



Univerza v Ljubljani

Biotehniška fakulteta

IV.

Doktorski
dan

Bi@znanosti?



Zbornik prispevkov

Četrty doktorski dan Bi(o)znanosti?

Zbornik prispevkov

Ljubljana, 2023

Četrty doktorski dan Bi(o)znanosti?

Zbornik prispevkov

Založnik zbornika:

Biotehniška fakulteta
Jamnikarjeva 101
1000 Ljubljana

Uredniki zbornika: Maja Hostnik, Iva Zahija, Jure Mravlje, Pia Starič, Zala Brajnik, Amela Kujović

Organizacijski odbor:

Jure Mravlje, Maja Hostnik, Amela Kujović, Pia Starič, Iva Zahija, Zala Brajnik, Vesna Ješe Janežič in
Programski Svet Bioznanosti

Datum in kraj dogodka:

7. junij 2023
Biotehniška fakulteta

Tehnično urejanje zbornika: Maja Hostnik, Iva Zahija

Zbornik recenziranih prispevkov (Recenzirali člani PS Bioznanosti).

Švilo strani: 108

Naklada:

Elektronska publikacija

Publikacija je dostopna na povezavi: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=146450>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v NUK Ljubljana

COBISS.SI 154303235

ISBN 978-961-6379-79-3 (PDF)

KAZALO

AGRONOMIJA

Vojnović A. in sod.: Identification of different potato cultivars by multispectral imaging . 1

BIOLOGIJA

Mravlje J. in sod.: Primerjava dveh metod za oceno učinkovitosti glivne dezinfekcije zrnja z uporabo tehnologije hladne plazme8

Slavinec P. in sod.: Diverziteta mikroalg v brakičnih vodah slovenskega obalnega morja 17

Starič P. in sod.: Vpliv direktne in indirektna plazemske obdelave na kalivost semen navadne ajde in hidrofobnosti lastnosti perikarpa27

BIOTEHNOLOGIJA

Brajnik Z. in Ogorevc J.: Kandidatni geni za odpornost proti mastitisu pri govedu35

Gostinčar K. in Luthar Z.: Genetska raznolikost slovenskih genotipov hruške (*Pyrus communis* L.).....42

Mlinarič K. in Luthar Z.: Vsebnost fagopirinov v semenih različnih akcesij tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.).....50

Šarac A. in sod.: Validation of CRISPR/Cas9-mediated T cell receptor knockout in the Jurkat cell line58

HORTIKULTURA

Gačnik S. in sod.: Preventive and curative effects of salicylic and methyl-salicylic acid against *Monilinia laxa* and the metabolic response of apple peel68

Šimkova K. in sod.: Aroma variability of everbearing strawberry cultivar 'Capri' during the harvest season 77

TEHNIŠKI SISTEMI V BIOTEHNIKI

Lapajne J. in sod.: Programska oprema SiaPy za enostavno segmentacijo spektralnih slik86

ZNANOST O CELICI

Kunčič K. in sod.: Od širše slike do podrobnosti: analiza 3D zgradbe prebavnega sistema nevretenčarskega organizma s kombinacijo mikro-CT in svetlobne mikroskopije.....93

Zahija I. in sod.: Zmožnost tvorbe aflatoksinov na mesnem gojišču pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus* 100

AGRONOMIJA

Identification of different potato cultivars by multispectral imaging

Ana VOJNOVIĆ^{1*}, Uroš ŽIBRAT², Janez LAPAJNE², Peter DOLNIČAR¹, Vladimir MEGLIČ¹

¹ Agricultural institute of Slovenia, Crop Science Department, Ljubljana, Slovenia

² Agricultural institute of Slovenia, Crop Protection Department, Ljubljana, Slovenia

* ana.vojnovic@kis.si

Identification of different potato cultivars by multispectral imaging

Abstract: Crop breeding and phenotyping are crucial for developing improved crop varieties adapted to specific environments, increasing productivity, yield, and quality. This study aimed to test the applicability of a multispectral imaging system mounted on a UAV to identify 68 potato cultivars. Multispectral images were obtained using a 5-band multispectral camera mounted on a quadcopter at an altitude of 50 m AGL. Two datasets were built, and using each dataset, 40 spectral indices were calculated. The developed models achieved high success rates in identifying cultivars using per-pixel and mean spectra of plants. The per-pixel data had a success rate of 88.5%, while the mean spectra of plants had a success rate of 97.1%. The researchers combined per-pixel classifications with majority voting to achieve highly accurate results in classification tasks. These findings demonstrate the potential of spectral data and machine learning techniques in accurately identifying cultivars and enhancing crop breeding programs. Further studies, including time series, use of different environmental conditions, and combination with classical physiology assessment approaches are needed to validate these results and develop more generalizable models differentiation.

Key words: remote sensing; *Solanum tuberosum* L.; multispectral imaging, cultivar differentiation; spectral indices; drone

Identifikacija različnih sort krompirja z multispektralnim slikanjem

Izveček: Žlahtnjenje pridelkov in fenotipizacija sta ključnega pomena za razvoj sort, prilagojenih okolju, povečanje produktivnosti, donosa in kakovosti pridelkov. Namen te študije je bil preizkusiti uporabnost sistema multispektralnih kamer, nameščenih na brezpilotni letalnik za identifikacijo 68 kultivarjev krompirja. Multispektralne slike smo pridobili s 5-pasovno multispektralno kamero, nameščeno na kvadrokopterju na nadmorski višini 50 m. Pridobili smo dva nabora podatkov in z obema izračunanli 40 spektralnih indeksov. Razviti modeli so dosegli visoke stopnje uspešnosti pri identifikaciji sort krompirja z uporabo spektrov na slikovno piko in povprečnih spektrov rastlin. Podatki na slikovno piko so imeli stopnjo uspešnosti 88,5 %, medtem, ko so imeli srednji spektri rastlin uspešnost 97,1 %. Naši rezultati kažejo potencial uporabe spektralnih podatkov in tehnik strojnega učenja pri natančnem

prepoznavanju sort in nadaljnji uporabi pri programih žlahtnjenja. Za potrditev teh rezultatov in razvoj bolj posplošljivih modelov so potrebne nadaljnje študije, vključno z zajemom slik v različnih fenoloških fazah, v različnih okoljskih pogojih in v kombinaciji s klasičnimi fiziološkimi meritvami.

Ključne besede: daljinsko zaznavanje; *Solanum tuberosum* L.; multispektralno slikanje; identifikacija sort; spektralni indeksi; dron

1 INTRODUCTION

In any crop breeding program, the first important steps are the identification and characterisation of varieties. Phenotyping and cultivar identification are critical for developing improved crop varieties adapted to specific environments, enhancing productivity, yield, and quality. In the program of organic breeding of potatoes for organic production at KIS, the selection of genotypes with appropriate development of leaf mass in the field is very important. The rapid development of stronger leafy plants that cover the ground well enables greater competition against weeds, reduces water loss and ultimately ensures a high yield. High-throughput field phenotyping rapidly measures plant traits on a large scale. Remote sensing technologies, such as spectral imaging from unmanned aerial vehicles (UAVs), provide accurate information about crop growth, health, and performance over large areas at high resolutions (Rodríguez et al., 2021; Yang et al., 2017). Remote sensing increases efficiency and accuracy, reduces labour costs, and enables real-time data collection for rapid decision-making in crop breeding. Additionally, remote sensing provides valuable insights into physiological processes underlying crop growth, enabling more precise and effective breeding strategies (Maes & Steppe, 2019). Phenotyping and cultivar identification facilitated by remote sensing play a crucial role in developing improved crop varieties to meet increasing demands for food, fibre, and fuel. In recent years, application of spectral imaging for discrimination of crop cultivars was tested on several crop species, such as maize, almond trees and soybean, although further research on different species is needed (Gava et al., 2022; Guimarães et al., 2023; Zhang et al., 2020; Zhu et al., 2019).

The objective of this study was to test the applicability of a multispectral imaging system mounted on an unmanned aerial vehicle (UAV) to identify 68 potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars.

2 MATERIALS AND METHODS

68 potato cultivars were planted at a field of the Infrastructure centre Jable, Agriculture institute of Slovenia (KIS), near Ljubljana in April 2020. Potatoes were planted in microplots in a randomised design with 30 plants per microplot, and three replicates per cultivar. Seeding material was obtained from regular breeding and phenotyping activities at KIS. Cultivars were grouped into 5 groups (early, late, second early, very early, very late), based on their maturity period.

Multispectral images were obtained using a 5-band multispectral camera with downwelling light sensor (Micasense Rededge-MX), mounted on a quadcopter Skyhero Spyder X4-850 Geo Edition, at an altitude of 50 m AGL, at midday on a single day in beginning of July 2020. Positions of ground control points were measured using a Stonex S9i GNSS receiver, and used to increase spatial accuracy of multispectral images.

Reflectance images were segmented, leaf area pixels extracted for each plant and labelled for each cultivar and replicate. Two datasets were built, one with leaf-area pixel values, the second with mean spectra of each plant. Using each dataset, 40 spectral indices were calculated. Principal component analysis was used a dimensionality reduction and data exploration methods. Both dimensionally reduced datasets were split into training and test datasets in a 70:30 ratio. The first dataset was used to train an Extreme Gradient Boosting (XGBoost) model (Chen & Guestrin, 2016), which was evaluated using 5-times repeated 10-fold cross validation. Hyperparameter tuning was performed using a grid search. For the per-pixel dataset, majority voting was implemented to determine classification success for individual plants. The test dataset was then used to perform the final evaluation of the developed models.

3 RESULTS AND DISCUSSION

By multispectral imaging we obtained multispectral data from which we calculated 40 spectral indices. On Figure 1, red-green-blue (RGB) image and two indices, Normalized difference vegetation index (NDVI) and Modified chlorophyll absorption in reflectance (MCARI) are shown. The NDVI is a simple graphical indicator that can be used to measure green biomass, it detect and quantifies the presence of live green vegetation and it is widely use to assess the plant health status, detecting early drought stress, leaf area index (LAI), etc. (Herrmann et al., 2010; Saravia et al., 2016; Zhong et al., 2020). MCARI gives the measure of depth of chlorophyll absorption and is sensitive for estimating chlorophyll content, it's distribution in leaves as well as variations of LAI (Herrmann et al., 2010; Sytar et al., 2017).

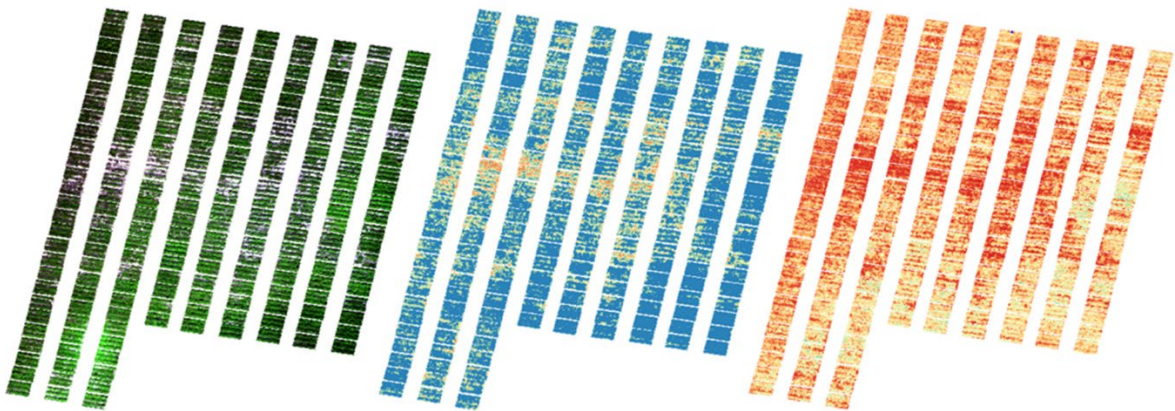


Figure 1: Images of the experimental field taken by a multispectral system mounted on an unmanned aerial vehicle. From left to right: RGB image, NDVI index and MCARI.

The first two principal components explain approximately 80% variance. 22 indices were selected as important, and accounted for most of the observed variance. The selected 10 components explain more than 95% variance in the data. Cultivar groups were arranged predominantly along the 1st component, with late varieties characterized by high values of indices such as MSAVI, ARVI, GNDVI, DVI, and low values of indices NDWI, TCARI, and WI. The opposite was observed for early and very early varieties, while second early varieties were between these groups. Moderately early cultivars also had the largest variability of all cultivar groups (Figure 2).

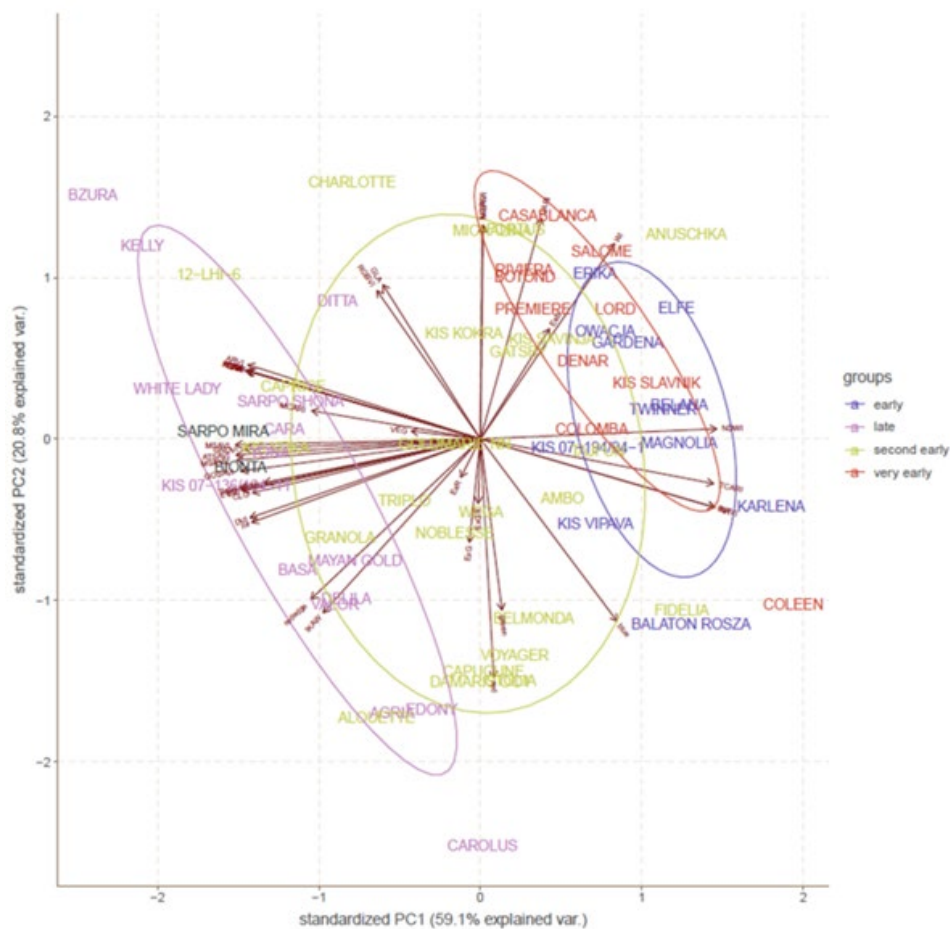


Figure 2: PCA biplot of the first two principal components with 95 % confidence ellipses for each group.

Identification of cultivars using PCA and XGBoost achieved a success rate of 97.1% on mean spectra of plants. Using per-pixel data, a success rate of 88.5% was achieved, and then increased to 98.4% by using majority voting. Moreover, majority voting constrained classification results, thereby reducing confidence intervals in comparison to both per-pixel and mean classifications, with confidence intervals ranging from 94.1% - 99.5%, compared to 83.5% - 98.7%, respectively. These findings highlight the effectiveness of combining per-pixel

classifications with majority voting in achieving highly accurate results in classification tasks. In similar studies, by using XGBoost and vegetal indices, spectral bands and two structural parameters, success rate of up to 99% was achieved for classification of two species of almond trees (Guimarães et al., 2023). For identification of soybean cultivars, classification success rate of 92.18% was achieved by using artificial neural networks (ANN) and spectral bands (Gava et al., 2022).

For potato, spectral data was previously used for detection and classification of diseases and physiological disorders caused by exposure to biotic or abiotic stress, or for estimating for example nitrogen concentrations or yield (Burnett et al., 2021; León-Rueda et al., 2022; Li et al., 2021; Zhou et al., 2022). Identification of potato varieties was very successfully, with success rate up to 100%, performed on tubers by using ANN, but not on the green parts on the plants in the field (Azizi et al., 2016).

4 CONCLUSIONS

These findings demonstrate the potential of spectral data and machine learning techniques in accurately identifying cultivars and enhancing crop breeding programs by combining per-pixel classifications with majority voting. Moreover, the spectral data obtained during the research represent a relatively large database for potato cultivars grown in organic production. The observed differences among cultivar groups change throughout the season, so detailed time series analysis would be needed to accurately characterize these cultivars, their differences, and developmental changes throughout the season. The biggest differences were observed between late and early and very early cultivars, with moderately early cultivars between them. At the time of imaging, early cultivars were more developed than late, and moderately early cultivars were in between. Another factor, contributing to differences might be also differential response of cultivars to environmental factors. For taking that into account, detailed monitoring of environmental factors would be needed. Later in the season the variability within this group would probably decrease, leading to a better differentiation. Further studies are needed, including time series, use of more cultivars, and different environmental conditions, to validate these results and develop more generalizable models.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from the Slovenian Research Agency (research core funding No. P4-0072 (Agrobiodiversity) and Young researcher grant: A. Vojnović, contract number 1000-21-0401) and by European Union Horizon 2020 Grant Agreement No. 771367 within ECOBREED project.

5 REFERENCES

Azizi, A., Abbaspour-Gilandeh, Y., Nooshyar, M., & Afkari-Sayah, A. (2016). Identifying

- Potato Varieties Using Machine Vision and Artificial Neural Networks. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 618–635. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1038834>
- Burnett, A. C., Serbin, S. P., Davidson, K. J., Ely, K. S., & Rogers, A. (2021). Detection of the metabolic response to drought stress using hyperspectral reflectance. *Journal of Experimental Botany*, 72(18), 6474–6489. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab255>
- Chen, T., & Guestrin, C. (2016). XGBoost: A scalable tree boosting system. *Proceedings of the ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, 13-17-Aug, 785–794. <https://doi.org/10.1145/2939672.2939785>
- Gava, R., Santana, D. C., Cotrim, M. F., Rossi, F. S., Teodoro, L. P. R., da Silva Junior, C. A., & Teodoro, P. E. (2022). Soybean Cultivars Identification Using Remotely Sensed Image and Machine Learning Models. *Sustainability (Switzerland)*, 14(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/su14127125>
- Guimarães, N., Pádua, L., Sousa, J. J., Bento, A., & Couto, P. (2023). Almond cultivar identification using machine learning classifiers applied to UAV-based multispectral data. *International Journal of Remote Sensing*, 44(5), 1533–1555. <https://doi.org/10.1080/01431161.2023.2185913>
- Herrmann, I., Karnieli, A., Bonfil, D. J., Cohen, Y., & Alchanatis, V. (2010). SWIR-based spectral indices for assessing nitrogen content in potato fields. *International Journal of Remote Sensing*, 31(19), 5127–5143. <https://doi.org/10.1080/01431160903283892>
- León-Rueda, W. A., León, C., Caro, S. G., & Ramírez-Gil, J. G. (2022). Identification of diseases and physiological disorders in potato via multispectral drone imagery using machine learning tools. *Tropical Plant Pathology*, 47(1), 152–167. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00460-2>
- Li, D., Miao, Y., Gupta, S. K., Rosen, C. J., Yuan, F., Wang, C., Wang, L., & Huang, Y. (2021). Improving potato yield prediction by combining cultivar information and uav remote sensing data using machine learning. *Remote Sensing*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/rs13163322>
- Maes, W. H., & Steppe, K. (2019). Perspectives for Remote Sensing with Unmanned Aerial Vehicles in Precision Agriculture. *Trends in Plant Science*, 24(2), 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.007>
- Rodríguez, J., Lizarazo, I., Prieto, F., & Angulo-Morales, V. (2021). Assessment of potato late blight from UAV-based multispectral imagery. *Computers and Electronics in Agriculture*, 184(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106061>
- Saravia, D., Farfán-Vignolo, E. R., Gutiérrez, R., De Mendiburu, F., Schafleitner, R., Bonierbale, M., & Khan, M. A. (2016). Yield and Physiological Response of Potatoes

- Indicate Different Strategies to Cope with Drought Stress and Nitrogen Fertilization. *American Journal of Potato Research*, 93(3), 288–295. <https://doi.org/10.1007/s12230-016-9505-9>
- Sytar, O., Brestic, M., Zivcak, M., Olsovska, K., Kovar, M., Shao, H., & He, X. (2017). Applying hyperspectral imaging to explore natural plant diversity towards improving salt stress tolerance. *Science of the Total Environment*, 578(February), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.014>
- Yang, G., Liu, J., Zhao, C., Li, Z., Huang, Y., Yu, H., Xu, B., Yang, X., Zhu, D., Zhang, X., Zhang, R., Feng, H., Zhao, X., Li, Z., Li, H., & Yang, H. (2017). Unmanned aerial vehicle remote sensing for field-based crop phenotyping: Current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01111>
- Zhang, L., Liu, Z., Ren, T., Liu, D., Ma, Z., Tong, L., Zhang, C., Zhou, T., Zhang, X., & Li, S. (2020). Identification of seed maize fields with high spatial resolution and multiple spectral remote sensing using random forest classifier. *Remote Sensing*, 12(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/rs12030362>
- Zhong, F., Cheng, Q., Cheng, Q., & Wang, P. (2020). Meteorological Drought, Hydrological Drought, and NDVI in the Heihe River Basin, Northwest China: Evolution and Propagation. *Advances in Meteorology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2409068>
- Zhou, J., Wang, B., Fan, J., Ma, Y., Wang, Y., & Zhang, Z. (2022). A Systematic Study of Estimating Potato N Concentrations Using UAV-Based Hyper- and Multi-Spectral Imagery. *Agronomy*, 12(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102533>
- Zhu, S., Chao, M., Zhang, J., Xu, X., Song, P., Zhang, J., & Huang, Z. (2019). Identification of soybean seed varieties based on hyperspectral imaging technology. *Sensors (Switzerland)*, 19(23). <https://doi.org/10.3390/s19235225>

BIOLOGIJA

Primerjava dveh metod za oceno učinkovitosti glivne dezinfekcije zrnja z uporabo tehnologije hladne plazme

Jure MRAVLJE^{1,*}, Marjana REGVAR¹, Miran MOZETIČ², Katarina VOGEL-MIKUŠ^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

* jure.mravljje@bf.uni-lj.si

Primerjava dveh metod za oceno učinkovitosti glivne dezinfekcije zrnja z uporabo tehnologije hladne plazme

Izvleček: Glive predstavljajo glavni razlog za rastlinske bolezni po svetu in so odgovorne za ogromne ekonomske izgube na globalni ravni. Tehnologija uporabe hladne plazme predstavlja nov, okolju prijazen način za zatiranje glivnih okužb na zrnju. V raziskavi smo testirali nizkotlačni radiofrekvenčni plazemski sistem z uporabo kisika kot dovodnega plina za učinkovitost dezinfekcije zrnja ajde, predhodno okuženega z glivo *Fusarium equiseti*. Primerjali smo rezultate dveh široko uporabljenih metod za oceno učinkovitosti dezinfekcije: direktnega gojenja na agarnih ploščah in posredne metode gojenja s štetjem enot, ki tvorijo kolonije (CFU). Izsledki naše raziskave nakazujejo, da ima izbor metode za oceno učinkovitosti dezinfekcije lahko velik vpliv na pridobljene rezultate.

Ključne besede: hladna plazma, ajda, *Fusarium equiseti*, glive, sterilizacija

Comparison of two methods for evaluating grain fungal disinfection efficacy with cold plasma technology

Abstract: Fungi present the leading cause of plant diseases worldwide and are responsible for enormous economic losses on a global scale. The cold plasma technology is a potential new and environmentally friendly tool for eliminating fungal contaminants from seeds. In this study, we used a low-pressure radiofrequency cold plasma system with oxygen as the feed gas to test the disinfection efficacy of buckwheat grains that were artificially infected with *Fusarium equiseti*. We compared the results of two widely used methods for evaluating the disinfection efficacy: direct culturing on agar plates and indirect method of culturing via counting the CFUs. Our research findings indicate that selecting a method for assessing disinfection efficacy can greatly influence the reported results.

Key words: cold plasma, buckwheat, *Fusarium equiseti*, fungi, sterilisation

1 UVOD

V današnjem času se, predvsem zaradi globalizacije in podnebnih sprememb, soočamo z množičnim porastom širjenja glivnih okužb, ki povzročajo številne bolezni (Fisher in sod., 2016). Glivne okužbe in z njimi povezane bolezni so vzrok za smrt več kot 1,6 milijona ljudi letno. Glive so tudi glavni dejavnik tveganja v rastlinski produkciji, saj svetovno gledano uničijo kar tretjino letnega pridelka, s čimer bi lahko nahranili več kot 600 milijonov ljudi (Anonymus, 2017). Poleg tega, da lahko zavirajo kalitev in povzročijo kvarjenje skladiščenih zrn (Hallowin, 1983), mnoge izmed njih tvorijo tudi mikotoksine, ki so škodljivi za zdravje ljudi in živali (Miller, 1995). Glive iz rodu *Fusarium* so tipične poljske glive (Christensen, 1957), ki pogosto okužujejo semena in zrna rastlin ter so sposobne tvorbe širokega spektra različnih mikotoksinov kot so fumozini, trihoteceni in zearalenoni (Bennett & Klich, 2003).

Ob hitro naraščajoči človeški populaciji, ki bo po ocenah FAO (angl. »Food and Agriculture Organisation«) dosegla skoraj 10 milijard do leta 2050 (FAO UN, 2009), je tako ključno preprečevanje glivnih okužb za doseganje prehranske varnosti. Svetovno gledano je uporaba pesticidov (fungicidov) še vedno najbolj razširjena metoda za preprečevanje glivne rasti (Mancini & Romanazzi, 2014), vendar pa ti za seboj puščajo škodljive ostanke, ki negativno vplivajo na naše zdravje in okolje, zato njihova uporaba postaja vedno manj zaželena (Sharma in sod., 2019). Nenazadnje pa smo v zadnjih letih priča strmemu naraščanju pojava odpornosti na številne fungicide (Fisher in sod., 2022), zaradi česar se pospešeno išče nove, okolju prijazne in varne ter trajnostne tehnologije za zatiranje gliv.

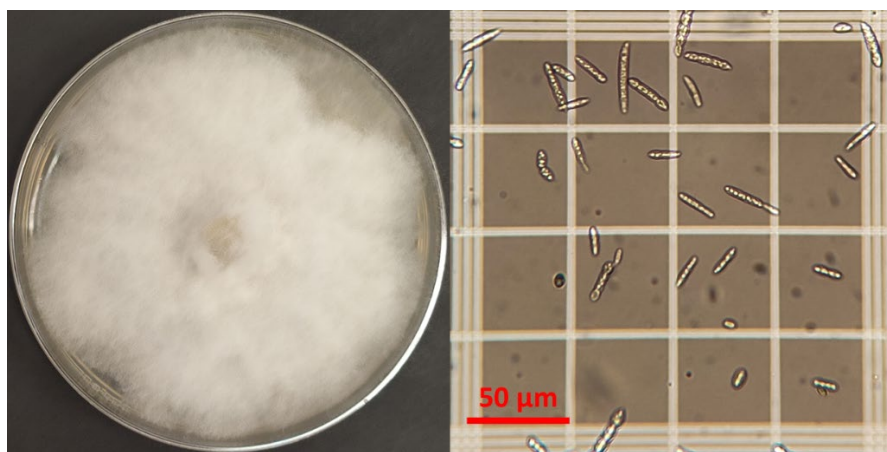
V zadnjih nekaj desetletjih se je izoblikovalo novo, interdisciplinarno področje raziskav z uporabo hladne plazme (HP), ki kaže aplikacije na mnogih področjih vključno s kmetijstvom in živilsko tehnologijo (Puač in sod., 2018). Ena izmed najbolj obetavnih je prav površinska dekontaminacija oziroma dezinfekcija mikroorganizmov s semenskega materiala in zrnja (Mravlje in sod., 2021 a) ter degradacija mikotoksinov z uporabo HP (Hojnik in sod., 2017). Plazma predstavlja četrto agregatno stanje, delno ioniziran plin, ki ga dobimo z dovajanjem energije plinu (Conrads & Schmidt, 2000). Sestoji iz prostih elektronov, atomov, ionov, molekul, radikalov in drugih reaktivnih zvrsti, skupaj z UV sevanjem. Vse te aktivne kemijske zvrsti ji dajejo edinstvene lastnosti, med drugim tudi protimikrobno delovanje (Moisan in sod., 2001).

Raziskave na področju glivne dezinfekcije zrnja s HP so še v povojih in iz zadnjih objavljenih preglednih člankov s tega področja (Mravlje in sod., 2021 a; Veerana in sod., 2022) lahko opazimo, da večina avtorjev uporablja eno od dveh metod za oceno učinkovitosti dezinfekcije in sicer: metodo direktnega gojenja, s katero določimo odstotek glivne kolonizacije, ter metodo posrednega gojenja s štetjem enot, ki tvorijo kolonije – CFU (angl. »colony-forming units«). Namen te raziskave je bil primerjati rezultate obeh metod za oceno učinkovitosti dezinfekcije okuženih zrn ajde po obdelavi s HP. Zrnje smo predhodno okužili z glivo *Fusarium equiseti*, globalno razširjenega patogena žitnih zrn in sadja, ki lahko tvori mnoge mikotoksine, predvsem trihotecene in zearalenone (Thrane, 2014).

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Priprava vzorcev

Zrnje navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) smo pridobili iz Mlina Rangus (Šentjernej, Slovenija). Zrnje smo predhodno sterilizirali z avtoklaviranjem (pri 121 °C za 15 minut, v avtoklavu Systec VX-150), da smo odstranili naravno prisoten mikrobiom zrnja. Glivo *Fusarium equiseti* (sev GB010, ki ga hranimo v glivni banki Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete UL) smo vzgojili v sveži enotedenski kulturi na gojišču iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA). Sledila je izolacija spor (makrokonidijev) v fiziološki raztopini z dodanim 0.1 % (v/v) Tween 80 (Slika 1). Koncentracijo spor smo uravnali na 10^6 s štetjem pod mikroskopom (Carl Zeiss) s pomočjo hemocitometra (Neubauer Chamber Assistant Bright Line). Nato smo predhodno sterilizirano zrnje ajde okužili tako, da smo v sterilno čašo zatehtali 10 g zrnja ajde in dodali 10 mL suspenzije spor v fiziološki raztopini. Sledilo je 30 minutno stresanje na rotacijskem mešalniku pri 180 obratih na minuto. Za tem smo zrnje odcedili in prenesli na sterilne petrijevke, kjer smo jih do suhega posušili v brezprašni komori (24 ur).



Slika 1: Enotedenska čista kultura glive *Fusarium equiseti* na gojišču PDA (levo) ter njene izolirane spore (konidiji) pod mikroskopom (desno).

2.2 Obdelava s hladno plazmo

Okuženo zrnje smo obdelali v velikem radiofrekvenčnem plazemskem reaktorju pri znižanem tlaku (vakuumu), ki je podrobneje opisan v predhodnem članku (Mravlje in sod., 2021 b). Kot vhodni plin smo uporabili čisti kisik (99,99 %), obdelave so potekale pri delovnem tlaku približno 30 Pa in moči 1,8 kW, pretok plina je bil 50 sccm. Zrnje smo izpostavili HP za 30, 60, 120 in 180 sekund. Po obdelavi smo zrnje sterilno zapakirali v plastične vrečke in še isti dan nadaljevali s poskusi za ocenjevanjem učinkovitosti dezinfekcije.

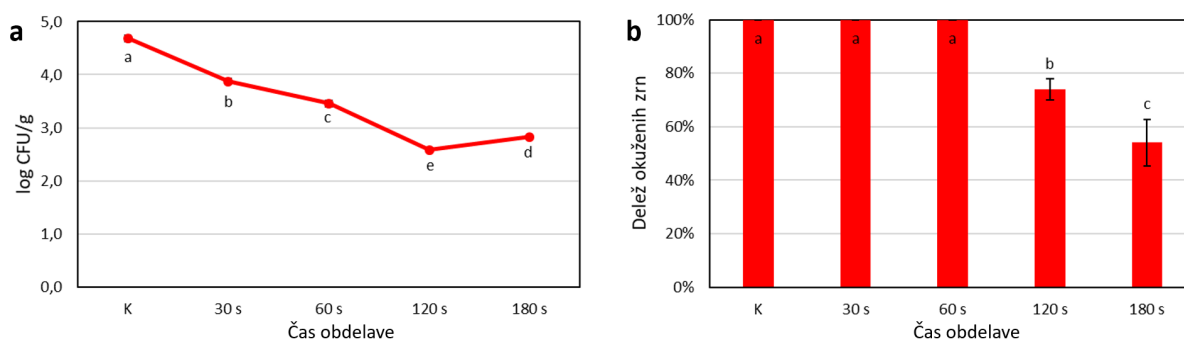
2.3 Ocena učinkovitosti dezinfekcije

Za oceno učinkovitosti dezinfekcije gliv iz zrnja ajde pri različnih časovnih izpostavitvah HP smo paralelno izvedli dve metodi: direktno gojenje in posredno gojenje, na osnovi metode CFU. V prvem primeru, pri metodi direktnega gojenja, smo po 10 ajdovih zrn iz kontrolne skupine in različnih obdelav s HP v enakomernem razmaku sterilno položili na sveža 2 %

gojišča krompirjevega dekstroznega agarja (PDA), ki mu je bil dodan antibiotik kloramfenikol (50 mg/L). Za vsako skupino smo pripravili po 10 paralelk. Plošče smo inkubirali 5 dni pri sobni temperaturi, v temi. Nato smo določili odstotek kontaminiranih zrn. V drugem primeru pa smo posredno, na osnovi metode CFU določili učinkovitost dezinfekcije s HP. Po 1 g zrnja iz vsake skupine smo zatehtali v sterilne 150 mL steklene posodice in dodali 9 mL sterilizirane fiziološke raztopine z dodanim 0.1 % (v/v) Tween 80. Posodice smo stresali 30 minut na rotacijskem mešalniku pri 180 obratih na minuto. Za tem smo suspenzijo ustrezno redčili (sto-ozroma tisočkrat) in 100 μ L razredčene suspenzije razmazali na 2 % gojišča PDA. Za vsako skupino in vsako redčitev smo naredili po 3 paralelke. Po 5 dnevni inkubaciji, pri enakih pogojih kot zgoraj, smo prešteli zrastle kolonije in vrednosti izrazili kot število CFU na gram zrnja. Rezultate smo obdelali z enosmerno analizo variance s Tukeyevim post hoc testom (rezultati so bili statistično značilni pri p vrednosti manjši od 0,05) z uporabo programa Statistica StatSoft verzije 7.0, grafe pa izrisali s programom MS Excel.

