious variety, application of new varieties

1 UVOD

Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) je poljščina z več tisočletno zgodovino gojenja (Fike, 2016). Za njeno izhodišče štejemo osrednjo Azijo z dvema centroma izvora (Zeven in Zhukovsky, 1975), od koder se je v zadnjih 6000 letih razširila po celem svetu (Small, 2015). Nato se je v posameznih predelih sveta konoplja stoletja ali celo tisočletja ločeno in v izolaciji razvijala, bodisi kot gojena rastlina, bodisi kot divje populacije. To je verjetno razlog, da so se oblikovale populacije, ki so si med seboj močno različne tako morfološko kot tudi genetsko (Salentijn in sod., 2015). Zato taksonomija navadne konoplje še danes ni poenotena, saj nekateri avtorji zagovarjajo uvrščanje genotipov konoplje zgolj v eno vrsto (*Cannabis sativa* L.) z več podvrstami (latinsko subspecies) in varietetami (npr. *C. sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*, *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica*, *C. sativa* subsp. *sativa* var. *spontanea*) (npr. Small in Cronquist, 1976; de Meijer, 2014), medtem ko jo drugi raziskovalci delijo v več vrst, npr. *C. sativa*, *C. indica* in *C. ruderalis* (npr. Hillig, 2005; McPartland in Guy, 2004; Sawler in sod., 2015).

Glede na vsebnost psihoaktivnega kanabinoida Δ^9 -THC (delta-9-tetrahidrokanabinol) delimo konopljo na dve skupini, in sicer na industrijsko konopljo (vsebnost Δ^9 -THC je pod 0,2 % v suhi snovi; v Kanadi in nekaterih EU državah je ta meja 0,3 % ali več) in medicinsko konopljo, ki vsebuje Δ^9 -THC nad 0,2 % v suhi snovi (Small in Cronquist, 1976; Fike, 2016). Zgornja dovoljena meja 0,2 % Δ^9 -THC v suhi snovi je žlahtniteljem industrijske konoplje močno omejila uporabo perspektivnih žlahtniteljskih linij in tako zožila možnosti pridobitve boljših sort. Obstajajo stare sorte in nove linije industrijske konoplje, pridobljene v postopkih žlahtnjenja, ki imajo visok potencial za uspešno pridelavo za seme in vlakna, toda ker vsebujejo Δ^9 -THC nad dovoljeno mejo, a večinoma ne več kot 1 %, njihova pridelava na prostem za industrijske namene ni dovoljena in se zato tudi niso ohranjale (Berenji in sod., 2013). 1 % Δ^9 -THC v suhi snovi je meja, ki pri uživanju povzroča psihotropične učinke (Chait in sod., 1988; Grotenhermen in Karus, 1998), zato se zdi sedanja določena vsebnost 0,2 % Δ^9 -THC v suhi snovi, ki je ločnica med dovoljenimi in nedovoljenimi sortami, nerazumno postavljena v škodo poljedelske pridelave in izkoriščanja industrijske konoplje.

Pridelava industrijske konoplje v Evropi je pred 20. stoletjem temeljila na uporabi domačih pokrajinskih populacij, ki so jih pridelovalci sami počasi izboljševali z

masovno odbiro. V 20. stoletju pa so začeli žlahtnitelji uporabljati tujo dednino za križanja z namenom povečati pridelke vlaken in semena. Križanja med mediteranskimi in osrednjerskimi ekotipi predstavljajo glavne žlahtniteljske linije, iz katerih je nastala večina evropskih sodobnih sort (Clarke in Merlin, 2017).

V prispevku so prikazani pomembni dosežki v poteku žlahtnjenja industrijske konoplje v Evropi, opisani so uporabljeni pristopi pri pridobitvi nekaterih znanih evropskih sort (starševske sorte/linije in načini žlahtnjenja) ter kako poteka testiranje novih kandidatnih sort industrijske konoplje in postopek vpisa na sortno listo.

2 MEJNIKI ŽLAHTNENJA INDUSTRIJSKE KONOPLJE V EVROPI

V prvih treh desetletjih 20. stoletja so v Evropi sorte žlahtnili z odbiro iz starih pokrajinskih populacij glede na dolžino rastne dobe, višino, premer in težo stebel ter v nekaterih primerih tudi na pridelek semena. L. H. Dewey velja za enega izmed prvih žlahtniteljev industrijske konoplje, saj je leta 1927 objavil delo, v katerem je opisal pridobitev poznih sort iz kitajskih pokrajinskih populacij (angl. landraces) (Dewey, 1927). Ena izmed starševskih komponent je bila tudi pokrajinska populacija Ferrara (Ranalli, 2004). Odbira glede na zgoraj opisane morfološke lastnosti je enostavna in relativno hitro vodi v izenačenje populacije. Toda na ta način se kvalitativne lastnosti, kot je npr. količina vlaken v stebelu, niso izboljševale. Prva izmed prelomnic v žlahtnjenju industrijske konoplje je bilo odkritje, da se delež vlaken deduje tako po materi kot tudi očetu pri dvodomnih konopljah (moški in ženski cvetovi se nahajajo na ločenih rastlinah). Bredemann (1924) je prvi uporabil metodo odbire moških rastlin za povečanje deleža vlaken v steblih konoplje in v naslednjih 30 letih povečal delež vlaken za trikrat, iz 12 – 15 % na 25–35 % (Berenji in sod., 2013). Bolj znani žlahtnitelji iz tega zgodnjega obdobja so še Rudolf Fleischmann iz Madžarske, Otto Heuser iz Nemčije ter Vedenski, Grishko in Malusha iz Rusije (Ranalli, 2004). Druga večja prelomnica pri žlahtnjenju industrijske konoplje je bilo odkritje hermafroditnih enodomnih rastlin (moški in ženski cvetovi se nahajajo na isti rastlini), ki jih je bilo mogoče tudi samoopraševati in na ta način razvijati bolj izenačene nove sorte (Grishko in Malusha, 1935; Grishko in sod., 1937). Od takrat se je uporaba samoopraševanja in križanja eno- in dvodomnih rastlin ter vnašanja heteroznega učinka pri žlahtnjenju konoplje začela obširneje uporabljati in je vodila do razvoja sodobnih sort. Neuer in Sengbusch (1943) sta prva fiksirala lastnost za enodomnost. Njuno delo je vodilo do pridobitve sorte Fibrimon, ki je verjetno prva uradno registrirana enodomna sorta (Bredemann in sod., 1961), iz katere izhajajo številne sodobne sorte. Pridobitev enodomnih linij je vodilo v odkritje, da se lahko F1 potomci križanja dvodomnih ženskih rastlin in enodomnih rastlin uporabijo kot materna komponenta pri pridobivanju hibridov konoplje (Bócsa, 1967), kar je vodilo do

registracije sort Uniko-B leta 1969 in Kompolti hibrid TC let 1983. Potrebno je poudariti, da to niso pravi hibridi, ki bi nastali s križanjem čistih (genetsko izenačenih, homogenih) linij, ampak gre za križanja rastlin, ki sicer lahko izvirajo iz uradno registrirane sorte, vendar so rastline genetsko heterogene. Pomemben mejnik v žlahtnjenju industrijske konoplje je tudi pridobitev sorte Finola (v EU registrirana leta 1999; Clarke in Merlin, 2017), ki cveti neodvisno od dolžine dneva (angl. auto flowering). Poleg tega je tudi nizka in zato bolj primerna za strojno žetev semena, kar je redkost med sortami navadne konoplje (Callaway in Lakkonen, 1996).

3 OPIS ŽLAHTNENJA NAKATERIH EVROPSKIH SORT INDUSTRIJSKE KONOPLJE

3.1 Dvodomne sorte

Veliko današnjih dvodomnih sort industrijske konoplje, katerih namen pridelave je pridobivanje vlaken, ima skupnega prednika, in sicer sorto Carmagnolo (Clarke in Merlin, 2017).

Carmagnola je pokrajinska populacija konoplje iz severnega dela Italije in je najstarejša populacija v Italiji. Z masovno selekcijo je bila požlahtnjena v sorto. Izvira iz neke kitajske širokolistne (angl. broad-leaflet hemp) pokrajinske populacije (Clarke in Merlin, 2017). V preteklosti je bila razširjena po celi Italiji, kjer so z masovno selekcijo pridobili ekotipe in nato sorte Bolognese, Toscana in Ferrarese (Ranalli, 2004). Sorta Carmagnola Selezionata (CS) je bila pridobljena iz Carmagnole v 70. letih 20. stoletja. Carmagnola je bila tudi eden izmed staršev pri pridobitvi sort Fibranova (drugi od staršev je bila sorta Bredemann Eletta) in Eletta Campana (drugi od staršev je bila verjetno nemška sorta Fibridia) (de Meijer, 1995). Sorte Carmagnola, CS, Fibranova in Eletta Campana se še danes nahajajo na evropski sortni listi.

Večina madžarskih sort je dvodomnih. Stara madžarska sorta je bila Fleischmannova konoplja (angl. Fleischmann hemp ali F-hemp), ki jo je leta 1931 pridobil Rudolf Fleischmann s križanjem inbridiranih pokrajinskih populacij Bologna in Ferrara, ki sta italijanskega izvora (Grassi in McPartland, 2017). Sorta Kompolti je bila verjetno pridobljena iz italijanske sorte Carmagnola z odbiro na višjo vsebnost vlaken v steblih (Clarke in Merlin, 2017). Uniko-B je eno-linijski hibrid (registriran leta 1969), kjer so bile materna komponenta dvodomne ženske rastline sorte Kompolti, očetna komponenta pa enodomna sorta Fibrimon 21. F1 potomci so bili skoraj v celoti ženske rastline in nekaj enodomnih ter zelo malo moških rastlin. F1 potomce so nato oprášili med sabo in F2 generacija (komercialno seme) je vsebovala okoli 30 % moških rastlin, sorta je bila primerna za pridelavo vlaken (Bócsa in Karus, 1998). Kompolti hibrid TC je tri-linijski

hibrid. Materna komponenta so bile ženske dvodomne rastline kitajske sorte Kinai, ki so jih križali z enodomnimi rastlinami sorte Kinai. Pridobili so F1 Kinai Uniszex. V drugem letu so F1 Kinai uniszex uporabili kot materno komponento in jo križali z moškimi rastlinami sorte Kompolti. F2 potomci so bili nova sorta Kompolti hibrid TC, ki je sestavljena iz 50 % ženskih in 50 % moških rastlin (Ranalli, 2004).

Na prostoru bivše Jugoslavije (predvsem Srbija in Hrvaška) so v preteklosti za pridelavo uporabljali predvsem tuje sorte, žlahtnjenje se je začelo šele po letu 1950 (Bouloc in Berenji, 2013). Uporabljali so dve domači sorti, in sicer Flajsmanovo (gre za prilagojene rastline Fleischmannove konoplje iz Madžarske) in Novosadsko konopljo, ki je bila v 60. letih prejšnjega stoletja z masovno selekcijo požlahtnjena iz Fleischmannove konoplje (de Meijer, 1995). Na Srbski sortni listi se od leta 2002 nahajajo 3 sorte, in sicer Marina (dvodomna), Helena (enodomna) in Diana (F1 hibrid) (Bouloc in Berenji, 2013). Tik pred vpisom na evropsko sortno listo sta sorti Marina in Helena (Helena Rakovec, osebna komunikacija).

Finola (slika 1) je posebna sorta med vsemi sortami industrijske konoplje zaradi lastnosti, da začne cveteti neodvisno od fotoperiode (Callaway in Lakkonen, 1996).



Slika 1: Posevek sorte Finola (Novo mesto, 2018)

Je zgodnja sorta, pridobljena na Finskem in je namenjena pridelavi semena v severnejših geografskih širinah. V večjem obsegu jo pridelujejo v Kanadi za seme in olje (Small in Marcus, 2002). Finola je križanec dveh zelo podobnih, zgodnjih severno ruskih ozkolistnih (angl. narrow-leaflet hemp) pokrajinskih populacij, ki so ju hranili v Vavilovem inštitutu (Vavilov Research Institute) v Sankt Peterburgu v Rusiji (Clarke in Merlin, 2017). Je nizka in zgodnja sorta namenjena strojni pridelavi. V EU je bila registrirana leta 1999 (Clarke in Merlin, 2017). Doseže

lahko visoke pridelke semena, tudi do 1,7 t/ha (Callaway in Lakkonen, 1996). V Italiji jo v zadnjih letih uporabljajo kot enega izmed staršev pri križanjih s sorto Carmagnolo in drugimi sortami, ki izhajajo iz Carmagnole z namenom vnesti lastnost enodomnosti v potomce in zvišati pridelek semena (Grassi in McPartland, 2017).

3.2 Enodomne sorte

Skoraj vse evropske novodobne enodomne sorte izhajajo iz sorte Fibrimon, ki so jo požlahtnili v Nemčiji v letih 1951 do 1955. Fibrimon je bila pridobljena iz ene same enodomne rastline, ki je bila naključno najdena v pokrajinski populaciji iz osredne Rusije. Rastlino so samoopraševali in pridobili linijo, ki so jo nato križali z ženskimi rastlinami iz linije z visoko vsebnostjo vlaken iz Nemčije in s pozno cvetočimi gojenimi populacijami iz Italije in Turčije (de Meijer, 1995; Clarke in Merlin, 2017). Konoplja s samoopraševanjem izgublja vigor (Clarke in Merlin, 2017). To bi lahko bil razlog, da so enodomne sorte običajno manj bujne od dvodomnih sort, npr. dosežejo nižjo končno višino, manjši premer stebela in nižji pridelek biomase (Flajšman in Kocjan Ačko, ta izdaja).

Poljska je svoje enodomne sorte pridobila s križanjem in odbiro iz drugih evropskih sort (preglednica 1). Najstarejši sorti sta Bialobrzeskie in Beniko. Bialobrzeskie je nastala z večkratnim križanjem dvodomnih in enodomnih sort in linij (LKCS D x Kompolti), potomci so bili nato križani z enodomno sorto Fibrimon. Sledila je večletna odbira in po 12 letih žlahtnjenja je bila sorta leta 1967 registrirana. Kar 21 let so žlahtnili enodomno sorto Beniko (registrirana leta 1985). Pridobitev te sorte je temeljila na križanju dveh enodomnih sort (Fibrimon 21 x Fibrimon 24) ter nato na individualni odbiri. Obe opisani sorti sta nadalje služili kot eden izmed staršev pri pridobitvi sort Tygra, Wojko in Rajan. Zadnja registrirana sorta je Henola iz leta 2017, ki je križanec med sorto Zolotonowska 13 (enodomna) in Zenica (dvodomna) (Poniatowska in sod., 2019).

Vse francoske sorte so potomke enodomne sorte Fibrimon, ki je bila v Francijo prinesena proti koncu 60. let prejšnjega stoletja iz Nemčije, kjer se je njeno žlahtnjenje tudi začelo. Sorte Fibrimon 21, Fibrimon 24 in Fibrimon 56 (danes jih ni več na sortni listi) so bile odbrane direktno iz Fibrimona in so se med sabo razlikovale v času cvetenja. Tudi Ferimon je sorta, ki je bila odbrana direktno iz Fibrimona in se danes še nahaja na sortni listi. Fedora 19 je nastala kot dvo-linijski hibrid križanja ženskih dvodomnih rastlin ruske sorte JUS-9 in enodomnih rastlin sorte Fibrimon 21, sledilo je povratno križanje F1 generacije z enodomnimi rastlinami sorte Fibrimon 21. Danes je na sortni listi sorta Fedora 17 (odbrana iz sorte Fedora 19 in vsebuje manj Δ^9 -THC). Po isti shemi so bile pridobljene sorte Féline 34 (materna komponenta so bile ženske dvodomne rastline madžarske sorte Kompolti) in Fédrina 74 ter Futura 77 (materna komponenta obeh sort so bile

ženske dvodomne rastline nemške sorte Fibridia), opraševalna linija pa dvakrat Fibrimon 24 (de Meijer, 1995). Sorte Fédrina 74 ni več na sortni listi, sorti Félina 34 in Futura 77 pa sta zamenjali novejši sorti Félina 32 in Futura 75, ki vsebujeta manj Δ^9 -THC. V zgodnjih 80. letih prejšnjega stoletja so v Franciji začeli intenzivno odбирati linije glede na vsebnost Δ^9 -THC. Po letu 2001 so uspeli odbrati linije, ki so vsebovale samo 0,05 % Δ^9 -THC v suhi snovi. Od tod tudi novodobne sorte z zelo nizko vsebnostjo tega kanabinoida, npr. Fedora 17, Felina 32 in Futura 75. Iz posameznih rastlin so odbrali tudi linije, kjer je raven Δ^9 -THC zaradi naravne mutacije padla pod mejo detekcije. Iz tovrstne selekcije izvirajo sorte Santhica 23, Santhica 27 in Santhica 70 (Berenji in sod., 2013).

Preglednica 1: Prikaz poti in časovna opredelitev žlahtnjenja poljskih sort (povzeto po Poniatowska in sod., 2019)

Sorta	Starši	Spolna oblika*	Začetek žlahtnjenja	Konec žlahtnjenja	Trajanje žlahtnjenja (let)
Białobrzeskie	(LKCS D x Kompolti) x Fibrimon	(D x E) x E	1956	1967	12
Beniko	Fibrimon 21 x Fibrimon 24	E x E	1964	1985	21
Tygra	Białobrzeskie x Ukraińskie	E x E	1998	2007	9
Wojko	Jermachowskie x Beniko	E x E	2000	2011	11
Rajan	Giganteus x Białobrzeskie	D x E	2000	2014	14
Henola	Zołotonowska 13 x Zenica	E x D	2004	2017	13

*D - dvodomna oblika; E – enodomna oblika

4 SLOVENSKE SORTE

Sredi 20. stoletja sta se na slovenskem pridelovale ruska in laška konoplja. Baška in srbska konoplja sta bili domači obliki. Poznali so tudi ogrsko, špansko in ameriško konopljo (Sadar, 1935; 1951). V 90. letih 20. stoletja so bile v slovensko sortno listo vpisane sorte Kompolti kender, Kompolti hibrid TC, Kompolti sarga szaru, Unico B in Novosadska konoplja (Kocjan Ačko, 1999). V tistem času so v genski banki hranili dve sorti, to sta bili Rudnik 1-AŠ in Rudnik 2-AŠ. Gre za semena iz zapuščine Ane Šteblaj (Rengeo, 1995). Danes imajo v genski banki na Kmetijskem inštitutu shranjenih osem genskih virov konoplje, zbranih na področju Slovenije v zadnjih dvajsetih letih (Jelka Šuštar-Vozlič, osebna komunikacija).

Slovenski sorti, ki sta se pridelovali ob koncu 20. stoletja, sta bili po pričevanjih prof. Jožeta Spanringa Rudnik in Pesnica (de Meijer, 1995). Danes na sortni listi ni slovenskih sort. V postopku registracije in preizkušanja sta trenutno dve slovenski sorti, in sicer Fukal (prijavitelj Dejan Rengeo), ki je v postopku prijave kot ohranjevalna sorta. Gre za staro pokrajinsko populacijo konoplje, ki so jo v preteklosti pridelovali v Prekmurju. Pridelovalec Dejan Rengeo je staro seme shranil in ga množil v izolaciji. V načrtu ima prijavo še ene domače ohranjevalne sorte, imenovana Gorička Simba, vendar zaenkrat še nima zadostne količine semena (D. Rengeo, osebna komunikacija). Druga kandidatna sorta v prijavi je enodomni dvo-linijski hibrid, katerega prijavitelj je Biotehniška fakulteta.

5 POSTOPEK PRIJAVE IN VPISA KANDIDATNE SORTE NAVADNE KONOPLJE NA SORTNO LISTO (POVZETO PO WWW.GOV.SI – UVHVVR IN OSEBNI VIRI)

»Zakon o semenskem materialu kmetijskih rastlin« predpisuje pogoje, pod katerimi se lahko sorte vpišejo v sortno listo. V Sloveniji vpise sort na sortno listo ureja Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Vpis sorte na sortno listo omogoča trženje semena sorte. Evropsko sortno listo objavlja Evropska komisija. Če je sorta vpisana v uradni seznam (sortno listo) vsaj v eni državi članici EU, je vpisana tudi v Skupni katalog sort poljščin. Industrijska konoplja je poljščina, zato za prijavo nove sorte industrijske konoplje veljajo ista pravila kot za vpis drugih poljščin na sortno listo (npr. koruze, pšenice, soje, itd.).

5.1 Pogoji za vpis konoplje na sortno listo

Osnovni pogoj nove sorte je, da je razločljiva (pri konoplji se pregleduje 22 lastnosti), izenačena in nespremenljiva (RIN). RIN testi so pri konoplji dvoletni. Če se sorta prijavlja preko Slovenije, se RIN testiranja opravljajo v tujini. Ena izmed testnih lokacij je inštitut Nebih v Tordasu na Madžarskem (slika 2). Količina semena, ki je potrebna za opravljanje RIN testa, je 2 kg. Nova sorta konoplje mora opraviti tudi dvoletni VPU test (vrednost za pridelovanje in uporabo), ki ga izvaja Kmetijski inštitut Slovenije na dveh lokacijah (Jablje in Rakičan). Količina semena, ki je potrebna za opravljanje VPU testa, je tudi 2 kg. Sorta mora imeti ob vpisu na sortno listo ustrezno ime, pred tem je lahko evidentirana pod poljubno številko žlahtnitelja.

5.2 Stroški, povezani z registracijo in vzdrževanjem nove sorte

Ob prijavi kandidatne sorte na UVHVVR je potrebno oddati obrazec za prijavo in izpolniti tehnični vprašalnik, kjer so opisane nekatere lastnosti kandidatne sorte in postopki žlahtnjenja. Poravnati je potrebno upravno takso v višini 22,60 €. Prijava

se mora vložiti do 15. marca oz. do 1. aprila, če se sorta prijavlja kot ohranjevalna. Stroški RIN preizkušanja so 500 € na leto (velja za inštitut Nebih, Madžarska), stroški VPU testiranja pa 550 € na leto. Po tem, ko je sorta vpisana v sortno listo, je potrebno vsako leto plačati letno pristojbino, ki za navadno konopljo znaša 24 € na sorto. Sorta konoplje se na sortno listo vpiše za trajanje 10 let.



***Slika 2:** Testna lokacija na inštitutu Nebih v Tordasu na Madžarskem, kjer so v letu 2019 preizkušali 11 kandidatnih sort. Poleg njih so imeli posejanih 8 sort kot standarde, s katerimi lahko primerjajo značilnosti kandidatnih sort.*

6 ZAKLJUČKI

Mejniki žlahtnjenja industrijske konoplje v 20. stoletju (odbira moških rastlin pred cvetenjem glede na vsebnost vlaken, razvoj enodomnih sort, sheme pridobivanja »hibridnih« sort pri konoplji, odkritje in uporaba neodvisnosti od fotoperiode v dednini industrijske konoplje) so vodili do razvoja številnih novih sort, požlahtnjenih glede na namen uporabe. Pokrajinske populacije, ki so se skozi zgodovino oblikovale s človeško odbiro in okoljskim selekcijskim pritiskom, so bile podlaga za nova križanja in oblikovanje sodobnih dvodomnih sort, kot sta Kompolti hibrid TC in Finola, ter enodomnih sort, kot so Futura 75, USO-31 in Henola.

Slovenskih sort na sortni listi zaenkrat nimamo in tudi genski viri so omejeni. Za uspešnejšo pridelavo industrijske konoplje pri nas bi gotovo potrebovali slovenske sorte, ki bi imele zaradi boljše prilagoditve na naše pedo-klimatske razmere višje pridelke stebel in semena od tujih sort. Nova zgodba so kanabinoidi, ki bodo verjetno v prihodnosti postali vodilni produkt industrijske konoplje. Zato bi bilo smiselno žlahtniteljske napore vlagati v razvoj novih slovenskih sort, ki bi imele visok potencial za pridelek kanabinoidov kot tudi željen kanabinoidni profil.

Zahvala. Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa P4-0077 Kmetijske rastline - genetika in sodobne tehnologije, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

7 VIRI

- Berenji J., Sikora V., Fournier G., Beherec O. Genetics and selection of hemp V: Hemp: Industrial Production and Uses. Bouloc P. (ur.). London, CABI. 2013: 48-72.
- Bócsa I. Kender fajtahibrid előállításához szükséges unisexuális (hímmentes) anyafajta nemesítése. Rostnövények. 1967: 3-7.
- Bócsa I., Karus M. The cultivation of hemp. Botany, varieties, cultivation and harvesting. Hemptech, Sebastopol (ZDA.). 1998: 172 str.
- Bouloc P., Berenji J. Hemp Production Outside the EU – North America and Eastern Europe. V: Hemp: Industrial Production and Uses. Bouloc P. (ur.). London, CABI. 2013: 268-277.
- Bredemann G. Beitrage zur Hanfzuchtung II. Ansele faserreicher. Mannchen zur Befruchtung durch Faser-bestimmung an der lebeden Pflanze vor deu Blute. Angew Botanik. 1924; 6: 348–360.
- Bredemann G., Garber K., Huhnke W., von Sengbusch R. Die Züchtung von monözischen und diözischen, faserertragreichen Hanfsorten Fibrimon und Fibridia. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung. 1961; 46: 235-245.
- Callaway J.C., Laakkonen T.T. Cultivation of Cannabis oil seed varieties in Finland. Journal of the International Hemp Association. 1996; 3: 32-34.
- Chait L.D., Evans S.M., Grant K.A., Kamien J.B., Johanson C.E., Schuster C.R. Discriminative stimulus and subjective effects of smoked marijuana in humans. Psychopharmacology. 1988; 94: 206–212.
- Clarke R.C., Merlin M.D. Cannabis domestication, breeding history, present-day genetic diversity, and future prospects. Critical reviews in plant sciences. 2016; 35(5-6): 293-327.
- de Meijer E.P.M. The chemical phenotypes (chemotypes) of Cannabis. V: Handbook of Cannabis. Handbooks in Psychopharmacology. Pertwee R.G. (ur). Oxford University Press, London. 2014: 89–110.
- de Meijer E.P.M.. Fibre hemp cultivars: A survey of origin, ancestry, availability and brief agronomic characteristics. Journal of the International Hemp Association. 1995; 2(2): 66-73.
- Dewey L.H. Hemp varieties of improved type are result of selection. Yearbook of the Department of Agriculture. ZDA. 1927: 358–361.
- Fike J. Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop. Critical Reviews in Plant Sciences. 2016; 35(5-6): 406-424.
- Flajšman M., Kocjan Ačko D. Vpliv rastnih razmer na pridelek stebel in morfološke lastnosti 12 sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) v letih 2018 in 2019. Hmeljarski bilten. 2019. Ta izdaja.
- Grassi G., McPartland J.M. Chemical and morphological phenotypes in breeding of *Cannabis sativa* L. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 137-160.
- Grishko N.N., Levchenko V.I., Seletski V.I. Question of sex in hemp, the production of monoecious forms and of varieties with simultaneous ripening of both sexes. Vsesoy. Nauchno- Issled. Inst. Konopli. 1937; 5: 73–108. (v ruščini z angl. povzetkom)
- Grishko N.N., Malusha K.V. Probleme und Richtlinien in Hanfzuchtung. Trudy po Prikladnoi Botanike. 1935; 4: 61–67. (v ruščini)

- Grotenhermen F., Karus M. Industrial hemp is not marijuana: comments on the drug potential of fiber Cannabis. *Journal of the International Hemp Association*. 1998; 5: 96–101.
- Hillig K.W. Genetic evidence for speciation in Cannabis (*Cannabaceae*). *Genetic Research and Crop Evolution*. 2005; 52(2): 161–180.
- Kocjan Ačko D. Pomen lanu in konoplje v preteklosti in obeti zanju v prihodnosti. *Sodobno kmetijstvo*. 1999;32 (4): 173-178.
- McPartland J.M., Guy G.W. The evolution of Cannabis and coevolution with the cannabinoid receptor – a hypothesis. V: *The medicinal uses of Cannabis and cannabinoids*. G. W, Whittle B. A., Robson P. J. (ur). Pharmaceutical Press, London. 2004: 71–101.
- Neuer H.V., Sengbusch R.V. Die Geschlechtsvererbung bei Hanf und die Züchtung eines monöcischen Hanfes. *Der Züchter (Zeitschrift für theoretische und angewandte Genetik)*. 1943; 15:(3): 49–62.
- Poniatowska J., Wielgus K., Szalata M., Szalata M., Ożarowski M., Panasiewicz K. Contribution of Polish agrotechnical studies on *Cannabis sativa* L. to the global industrial hemp cultivation and processing economy. *Herba Polonica*. 2019; 65(2): 37-50.
- Rengeo D. Konoplja in lan. Izdano ob prireditvi Bujraški dnevi Ižakovci. 1995: 52 str.
- Ranalli P. Current status and future scenarios of hemp breeding. *Euphytica*. 2004; 140(1-2): 121-131.
- Sadar V. Lan in konoplja. Kmetijska matica, Ljubljana, 1935: 78 str.
- Sadar V. Olnice, korenovke, predivnice in hmelj. Založba Kmečka knjiga, Ljubljana, 1951: 355 str.
- Salentijn E.M., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L.M. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. 2015; 68: 32-41.
- Sawler J., Stout J.M., Gardner K., Hudson D., Vidmar J., Butler L., ... , Myles S. The genetic structure of marijuana and hemp. *PloS one*. 2015; 10(8): e0133292.
- Small E. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *The Botanical Review*. 2015; 81(3): 189-294.
- Small E., Cronquist A. Practical and natural taxonomy for Cannabis. *Taxon*. 1976; 25, 4: 405-435.
- Small E., Marcus D. Hemp: a new crop with new uses for North America. V: *Trends in New Crops and New Uses*. Janick J., Whipkey A. (ur). ASHS Press, Alexandria, VA. 2002: 284–326.
- Zeven A.C., Zhukovsky P.M. Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity. Pudoc, Wageningen, Nizozemska. 1975: ISBN 9022005496.