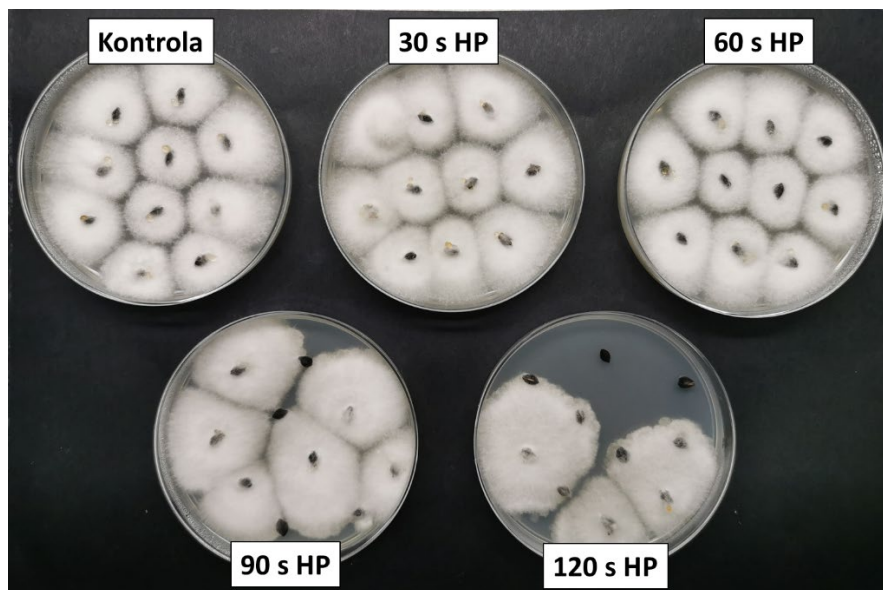
3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Na osnovi metode CFU (Slika 2a) smo že po 30 s izpostavitvi HP opazili statistično značilno znižanje okužbe z glivo *F. equiseti* in sicer za skoraj 1 log enoto (iz 4,7 na 3,9 log/g zrnja). Po 60 s izpostavitvi HP pa še za približno 0,5 log. Vendar pa pri primerjavi z rezultati na osnovi metode direktnega gojenja (Slika 2b) lahko opazimo, da pri slednji tudi po 60 s izpostavitvi HP nismo opazili nobene razlike s kontrolno skupino, saj so bila še vedno kontaminirana vsa zrna ajde. Podobno so v svoji raziskavi opazili tudi Zahoranová in sod. (2018), ki so testirali učinkovitost HP pri atmosferskem tlaku za dezinfekcijo naravno in umetno kontaminiranih semen koruze. Ob okužbi z glivo *Fusarium culmorum* so že po 60 s izpostavitvi HP z uporabo metode CFU opazili popolno dezinfekcijo semen, saj niso opazili več nobene zrastle kolonije. Kljub temu pa so z metodo direktnega gojenja na ploščah opazili, da je bilo po 60 s izpostavitvi HP okuženih še približno 10 % vseh semen. Podobno so opazili tudi pri glivi *Alternaria alternata*, pri kateri so na osnovi metode CFU opazili popolno dezinfekcijo po 300 s izpostavitvi HP, medtem ko so z metodo direktnega gojenja na ploščah zaznali še približno 15 % okuženih zrn.



Slika 2: Učinkovitosti dezinfekcije glede na obdelavo pri metodi CFU (a) in metodi direktnega gojenja na ploščah (b). K – kontrola; 30 s HP – 30 sekundna izpostavitvev hladni plazmi; 60 s HP – 60 sekundna izpostavitvev hladni plazmi; 90 s HP – 90 sekundna izpostavitvev hladni plazmi; 120 s HP – 120 sekundna izpostavitvev hladni plazmi. Prikazana so povprečja $\pm$ standardne napake. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test, $p < 0,05$).

V našem primeru smo po 120 s izpostavitvi HP dosegli skoraj polovično zmanjšanje začetnega števila CFU glede na kontrolo (2,6 log/g zrnja). Po 180 s izpostavitvi HP smo sicer zaznali celo nekoliko višjo stopnjo okužbe (2,8 log/g zrnja), vendar pa je to verjetno posledica napake pri oceni kolonizacije, ki nastane zaradi same metode kot take, ki vključuje veliko serijo redčitev. Prav tako je bila metoda CFU razvita za štetje in oceno bakterijske rasti, ter je lahko problematična pri glivah, ki lahko obstajajo in rastejo v mnogih oblikah: od spor do celic in večceličnih hif, kar še poveča možnost napak pri vrednotenju rezultatov. Na osnovi metode direktnega gojenja pa smo šele po 120 s izpostavitvi HP opazili zmanjšanje deleža okuženih semen (Slika 3) in sicer za približno 30 %, po 180 s izpostavitvi HP pa za skoraj 50 %.



Slika 3: Reprezentativni primeri gojišč PDA z okuženimi zrnji ajde (test direktnega gojenja na ploščah) po enotedenski inkubaciji na sobni temperaturi, v temi. 30 s HP – 30 sekundna izpostavitvev hladni plazmi; 60 s HP – 60 sekundna izpostavitvev hladni plazmi; 90 s HP – 90 sekundna izpostavitvev hladni plazmi; 120 s HP – 120 sekundna izpostavitvev hladni plazmi.

Kljub dejstvu, da so bila okužena zrna ajde izpostavljena HP istočasno, so si rezultati ocen učinkovitosti dezinfekcije z uporabo dveh različnih metod precej različni. Z uporabo metode CFU smo namreč že po 30 s izpostavitvi HP opazili statistično značilno zmanjšanje okužbe z glivo *F. equiseti*, medtem ko smo pri metodi direktnega gojenja to opazili šele po 120 s izpostavitvi HP. To lahko pripisujemo dejstvu, da zaznava z metodo CFU zahteva, da spore predhodno speremo v raztopino, ki jo nato razmažemo na ploščo. Semena rastlin imajo zelo nagubano in razgibano površino, in znano je, da lahko različne vdolbinice in razpoke služijo kot zaščita za glivne spore (Basaran in sod., 2008; Selcuk in sod., 2008). Posledično jih tudi težje speremo iz okuženega zrnja z uporabo metode CFU. Na drugi strani pa je, pri metodi direktnega gojenja, kjer zrnje postavimo direktno na površino agarne plošče, že prisotnost ene same glivne spore dovolj, da se razvije okužba.

4 SKLEPI

Na osnovi naše raziskave lahko sklepamo, da ima izbira metode za oceno učinkovitosti dezinfekcije semen po obdelavi s hladno plazmo, velik vpliv na pridobljene rezultate. Z metodo CFU, ki je sicer zelo hitra in enostavna, lahko že pri krajših izpostavitvah hladni plazmi zaznamo statistično pomembne razlike (v našem primeru tudi več kot 1 log enote, kar se po mikrobioloških standardih dezinfekcije smatra kot 90 % redukcija), ki pa nimajo nujno biološko relevantnega pomena. Zato predlagamo, da paralelno izvedemo tudi metodo direktne ocene deleža glivne infekcije, ki nam bo dala boljši vpogled v dejansko učinkovitost dezinfekcije.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za sofinanciranje iz državnega proračuna (financiranje programske skupine P1-0212 Biologija rastlin, projekta J1-3014 in MR J. Mravlje).

6 VIRI

- Anonymus. (2017). Stop neglecting fungi. *Nature Microbiology*, 2 (July), 17120. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120>
- Basaran, P., Basaran-Akgul, N., & Oksuz, L. (2008). Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiology*, 25(4), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.005>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497>
- Christensen, C. M. (1957). Deterioration of Stored Grains by Fungi. *Botanical Review*, 23(2), 108–134.
- Conrads, H., & Schmidt, M. (2000). Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*, 9(4), 441–454. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/9/4/301>
- FAO United Nations. (2009). How to Feed the World in 2050 Executive. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Fisher, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, T., Bignell, E. M., Bowyer, P., Bromley, M., Brüggemann, R., Garber, G., Cornely, O. A., Gurr, S. J., Harrison, T. S., Kuijper, E., Rhodes, J., Sheppard, D. C., Warris, A., White, P. L., Xu, J., Zwaan, B., & Verweij, P. E. (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology*, 20(9), 557–571. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>
- Fisher, M. C., Gow, N. A. R., & Gurr, S. J. (2016). Tackling emerging fungal threats to animal

- health, food security and ecosystem resilience. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0332>
- Halloin, J. M. (1983). Deterioration Resistance Mechanisms in Seeds. *Phytopathology*, 73, 335–339.
- Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavčar-Kalcher, G., Walsh, J. L., & Križaj, I. (2017). Mycotoxin decontamination of food: Cold atmospheric pressure plasma versus “classic” decontamination. *Toxins*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/toxins9050151>
- Mancini, V., & Romanazzi, G. (2014). Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops. *Pest Management Science*, 70(6), 860–868. <https://doi.org/10.1002/ps.3693>
- Miller, J. D. (1995). Fungi and mycotoxins in grains: Implication for stored product research. *Journal of Stored Products Research*, 31(1), 1–16.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., & Yahia, L. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: A review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 226 (1–2), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00752-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00752-9)
- Mravlje, J., Regvar, M., & Vogel-Mikuš, K. (2021) a. Development of cold plasma technologies for surface decontamination of seed fungal pathogens: Present status and perspectives. *Journal of Fungi*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/jof7080650>
- Mravlje, J., Regvar, M., Starič, P., Mozetič, M., & Vogel-Mikuš, K. (2021) b. Cold plasma affects germination and fungal community structure of buckwheat seeds. *Plants*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/plants10050851>
- Puač, N., Gherardi, M., & Shiratani, M. (2018). Plasma agriculture: A rapidly emerging field. *Plasma Processes and Polymers*, 15(2), 1–5. <https://doi.org/10.1002/ppap.201700174>
- Selcuk, M., Oksuz, L., & Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99(11), 5104–5109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.076>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Kohli, S. K., Yadav, P., Bali, A. S., Parihar, R. D., Dar, O. I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Thrane, U. (2014). *Fusarium*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2, 76–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5>
- Veerana, M., Yu, N., Ketya, W., & Park, G. (2022). Application of Non-Thermal Plasma to

Fungal Resources. *Journal of Fungi*, 8(2), 1–36. <https://doi.org/10.3390/jof8020102>

Zahoranová, A., Hoppanová, L., Šimončicová, J., Tučeková, Z., Medvecká, V., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., & Černák, M. (2018). Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 38(5), 969–988. <https://doi.org/10.1007/s11090-018-9913-3>

Diverziteta mikroalg v brakičnih vodah slovenskega obalnega morja

Petra SLAVINEC*^{1,2}, Ana FORTIČ¹, Janja FRANCÉ¹, Patricija MOZETIČ¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja, Piran, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

* petra.slavinec@nib.si

Diverziteta mikroalg v brakičnih vodah slovenskega obalnega morja

Izveček: V okviru študije smo proučevali diverziteto mikroalg v brakičnih okoljih slovenskega obalnega morja – v Luki Koper, laguni Stjuži in Škocjanskem zatoku, ki so tudi antropogeno preoblikovana. Mikroalge smo vzorčili enkrat mesečno med aprilom 2018 in majem 2021, vzorce pa fiksirali in pregledali z invertnim epifluorescentnim mikroskopom in vrstičnim elektronskim mikroskopom. Skupno smo identificirali 284 taksonov, od tega jih največ pripada dinoflagelatom (126) in diatomejam (125). Manj jih pripada kokolitoforidom (15), silikoflagelatom (4), skupini Ebriida (1), evglenoficejam (2), kloroficejam (3), ohrofitom (2) in cianobakterijam (6). Določili smo 24 vrst, ki lahko povzročijo škodljiva cvetenja alg, ena vrsta (*Pseudo-nitzschia multistriata*) je bila identificirana kot tujerodna, dva taksona pa kot kriptogena (*Azadinium caudatum* var. *margalefii* in *Merismopedia* sp.). 35 od 284 taksonov je bilo določenih prvič. Ugotovili smo, da je diverziteta mikroalg v različnih brakičnih in antropogeno spremenjenih okoljih podobna. Rezultati bodo pomembni za pripravo nove presoje stanja morskega okolja po deskriptorju D2 za tujerodne vrste, kot to določa Okvirna direktiva o morski strategiji 2008/56/ES (ODMS).

Ključne besede: diverziteta; mikroalge; obalno morje; brakična okolja; tujerodne vrste

Diversity of microalgae in brackish waters of Slovenian coastal sea

Abstract: We determined the diversity of microalgae in brackish and anthropogenically modified environments - in Port of Koper, Stjuža lagoon and Škocjanski Zatok. Microalgae were sampled between April 2018 and May 2021. Samples were examined under an inverted epifluorescence and a scanning electron microscope. We identified total of 284 taxa, most of which belong to the classes Dinophyceae (126) and Bacillariophyceae (125). Significantly fewer number of species belong to Coccolithophyceae (15), Dictyochophyceae (4), Ebriida (1), Euglenophyceae (2), Chlorophyta (3), Ochrophyta (2), Cyanophyceae (6). We found 24 species that can cause harmful algal blooms, one species (*Pseudo-nitzschia multistriata*) was classified as a non-indigenous, and two taxa (*Azadinium caudatum* var. *margalefii* and *Merismopedia* sp.) as cryptogenic. 35 of the 284 taxa were identified for the first time. The species diversity of microalgae in different brackish water environments was similar, but differences were observed in the percentage of true marine, brackish, and freshwater species.. The results will be relevant for the preparation of a new assessment of the status of the marine environment

according to descriptor D2 - non-indigenous species, as set out in the Marine Strategy Framework Directive 2008/56/EC (MSFD).

Key words: biodiversity; microalgae; coastal sea; brackish waters; non-indigenous species

1 UVOD

Mikroalge so zelo raznolika skupina mikroskopskih organizmov, ki jih najdemo tako v morju kot v celinskih vodah, ter tvorijo osnovo prehranjevalnih mrež številnih ekosistemov. Poleg taksonomijemerila za razvrščanje mikroalg v skupine vključujejo tudi njihove morfološke, fiziološke in ekološke značilnosti (Hemaiswarya in sod., 2013; Salmaso et al., 2015). Glavne skupine morskih mikroalg, tako po številu vrst kot po številčnosti posameznih taksonov, so diatomeje (deblo Bacillariophyta), sledijo dinoflagelati (Dinoflagellata), kokolitoforidi (Coccolithophyceae) in drugi haptofiti iz debela Haptophyta, kriptofiti (Cryptophyta), enocelične zelene alge (Chlorophyta) in cianobakterije (Cyanobacteria) (taksonomija povzeta po <https://www.algaebase.org>). Glede na življenjski prostor jih razdelimo v dve ekološki skupini: bentoške mikroalge - mikrofitobentos in planktonske mikroalge – fitoplankton. Celice mikroalg povprečno merijo od 1 μm do 70 μm , z nekaj predstavniki do 1 mm, in jih lahko delimo v tri velikostne razrede: pikoplankton (0,2-2 μm), nanoplankton (2-20 μm) in mikropilankton (20-200 μm).

Obalni ekosistemi na prehodu med kopnim oz. celinskimi vodami in pravim morskih okoljem imajo zaradi svojih abiotičnih lastnosti pomembno ekološko vlogo. Vnosi hranil s kopnega, morja, atmosfere in preko resuspenzije sedimentov (Batelli & Gregorič, 2020; Šajna in Kaligarič, 2005) podpirajo veliko produkcijo in diverzitetu življenjskih združb. Med obalne ekosisteme uvrščamo tudi brakična vodna telesa, kot so izlivna območja rek, lagune in mokrišča, ki so pogosto antropogeno preoblikovana.

Na slovenski obali so takšna območja Škocjanski zatok, strunjanska laguna Stjuža in tudi območje Luke Koper, natančneje drugi luški bazen, kamor se izliva reka Rižana. V teh okoljih je pričakovati poleg izključno morskih tudi brakične in sladkovodne vrste, ki so vnesene z viri sladke vode, zaradi majhne globine pa tudi več bentoških vrst med planktonom. Tovrstna spremenjena okolja so med drugim lahko tudi recipientska okolja za tujerodne vrste (Kraus in sod. 2020).

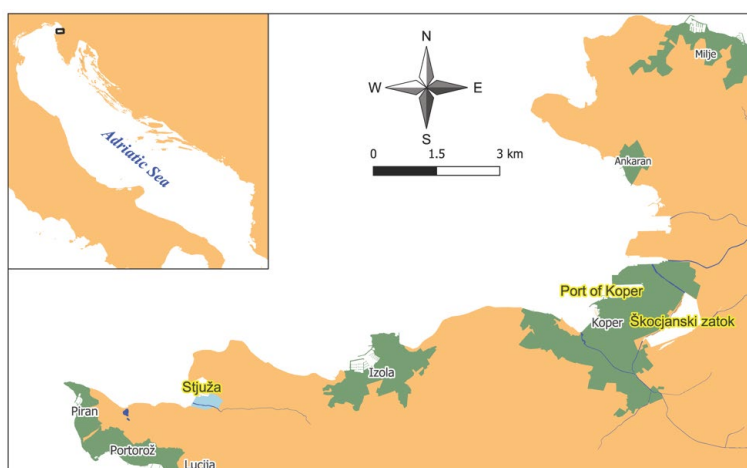
Tujerodna vrsta je vrsta, podvrsta ali takson nižje kategorije, ki je vnesena izven območja naravne razširjenosti v neko novo območje, s pomočjo človeka, bodisi namerno ali nenamerno. To vključuje kateri koli razvojni stadij organizma, ki je sposoben preživetja in razmnoževanja (Pyšek in sod., 2009). Vrste, katerih izvor je nejasen in jih ne moremo opisati kot tujerodne ali avtohtone, imenujemo kriptogene vrste (Carlton, 1996). Podkategorijo tujerodnih vrst, ki so izven območja svoje naravne razširjenosti uveljavile in imajo negativne vplive na biološko raznovrstnost, ekosistemske funkcije, socio-ekonomske vrednote in zdravje ljudi, imenujemo tujerodne invazivne vrste. Te vrste se po navadi hitro razmnožujejo in lahko svoj areal zelo hitro širijo (Pyšek in sod., 2009).

Cilj pričujoče študije, ki je potekala v okviru projekta »Spremljanje pestrosti in številčnosti tujerodnih vrst v slovenskem morju«, je bil i) preučiti do tedaj nepoznano diverzitetu mikroalg v brakičnih in antropogeno preoblikovanih vodnih okoljih vzdolž slovenske obale ter ugotoviti, kako se prisotnost in abundanca taksonov spreminja glede na lokacijo in čas vzorčenja. Poudarek je bil na planktonskih mikroalgah, posebno pozornost pa smo namenili vrstam, ki povzročajo škodljiva cvetenja alg in tujerodnim vrstam, ki lahko preko teh recipientskih okolij zaidejo v slovensko morje.

2 MATERIAL IN METODE

Slovensko morje zavzema jugovzhodni del Tržaškega zaliva, ki je najsevernejša točka Jadranskega in tudi Sredozemskega morja. Tržaški zaliv je polzaprti plitev zaliv z največjo globino 25 m, medtem ko voda v dobri petini zaliva ni globlja od 10 m in je pod močnim vplivom rek (Malone in sod., 2021).

Mikroalge smo vzorčili enkrat mesečno med aprilom 2018 in aprilom 2021 v treh brakičnih vodnih okoljih: v Luki Koper, Stjuži in Škocjanskem zatoku (Slika 1). Luka Koper je pretežno luka pretovora, kar pomeni, da lahko predstavlja tako recipientsko kot tudi donorsko okolje. Reka Rižana, ki je glavni vir sladke vode v regiji, se izliva v drugi luški bazen, ki je globok približno 14m in prinaša prečiščene komunalne in industrijske odpadne vode (Mozetič in sod., 2015). Stjuža je edina slovenska morska laguna in je del Naravnega rezervata Strunjan Stjuža, ki je vključeno v omrežje Natura 2000. Gre za plitko (maksimalna globina je 5m) delno zaprto brakično laguno, ki je razdeljena v dva dela: manjšo pretočno laguno in glavno laguno, ki je z morjem ostala povezana preko treh kanalov. Naravni rezervat Škocjanski zatok je naše največje polslano mokrišče in je ostanek morskega zaliva, kjer sta se reki Rižana in Badaševica zlivali v morje. Sestavljen je iz dveh delov - iz sladkovodnega dela rezervata ter brakične lagune, ki je pod vplivom plimovanja (globina ca. 1 m) (Mozetič in sod., 2010).



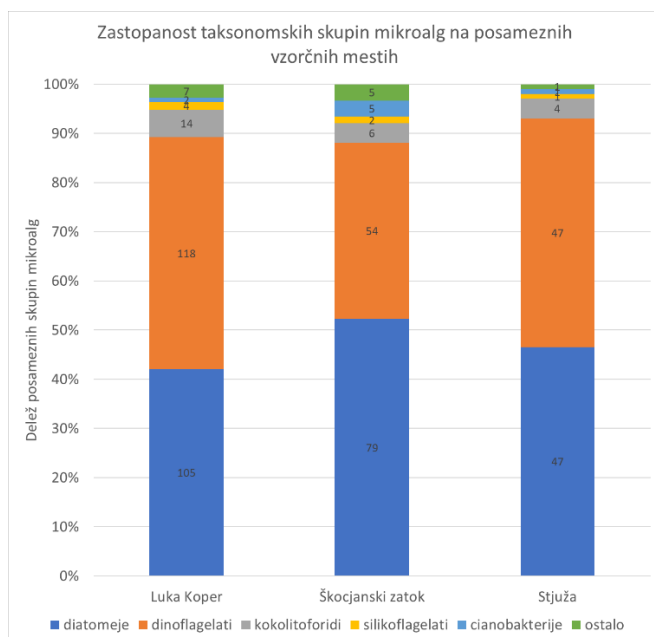
Slika 1: Zemljevid vzorčnih mest (označena z rumeno) (avtor: Milijan Šiško).

Mikroalge smo vzorčili z več horizontalnimi vleki s pomočjo fitoplanktonske mrežice z očesi velikosti 20 µm. Vzorci so bili fiksirani s 4% formaldehidom in shranjeni v temnih steklenicah (0,5 l) do pregleda. Vzorce smo pregledali pod invertnim epifluorescentnim mikroskopom Axio Observer Z1 (ZEISS) z integriranim digitalnim fotoaparatom AxioCam Mrc5. Nekaj dinoflagelatov, ki so bili posebno zahtevni za identifikacijo, smo obarvali z barvilom Calcofluor white M2R (Fritz in Triemer, 1985), kar nam je omogočilo ogled ploščic celične stene ali teke, katerih razporeditev je pomemben taksonomski znak. Za identifikacijo nekaterih manjših in težko določljivih taksonov smo uporabili vrstični elektronski mikroskop TESCAN MIRA. Opažene organizme smo določili do najnižjega možnega taksona.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

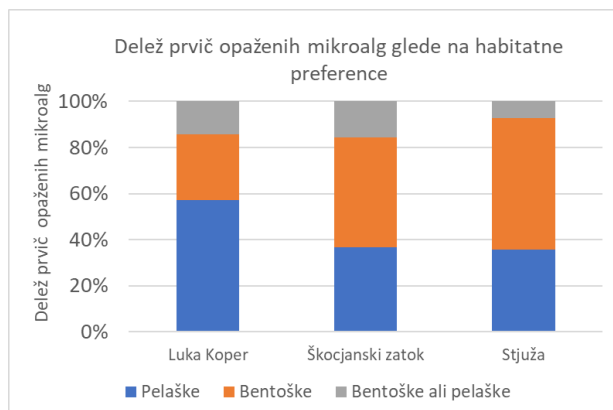
V vzorcih iz brakičnih habitatov smo skupno našli 284 različnih taksonov. Od teh jih je največ pripadalo dinoflagelatam (126) in diatomejam (125). Precej manj jih je pripadalo ostalim skupinam: kokolitoforidi (15), cianobakterije (6), silikoflagelati (4), klorofiti (3), ohrofiti (2), evglenoficeje (2) in Ebriida (1).

Pri večini najdenih taksonov gre za predstavnike morskega fitoplanktona, vendar smo našli tudi izključno brakične in sladkovodne organizme. Zaradi majhne globine vzorčnih mest je bilo kar nekaj bentoških vrst. Največ taksonov (249) je bilo najdenih v Luki Koper. V Škocjanskem Zatonu smo našli 151 taksonov in v Stjuži 101 takson. V Luki Koper so največji delež najdenih taksonov predstavljali dinoflagelati (47%) s 118 taksoni, sledile so diatomeje (42%) s 105 identificiranimi taksoni. Kokolitoforidi so s 14 taksoni predstavljali veliko manjši delež (6%), med tem ko so taksoni ostalih skupin (7) predstavljali 5% delež. V Škocjanskem zatoku je bila situacija obratna: največji delež (52%) so predstavljale diatomeje (29 taksonov), sledili so dinoflagelati (54 taksonov, 36%), kokolitoforidi so predstavljali 4% (6 taksonov), taksonov ostalih skupin pa je bilo skupno 8% (5 taksonov). V Stjuži je bil delež diatomej in dinoflagelatov enak (47%, 47 taksonov). Sledili so kokolitoforidi s 4% in taksoni ostalih skupin (3%). Večina mikroalg, ki smo jih identificirali je običajnih v morskih okoljih (235 taksonov), nekatere pa se lahko pojavljajo v morskih in sladkovodnih okoljih (18 taksonov). 3 najdeni taksoni so izključno brakični, 7 pa je izključno sladkovodnih (Graf 1). Le-ti so bili najdeni predvsem v Škocjanskem zatoku. Prednostna življenjska okolja mikroalg so bila določena glede na World register of marine species (WoRMS, 2022).



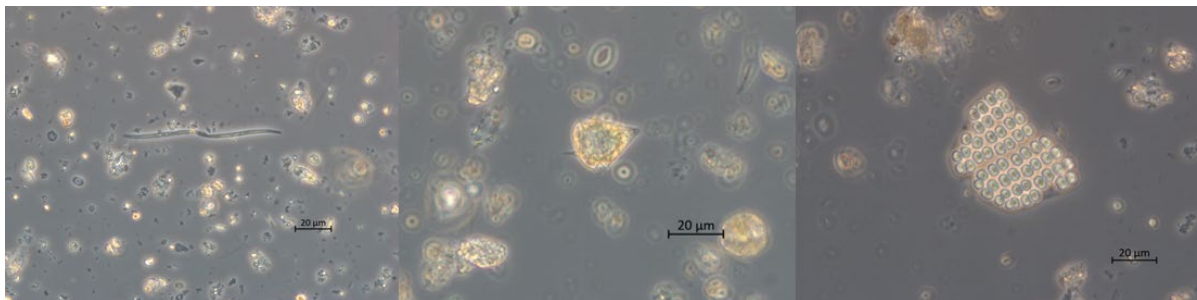
Slika 2: Zastopanost taksonomskih skupin mikroalg na posameznih vzorčnih mestih

Kar 35 taksonov je bilo prvič določenih; med njimi največ diatomej (19), dinoflagelatov (9) in cianobakterij (6). Približno enako število prvič določenih mikroalg je bilo planktonskih (13), bentoških (12) in t.i. tihopelagičnih (10), ki se lahko pojavljajo tako v vodnem stolpcu kot na dnu (Graf 2). V Luki Koper je bilo največ prvič določenih taksonov planktonskih, v Škocjanskem zatoku in v Stjuži pa je bila večina prvič opaženih taksonov bentoških.



Slika 3: Deleži prvič opaženih mikroalg glede na habitatne preference

Za 28 vrst je značilno, da lahko povzročijo škodljiva cvetenja alg (angl. Harmful Algal Blooms - HAB). Ena vrsta (*Pseudo-nitzschia multistriata*) je bila prepoznana kot tujerodna, dve (dinoflagelat *Azadinium caudatum* var. *margalefii* in cianobakterija iz rodu *Merismopedia*) pa kot kriptogeni (Slika 2).



Slika 4: Od leve proti desni: edina najdena tujerodna vrsta *Pseudo-nitzschia multistriata*, kriptogeni dinoflagelat *Azadinium caudatum* var. *margalefii* in prvič opažena kriptogena cianobakterija *Merismopedia* sp.



Slika 5: Od leve proti desni: prvič opažen toksični dinoflagelat *Coolia monotis*, prvič identificiran (do vrste) dinoflagelat *Alexandrium insuetum* ter prvič identificirana diatomeja *Actinocyclus* sp.

4 SKLEPI

Najpomembnejši rezultat te študije je prvi popis diverzitete mikroalg, ki se pojavljajo v brakičnih in antropogeno močno spremenjenih vodnih okoljih vzdolž slovenske obale in tako predstavlja osnovo za nadaljnje raziskave diverzitete obalnih ekosistemov. Lista taksonov bo v prihodnosti služila tudi kot izhodišče za spremljanje pojavljanja tujerodnih vrst, med katerimi so lahko tudi potencialno škodljive vrste. Brakični habitati slovenskega obalnega morja so si po diverziteti mikroalg med seboj podobni. Večjo podobnost smo opazili pri Luki Koper in Stjuži, med tem ko se je Škocjanski zatok po sestavi mikroalg nekoliko bolj razlikoval od prvih dveh, kar lahko pripišemo izjemno nizki globini, zaradi česar je odstotek bentoških mikroalg v vzorcu večji.

Rezultati bodo pomembni tudi za pripravo nove presoje stanja morskega okolja po deskriptorju D2 za tujerodne vrste, kot to določa Okvirna direktiva o morski strategiji 2008/56/ES (ODMS). Rezultati bodo koristni tudi pri uresničevanju Okvirne direktive o vodah 2000/60/ES (ODV) v prihodnosti, saj je eden izmed bioloških elementov za oceno ekološkega stanja v močno preoblikovanih vodnih telesih (Luka Koper) in lagunah tudi fitoplankton oziroma njegova biomasa in vrstna sestava.

- Batelli C. & Gregorič N. (2020). First report of an aegagropilous form of *Rytiphlaea tinctoria* from the lagoon of Strunjan (Gulf of Trieste, Northern Adriatic). *Annales, Series historia naturalis* 30: 61–68.
- Carlton J. T. (1996). Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology* 77: 1653–1655.
- Dodge J. D. (1982). *Marine Dinoflagellates of the British Isles*. London, Her Majesty's Stationary Office.
- European Communities. (2000). Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* 43(L327): 75.
- Faust M. A. & Gulledge R. A. (2002). *Identifying Harmful Marine Dinoflagellates*. Washington, DC, Department of Systematic Biology – Botany.
- Fritz L. & Triemer R. E. (1985). A rapid simple technique utilizing Calcofluor White M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *Journal of Phycology* 21: 662–664.
- Gómez F. (2003). Checklist of Mediterranean free-living dinoflagellates. *Botanica Marina* 46: 215–242.
- Guiry M. D. & Guiry G. M. (2022). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org> (datum dostopa 15. 5. 2021).
- Hemaiswarya S., Raja R. & Carvalho I. S. (2013). Microalgae taxonomy and breeding. *Biofuel Crops. Production, Physiology and Genetics*: 44–53.
- Hoppenrath M., Elbrächter M. & Drebes G. (2009). *Marine Phytoplankton*. Stuttgart, Schweizerbart Science Publishers.
- Kraberg A., Baumann M. & Dürselen C. D. (2010). *Coastal Phytoplankton-Photo Guide for Northern European Seas*. Munchen, Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research.
- Krajinski Park Strunjan. <https://parkstrunjan.si> (datum dostopa: 4. 5. 2022).
- Kraus R., Ninčević-Gladan Ž., Auriemma R., Bastianini M., Bolognini L., Cabrini M., Cara M., Čalić M., Campanelli A., Cvitković I., Despalatović M., Dragičević B., Drakulović D., Dulčić J., Flander-Putrlle V., Grati F., Grego M., Grilli F., Jaklin A., Janeković I., Kolitari J., Lipej L., Magaletti E., Marini M., Matić-Skoko S., Mavrič B., Mikuš J., Mozetič P., Orlando-Bonaca M., Petović S., Precali R., Supić N., Trabucco B., Travizi A. & Žuljević A. (2019). Strategy of port baseline surveys (PBS) in the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 147: 47–58.

- Larink O. & Westheide W. (2011). Coastal Plankton-Photo Guide for European Seas. V: Wiltshire K. H. in Boersma M. (ur.). Munchen, Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research.
- Lassus P., Chomérat N., Hess P. & Nézan E. (2016). Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean: Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. Denmark, International Society for the Study of Harmful Algae in United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation.
- Lipej B., Lipej L. & Kerma S. (2020). Škocjanski zatok Nature Reserve: a case study of a protected urban wetland area and tourist attraction. V: Koderman M., Opačić V.T. (ur.). Challenges of tourism development in protected areas of Croatia and Slovenia. Koper in Zagreb, Založba Univerze na Primorskem in Hrvatsko geografsko društvo
- Lopes V. R. & Vasconcelos V. M. (2010). Planktonic and benthic cyanobacteria of European brackish waters: a perspective on estuaries and brackish seas. *European Journal of Phycology* 46(3): 292–304.
- Lundholm N., Churro C., Frag S., Hoppenrath M., Iwataki M., Larsen J., Mertens K., Moestrup Ø. & Zingone A. (Eds). (2009). onwards. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <https://www.marinespecies.org/hab> on 2022-08-18. doi:10.14284/362 (datum dostopa: 17. 5. 2021).
- Malone T. C., Malej A. & Faganeli J. (2021). Introduction: Coastal Ecosystem Services at Risk. V: MALONE, T. C., MALEJ, A., FAGANELI, Jadran (ed.). Coastal ecosystems in transition: a comparative analysis of the northern Adriatic and Chesapeake Bay. 1st ed. American Geophysical Union: Wiley, 2021. Str. 1-6.
- Mavrič B., Orlando-Bonaca M., Fortič A., Francé J., Mozetič P., Slavinec P., Pitacco V., Trkov D., Vascotto I., Zamuda L. & Lipej L. (2021). Spremljanje vrstne pestrosti in abundance tujerodnih vrst v slovenskem morju. Piran, Nacionalni Inštitut za Biologijo - Morska Biološka Postaja.
- McDermott G. & Raine R. (2006). The Dinoflagellate Genus *Ceratium* in Irish Shelf Seas. Galway, The Martin Ryan Institute.
- McLusky D. S. & Elliott M. (2007). Transitional waters: A new approach, semantics or just muddying the waters?. *Estuarine, coastal and shelf science* 71: 359-363.
- Miller C. B. (2004). Biological oceanography. Oxford, Blackwell Publishing.
- Mozetič B., Lipej B. & Šalaja N. (2010). Zeleno srce Kopra – vodnik po Naravnem rezervatu Škocjanski zatok. Ljubljana, Društvo za opazovanje in proučevanje ptic Slovenije.
- Mozetič P., Fonda-Umani S., Cataletto B. & Malej A. (1998). Seasonal and inter-annual plankton variability in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *ICES Journal of Marine*

Science 55: 711–722.

- Mozetič P., Cangini M., Francé J., Bastianini M., Aubry F.B., Bužančić M., Cabrini M., Cerino F., Čalić M., D'Adamo R., Drakulović D., Finotto S., Fornasaro D., Grilli F., Kraus R., Kužat N., Marić Pfannkuchen D., Ninčević Gladan Ž., Pompeii M., Rotter A., Servadei I. & Skejić S. (2019). Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. *Marine Pollution Bulletin* 147: 117–132.
- Pompei M., Pigozzi S. & Cangini M. (2003a). Marine Dinoflagellates. Material of UNEP training course, Cesenatico, 9-13 June 2003. Italy, Centro Ricerche Marine - Laboratorio Fitoplankton.
- Pompei M., Pigozzi S. & Cangini M. (2003b). Marine Diatoms. Material of UNEP training course, Cesenatico, 9-13 June 2003. Italy, Centro Ricerche Marine - Laboratorio Fitoplankton.
- Povezanost pristanišča. <https://luka-kp.si/slo/povezanost-pristanisca> (datum dostopa: 17. 5. 2021).
- Pyšek P., Hulme P. E. & Nentwig W. (2009). Glossary of the main technical terms used in the handbook. Daisie (ur). *Handbook of Alien Species in Europe. Invasing Nature - Springer Series in Invasion Ecology* 3: 375–379.
- Reynolds C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton*. New York, Cambridge University Press.
- Round F.E. (1971). Benthic marine diatoms. *Oceanography and marine biology: an annual review* 9: 83–139.
- Salmaso N., Naselli-Flores L. & Padisák J. (2015). Functional classifications and their application in phytoplankton ecology. *Freshwater Biology* 60: 603–619.
- Šajna N. & Kaligarič M. (2005). Vegetation of the Stjuža coastal lagoon in Strunjan landscape park (Slovenia): A draft history, mapping and nature-conservancy evaluation. *Annales* 15: 79–90.
- Šalaja N. & Mozetič B. (2005). Škocjanski zatok – oaza na pragu Kopra. *Svet ptic* 10(4): 188–21.
- Tomas C. R. (1996). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. San Diego CA, Academic Press.
- Trobajo R. & Mann D. G. (2019). A rapid cleaning method for diatoms. *Diatom Research* 34(2): 115–124.
- Turk Dermastia T., Cerino F., Stanković D., Francé J., Ramšak A., Tušek-Žnidarič M., Beran

- A., Natali V., Cabrini M. & Mozetič P. (2020). Ecological time series and integrative taxonomy unveil seasonality and diversity of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae* 93(9): 1–20.
- Twrdy E. & Hämmäläinen E. (2017). A green port – Case study of Port of Koper. Conference paper.
- Učakar T. (2009). Geografija naravnega rezervata Škocjanski zatok. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani.
- Viličić D. (2002). Fitoplankton Jadranskoga Mora – biologija i taksonomija. Zagreb, Školska Knjiga.
- WFD CIS. (2003). Transitional and Coastal Waters, Typology, Reference Conditions and Classification Systems. Published by the Directorate General Environment of the European Commission, Brussels. Guidance Document No. 5.
- WoRMS Editorial Board. (2022). World Register of Marine Species. <https://www.marinespecies.org> (datum dostopa: 15.5.2021).

Vpliv direktne in indirektne plazemske obdelave na kalivost semen navadne ajde in hidrofobne lastnosti perikarpa

Pia STARIČ^{1,2,*}, Ita JUNKAR², Katarina VOGEL-MIKUŠ^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

* pia.staric@ijs.si

Vpliv direktne in indirektne plazemske obdelave na kalivost semen navadne ajde in hidrofobne lastnosti perikarpa

Izveček: Uporaba plazemskih tehnologij v agronomiji pridobiva vedno večje zanimanje. Poleg vloge dekontaminacije površin (semenska lupina), se plazma lahko uporablja tudi za izboljšanje kalivosti semen. Preučevali smo, kako direktna in indirektna plazemska obdelava semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) vpliva na vsebnost vlage v semenih, hidrofobne lastnosti površine semen ter na dinamiko kalivosti. Po obdelavi s kisikovo plazmo v direktnem in indirektnem načinu pri različnih časovnih izpostavitvah, smo preverili vsebnost vlage v semenih, kontaktni kot vode ter končni delež kalivosti semen in njihovo hitrost kalitve. Rezultati nakazujejo, da direktna plazemska obdelava povzroči večje kemijske spremembe na površini, kar se kaže v povečani hidrofilnosti semenske površine. Prav tako direktna plazemska obdelava ob enaki časovni izpostavitvi semen plazmi povzroči večje znižanje kalivosti semen ter počasnejšo dinamiko kalitve v primerjavi z indirektno plazemsko obdelavo. Za obdelavo semen navadne ajde je za povečanje kalivosti semen potrebno poiskati druge pogoje plazemske obdelave, predvsem indirektno plazemsko obdelavo s krajšimi časovnimi izpostavitvami.

Ključne besede: ajda, rastline, semena, hladna plazma, kalitev, vsebnost vlage, hidrofilnost

Direct and indirect plasma treatment of common buckwheat grains affects grain hydrophilicity and germination

Abstract: The use of plasma technologies in agronomy is gaining interest. In addition to the role of surface decontamination, plasma can also be used to improve seed germination. We studied how direct and indirect plasma treatment of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench) affects the moisture content of the seeds, hydrophobic properties of the seed surface and the dynamics of germination. After treatment with oxygen plasma in direct and indirect mode at different exposure times, we checked the moisture content in the seeds, the water contact angle and the final percentage of seed germination and germination speed. The results indicate that direct plasma treatment causes greater chemical changes on the surface, which is reflected in the increased hydrophilicity of the seed surface. Likewise, direct plasma treatment with the same time exposure of seeds to plasma results in a greater decrease in seed germination and slower germination dynamics compared to indirect plasma treatment. For the treatment of common buckwheat seeds, in order to obtain increased seed germination, it is necessary to find

other plasma treatment conditions, with indirect plasma treatment with shorter time exposures being a great option to continue the research.

Key words: buckwheat; plants; grains; cold plasma; germination; moisture content; hydrophilicity

1 UVOD

Plazma je četrto agregatno stanje snovi, ki je vseskozi prisotno v naravi, npr. v ognju, v nevihtnih strelah itd. Hladna plazma (HP) je delno ioniziran plin, ki je sestavljen iz številnih atomov in molekul plina, ionov, radikalov, elektronov in številnih drugih reaktivnih zvrsti. Med drugim so v plazmi prisotni tudi fotoni ultravijolične (UV) in vidne svetlobe, pojavi pa se lahko tudi naraščanje temperature. Razlikujemo dva načina plazemske obdelave, ki se delita na direktno in indirektno plazemsko obdelavo. Pri direktni plazemski obdelavi so prisotne predvsem sledeče plazemske komponente: elektroni, pozitivno nabiti ioni, kratko in dolgo živeči radikali, povišana temperatura ter ultravijolično (UV) in vakuumsko ultravijolično (VUV) sevanje. V indirektnem načinu pa so prisotne le dolgo živeče, manj agresivne in močne kemijske zvrsti. Posledično je indirektna plazemska obdelava šibkejša, kar zahteva daljše obdelovalne čase za doseg podobnih rezultatov kot z direktno plazemsko obdelavo (Han in sod., 2016; Starič in sod., 2020; Tendero in sod., 2006).

V kmetijstvu se HP lahko uporablja za dekontaminacijo semenskega materiala, kar lahko potencialno zmanjša obolelost rastlin na polju ter hkrati omogoči zmanjšanje uporabe pesticidov, ki močno obremenjujejo okolje. Drugi namen uporabe HP pa je izboljšanje kalivosti semen ter izboljšanje rasti in razvoja rastlin (Kyzek in sod., 2019; Starič in sod., 2020; A. Zahoranová in sod., 2016). HP je površinska tehnika, saj spreminja predvsem kemijsko sestavo površine semena. Ta postane bolj hidrofilna in zato olajša prehod vode skozi trdo in težko prepustno semensko lupino (Bormashenko in sod., 2012). Številni znanstveniki predvidevajo, da to omogoči hitrejšo in boljšo kalitev semen, vendar mnogi rezultati nakazujejo, da to ni edni mehanizem vpliva HP na semena (Bermúdez-Aguirre, 2019). V večini raziskav je obdelava semen s HP povečala kalivost (Dobrin in sod., 2015; Henselová in sod., 2012; Zahoranová in sod., 2018), obstajajo pa tudi nasprotujoči si rezultati, kjer so druge raziskovalne skupine poročale o slabši kalitvi semen (A. Zahoranová in sod., 2016; Zhang in sod., 2017). Podatki niso enotni, saj raziskovalci uporabljajo različne plazemske naprave, plazemske parametre, uporabljen plin ter tudi različne rastlinske vrste.

V sledečem prispevku smo želeli oceniti, ali direktna in indirektna plazemska obdelava različno vplivata na vsebnost vlage, kontaktni kot vode in dinamiko kalitve semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench).

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Semenski material

V raziskavi smo uporabili semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), sorte Trdinova iz leta 2020 (Mlinarstvo in trgovina Rangus d.o.o.).

2.2 Plazemska obdelava semen

Obdelavo semen s HP smo izvedli v posebej izdelanem plazemskem sistemu. Na posamezno kombinacijo plazemskih parametrov smo obdelali po 100 semen navadne ajde. Semena so bila izpostavljena kisikovi radio-frekvenčni (RF) HP, ki se je tvorila znotraj kvarčne cevi z zožitvijo. Cev z zožitvijo omogoča obdelavo semen v dveh načinih; direktna obdelava (*ang.* glow) ali indirektna obdelava (*ang.* afterglow). Tlak v plazmi je bil 50 Pa, vhodna moč plazme pa 200 W. Semena smo obdelali s HP v različnih časovnih izpostavitvah: v direktni izpostavitvi za 5, 10 in 30 s, v indirektni izpostavitvi pa za 10, 30 in 60 s. V poskus smo vključili tudi kontrolne neobdelane vzorce in neobdelani vakuumski kontroli, pri čemer smo semena izpostavili nizkemu tlaku (50 Pa) in enakemu pretoku plina (kisika ali dušika) kot med plazemsko obdelavo.

2.3 Meritve vsebnosti vlage v semenih

Po obdelavi semen s HP smo izmerili vsebnost vlage v semenih tako, da smo po 20 semen prestavili v steklene petrijevke (za vsako obdelavo tri ponovitve), jih stehali (sveža masa) ter jih 24 ur sušili na 105 °C. Po sušenju smo jih ponovno stehali in izračunali vsebnost vlage po sledeči enačbi (Los in sod., 2019):

$$MC = ((W_i - W_f) * 100 \%) / W_i$$

Pri čemer W_f predstavlja končno, suho maso, W_i pa predstavlja začetno (svežo) maso 20 semen.

2.4 Kontaktni kot vode na površini semen

Kontaktni kot vode na površini semen smo izmerili 2 h po plazemski obdelavi. Naključno smo izbrali 10 semen za vsako plazemsko obdelavo in kontrolo. Kontaktni kot 1 µl kapljice MiliQ vode smo izmerili z analizatorjem kapljic »Drop Shape Analyzer DSA 100E« (KRÜSS GmbH, Hamburg, Nemčija)

2.5 Kalitveni test

Za vsako plazemsko obdelavo in kontrolo smo pripravili po 4 petrijevke z dvema slojema filtrirnega papirja. V vsako petrijevko smo dali po 50 semen; skupaj torej 200 semen na plazemsko obdelavo ter omočili filtrirni papir s 3,5 ml destilirane vode. Semena smo inkubirali v temi pri nočni temperaturi 19 °C in dnevni temperaturi 21 °C. Število kalečih semen smo

prešteli po 1, 2, 3 in 7 dneh. Kriterij, da je seme vzkalilo, je bil prodor radikule v dolžini vsaj 1 mm iz semenske lupine. Delež kalečih semen (K) smo izračunali po sledeči formuli:

$$K (\%) = \frac{\text{število kalečih semen 7. dan}}{\text{število vseh semen}} \times 100$$

Izračunali smo tudi hitrost kalitve (MR) s sledečo formulo (Ranal in sod., 2009):

$$MR = \frac{1}{\frac{\sum N_d \times d}{N_g}}$$

Kjer je N_d predstavlja število kaljenih semen na dan d , in d predstavlja čas (v dnevih) od začetka eksperimenta. N_g predstavlja celokupno število kalečih semen v Petrijevki.

2.6 Statistična analiza

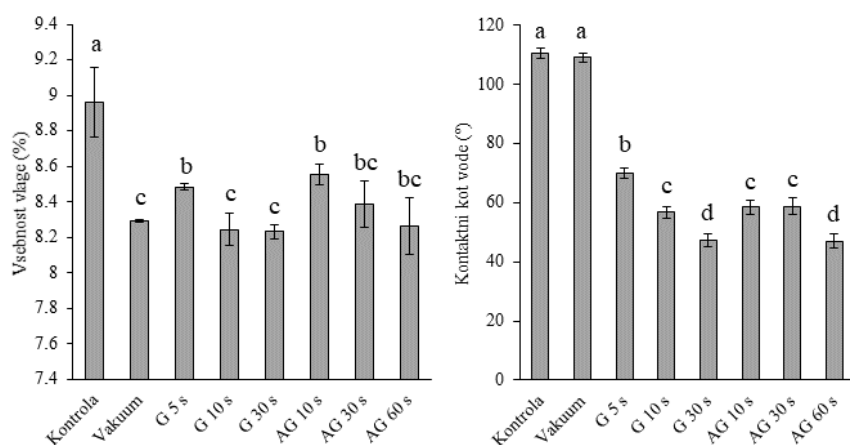
Podatke smo statistično obdelali s pomočjo programa Microsoft Excel in Excelove razširitve XLStat (Lumivero). Statistično značilne razlike med vzorci smo ocenili z uporabo enosmerne analize variance (ANOVA) in post hoc Holm-Sidak testom. Razlike so bile ovrednotene kot statistično značilne za $p < 0,05$. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina s $\pm$ standardno napako dveh ponovitev ($N=3$).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Po obdelavi semen s HP smo želeli preveriti, ali so prisotne kemijske spremembe na površini semen. Kemijske spremembe po plazemski obdelavi vplivajo na prvotno hidrofoben značaj semen, kot je bilo opisano že v številnih raziskavah na semenih pšenice, ječmena, graha in drugih (Bormashenko in sod., 2015; Los in sod., 2018; Starič in sod., 2022). Po plazemski obdelavi površina semen postane bolj hidrofilna. Z meritvami kontaktnega kota to lahko opazimo z zmanjšanjem kontaktnega kota vodnih kapljic (Slika 1b). Izpostavitvev semen nizkemu tlaku (vakuumu) ne vpliva na kontaktni kot vode površine semen. Vendar tudi najkrajša plazemska obdelava povzroči takojšnje znižanje kontaktnega kota vode. Z daljšanjem časa direktne obdelave (G) s HP, se kontaktni kot vode močno zmanjša. Najnižji kontaktni kot je opaziti po direktni obdelavi 30 s (G 30 s). Indirektna obdelava (AG) semen s HP prav tako povzroči padec kontaktnega kota vode. Če primerjamo enako časovno izpostavitvev HP v direktnem in indirektnem načinu, na primer vzorca G 30 s in AG 30 s, lahko opazimo, da je kontaktni kot vode pri indirektni obdelavi (AG 30 s) višji kot pri direktni HP obdelavi. Direktna plazemska obdelava vsebuje močno reaktivne, kratkožive in dolgožive reaktivne kisikove spojine, ki bombardirajo površino semena in vplivajo na njeno kemijsko strukturo. Še posebno pri kisikovi HP najbolj intenzivno prihaja do oksidacije lipidov, ki so prisotni v kutikuli semen

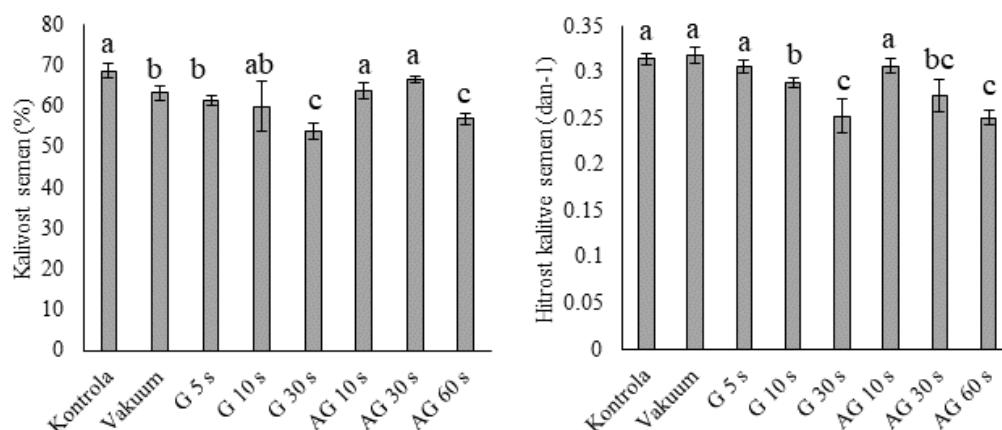
in omogočajo hidroforen značaj semenske površine. Z oksidacijo teh lipidov postane površina bolj hidrofilna. Indirektna HP ne vsebuje dolgoživih reaktivnih kisikovih zvrsti, zato so kemijske spremembe s strani HP manj intenzivne. To se opazi tudi v manjšem znižanju kontaktnega kota vode semenske površine v primerjavi z direktno HP obdelavo (Starič in sod., 2022).

Pogoji nizkega tlaka v cevi, kjer se tvori HP vplivajo na vsebnost vlage v semenih (Slika 1a). Že izpostavitve semen nizkemu tlaku brez plazemske obdelave povzroči statistično značilno znižanje vlage v semenih, kar lahko negativno vpliva na njihovo viabilnost in dolgoročno skladiščenje semen. Večjih razlik med plazemskimi obdelavami ni. Kljub temu pa se pri indirektnih obdelavah s HP opazi trend postopnega zniževanja vlage v semenih z daljšanjem plazemske obdelave.



Slika 1: (a) vsebnost vlage v semenih navadne ajde ter (b) kontaktni kot vode na površini semen, ki so bila obdelana v direktni (G) plazemski obdelavi za 5, 10 in 30 s ali indirektni (AG) plazemski obdelavi za 10, 30 in 60 s. Kontrolna semena niso bila obdelana, Vakuumska kontrola so semena, ki so bila izpostavljena nizkemu tlaku znotraj cevi za tvorbo plazme. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka. Različne črke (a-d) predstavljajo statistično značilne razlike ($p > 0,05$).

S plazemsko obdelavo smo želeli preveriti, ali lahko vplivamo na izboljšanje kalivosti semen navadne ajde, saj nekatere raziskave poročajo o boljši kalivosti po plazemski obdelavi (Bafail in sod., 2019; Ling in sod., 2015; Rahman in sod., 2018; Sadhu in sod., 2017). Izpostavitve semen vakuumu je v manjši meri znižala kalivost semen. Daljša direktna (G 30 s) in indirektna (AG 60 s) plazemska obdelava je precej znižala končen delež kalivosti semen (Slika 2a) v primerjavi s kontrolo. Če primerjamo 30 s direktno (G 30 s) in indirektno (AG 30 s) plazemsko obdelavo semen lahko opazimo da G 30 s bolj vpliva na slabšo kalivost semen v primerjavi z AG 30 s. To je lahko posledica večje izpostavljenosti semen močnim reaktivnim kisikovim zvrstem v direktnem načinu plazemske obdelave ter potencialno zvišanje temperature znotraj reaktorja med obdelavo (Bermúdez-Aguirre, 2019; Starič in sod., 2022).



Slika 2: (a) Končna kalivost semen navadne ajde ter (b) hitrost kalitve semen, ki so bila obdelana v direktni (G) plazemski obdelavi za 5, 10 in 30 s ali indirektni (AG) plazemski obdelavi za 10, 30 in 60 s. Kontrolna semena niso bila obdelana, Vakuumska kontrola so semena, ki so bila izpostavljena nizkemu tlaku znotraj cevi za tvorbo plazme. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka. Različne črke (a-c) predstavljajo statistično značilne razlike ($p > 0,05$).

Poleg končnega deleža kalečih semen je pomemben podatek tudi ali HP vpliva na dinamiko kalitve semen. Zakasnjena ali hitrejša kalitev je tudi pomemben in preprost indikator vpliva plazemske obdelave na metabolizem semen. Katere komponente vplivajo na katere signalne poti semen pa še ni raziskano. Opaziti je da 10 in 30 s direktna obdelava s HP vpliva na zakasnitev v kalitvi semen, najbolj pa je to izrazito pri najdaljši direktni plazemski obdelavi (G 30 s) in indirektni plazemski obdelavi (AG 60 s). Med G 30 s in AG 60 s ni opaziti razlik v hitrosti kalitve, niti v končnem deležu kalečih semen. Zato lahko predvidevamo, da na kalitvene parametre ne vplivajo kratko živeče močne kisikove zvrsti prisotne v direktnem načinu obdelave. Torej na kalitvene parametre lahko vplivajo druge komponente HP, ki so skupne tako direktnemu kot indirektnemu plazemskemu načinu. Eden izmed teh dejavnikov bi lahko bile tudi šibkejšje dolgo živeče kisikove zvrsti.

4 SKLEPI

Plazemska obdelava semen navadne ajde vpliva na hidrofobne lastnosti površine semen, kar vpliva na privzem vode v semena in na kalivost. Direktna plazemska obdelava je močnejša in v krajšem času povzroči večje kemijske spremembe na površini semen v primerjavi z indirektno plazemsko obdelavo. Daljše plazemske obdelave (tako direktna kot indirektna) vplivajo na zmanjšan delež kalečih semen in upočasnijo kalitev semen navadne ajde. Uporabljeni pogoji plazemske obdelave semen navadne ajde so negativno vplivali na kalivost semen, kar nakazuje da niso bili uporabljeni ustrezni pogoji za to rastlinsko vrsto. V prihodnosti je potrebna dodatna optimizacija plazemske obdelave, kjer je potrebno poiskati pogoje, ki bi morda pozitivno vplivali na semena in povzročili izboljššan končni delež kalečih semen. S tem bi povečali izkoristek pridelka za naslednjo setev in prispevali k razvoju agronomskih tehnologij za izboljšanje kalivosti semen z uporabo okolju prijaznih tehnologij in brez dodajanja kemikalij, ki negativno vplivajo na ekosistem.

- Bafoil M., Le Ru A., Merbahi N., Eichwald O., Dunand C. in Yousfi M. 2019. New insights of low-temperature plasma effects on germination of three genotypes of *Arabidopsis thaliana* seeds under osmotic and saline stresses *Scientific Reports*, 9,1: 1–10.
- Bermúdez-Aguirre D. 2019. Advances in cold plasma applications for food safety and preservation (D. Bermudez-Aguirre, Ur.) (1. izd.). United States, Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
- Bormashenko E., Grynyov R., Bormashenko Y. in Drori E. 2012. Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds *Scientific Reports*, 2: 3–10.
- Bormashenko E., Shapira Y., Grynyov R., Whyman G., Bormashenko Y. in Drori E. 2015. Interaction of cold radiofrequency plasma with seeds of beans (*Phaseolus vulgaris*) *Journal of Experimental Botany*, 66,13: 4013–4021.
- Dobrin D., Magureanu M., Mandache N. B. in Ionita M. D. 2015. The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29: 255–260.
- Han L., Patil S., Boehm D., Milosavljević V., Cullen P. J. in Bourke P. 2016. Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* *Applied and Environmental Microbiology*, 82,2: 450–458.
- Henselová M., Slováková Ľ., Martinka M. in Zahoranová A. 2012. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma *Biologia*, 67,3: 490–497.
- Kyzek S., Holubová Ľ., Medvecká V., Tomeková J., Gálová E. in Zahoranová A. 2019. Cold Atmospheric Pressure Plasma Can Induce Adaptive Response in Pea Seeds *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 39,2: 475–486.
- Ling L., Jiangang L., Minchong S., Chunlei Z. in Yuanhua D. 2015. Cold plasma treatment enhances oilseed rape seed germination under drought stress *Scientific Reports*, 5: 1–10.
- Los A., Ziuzina D., Akkermans S., Boehm D., Cullen P. J., Van Impe J. in Bourke P. 2018. Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing *Food Research International*, 106: 509–521.
- Rahman M. M., Sajib S. A., Rahi M. S., Tahura S., Roy N. C., Parvez S., ... Kabir A. H. 2018. Mechanisms and Signaling Associated with LPDBD Plasma Mediated Growth Improvement in Wheat *Scientific Reports*, 8,1: 1–11.
- Ranal M. A., de Santana D. G., Ferreira W. R. in Mendes-Rodrigues C. 2009. Calculating

- germination measurements and organizing spreadsheets *Revista Brasileira de Botanica*, 32,4: 849–855.
- Sadhu S., Thirumdas R., Deshmukh R. R. in Annapure U. S. 2017. Influence of cold plasma on the enzymatic activity in germinating mung beans (*Vigna radiata*) *LWT - Food Science and Technology*, 78,: 97–104.
- Starič P., Mravlje J., Mozetič M., Zaplotnik R., Batič B. Š., Junkar I. in Mikuš K. V. 2022. The influence of glow and afterglow cold plasma treatment on biochemistry, morphology, and physiology of wheat seeds *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 7369, 23,13: 7369.
- Starič P., Vogel-Mikuš K., Mozetič M. in Junkar I. 2020. Effects of nonthermal plasma on morphology, genetics and physiology of seeds: A review *Plants*, 9,12: 1–18.
- Tendero C., Tixier C., Tristant P., Desmaison J. in Leprince P. 2006. Atmospheric pressure plasmas: A review *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. Elsevier.
- Zahoranová A., Henselová M., Hudecová D., Kaliňáková B., Kováčik D., Medvecká V. in Černák M. 2016. Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36,2: 397–414.
- Zahoranová Anna, Hoppanová L., Šimončicová J., Tučeková Z., Medvecká V., Hudecová D., ... Černák M. 2018. Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2018 38:5, 38,5: 969–988.
- Zhang J. J., Jo J. O., Huynh D. L., Mongre R. K., Ghosh M., Singh A. K., ... Jeong D. K. 2017. Growth-inducing effects of argon plasma on soybean sprouts via the regulation of demethylation levels of energy metabolism-related genes *Scientific Reports*, 7,: 41917.

BIOTEHNOLOGIJA

Kandidatni geni za odpornost proti mastitisu pri govedu

Zala BRAJNIK^{1,*}, Jernej OGOREVC¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Domžale, Slovenija

* zala.brajnik@bf.uni-lj.si

Kandidatni geni za odpornost proti mastitisu pri govedu

Izvleček: Mastitis predstavlja enega največjih zdravstvenih problemov v čredah prežvekovalcev, namenjenih prireji mleka, in je eden najpomembnejših dejavnikov, ki omejujejo prirejo mleka in optimalno rabo virov v sektorju. Vendar je odkrivanje kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu pri velikih rejnih živalih težavno, saj gre za kompleksno lastnost. Trenutno je edini smiseln pristop za identifikacijo kandidatnih genov pri kompleksnih lastnostih velikih rejnih živali kombiniranje različnih informacij, ki podpirajo funkcionalnost identificiranih genomskih regij v zvezi s kompleksno lastnostjo. Kandidatne gene, povezane z mastitisom in navedene v asociacijskih in ekspresijskih študijah ter študijah na mišjih modelih, smo zbrali z iskanjem po relevantni literaturi in podatkovnih zbirkah. Zbrane podatke smo integrirali v eno podatkovno zbirko, preverili morebitna prekrivanja in jih uporabili za analizo obogatitve bioloških poti. Zbranih 2448 kandidatnih lokusov je enakomerno razporejenih po kromosomih goveda.

Ključne besede: asociacijske študije; epigenetika; kandidatni geni; kvantitativni lokus; mlečna žleza; mastitis

Candidate genes for mastitis resistance in cattle

Abstract: Mastitis is one of the most detrimental health conditions in dairy ruminants and is considered the most economically important infectious disease of the dairy sector. However, mastitis resistance is a complex trait and identification of mastitis-associated alleles in livestock is difficult. Currently, the only applicable approach to identify candidate loci for complex traits in large farm animals is to combine different information that supports the functionality of the identified genomic regions with respect to a complex trait. Mastitis-associated candidate genes reported in association, expression, and mouse model studies were collected by searching the relevant literature and databases. The collected data were integrated into a single database, screened for overlaps, and used for gene set enrichment analysis. The database contains candidate genes from association and expression studies and relevant transgenic mouse models. The 2448 collected candidate loci are evenly distributed across bovine chromosomes.

Key words: association study; candidate genes; epigenetics; mammary gland; mastitis; quantitative trait loci

1 UVOD

Mastitis, vnetje mlečne žleze, je pogosto obolenje v čredah prežvekovalcev, namenjenih prireji mleka. Predstavlja enega največjih zdravstvenih problemov v čredah prežvekovalcev, namenjenih prireji mleka, in je eden najpomembnejših dejavnikov, ki omejujejo prirejo mleka in optimalno rabo virov v sektorju (Hogeveen in sod., 2011; Wojdak-Maksymiec in sod., 2012). Selekcija živali na povečanje prireje mleka in boljšo molznost je privedla do zmanjšane odpornosti živali na okužbe mlečne žleze. Poleg indirektnega učinka na prirejo (izločanje mleka obolelih in zdravljenih živali) je bilo dokazano, da imajo infekcije mlečne žleze tudi direkten vpliv na izražanje genov v mlečni žlezi, preko epigenetskih mehanizmov; npr. utišanje genov za mlečne proteine ob okužbah (Vanselow in sod., 2006). Mastitis običajno zdravimo z antibiotiki, kar pa ni vedno učinkovito in ima druge neželene posledice (Sugiyama in sod., 2022), ki bi se jim lahko izognili s povečanjem naravne odpornosti prežvekovalcev na okužbe mlečne žleze.

Odkrivanje kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu pri velikih rejnih živalih je težavno, saj gre za kompleksno lastnost. Večina gospodarsko pomembnih lastnosti, vključno z odpornostjo mlečne žleze proti patogenom, spada med kvantitativne lastnosti, ki so običajno odvisne od delovanja velikega števila genov z majhnim do zmernim učinkom in vpliva okolja. Zaradi kompleksnosti fenotipa in možnih interakcij med geni ter geni in okoljem je določitev kandidatnih/vzročnih genov pri kvantitativnih lastnostih težavna. Poleg tega se asociacijske študije in študije kvantitativnih lokusov (QTL) pri domačih živalih običajno izvajajo na nesorodnih populacijah, različna genetska ozadja pa identifikacijo kandidatnih lokusov še dodatno otežijo. V zadnjih letih so bili odkriti številni kandidatni geni in kvantitativni lokusi (QTL), povezani z odpornostjo proti mastitisu (Hu in sod., 2019). Do sedaj pa še niso bili identificirani vzročni geni, ki bi jih lahko povezali z znatno izboljšano odpornostjo proti mastitisu. Razumevanje molekularnih osnov za večjo odpornost proti mastitisu je zato pomembno za dolgoročno izboljšanje zdravja v mlečnih čredah.