TERPENI V NAVADNI KONOPLJI (*Cannabis sativa* L.)Marjeta ZAGOŽEN¹, Samo KREFT² in Andreja ČERENAK³

Pregledni članek / review article

Prispelo / received: 24. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 5. 12. 2019

Izveček

Terpeni so za kanabinoidi druga največja skupina sekundarnih metabolitov v navadni konoplji (*Cannabis sativa* L.). Pripisujejo jim številne terapevtske učinke. V rastlinah so odgovorni za njihov vonj, hkrati pa ščitijo rastline pred različnimi patogeni. V konoplji so najbolj zastopani monoterpeni in seskviterpeni. Glavni monoterpeni so β -mircen, d-limonen, α -pinen, β -pinen in linalol. Glavni seskviterpeni pa so β -kariofilen, α -humulen in nerolidol. Monoterpeni v konoplji nastajajo preko metileritritol fosfatne (MEP) sintazne poti, seskviterpeni pa preko citosolne mevalonatne (MEV) poti. Najvišja vsebnost terpenov (3,5 % - 10%) se nahaja v trihomih. Vsebnost je odvisna od agrotehničnih ukrepov, genotipa, okolja in razvojne faze. Terpenski profil se določa s plinsko kromatografijo. Eterično olje navadne konoplje se lahko uporablja kot repelentno sredstvo oz. insekticid, saj deluje odvrtačno in toksično na določene škodljive organizme.

Ključne besede: navadna konoplja, *Cannabis sativa*, eterično olje, terpeni, monoterpeni, seskviterpeni, repelenti

TERPENES IN HEMP (*Cannabis sativa* L.)**Abstract**

Terpenes are after the cannabinoids the second largest group of secondary metabolites in hemp (*Cannabis sativa* L.). They have many therapeutic effects. Terpenes in plants are responsible for their fragrance and for protection of plants against different pathogens. The main groups of terpenes in hemp are monoterpenes and sesquiterpenes. The main monoterpenes are β -myrcene, d-limonene, α -pinene, β -pinene, linalool. The main groups of sesquiterpenes are β -caryophyllene, α -humulene and nerolidol. Monoterpenes in hemp are synthesized via methylerythritol phosphate (MEP) pathway and sesquiterpenes are synthesized

¹ Mag. inž. agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: marjeta.zagozen@ihps.si

² Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, e-pošta: samo.kreft@ffa.uni-lj.si

³ Izr. prof. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

via cytosolic mevalonate (MEV) pathway. The highest terpene content is found in trichomes (from 3.5 % up to 10 %). Terpene content depends on agro-techniques, genotype, environmental and harvesting time. The terpene profil is determined mostly by gas chromatography. Essential oil can also be used as repelent and as insecticide. It has deterrent and toxic effect on specific insects.

Key words: hemp, *Cannabis sativa*, essential oil, terpenes, monoterpenes, sesquiterpenes, repelents

1 UVOD

Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) izvira iz centralne Azije (Andre in sod., 2016) in je ena najbolj znanih rastlin z omejeno pridelavo na svetu (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016). Uporablja se za prehrano ljudi in živali, za pridobivanje olja iz semen, vlakna, izdelavo vrvi ter za medicinske namene (Hillig, 2005).

Navadna konoplja vsebuje za rastlino značilne sekundarne metabolite, ki imajo številne terapevtske učinke na različne bolezni in motnje (Andre in sod., 2016). Do danes je bilo v konoplji odkritih več kot 500 snovi, ki pripadajo skoraj vsem kemijskim skupinam. Najbolj znani sekundarni metaboliti v konoplji so kanabinoidi, terpeni, flavononoidi, steroidi, alkaloidi, lignani itd. Med najbolj znane spadajo kanabinoidi, predvsem CBD (kanabidiol) in THC (delta-9-tetrahidrokanabinol) ter kanabigerol (CBG) in kanabikromen (CBC) (Janatova in sod., 2018).

Glede na različno vsebnost in razmerja med kanabinoidi se konoplja deli na 5 glavnih kemotipov. Leta 1973 sta Small in Becksted (1973) določila 3 kemotipe, in sicer; kemotip I, ki ima vsebnost THC nad 0,3 % in CBD vrednost pod 0,5 %; kemotip II (mešani tip), ki ima tako THC kot CBD vrednost v razmerju 1:1; in kemotip III, ki ima vsebnost CBD višjo od 0,3 % in vsebnost THC pod 0,3 %. Leta 1987 pa so določili še kemotip IV, pri katerem prevladuje kanabinoid CBG (vsebnost nad 0,3 %), vsebnost CBD pa je pod 0,5 %, ter kemotip V, v katerem ni zaznanih vsebnosti kanabinoidov oz. so te vrednosti zelo nizke (Fournier in sod., 1987). Tudi terpenški profil se spreminja glede na kemotip (Aizpura-Olaizola in sod., 2016).

Na drugem mestu po zastopanosti sekundarnih metabolitov pa so terpeni, glavni odgovorni za značilno aromo konoplje. Terpeni imajo tudi terapevtske učinke, vendar njihovo delovanje še ni popolnoma razumljivo. Že zelo majhna vsebnost terpenov v konoplji naj bi vplivala na aktivnost kanabinoidov (Namdar in sod., 2018). V konoplji se nahajata dve glavni skupini terpenov, in sicer monoterpeni in seskviterpeni (Russo, 2011).

V tem preglednem članku bomo predstavili najpogostejše terpene v konoplji, njihove lastnosti, vpliv na zdravje ter pomen za samo rastlino.

2 GLAVNI MONOTERPENI IN SESKVITERPENI V KONOPLJI

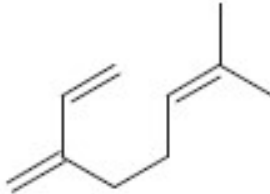
Rastline proizvajajo terpene zaradi interakcij z drugimi organizmi, saj jih le-ti ščitijo pred patogeni, kot so plesni, glive in bakterije, hkrati pa lahko z njimi privabljajo opraševalce in odganjajo škodljivce. V eteričnem olju konoplje in v eteričnem olju hmelja (*Humulus lupulus* L.) se večinoma nahajajo monoterpeni in seskviterpeniti, ki v hmelju predstavljajo 99 % od vseh terpenov v rastlini, v konoplji pa 98 % (Nuutinen, 2018). Tako kot so terpeni v konoplji odgovorni za vonj cvetov in rastline ter prispevajo k edinstvenemu okusu konopljinih izdelkov, tako terpeni v hmelju prispevajo k pomembni aromatični sestavi piva. V sorti 'Finola' je bilo do sedaj določenih 33 popolnih terpenskih sintaznih genov in 18 domnevnih terpenskih sintaznih genov. Nekateri sintazni geni lahko kodirajo zapise samo za posamezne terpene, medtem ko lahko drugi proizvajajo več kot enega (Booth in sod., 2017). Biokemični profil terpenov je bolj genetsko kot okoljsko pogojen. Največ terpenov se nahaja v žleznihih trihomih (Potter, 2009). V severnoameriških kemovarjih konoplje so do sedaj odkrili okrog 50 terpenov, od teh pa je najpogostejših 17 (Russo in Marcu, 2017).

Monoterpeni so v večini odgovorni za razlike v vonju med sortami, tudi seskviterpeni imajo podobne lastnosti, vendar se po navadi v rastlinah konoplje nahajajo v manjših količinah kot monoterpeni (Bertoli in sod., 2010). Seskviterpeni so tudi manj hlapni kot monoterpeni, njihov vonj pa lahko zaznamo le, če so vezani na alkohole ali ketone. Zaradi razlike v hlapnosti pri sušenju zato izgubimo večje količine monoterpenov kot pa seskviterpenov, vendar nobena od glavnih komponent olj popolnoma ne izgine (Hillig, 2004). Terpeni lahko skupaj s kanabinoidi pri farmakoloških učinkih delujejo sinergistično na zdravje (Russo, 2011).

Terpeni so s farmakološkega vidika vsestranski. Ker so lipofilni, interagirajo s celičnimi membranami, ionskimi kanali živčnih in mišičnih celic, nevrottransmitterskimi receptorji, G-proteinskimi receptorji in encimi. Vsi glavni terpeni v konoplji so s strani ameriške Agencije za hrano in zdravila (Food and Drug Administration) prepoznani kot varni prehranski dodatki (Russo, 2011).

2.1 Monoterpeni

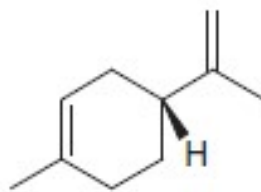
2.1.1 β -MIRCEN



Mircen

β -Mircen je najbolj zastopan terpen v kemovarjih konoplje v Evropi in Združenih državah Amerike in je eden od odgovornih za pomirjevalni učinek v preparatih iz konoplje in hmelja (Russo in Marcu, 2017). V kemotipu konoplje 'blueberry', ki ima višjo vsebnostjo THC, lahko vsebnost β -mircena doseže tudi do 78 % eteričnega olja. β -Mircen ima protivnetne učinke in varuje pred oksidativnim stresom ter ima anti-nociceptivne učinke, kar pomeni, da deluje protibolečinsko (Nuutinen, 2018).

2.1.2 D-LIMONEN



D- Limonen

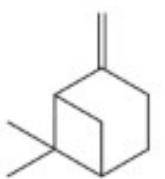
Gre za ciklični monotерpen, ki ga pogosto najdemo v olupkih citrusov, pojavlja pa se tudi v konoplji, kjer sicer ni prisoten v vseh kemotipih (Russo in Marcu, 2017). Limonen deluje proti bakterijam pri aknah (Kim in sod., 2008), deluje anksiolitično (Pultri in sod., 2006) in je potencialni imunostimulant (Komori in sod., 1995). Limonen ima tudi antibiotični učinek proti *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa* (Onawunimi in sod., 1984).

2.1.3 α -PINEN

 α - Pinen

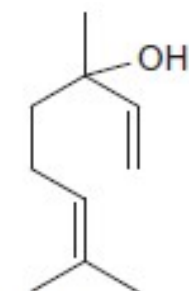
α -Pinen je najbolj zastopan terpen v naravi, vendar pa je v modernih kemovarjih konoplje prisoten v nižjih koncentracijah (Russo in Marcu, 2017), z izjemo sorte Finola, kjer je vsebnost α -pinena okrog 23 % (Nuutinen, 2018). Ima protivnetni učinek, je bronhodilator, ima tudi antibiotični učinek pri bakteriji MRSA ter drugih (Russo in Marcu, 2017).

2.1.4 β -PINEN

 β - Pinen

β -Pinen je biciklični monotерpensi izomer. Po navadi ga najdemo skupaj z α -pinenom (Russo in Marcu, 2017). Vsebnost β -pinena v konoplji je po navadi okrog 6,1 %. Na zraku lahko zelo hitro oksidira v pinokarveol in mirtenol ter se hitro pretvarja v druge terpene (Nuutien, 2018). Tudi β -pinen ima antibakterijski učinek (Russo in Marcu, 2017).

2.1.5 LINALOL

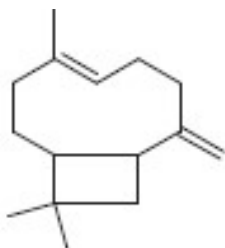


D-Linalol

Linalol je neciklični monoterpenski alkohol (terpenoidi so terpenom podobne snovi ali derivati, le da so denaturirani). Večinoma se nahaja v sivki, vrtnici, baziliki (Russo in Marcu, 2017). V konoplji ga redko najdemo kot prevladujoči terpen (Nuutinen, 2018). Linalol deluje proti depresiji, ima sedativni oz. pomirjevalni učinek, poleg tega pa tudi analgetični, anti-konvulzivni in anti-nociceptivni učinek (Russo in Marcu, 2017).

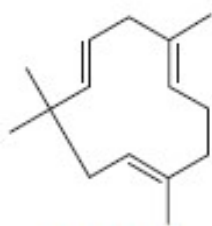
2.2 Seskviterpeni

2.2.1 β -KARIOFILEN

 β -Kariofilen

β -Kariofilen je prav tako močno zastopan terpen v navadni konoplji. V kemotipu 'gorilla glue', ki ima visoko vsebnost THC, predstavlja 64 % vseh terpenov, medtem ko ga v nekaterih kemotipih lahko sploh ni (Nuutinen, 2018). Ima znatno afiniteto do receptorja CB₂. β -kariofilen deluje protivnetno (Russo in Marcu, 2017).

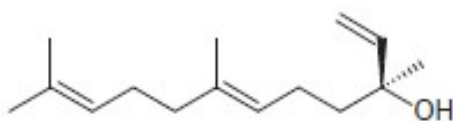
2.2.2 α -HUMULEN



Humulen

Tudi α -humulen je eden od glavnih terpenov v konoplji, kjer je zastopan v okrog 52 %. Drugo ime za α -humulen je tudi α -kariofilen, vendar v svoji kemijski zgradbi ne vsebuje ciklobutanskega obroča. Prav tako zanj ni znano, da bi lahko bil ligand CB₂ receptorja (Nuutinen, 2018). α -Humulen inhibira rast tumorskih celic (Satsu in sod., 2004), pripisujejo mu proti vnetno delovanje pri miših in podganah (Fernandez in sod., 2007).

2.2.3 NEROLIDOL



Nerolidol

Nerolidol je neciklični seskviterpenski alken alkohol, ki ima pomirjevalni učinek. Najdemo ga tudi v olupkih citrusov (Russo in Marcu, 2017). V konoplji je prisoten v zelo majhnih količinah, najdemo ga predvsem v kalifornijskih kemovarjih (Giese in sod., 2015). Je ne toksičen in ne povzroča občutljivosti na koži (Russo in Marcu, 2017).