Z iskanjem po literaturi in specializiranih podatkovnih zbirkah smo zbrali kandidatne gene in genomske regije, ki so bile povezane z odpornostjo proti mastitisu in podatke, zbrane s pomočjo različnih študijskih pristopov, integrirali v podatkovno zbirko kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu pri govedu (Brajnik & Ogorevc, 2023). Kandidatne gene smo, glede na število raziskav, ki jih povezujejo z mastitisom, razvrstili po prioriteti in jih bomo preverili v vzpostavljenih celičnih modelih.

2 MATERIAL IN METODE

Cilj raziskave je bil ustvariti podatkovno zbirko kandidatnih genov, povezanih z odpornostjo proti mastitisu pri govedu. Postopek zbiranja podatkov je zajemal pregled literature in specializiranih podatkovnih zbirk, kot je Animal QTLdb (Hu in sod., 2022). Lokusi, povezani z mastitisom, so bili zbrani na podlagi ključnih besed, povezanih z mastitisom: število somatskih celic, mlečna žleza, okužba, QTL, SNP, itd. V podatkovno zbirko smo vključili informacije iz asociacijskih kot tudi ekspresijskih študij, pri čemer smo se osredotočili na najpogostejše patogene, ki povzročajo mastitis, kot so *Escherichia coli* in *Staphylococcus*

aureus. Poleg tega smo v zbirko vključili tudi kandidatne lokuse povezane z mastitisom, ki so bili identificirani na mišjih transgenih modelih ali modelih z izničnimi geni.

Analiza podatkov je zajemala več korakov, s katerimi so bili identificirani najbolj obetavni kandidatni geni, povezani z mastitisom. Kot najbolj obetavni so bili določeni kandidatni geni, ki so se pojavljali v več neodvisnih študijah ali so njihove fizične pozicije sovpadale s kvantitativnimi lokusi (QTL), povezanimi z mastitisom. Lokacije QTL in kandidatnih genov smo pridobili z uporabo Cattle QTLdb (<https://www.animalgenome.org/QTLdb>) in podatkovne zbirke GenBank (Clark in sod., 2016).

Izvedli smo tudi analizo obogatitve metaboličnih poti zbranih kandidatnih genov s pomočjo programskega orodja g:Profiler (Raudvere in sod., 2019), ki je za kandidatne gene določil najbolj relevantne biološke procese, molekularne funkcije in celične komponente. Za najbolj obetavne kandidatne gene smo z uporabo baze podatkov STRING (Szklarczyk in sod., 2019) določili proteinske interakcije.

Namen analize je bil identificirati najbolj obetavne kandidatne gene, povezane z mastitisom in zagotoviti boljše razumevanje njihovih bioloških funkcij in interakcij z drugimi geni.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Odkrivanje vzročnih genov za kompleksne lastnosti pri velikih domačih živalih je zahtevno iz več razlogov. Postopki transgeneze, kot jih poznamo pri glodavcih ali nekaterih drugih modelnih organizmih (modeli z izbitimi geni, transgeni modeli), pri domačih živalih niso uveljavljeni, kar dodatno ovira funkcionalno anotacijo. Kompleksne lastnosti so odvisne od delovanja velikega števila različnih genov z majhnim do zmernim učinkom in tudi vpliva okolja. Prav zaradi možnih interakcij med geni ter geni in okoljem je določitev kandidatnih genov pri kvantitativnih lastnostih še dodatno otežena.

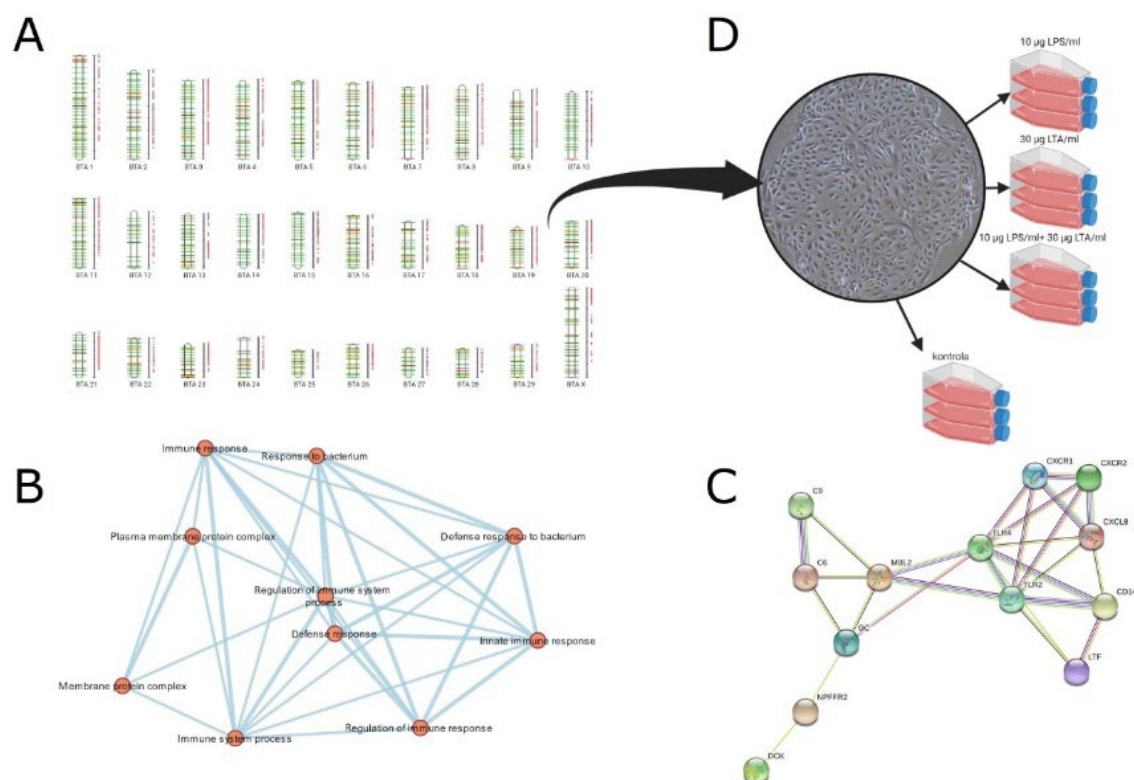
Z raziskavo smo identificirali 2448 kandidatnih genov, ki so bili z mastitisom povezani v asociacijskih študijah, študijah izražanja genov in mišjih modelih. Ti kandidatni geni so enakomerno razporejeni po vseh kromosomih goveda (Slika 1A). Ustvarili smo seznam najbolj obetavnih kandidatnih genov (Preglednica 1) na podlagi njihove povezanosti z mastitisom v neodvisnih študijah in prekrivanja s QTL. Analiza obogatitve je razkrila najbolj obogatene poti, povezane z imunskim odzivom na okužbe mlečne žleze.

Preglednica 1: Seznam najbolj obetavnih kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu.

Ime gena	Ensembl ID (<i>Bos Taurus</i>)	Asociacijske študije	Ekspresijske študije	Prekrivanje QTL
<i>BoLA-DRB3</i>	ENSBTAG000000013919	+++++	+	SCS
<i>C6</i>	ENSBTAG000000014177	+++	++	/
<i>C9</i>	ENSBTAG000000016149	++++	+	/
<i>CACNA2D1</i>	ENSBTAG000000020569	++++	++	/
<i>CARD6</i>	ENSBTAG000000014374	+++		/
<i>CD14</i>	ENSBTAG000000015032	++++	++	/
<i>CXCL8</i>	ENSBTAG000000019716	+++++ ++	+++++	CM
<i>CXCR1</i>	ENSBTAG000000026753	+++++ ++++	++++	/
<i>CXCR2</i>	ENSBTAG000000038042	+++		/
<i>DCK</i>	ENSBTAG000000012397	++++	+	/
<i>DGAT1</i>	ENSBTAG000000026356	+++++	+	/
<i>GC</i>	ENSBTAG000000013718	+++++	+	SCS
<i>LTF</i>	ENSBTAG000000001292	+++++	+++++	/
<i>MBL1</i>	ENSBTAG000000054761	+++++		/
<i>MBL2</i>	ENSBTAG000000007049	+++		/
<i>NPFFR2</i>	ENSBTAG000000009070	++++		SCS
<i>SOCS2</i>	ENSBTAG000000012007	++++	++++	/
<i>STAT5A</i>	ENSBTAG000000009496	+++++	++++	CM
<i>TLR2</i>	ENSBTAG000000008008	+++++	+++++	/
<i>TLR4</i>	ENSBTAG000000006240	+++++ +	+++++	/

Povezavo med genotipom in odpornostjo proti mastitisu (asociacijske študije) smo odkrili pri 157 kandidatnih genih. Nekateri od teh genov, vključno s *CXCL8*, *CXCR1* in *TLR4*, so bili navedeni v več neodvisnih asociacijskih študijah. Identificirali smo tudi 2300 kandidatnih genov, ki so bili diferencialno izraženi ob okužbah mlečne žleze (transkriptomske študije). Nekateri od genov, ki se jim je izražanje ob okužbah mlečne žleze spremenilo, so bili navedeni v več neodvisnih študijah, npr. *CXCL8*, *CXCR1*, *LTF* in *TLR4*.

Z analizo bioloških poti KEGG smo kandidatne gene umestili v biološke poti in jim določili njihove biološke funkcije. Analiza obogatitve je razkrila najbolj obogatene poti, povezane z aktivacijo imunskega odziva pri mastitisu (Slika 1B). Najdeni kandidatni geni in obogatene poti, povezane z imunskim odzivom lahko pomagajo pri razvoju intervencij in selekciji za izboljšanje odpornosti proti mastitisu pri govedu. Izbrane kandidatne gene, ki so bili identificirani kot najbolj obetavni, bomo dodatno preučili v epitelnih celičnih modelih mlečne žleze, ki smo jih vzpostavili iz kravjega mleka.



Slika 1: Rezultati analize kandidatnih genov. A) Razporeditev kandidatnih genov po kromosomih goveda. QTL (desno) smo pridobili iz podatkovne zbirke CattleQTLdb. Kandidatni geni, vpleteni v imunski odziv na okužbo z *E. coli*, so označeni z zeleno barvo, tisti, vpleteni v okužbo z *S. aureus*, so označeni z oranžno barvo, rdeča barva pa označuje kandidatne gene, povezane z drugimi patogeni. B) Analiza obogatitve metaboličnih poti. C) Protein-protein interakcije 20 najbolj obetavnih kandidatnih genov, kot jih predlaga baza podatkov STRING. D) Glede na prednostni seznam, ki smo ga določili, bomo kandidatne gene dodatno preučili na celičnih modelih – njihovo odzivnost bomo preučili s stimulacijo z virulentnimi dejavniki.

Z raziskavo smo ustvarili podatkovno zbirko, ki vsebuje podatke o genetskem ozadju odpornosti krav proti okužbam mlečne žleze in je uporabna za določitev ortologov pri drugih vrstah prežvekovalcev. Glavni izziv določitve kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu je kompleksnost lastnosti in heterogenost raziskav, ki uporabljajo različne tehnologije, eksperimentalne pristope in patogene oziroma virulentne dejavnike za imunostimulacijo, zaradi česar se rezultati študij pogosto razlikujejo.

Integracija zbranih kandidatnih genov iz različnih virov v eno podatkovno zbirko, ki se prekriva z znanimi kvantitativnimi lokusi (QTL), omogoča prepoznavanje potencialno pomembnih genomskega regij za odpornost proti mastitisu. Kandidatni geni, ki so bili identificirani kot najbolj obetavni, so večinoma vključeni v aktivacijo imunskega odziva, kar je razvidno iz analize obogatitve poti in analize proteinskih mrež (Slika 1C), poleg tega pa se ujemajo z nekaterimi meta-analizami drugih avtorjev (npr. Tribout in sod. 2020), kar potrjuje smiselnost pristopa.

4 SKLEPI

Podatkovna zbirka vsebuje 2448 kandidatnih genov, ki so povezani z odpornostjo proti mastitisu pri govedu. Kandidatni geni so enakomerno razporejeni po kromosomih goveda, kar kaže na kompleksnost lastnosti. Podatkovna zbirka predstavlja celovit vir informacij genetskega ozadja odpornosti proti mastitisu. Glede na prednostni seznam, ki smo ga določili, bomo kandidatne gene dodatno preučili na celičnih modelih (Slika 1D). Takšne študije bi lahko privedle do potrditve kandidatnih genov in identifikacije t. i. kvantitativnih nukleotidov (QTN), ki bi bili uporabni za namene selekcije ali bi predstavljali potencialna tarčna mesta za modifikacije s pomočjo tehnologij preurejanja genoma.

5 VIRI

Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1):16–23.

Wojdak-Maksymiec, K., Kmiec, M., Ziemak, J. (2012). Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinary Medicine*, 51(1): 14–20.

Vanselow, J., Yang, W., Herrmann, J., Zerbe, H., Schuberth, H.J., Petzl, W., in sod. (2016). DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 37(3):463–77.

Sugiyama, M., Watanabe, M., Sonobe, T., Kibe, R., Koyama, S., Kataoka, Y. (2022). Efficacy of antimicrobial therapy for bovine acute *Klebsiella pneumoniae* mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 84(7):1023–8.

Hu Z. L., Park C. A., Reecy J. M. (2019). Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Resources*, 47(D1):701–710.

Brajnik, Z., & Ogorevc, J. (2023). Candidate genes for mastitis resistance in dairy cattle: a data integration approach. *Journal of animal science and biotechnology*, 14(1), 10.

Hu, ZL., Park, CA., Reecy, JM. (2022). Bringing the animal QTLdb and CorrDB into the future: meeting new challenges and providing updated services. *Nucleic Acids Research*, 50(D1):D956–61.

CattleQTLdb. <https://www.animalgenome.org/QTLdb>. (15. september 2021)

Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67–D72.

Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., et al. (2019).

G:profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, 47(W1):W191–8.

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., et al. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D607–13.

van den Berg, I., Xiang, R., Jenko, J., Pausch, H., Boussaha, M., Schrooten, C., Tribout, T., Gjuvsland, A.B., Boichard, D., Nordbø, Ø., Sanchez, M.P., & Goddard, M.E. (2020). Meta-analysis for milk fat and protein percentage using imputed sequence variant genotypes in 94,321 cattle from eight cattle breeds. *Genetics, selection, evolution : GSE*, 52(1), 37.

Genetska raznolikost slovenskih genotipov hruške (*Pyrus communis* L.)

Kristina GOSTINČAR^{1*}, Zlata LUTHAR¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

* kristina.gostincar@bf.uni-lj.si

Genetska raznolikost slovenskih genotipov hruške (*Pyrus communis* L.)

Izveček: V zmernem podnebnem pasu je ena izmed pomembnejših sadnih vrst z zelo dolgo tradicijo pridelovanja hruška (*Pyrus* spp.). Najpomembnejše vrste, ki se pridelujejo na tem območju so *P. communis*, *P. syriaca*, v slovenskem prostoru pa sta prisotni še vrsti *P. nivalis* in *P. pyraster*. Kljub veliki pestrosti sort, pa tržna pridelava temelji le na nekaj sortah, medtem ko so tradicionalne, lokalne sorte iz sortnega nabora izpadle. Prišlo je do bojazni, da bodo slednje izumrle, zato so se oblikovali različni nacionalni programi z namenom zbiranja, hranjenja in opisovanja lokalnih sort v sklopu genskih bank. S setom 14 mikrosatelitnih (SSR) markerjev je bilo na molekulskem nivoju analiziranih 53 akcesij, ki so posajene do 5 primerkov na akcesijo, skupno 176 dreves in so del slovenske genske banke. Vsi SSR markerji so bili polimorfni s povprečjem 12,3 alelov na lokus in povprečno dejansko heterozigotnostjo 0,693, ki je bila nekoliko nižja od pričakovane heterozigotnosti (0,7915). V kolekcijskem nasadu je bilo odkritih kar 10 skupin sinonimov in 7 homonimov med analiziranimi genotipi hruške. Rezultati analize bodo prispevali k lažjemu in varnejšemu opravljanju z genskimi viri ter bodo osnova za oblikovanje osnovne slovenske zbirke.

Ključne besede: genetska raznolikost; genski viri; hruška; *Pyrus communis*

Genetic diversity of Slovenian pear (*Pyrus communis* L.) genotypes

Abstract: In temperate climates, one of the most important fruit species with a very long tradition of cultivation is the pear (*Pyrus* spp.). The most important species cultivated in this area are *P. communis*, *P. syriaca* and, in Slovenia, *P. nivalis* and *P. pyraster* are also present. Despite the great diversity of varieties, commercial production is based on only a few varieties, while traditional, local varieties have fallen out of the growing list. There were fears that the latter would become extinct, and various national programmes were set up to collect, preserve and describe local varieties as part of genebanks. Using a set of 14 microsatellite (SSR) markers, 53 accessions, planted up to 5 trees per accession, a total of 176 trees, were analysed at the molecular level. The analysed trees are part of the Slovenian genebank. All SSR markers were polymorphic with an average of 12.3 alleles per locus and the average true heterozygosity (0.693) was slightly lower than expected (0.7915). In the collection plantation, 10 groups of synonyms and 7 homonyms were detected among the analysed pear genotypes. The results of the analysis will contribute to easier and safer handling of genetic resources and will form the basis for the creation of a core Slovenian collection.

Key words: genetic diversity; germplasm; pear; *Pyrus communis*

Hruška (*Pyrus* spp.) je ena izmed starejših in bolj razširjenih sadnih rastlin v zmernem podnebnem pasu. Rod *Pyrus* je v osnovi razdeljen na Evropske in Azijske hruške. Evropska skupina hrušk vključuje več vrst, večinoma so gojene *P. communis*, ki so prisotne na območju Evrope, Severne in Južne Amerike in Afrike, v mediteranskem območju pa je prisotna še divja vrsta *P. syriaca* (MirAli in sod., 2007; Yamamoto in Chevreau, 2009). V slovenskem prostoru sta bili potrjeni še dve vrsti, in sicer *P. nivalis* in *P. pyraster*, ki so jih v preteklosti gojili z namenom predelave v alkoholne pijače in sokove (Šisko in sod., 2009). Danes te vrste nimajo večjega ekonomskega pomena, vendar zaradi prilagojenosti na obstoječe ekološke razmere in tolerance oz. rezistence na določene bolezni in škodljivce predstavljajo pomembne vir genov za žlahtnjenje novih sort.

Pridelava hruške, kjer je prisotna tudi medvrstna pestrost, v Evropi temelji na vrsti *P. communis* in le nekaj sortah: 'Konferans', 'Viljamovka', 'Abate fetel' (Dondini in Sansavini, 2012; WAPA, 2023). Poleg omejenega števila sort za pridelavo so se žlahtniteljski programi omejili le na nekaj genskih virov, ki temeljijo na organoleptičnih lastnostih, estetskih standardih in odpornosti na bolezni (Noiton in Alspach, 1996). Omenjeni dejavniki, ki so trenutno vključeni in prevladujejo v tržni pridelavi, so privedli do visoke stopnje izenačenosti sortnega izbora komercialnih sadovnjakov in izključitvi tradicionalnih ter dobro prilagojenih lokalnih sort, kar je prispevalo k zmanjšanju genetske raznolikosti hrušk (Hammer in sod., 2003). Introdukcija evropskih in ameriških sort je dodatno prispevala k zmanjšanju pridelave lokalnih sort (Mars in sod., 1994).

V zadnjih nekaj desetletjih je prišlo do grožnje, da bodo te sorte izumrle. Vendar pa je zavedanje o pomembnosti teh genskih virov privedlo do njihovega zbiranja, hranjenja in opisovanja v sklopu genskih bank (Urrestarazu in sod., 2012). Oblikovali so se programi genskih bank, kjer so na nacionalnem nivoju nastajali koleksijski nasadi, ki so vključevali gojene stare sorte, sorte tradicionalne za neko regijo, sorte, ki po izvoru prihajajo iz drugega geografskega območja, vendar so na določenem območju že več desetletij pridelujejo ter divji sorodniki, če so značilni za določeno nacionalno območje (Urrestarazu in sod., 2016). Organizirano in sistematično hranjenje genskih virov pomembno prispeva k ohranjanju določenih vrst in sort ter njihove pestrosti. Preučevanje genskih virov je pomembno za razvoj in uporabo le teh pri pridobivanju novih sort, prilagojenih na globalne spremembe (Zeigler, 2013).

V tej raziskavi smo želeli z uporabo seta mikrosatelitnih (SSR) markerjev opisati na molekularnem nivoju genetsko raznolikost akcesij hruške vključenih v koleksijski nasad genske banke, ki se v okviru Javne službe nalog rastlinske genske banke Biotehniške fakultete nahaja v Kartuzijanskem samostanu Pleterje.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material in izolacija DNA

V genotipizacijo je bilo vključenih 53 akcesij hrušk, ki so posajene do 5 primerkov na akcesijo, skupno 176 dreves, ki so del genske banke v Kartuzijanskem samostanu Pleterje. Za analize je bila iz mladih listov hrušk izolirana DNA po metodi CTAB (Kump in Javornik, 1996), dodatno pa so bili vzorci tretirani z RNazo z namenom zmanjšanja neželenih vplivov RNA pri nadaljnjih analizah. Kvantifikacija DNA vzorcev je bila določena z uporabo fluorometra DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, Chicago, ZDA).

2.2 PCR reakcija in SSR analiza

Genomska DNA je bila analizirana s setom 14 SSR markerjev: CH03g07, CH05c06, GD142, CH01d08, CH01d09, CH03d12, CH-Vf1, CH02b10, CH02c11, EMPc11, EMPc117, CH04e03 in GD147 (Bielsa in sod., 2021). Markerji so priporočeni v sklopu Evropskega kooperativnega programa za rastlinske genske vire (ECPGR) v sklopu delovne skupine za *Malus/Pyrus* (Evans in sod., 2009). Izvedene so bile tri multipleks reakcije, kjer so bili vodilni začetni oligonukleotidi na 5' koncu označeni s fluorescentnimi barvami 6-FAM, VIC, NED ali PET. Vse PCR reakcije so potekale v napravi MiniAmp Thermal Cycler (Qiagen, Holden, Nemčija) s končnim volumnom reakcije 10 µL in 10 ng DNA, 0,2, 0,4 ali 0,6 µM vsakega začetnega oligonukleotida in 1x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Holden, Nemčija). PCR temperaturni profil je zajemal 15 min začetne denaturacije pri 95 °C, sledilo je 10 ciklov PCR s padajočo temperaturo pri 95 °C za 30 s, 65-1 °C/cikel za 60 s in 72 °C za 60 s, sledilo je 30 ciklov pri 95 °C za 30 s, 55 °C za 60 s, 72 °C za 60 s in končno izdolževanje na 72 °C za 7 min kot navajajo avtorji Pina in sod. (2014). DNA amplifikacijski produkti so bili preverjeni na agarozni gelski elektroforezi in nato ločeni s kapilarno elektroforezo ABI 3130XL (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, ZDA), velikosti SSR pomnoženih fragmentov so bile določene s pomočjo programa GeneMapper 5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Analiza genetske sorodnosti je bila narejena s primerjalno analizo v programu Cervus (Kalinowski in sod., 2007). Redundantni genotipi (genetsko enake ponovitve znotraj akcesij) so bili odstranjeni iz nadaljnjih analiz. Osnovne statistične analize genotipov so bile narejene s programom Cervus in Darwin (Perrier in Jacquemoud-Collet, 2006).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

V tej študiji je bilo prvič s setom 14 SSR markerjev analiziranih 176 dreves od 53 akcesij hrušk, ki so del kolekcijskega nasada genske banke v Kartuzijanskem samostanu Pleterje. Parna primerjava vseh SSR lokusov je pokazala 123 redundantnih akcesij (70 % redundanca), ki so bile izločene iz nadaljnjih analiz. Velik delež redundance je posledica vključitve do 5 dreves na posamezno akcesijo z namenom potrjevanja istih genotipov v kolekcijskem nasadu. Vsi mikrosatelitni markerji so pomnožili fragmente značilne za posamezni lokus. Analiza posameznih genotipov s programom CERVUS je pokazala, da so vsi SSR markerji polimorfni (preglednica 1). V povprečju je bilo 12,3 alelov na lokus pri čemer je bil informativni

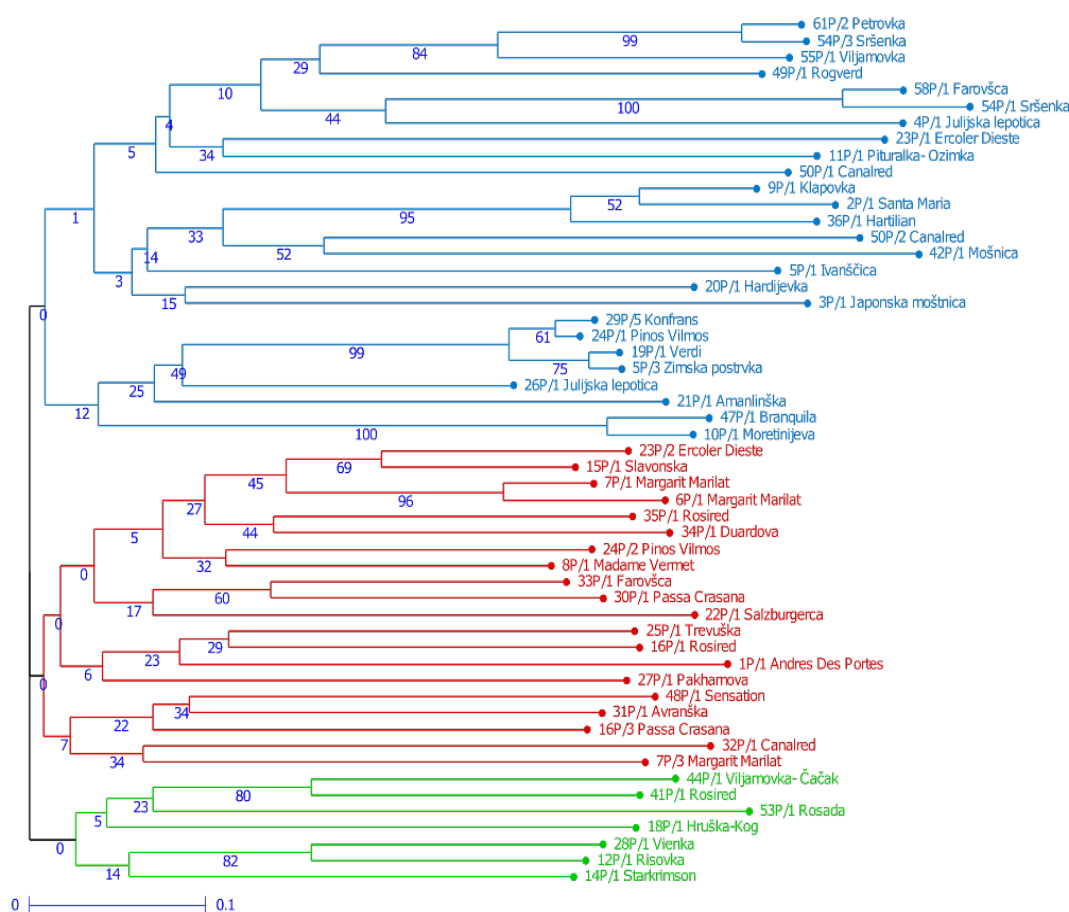
polimorfizem od 0,458 do 0,879. Največje število 20 alelov je imel lokus GD142, najmanjše število 8 alelov pa so imeli lokusi CH01d08, GD147, EMPc11 in CH04e03. Povprečna dejanska heterozigotnost je bila (0,693) nekoliko nižja od pričakovane (0,7915), saj genotipi, ki so pokazali samo en vrh na določenem lokusu so bili določeni kot homozigoti, čeprav so lahko zaradi ničtih alelov dejansko heterozigoti (Liang in sod., 2015). Frekvenco ničtih alelov večjo od 0,1 so imeli lokusi CH02b10, CH-Vf1, CH01f07 in CH04e03, kar je lahko posledica nastanka manjših mutacij v obrobni regiji mikrosatelitnega lokusa. Velika genetska raznolikost preučevanih genskih virov hruške iz slovenskega območja sovпада z rezultati drugih evropskih držav, kot so Španija (Urrestarazu in sod., 2015), Italija (Ferradini in sod., 2017), Švica (Urrestarazu in sod., 2019) in Švedska (Sehic in sod., 2012). Vegetativno razmnoževanje in prenos rastlinskega materiala med različnimi regijami, selekcija in žlahtnjenje ter samoinkompatibilnost vrste je prispevalo k visokemu nivoju genetske raznolikosti pri *Pyrus* spp. (Urrestarazu in sod., 2019).

Preglednica 1: Parametri genetske raznolikosti za 14 SSR na 53 akcesijah hrušk iz genske banke

Oznaka lokusa	Dolžina alelov (bp)	Št. alelov na lokus	Dejanska heterozigotnost (Ho)	Pričakovana heterozigotnost (He)	Informativnost polimorfizma (PIC)	Frekvenca ničtih alelov (F_{null})
CH01d08	242-305	8	0,769	0,798	0,760	0,0055
CH01d09	120-176	14	0,846	0,879	0,858	0,0195
CH03g07	204-288	15	0,904	0,845	0,820	-0,0453
CH05c06	82-118	9	0,830	0,689	0,638	-0,1086
GD142	126-184	20	0,827	0,885	0,865	0,0340
CH02b10	120-162	12	0,566	0,839	0,812	0,1898
CH02c11	203-249	14	0,811	0,882	0,861	0,0390
CH03d12	91-158	13	0,679	0,826	0,795	0,0879
CH-Vf1	129-172	16	0,642	0,883	0,866	0,1586
GD147	121-167	8	0,491	0,483	0,458	0,0033
CH01f07	175-211	15	0,623	0,897	0,879	0,1801
EMPc11	135-157	8	0,698	0,728	0,694	0,0134
EMPc117	88-140	12	0,623	0,766	0,730	0,0936
CH04e03	175-207	8	0,396	0,679	0,618	0,2745
Povprečje		12,3	0,693	0,792	0,761	0,0516

Slovenske genske vire hrušk se lahko razdeli v tri večje skupine, ki so si genetsko znotraj skupine bolj podobne, kot so si akcesije med skupinami (slika 1). V prvo skupino so se uvrstile lokalne sorte z domačim poimenovanjem, v drugo in tretjo skupino pa sorte z imeni, ki jih najdemo tudi po drugih evropskih regijah. Z natančnejšo parno primerjavo je bilo odkritih kar nekaj genskih virov z različnim poimenovanjem in podobnim genotipom t.i. sinonimi, ki so bili na vseh preučevanih lokusih enaki z dovoljenim odstopanjem na enem od preučevanih lokusov. Tako je bilo odkritih 10 skupin sinonimov: 1. genotip Madame Vermet (8P1/1, 8P/2) je enak genotipu Concord (13P/1, 13P/2), 2. Rosired (16P/1, 16P/2) je enak Konferans (29P/1, 29P/2, 29P/3, 29P/4), 3. Rosired (16P/3) je enak Passa Crasana (17P/1), 4. Verdi (19P/1, 19P/2, 19P/3) je enak Pinos Vilmos (24P/1), Konferans (29P/5), Raimerred (46P/1, 46P/2), Šmarješki (56P/1), Hardijevki (62P/1, 62P/2) in Pastorjevki (63P/1), 5. Ercole Dieste (23P/2, 23P/3, 23P/4) je enak Harvest (37P/1, 37P/2, 37P/3, 37P/4), Piševki (38P/1, 38P/2, 38P/3), Sirene (40P/1, 40P/2, 40P/3, 40P/4), Rdeči viljamovki (43P/1, 43P/2, 43P/3, 43P/4) in Rogverd (49P/3, 49P/4), 6. Passa Crasana (30P/1, 30P/2, 30P/3, 30P/4) je enak Rani viljamovki (45P/1,

45P/2, 45P/3, 45P/4), 7. Canalred (50P/1, 50P/3, 50P/4) je enak Red Butira Hardy (51P/1, 51P/2), 8. Rosada (53P/1, 53P/2, 53P/3, 53P/4) je enak Dišečki (57P/1, 57P/2) in Šiščki (59P/1), 9. Viljamovka (55P/1, 55P/2) je enak Kresnici (60P/1) in Petrovki (61P/1), 10. Viljamovka (55P/3, 55P/4) je enak Petrovki (61P/2). Literaturni podatki navajajo, da so bili sinonimi odkriti tudi v nemški (Puskas in sod., 2016), španski (Ferreira dos Santos in sod., 2011) in večji evropski kolekciji genskih virov hruške (Urrestarazu in sod., 2015). Iz tega vidika mikrosateliti predstavljajo primerno orodje za odkrivanje istih genotipov v različnem naboru podatkov. Odkritih je bilo tudi nekaj genskih virov z istim poimenovanjem in različnim genotipom t.i. homonimi. Identificiranih je bilo 7 homonimov: 1. Passa Crasana (17P/1 in 30P/1, 30P/2, 30P/3, 30P/4), 2. Julijska lepota (4P/1, 4P/2, 4P/3 in 26P/1, 26P/2, 26P/3, 26P/4), 3. Hardijevka (20P/1, 20P/2 in 62P/1, 62P/2), 4. Rosired (16P/1, 16P/2, 16P/3 in 35P/1, 35P/2, 35P/3), 5. Viljamovka (44P/1, 44P/2, 44P/3, 44P/4 in 55P/1, 55P/2, 55P/3, 55P/4), 6. Rogverd (49P/1, 49P/2 in 49P/3, 49P/4) in 7. Petrovka (61P/1 in 61P/2). V nekaterih primerih sinonimov in homonimov je lahko napačno imenovanje rezultat napačne oznake genotipov, zaradi velikih morfoloških podobnosti pa se sort fenotipsko ne da ločiti med seboj (Draga in sod., 2023). Identifikacija dvojnikov, sinonimov in homonimov bo prispevala k lažjemu in cenejšemu upravljanju z genskimi viri. Poleg tega bodo pridobljeni rezultati prispevali k oblikovanju osnovne zbirke (angl. core collection) hruške v Sloveniji kot del *ex situ* zbirke genske banke.



Slika 1: Genetska sorodnost 53 akcesij hruške iz genske banke v Kartuzijanskem samostanu Pleterje

4 SKLEPI

Analiza genskih virov hruške s pomočjo mikrosatelitnih markerjev je omogočila odkrivanje prisotnosti enakih genotipov z istim poimenovanjem, sinonimov in homonimov v samem kolekcijskem nasadu genske banke v Kartuzijanskem samostanu Pleterje. Rezultati pričakovane in dejanske heterozigotnosti posameznih SSR lokusov nakazujejo na veliko genetsko pestrost v tej zbirki. Pridobljena identifikacija posameznih genotipov s pomočjo mikrosatelitnih markerjev bo prispevala k gospodarnejšemu in varnejšemu upravljanju z genskimi viri ter predstavlja osnovo za oblikovanje osnovne zbirke.

5 VIRI

- Bielsa, F. J., Irisarri, P., Errea, P., & Pina, A. (2021). Genetic Diversity and Structure of Local Pear Cultivars from Mountainous Areas from Aragon (Northeastern Spain). *Agronomy-Basel*, 11(9), Article 1778. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091778>
- Dondini, L., & Sansavini, S. (2012). European pear. In M.L. Badenes & D.H. Byrne (Eds.), *Fruit Breeding* (pp. 369–413). Berlin, Springer.
- Draga, S., Palumbo, F., Barbagiovanni, I. M., Pati, F., & Barcaccia, G. (2023). Management of genetic erosion: The (successful) case study of the pear (*Pyrus communis* L.) germplasm of the Lazio region (Italy). *Frontiers in Plant Science*, 13, Article 1099420. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1099420>
- Evans, K. M., Fernandez-Fernandez, F., & Govan, C. (2009). Harmonising fingerprinting protocols to allow comparisons between germplasm collections - pyrus. *Acta Horticulturae*, 814, 103–106.
- Ferradini, N., Lancioni, H., Torricelli, R., Russi, L., Ragione, I. D., Cardinali, I., . . . Albertini, E. (2017). Characterization and Phylogenetic Analysis of Ancient Italian Landraces of Pear. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 751. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00751>
- Ferreira dos Santos, A. R., Ramos-Cabrer, A. M., Díaz-Hernández, M. B., & Pereira-Lorenzo, S. (2011). Genetic variability and diversification process in local pear cultivars from northwestern Spain using microsatellites. *Tree Genetics & Genomes*, 7(5), 1041-1056. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0393-3>
- Hammer, K., Arrowsmith, N., & Gladis, T. (2003). Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften*, 90(6), 241-250. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0433-4>
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>

- Kump, B., & Javornik, B. (1996). Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114(2), 149-158.
- Liang, W., Dondini, L., De Franceschi, P., Paris, R., Sansavini, S., & Tartarini, S. (2015). Genetic Diversity, Population Structure and Construction of a Core Collection of Apple Cultivars from Italian Germplasm. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 458-473. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0754-9>
- Mars, M., Carraut, A., Marrakchi, M., Gouiaa, M., Gaaliche, F. (1994). Ressources genetiques fruitieres en Tunisie (poirier, oranger, figuier, grenadier). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 100, 14–17.
- MirAli, N., Haider, N., Nabulsi, I., & Al-Oudat, M. (2007). *Pyrus syriaca*: An ecological and molecular study. *Advances in Horticultural Science*, 21(2), 89-95.
- Noiton, D. A. M., & Alspach, P. A. (1996). Founding clones, inbreeding, coancestry, and status number of modern apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 773-782.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J.P. (2006). DARwin Software. Available online: <http://darwin.cirad.fr/> (accessed on January 2023).
- Pina, A., Urrestarazu, J., & Errea, P. (2014). Analysis of the genetic diversity of local apple cultivars from mountainous areas from Aragon (Northeastern Spain). *Scientia Horticulturae*, 174, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.04.037>
- Puskas, M., Hofer, M., Sestras, R. E., Peil, A., Sestras, A. F., Hanke, M. V., & Flachowsky, H. (2016). Molecular and flow cytometric evaluation of pear (*Pyrus* L.) genetic resources of the German and Romanian national fruit collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(6), 1023-1033. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0298-3>
- Sehic, J., Garkava-Gustavsson, L., Fernandez-Fernandez, F., & Nybom, H. (2012). Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. *Scientia Horticulturae*, 145, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.023>
- Šisko, M., Javornik, B., Šiftar, A., & Ivančič, A. (2009). Genetic Relationships among Slovenian Pears Assessed by Molecular Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 97-108. <https://doi.org/10.21273/jashs.134.1.97>
- Urrestarazu, J., Denance, C., Ravon, E., Guyader, A., Guisnel, R., Feugey, L., . . . Durel, C. E. (2016). Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. *Bmc Plant Biology*, 16, Article 130. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0>

- Urrestarazu, J., Kagi, C., Buhlmann, A., Gassmann, J., Santesteban, L. G., Frey, J. E., . . . Miranda, C. (2019). Integration of expert knowledge in the definition of Swiss pear core collection. *Scientific Reports*, 9, Article 8934. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44871-3>
- Urrestarazu, J., Miranda, C., Santesteban, L. G., & Royo, J. B. (2012). Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 8(6), 1163-1180. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0502-y>
- Urrestarazu, J., Royo, J. B., Santesteban, L. G., & Miranda, C. (2015). Evaluating the Influence of the Microsatellite Marker Set on the Genetic Structure Inferred in *Pyrus communis* L. *Plos One*, 10(9), Article e0138417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138417>
- WAPA. (2023). The world apple and pear association. Retrieved from <http://www.wapa-association.org/asp/index.asp> (march, 2023)
- Yamamoto, T., Chevreau, E. (2009). Pear genomics, In K.M. Folta & S.E. Gardiner (Eds.), *Genetics and Genomics of Rosaceae* (pp. 163–187). New York, Springer.
- Zeigler, R.S., (2013). Food security, climate change and genetic resources. In M. Jackson, B. Ford-Lloyd, Parry M (Eds.), *Plant Genetic Resources and Climate Change* (pp 1-15). UK: CAB International.

Vsebnost fagopirinov v semenih različnih akcesij tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)

Katja MLINARIČ^{1*}, Zlata LUTHAR¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

* katjamlinaric@hotmail.com

Vsebnost fagopirinov v semenih različnih akcesij tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)

Izvleček: Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) v zadnjem obdobju tudi zaradi vsebnosti bioaktivnih sestavin pridobiva na pomenu. V primerjavi z žiti vsebuje v semenih veliko fenolnih snovi, med njimi tudi protofagopirine. Ti so prisotni že v kalicah med kaljenjem semen in svetloba je pomembna za pretvorbo protofagopirinov v fagopirine. Analiza fagopirinov je bila opravljena s tekočinsko kromatografijo v semenih 15 lokalnih akcesij tatarske ajde iz Slovenije z oznakami S1 do S15 in 3 akcesij iz Nepala z oznakami N1 do N3, v dveh zaporednih pridelovalnih letih. Pri vseh analiziranih akcesijah so bile ugotovljene značilno nižje vsebnosti skupnih fagopirinov v prvem letu od 6,39 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (3N) do 23,73 (4S), v primerjavi z drugim letom od 19,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (3N) do 104,99 (10S). Določene so bile 3 oblike fagopirinov: E, F in X4 – delovna oznaka. Značilno največ ($p \leq 0,05$) je bilo fagopirina F od 3,55 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (3N) do 94,67 (10S), sledil je fagopirin X4 od 1,36 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (3N) do 15,34 (10S) in najmanj je bilo fagopirina E od 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (11S) do 3,56 (10S).

Ključne besede: akcesija; fagopirini; genotip; HPLC; okolje; seme; tatarska ajda

Content of fagopyrins in the seeds of different accessions of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)

Abstract: Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) has become increasingly important in recent years, also because of its bioactive content. Compared to cereals, seeds contain many phenolic substances, including protofagopyrins. These are already present in the germ during germination, and light is important for the conversion of protofagopyrins to fagopyrins. Fagopyrins were analyzed by liquid chromatography in the seeds of 15 local buckwheat accessions from Slovenia designated S1 to S15 and 3 accessions from Nepal designated N1 to N3 in two consecutive growing years. Significantly lower levels of total fagopyrins were found in all analyzed accessions in the first year, from 6.39 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. seeds (3N) to 23.73 (4S), compared to the second year from 19.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. seeds (3N) to 104.99 (10S). Three forms of fagopyrins were identified: E, F and X4 - the working designated. Significantly highest ($p \leq 0.05$) was fagopyrin F from 3.55 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. Seed (3N) to 94.67 (10S), followed by fagopyrin X4 from 1.36 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. Seed (3N) to 15.34 (10S) and the lowest was fagopyrin E from 0.01 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. seeds (11S) to 3.56 (10S).

Key words: accession; fagopyrins; genotype; HPLC; environment; seed; Tartary buckwheat

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je nepravo žito in je vključena v družino Polygonaceae, ki v zadnjem času zaradi vsebnosti koristnih sestavin pridobiva na pomenu v prehrani ljudi (Kreft, 2020). Rod *Fagopyrum* vključuje dve gojeni vrsti, navadno (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarsko ajdo (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) ter več kot 26 divjih vrst (Ohnishi, 1990; Ohnishi, 2003; Ohsako & Li 2020; Chrungoo & Chettry 2021; Zhang in sod., 2021). Pridelovalno območje navadne in tartarske ajde se razprostira od vzhodne preko centralne Azije vse do vzhodne in centralne Evrope, Kanade, Amerike in v zadnjih letih se pridelujeta tudi v Republiki Južne Afrike in Tanzaniji (FAOSTAT, 2020). Dobro uspevata tudi do 2.500 m nadmorske višine, kjer druga žita nimajo več pogojev za rast. Ajda je rastlina, ki za svojo rast potrebuje skromne okoljske razmere in zaradi bogatega sekundarnega metabolizma, katerega produkti jo varujejo pred boleznimi in škodljivci ne potrebuje dodatne fitofarmacevtske oskrbe.

V primerjavi z žiti tatarska ajda vsebuje v semenih veliko fenolnih snovi (rutin, kvercetin, emodin, fagopirine, tanine in druge polifenol). Nekatere med njimi imajo bioaktivne učinke in zmerne koncentracije blagodejno vplivajo na človeški metabolizem, večje koncentracije lahko sprožijo pri občutljivih ljudeh nezaželene reakcije (Kumari & Kumar Chaudhary, 2020; Huda in sod., 2021; Chrungoo & Chetry, 2021). Fagopirini so flavonoidi podobni hipericinu, ki se v glavnem nahajajo v večjih koncentracijah v zelenih delih, predvsem v listih in socvetjih in tu so bili v preteklosti predmet proučevanja (Stojilkovski in sod., 2013; Kreft in sod., 2013). V navadni ajdi so v listih in socvetjih določili 6 oblik fagopirinov, imenovanih od A do F. V manjših koncentracijah se nahajajo tudi v semenih navadne ajde (Joshi in sod., 2020), medtem ko v semenih tatarske ajde po dostopnih literaturnih podatkih še niso bili proučevani. Za fagopirine je značilno, da imajo majhno gostoto in se težko ekstrahirajo ter to še otežujejo nizke koncentracije (Brockmann in sod., 1952).

Fagopirini so bili odkriti v dveh gojenih vrsta rodu *Fagopyrum* (*esculentum* in *tataricum*) ter v vrsti *F. cymosum*, ki se v azijskih državah uporablja za farmacevtske namene in krmo živali. Avtorji Stojilkovski in sod. (2013); Kreft in sod. (2013); Kočever Glavač in sod. (2017) ter Joshi in sod. (2020) so določili največjo količino fagopirinov v cvetovih, listih in rastočih kalčkih *F. cymosum* in manj pri navadni ajdi. Med samim kaljenjem semena ajde, so že v kalicah prisotni fagopirini in svetloba je pomembna za pretvorbo protofagopirinov v fagopirine (Stojilkovski in sod., 2013; Kreft in sod., 2013). Uživanje večjih količin kalice, pitje čaja iz zelenih delov in socvetij lahko pri občutljivih ljudeh po takojšnjem izpostavljanju soncu izzove fagopirizem. Fototoksični učinki se kažejo, kot draženje kože, edemi in serozni eksudati (Zhu, 2016).

Vsebnost in oblike fagopirinov v semenih različnih lokalnih akcesij tatarske ajde iz Slovenije in Nepala smo proučevali v dveh zaporednih pridelovalnih letih, z namenom ugotavljanja vpliva genotipa in okolja na sintezo in nalaganje v semenih.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

V proučevanje vsebnosti in prisotne oblike fagopirinov v semenih tatarske ajde smo vključili 15 lokalnih slovenskih akcesij z oznakami S1 do S15 in 3 akcesije z Nepala z oznakami N1 do N3. Semena omenjenih akcesij smo v dveh zaporednih letih razmnožili na Laboratorijskem polju Biotehnoške fakultete. Po žetvi, dosuševanju ter čiščenju semen smo jih zmleli in opravili analizo fagopirinov s HPLC.

2.2 Klimatski parametri

Fagopirini so produkti sekundarnega metabolizma, zato smo predvidevali, da imajo okoljski dejavniki vpliv na sintezo in nalaganje v semena. V ta namen smo spremljali dnevne temperature in padavine ter sončno obsevanje v obeh letih v obdobju rasti in razvoja akcesij, od sredine julija do druge dekade oktobra, ko je bila ajda požeta. Omenjene meteorološke podatke smo povzeli iz arhiva Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO, 2013 in 2014).

2.3 Ekstrakcija fagopirinov

Ekstrakcijo smo opravili na zmletih semenih. Po 10 g semen vsake akcesije smo zmleli z laboratorijskim mlinom (Kika® WerkeM20, Germany). Fagopirine smo ekstrahirali s kombinacijo topila aceton/voda (HPLC gradient, Sigma-Aldrich). Natehtali smo 1 g zmletih semen in jih prelili z 10 ml kombinacije aceton/voda (9/1) in temeljito mešali 1 min. Suspenzije smo inkubirali 20 ur pri 37 °C. Vzorce smo 1 min mešali in nato centrifugirali pri 1000 rpm, 5 min in 25 °C. Del čistega supernatanta smo odpipetirali v plastične testne epruvete (TPP, Trasadingen, Switzerland) in filtrirali skozi membranski filter (Millex-GN filters; pore size = 0,2 µm, Millipore). Nato smo 1 ml filtriranega ekstrakta odpipetirali v stekleno vialo in izpostavili 1 uro dnevni svetlobi, da so se protofagopirini pretvorili v fagopirine in nato opravili HPLC analizo (Tavčar Benkovič in sod., 2014).

2.4 HPLC analiza

HPLC analizo smo izvedli v štirih ponovitvah s HPLC analizatorjem (Shimadzu Prominence), ki se sestoji iz kontrolnega sistema (CBM-20A), kolone (CPO-20AC), črpalke z mobilno fazo z razplinjevalcem (DGU-20A5) povezanim s hlajenim avtomatskim vzorčevalnikom (SIL-20AC) s fotodiodo (PDA), detektorjem, ki nadzoruje valovno dolžino 190-800 nm in fluorescentnim detektorjem (LC-20AD XR) z eksitacijsko valovno dolžino = 330 nm in emisijsko valovno dolžino = 590 nm. Zaznambe detektorjev so bile posnete z uporabo LC raztopine in računalniške opreme 1.24SPI. Kromatografija je potekala pri 40 °C in pretokom 2 ml min⁻¹ z uporabo Phenomenex Kinetex® XB-C1B kolone (10 cm x 4,6 mm I.D., velikost delcev 2,7 µm). Uporabljena je bila gradientna metoda z uporabo vode (topilo A) in acetonitrilom (topilo B). Oba sta vsebovala 0,1 % trifluoroocetne kisline (Carlo Erba, Italy): 0,01-0,5 min, 0 % B; 0,5-0,6 min, 0-51% B; 6,01-6,01 min, 51 % B in 6,01-30 min 51-54 % B. Identificirani vrhovi so temeljili na fluorescentnem spektru v primerjavi z retencijskim časom, določeno po Eguchi in sod. (2009) ter Tavčar Benkovič in Kreft (2015). Na

kromatogramu v območju fagopirinov smo zasledili tri vrhove. Celotna vsebnost fagopirinov je bila določena glede na vsebnost hipericina (Carl Roth, Nemčija) (Hinneburg in sod., 2005; Ožbolt in sod., 2008), ker so njegove spektralne značilnosti in struktura podobne fagopirinom, katerega standardna referenčna spojina ni na voljo.

2.5 Statistična analiza

Statistična analiza je bila opravljena s programom R (R Core Team, 2021; R različica 4.1.2 (2021-11-01)) z uporabo paketa po Lenth (2022). Značilne razlike v vsebnosti fagopirinov v semenih med prvim (2013) in drugim letom (2014) smo izvedli s Fisherjevim testom in enosmerno analizo variance (ANOVA) ter Duncan-ovim testom večkratnih primerjav ($p \leq 0,05$).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Proučevanje vsebnosti fagopirinov v zrelih semenih tatarske ajde smo opravili, z namenom ugotoviti morebitne razlike med slovenskimi in nepalskimi genotipi in kakšen vpliv imajo okoljske razmere, predvsem klimatske na sintezo in nalaganje fagopirinov v semena. V ta namen smo zasnovali dvoletni bločni poskus z enakimi akcesijami in na isti lokaciji, da izključimo vpliv različnih talnih razmer. Analiza skupnih fagopirinov je pokazala statistično značilne razlike v vsebnosti pri vseh akcesijah ne glede na izvor med prvim in drugim pridelovalnim letom (preglednica 1).

Preglednica 1: Razmerje vsebnosti skupnih fagopirinov $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen v prvem in drugem letu pridelave 18 akcesij tatarske ajde

Primerjava med leti	Oznaka akcesije	Razmerje	Značilne skupine	SE	SP	p vrednost
2 / 1	10S	10,09	1	0,96	108	1,95E-45
2 / 1	7S	6,82	2	0,65	108	2,66E-38
2 / 1	13S	5,32	3	0,51	108	2,73E-33
2 / 1	8S	4,54	4	0,43	108	6,53E-30
2 / 1	12S	4,49	4	0,43	108	1,14E-29
2 / 1	3S	4,37	4	0,42	108	4,07E-29
2 / 1	2S	4,28	4	0,41	108	1,18E-28
2 / 1	14S	3,80	5	0,36	108	5,60E-26
2 / 1	11S	3,77	5	0,36	108	8,96E-26
2 / 1	15S	3,74	5	0,36	108	1,35E-25
2 / 1	9S	3,25	6	0,31	108	2,32E-22

2 / 1	3N	3,05	7	0,29	108	7,36E-21
2 / 1	1N	2,91	8	0,28	108	9,05E-20
2 / 1	5S	2,74	9	0,26	108	2,71E-18
2 / 1	2N	2,40	10	0,23	108	3,59E-15
2 / 1	1S	2,12	11	0,20	108	2,69E-12
2 / 1	6S	2,03	11	0,19	108	2,77E-11
2 / 1	4S	1,23	12	0,12	108	0,033720

V prvem letu (2013) smo v semenih akcesij v povprečju določili značilno ($p \leq 0,05$) manj fagopirinov od $6,39 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (akcesija 3N) do $23,73$ (akcesija 4S), v primerjavi z vrednostmi v drugem letu (2014) od $19,5 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (akcesija 3N) do $104,99$ (akcesija 10S). Razmerje vsebnosti fagopirinov v prvem in drugem letu je bilo med $1,23 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (akcesija 4S) in $10,09 \pm 0,96$ (akcesija 10S). Ostalih 10 skupin, ki so se med seboj značilno razlikovale je vključevalo od 1 do 3 akcesije v posamezni skupini (preglednica 1). Avtorji Stojilkovski in sod. (2013) navajajo najvišje vsebnosti fagopirinov v cvetovih *F. cymosum* $20,7 \text{ mg/g}$, manj $4,83 \text{ mg/g}$ v cvetovih in $0,322\text{--}2,3 \text{ mg/g}$ v listih navadne ajde.

Ker smo akcesije v obeh letih gojili v enakih talnih razmerah in določili značilne razlike v vsebnosti fagopirinov med leti, lahko večji del v izražanju te lastnosti, poleg genotipa pripišemo trenutnim vremenskim razmeram. Te so bile v drugem letu pridelovanja, glede prisotne značilno večje količine fagopirinov, ugodnejše za sintezo in nalaganje v semena (preglednica 1). Z namenom proučitve okoljskih vpliv na količino prisotnih fagopirinov v semenih, smo v rastni dobi ajde, od sredine julija do druge dekade oktobra, ko je bila ajda požeta, spremljali tri vremenske dejavnike: dnevne temperature, padavine in sončno obsevanje za Ljubljano (ARSO, 2013 in 2014). V letu 2014 je v omenjenem obdobju padlo povprečno za 321 mm več padavin v primerjavi z letom 2013, ki je bilo za $5,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ toplejše. V prvih treh mesecih rastnega obdobja (julij, avgust in september) je bilo v letu 2013 za $266,6$ ur več sončnega obsevanja in v zadnji fazi dozorevanja semen oktobra 2014 pa za $56,7$ ure več kot v letu 2013. Navedeni podatki nakazujejo, da ne glede na izvor genotipa (slovenski/nepalski) je bilo leto 2014 ugodnejše za sintezo in nalaganje fagopirinov v semena. Avtorji Joshi in sod. (2020); Stojilkovski in sod. (2013); Kreft in sod. (2013); Kim in sod. (2021) navajajo, da so protofagopirini kot predhodniki fagopirinov prisotni že takoj po kalitvi v mladih kalicah, koliko se jih bo pretvorilo v fagopirine je odvisno od svetlobe. V fazi dozorevanja semen v oktobru 2014 je bilo za $56,7$ ure več sončnega obsevanja v primerjavi z enakim obdobjem v letu 2013, kar je verjetno tudi vplivalo na značilno večje vsebnosti skupnih in posameznih fagopirinov v letu 2014 (preglednici 1 in 2).

Pri vseh akcesijah, tako slovenskih kot nepalskih smo s HPLC analizo v spektralnem območju fagopirinov zasledili tri vrhove, ki smo jih glede na retencijski čas pojavljanja določili kot fagopirin E, F in X4 – delovno poimenovanje. O šestih oblikah fagopirinov od A do F poročajo

avtorji Kočevar Glavač in sod. (2017) ter Joshi in sod. (2020), ki so jih določili v listih in socvetjih navadne in tatarske ajde ter *F. cymosum*.

Preglednica 2: Najmanjše in največje izmerjene vrednosti treh oblik fagopirinov E, F in X4 v semenih 18 akcesij tatarske ajde v dveh zaporednih letih pridelave

Leto		vsebnost fagopirinov					
		E		F		X4	
		min	max	min	max	min	max
2013	$\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen	0,01	1,03	3,55	20,51	1,36	5,75
	oznaka akcesije	11S	4S	3N	9S	3N	2N
2014	$\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen	0,44	3,56	14,24	94,67	3,46	15,34
	oznaka akcesije	6S	10S	3N	10S	6S	10S

V semenih vseh proučevanih akcesij tatarske ajde smo določili tri oblike fagopirinov, ki so se v koncentracijah značilno ($p \leq 0,05$) med seboj razlikovale. Največ je bilo fagopirina F od $3,55 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (akcesija 3N) do $94,67 \mu\text{g g}^{-1}$ (akcesija 10S), sledila mu je oblika X4 od $1,36 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (akcesija 3N) do $15,34 \mu\text{g g}^{-1}$ (akcesija 10S) in najmanj je bilo fagopirina E od $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen (akcesija 11S) do $3,56 \mu\text{g g}^{-1}$ (akcesija 10S). V letu 2014 je vsebovala akcesija 10S največ vseh treh oblik fagopirinov ($F = 94,67 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen, $X4 = 15,34 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen) in E ($0,44 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen). Akcesija 3N je imela v obeh pridelovalnih letih najmanj fagopirina F. V letu 2013 samo $3,55 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen in v letu 2014 značilno več $14,24 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen ter v letu 2013 je vsebovala značilno najmanj fagopirina X4 ($1,36 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen) (preglednica 2).

4 SKLEPI

Značilne razlike v vsebnosti fagopirinov med proučevanimi akcesijami tatarske ajde nakazujejo, da je prisotnost fagopirinov v semenih, lastnost povezana z genotipom, na katero ima velik vpliv okolje.

S potrjenimi značilnimi razlikami, v vsebnosti fagopirinov pri vseh akcesijah v obeh pridelovalnih letih lahko potrdimo, da ima okolje, predvsem klimatski dejavniki večji vpliv na vsebnost fagopirinov v primerjavi z genotipom, saj so vse akcesije naložile v prvem letu značilno manj fagopirina kot v drugem letu. V obeh pridelovalnih letih smo v poskus vključili enake genotipe na isto površino in razlike med leti so bile samo v klimatskih dejavnikih.

Trije klimatski dejavniki: temperatura, vlaga in sončno obsevanje imajo ključno vlogo pri sintezi fagopirinov. Temperatura in vlaga sta pomembni v obdobju oblikovanja in napolnjevanja semen s protofagopirini ter sončno obsevanje v zadnjem obdobju zorenja, pri pretvorbi protofagopirinov v fagopirine, kjer ima svetloba pomembno vlogo.

V semenih tatarske ajde smo določili samo tri oblike fagopirinov, medtem ko avtoriji Kočevar Glavač in sod. (2017) ter Joshi in sod. (2020) poročajo o šestih oblikah v socvetjih in listih

navadne in tatarske ajde ter *F. cymosum*. Prisotnost različnih oblik fagopirinov je tkivno pogojena lastnost oz. vezana na različne organe.

5 VIRI

Agencija Republike Slovenije za okolje (ARSO). <https://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive/> (3.8.2022)

Brockmann, H., Weber E., Pampus, G. (1952). Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*). Justus Liebig's Annalen der Chemie (Weinheim), 575(1), 53-83.

Chrungoo, N.K., Chettry, U. (2021). Buckwheat: A critical approach towards assessment of its potential as a super crop. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 81, 1–23.

Eguchi, K., Anase, T., Osuga, H. (2009). Development of a high-performance liquid chromatography method to determine the fagopyrin content of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) and buckwheat (*F. esculentum* Moench). *Plant Production Science*, 12, 475–480.

FAOSTAT. The Food and Agriculture Organization of the United Nation. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (9.5.2022)

Glavač, N.K., Stojilkovski, K., Kreft, S., Park, C.H., Kreft, I. (2017). Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products. *LWT*, 79, 423–427.

Hinneburg, I., Kempe, S., Rüttinger, H.H., Neubert, R.H.H. (2005). A CE method for measuring phototoxicity in vitro. *Chromatographia* 62: 325–329.

Huda, M.N., Lu, S., Jahan, T., Ding, M., Jha, R., Zhang, K., Zhang, W., Georgiev, M.I., Park, S.U., Zhou, M. (2021). Treasure from garden: Bioactive compounds of buckwheat. *Food Chem.*, 335, 127653.

Joshi, D.C., Zhang, K., Wang, C., Chandora, R., Khurshid, M., Li, J., He, M., Georgiev, M.I., Zhou, M. (2020). Strategic enhancement of genetic gain for nutraceutical development in buckwheat. A genomics-driven perspective. *Biotechnol. Adv.*, 39, 107479.

Kim, J., Kim, S., Hwang, K. T. (2021). Determination and photochemical conversion of protofagopyrins and fagopyrins in buckwheat plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100, 103894.

Kočevar Glavač, N., Stojilkovski, K., Kreft, S., Park, C.H., Kreft, I. (2017). Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products. *LWT Food Sci. Technol.*, 79, 423–427.

Kreft, I. (2020). Grenko Seme Tatarske Ajde. Slovenska Akademija Znanosti in Umetnosti:

Ljubljana, Slovenia.

- Kreft, S., Janež, D., Kreft, I. (2013). The content of fagopyrin and polyphenols in common and Tartary buckwheat sprouts. *Acta Pharm.*, 63, 553–560.
- Kumari, A., Kumar Chaudhary, H. (2020). Nutraceutical crop buckwheat: A concealed wealth in the lap of Himalayas. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 40, 539–554.
- Lenth, R.V. (2022). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.7.4-1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Ohnishi, O. (1990). Discovery of the wild ancestor of common buckwheat. *Fagopyrum*, 11, 5–10.
- Ohnishi, O., (2003). Buckwheat in the Himalayan hills. In I. Kreft, K.J. Chang, Y.S. Choi, H. Park (Eds.), *Ethnobotany of Buckwheat* (pp.21–33). Seoul: Jinsol Publishing Co.
- Ohsako, T., Li, C. (2020). Classification and systematics of the *Fagopyrum* species. *Breed. Sci.*, 70, 93–100.
- Ožbolt, L., Kreft, S., Kreft, I., Germ M., Stibilj, V. (2008). Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 110, 691–696.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Stojilkovski, K., Glavač, N.K., Kreft, S., Kreft, I. (2013). Fagopyrin and flavonoid contents in common, Tartary, and cymosum buckwheat. *J. Food Compos. Anal.*, 32, 126–130.
- Tavčar Benković, E., Žigon, D., Friedrich, M., Plavec J., Kreft, S. (2014). Isolation, analysis and structures of phototoxic fagopyrins from buckwheat. *Food Chem (Amsterdam)*, 143, 432–439.
- Zhang, K., Fan, Y., Weng, W., Tang, Y., Zhou, M. (2021). *Fagopyrum longistylum* (Polygonaceae), a new species from Sichuan, China. *Phytotaxa*, 482, 173–182,
- Zhu, F. (2016). Chemical composition and health effects of Tartary buckwheat, *Food Chemistry*, 203, 231–245.

Validation of CRISPR/Cas9-mediated T cell receptor knockout in the Jurkat cell line

Andrea ŠARAC^{1,2,†,*}, Karen BUTINA-OGORELEC^{2,3,†}, Simon HORVAT¹, Jelka POHAR², Anže SMOLE²

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science, Chair of Genetics, Animal Biotechnology and Immunology, Domžale, Slovenia

² National Institute of Biology, Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, Immunology and Cellular Immunotherapy Group, Ljubljana, Slovenia

³ Present address: InnoRenew CoE, Wood Modification Group, Izola, Slovenia

[†] These authors contributed equally

* andrea.sarac@bf.uni-lj.si

Validation of CRISPR/Cas9-mediated T cell receptor knockout in the Jurkat cell line

Abstract: Chimeric antigen receptors (CARs) are synthetic receptors that endow T cells with the designed specificity and function. Based on unprecedented clinical results, CAR-T cell therapy is now FDA-approved cancer immunotherapy for certain types of leukemia and lymphoma. Currently, clinically used CAR-T cells are generated via lentiviral or retroviral transduction of T cells, posing certain risks due to the semi-random integration of the genes. CRISPR/Cas genome editing approaches opened the innovative opportunities for targeted genome integration of desired genetic elements using viral or non-viral donor template DNA. Applications of these platforms, such as knocking-out the endogenous T cell receptor (TCR) or targeted integration of the CAR molecule via homology-directed repair (HDR) method, contribute to the production of a more homogenous and therefore safer cellular products. Here, we evaluate the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated knockout (KO) of the endogenous TCR in the Jurkat cell line using ribonucleoprotein (RNP) electroporation with the different settings and sgRNAs. The results show that different voltage (V) settings and electroporation times (ms) did not affect cell viability, which was high throughout the experiment. KO efficiency was high in different experimental settings, including when using sgRNA designed with the CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) web tool.

Key words: CAR-T cells; immunotherapy; CRISPR/Cas9; gene knockout; TCR; TRAC locus; Jurkat; electroporation

Ovrednotenje CRISPR/Cas9 posredovanega izbitja T celičnega receptorja v Jurkat celični liniji

Izvleček: Himerni antigenski receptorji (CAR) so sintetični receptorji, ki dajejo celicam T načrtovano specifičnost in funkcijo. Na podlagi kliničnih rezultatov je bila terapija s celicami CAR-T odobrena s strani FDA kot imunoterapija za nekatere vrste krvnih rakov. Trenutno se

klinično uporabljene celice CAR-T ustvarijo z lentivirusno ali retrovirusno transdukcijo celic T, kar predstavlja določena tveganja zaradi delno naključne integracije genov. Pristopi urejanja genoma s CRISPR/Cas so odprli inovativne priložnosti za ciljno integracijo želenih genetskih elementov v genom z uporabo virusne ali nevirusne donorske DNK. Aplikacije te platforme, kot je izbitje endogenega T celičnega receptorja (TCR) ali ciljna integracija molekule CAR z metodo »homology direct repair« (HDR), prispevajo k pripravi bolj homogenega in zato varnejšega celičnega produkta. V tem delu testiramo učinkovitost s CRISPR/Cas9 posredovanega izbitja (KO) endogenega TCR v celični liniji Jurkat z uporabo elektroporacije ribonukleoproteinov (RNP) z različnimi nastavitvami in sgRNA. Rezultati kažejo, da različne nastavitve napetosti (V) in časi elektroporacije (ms) niso vplivale na sposobnost preživetja celic, ki je bila tekom celotnega poskusa visoka. Učinkovitost izbitja je bila visoka pri različnih poskusnih pogojih vključno pri uporabi sgRNA, zasnovane s spletnim orodjem CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>).