3 BIOSINTEZNA POT TERPENOV V KONOPLJI

Sinteza terpenov v konoplji poteka po dveh poteh, kjer nastaja 5-ogljčni izoprenoid difosfat, ki je prekurzor za vse terpene. Monoterpeni nastajajo po metileritritol fosfatni (MEP) poti, seskviterpeni pa po citosolni mevalonatni (MEV) poti. MEP pot je sestavljena iz sedmih korakov, ki pretvarjajo piruvat in gliceraldehid-3-fosfat v izopentenil difosfat (IPP) in dimetilalil difosfat (DMAPP). MEV pot pretvarja 3 enote acetil-CoA v IPP, kateri s pomočjo IPP izomeraze izomerizira v DMAPP. IPP in DMAPP se nato preko preniltransferaze kondenzirata v daljše verige izoprenoid difosfatov, kot so geranil difosfat (GPP) in farnezil difosfat (FPP). GPP je 10-ogljčni prekurzor monoterpenov, ki nastane iz dveh 5-ogljčnih izopreno difosfatnih enot, nastalih po MEP poti. GPP je tudi eden od gradnikov biosintezne poti pri kanabinoidih. FPP je 15-ogljčni prekurzor seskviterpenov. Nastaja iz treh 5-ogljčnih izopreno difosfatnih enot, ki nastajajo pri MEV poti (Booth in sod., 2017).

Terpenske sintaze so v rastlini pogosto kodirane v raznolikih in velikih genskih družinah. Terpenska sestava konoplje pogosto zavisi od različnih genetskih, razvojnih in okoljskih dejavnikov. Kanabinoidna sestava je v različnih sortah konoplje po navadi predvidljiva, medtem ko je terpenški profil v konoplji pogosto nepredvidljiv oz. nepoznan, zato je potrebno za lažje določanje terpenskih profilov določiti gene, ki so odgovorni za biosintezo terpenov (Booth in sod., 2017).

4 VSEBNOST TERPENOV V RAZLIČNIH SORTAH KONOPLJE

Vsebnost terpenov v konoplji je bila prvotno okrog 1 % oz. izjemoma do 10 % v trihomih. S časoma pa se je s selektivnim žlahtnjenjem zvišala na 3,5 % ali pa tudi več. V severnoameriških kemovarjih so do sedaj našli 50 konopljinih terpenov, od tega je 17 terpenov takšnih, ki se najpogosteje nahajajo v rastlinah konoplje (Lewis in sod., 2018). Če želimo iz konoplje pridobiti kakovostno eterično olje in visoko vsebnost le tega, je potrebno upoštevati agrotehnične ukrepe pri gojenju rastlin. Zelo pomembno je upoštevanje interakcije med genotipom in okoljem ter upoštevanje časa žetve (Ascrizzi in sod., 2019).

Vsebnost terpenov v konoplji narašča z izpostavljenostjo svetlobi, znižuje pa se z gnojenjem tal, saj se je pokazalo, da imajo rastline konoplje pri pomanjkanju dušika višjo vsebnost terpenov. Vseeno pa je njihova vsebnost bolj genetsko kot okoljsko pogojena (Russo, 2011).

V poskusu avtorjev Nissen in sod. (2010), kjer so analizirali eterična olja 4 različnih sort, je imela najvišjo vsebnost eteričnih olj sorta Futura 77, sledila pa ji je sorta Fibranova-I. Sorti Carmagnola in Fibranova-II pa sta imeli podobno vsebnost eteričnih olj. Terpene so analizirali s pomočjo plinske kromatografije s

plamenskimi ionizacijskimi detektorjem (GC-FID), vzorce pa so pripravili s parno destilacijo. Carmagnola je imela najvišjo vsebnost β -mircena (29,2 %), Futura 77 pa najvišjo vsebnost terpinolena (10,7 %). Terpeni α -pinen, limonen, β -kariofilen in α -humulen so bili v vseh sortah približno enako zastopani. Vse štiri sorte so imele nizko vsebnost seskviterpenov (okrog 30 %) z izjemo β -kariofilena in α -humulena, pri monoterpenih (okrog 60 %) pa so prevladovali β -mircen, α -pinen in β -pinen.

Bertoli in sod. (2010) so preko hidrodestilacije in analize na GC-FID napravi določali terpenski profil pri enodomnih (Codimono in Felina 34) in dvodomnih sortah (Carmagnola, C.S.) v letih 2005 in 2006. Terpenski profili enodomnih in dvodomnih sort so se razlikovali, in sicer je bila pri enodomnih sortah vsebnost eteričnih olj nižja kot pri dvodomnih sortah. Pri enodomnih sortah so prevladovali terpeni α -pinen (7,9 %, 2005; 11,4 %, 2006), β -mircen (20,2 %, 2005; 15,6 %, 2006), terpinolen (13,7 %, 2005; 12,8 %, 2006) in β -kariofilen (15,7 %, 2005; 21,9 %, 2006). Dvodomni sorti sta imeli najvišjo vsebnost β -mircena (22,0 %, 2005; 16,0 %, 2006), terpinolena (10,3 %, 2005; 11,7 %, 2006) in β -kariofilena (15,2 %, 2005; 22,9 %, 2006). Velika razlika se je med enodomnima in dvodomnima sortama kazala predvsem pri vsebnosti α -pinena in β -pinena, ki je bila zelo visoka pri enodomnih sortah (18,1 %, 2005; 17,3 %, 2006), medtem ko je bila pri dvodomnih sortah vsebnost 2,7 % v 2005 in 4,5 % v 2006, vendar imamo za to še premalo rezultatov, da bi lahko posploševali na vse eno- ali dvodomne sorte.

V letih 2015 in 2016 so Ascrizzi in sod. (2019) analizirali vsebnost eteričnih olj v dveh sortah konoplje, in sicer v sorti Cascina in sorti Santa Luce. V obeh letih in v vseh vzorcih so bili najbolj zastopani seskviterpeni (60 %), od posameznih terpenov pa je bila v vseh vzorcih najvišja vsebnost β -kariofilena, vsebnost α -humulena je bila stabilna v skoraj vseh vzorcih, so pa vzorci sorte Santa Luce vsebovali nekoliko višje vsebnosti omenjenega terpena.

Vsebnost terpenov ni odvisna samo od sorte ampak tudi od kemotipa. Vsebnost monoterpenov v rastlinah narašča do določenega tedna nato pa začne padati, medtem ko vsebnost seskviterpenov narašča skozi celotno rastno dobo. Aizpurura-Olaizola in sod. (2016) so ugotavljali kakšna je povezava med vsebnostjo terpenov in kanabinoidov (CBD in THC) v kemotipih I, II in III. Ugotovili so razliko med kemotipom I in kemotipom III medtem ko je kemotip II bližje kemotipu III. V kemotipu I so prevladovali predvsem terpeni kot so: γ -selinen, β -selinen, α -gurjunen, γ -elemen, selina-3,7(11)dien in β -kurkumen, medtem ko so v kemotipu III prevladovali β -eudesmol, γ -eudesmol, guaicol, α -bisabolen, α -bisabolol in evkaliptol. Ostalih terpeni niso bili toliko odvisni od določenega kemotipa. Tisti terpeni, ki so prevladovali v kemotipu I so imeli višji korelacijski koeficient s THCA in negativen korelacijski koeficient s CBDA medtem ko je bilo pri

kemotipu III obratno. Ugotovili so tudi jasno razliko med monoterpeni in seskviterpeni, pri čemer imajo monoterpeni pozitivni regresijski koeficient, seskviterpeni pa negativen. Tudi Jin in sod. (2017) so preučevali korelacijo med vsebnostjo THC in CBD ter vsebnostjo terpenov. Različne kultivarje so razdelili v 3 skupine in sicer v skupini 1 se nahajajo kultivarji z višjo vsebnostjo THCA in terpenov (limonen, fenhol, terpineol, borneol, linalol, β -kariofilen, fenhon, β -mircen), skupino 2, kjer se nahajajo kultivarji, ki vsebujejo predvsem različne vsebnosti kanabinoidov (CBN, CBC, CBDA, CBD, THCV) in p-cimen ter skupino 3, kjer kultivarji vsebujejo višje vsebnosti α -pinena in THC.

5 UPORABA ETERIČNEGA OLJA KONOPLJE PRI ZATIRANJU ŠKODLJIVCEV

Zaradi nizke toksičnosti, okolju prijazne uporabe in zaradi dobrega učinka se vse več ljudi predvsem pa ekoloških kmetov odloča za uporabo naravnih repelentov. Konoplja zaradi bogate vsebnosti eteričnih olj predstavlja eno od rastlin, ki bi jih lahko uporabljali v proizvodnji naravnih repelentov in insekticidov (Benelli in sod., 2018). Naravni pesticidi morajo biti učinkoviti pri odganjanju oz. zatiranju škodljivcev, hkrati pa ne smejo biti toksični za ostale ne ciljne organizme (Bedini in sod., 2016).

Gorski in sod. (2016) so pri zatiranju zelenih krompirjevih uši (*Aulacorthum solani* Kalt.) in pršic (*Tetranychus uticae* Koch) testirali uporabo eteričnega olja konoplje, ki je bilo pridobljeno iz sort Beniko, Bialobrzeskie in Silesia. Vse sorte so imele vsebnost THC pod 0,2 %. Pri listnih ušeh se je eterično olje izkazalo za zelo učinkovito, saj se je pri 0,1 % koncentraciji v 48 urah pokazala 100 % umrljivost. Prav tako se je eterično olje pokazalo za učinkovito tudi pri zatiranju pikaste pajkove pršice, kjer je bila umrljivost v 48 urah pri 0,1 % koncentraciji eteričnega olja 96 %.

Bedini in sod. (2016) so preučevali učinkovitost eteričnih olj konoplje in hmelja proti ličinkam tigrastega komarja (*Aedes albopictus*), proti sladkovodnemu polžu (*Physella acuta*) ter proti enodnevnici *Cleon dipterum*. Vse tri živali si delijo isti habitat. Eterično olje konoplje so kupili, medtem ko so eterično olje hmelja pridobili iz sorte Cascade. Tako eterična olja konoplje kot hmelja so pokazala značilno toksičnost proti vsem trem vrstam *A. albopictus*, *C. dipteru* in *P. acuta*. Študija je prav tako dokazala, da ekstrakt iz konoplje na osnovi vode deluje proti odganjanju insektov oz. jih z njim lahko tudi ubijemo (Bedini in sod., 2016; Jalees in sod., 1993). Konoplja vsebuje visoko vsebnost hlapnih spojin, kot so β -kariofilen, kriofilen oksid, limonen in β -mircen, ki močno delujejo kor repelenti proti insektom (Bedini in sod., 2016).

Učinek eteričnih olj za zatiranje škodljivih žuželk so preučevali tudi Benelli in sod. (2018). Dokazati so želeli toksičnost eteričnih olj ter njihovo varnost. Eterično olje so pridobili iz sorte Felina 32. Insekticidni učinek so preučevali na dveh prenašalcih bolezni; komarju (*Celux quinquefasciatus*) in hišni muhi (*Musca domestica* .) ter na ekonomsko pomembnih škodljivcih, kot so siva breskova uš (*Myzus persicae*) in gosenica metulja (*Spodoptera littoralis*). Hkrati pa so želeli dokazati še varnost in ne toksičnost na ne ciljnih organizmih, kot so večbarvni azijski hrošč (*Harmonia axyridis*) in deževnik (*Eisena fetida*). Eterično olje sorte Felina 32 je vsebovalo največ α -pinena, β -kariofilena ter β -mircena. Rezultati so pokazali, da je eterično olje močno toksično delovalo proti listnim ušem in hišni muhi, zmerna toksičnost se je pokazala pri metuljevi gosenici, zelo majhno toksičnost pa so rezultati pokazali proti ličinkam in odraslim komarjem. Eterično olje sorte Felina 32 ne vpliva toksično na zgoraj naštete pozitivne organizme, kar je zelo pomembno iz vidika okoljske varnosti pri ostankih uporabe rastlinskih insekticidov (Benelli in sod., 2018).

6 ZAKLJUČEK

Terpeni so kot sekundarni metaboliti po zastopanosti v konoplji na drugem mestu. V rastlinah se večinoma nahajajo monoterpeni in seskviterpeni, enako je tudi pri hmelju. Vsebnost posameznih terpenov je odvisna od sorte in agrotehnike. Pri konoplji je bilo do sedaj veliko raziskav narejenih predvsem na kanabinoidih, medtem ko so pomen terpenov in njihove lastnosti raziskovali večinoma pri drugih rastlinah. Zato bi bilo pri konoplji potrebnih še veliko raziskav predvsem na področju povezave med terpeni in kanabinoidi v različnih sortah konoplje, njihov sinergističen učinek ter vpliv na zdravljenje različnih bolezni.

7 VIRI

- Aizpurua-Olaizola O., Soydaner U., Öztürk E., Schibano D., Simsir Y., Navarro P., Etxebarria N., Usobiaga A. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*. 2016; 79(2): 324-331.
- Andre C. M., Hausman J., Guerriero G. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 1-17.
- Ascrizzi R., Ceccarini L., Tavarini S., Flamini G., Angelini L. G. Valorisation of hemp inflorescence after seed harvest: Cultivation site and harvest time influence agronomic characteristics and essential oil yield and composition. *Industrial Crops and Products*. 2019; 139: 1-8.
- Bedini S., Flamini G., Cosci F., Ascrizzi R., Benelli G., Conti B. *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* essential oils as novel control tools against the invasive mosquito *Aedes albopictus* and fresh water snail *Physella acuta*. *Industrial Crops and Products*. 2016; 85: 318-323.

- Benelli G., Pavela R., Petrelli R., Cappellacci L., Santini G., Fiorini D., Sut S., Dall'Acqua S., Canale A., Maggi F. Th essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. *Industrial Crops and Products*. 2018; 122(19): 308-315.
- Bertoli A., Tozzi S., Pistelli L., Angelini L. G. Fibre Hemp inflorescences: From crop-residues to essential oil productin. *Industrial Crops and Products*. 2010; 32: 329-337.
- Booth J. K. in Bohlmann J. Terpenes in *Cannabis sativa* - From plant genome to humans. *Plant Science*. 2019; 284: 67-72.
- Booth J. K., Page J. E., Bohlmann J. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *Plos One*. 2017; 12(3): 1-20.
- Fernandez E. S., Passos G. F., Medeiros R., da Cunha F. M., Ferreira J., Campos M. M., Pianowski L. F., Calixto J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. 2007; 569(3): 338-236.
- Fournier G., Richez-Dumanois C., Duvezin J., Mathieu J. P. Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects. *Planta Medica* 1987; 53(3): 277-280.
- Giese M. W., Lewis M. A., Giese L., Smith K. M. Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in *Cannabis*. *Journal of AOAC International*. 2015; 98(6): 1503-1522.
- Gorski R., Sobieralski K., Siwulski M. The effect of hemp essential oil on mortality *Aulacorthum solani* Kalt. And *Tetranychus urticae* Koch. *Ecological Chemistry and Enginiring*. 2016; 23(3): 505-511.
- Hillig K. W., Mahlberg P. G. A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004; 875-891.
- Jalees S., Sharma S. K., Rahman S. J., Verghese T. Evaluation of insecticidal properties of an indigenous plant *Cannabis sativa* L., against mosquito larvae under laboratory conditions. *Journal of Entomological Research*. 1993; 17(2): 117-120.
- Janatova A., Frankova A., Tlustoš P., Hamouz K., Božik M., Klouček P. Yield and cannabinoids contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. *Idustrial Crops and Product*. 2018; 112: 363-367.
- Jin D., Jin S., Yu Y., Lee C., Chen J. Classification of cannabis cultivars marketed in Canada for medicinal purposes by quantification of cannabinoids and terpenes using HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Analytical and Bioanalytical Technicques*. 2017; 8: 1-9.
- Kim S. S., Baik J. S., Oh T. H., Yoon W. J., Lee N. H., Hyun C. G. Biological activities of Korean Citrus obovoides and Citrus natsudaidai essential oils against acne-inducing bacteria. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 2008; 72: 2507-2513.
- Komori T., Fujiwara R., Tanida M., Nomura J., Yokoyama M. M. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation*. 1995; 2: 174-180.
- Lewis M. A., Russo E. B., Smith K. M. Pharmacological foundations of Cannabis chemovars. *Planta Medica*. 2018; 84(4): 225-233.
- Namdar D., Mazuz M., Ion A., Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorecence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*. 2018; 113: 376-382.

-
- Nissen L., Zatta A., Stefanini I., Grandi S., Sgorbati B., Biavati B., Monti A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*. 2010; 81(5): 413-419.
- Nuutinen T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018; 198-228.
- Onawunmi, G. O., Yisak, W. A., Ogunlana, E. O.. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 12(3): 279–286.
- Potter D. J. The propagation, characterisation and optimisation of *Cannabis sativa* L. as a phytopharmaceutical. Doktorska naloga, King's College, London, 2009.
- Pultrini Ade M., Galindo L. A., Costa M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Science*. 2006; 78: 1720–1725.
- Russo E. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 163: 1344-1364.
- Small E., Beckstead H. D. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis. *Lloydia*. 1973; 36: 144-165.

EKONOMSKO OVREDNOTENJE PRIDELAVE INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Martin PAVLOVIČ¹, Borut GRAŠIČ² in Karmen PAŽEK³

Strokovni članek / professional article

Priseplo / received: 25. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 25. 11.2019

Izvleček

Analitična kalkulacija ekonomičnosti pridelave konoplje za seme vključuje povprečno ocenjen pridelek semena 1.000 kg/ha in tržno ceno 1,70 € za kg. Celotni skupni stroški pridelave semena znašajo 1.544,20 €/ha, kar pomeni bruto dodano vrednost v višini 431,80 €/ha. V pričujoči kalkulaciji vključenih predpostavk predstavlja pridelek semena konoplje 750 kg/ha prag rentabilnosti (prelomno točko), oz. koeficient ekonomičnosti 1.

Ključne besede: industrijska konoplja, pridelava, agrarna ekonomika.

ECONOMIC EVALUATION OF INDUSTRIAL HEMP PRODUCTION

Abstract

The analytical calculation of the seed hemp production economics includes an average estimated seed production of 1,000 kg/ha and a market price of € 1.70 per kg. The total estimation of a seed production costs amounts in 1,544.20 €/ha, which means a gross added value of 431.80 €/ha. In the calculation with the assumptions included, the yield of hemp seed 750 kg/ha represents the profitability threshold (break-even point, i.e. economic coefficient equals 1), at which a business becomes profitable.

Key words: industrial hemp, production, agricultural economics.

1 UVOD

Pridelovanje konoplje je lahko gospodarsko uspešno tudi v hribovitih območjih in na manjših površinah, s čimer nudi možnost ohranjanja poselitve in obdelovalnih površin. Uvrstitev konoplje v osnovni kolobar namesto žit ali krompirja je ekološko in ekonomsko primerna, saj konoplja čisti zemljo in ima – po projektnih

¹ Prof. dr., IHPS, Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-pošta: martin.pavlovic@ihps.si

² Mag. agr. ekon. UM, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Pivola 10, 2311 Hoče

³ Prof. dr., Univerza v Mariboru, FKBV, Pivola 10, 2311 Hoče, e-pošta: karmen.pazek@um.si

izračunih - količnik ekonomičnosti večji od 1 že pri pridelku zgolj 750 kg semena. V raziskavi smo izdelali analitično kalkulacijo hektarskih stroškov pridelave konoplje za potrebe prakse, ki vključuje določene predpostavke. Kalkulacija stroškov pridelave konoplje je izdelana za pridelavo semena, pri setvi z žitno sejalnico in žetvi z žitnim kombajnom.

2 MATERIAL IN STORITVE – MODELNI INPUT

V modelni kalkulaciji upoštevamo material, ki vključuje nakup semena in NPK gnojil, ne vključujemo pa sredstev za varstvo rastlin. Količina 35 kg semen na hektar, ki smo jo uporabili v kalkulaciji, odraža povprečno uporabljeno količino semen slovenskih pridelovalcev, ki se giblje med 30 in 40 kg. Pridelovalci konoplje v Sloveniji za setev uporabljajo žitne sejalnice, saj omogočajo več načinov sejanja, tako je najbolj primerna setev z 2,5 m široko sejalnico z 21 vrstami, pri kateri sejemo zgolj v vsako drugo vrsto, tako sejemo 10 vrst v razmaku 25 cm, da ima konoplja dovolj prostora za rast in da setev ni pregosta. Redkejša setev, pri kateri sejemo zgolj 7 vrstic na razmak 35 cm je manj uspešna, saj je pridelek slabši, zemlja pa se zapleveli. Gostejša setev bi bila zanimiva za predelavo vlaken, vendar glede na trenutno ekonomsko situacijo na tekstilnem trgu, vlakna predstavljajo zgolj možni stranski prihodek.

Cena semena v kalkulaciji znaša 11 € za kilogram, kolikor je bila ocenjena povprečna cena semena v letu 2016. Strošek semena tako znaša 385 € in je dokaj visok glede na prodajno ceno semena. Predstavlja 28 % delež stroškov, vendar teh stroškov ni mogoče zmanjšati, saj mora vsak pridelovalec kupiti deklarirana semena od pooblaščenih prodajalcev konopljinih semen, kakor veva zakonodaja.

Stroške zunanjih storitev sestavljajo v kalkulaciji stroški setve, kombajniranja, baliranja slame v 10 kg bale in stroški zavarovanja. Ceno in število ur potrebnih za setev smo v raziskavi povzeli po modelnih kalkulacijah za pridelavo pšenice. Cena najete delovne ure za setev je v kalkulaciji 30 €. Za 1 hektar je potrebnih 1,3 ure, kar znaša 39 €. Stroški kombajniranja oz. stroški žetve, ki smo jih povzeli po modelnih kalkulacijah za »žetev žit – storitev« za leto 2016 so nekoliko povečani in znašajo 150 €, kar je smiselno, saj se za žetev konoplje uporabljajo enaki kombajni kot za žetev žit. Tudi stroške baliranja v 10 kg štirioglate bale smo povzeli po modelnih kalkulacijah Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS) in so preračunani za 3.000 kg vlaknene slame, kar ob vrednosti 1 bale 0,43 € znaša 128 €. Stroške zavarovanja pridelka smo ocenili pavšalno in zaokrožili na 50 € na hektar. Tako vsi stroški zunanjih (oz. najetih) storitev znašajo 24 % oz. 366,50 €.

Lastne strojne ure so ure - potrebne za pripravo in obdelavo 1 ha velike površine, od kmetije oddaljene 1 km. Ocenjene so glede na značilnosti same pridelave konoplje, ki je podobna pridelavi žit. Primerljiva je predsetvena priprava, setev,

žetev in tudi spravilo slame. V kalkulacijah smo obračunali lastne strojne storitve oranja, brananja, predsetvene priprave, valjanja, prevoza slame in zrnja ter premike strojev. Ceno in število lastnih strojnih ur smo povzeli po modelnih kalkulacijah KIS in priredili glede na izkušnje slovenskih pridelovalcev. Za obdelavo je potrebnih 21 domačih strojnih ur, kar pri ceni 15,91 € za delovno uro znaša 334,05 € oz. 22 % celotnih stroškov.

Stroški lastnega dela so vsota stroškov dela pomoči pri setvi in žetvi, dela z nalaganjem in razlaganjem slame in s stroški sušenja semena. Stroške domačega dela smo cenovno ovrednotili enako kot v modelnih kalkulacijah KIS v 2016, in sicer z vrednostjo 5,80 € na opravljeno delovno uro. Število delovnih ur lastnega dela pri setvi, žetvi in spravilu slame smo povzeli po številu potrebnih delovnih ur za pridelavo pšenice. Število porabljenih ur pri sušenju semena smo ocenili na osnovi intervjujev s pridelovalci konoplje in se nanašajo na delo potrebno za sušenje semena. Ocenjeno število ur lastnega dela je 23 ur, kar znaša 133,29 € in predstavlja 9 % celotnih skupnih stroškov.

Stroški obveznosti in posrednih stroškov so seštevek prispevkov za socialno varnost, stroškov nadomestil in regresov, posrednih stroškov in stroškov kapitala. To so stroški za pokojninsko in invalidsko zavarovanje kmetov, izračunani na osnovi bruto minimalne plače in izhajajo iz vseh dohodkov kmetije. Vse obveznosti in posredne stroške smo povzeli po izračunih modelnih kalkulacij Kmetijskega inštituta Slovenije za leto 2016 in znašajo 177,93 € oz. 12 % celotnih stroškov.

3 STROŠKI PRIDELAVE KONOPLJE ZA SEME

Celotni skupni hektarski stroški pridelave konoplje znašajo 1.543,97 €, kar ob predvidenem pridelku 1.000 kg semena pomeni polno lastno ceno v višini 1,54 € na kg semena. Stroški kupljenega materiala znašajo 532,20 €, stroški zunanjih (kupljenih) strojnih storitev 366,50 €, lastno delo in strojne ure 467,34 € in stroški obveznosti in posredni stroški 177,93 €.

Preglednica 1: Tehnološki podatki za izračun stroškov pridelave

Neto pridelek	1.000 kg/ha
Bruto pridelek	1.050 kg/ha
Izgube	5,0 %
Vlaga ob žetvi	14,1 %
Velikost poljine	1,0 ha
Oddaljenost od kmetije	1,0 km
Razdalja do odkupnega mesta	10,0 km

V kalkulaciji smo v nadaljevanju upoštevali trenutno veljavne proračunske dodatke (KIS 2016), ki za konopljo pomenijo seštevek plačilne pravice na hektar v višini 176,97 € in za zeleno komponento v višini 98,57 €, kar pomeni skupaj 275,54 € na hektar. Z upoštevanjem proračunskih dodatkov se skupni celotni stroški zmanjšajo na 1.268,43 € na hektar, kar nam da lastno ceno 1,27 € za kg semena.

Stroške v analitični kalkulaciji za seme (preglednici 1 in 2) smo povzeli po kalkulacijah KIS in jih deloma dopolnili glede na značilnosti pridelave konoplje. Iz preglednice je razvidno, da predstavlja kupljen material 34 % celotnih stroškov ter da je strošek kupljenih storitev 24 %, kar skupaj predstavlja več kot polovico (58 %) vseh stroškov. Lastne strojne storitve, lastno delo, obveznosti in posredni stroški skupaj znašajo zgolj 42 % skupnih stroškov pridelave. Celotni stroški zmanjšani za subvencije, znašajo 1.268,43 € in so osnova za nadaljnje ekonomske izračune, saj prihodkov stranskih pridelkov v kalkulaciji nismo upoštevali.

V raziskavi so kupljeni material in storitve vsota stroškov nakupa semena, najetih strojnih ur setve, žetve in baliranja slame. Predpostavljamo, da lahko - razen žetve z žitnim kombajnom in nakupa semena - vse ostale storitve na kmetijah opravijo pridelovalci sami, saj ima velika večina kmetij lastne žitne sejalnice in stroje za spravilo vlaknene slame in tako zmanjšamo stroške pridelave še za nadaljnjih 200 € na hektar.

4 PRIHODKI OD PRODAJE

Prodajno ceno v kalkulaciji smo povzeli po povprečni uvozni ceni leta 2016, ki je znašala 1,70 € za kilogram. Ob predvidenem hektarskem donosu 1.000 kg to znaša 1.700 €. Hektarski donos 1.000 kg je povprečna količina, ki so jo v letu 2014 in 2015 pridelali slovenski pridelovalci konoplje, kljub temu, da se v literaturi o konoplji omenjajo tudi mnogo višji hektarski donosi. Večji del materialnih stroškov pri pridelavi konoplje predstavlja nakup semena, ki ga je potrebno kupiti od uradnih prodajalcev. Trenutno je v Sloveniji veljavna zakonodaja, ki ne dopušča uporabe lastnih semen za nadaljnje razmnoževanje oz. za setveni material za prihodnje leto, kar bi še izboljšalo ekonomske kazalce pridelave konoplje in s tem smotrnost njene umestitve v osnovni kolobar. Podrobnejši prikaz ekonomskih kazalcev je podan v preglednici 3.

V izračunu kalkulacij nismo upoštevali prihodka stranskih produktov – vlaknene slame, cvetov in listov. Vlaknena slama je zelo dobra surovina za tekstilno, papirno in gradbeno industrijo, vendar brez spremljajoče predelovalne industrije to ni mogoče. Tovrstnega trga v Sloveniji še nismo zasledili, saj ni zaznanega povpraševanja po konopljni vlakneni slami. Za pridelovalce to pomeni raztros slame po njivah oz. uporaba za steljo.

Preglednica 2: Analitična kalkulacija stroškov pridelave konoplje za seme na 1 ha obdelovalne površine in pridelek 1.000 kg semena.