Ključne besede: Celice CAR-T; imunoterapija; CRISPR/Cas9; izbitje gena; TCR; TRAC lokus; Jurkat; elektroporacija

1 INTRODUCTION

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy is a clinically approved cancer immunotherapy that combines tumor-associated antigen binding domain with the killing mechanism of T cells (Smole, 2022; Chen et al., 2019). CARs are synthetic receptors that endow T cells with the designed specificity and function (June and Sadelain, 2018). CAR-T cell therapy was first approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 2017 for patients with certain types of relapsed or refractory leukemia or lymphoma (Larson and Maus, 2021). Treatment with CAR-T cells includes a collection of patients' peripheral blood, *ex vivo* genetic modification and expansion of T cells, and re-administration of the CAR-T cell product back into the patient intravenously (Johnson and June, 2017).

Currently, clinically approved CAR-T cells are produced via lentiviral or retroviral transduction of T cells. This is characterized by a semi-random integration of the gene and thus poses certain risks (Smole, 2022; Kotowski and Sharma, 2020). In an attempt to improve the safety and efficacy of CAR-T cells and optimize the process of manufacturing, innovative genome editing technologies, most notably CRISPR/Cas-mediated targeted genome integration using viral or non-viral donor template DNA are being developed (Nüssing et al., 2020; Huang et al., 2019). In this approach, CAR is integrated in the T cell receptor (TCR) α constant (TRAC) locus via homology-directed repair (HDR) method with viral (adeno-associated virus; AAV) (Eyquem et al., 2017) or non-viral double-stranded DNA (dsDNA) as a donor template (Oh et al., 2022; Zhang et al., 2022; Rafiq et al., 2020; Liu et al., 2019). Such integration of CAR into a TRAC locus showed uniform CAR expression in human peripheral blood T cells, enhanced T cell potency in a mouse model of acute lymphoblastic leukemia (ALL), effective internalization and re-expression of the CAR following single or repeated exposure to antigen and delayed effector T cell differentiation and exhaustion (Eyquem et al., 2017). In addition to the simultaneous knock-in of a CAR and knockout of the endogenous TCR, the latter is a further improvement in the development of CAR-T cells. TCR KO prior to

the introduction of the CAR molecule to the T cells reduces alloreactivity and contributes to the production of a more homogenous, and therefore safer, cellular product (Bashor et al., 2022; Stenger et al., 2020; Ren et al., 2017).

The efficiency of CRISPR/Cas9 KO of the endogenous TCR in Jurkat cell line using the different NEPA21 electroporator settings as well as different sgRNAs is evaluated in this article. Jurkat cell line is an immortalized T lymphocyte cell line that was isolated in 1977 from the blood of a fourteen-year-old boy with acute lymphoblastic leukemia (Schneider et al., 1977). Since then, Jurkat cell line has been widely used as an *in vitro* model for studying T-cell biology, most notably, the TCR signaling and molecular events in the HIV infection life cycle (Gioia et al., 2018; Montano, 2014; Abraham and Weiss, 2004).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell line

Jurkat, an immortalized human T lymphocyte suspension cell line used for this study, was a gift from prof. dr. Mojca Narat from the Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Cells were thawed and cultured in a complete medium comprising of RPMI 1640 GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 10 % FBS (Gibco), 100 U/mL Penicillin-Streptomycin (Gibco), and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Gibco), for one week prior to electroporation. Cells were cultured in T75 flasks, sub-cultured every 2-3 days with the addition of the fresh medium and maintained at the density of $0.2-1 \times 10^6$ cells/ml. Cultures were incubated at 37 °C with 5% CO₂ in air atmosphere. Cell counts were performed using LUNA™ Automated Cell Counter.

2.2 Designing sgRNA for CRISPR/Cas9 KO

TCR α chain encoded by single *TRAC* gene and TCR β chain encoded by two *TCRB* genes are both essential to the assembly and membrane translocation of the TCR complex (Osborn et al., 2016; Huppa & Ploegh, 1997), and disruption of these genes has proven the feasible approach to the elimination of TCR expression (Osborn et al., 2016). *TRAC* gene sequence, including exons and introns, was obtained from Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) genome browser (Chromosome 14: 22,547,506-22,552,156, forward strand) in FASTA format and imported into Benchling (<https://www.benchling.com/>), a cloud-based platform for biotechnology research and development, which was used for exons annotation. For the design of the gRNA, web tool CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (Labun et al., 2021; Montague et al., 2014) was used. gRNA positioned on the negative strand of the exon 1 with the predicted efficiency of 58.70 % and a low mismatch score (MM0 and MM1 scored 0, MM2 scored 1, and MM3 scored 4) and accompanied with the appropriate protospacer adjacent motif (PAM) sequence was chosen for this experiment. Knockout was also performed with the reference, previously validated sgRNA targeting *TRAC* (Smole et al., 2022; Stadtmauer et al., 2020). Both gRNAs were copied onto the annotated sequence of the *TRAC* gene in Benchling to check for any potential discrepancies in the gene sequences amongst different browsers and online tools. Finally, gRNAs were ordered from Synthego in a form of single guide RNA

(sgRNAs) that are used for CRISPR/Cas9 gene editing. 100 μ M sgRNAs were prepared according to Synthegos' protocol by resuspension in 1X TE buffer.

2.3 CRISPR/Cas9 KO of TRAC in Jurkat cell line

Two separate electroporation experiments were performed, one for testing the effects of two different electroporation conditions, 275 V for 1 ms and 175 V for 3 ms, on the cell viability and KO efficiency and the other for testing the adequacy of web tool CHOPCHOP for designing the efficient sgRNAs.

Prior to electroporation Jurkat cells were prepared for electroporation by centrifugation (900 rpm, 10 min) and resuspension in OptiMEM (Gibco) twice to wash away medium with FBS that was used for cell culture. Cells were once again counted, centrifuged, and resuspended in OptiMEM to reach the concentration of 1×10^7 cells/ml. Immediately before transfection, RNP complexes were prepared as described in the protocol by Oh et al. (2019) by mixing 150 pmol (3 μ l) of sgRNA with 60 pmol (2 μ l) of Cas9 protein per transfection in RNase free tubes following the 10 min incubation at room temperature (RT). Simultaneously, 5 μ l of OptiMEM in an RNase free tube was prepared for each non-transfected and non-electroporated control. 95 μ l of cells (approx. 1×10^6 cells) were added to RNP complexes or OptiMEM and incubated for 2 minutes while electroporation cuvettes were labelled.

Electroporation was performed with NEPA21 electroporator (NepaGene). For electroporation, 100 μ l of the sample was added to each electroporation cuvette. Before electroporating, the samples' impedance was measured and adjusted to be between 30-55 Ω . Samples were electroporated one by one, and measured values on the NEPA screen were recorded. After electroporation, samples were transferred from the cuvettes into the 12-well plate with warm R10e medium using the included disposable pipette and by mixing well to break the cell clumps that formed as a side effect of the electroporation. All subsequent cell culturing was performed in the R10e medium comprising of RPMI 1640 GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 10 % FBS (Gibco), 100 U/mL Penicillin-Streptomycin (Gibco), 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Gibco) and 1 mM of sodium pyruvate (Invitrogen), MEM NEAA (Invitrogen) and HEPES (Gibco).

2.4 Subsequent sample analyses

In both experiments, electroporated cells were counted every 2-3 days for the next 10 days on the automated cell counter. The knockout efficiency was determined by flow cytometry through the expression of CD3 protein as a surrogate marker. The specificity of the CD3 antigen for T cells and its appearance at all stages of T cell development makes it a suitable surrogate marker for TCR α assembly and membrane translocation (Smole et al., 2022; Bio-Rad, n.d.). Samples for flow cytometry were taken on day 2 and day 9 post-electroporation (which was day 0). Samples were spun down and washed with DPBS prior to staining with Zombie Aqua viability dye (Biolegend, Cat# 423101). After 20 minutes of incubation at RT, staining was inactivated with the addition of FACS buffer prepared by mixing DPBS with 0,5% BSA (Miltenyi Biotec). Samples were once again spun down and resuspended in an antibody cocktail, staining for surface markers, including anti-human CD3 Antibody (Biolegend, Cat#

317341). Samples were incubated for 20 minutes at 4 °C following 2 rounds of centrifugation and final resuspension of cells in 200 µl of FACS buffer. Flow cytometry was performed using the MACSQuant® benchtop flow cytometer (Miltenyi Biotec). Flow cytometry data analysis was performed using the FlowJo™ Software (v10.8.1) (<https://www.flowjo.com/>).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 The different electroporation conditions had no effect on cell viability or KO efficiency

The two different electroporation conditions tested showed no substantial differences in cell viability or KO efficiency. Electroporation of cells with (samples 1 and 2) or without (samples 1C and 2C) the presence of RNP complexes and electroporated either with 275 V for 1 ms (samples 1 and 1C) or 175 V for 3 ms (samples 2 and 2C) resulted in high viability on day 9 post electroporation and comparable cell density and average cell size to the non-electroporated control (Table 1).

Table 1: Cell count on day 9 after electroporation showing cell concentration (cells/ml), viability (%), and average cell size (µm) at different electroporation conditions; each condition was tested only once. Abbreviations: E⁻ Ctrl – no-electroporation control, c – concentration, Via – viability, Avg – average.

Sample present	c [cells/ml]	Via [%]	Avg size [µm]	Electroporation setting	RNP complex present
1	1.02×10 ⁶	96.7	10.3	275 V/1 ms	Yes
1C	1.01×10 ⁶	94.9	10.6	275 V/1 ms	No
2	0.86×10 ⁶	97.6	10.4	175 V/3 ms	Yes
2C	1.08×10 ⁶	98.3	10.8	175 V/3 ms	No
E ⁻ Ctrl	0.97×10 ⁶	96.9	10.5	Not electroporated	No

Flow cytometry analysis showed comparable KO efficiencies between the two electroporation conditions in samples that were incubated with the RNP complexes. KO efficiency of TCR in cells that were incubated with Cas9 and sgRNA and electroporated either with 275 V for 1 ms or 175 V for 3 ms was high (data not shown).

3.2 sgRNA designed with the web tool CHOPCHOP showed high KO efficiency

We first analyzed Jurkat cell line for the CD3 expression in a non-electroporated control sample and a sample electroporated only with the presence of Cas9 endonuclease. Results showed that approximately 61-65 % of Jurkat cells were positive for CD3 marker (CD3⁺ population). By day 9 of the experiment, the KO efficiency in samples incubated and electroporated either with the reference (Smole et al., 2022; Stadtmauer et al., 2020) or newly designed sgRNA was

evaluated as the reduction of CD3⁺ population compared to the controls. Electroporation of sample with reference sgRNA reduced the CD3⁺ population to approximately 8 %, and electroporation of the sample with the newly designed sgRNA resulted in approximately 3 % of Jurkat cells being positive for the CD3 marker (Figure 1). Taken together, the flow cytometry analysis showed that both reference sgRNA and the sgRNA designed in this study with the web tool CHOPCHOP were successful in knocking-out the endogenous TCR as demonstrated by the reduction of CD3⁺ population in Jurkat cell line. The results with the newly designed sgRNA validate CHOPCHOP as a tool of choice in our research group when designing the sgRNAs.

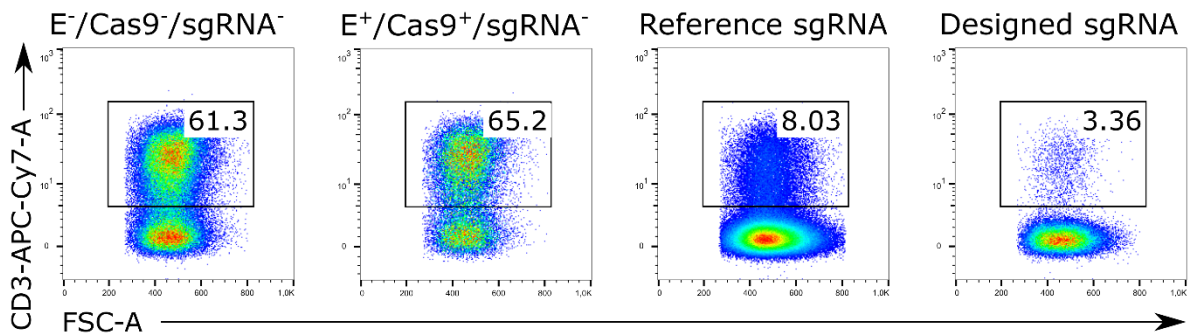


Figure 1: Flow cytometry results showing knockout (KO) efficiency of the reference sgRNA and the sgRNA designed with the web tool CHOPCHOP; samples were measured on day 9 of the experiment, and each condition is represented by only one sample (no biological or technical replicates in this preliminary study). Abbreviations: E⁻ - not electroporated, E⁺ - electroporated, Cas9⁻ - Cas9 not present, Cas9⁺ - Cas9 present, sgRNA⁻ - sgRNA not present.

4 CONCLUSIONS

The efficiency of the CRISPR/Cas9 KO of the endogenous TCR in Jurkat cell line using the different NEPA21 electroporator settings as well as different sgRNAs was evaluated. We established the protocol and electroporation settings that enabled the high viability of Jurkat cells. Different electroporation settings that we chose to test based on a thorough investigation of the NEPA21 electroporator operation procedures, including higher and lower voltage and shorter and longer electroporation time, did not reduce the viability of the cells. The viability of the cells was still high (> 95 %) at the end of the experiment, 9 days post electroporation, as well as the KO efficiency evaluated as the reduction of the CD3⁺ population of cells. The CHOPCHOP tool enabled us to design the sgRNA for efficient KO of the endogenous TCR in Jurkat cell line, comparable with the published reference sgRNA (Smole et al., 2022; Stadtmauer et al., 2020). Due to the user-friendly interface of the CHOPCHOP tool as well as the encouraging KO results, CHOPCHOP will be a preferred sgRNA designing tool in our research group in future studies. We plan to further validate it across more experiments and different genes and genomic loci. Note that all the results presented in this article are based on the single sample for each condition tested and thus present only the preliminary data that will be further evaluated in our ongoing studies of genome editing in T cells with multiple biological and technical replicates for each condition as well as the appropriate statistical data analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank prof. dr. Mojca Narat for gifting us the Jurkat cell line, doc. dr. Jernej Ogorevc for introducing us to the electroporator, Ana Jakopič for helping us adjust to the laboratory and dr. Katja Kološa (NIB/GEN) for introducing us to the MACSQuant® Flow Cytometer. We thank the Slovenian Research Agency for funding this research through MR grant to Šarac A., and the Project J3-3084 (PI: Smole A.) and Programme Groups P4-0220 (head: Dovč P.) and P1-0245 (head: Žegura B.). We thank the Research fund of the National Institute of Biology for Project 10ICIGEN (ICI) (co-PIs: Pohar J., Smole A.) for supporting this research. We thank Public Scholarship, Development, Disability and Maintenance Fund of Republic of Slovenia for co-financing project work (Karen Butina Ogorelec).

5 REFERENCES

- Abraham, R. T., & Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology*, 4(4), 301–308, <https://doi.org/10.1038/nri1330>
- Bashor, C. J., Hilton, I. B., Bandukwala, H. S., Smith, D. M., & Veisheh, O. (2022). Engineering the next generation of cell-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(9), 655–675, <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00476-6>
- Bio-Rad. (n.d.). The T Cell Marker, CD3 Antigen & Antibodies: Mini-review | Bio-Rad. Bio-Rad, <https://www.bio-rad-antibodies.com/minireview-cd3-antibody.html>
- Chen, H., Wang, F., Zhang, P., Salahudeen, A. A., Chen, Y., Fan, X., Cao, X., Liu, J., Yang, Y., Wang, B., Lei, B., Gu, L., Bai, J., Wei, L., Zhang, R., Zhuang, Q., Zhang, W., Zhao, W., & He, A. (2019). Management of cytokine release syndrome related to CAR-T cell therapy. *Frontiers of Medicine*, 13(5), 610–617, <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0714-8>
- Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., Van Der Stegen, S. J. C., Hamieh, M., Cunanan, K. M., Odak, A., Gonen, M., & Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 543(7643), 113–117, <https://doi.org/10.1038/nature21405>
- Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R., & Su, A. I. (2018). A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*, 19(1), <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>
- Huang, B., Johansen, K. H., & Schwartzberg, P. L. (2019). Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis in Primary Murine T Lymphocytes. *Current Protocols in Immunology*, 124(1), e62, <https://doi.org/10.1002/cpim.62>
- Huppa, J. B., & Ploegh, H. L. (1997). In Vitro Translation and Assembly of a Complete T Cell

- Receptor–CD3 Complex. *Journal of Experimental Medicine*, 186(3), 393–403, <https://doi.org/10.1084/jem.186.3.393>
- Johnson, L. A., & June, C. H. (2017). Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Research*, 27(1), 38–58, <https://doi.org/10.1038/cr.2016.154>
- June, C. H., & Sadelain, M. (2018). Chimeric Antigen Receptor Therapy. *The New England Journal of Medicine*, 379(1), 64–73, <https://doi.org/10.1056/nejmra1706169>
- Kotowski, M., & Sharma, S. (2020). CRISPR-Based Editing Techniques for Genetic Manipulation of Primary T Cells. *Methods and Protocols*, 3(4), 79, <https://doi.org/10.3390/mps3040079>
- Labun, K., Krause, M., Cleuren, Y. N. T., & Valen, E. (2021). CRISPR Genome Editing Made Easy Through the CHOPCHOP Website. *Current Protocols*, 1(4), <https://doi.org/10.1002/cpz1.46>
- Larson, R. D., & Maus, M. V. (2021). Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nature Reviews Cancer*, 21(3), 145–161, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00323-z>
- Liu, Y., Di, S., Shi, B., Zhang, H., Wang, Y., Wu, X., Luo, H. Q., Wang, H., Li, Z., & Jiang, H. (2019). Armored Inducible Expression of IL-12 Enhances Antitumor Activity of Glypican-3–Targeted Chimeric Antigen Receptor–Engineered T Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Immunology*, 203(1), 198–207, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800033>
- Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M., & Valen, E. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W401–W407, <https://doi.org/10.1093/nar/gku410>
- Montano, M. (2014). Model systems. Elsevier eBooks, 9–33, <https://doi.org/10.1533/9781908818652.9>
- Nüssing, S., House, I. G., Kearney, C. J., Chen, A. L. C., Vervoort, S. J., Beavis, P. A., Oliaro, J., Johnstone, R. W., Trapani, J. A., & Parish, I. A. (2020). Efficient CRISPR/Cas9 Gene Editing in Uncultured Naive Mouse T Cells for In Vivo Studies. *Journal of Immunology*, 204(8), 2308–2315, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901396>
- Oh, S., Seki, A., & Rutz, S. (2019). Ribonucleoprotein Transfection for CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in Primary T Cells. *Current Protocols in Immunology*, 124(1), e69. <https://doi.org/10.1002/cpim.69>
- Oh, S., Senger, K., Madireddi, S., Akhmetzyanova, I., Ishizuka, I. E., Tarighat, S. S., Lo, J. H., Shaw, D. E., Haley, B., & Rutz, S. (2022). High-efficiency nonviral CRISPR/Cas9-mediated gene editing of human T cells using plasmid donor DNA. *Journal of*

- Osborn, M. J., Webber, B. R., Knipping, F., Lonetree, C., Tennis, N. C., DeFeo, A. P., McElroy, A. N., Starker, C. G., Lee, C., Merkel, S. C., Lund, T. C., Kelly-Spratt, K. S., Jensen, M. C., Voytas, D. F., Von Kalle, C., Schmidt, M. G., Gabriel, R. P., Hippen, K. L., Miller, J. S., . . . Blazar, B. R. (2016). Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Molecular Therapy*, 24(3), 570–581, <https://doi.org/10.1038/mt.2015.197>
- Rafiq, S., Hackett, C. S., & Brentjens, R. J. (2020). Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(3), 147–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>
- Ren, J., Liu, X., Fang, C., Wang, K., June, C. H., & Zhao, Y. (2017). Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 23(9), 2255–2266, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-1300>
- Schneider, U., Schwenk, H., & Bornkamm, G. W. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 19(5), 621–626, <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>
- Smole, A. (2022). Cancer immunotherapy with CAR T cells: well-trodden paths and journey along lesser-known routes. *Radiology and Oncology*, 56(4), 409–419, <https://doi.org/10.2478/raon-2022-0049>
- Smole, A., Benton, A., Poussin, M. A., Eiva, M. A., Mezzanotte, C., Camisa, B., Greco, B., Sharma, P., Minutolo, N. G., Gray, F., Bear, A. S., Baroja, M. L., Cummins, C., Xu, C., Sanvito, F., Goldgewicht, A. L., Blanchard, T., Rodriguez-Garcia, A., Klichinsky, M., . . . Powell, D. J. (2022). Expression of inducible factors reprograms CAR-T cells for enhanced function and safety. *Cancer Cell*, 40 (12), 1470-1487.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.11.006>
- Stadtmauer, E. A., Fraietta, J. A., Davis, M., Cohen, A. F., Weber, K. L., Lancaster, E., Mangan, P. A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V. E., Xu, J., Jung, I. H., Melenhorst, J. J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., . . . June, C. H. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 367(6481), <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
- Stenger, D., Stief, T. A., Kaeuferle, T., Willier, S., Rataj, F., Schober, K., Vick, B., Lotfi, R., Wagner, B., Grunewald, T. G. P., Kobold, S., Busch, D. H., Jeremias, I., Blaesche, F., & Feuchtinger, T. (2020). Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood*, 136(12), 1407–1418, <https://doi.org/10.1182/blood.2020005185>
- Zhang, J., Hu, Y., Yang, J., Li, W., Zhang, M., Wang, Q., Zhang, L., Wei, G., Tian, Y.,

Amassian, A., Chen, A., Tan, B., Cui, J., Li, D., Li, Y., Qi, Y., Wang, D., Wu, Y., Li, D., ... Huang, H. (2022). Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*, 609(7926), 369–374, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05140-y>

Preventive and curative effects of salicylic and methyl-salicylic acid against *Monilinia laxa* and the metabolic response of apple peel

Saša GAČNIK^{1*}, Alenka MUNDA, Robert VEBERič¹, Metka HUDINA¹ and Maja MIKULIČ-PETKOVŠEK¹

¹ University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Agronomy, Ljubljana, Slovenia

* sasa.gacnik@bf.uni-lj.si

Preventive and curative effects of salicylic and methyl-salicylic acid against *Monilinia laxa* and the metabolic response of apple peel

Abstract: Curative (CUR) and preventive effects (PRE) of salicylic acid (SA) and methyl-salicylic acid (MeSA) on the infection of apple fruits with *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland.) Honey ex Whetzel, the causal agent of brown rot, were investigated. CUR application of SA and MeSA slowed the progression of the infection. In contrast, PRE application was generally unsuccessful. HPLC–MS system was used to analyze the content of phenolic compounds in apple peels of healthy and boundary tissues. The boundary tissue of untreated infected apple peel had up to 2.2-times higher content of total analyzed phenolic compounds (TAPC) than in the control. Flavanols, hydroxycinnamic acids and dihydrochalcones were also higher in the boundary tissue. During the CUR treatment with salicylates, the ratio of TAPC between healthy and boundary tissue was lower (SA up to 1.2-times higher and MeSA up to 1.4-times higher TAPC in boundary compared with those in healthy tissue) although the content in healthy tissues also increased. The results confirm that salicylates and *M. laxa* infection increase the content of phenolic compounds. CUR use of salicylates has a greater potential than PRE use in infection control.

Key words: *Monilinia laxa*, brown rot, phenolic compounds, phenylpropanoid metabolic pathway, salicylates, plant protection

Preventivni in kurativni učinki salicilne in metil salicilne kisline proti glivi *Monilinia laxa* ter metabolni odziv kože jabolk

Izveček: V študiji smo raziskovali kurativni (CUR) in preventivni (PRE) učinek salicilne (SA) in metil salicilne kisline (MeSA) na okužbo jabolk z glivo *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland.) Honey ex Whetzel, ki je ena izmed povzročiteljev sadne gnilobe. Uporaba SA in MeSA pri CUR je upočasnila napredovanje okužbe. Nasprotno pa je bila uporaba PRE na splošno neuspešna. Za analizo vsebnosti fenolnih spojin v koži jabolk v zdravem in robnem tkivu okoli lezij smo uporabili sistem HPLC-MS. Robno tkivo netretirane okužene kože je imelo do 2,2-krat večjo vsebnost skupnih analiziranih fenolov (TAP) kot pri kontroli. V robnem tkivu kože okoli lezij je bila tudi večja vsebnost flavanoloov, hidroksicimetnih kislin in dihidrohalkonov. Pri CUR tretiranju s salicilati je bilo razmerje vsebnosti TAP med zdravim

in robnim tkivom manjše (SA do 1,2-krat več in MeSA do 1,4-krat več TAP v robnem v primerjavi z zdravim tkivom) na račun povečane vsebnosti tudi v zdravem tkivu. Rezultati potrjujejo, da salicilati in okužba z glivo *M. laxa* povzročijo povečano vsebnost fenolnih spojin v kožici jabolk. Uporaba salicilatov pri CUR ima pri obvladovanju okužb večji potencial kot PRE uporaba.

Ključne besede: *Monilinia laxa*, sadna gniloba, fenolni profil, fenil propanoidna pot, salicilati, varstvo rastlin

1 INTRODUCTION

Food production is facing the challenge of producing enough quality food in the face of climate changes, the resistance of harmful organisms to chemical agents, and the desire of consumers for healthy food, produced with the least possible phytopharmaceutical products, due to their negative impact on human health and the environment (Babalar et al., 2007; Calzadilla et al., 2013; Droby et al., 2009). New environmentally friendly approaches are needed to protect plants from biotic and abiotic stress factors (Tyagi et al., 2022). One of the possible alternative could be salicylic acid (SA) and its derivatives.

SA is a naturally occurring phenolic compound in plants (Raskin, 1992) that has an important influence on plant development, physiological processes, and plant adaptations to stress (Klessig & Malamy, 1994). It also contributes in the activation of plant defenses when attacked by pests (Stella de Freitas et al., 2019) and can influence various fruit properties, such as colour, weight, firmness, as well as the contents of vitamin C, sugars and other bioactive compounds (Gacnik et al., 2021; Gačnik et al., 2021; Giménez et al., 2014; Wang et al., 2022). Activation of the SA synthesis pathway is usually triggered by pest attack or pathogen infection, but can also be stimulated by exogenous use of elicitors (Filgueiras et al., 2019). Exogenous use of SA has been shown to be effective against several diseases, including anthracnose (Zainuri et al., 2001), cherry brown rot (Yao & Tian, 2005), apple scab, brown leaf spot (Abbasi et al., 2019), potato late blight (Halim et al., 2007), strawberry gray mold (Babalar et al., 2007) and apple blue mold (da Rocha Neto et al., 2016).

There is a lack of studies investigating the effects of different uses of SA on pathogen infection. Therefore, our objective was to investigate the effects of preventive (PRE) and curative use (CUR) of SA and methyl-salicylic acid (MeSA) on infection of apples with the fungus *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland.) Honey ex Whetzel and the metabolic response of infected and uninfected apple peel.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant material, pathogen preparation and experimental design

This study was performed on the apple cultivar 'Golden Delicious' at the Biotechnical Faculty in Ljubljana. Before use, the apples were disinfected with 1% active chlorine solution for 2

minutes, rinsed in sterile distilled water (SDW) and air dried. To prepare the spore suspension of *Monilinia laxa*, spores were scraped from the surface of the previously infected fruit, suspended in SDW and adjusted to the concentration 5×10^5 spores/ml. SA and MeSA were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and diluted in SDW to 2.5 mM concentration. Disinfected apples were distributed in plastic boxes on wet cardboard bottoms and divided among nine treatments – unINF_C (immersed in SDW and uninfected), unINF_SA (immersed in SA and uninfected), unINF_MeSA (immersed in MeSA and uninfected), PRE_INF_C (immersed in SDW and infected), PRE_INF_SA (immersed in SA and infected), PRE_INF_MeSA (immersed in MeSA and infected), INF_CUR_C (infected and immersed in SDW after 24 h), INF_CUR_SA (infected and immersed in SA after 24 h), INF_CUR_MeSA (infected and immersed in MeSA after 24 h). There were three plastic boxes per treatment, each contained 15 apples. To test PRE, apples were dipped in a 2.5 mM SA or MeSA for 30 min and then air dried for 2 h. Apples from all INF treatments were then infected through a puncture wound with a standardized needle (3 mm deep $\times$ 1 mm wide), through which 20 μ l of a suspension of *M. laxa* spores were applied. Apples from all treatments were then incubated for 24 h in a growth chamber at 20 °C and 100% humidity. After 24 hours of infection, apples from CUR treatment were removed from the growth chamber and immersed in a 2.5 mM SA or MeSA for 30 min. After drying, they were returned to the growth chamber, and apples from all treatments were incubated for 18 days at 17 °C and 100% humidity.

The intensity of infection (measurement of the lesion diameter) was first assessed after 3 days (D1). Based on the values of the lesion diameters, the average lesion growth rate (LGR; mm/day) was estimated as follows: $LGR = (\Sigma(\theta t)/t)$, where θ represents the average lesion diameter at time “t”. Disease incidence (%) was calculated as the ratio between the number of infected apples with characteristic symptoms of brown rot and the total number of apples. On the sampling date D5, healthy tissue and the boundary section - a 1–2 mm narrow strip of healthy tissue around the lesion- were removed from the apples and immediately shock-frozen in liquid nitrogen and stored at –20 °C for further HPLC-MS (High-performance liquid chromatography- Mass spectrometer) analysis.

2.2 HPLC-MS Analysis of Individual Phenolic Compounds in Apple Peel

For the analysis of phenolic compounds in healthy and boundary tissue, we weighed 2 g of grounded apple peel and poured with 7 ml of 80 % methanol with 3% formic acid. Phenolic compounds were extracted for 45 min in a cooled ultrasonic bath (4 °C). The extracts were centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5810 R) for 5 min at 10,000 rpm at 4 °C and filtered into vials using a 0.20 μ m Chromafil AO-20/25 (Macherey-Nagel) polyamide filter. The quantification of individual phenolics analysis was performed with an HPLC system (Thermo Scientific; San Jose, CA, USA) as described by Gacnik et al. (2023). The identification of phenolic compounds was performed with an LTQ XLTM Linear Ion Trap MS (Thermo Scientific), as described by Gacnik et al. (2023). Calculation (mg/kg FW of apple peel) of phenolic compound content in healthy and boundary tissue of apple peel was performed using

calibration curves of external standards and peak areas of the corresponding phenolic compound.

2.3 Statistical Analysis

R-commander statistical software (R Formation for Statistical Computing, Auckland, New Zealand) was used to analyse the data. The effects of PRE and CUR use of the SA and MeSA treatments on infection intensity, disease incidence and the content of phenolic compounds were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences among treatments were calculated by multiple comparisons of means using the Tukey test ($p < 0.05$).

3 RESULTS AND DISCUSSION

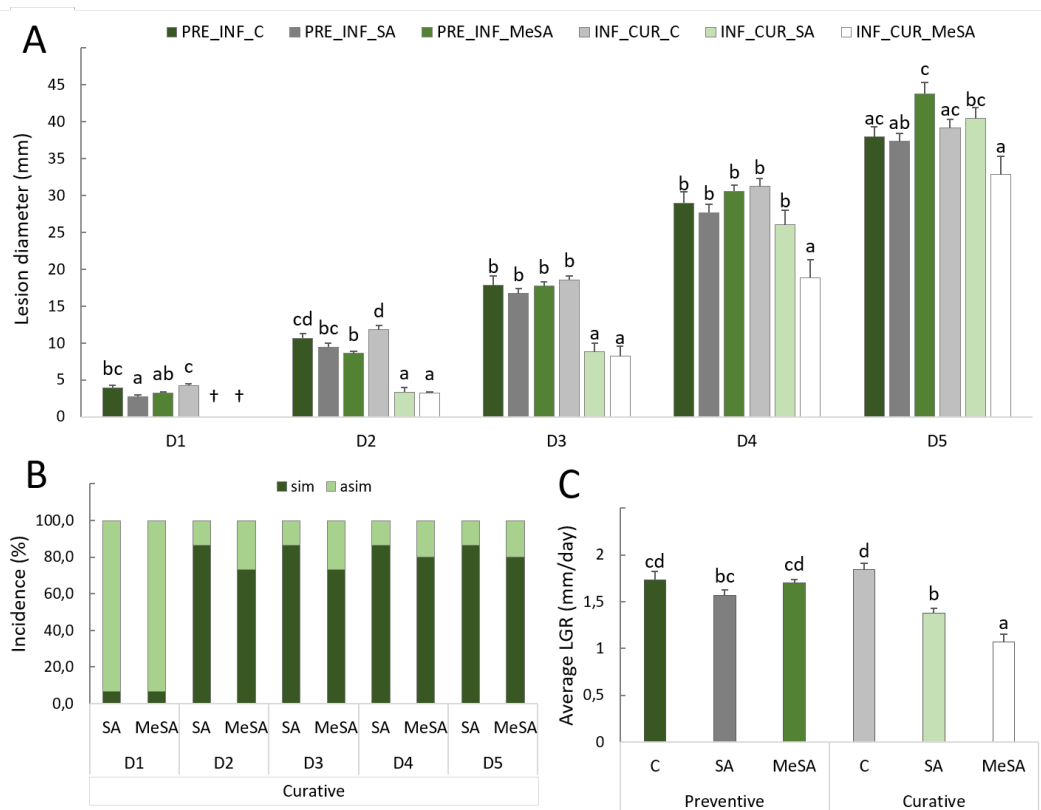


Figure 1: Curative (CUR) and preventive (PRE) treatments of apple fruits with 2.5 mM SA and MeSA solutions and infection with *M. laxa*. A - severity (mm) on different sampling dates after infection (after 3 days (D1), 7 days (D2), 10 days (D3), 14 days (D4) and 18 days (D5)), B - incidence (%) in symptomatic (sim) and asymptomatic (asim) fruit, C- average lesion growth rate (LGR) in 18 days (mm/day). Data represent the average $\pm$ standard error. Different upper letters indicate significant differences between the treatments (Tukey test, $p \leq 0.05$).