Vrsta stroška	Kg,l,ur/ha	cena €/ha,kg,l,h	vrednost €/ha	Skupaj €	%
MATERIAL				532,20	34%
seme	35,00	11,00	385,00		
NPK gnojila			147,20		
ZUNANJE STORITVE				366,50	24%
setev	1,30	30,00	39,00		
kombajniranje - žetev	1,00	150,00	150,00		
baliranje (10 kg bala)	300,00	0,43	127,50		
zavarovanje pridelka			50,00		
LASTNE STORITVE	21,00	15,91		334,05	22%
oranje	5,00		79,54		
branje	2,00		31,81		
predsetvena priprava	3,00		47,72		
valjanje	1,00		15,91		
prevoz zrnja	2,50		39,77		
prevoz slame	2,50		39,77		
premiki strojev (zrnje in slama)	5,00		79,54		
LASTNO DELO	23,00	5,80		133,29	9%
pomoč pri sejanju in žetvi	3,00		17,39		
nalaganje in razlaganje slame	10,00		57,95		
sušenje semena	10,00		57,95		
OBVEZNOSTI, POSRED. STR.				177,93	12%
socialna varnost			71,28		
nadomestila in regresi			47,54		
posredni stroški			20,17		
stroški kapitala	0,00	0,00	38,94	0,00	
STROŠKI SKUPAJ	0,00	0,00		1.543,97	100%
LASTNA CENA EUR/kg	1.000,00			1,54	
VREDNOST STRAN. PRIDELKOV	0,00	0,00	0,00	300,00	0
stebila - vlakna	3.000,00	0,10	300,00	0,00	0
PRORAČUNSKI DODATKI	0,00	0,00	0,00	275,54	
plačilna pravica na ha	1,00	176,97	176,97	0,00 ⁽¹⁾	
zelena komponenta	1,00	98,57	98,57	0,00 ⁽¹⁾	
STROŠKI (zmanjšani za subv.)		0,000		1.268,43	0
LASTNA CENA (brez subv. €/kg	1.000,0		1.268,43	1,27	0
LASTNA CENA ZM. ZA SUB. IN VR.STRAN.PRID. EUR/kg	1.000,0		968,43	0,97	

Preglednica 3: Ekonomski kazalci pridelave konoplje za seme

Konoplja za seme	Prodajna cena v €/kg	1,70
Model		
Intenzivnost pridelave	kg/ha	1.000,00
Velikost parcele	ha	1,00
IZVLEČEK ANALITIČNE KALKULACIJE		
Stroški blaga in storitev	EUR/ha	1.233,20
Od tega: seme	EUR/ha	385,00
gnojila	EUR/ha	147,20
sredstva za varstvo	EUR/ha	0,00
najete storitve	EUR/ha	317,00
zavarovanje	EUR/ha	50,00
domače strojne storitve	EUR/ha	334,00
Amortizacija	EUR/ha	0,00
Stroški lastnega dela in kapitala	EUR/ha	311,00
Od tega: lastno delo neto	EUR/ha	133,00
Stroški skupaj	EUR/ha	1.544,20
<i>Stranski pridelki</i>	<i>EUR/ha</i>	<i>300,00</i>
<i>Stroški glavnega pridelka</i>	<i>EUR/ha</i>	<i>1.244,20</i>
Subvencije	EUR/ha	276,00
Stroški, zmanjšani za subvencije	EUR/ha	1.268,20
Stroški, zmanjšani za subvencije/kg	EUR/kg	1,27
Prodajna cena	EUR/kg	1,70
Vrednost proizvodnje skupaj	EUR/ha	1.700,00
OBRAČUN DOHODKA		
Vrednost finalne proizvodnje skupaj	EUR/ha	1.700,00
Stroški brez lastnega dela	EUR/ha	801,20
Bruto dodana vrednost	EUR/ha	431,80
Neto dodana vrednost	EUR/ha	898,80

Lastna cena semena znaša 1,27 € za kilogram, kar nam ob prodajni ceni 1,70 € omogoči dohodek v višini 431,80 € (bruto dodana vrednost), ob upoštevanju vseh stroškov domačega dela ovrednotenega po neto delovnih in strojnih urah, kar smo povzeli po analitičnih kalkulacijah KIS.

Bruto dodana vrednost, ki znaša 431,80 € na hektar, je izračunana kot: »Bruto dodana vrednost = vrednost finalne proizvodnje – stroški zmanjšani za subvencije.«

Neto dodana vrednost v kalkulaciji smo izračunali kot: »Neto dodana vrednost = vrednost proizvodnje – stroški brez lastnega dela.«

Neto dodano vrednost v kalkulaciji smo izračunali kot razliko med vrednostjo proizvodnje in vsemi nujnimi stroški, kot so stroški obveznosti in dajatve, stroški kupljenih storitev, stroški materiala in tudi stroški kapitala. V neto dodani vrednosti nismo upoštevali stroškov lastnega dela. Ta kazalec kaže predvsem na to, koliko je kmet oz. pridelovalec zaslužil, če ne upošteva stroškov lastnega dela. Neto dodana vrednost znaša 898,80 € na hektar, kar predstavlja dober zaslužek v primerjavi z ostalimi poljščinami.

Preglednica 4 prikazuje spremembe dohodka in koeficienta ekonomičnosti glede na različen pridelek. Količine, ki smo jih uporabili v izračunih in se gibljejo od 700 kg do 1.100 kg semena na hektar, so izračunane na osnovi verjetnosti slabše oz. boljše letine glede na povprečen pridelek, ki je 1.000 kg/ha. V izračunih smo uporabili polno vrednost stroškov pridelave (z vračunanimi subvencijami) v višini 1.268,20 € na hektar.

Preglednica 4: Izračuni dohodka in koeficienta ekonomičnosti za različne količine pridelka (med 700 in 1.100 kg/ha) pri ceni 1,70 €/kg

Cena za kg semena	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Pridelek v kg/ha	700	750	800	900	1.000	1.100
Prihodek	1.190	1.275	1.360	1.530	1.700	1.870
Strošek	1.268	1.268	1.268	1.268	1.268	1.268
KE (koeficient ekonomičnosti)	0,94	1,01	1,07	1,21	1,34	1,47
Dohodek v €	-78,20	6,80	91,80	261,80	431,80	601,80

V kalkulaciji je dohodek pozitiven od pridelka 750 kg/ha dalje. Posledično enako je od pridelka 750 kg/ha dalje večji od 1 tudi koeficient ekonomičnosti. To nakazuje na ekonomično in donosno poljščino. Povprečen pridelek ima tako koeficient ekonomičnosti 1,34 in pomeni, da za vsak vložen evro zaslužimo 1,34 €, kar je z vidika agrarne ekonomike zelo uspešno.

5 ZAKLJUČEK

Analitična kalkulacija za pridelavo konoplje za seme je zasnovana na osnovi pridelka, ki so ga slovenski pridelovalci konoplje dosegli v letu 2016. Predviden pridelek semen je tako 1.000 kg, kar pri tržni ceni 1,70 € za kg, ki je povzeta po uvozni ceni za semena v letu 2016, znaša 1.700 € prihodka na hektar. Obračun stroškov kupljenih storitev, materiala in kapitala je povzet po analitičnih kalkulacijah Kmetijskega inštituta Slovenije za primerljive poljščine. Stroški lastnega dela in lastnih strojnih ur so prav tako obračunani po neto vrednosti delovne ure v letu 2016. Takšen način izračuna nam daje dejansko ekonomsko primerjavo z ostalimi poljščinami, saj so vse lastne delovne in strojne ure ovrednotene kot bi bile najete. Celotni skupni stroški pridelave semena znašajo

1.544,20 €, kar pomeni bruto dodano vrednost v višini 431,80 €. V pričujoči kalkulaciji vključenih predpostavk predstavlja pridelek semena 750 kg/ha prag rentabilnosti, oz. prelomno točko – s koeficientom ekonomičnosti 1.

6 LITERATURA

- Ciljni raziskovalni program. Pridelava industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) v Sloveniji. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec. 2019.
- Grašič B. Tržno-tehnološka analiza konopljinih surovin in izdelkov. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede. Maribor, 2016; 99. Maribor. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=62546> (1.10.2019).
- Pavlovič M., Pažek K., Grašič B. Predelava konoplje kot dopolnilna dejavnost kmetij. Hmeljarski bilten. 2016; 23: 105-114.
- Uradni list RS št. 36/1999. 1784. Uredba o pridelavi konoplje, s. 4216. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/1999-01-1784/> (1.10.2019).

PREISKUŠANJE BIOTIČNIH PRIPRAVKOV ZA ZATIRANJE VERTICILIJSKE UVELOSTI IN FUZARIJSKIH OBOLENJ PARADIŽNIKA

Sebastjan RADIŠEK¹ in Jaka RAZINGER²

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Prispelo / received: 25. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 2. 12. 2019

Izvelek

V raziskavi smo proučevali delovanje biotičnih pripravkov za preprečevanje povzročiteljev verticilijske uvelosti (povzročiteljica *Verticillium dahliae* (VD)) in fuzarijskih obolenj (povzročiteljici *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) ter *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL)) paradižnika. Z namenom zagotovitve homogene prisotnosti infekcijskega potenciala povzročiteljev smo testiranja zasnovali v obliki lončnega poskusa v rastlinjaku z uporabo umetno okuženih substratov. Pri preprečevanju FOL smo delovanje potrdili pri pripravkih Remedier, Prestop, Polyversum in Serenade ASO, pri preprečevanju FORL pa pri pripravkih Remedier, Prestop, Polyversum, ter Cilus Plus. V primeru preprečevanja VD, smo delovanje potrdili pri dveh bakterijskih pripravkih Serenade ASO in Cilus Plus ter pripravku na osnovi glive *Gliocladium catenulatum* (Prestop). Rezultati so potrdili širši spekter delovanja posameznih pripravkov, vendar ob visoki variabilnosti delovanja ter odvisnosti od vrste povzročitelja. Boljše rezultate smo dobili ob namakanju korenin sadik pred sajenjem kot v primeru zalivanja po sajenju. Izmerili smo relativno nizko učinkovitost pripravkov (do 50 % zmanjšanje okužb), kar je v primeru visokega infekcijskega potenciala v praksi nezadovoljivo. Iz omenjenega pri zatiranju talnih gliv svetujemo preventivno uporabo biotičnih agensov ali pa kot dopolnilo različnim programom izboljševanja zdravstvenega varstva tal.

Ključne besede: talne fitopatogene glive, vrtnarstvo, biotično varstvo rastlin

¹ Dr. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

² Dr., Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, e-naslov: jaka.razinger@kis.si

TESTING OF BIOFUNGICIDS AGAINST VERTICILLIUM WILT AND FUSARIUM DISEASES OF TOMATO

Abstract

In the research we studied several biofungicides against verticillium and fusarium wilt (caused by *Verticillium dahliae* (VD) or *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) and *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL), respectively) diseases on tomato. The testing was performed in glasshouse in potted plants by using artificially infected substrates. In the case of FOL we observed antagonistic effect of biofungicides Remedier, Prestop, Polyversum and Serenade ASO, whereas suppression of FORL was observed in biofungicides Remedier, Prestop, Polyversum and Cilus Plus. Testing against verticillium wilt (VD) revealed antagonistic effect of biofungicides Serenade ASO, Cilus Plus and *Gliocladium catenulatum* biofungicide Prestop. The results showed broad spectrum of several biofungicides; however we observed high level of variability in efficacy which depends also on the pathogen. Higher efficacy was obtained by root dipping method than drenching after planting, however overall efficacy was relatively low (<50% reduction of infected plants) which is not acceptable in commercial growing conditions in case of high soil infection potential. Based on our findings we advise the use of biofungicides against soil pathogens as preventive action or as additional measure to different soil disinfestation treatments which promotes soil health.

Key words: plant pathogenic soil fungi, vegetable production, biological plant protection

1 UVOD

Pri gojenju paradižnika se pridelovalci pogosto soočajo s pojavom uvelosti ter koreninskih in stebelnih gnilob, ki povzročajo oslABLJENO RAST IN ODMIRANJE RASTLIN. Med povzročitelji teh obolenj najdemo obsežen nabor različnih škodljivih organizmov, kot so talne glive iz rodov *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Phoma* in *Rhizoctonia*, oomicete iz rodov *Phytophthora* in *Pythium*, bakterije iz rodov *Clavibacter* in *Ralstonia* ter viruse kot je npr. virus pegavosti in uvelosti paradižnika (Tomato spotted wilt virus – TSWV) (Jones s sod, 2019). Obolenja, ki so posledica okužb talnih gliv, spadajo med najpogostejša, pri čemur iz skupine fuzarioz prevladujeta fuzarijska uvelost paradižnika (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) ter fuzarijska gniloba koreninskega vratu in korenin (*F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*) (Ajilogba in Babalola, 2013). V ZDA in Kanadi so opisana tudi obsežna odmiranja paradižnika zaradi okužb glive *F. solani* f. sp. *eumartii* (Romberg in Davis, 2007) ter glive *F. striatum* (Moine in sod., 2014). Poleg omenjenih fuzarijov je paradižnik občutljiv na pojav verticilijske uvelosti, kjer po patogenosti prevladujeta vrsti *Verticillium dahliae* (rasa 1 in 2) in *V.*

nonalfalae, okužbe pa lahko povzroča tudi gliva *V. tricorpus* (Inderbitzin s sod., 2011).

Skupna lastnost boleznim, ki jih povzročajo talne glive je predvsem pogosta neuspešnost zdravljenja okuženih rastlin, ter njihovo dolgotrajno ohranjanje v tleh v obliki trajnih organov. Tako uspešno preprečevanje okužb poleg odstranjevanja obolelih rastlin in sajenja odpornih sort temelji na različnih metodah sanacije tal, med katerimi prevladuje uporaba kemičnih fumigantov. Ob relativno visoki učinkovitosti preprečevanja pri kemičnih fumigantih trčimo ob njihovo strupenost in okolju obremenjujočih razpadnih produktov, ter posledično ukinjanju njihove uporabe. Iz omenjenega raziskovalci pospešeno razvijajo alternativne tehnologije nižanja talnega infekcijskega potenciala med katerimi se uveljavlja tudi uporaba biotičnih agensov (BA). Med BA, ki so se v okviru različni raziskav potrdili kot učinkoviti antagonisti talnih patogenih gliv spadajo rizo-bakterije *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia plymuthica* in različne vrste iz rodu *Bacillus*, medtem ko pri glivah najpogosteje srečamo vrste iz rodov *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Coniothyrium*, *Pythium* in *Gliocladium* (Berg s sod., 2006, Fravel, 2005). Antagonizem omenjenih organizmov temelji predvsem na antibiotici, produkciji, encimov, hormonov, parazitizmu in induciranju sistemske odpornosti. Tako med uspešne primere uporabe BA spada primer uporabe *B. subtilis* za zatiranje trohnobe citrusov (Manjula in sod., 2004), padavice sladkorne pese (Jorjani s sod., 2011) in verticilijske uvelosti bombaža (Shuqing in sod., 2013). Učinkovitost gliv iz rodu *Trichoderma* za zatiranje talnih patogenih gliv je raziskovalcem znana že iz začetka 60-ih let prejšnjega stoletja (Harman in sod., 2004). Med zadnjimi objavami najdemo uspešno uporabo *T. asperellum* za preprečevanje verticilijske uvelosti oljk, ki spada med najbolj uničujoče bolezni te rastlinske vrste (Carrero-Carron in sod., 2016).

V naši raziskavi smo se osredotočili na študijo učinkovitosti in načina uporabe nekaterih BA, ki jih najdemo na slovenskem in evropskem tržišču za preprečevanje okužb talnih gliv iz rodu *Fusarium* in *Verticillium*. Pri tem smo kot model preskušanja izbrali tri bolezni paradižnika: (1) fuzarijsko uvelost, (2) fuzarijsko gnilobo koreninskega vratu in korenin ter (3) verticilijsko uvelost.

2 MATERIAL IN METODE

Preskušanje smo izvedli v letu 2017 in 2018 v rastlinjaku Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v obliki lončnega poskusa na paradižniku (sorta Heinz 1370). Kot vir inokula smo uporabili izolate gliv *V. dahliae* (Pap-46VD), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (CBS 164.85) in *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (CBS 130306), ki jih hranimo v zbirki škodljivih organizmov na IHPS in so bili izolirani iz obolelih paradižnikov. Pred izvedbo določanja učinkovitosti BA smo izolatom z umetnimi okužbami v rastni komori (Kambič, RK-13300)

določili patogenost ter jih nato kot re-izolirane izolate uporabili v nadaljnjih preizkušanjih. Inokule smo v vseh poskusih pripravljali z gojenjem izolatov (7 dni) v GFM tekočem gojišču (Weising s sod.,1995) na horizontalnem rotacijskem stresalniku (60 vrt/min) pri sobni temperaturi. Namnoženo glivno maso smo precedili s pomočjo filter papirja in umerili inokulum na koncentracijo 10^7 CFU/ml (micelij in spore) s sterilno destilirano vodo. Sledila je inokulacija substrata (Presstopfs 70L/36/EP-Gramoflor, Nemčija) v odmerku 50 ml inokula v 1,5 l lonček.

V prvem letu smo v preizkušanje vključili 3 biotične pripravke: Remedier (glivi *T. asperellum*, *T. gamsii*), Prestop (gliva *Gliocladium catenulatum*, sev J1446) in Serenade ACO (bakterija *Bacillus subtilis*, sev QST 713), ki smo jih uporabili v obliki dveh vrst aplikacij: (I) 10 min namakanje koreninskega sistema pred sajenjem in (II) zalivanje po sajenju. V naslednjem letu smo preskušanje razširili še na pripravek Polyversum® (oomiceta *Pythium oligandrum*, sev M1 DV74) in Cilus® Plus (bakterija *Bacillus amyloliquefaciens*, sev IT45), kot aplikacijo pripravkov pa smo izbrali kombinacijo namakanja ob sajenju in zalivanja 14 dni po sajenju. Vsako kombinacijo glive in pripravka smo testirali v obsegu 10 rastlin/aplikacijo. Kontrolo preizkušanj so predstavljala obravnavanja brez uporabe pripravkov sajena v okužene substrate in rastline sajene v neokužen substrat. Rastline so bile v času inokulacij v razvojni fazi BBCH 12, po sajenju in uporabi pripravkov pa smo jih gojili v 1,5 l lončkih na bambusovi opori v rastlinjaku in jih oskrbovali v skladu z dobro agronomsko prakso. Rastlinam smo redno odstranjevali zalistnike in cvetove z namenom vzdrževanja homogenosti rasti. Oba poskusa smo izvedli od julija do septembra. Rastline smo po pojavu prvih bolezenskih znamenj ocenjevali v 14 dnevni intervalih s skalo od 0-5 glede na delež prizadete listne površine (Amer s sod., 2014). V času zadnjega ocenjevanja pa smo izvedli tudi meritve višine rastlin, sveže teže koreninskega sistema, oceno prizadetosti prevodnega tkiva (skala 0-2; 0 – brez rjavenja; 1- zaznana prisotnost rjavenja; 2 – izrazita porjavelost tkiva) in potrditvene re-izolacije. Podatke smo statistično ovrednotili s programom Statgraphic plus 4.0 z analizo variance (ANOVA) in testom mnogoterih primerjav (Duncan).

3 REZULTATI

Pojav prvih bolezenskih znamenj smo pri večini obravnavanj zaznali v petem tednu po inokulaciji, in sicer v obliki rumenjenja spodnjega dela listne mase, ki je napredovalo do nekroz posameznih listov (slika 1). Odmiranja celotnih rastlin nismo zaznali pri nobenem od obravnavanj, smo pa zaznali rjavenje prevodnega tkiva in slabši razvoj koreninskega sistema (slika 2). Med vsemi meritvami smo tako za vrednotenje delovanja pripravkov kot najpomembnejšo merilo določili (1) težo koreninskega sistema in (2) število okuženih rastlin. Pri prvem merilu smo delovanje pripravka pri posameznem obravnavanju upoštevali, če smo zaznali

značilno razliko z okuženo kontrolo. Pri drugem merilu smo prag delovanja pripravka postavili pri doseganju 50 % manj okuženih rastlin kot v primerjavi z okuženo kontrolo. Pojava fitotoksičnosti zaradi uporabe pripravkov na rastlinah v obeh letih preizkušanja nismo opazili. Z namenom lažje interpretacije v nadaljevanju predstavljamo rezultate preizkušanja za vsako glivo ločeno.

3.1 *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

V prvem letu preizkušanja smo najvišjo stopnjo preprečevanja fuzarijske uvelosti paradižnika zaznali pri pripravku Remedier, pri aplikaciji namakanje. V primeru zalivanja je Remedier na nivoju teže korenin pokazal slabše rezultate, vendar še vedno dobro delovanje glede na število okuženih rastlin. Učinkovitost delovanja smo zaznali tudi pri pripravkih Prestop in Serenade ASO, pri čemur smo pri slednjemu zaznali slabše rezultate pri aplikaciji zalivanje (preglednica 1).

Preglednica 1: Vpliv biotičnih pripravkov na rast paradižnika po okužbi z glivo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* v letu 2017

Biotični pripravek/konc.	** Aplikacija (ob sajenju)	*Višina (\bar{x} , cm)	*Teža korenin (\bar{x} , g)	*Bolezenska znamenja (povprečna vrednost vizualnih ocen)			*** Št. okuženih rastlin
				Listi	Korenine	Kor. vrat	
Remedier – 0.5%	namakanje	142,4 ^b	37,5 ^b	0,4 ^a	1,0 ^{cd}	0,6 ^b	6
	zalivanje	128,6 ^{ab}	24,8 ^{ab}	1,0 ^a	1,0 ^{cd}	0,6 ^b	5
Prestop – 0.5%	namakanje	110,9 ^a	30,9 ^{ab}	0,6 ^a	0,7 ^{bcd}	0,9 ^{bc}	10
	zalivanje	126,6 ^{ab}	30,6 ^{ab}	0,8 ^a	1,2 ^a	1,0 ^c	9
Serenade ASO - 4%	namakanje	127,8 ^{ab}	30,3 ^{ab}	0,6 ^a	0,4 ^{ab}	0,8 ^{bc}	9
	zalivanje	117,9 ^a	21,81 ^a	0,3 ^a	0,9 ^{bcd}	1,0 ^c	8
Okužena kontrola	/	125,4 ^{ab}	22,1 ^a	1,8 ^b	0,5 ^{bc}	1,0 ^c	10
Neokužena kontrola	/	127,5 ^{ab}	36,4 ^{ab}	0,2 ^a	0 ^a	0 ^a	0

*Povprečne vrednosti označene z enakimi črkami se statistično ne razlikujejo med seboj pri stopnji tveganja 0.05 (Duncan Multiple Range Test).

**Namakanje koreninskega sistema sadik v fazi višine 10-15 cm (10 min) v suspenziji pripravka.

***Št. Rastlin, pri katerih smo zaznali porjavlost prevodnega tkiva na bazalnem delu stbla.

V drugem letu testiranja smo pripravke uporabili v kombinirani aplikaciji namakanje ob sajenju in zalivanje 14 dni po sajenju. Pri tem smo najvišjo učinkovitost na nivoju teže korenin zaznali pri pripravku Polyversum. Vsi ostali pripravki so izkazovali nizko stopnjo delovanja, vključno s pripravkom Remedier, s katerim smo v letu 2017 dosegli najboljše rezultate. Pripravek Polyversum je potrdil delovanje tudi na nivoju števila okuženih rastlin, 50% manj okužb pa smo zaznali tudi pri pripravku Serenade ASO (preglednica 2).

Preglednica 2: Vpliv biotičnih pripravkov na rast paradižnika po okužbi z glivo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* v letu 2018

Biotični pripravek/konc.	** Aplikacija	* Višina (\bar{x} , cm)	* Teža korenin (\bar{x} , g)	*Bolezenska znamenja (povprečna vrednost vizualnih ocen)			Št. okuženih rastlin***
				Listi	Korenine	Kor. vrat	
Remedier – 0.5%	namakanje + zalivanje	92,1 ^b	6,98 ^a	0,4 ^{abc}	1,4 ^c	0,6 ^{abc}	5
Prestop – 0.5%	namakanje + zalivanje	78,3 ^a	7,59 ^a	0,1 ^{ab}	1,5 ^{cd}	0,3 ^{ab}	7
Serenade ASO - 4%	namakanje + zalivanje	81,0 ^{ab}	6,75 ^a	0,7 ^{cd}	1,7 ^{cd}	0,9 ^{bc}	3
Polyversum - 0.05%	namakanje + zalivanje	86,4 ^{ab}	12,22 ^b	0,0 ^a	0,9 ^b	0,3 ^{ab}	3
Cilus Plus – 0.01%	namakanje + zalivanje	81,3 ^{ab}	7,42 ^a	0,5 ^{bcd}	1,4 ^c	1,1 ^c	7
Okužena kontrola	/	83,7 ^{ab}	9,62 ^{ab}	0,9 ^d	1,9 ^d	0,7 ^{bc}	6
Neokužena kontrola	/	87,6 ^{ab}	16,13 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0

*Povprečne vrednosti označene z enakimi črkami se statistično ne razlikujejo med seboj pri stopnji tveganja 0.05 (Duncan Multiple Range Test).

**Namakanje koreninskega sistema sadik v fazi višine 10-15 cm (10 min) v suspenziji pripravka, zalivanje 14 dni po sajenju

***Št. rastlin, pri katerih smo zaznali porjavlost prevodnega tkiva na bazalnem delu stebela

3.2 *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*

Pri preprečevanju fuzarijske gnilobe koreninskega vratu in korenin paradižnika smo v prvem letu preizkušanja na nivoju teže korenin ugotovili delovanje pri vseh uporabljenih pripravkih ne glede na način aplikacije (namakanje, zalivanje). Med temi je izstopalo obravnavanje s pripravkom Prestop pri aplikaciji namakanje, kjer smo dosegli najvišji nivo delovanja. V primeru delovanja na nivoju števila okuženih rastlin nismo opazili bistvenih razlik med pripravki in okuženo kontrolo (preglednica 3).

V drugem letu preizkušanja je testiranje na nivoju teže korenin potrdilo delovanje pripravkov Remedier, Polyversum in Cilus Plus, medtem ko pripravka Prestop in Serenade ASO nista pokazala statistično značilnih razlik z okuženo kontrolo. Med pripravki pri katerih smo ugotovili delovanje je izstopal Remedier z najvišjo maso korenin in najnižjim deležem okuženih rastlin (preglednica 4).

Preglednica 3: Vpliv biotičnih pripravkov na rast paradižnika po okužbi z glivo *F. oxysporum f.sp. radidis-lycopersici* v letu 2017

Biotični pripravek/konc.	**Aplikacija (ob sajenju)	*Višina (\bar{x} , cm)	*Teža korenin (\bar{x} , g)	*Bolezenska znamenja (povp. vrednost vizualnih ocen)			***Št. okuženih rastlin
				Listi	Korenine	Kor. vrat	
Remedier – 0.5%	namakanje	112,5 ^{bc}	24,14 ^{ab}	1,4 ^{bc}	0,6 ^b	0,8 ^b	7
	zalivanje	124,0 ^c	23,46 ^{ab}	0,7 ^{ab}	0,7 ^b	0,7 ^b	8
Prestop – 0.5%	namakanje	118,5 ^c	28,96 ^b	0,8 ^{abc}	0,9 ^b	0,7 ^b	10
	zalivanje	98,4 ^{bc}	21,04 ^{ab}	0,3 ^a	0,7 ^b	1,0 ^b	7
Serenade ASO - 4%	namakanje	101,7 ^{bc}	22,82 ^{ab}	1,5 ^c	0,9 ^b	0,8 ^b	8
	zalivanje	49,3 ^a	19,74 ^{ab}	1,2 ^{bc}	0,8 ^b	0,8 ^b	8
Okužena kontrola	/	81,8 ^b	11,48 ^a	2,8 ^d	1,5 ^c	1,0 ^b	10
Neokužena kontrola	/	127,5 ^c	36,37 ^b	0,2 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0

*Povprečne vrednosti označene z enakimi črkami se statistično ne razlikujejo med seboj pri stopnji tveganja 0.05 (Duncan Multiple Range Test).