The intensity of infection of apple fruit with the fungus *M. laxa* was measured by the diameter of the lesion (Figure 1A). It increased in all treatments over the course of the sampling dates. However, there were differences between the sampling dates of each treatment. With CUR

application of 2.5 mM MeSA, the intensity of infection was significantly lower than in the control or PRE treatments on all 18 days. The effect of SA at CUR was similar during the first 14 days (up to date D4) but decreased thereafter. PRE did not differ from the control. CUR was most successful in controlling brown rot up to 3 days after infection (D1), with only 6.7% of infected fruit (Figure 1B). 7 days (D2) after infection, incidence was already 86.7% (SA) and 73% (MeSA) and at 18 days after infection, CUR incidence was reduced by 13.3% (SA) and 20% (MeSA). Significant differences were observed between CUR and PRE treatments in average lesion growth rate (LGR; Figure 1C). LGR on CUR fruit remained significantly different from the other treatments. The better persistence of SA and MeSA in the tissues might be the reason why CUR was more successful in slowing the progression of *M. laxa* infection (Gacnik et al., 2021), since the content of SA and MeSA in the apple peel was high in the first hours after dipping significantly lower after 24h. This probably means that the content of SA and MeSA in the apple peel at the time of infection (24h after dipping) in PRE treatments was too low to be protective against the pathogen.

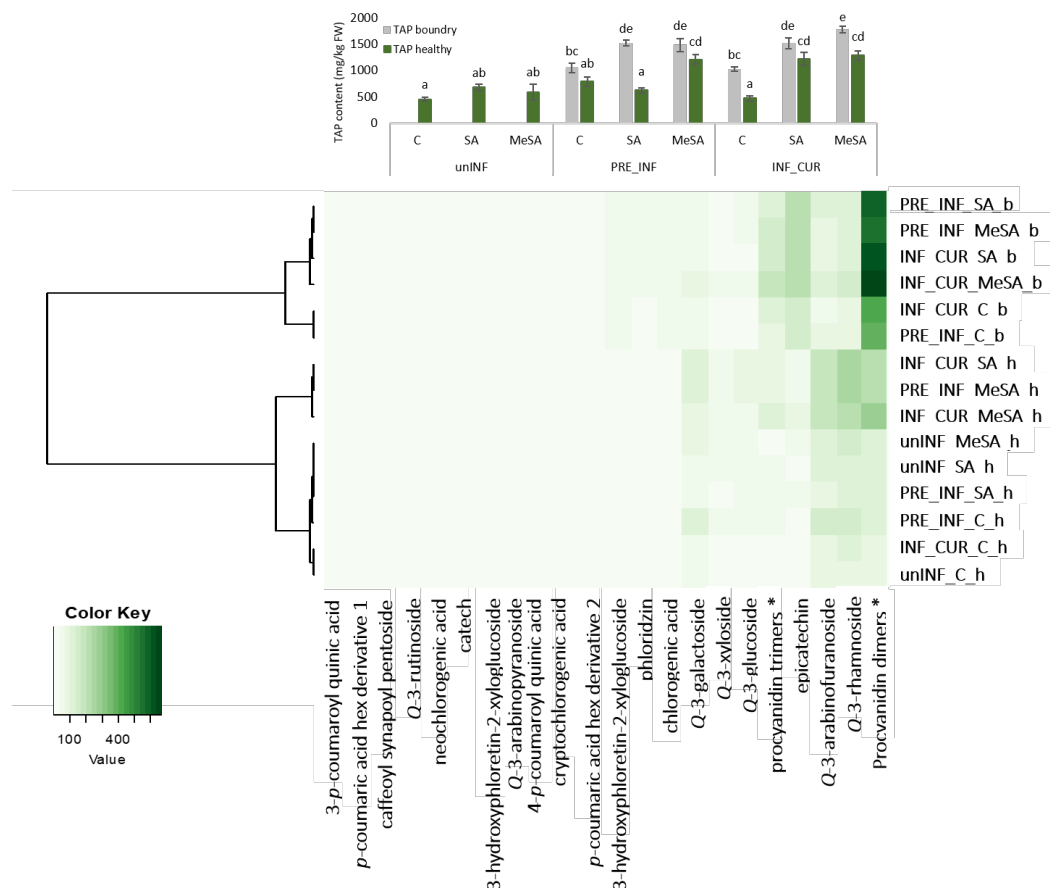


Figure 2: Heatmap of the content of all analyzed individual phenolic compounds (mg/kg FW) in uninfected (unINF) and infected (INF) healthy (h) and boundary (b) tissue of apple peel around the lesion caused by the fungus *M. laxa*, treated preventively (PRE) and curatively (CUR) with salicylic acid (SA) and methyl-salicylic acid (MeSA). On the left side, a hierarchical diagram was obtained using the squared Euclidean distance and Ward's method. Above the heatmap, results for total analyzed phenolic content (TAPC; mg/kg FW). C: control, Q: quercetin, *: Sum of all derivatives. Bright green, lower content of individual phenolics; dark green, higher content of individual phenolics.

No difference in the diversity of individual phenolic compounds of the different tissues was observed between the treatments (Figure 2), although the contents differed. As generally shown, the highest content of individual phenolic compounds was found in SA and MeSA treated boundary tissue of infected fruits, and consequently also of total analyzed phenolic compounds (TAPC). The exception were the quercetin derivatives, which content was higher in healthy tissue of infected and treated fruits. The response of apples to infection was strongest in the boundary tissue, with an increase in flavanols (FLA) and dihydrochalcones (DHC), since in all infected apples, their contents were higher in the boundary tissues around the lesion than in healthy tissues. Untreated boundary tissues had a 3.4-fold (PRE) and 4.7-fold (CUR) higher content of FLA than healthy tissues. In particular, the content of procyanidin and epicatechin derivatives was markedly higher in the boundary tissue. These increased even more in treatments with salicylates. In general, individual hydroxycinnamic acids (HCA) responded similarly to treatments with SA or MeSA and to infection with *M. laxa*, as well as total HCA. Chlorogenic acid, the most abundant compound of this group, was up to 6.6-fold higher (INF_CUR_C) in boundary tissue of infected apple peel compared to healthy tissue. Increased content of chlorogenic acid have already been associated with a reduction in the fruit susceptibility to brown rot (Lee & Bostock, 2007; Obi et al., 2020; Villarino et al., 2011). The difference in TAPC content between healthy and boundary tissue of treated infected fruits decreased at the expense of an increase in the content of phenols in healthy treated tissue. This was especially clear with curatively used SA (1.2 times higher TAPC in the border tissue) and MeSA (1.4 times higher TAPC in the border tissue). TAPC also increased significantly in boundary tissue of infected fruits, especially in the SA and MeSA treatments, regardless of the type of use. It has been suggested that SA inhibits catalase activity, which leads to increased H₂O₂ levels that induce gene expression of PAL (Desikan et al., 1998) and synthesis of phenolic compounds (Dorey et al., 1997).

4 CONCLUSIONS

CUR use of 2.5 mM SA and MeSA slowed the progression of brown rot infection. On the other hand, PRE showed no significant differences with the control. This could be due to the low persistence of SA and MeSA in apple peel after treatment. Analysis of phenolic compound content by HPLC-MS revealed only phytoanticipins, which in most cases increased with infection in the boundary tissue around the peel, with the exception of flavonols (FLO), whose content was the highest in the healthy tissue of the infected fruit. On the other hand, FLA, HCA and DHC were higher in the boundary tissue, and the difference in the content of the compounds between healthy and boundary tissue was greater. We hypothesize that DHC and FLA elicited a stronger response to infection and treatments with SA and MeSA. The use of salicylates decisively increased the content of FLA, HCA and DHC in the boundary tissue around the lesion, whereas in healthy peel tissue only CUR treatments affected the content of FLO, FLA, HCA and TAP in infected fruit.

5 REFERENCES

- Abbasi, P. A., Ali, S., Braun, G., Bevis, E., & Fillmore, S. (2019). Reducing apple scab and frogeye or black rot infections with salicylic acid or its analogue on field-established apple trees. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(3), 345–354. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1610070>
- Babalar, M., Asghari, M., Talaei, A., & Khosroshahi, A. (2007). Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit. *Food Chemistry*, 105(2), 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.021>
- Calzadilla, A., Rehdanz, K., Betts, R., Falloon, P., Wiltshire, A., & Tol, R. S. J. (2013). Climate change impacts on global agriculture. *Climatic Change*, 120(1–2), 357–374. <https://doi.org/10.1007/s10584-013-0822-4>
- da Rocha Neto, A. C., Luiz, C., Maraschin, M., & Di Piero, R. M. (2016). Efficacy of salicylic acid to reduce *Penicillium expansum* inoculum and preserve apple fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.007>
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, T. J., & Neill, J. S. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemical Journal*, 330(1), 115–120. <https://doi.org/10.1042/bj3300115>
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.-A., Saindrenan, P., Fritig, B., & Kauffmann, S. (1997). Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 10(5), 646–655. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.5.646>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Filgueiras, C. C., Martins, A. D., Pereira, R. V., & Willett, D. S. (2019). The Ecology of Salicylic Acid Signaling: Primary, Secondary and Tertiary Effects with Applications in Agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5851. <https://doi.org/10.3390/ijms20235851>
- Gacnik, S., Munda, A., Veberic, R., Hudina, M., & Mikulic-Petkovsek, M. (2023). Preventive and Curative Effects of Salicylic and Methyl Salicylic Acid Having Antifungal Potential against *Monilinia laxa* and the Development of Phenolic Response in Apple Peel. *Plants*, 12(8), 1584. <https://doi.org/10.3390/plants12081584>

- Gačnik, S., Veberič, R., Hudina, M., Koron, D., & Mikulič-Petkovšek, M. (2021). Salicylate Treatment Affects Fruit Quality and Also Alters the Composition of Metabolites in Strawberries. *Horticulturae*, 7(10), 400. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100400>
- Gacnik, S., Veberič, R., Hudina, M., Marinovic, S., Halbwirth, H., & Mikulič-Petkovšek, M. (2021). Salicylic and Methyl Salicylic Acid Affect Quality and Phenolic Profile of Apple Fruits Three Weeks before the Harvest. *Plants*, 10(9), 1807. <https://doi.org/10.3390/plants10091807>
- Giménez, M. J., Valverde, J. M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., & Castillo, S. (2014). Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chemistry*, 160, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.107>
- Halim, V. A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D., & Rosahl, S. (2007). Salicylic Acid Is Important for Basal Defense of *Solanum tuberosum* Against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 20(11), 1346–1352. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1346>
- Klessig, D. F., & Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*, 26(5), 1439–1458. <https://doi.org/10.1007/BF00016484>
- Lee, M.-H., & Bostock, R. M. (2007). Fruit Exocarp Phenols in Relation to Quiescence and Development of *Monilinia fructicola* Infections in *Prunus* spp.: A Role for Cellular Redox? *Phytopathology®*, 97(3), 269–277. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-3-0269>
- Obi, V. I., Montenegro, J., Barriuso, J. J., Saidani, F., Aubert, C., & Gogorcena, Y. (2020). Is the Tolerance of Commercial Peach Cultivars to Brown Rot Caused by *Monilinia laxa* Modulated by its Antioxidant Content? *Plants*, 9(5), 589. <https://doi.org/10.3390/plants9050589>
- Raskin, I. (1992). Role of Salicylic Acid in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 439–463. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255>
- Stella de Freitas, T. F., Stout, M. J., & Sant’Ana, J. (2019). Effects of exogenous methyl jasmonate and salicylic acid on rice resistance to *Oebalus pugnax*: Effects of exogenous methyl jasmonate and salicylic acid on rice resistance to *O. pugnax*. *Pest Management Science*, 75(3), 744–752. <https://doi.org/10.1002/ps.5174>
- Tyagi, P., Singh, A., Gupta, A., Prasad, M., & Ranjan, R. (2022). Mechanism and function of salicylate in plant toward biotic stress tolerance. In *Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture* (pp. 131–164). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91005-7.00018-7>
- Villarino, M., Sandín-España, P., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2011). High Chlorogenic and

- Neochlorogenic Acid Levels in Immature Peaches Reduce *Monilinia laxa* Infection by Interfering with Fungal Melanin Biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3205–3213. <https://doi.org/10.1021/jf104251z>
- Wang, J., Allan, A. C., Wang, W., & Yin, X. (2022). The effects of salicylic acid on quality control of horticultural commodities. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 50(2–3), 99–117. <https://doi.org/10.1080/01140671.2022.2037672>
- Yao, H., & Tian, S. (2005). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 35(3), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.09.001>
- Zainuri, Joyce, D. C., Wearing, H., Coates, L., & Terry, L. (2001). Effects of phosphonate and salicylic acid treatments on anthracnose disease development and ripening of ‘Kensington Pride’ mango fruit. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(6), 805. <https://doi.org/10.1071/EA99104>

Aroma variability of everbearing strawberry cultivar 'Capri' during the harvest season

Kristyna ŠIMKOVA^{1*}, Metka HUDINA¹, Mariana Cecilia GROHAR¹, Tea IVANCIC¹, Tina SMRKE¹, Massimiliano PELACCI¹, Jerneja JAKOPIC¹

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Ljubljana, Slovenia

* kristyna.simkova@bf.uni-lj.si

Abstract: Strawberry flavour is determined by the sugar and organic acid content, but also by the volatile compounds, which may affect the overall liking and sweetness perception of the consumers. However, the content of volatile compounds is affected by different factors including environmental ones, such as temperature or sunshine duration. This study focused on the effect of these factors on the content of important strawberry aroma markers in the everbearing strawberry 'Capri' over one harvest period. The aroma compounds were extracted by simultaneous distillation and analysed by GC-MS using 17 aroma markers. The results show that the synthesis of some of the more complex aroma markers such as *trans*-nerolidol, β -ionone and γ -dodecalactone is higher at lower temperatures and shorter sunshine duration, while the synthesis of hexanal, methyl butyrate and mesifurane increased with higher temperatures and longer sunshine duration. The total content of aroma compounds was highest at the end of the harvest period in October, which can be identified as the optimal harvest point when it comes to aroma.

Key words: *Fragaria* $\times$ *ananassa*; strawberry; aroma; harvest time; volatile; GC-MS; environmental variation

Spreminjanje arome plodov večkrat rodnega žlahtnega jagodnjaka sorte 'Capri' med obiranjem

Izveček: Okus jagod, poleg vsebnosti sladkorjev in organskih kislin, določa prisotnost hlapnih spojin, ki vplivajo na skladnost okusa in splošno sprejemljivost pri potrošnikih. Na količino hlapnih spojin vplivajo različni dejavniki, vključno z okoljskimi dejavniki, kot sta temperatura in osvetlitev. V tej raziskavi smo se osredotočili na učinek teh dveh dejavnikov na vsebnost tipičnih snovi, ki določajo aromo plodov večkrat rodne sorte 'Capri' v različnih terminih obiranja. Za določanje hlapnih snovi smo uporabili metodo destilacije s sočasno ekstrakcijo in s sistemom plinske kromatografije (GC-MS) določili 17 značilnih hlapnih snovi jagode. Rezultati kažejo, da je sinteza nekaterih kompleksnejših komponent arome jagode, kot so *trans*-nerolidol, β -ionon in γ -dodekalakton, večja pri nižjih temperaturah in krajšem trajanju sončnega obsevanja, medtem ko se sinteza heksanala, metil butirata in mezifurana poveča pri višjih temperaturah in daljšem obdobju sončnega obsevanja. Skupna količina hlapnih snovi je bila največja v zadnjih terminih obiranja v oktobru, ki so najprimernjši z vidika arome.

Ključne besede: (*Fragaria* $\times$ *ananassa*; jagoda; aroma; čas obiranja; hlapne snovi; GC-MS; okoljski dejavniki)

1 INTRODUCTION

Strawberries are one of the most popular red berry fruits. This can be attributed to their characteristic flavour, which depends on the sugar/acid ratio of the fruit, but also their aroma profile (Kader, 1991; Ulrich et al., 2018). The aroma of strawberries is determined by the content of volatile compounds, and over 360 such compounds have been identified in cultivated and wild strawberries (Fan et al., 2021). These compounds can significantly modify the taste perception even though they account for only 0.001-0.01% of the fruit weight (Yan et al., 2018). Different types of volatile compounds can be found in strawberries, including esters, furans, terpenoids, aldehydes, alcohols, ketones, acids, lactones, sulphur compounds, and acetals (Pérez & Sanz, 2010).

The strawberry fruit quality, including the aroma, can be influenced by a number of factors, such as the cultivar, environmental conditions, and the ripening stage (Cozzolino et al., 2021; Pérez et al., 1996; Ulrich & Olbricht, 2016). It has been previously reported that strawberries exhibit differences in volatile compounds content between harvest years, and it depends on the specific cultivar how stable that content is (Olbricht et al., 2011). Even though the effect of environmental factors on fruit quality is well known in strawberries, it is not so well studied when it comes to their aroma profile. The temperature and light intensity during postharvest storage have been reported to have an influence on aroma (Fu et al., 2017; Li et al., 2021; Miszczak et al., 1995; Pérez et al., 1996), but no studies have been performed to study the influence of these factors during the harvest season. Furthermore, since there is an increasing demand for strawberries throughout the whole year, the importance of everbearing cultivars has also increased (Mezzetti et al., 2018).

Therefore, the purpose of this work was to describe the changes in the content of important aroma markers in an everbearing cultivar 'Capri' throughout the harvest season. Additionally, the relation between the environmental factors (temperature, relative humidity, and sunshine duration) was assessed in order to determine the optimal harvest and growing conditions during the production season for the selected cultivar to improve fruit aroma.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

The experiment was carried out in Pesje, southeast Slovenia (latitude 45°56'26'' N, longitude 15°33'11'' E), in an open field with an integrated production system equipped with a drip irrigation system. The selected cultivar was planted in autumn 2020. The strawberry cultivar 'Capri' was chosen because it is a commonly grown everbearing cultivar in Slovenia, provides a high yield and has a good disease resistance. Strawberry fruit was collected between the end of June and the end of October 2021 every second week, and a total of 10 harvests were collected. Only fully ripe fruit was selected for this experiment. The samples were prepared by pooling at least 15 strawberry fruits from the whole plot and the samples were stored at -80 °C until further analysis.

2.2 Environmental conditions

Temperature and relative humidity (RH) data were recorded hourly using sensors (Votcraft DL-121TH; Hirschau, Germany) in the fields. Data on sunshine duration were obtained from Slovenian Environment Agency (ARSO) at the meteorological station in Novo mesto.

2.4 Aroma analysis

Analysis of aroma compounds followed the standard method for determination of aroma compounds in foods BVL L 00.00-106:2006-12 (2006) with minor modifications.

Prior to the analysis, the sample was ground in an IKA A11 basic grinder (IKA-Werke, Staufen, Germany) at low temperature using liquid nitrogen. The simultaneous distillation extraction was done from 30 g of sample with the addition of qualitative and quantitative standards, and pH was adjusted to neutral values (pH 6-7) before distillation. As extraction solvent, 10 g of a mix of diethyl ether and pentane (1:1) was used. The sample was distilled for 1 h 50 min.

The extracts were analysed within the same day using a GC system 8890 coupled with GC-MS system 5977B (Agilent Technologies, USA) with column Rtx-VMS 30 m x 0.25 mm ID x 1.4 µm film thickness (Restek, USA) and using H₂ as carrier gas at a constant flow of 1.6 ml/min. The injection volume was 2 µl, and the inlet temperature was 220 °C. The initial oven temperature was programmed at 35 °C for 1 min, and then the temperature programme was as follows: increase to 110 °C at 10 °C/min, increase to 150 °C at 50 °C/min, increase to 260 °C at 15 °C/min and hold at final temperature for 3 min. Mass spectrometric data were collected by scanning *m/z* within the range of defined quantification and qualification ions of the selected aroma markers. Based on the literature, 17 aroma markers were selected as these compounds are specific for strawberry aroma and significantly affect the aroma perception of the fruit. Calibration curves were constructed for each marker compound using a linear regression model going through 0 ($R^2 > 0.99$). The content of these markers in samples was calculated accordingly, and a correction factor based on the recovery rate of the quantitative standard was applied. The obtained recovery rate of the standard was higher than 80%. The analysis was done in triplicates.

2.3 Statistical analysis

The data were statistically analysed in R, version x64 4.1.2, using the Rcmdr graphical interface package, version 2.8-0. The data were expressed as means ± standard error. To determine the correlations of the content with environmental conditions (temperature, relative humidity and sunshine duration), the Pearson correlation test was applied, and a significant correlation was considered at $p < 0.05$. For the correlation, the average value of each variable 7 days before the collection of the fruit was considered.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Volatile compounds, together with sugars and organic acids, are the primary sensory elicitors of taste and consequently influence the perception of flavour in strawberries (Schwieterman et al., 2014). As shown in Figure 1, there are significant differences in the content on aroma markers between the harvest points. The total content of selected aroma markers was the highest at the end of the harvest period. As reported by Simkova et al. (2023), the sugar/acid ratio in this cultivar also increases at the end of the harvest period, which suggests that these strawberries would be best perceived by consumers at that time. However, it is important to look at the whole aroma profile as the individual aroma markers contribute to the sweetness perception and overall liking by consumers differently (Fan et al., 2021; Schwieterman et al., 2014). Our results show that the aroma profile of the studied strawberries changes over the harvest period (Figure 2). While at the beginning of the harvest season the most abundant aroma markers are furanes (in our case mesifurane), at the end of the harvest season the most abundant group are lactones. This could be partly explained by the effect of the environmental factors on the compounds.

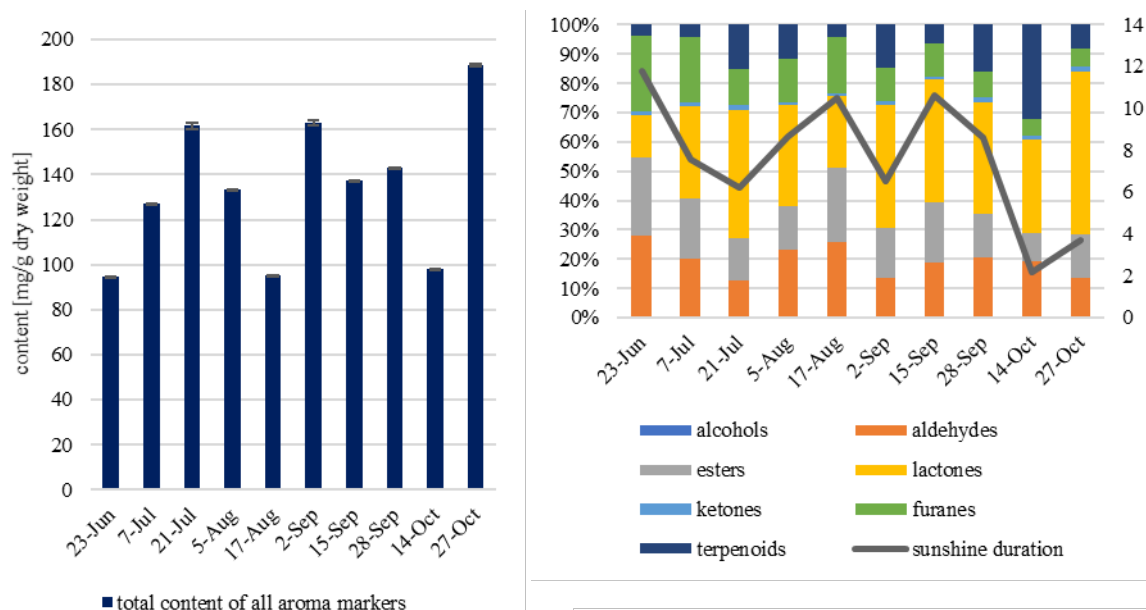


Figure 1 Total content of all aroma markers in strawberry cultivar "Capri" at different harvest points

Figure 2 Relative content of different groups of aroma compounds in strawberry cultivar "Capri" and average sunshine duration 7 days before harvest point

As shown in Table 1, although the total content of the aroma markers shows no correlation with the environmental factors, some of the individual aroma markers do. While hexanal, methyl butyrate and mesifurane show a positive correlation with temperature, *trans*-nerolidol, β -ionone, γ -dodecalactone, hexyl acetate, and ethyl butyrate show a negative correlation. The strongest positive effect of temperature was observed for mesifurane, and the strongest negative correlation was observed for γ -dodecalactone. However, within the same group, all compounds do not show the same trend. Among esters, a positive correlation with temperature and sunshine duration was observed for methyl butyrate, but the opposite trend was observed for ethyl butyrate. A similar effect of temperature on these compounds was reported in postharvest storage (Miszczak et al., 1995) and was attributed to the specific effect of temperature on each

biosynthetic pathway, as methyl-esters and ethyl-esters come from different precursors. Overall, the content of esters showed a positive correlation with sunshine duration and a negative correlation with relative humidity, which can be attributed to the effect of these factors on the methyl-esters, as they are more abundant than other esters. Additionally, the content of mesifurane increased with temperature and sunshine duration. A similar effect of temperature has been reported in postharvest storage (Fu et al., 2017; Pérez et al., 1996) and it can be attributed to the conversion of furaneol to mesifurane at high temperatures. A positive correlation with temperature was also observed for hexanal and a positive effect of sunshine duration was observed for both hexanal and *trans*-2-hexenal, which suggests that also the biosynthesis of these compounds is affected by the environment.

However, among the terpenoids, *trans*-nerolidol content decreased with higher temperatures and longer sunshine duration, which could be attributed to the effect of light on the regulation of terpene synthesis, which has been previously reported in postharvest conditions (Fu et al., 2017) and did not affect the linalool content, which is in an agreement with our results. The same effect was observed for β -ionone, suggesting that temperature and sunshine duration also effect biosynthesis of this compound. Furthermore, while γ -dodecalactone shows a strong negative correlation with temperature and sunshine duration, γ -decalactone doesn't show any. However, out of these two lactones, γ -dodecalactone was reported to contribute to the overall liking of the fruit in consumer tests (Fan et al., 2021). These results suggest that the synthesis of more complex molecules is inhibited by higher temperatures.

Table 1: Pearson correlation of selected aroma markers with environmental conditions (temperature, relative humidity, sunshine duration) in strawberry cultivar 'Capri'

Aroma marker	Sensory description	Pearson correlation		
		temperature	rel. humidity	sunshine duration
alcohols				
<i>cis</i> -3-hexenol	grassy, green ¹	ns	ns	ns
aldehydes				
<i>trans</i> -2-hexenal	green, fatty ¹	ns	ns	0.44
hexanal	grass, tallow, fat ²	0.77	-0.84	0.78
nonanal	fat, citrus, green ²	ns	ns	ns
sum		ns	-0.45	0.57
esters				
methyl butyrate	fruity, ester-like, green ¹	0.43	-0.64	0.61
ethyl butyrate	fruity, ester-like, sweet ¹	-0.52	0.57	-0.49

methyle hexanoate	fruity, ester-like ¹	ns	-0.39	ns
methyle cinnamate	strawberry ²	ns	ns	ns
benzyle acetate	fresh, boiled vegetable ²	ns	ns	ns
hexyle acetate	fruit, herb ²	-0.39	0.43	ns
sum		ns	-0.46	0.46
lactones				
γ -decalactone	fruity, lactone-like, cocos ¹	ns	ns	ns
γ -dodecalactone	sweet, flower, fruit ³	-0.74	0.74	-0.68
sum		-0.47	0.39	ns
ketons				
β -ionone	floral, crude, violet ¹	-0.65	0.67	-0.68
2-pentanone	thinner, acetone ¹	ns	ns	ns
sum		ns	ns	ns
furanes				
mesifurane	fruity, caramel, green ¹	0.83	-0.76	0.49
terpenoids				
linalool	flowery, sweet ¹	ns	ns	ns
<i>trans</i> -nerolidol	wood, flower, wax ²	-0.63	0.67	-0.69
sum		-0.62	0.66	-0.67
sum of all		ns	ns	ns

Correlation listed when significant at $p < 0.05$. Ns, not significant. References for sensory description: ¹(Ulrich et al., 1997); ²(Acree & Arn, n.d.); ³(Leonardou et al., 2021).

4 CONCLUSIONS

Our results suggest that the synthesis of volatile organic compounds is very specific for each compound type, and the effect of harvest conditions needs to be assessed based on the individual aroma profile and the volatile compounds present. While at higher temperatures and longer sunshine duration the content of hexanal, methyl butyrate and mesifurane, which can be considered more ‘green’ aroma notes, is higher, at lower temperatures and shorter sunshine

duration, the content of *trans*-nerolidol, β -ionone, γ -dodecalactone, and ethyl butyrate is higher, which can contribute to a more ‘fruity’ and ‘floral’ aroma notes. In general, the total content of aroma markers was highest at the end of the harvest which seems to be the optimal harvest time when it comes to aroma.

FUNDING

This work received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 956257. The authors also acknowledge the financial support of the Slovenian Research Agency 449 (ARRS) within the research programme Horticulture (P4-0013) and within the infrastructural centre IC RRG-AG (IO-0022-0481-001).

5 REFERENCES

- Acree, T., & Arn, H. (n.d.). Flavornet and human odor space. Retrieved 6 April 2023, from <https://www.flavornet.org/index.html>
- Beuth Verlag GmbH. (2006). BVL L 00.00-106:2006-12. Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der Konzentrationen und Enantiomerenverhältnisse chiraler Aromastoffe in Lebensmitteln
- Cozzolino, R., Pace, B., Palumbo, M., Laurino, C., Picariello, G., Siano, F., De Giulio, B., Pelosi, S., & Cefola, M. (2021). Profiles of Volatile and Phenolic Compounds as Markers of Ripening Stage in Candonga Strawberries. *Foods*, 10(12), 3102. <https://doi.org/10.3390/foods10123102>
- Fan, Z., Hasing, T., Johnson, T. S., Garner, D. M., Schwieterman, M. L., Barbey, C. R., Colquhoun, T. A., Sims, C. A., Resende, M. F. R., & Whitaker, V. M. (2021). Strawberry sweetness and consumer preference are enhanced by specific volatile compounds. *Horticulture Research*, 8(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00502-5>
- Fu, X., Cheng, S., Zhang, Y., Du, B., Feng, C., Zhou, Y., Mei, X., Jiang, Y., Duan, X., & Yang, Z. (2017). Differential responses of four biosynthetic pathways of aroma compounds in postharvest strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) under interaction of light and temperature. *Food Chemistry*, 221, 356–364. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.10.082>
- Kader, A. A. (1991). Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. In *The strawberry into the 21st century* (pp. 145–152).
- Leonardou, V. K., Doudoumis, E., Tsormpatsidis, E., Vysini, E., Papanikolopoulos, T., Papisotiropoulos, V., & Lamari, F. N. (2021). Quality traits, volatile organic compounds, and expression of key flavor genes in strawberry genotypes over harvest period. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13499.

<https://doi.org/10.3390/IJMS222413499/S1>

- Li, Y., Zhang, Y., Liu, X., Xiao, Y., Zhang, Z., Shi, Y., Kong, W., Yang, X., Jiang, G., Zhang, B., & Chen, K. (2021). Cultivation conditions change aroma volatiles of strawberry fruit. *Horticulturae*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7040081>
- Mezzetti, B., Giampieri, F., Zhang, Y.-T., & Zhong, C.-F. (2018). Status of strawberry breeding programs and cultivation systems in Europe and the rest of the world. *Journal of Berry Research*, 8, 205–221. <https://doi.org/10.3233/JBR-180314>
- Miszczak, A., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1995). Development of aroma volatiles and color during postharvest ripening of ‘Kent’ strawberries. In *American Society for Horticultural Science* (Vol. 120, pp. 650–655).
- Olbricht, K., Ulrich, D., Weiss, K., & Grafe, C. (2011). Variation in the Amounts of Selected Volatiles in a Model Population of *Fragaria × ananassa* Duch. As Influenced by Harvest Year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 944–952. <https://doi.org/10.1021/jf1034948>
- Pérez, A. G., Olías, R., Sanz, C., & Olías, J. M. (1996). Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3620–3624. <https://doi.org/10.1021/jf960099m>
- Pérez, A. G., & Sanz, C. (2010). Strawberry Flavor. *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*, 431–449. <https://doi.org/10.1002/9780470622834.CH23>
- Schwieterman, M. L., Colquhoun, T. A., Jaworski, E. A., Bartoshuk, L. M., Gilbert, J. L., Tieman, D. M., Odabasi, A. Z., Moskowitz, H. R., Folta, K. M., Klee, H. J., Sims, C. A., Whitaker, V. M., & Clark, D. G. (2014). Strawberry Flavor: Diverse Chemical Compositions, a Seasonal Influence, and Effects on Sensory Perception. *PLOS ONE*, 9(2), e88446. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088446>
- Simkova, K., Veberic, R., Hudina, M., Grohar, M. C., Ivancic, T., Smrke, T., Pelacci, M., & Jakopic, J. (2023). Variability in ‘Capri’ Everbearing Strawberry Quality during a Harvest Season. *Foods*, 12(6), 1349. <https://doi.org/10.3390/foods12061349>
- Ulrich, D., Hoberg, E., Rapp, A., & Kecke, S. (1997). Analysis of strawberry flavour - discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 205(3), 218–223. <https://doi.org/10.1007/S002170050154/METRICS>
- Ulrich, D., Kecke, S., & Olbricht, K. (2018). What Do We Know about the Chemistry of Strawberry Aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3291–3301. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01115>
- Ulrich, D., & Olbricht, K. (2016). A search for the ideal flavor of strawberry-Comparison of

consumer acceptance and metabolite patterns in *Fragaria* × *ananassa* Duch. Article in Journal of Applied Botany and Food Quality. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.029>

Yan, J. wei, Ban, Z. jun, Lu, H. yan, Li, D., Poverenov, E., Luo, Z. sheng, & Li, L. (2018). The aroma volatile repertoire in strawberry fruit: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4395–4402. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9039>

TEHNIŠKI SISTEMI V BIOTEHNIKI

Programska oprema SiaPy za enostavno segmentacijo spektralnih slik

Janez LAPAJNE^{1,*}, Ana VOJNOVIĆ², Uroš ŽIBRAT¹

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana, Slovenija

² Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje, Ljubljana, Slovenija

* janez.lapajne@kis.si

Programska oprema SiaPy za enostavno segmentacijo spektralnih slik

Izvleček: Komercialna programska oprema je pogosto draga in zato večini uporabnikov nedostopna. Odprtokodna programska oprema lahko olajša analizo, vendar je običajno uporabniku manj prijazna. Cilj te raziskave je bil razviti, preizkusiti ter izboljšati odprtokodno programsko opremo SiaPy (Spectral imaging analysis for Python). Programsko opremo smo ovrednotili na naboru hiperspektralnih podatkov, z eno sorto krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v kontrolnih in sušnih razmerah. Rezultati pilotnega primera potrjujejo učinkovitost uporabe SiaPy v poljedelstvu, zlasti v primerih, ko je treba obdelati večje število spektralnih slik. Poleg tega je lahko odlična zamenjava za komercialno programsko opremo, uporabljeno za segmentacijo spektralnih slik.