**Namakanje koreninskega sistema sadik v fazi višine 10-15 cm (10 min) v suspenziji pripravka.

***Št. rastlin, pri katerih smo zaznali porjavlost prevodnega tkiva na bazalnem delu stebela.

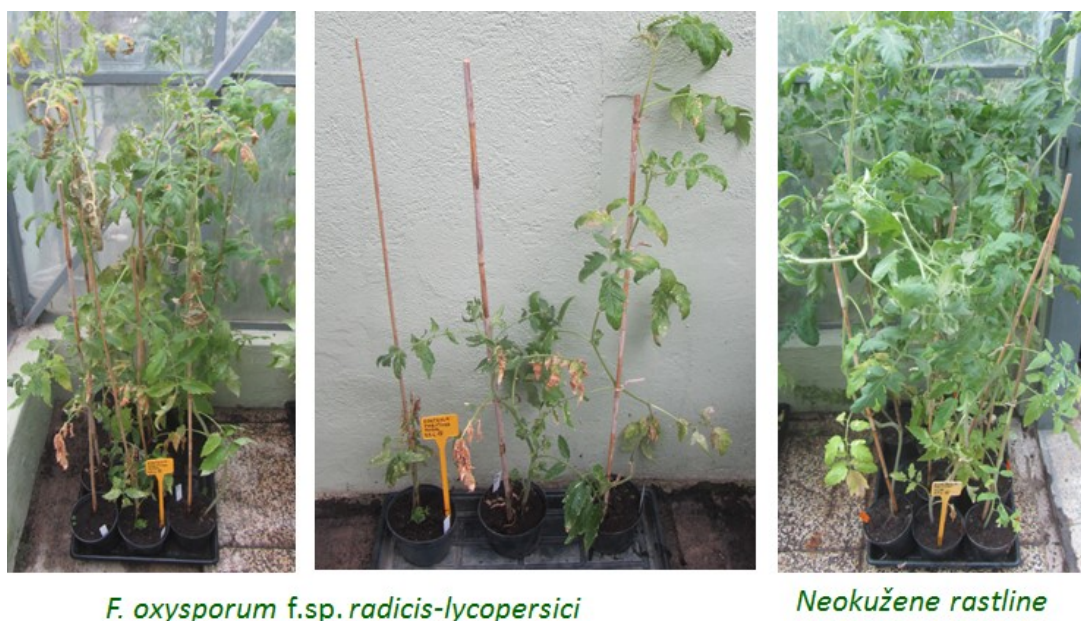
Preglednica 4: Vpliv biotičnih pripravkov na rast paradižnika po okužbi z glivo *F. oxysporum f.sp. radidis-lycopersici* v letu 2018

Biotični pripravek/konc.	**Aplikacija	*Višina (\bar{x} , cm)	*Teža korenin (\bar{x} , g)	*Bolezenska znamenja (povprečna vrednost vizualnih ocen)			Št. okuženih rastlin***
				Listi	Korenine	Kor. vrat	
Remedier – 0.5%	namakanje + zalivanje	87,7 ^b	18,56 ^b	0,9 ^b	1,1 ^b	0,4 ^{ab}	3
Prestop – 0.5%	namakanje + zalivanje	70,6 ^a	13,38 ^a	0,8 ^b	1,3 ^b	1,0 ^c	10
Serenade ASO - 4%	namakanje + zalivanje	84,9 ^{ab}	13,24 ^a	0,7 ^b	1,4 ^b	1,8 ^d	9
Polyversum - 0.05%	namakanje + zalivanje	73,9 ^{ab}	16,03 ^{ab}	0,8 ^b	1,2 ^b	0,9 ^{bc}	7
Cilus Plus – 0.01%	namakanje + zalivanje	87,7 ^b	16,13 ^{ab}	0,8 ^b	1,3 ^b	0,9 ^{bc}	7
Okužena kontrola	/	81,4 ^{ab}	13,08 ^a	0,7 ^b	1,3 ^b	1,1 ^c	9
Neokužena kontrola	/	87,6 ^b	16,13 ^{ab}	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0

*Povprečne vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično ne razlikujejo med seboj pri stopnji tveganja 0.05 (Duncan Multiple Range Test).

**Namakanje koreninskega sistema sadik v fazi višine 10-15 cm (10 min) v suspenziji pripravka, zalivanje 14 dni po sajenju

***Št. rastlin, pri katerih smo zaznali porjavlost prevodnega tkiva na bazalnem delu stebela.



Slika 1: Pojav bolezenskih znamenj nadzemnega dela paradižnika 7 tednov po okužbi z glivo *F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*, ki povzroča fuzarijsko gnilobo koreninskega vratu in korenin paradižnika (Testiranje v letu 2017; foto: S. Radišek).

Preglednica 5: Vpliv biotičnih pripravkov na rast paradižnika po okužbi z glivo *Verticillium dahliae* v letu 2017

Biotični pripravek/konc.	** Aplikacija (ob sajenju)	*Višina (\bar{x} , cm)	*Teža korenin (\bar{x} , g)	*Bolezenska znamenja (povprečna vrednost vizualnih ocen)			*** Št. okuženih rastlin
				Listi	Korenine	Kor. vrat	
Remedier – 0.5%	namakanje	131,4 ^a	22,09 ^a	0,2 ^a	0,8 ^c	0,8 ^b	7
	zalivanje	117,7 ^a	16,77 ^a	0,9 ^b	0,9 ^c	0,7 ^b	8
Prestop – 0.5%	namakanje	125,1 ^a	23,75 ^{ab}	0,5 ^{ab}	0,7 ^{bc}	0,6 ^b	7
	zalivanje	112,2 ^a	29,1 ^{ab}	0,1 ^a	1,0 ^c	0,7 ^b	6
Serenade ASO - 4%	namakanje	127,9 ^a	20,35 ^a	0,6 ^{ab}	0,9 ^c	0,4 ^b	5
	zalivanje	137,4 ^a	28,59 ^{ab}	0,0 ^a	0,4 ^b	0,5 ^b	7
Okužena kontrola	/	140,7 ^a	18,65 ^a	1,8 ^c	0,9 ^c	0,9 ^b	9
Neokužena kontrola	/	127,5 ^a	36,37 ^b	0,2 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0

*Povprečne vrednosti označene z enakimi črkami se statistično ne razlikujejo med seboj pri stopnji tveganja 0.05 (Duncan Multiple Range Test).

**Namakanje koreninskega sistema sadik v fazi višine 10-15 cm (10 min) v suspenziji pripravka.

***Št. rastlin, pri katerih smo zaznali porjavlost prevodnega tkiva na bazalnem delu stbla

3.3 *Verticillium dahliae*

V prvem letu preprečevanja verticilijske uvelosti paradižnika smo na nivoju teže korenin potrdili delovanje pripravka Prestop pri aplikaciji namakanje in zalivanje, ter

pri pripravku Serenade pri aplikaciji zalivanje. Ostala obravnavanja se niso statistično razlikovala od okužene kontrole (preglednica 5).

V drugem letu preizkušanja smo najvišjo težo korenin zaznali pri pripravku Cilus Plus, na nivoju števila okuženih rastlin pa smo delovanje zaznali pri pripravku Serenade ASO. Ostala obravnavanja niso pokazale statistične razlike z okuženo kontrolo (preglednica 6).

Preglednica 6: Vpliv biotičnih pripravkov na rast paradižnika po okužbi z glivo *Verticillium dahliae* v letu 2018

Biotični pripravek/konc.	** Aplikacija	* Višina (\bar{x} , cm)	* Teža korenin (\bar{x} , g)	*Bolezenska znamenja (povprečna vrednost vizualnih ocen)			Št. okuženih rastlin***
				Listi	Korenine	Kor. vrat	
Remedier – 0.5%	namakanje + zalivanje	55,5 ^a	8,16 ^a	1,0 ^{cd}	1,4 ^c	1,3 ^d	9
Prestop – 0.5%	namakanje + zalivanje	86,2 ^{bc}	18,7 ^b	0,2 ^{ab}	0,8 ^b	0,3 ^{ab}	9
Serenade ASO - 4%	namakanje + zalivanje	77,8 ^b	16,87 ^b	0,8 ^{cd}	1,0 ^{bc}	1,3 ^d	3
Polyversum - 0.05%	namakanje + zalivanje	87,0 ^{bc}	20,22 ^b	0,5 ^{abc}	0,8 ^b	1,2 ^{cd}	9
Cilus Plus – 0.01%	namakanje + zalivanje	86,6 ^{bc}	25,35 ^c	0,6 ^{bcd}	0,6 ^b	0,7 ^{bc}	8
Okužena kontrola	/	90,7 ^c	18,26 ^b	1,1 ^d	0,5 ^{ab}	0,7 ^{bc}	6
Neokužena kontrola	/	87,6 ^{bc}	16,13 ^b	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0

*Povprečne vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično ne razlikujejo med seboj pri stopnji tveganja 0.05 (Duncan Multiple Range Test).

**Namakanje koreninskega sistema sadik v fazi višine 10-15 cm (10 min) v suspenziji pripravka, zalivanje 14 dni po sajenju

***Št. rastlin, pri katerih smo zaznali porjavlost prevodnega tkiva na bazalnem delu stebela.

4 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

V raziskavi smo proučevali delovanje biotičnih pripravkov na osnovi različnih mikroorganizmov za preprečevanje povzročiteljev verticilijske uvelosti in fuzarijskih obolenj paradižnika. Z namenom zagotovitve homogene prisotnosti infekcijskega potenciala povzročiteljev smo testiranja zasnovali v obliki lončnega poskusa v rastlinjaku z uporabo umetno okuženih substratov. Pri preprečevanju glive *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), ki povzroča fuzarijsko uvelost paradižnika smo delovanje potrdili pri pripravkih Remedier, Prestop, Polyversum in Serenade ASO. Podobne rezultate smo dobili tudi pri preprečevanju glive *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, z dobrim antagonističnem delovanjem pripravkov Remedier, Prestop, Polyversum, ter pripravka na osnovi bakterije *BaCilus amyloliquefaciens* (Cilus Plus). V primeru preprečevanja verticilijske

uvelosti, ki jo povzroča gliva *V. dahliae*, pa smo delovanje potrdili pri dveh bakterijskih pripravkih Serenade ASO in Cilus Plus ter pripravku na osnovi glive *Gliocladium catenulatum* (Prestop).



F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici



Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici



Verticillium dahliae

Slika 2: Primerjava koreninskega sistema v poskusu kontrolnih okuženih (bela, oranžna, rumena) in neokuženih rastlin (modra) (levi stolpec fotografij) ter prizadetost prevodnega sistema (desni stolpec fotografij) na bazalnem delu rastlin po vzdolžnem prerezu (foto: S. Radišek).

Rezultati tako kažejo na širši spekter delovanja posameznih pripravkov, vendar tudi na odvisnost od vrste povzročitelja. To pomeni, da je pred uporabo pripravkov potrebno ugotoviti povzročitelja in na osnovi te informacije pripraviti program

varstva rastlin. Pri tem je potrebno upoštevati, da se predvsem v vrtnarstvu pridelovalci pogosto srečujejo s sočasno prisotnostjo več različnih talnih patogenih organizmov.

Pri primerjavi načina uporabe pripravkov so rezultati poskusa pokazali višji nivo delovanja pri aplikaciji namakanja korenin sadik pred sajenjem kot v primeru zalivanja po sajenju. To samo potrjuje pomembnost pravilne uporabe (aplikacije) posameznega pripravka, ki mora biti prilagojena biologiji BA, tarčnega organizma in gojene rastline. Prav tako na učinkovitost pripravkov lahko vpliva več dejavnikov kot so pravilna priprava pripravka, viabilnost BA v pripravkih, ohranjanja BA v tleh in rizosferi, odmerek pripravka, višina infekcijskega potenciala povzročitelja bolezni, gnojenje, priprava tal, namakanje in fenološka faza rastline (Spadaro in Gullino, 2005). Ti dejavniki lahko pojasnjujejo visok nivo variabilnosti rezultatov naših poskusov in tudi mnogih predhodnih raziskav (Larkin in Fravel, 1998), kljub zagotavljanju uniformnih pogojev med ponovitvami testiranj.

Izpostaviti je potrebno tudi relativno nizko učinkovitost pripravkov na nivoju rezultatov števila okuženih rastlin pri posameznem obravnavanju. Ta je le redko dosegla 50 % zmanjšanje okužb, kar je v primeru visokega infekcijskega potenciala v praksi nezadovoljivo. V določenih primerih lahko z višanjem koncentracije in pogostnosti uporabe pripravka ter kombinacijami različnih pripravkov (Alabouvette in sod., 1998) zvišamo nivo učinkovitosti, vendar trčimo ob ekonomsko nevzdržnost. Iz omenjenega se pristopi uporabe BA pri zatiranju talnih gliv vključujejo kot preventivni ukrep ali pa kot dopolnilo programom zdravstvenega varstva tal kot je biofumigacija, solarizacija, vnašanje različnih organskih in anorganskih izboljševalcev tal, ki prispevajo k ohranjanju in razvoju BA v tleh ter seveda ob sajenju sort, ki omogočajo kompatibilnost BA z njihovo rizosfero.

Zahvala. Avtorja se za finančno podporo zahvaljujeta Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (CRP projekt: V4-1602; raziskovalna programa: P4-0077 in P4-0072). Hkrati se avtorja zahvaljujeva naslednjim podjetjem za brezplačno donacijo pripravkov: Bayer Crop Science, Biopreparaty, spol.s r.o., Karsia d.o.o. in Metrob.

5 VIRI

- Ajillogba C., Babalola, O. Integrated Management Strategies for Tomato Fusarium Wilt. *Biocontrol Science*. 2013; 18. 117-27.
- Alabouvette C., Schippers, B., Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M. Biological control of Fusarium wilts: toward development of commercial products. V: Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (ur), *Plant-Microbe interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, New York, USA, 1998. 15-36.

- Amer M. A., El-Samra A., Abou-El-Seoud I.I., Sawsan M. El-Abd, Shawertamim N.K. Induced Systemic Resistance in Tomato Plants against Fusarium Wilt Disease using Biotic Inducers. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 2014 3(4): 1090-1103.
- Berg G., Hallmann J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. V: Schulz BJE., Boyle CJC., Sieber TN, (ur), Springer-Verlag, Berlin. *Microbial Root Endophytes*, 2006. 53–69.
- Carrero-Carrón I., Trapero-Casas JL., Olivares-García C., Monte E., Hermosa R., Jiménez-Díaz RM. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop protection*. 2016. 88, 45-52.
- Fravel D. R. Commercialization and implementation of bio control. *Annual review of Phytopathology*. 2005. 43: 337-359.
- Harman G. E., Howell, C. R., Vitarbo, A., Chet, I., Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev. Microbiol*. 2004. 2:43-56.
- Inderbitzin P, Bostock R. M, Davis R. M, Usami T, Platt H. W. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE*. 2011. 6(12): e28341.
- Jones J. B., Zitter T. A., Momol M. T., Miller S. A. (ur). *Compendium of Tomato Diseases and Pests*, 2nd Ed. 2014. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Jorjani M., Heydari A., Zamanizadeh H.R., Rezaee S., Naraghi L. Controlling sugar beet mortality disease by application of new bioformulations. *J. Plant Prot. Res*. 2011. 52 (3): 303–307.
- Larkin R. P., Fravel, D. R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease*. 1998. 82:1022-1028.
- Manjula K., Krishna G.K., Podile A.R. Whole cell of *Bacillus subtilis* AF1 proved more effective than cell-free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can. J. Microbiol*. 2004. 50 (9): 737–744.
- Moine L. M., Labbé C., Louis-Seize G., Seifert K. A., Bélanger R. R. Identification and detection of *Fusarium striatum* as a new record of pathogen to greenhouse tomato in Northeastern America. *Plant Disease*. 2014. 98:292-298.
- Romberg M. K., Davis R. M. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Disease*. 2007. 91:585-592.
- Shuqing Li., Nan Zhang, Zhenhua Zhang, Jia Luo, Biao Shen, Ruifu Zhang, Qirong Shen. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium wilt* of cotton by root colonization and biofilm formation. *Biology and Fertility of Soils*. 2013. 49: 295-303.
- Spadaro D., Gullino M.L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens, *Crop Protection*. 2005, 24 (7). 601-613.