Ključne besede: segmentacija slik, hiperspektralno snemanje, odprto kodna programska oprema, Python

The SiaPy software for easy segmentation of spectral images.

Abstract: Commercial software is often too expensive and therefore inaccessible to most users. Open source software can facilitate analysis, but is usually less user-friendly. The aim of this research was to develop, test, and improve the open-source SiaPy software (Spectral imaging analysis for Python). The software was evaluated on a hyperspectral dataset showing a variety of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) under control and drought conditions. The results of the pilot study confirm the effectiveness of using SiaPy in agriculture, especially in cases where a large number of hyperspectral images need to be processed. Additionally, it can be an excellent alternative to commercial software used for hyperspectral image segmentation.

Key words: image segmentation, hyperspectral imaging, open-source software, Python

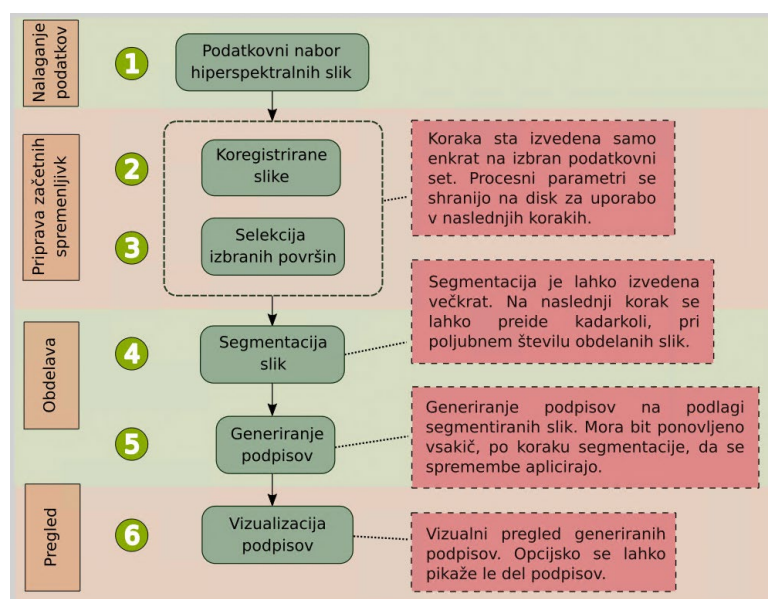
1 UVOD

Hiperspektralno slikanje je tehnika daljinskega zaznavanja, pri kateri posnamemo sliko pri različnih valovnih dolžinah in tako dobimo informacijo o spektralnih in prostorskih značilnostih objekta (Lowe et al., 2017). V agronomiji in preciznem kmetijstvu se uporablja kot neinvazivna metoda za odkrivanje različnih stresorjev, ki vplivajo na zdravje rastlin. Izpostavljenost stresu sproži aktivacijo obrambnih mehanizmov v rastlini (Susič et al., 2018). Ti delujejo tako, da spremenijo biofizikalne in biokemične lastnosti rastlinskega tkiva, kar se odraža tudi v spremembah spektralnih karakteristik (Martinelli et al., 2015; Thomas et al., 2018). Hiperspektralne kamere zajemajo odbito svetlobo z visoko spektralno ločljivostjo. Hiperspektralna slika običajno vključuje več kot dvajset kanalov, pri čemer posamezen pripada vnaprej določenemu spektralnemu pasu (Mahlein, 2016). Ti so enakomerno porazdeljeni po svetlobnem spektru, ki ga senzor zajema (Moghimi et al., 2018). Velik izziv pri raziskavah, ki vključujejo hiperspektralno slikanje, predstavlja proces obdelave slik in pridobivanje končnih rezultatov (Lapajne et al., 2022). Delo s hiperspektralnimi podatki sestavlja več korakov: (1) zajemanje neobdelanih, surovih spektralnih slik, (2) pretvorba slik v energijsko sevnost (radianco), (3) pretvorba v enote odbojnosti z uporabo referenčnih plošč z znano odbojnostjo (4) segmentacija in pridobivanje podatkov izbranih objektov, npr. posameznih rastlin, (5) izvoz izbranih objektov v željeni izhodni format in (6) nadaljnji specifični koraki za določeno opravilo (Rinnan et al., 2009). Koraka (3) in (4) je mogoče tudi zamenjati, saj je treba vrednosti odbojnosti referenčne plošče izluščiti in uporabiti za umerjanje vrednosti slikovnih pik celotne slike. Za izvedbo katerega koli koraka med (3) in (6) je v splošni rabi programska oprema ENVI (Exelis Visual Information Solutions, Boulder, Colorado), ki velja za industrijski standard za obdelavo slik in analizo hiperspektralnih slik. Gre za kakovosten in uporabniku prijazen program, primeren predvsem za tiste, ki niso večji programiranja. Vendar pa ima številne pomanjkljivosti, med katerimi je ena glavnih tudi visoka cena za vzdrževanje licence. Poleg tega je program zelo splošen, za posebne namene je tako primernejša uporaba drugih, bolj specializiranih programov. V prispevku predstavljamo odprtokodno rešitev SiaPy (Spectral imaging analysis for Python; Lapajne & Žibrat, 2022), programsko opremo za obdelavo hiperspektralnih podatkov, prikaz in analizo. Uporablja prosto dostopne pakete programskega jezika Python in je pakiran kot Docker slika, z enostavno ukazno vrstico. Programska oprema Siapy lahko popolnoma nadomesti ENVI kot orodje za obdelavo hiperspektralnih slik za kmetijske poskuse in je lahko celo boljša rešitev za ponavljajoče se korake segmentacije. Naš glavni cilj je bil uporabiti prvotno izdano različico (v0.1.0) SiaPy in preveriti njeno ustreznost uporabe na lastnem hiperspektralnem naboru podatkov, na slikah posameznih rastlin krompirja. Cilj je bil pridobiti spektralne podpise rastlin iz radiometrično popravljenih slik. Postopek segmentacije je po podanih navodilih izvedla oseba brez programerskih izkušenj. Med izvajanjem procesa smo vse vmesne rezultate shranjevali in jih objektivno vrednotili ter primerjali z zelenimi izidi.

2 MATERIAL IN METODE

Eksperiment v rastlinjaku smo izvedli na Kmetijskem inštitutu Slovenije (Ljubljana, Slovenija) med aprilom do avgustom 2021. Izveden je bil v kontroliranih pogojih osvetlitve (14ur luč,

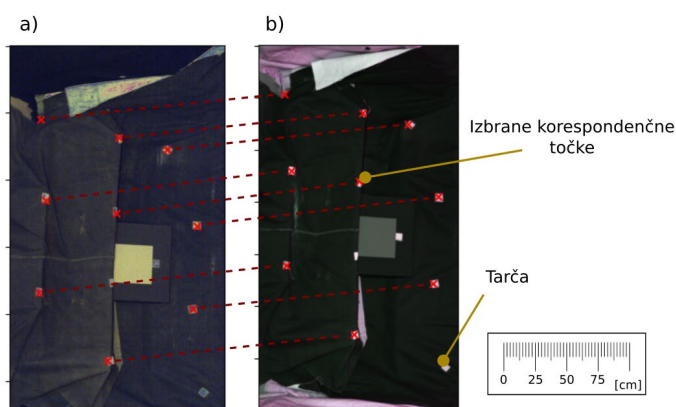
10ur tema), temperature (od 15°C do 21 °C), ter vlažnosti zraka (60% relativna vlažnost). 30 rastlin krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte KIS Krka smo vzgojili iz gomoljev v 5-litrskih lončkih. 15 naključno izbranih rastlin je bilo približno pet tednov po sajenju izpostavljenih režimu pomanjkanja vode, to je zalivanje do 50 % poljske kapacitete substrata. Vlažnost substrata (vlažnost tal) smo spremljali s tenziometri (14.04.04 Jett Fill tensiometers, Eijkelkamp, Giesbeek Nizozemska). Med eksperimentom smo matrični potencial tal vzdrževali med -10 kPa in -25 kPa za dobro zalite rastline ter med -50 kPa in -70 kPa za rastline s pomanjkanjem vode. Hiperspektralno slikanje je bilo izvedeno 21 dni po uvedbi režima pomanjkanja vode. Hiperspektralne slike so bile pridobljene v spektralnih območjih VNIR (visible and near-infrared; vidna do bližnje infrardeča svetloba) in SWIR (short-wave infrared; kratkovalna infrardeča svetloba) z uporabo Hypspx (Norsk Elektro Optikk, Oslo, Norveška) kamer VNIR-1600 (400–988 nm, 160 pasov, pasovna širina 3,6 nm). in SWIR-384 (950–2500 nm, 288 pasov, pasovna širina 5,4 nm). Ločljivost slik je bila 2700 x 1600 za VNIR in 696 x 384 za SWIR. Kamere so bile nameščene na razdalji 3 m od rastlin krompirja skupaj s kalibriranimi halogenskimi žarnicami, slikanje smo izvedli v zatemnjenem prostoru. Naenkrat smo posneli tri rastline krompirja in kalibrirano referenčno ploščo z 20 % odbojnostjo, postavljeno na sintetično ozadje z nizko odbojnostjo (< 5 %). Slike smo radiometrično kalibrirali s programsko opremo proizvajalca kamer Hypspx.



Slika 1: Zaporedje korakov analize z uporabo SiaPy programske opreme.

Celoten postopek za pridobivanje podatkov smo izvedli s programsko opremo SiaPy. Za prikaz slik v RGB barvnem prostoru smo za VNIR uporabili 12., 41. in 55. (453 nm, 559 nm, 610 nm), ter za SWIR 20., 75. in 117. (1059 nm, 1260 nm, 1586 nm,) spektralne pasove. Programska oprema SiaPy je samodejno prebrala izbrane pasove iz glave datoteke ustreznih hiperspektralnih slik. Pri prvem koraku smo usmerili program na lokacijo shranjenih slik, saj smo vse nadaljnje korake izvajali na njih. Nato je sledila priprava spremenljivk, ki je obvezen korak pred procesom segmentacije. Pri obeh kamerah smo izvedli koregistriracijo, tj. opravili

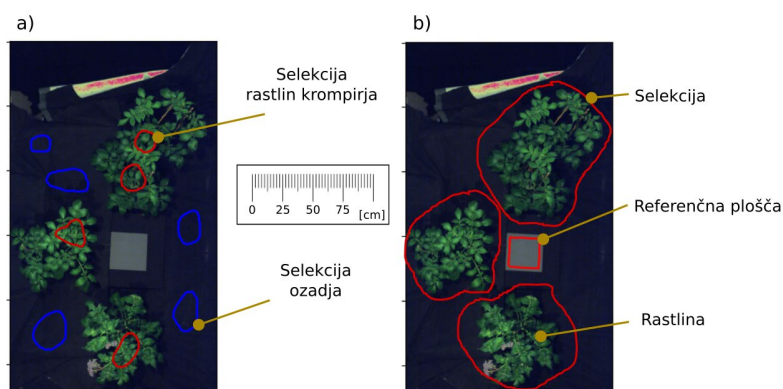
smo geometrijsko transformacijo iz prostora VNIR v prostor SWIR in izbrali različna področja (posamezne rastline, referenčna plošča) na prvi sliki, to sta koraka 2 in 3. Ta dva koraka smo izvedli samo enkrat, saj osvetlitve in nastavitve med zajemanjem nabora podatkov nismo več spreminjali. Za izvedbo koregistracije smo eno slikanje izvedli samo s tarčami, v našem primeru smo uporabili samolepilne lističe, ki smo jih enakomerno porazdelili po celotnem prostoru, ki smo ga zajemali na slikah. Lističi ne bi bili nujno potrebni, vendar so predstavljali lahko vidne ujemaajoče se točke med dvema slikama obeh kamer. Točke v programu smo izbrali v zaporednem vrstnem redu, najprej na prvi in nato na drugi sliki. Kot je prikazano na sliki 2, smo za koregistracijo v tej raziskavi uporabili skupno 9 točk. Število točk je odvisno od želene natančnosti. Za metodo najmanjših kvadratov je bilo potrebnih vsaj 6 homogeno razporejenih točk (Barone et al., 2020), saj SiaPy uporablja direktno linearno transformacijo (DLT) za pretvorbo koordinatnega sistema prve slike v drugo. Večje število izbranih točk običajno pomeni natančnejše rezultate. Transformacijo smo zato izračunali na več kot minimalno ($6 < 9$) zahtevanih ustreznih točkah in jo shranili v pomnilnik za kasnejšo uporabo.



Slika 2: Ujemajoče se točke med slikama a) VNIR in b) SWIR.

Proces segmentacije SiaPy temelji na nadzorovani klasifikaciji slikovnih pik. Zato je treba območja slikovnih pik, ki pripadajo objektu, npr. rastline krompirja in ozadje, najprej izbrati. To smo naredili ročno z uporabo računalniške miške in orodja za izbiro z lasom. Izbiro območij smo naredili samo na sliki VNIR, ker so bila vsa izbrana območja nato s pomočjo transformacije, izračunane v prejšnjem koraku, samodejno prevedena v sliko SWIR. Enako izbiro smo uporabili za segmentacijo vseh 30 slik, saj je bila osvetlitev med zajemanjem teh slik enaka (zagotovljeno s predhodnim 15 minutnim prižigom luči pred samim snemanjem). Poljubno smo izbrali štiri območja rastlin krompirja in pet iz ozadja. Izbirali smo območja z različnih delov slike, da smo ohranili raznolikost (prikazano na Sliki 3). Območja, ki smo jih pridobili iz obeh slik, smo shranili, slikovne pike izbranih območij smo nato uporabili testno klasifikacijo. Klasifikator je nato v koraku segmentacije razlikoval med rastlinami krompirja in ozadjem. Izbira klasifikacijskega algoritma je poljubna, v tem primeru smo uporabili algoritem SVM (Support Vector Machine; metoda podpornih vektorjev). Koraka 4 in 5 v procesu (Slika 1) sta predstavljala segmentacijo slik oziroma ustvarjanje spektralnih podpisov. Pri koraku 4 smo iz slik pridobili in shranili območja rastlin krompirja in referenčne plošče, pri 5 pa izračunali povprečni spektralni podpis izbranih območij za vsako rastlino. Segmentacijo smo izvedli za vse razpoložljive slike v naboru podatkov. Kot prej smo območja izbrali z

uporabo orodja za izbor z lasom, kjer smo rastline krompirja in referenčno ploščo obkrožili, kot je prikazano na sliki 3. Postopek izbire smo ročno izvedli samo na slikah VNIR, ker so bila območja spet samodejno prevedena v slike SWIR z uporabo vnaprej izračunane transformacije. Z izbiro območij oziroma objektov je programska oprema vedela, na katerih delih slike uporabiti postopek segmentacije. Na ta način so bile kot ozadje ali rastlina razvrščene samo slikovne pike znotraj obkroženih območij. Ko so bile vse slike obdelane po opisanem postopku, smo izvedli korak ustvarjanja podpisov, pri čemer smo pridobili 30 spektralnih podpisov, od katerih vsak pripada eni označeni rastlini krompirja. Spektralne podatke iz slik VNIR in SWIR smo združili in ustvarili en spektralni podpis, ki pokriva oba dela. V tem koraku je bil podpis referenčne plošče uporabljen za pretvorbo podpisov z energijsko sevnostjo (radianca) v podpise svetlobne odbojnosti (reflektanca). Te smo shranili v formatu csv za vizualizacijo ali uporabo v morebitnih nadaljnjih analizah. Proces segmentacije in pretvorbe v odbojne podpise je matematično predstavljen tudi v članku Lapajne et al., (2022).

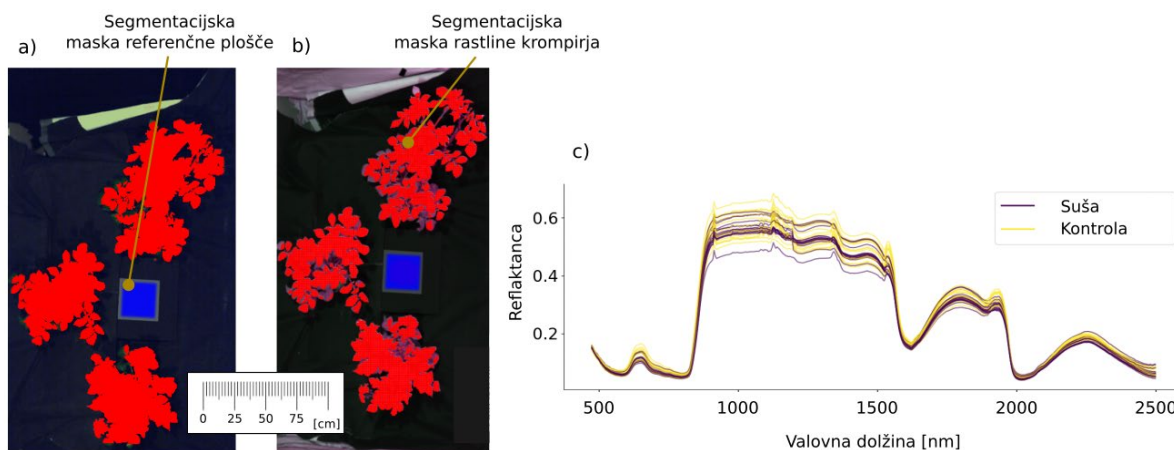


Slika 3: Izbor a) področij z rastlinami krompirja in ozadja ter b) pozicije rastlin krompirja in referenčne plošče pri koraku segmentacije.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Segmentacije rastlin krompirja in referenčne plošče so bile izvedene za vsak par slik VNIR-SWIR. Objekte smo obkrožili in jih vizualno pregledali, da smo preverili ali so bile segmentacije natančno izvedene. Primer takšne segmentacije je prikazan na sliki 4, kjer sta obe sliki prikazani s prekrivajočimi se segmentacijskimi maskami – lokacijami, kjer je program zaznal objekte in jih ločil od ozadja. Segmentacije so bile na splošno zelo natančne, saj je bilo na vsako sliko več kot 95 % vseh slikovnih pik pravilno razvrščenih. Takšen rezultat smo pričakovali, saj se je za to postavitev povprečni spektralni podpis ozadja bistveno razlikoval od podpisov rastlin krompirja. Čas, ki ga je SiaPy potreboval za izvedbo segmentacije, je bil odvisen od velikosti izbranih območij, tj. skupnega števila slikovnih pik. V tem primeru je segmentacija na eno sliko trajala $11 \pm 2,5$ s na računalniku srednjega razreda (Intel Core i7–8550U, 16 GB DDR4). Odbojni podpisi rastlin krompirja so bili ustvarjeni na podlagi lokacij segmentacijskih mask in njihovih osnovnih vrednosti slikovnih pik. Z uporabo preprostih ukazov je program izračunal povprečje vseh vrednosti slikovnih pik, ki pripadajo eni rastlini krompirja, združil VNIR in SWIR del podpisa in ga pretvoril v odbojni podpis. Te je z uporabo programa SiaPy mogoče zlahka predstaviti kot 1-dimenzionalne signale. Takšen izris je

prikazan na sliki 4, kjer so narisani podpisi obeh razredov vodnega režima po ustreznih številkah pasov. Tako dobimo prvi vpogled na vpliv pomanjkanja vode na spremembe spektralnih podpisov rastlin krompirja. Odbojnost dobro namakanih rastlin je na splošno višja v primerjavi z rastlinami izpostavljenimi pomanjkanju vode zaradi sprememb v biokemičnih in biofizikalnih značilnostih rastlin.



Slika 4: Segmentacija posameznih rastlin krompirja in referenčne plošče na sliki a) VNIR in b) SWIR; c) Odbojni podpisi dobro zalitih rastlin (rumene barve) in rastlin s pomanjkanjem vode (vijolične barve).

Za vizualizacijo je mogoče uporabiti različne možnosti, na primer izris posameznih podpisov, predstavitev različnih razredov podpisov, itd. Programska oprema SiaPy se je izkazala za hitro in učinkovito orodje za segmentacijo rastlin krompirja iz hiperspektralnih slik in pridobivanje njihovih spektralnih podpisov. Z visoko natančnostjo je razlikovala med slikovnimi pikami ozadja in ostalimi ter izdelala zelo podrobne segmentacijske maske. Pridobljene podpise smo narisali z uporabo ukazov znotraj programskega orodja SiaPy. Preprosti grafi so omogočili hiter pregled pridobljenih podpisov in razlike med različnimi skupinami rastlin. Celoten niz korakov obdelave je po navodilih samostojno ter brez večjih težav izvedel uporabnik, ki nima izkušenj s programiranjem in programskim jezikom Python. Med postopkom preskušanja smo prepoznali določene napake, ki jih je večinoma povzročila nepričakovana situacija v izvirnem nizu podatkov, npr. neustrezna struktura oznake slike in napačno nastavljena pot direktorija. Uporabnik, ki je opravljal segmentacijo, je težave sporočil programerju, tako da bi lahko napake v kodi odpravili v prihodnjih različicah.

4 SKLEPI

V tej študiji smo na danem nizu podatkov potrdili uporabnost programskega orodja SiaPy. Pokazali smo, da lahko z uporabo le tega precej olajšamo delo uporabnikom, ki delajo na področju hiperspektralnega slikanja, zlasti za kmetijske namene. Programska oprema je še vedno v zgodnjih fazah razvoja, zato so trenutno možnosti obdelave omejene in osredotočene predvsem na primer uporabe, opisan v tem prispevku. Zaenkrat smo preizkusili samo slike, ki imajo povezane datoteke glave ENVI. V začetni izdaji programske opreme uporabnik nadzira izvajanje določenih korakov samo prek vmesnika ukazne vrstice in pojavnih oken

uporabniškega vmesnika. Razvoj SiaPy se nadaljuje in vključuje naprednejše funkcije, kot je analiza strojnega učenja

5 VIRI

- Barone, F., Marrazzo, M., & Oton, C. J. (2020). Camera calibration with weighted direct linear transformation and anisotropic uncertainties of image control points. *Sensors (Switzerland)*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/s20041175>
- Lapajne, J., Knapič, M., & Žibrat, U. (2022). Comparison of Selected Dimensionality Reduction Methods for Detection of Root-Knot Nematode Infestations in Potato Tubers Using Hyperspectral Imaging. *Sensors*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/s22010367>
- Lapajne, J., Žibrat, U. (2022). Spectral imaging analysis for Python (SiaPy) (v0.1.0). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7409194>
- Lowe, A., Harrison, N., & French, A. P. (2017). Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress. *Plant Methods*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0233-z>
- Mahlein, A.-K. (2016). Present and Future Trends in Plant Disease Detection. *Plant Disease*, 100(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., Davis, C. E., & Dandekar, A. M. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 1–25. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>
- Moghimi, A., Yang, C., & Marchetto, P. M. (2018). Ensemble Feature Selection for Plant Phenotyping: A Journey from Hyperspectral to Multispectral Imaging. *IEEE Access*, 6, 56870–56884. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2018.2872801>
- Rinnan, Å., Berg, F. van den, & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 28, Issue 10, pp. 1201–1222). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>
- Susič, N., Žibrat, U., Širca, S., Strajnar, P., Razinger, J., Knapič, M., Vončina, A., Urek, G., & Gerič Stare, B. (2018). Discrimination between abiotic and biotic drought stress in tomatoes using hyperspectral imaging. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 273(June), 842–852. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.121>
- Thomas, S., Kuska, M. T., Bohnenkamp, D., Brugger, A., Alisaac, E., Wahabzada, M., Behmann, J., & Mahlein, A. K. (2018). Benefits of hyperspectral imaging for plant disease detection and plant protection: a technical perspective. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125(1), 5–20. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0124-6>

ZNANOST O CELICI

Od širše slike do podrobnosti: analiza 3D zgradbe prebavnega sistema nevretenčarskega organizma s kombinacijo mikro-CT in svetlobne mikroskopije

Katja KUNČIČ^{1*}, Polona MRAK¹, Urban BOGATAJ¹, Miloš VITTORI¹, Nada ŽNIDARŠIČ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

* katja.kuncic@bf.uni-lj.si

Od širše slike do podrobnosti: analiza 3D zgradbe prebavnega sistema nevretenčarskega organizma s kombinacijo mikro-CT in svetlobne mikroskopije

Izveček: Za razumevanje zgradbe organizma kot celote je pomembno, da pridobimo informacije o strukturi na celičnem nivoju, ter na nivoju tkiv in organov z analizo izoliranih vzorcev in z analizo celotnega organizma. Podatke o 3D strukturi bioloških vzorcev lahko pridobimo z analizo histoloških serijskih rezin celotnega vzorca ali pa s slikanjem notranje zgradbe intaktnega vzorca. Medtem ko je 3D rekonstrukcija zgradbe iz histoloških serijskih rezin časovno zahtevna metoda, je slikanje notranje zgradbe intaktnega vzorca oteženo zaradi slabše kontrastnosti in prepoznavnosti posameznih mehkih tkiv. Priprava histoloških rezin je destruktivna tehnika, kar pomeni, da celoten vzorec ni več na voljo za nadaljnje druge analize, nedestruktivne tehnike za analize notranje zgradbe intaktnega vzorca pa omogočijo ohranitev celotnega vzorca. Cilj te raziskave je uvedba nove metode mikroračunalniške tomografije (mikro-CT) za analizo 3D zgradbe prebavne cevi in prebavnih žlez v intaktnem nevretenčarskem organizmu vrste *Porcellio scaber*. Pridobljene rezultate slikanja z mikro-CT smo primerjali z rezultati histološke analize zgradbe prebavnega sistema tega organizma ter ovrednotili prednosti in omejitve obeh metod. Kombinacija mikro-CT in svetlobne mikroskopije omogoča bolj celosten vpogled v notranjo zgradbo živali.

Ključne besede: 3D rekonstrukcija; 3D segmentacija; histologija; mikroračunalniška tomografija (μ CT); rentgenski žarki; prebavni sistem; členonožci; *Porcellio scaber*

From the big picture to details: micro-CT and light microscopy analysis of the 3D organization of the digestive system of an invertebrate organism

Abstract: To understand an organism as a whole, it is important to obtain structural information at the cellular level as well as at the tissue and organ levels by analyses of isolated tissue samples and also whole organisms. Data on the 3D structure of biological samples can be obtained by analysis of histological serial sections of the whole sample or by whole volume (also whole-body) imaging of intact sample. While 3D reconstruction of samples by histological serial sections is tedious, the whole volume (whole-body) imaging of intact organisms is limited by low contrast and poor recognition of individual soft tissues. Histological sections preparation is a destructive technique and does not allow additional

analysis of the sample, while the non-destructive methods of whole-volume imaging preserve the sample. Our goal is to establish a new imaging method, micro-computed tomography (micro-CT), for 3D structure analysis of the digestive tract and digestive glands in the intact invertebrate organism *Porcellio scaber*. We compared the results of micro-CT analysis with the results of histological analysis and evaluated the advantages and limitations of each method. The combination of micro-CT imaging and light microscopy of sections provides a comprehensive view of the internal structure of the animal.

Key words: 3D reconstruction; 3D segmentation; histology; micro-computed tomography (μ CT); X-rays; arthropods; digestive system; *Porcellio scaber*

1 UVOD

Mikroračunalniška tomografija (mikro-CT ali μ CT, *angl. micro-computed tomography*) je nedestruktivna slikovna tehnika, pri kateri z rentgenskimi žarki pridobimo informacijo o notranji zgradbi vzorca. Nedestruktivna analiza pri mikro-CT omogoča, da po analizi vzorec ostane intakten in se lahko uporabi v celoti za nadaljnje analize. Mikro-CT deluje po podobnem principu kot CT (računalniška tomografija, *angl. computed tomography*), ki se pogosto uporablja v klinični diagnostiki, vendar ima boljšo prostorsko ločljivost in omogoča analizo manjših vzorcev (Baird in Taylor, 2017). Velikost slikovnih elementov (pikslov) je pri mikro-CT v območju mikrometrov, pri CT pa v območju milimetrov (Baird in Taylor, 2017; Huang in sod., 2021). V mikro-CT napravi sta vir žarkov in detektor nepremična, vzorec pa se vrti v osi, ki je pravokotna na potek žarkov. Detektor na podlagi interakcij rentgenskih žarkov z vzorcem posname 2D sliko ali projekcijo (Baird in Taylor, 2017). Vzorec zavrtimo okrog osi za vsaj 180° v definiranih premikih, na primer $0,2^\circ$, pri čemer ob vsakem premiku detektor posname sliko. Iz serije velikega števila projekcijskih slik vzorca, pridobljenih s slikanjem iz različnih kotov, z računalniškim programom pridobimo najprej 2D virtualne prereze v z-osi, in nato digitalen 3D nabor podatkov, ki nam omogoča tudi prikaz 2D virtualnih prerezov v katerikoli orientaciji znotraj vzorca (Baird in Taylor, 2017; O'Sullivan in sod., 2017). V naboru podatkov lahko s specializirano programsko opremo označimo slikovne elemente (voksle) izbranih struktur v vzorcu (segmentacija) (Baird in Taylor, 2017). Kadar je med sosednjimi regijami slike velik kontrast, lahko strukture s programsko opremo segmentiramo avtomatsko na podlagi razlike v signalu, če pa je kontrast različnih regij podoben, je potrebno ročno označevanje in posledično večji časovni vložek. Slabo kontrastna so predvsem mehka tkiva, ki imajo podobno prepustnost za rentgenske žarke zaradi podobne sestave. Pri mineraliziranih tkivih te težave ni in so dobro kontrastna (Baird in Taylor, 2017; O'Sullivan in sod., 2017). Prepustnost mehkih tkiv za rentgenske žarke lahko spremenimo z uporabo kontrastnih sredstev, kot so na primer težke kovine (Baird in Taylor, 2017). Druge metode za analizo notranje zgradbe organizmov so po večini destruktivne, kar zelo omeji nadaljnjo analizo zgradbe istega vzorca z drugimi tehnikami. 3D zgradbo organizmov lahko analiziramo tudi s histološkimi serijskimi rezinami, vendar je postopek tehnično in časovno zahteven. Na primer iz organizma velikosti 2 cm bi morali pripraviti približno 3000 histoloških rezin debeline $7\ \mu\text{m}$, ter jih potem še pobarvati, slikati in izvesti 3D rekonstrukcijo z uporabo ustrezne programske opreme. Čeprav pridobimo trajne histološke preparate, celoten intakten vzorec ni več na razpolago, za

razliko od mikro-CT tehnike, kjer vzorec ostaja intakten in ga lahko ponovno uporabimo za dodatno analizo.

Namen raziskave je uvedba in optimizacija metode mikro-CT za analizo zgradbe prebavnega sistema pri odraslem enakonožcu vrste *Porcellio scaber*, ter primerjava te metode s histološko analizo enakega vzorca. V nadaljevanju želimo mikro-CT slikanje uporabiti za študij morfogeneze prebavnega sistema med embrionalnim in postembrionalnim razvojem, v kombinaciji z drugimi mikroskopskimi tehnikami, na primer s svetlobno in elektronsko mikroskopijo.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Mikroračunalniška tomografija

V analizo smo vključili odrasle samce brez zunanjih znakov levitve (Zidar in sod., 1998) iz laboratorijske kulture v steklenem terariju (podlaga iz zemlje in listov leske, 25°C, visoka vlažnost, 12-urni svetlobni cikel). Cele živali smo fiksirali v raztopini 2 % formaldehida (FA) in 2,5 % glutaraldehida (GA) v 0,1 M pufru HEPES (pH = 7,2) in jim odstranili okončine, kar olajša prepojitve vzorca z raztopinami kemikalij med pripravo in olajša slikanje. Vzorce smo po fiksaciji sprali s pufrom HEPES. Postopoma smo jih dehidrirali v raztopinah etanola z naraščajočo koncentracijo od 50 % do 100 %, ter nato etanol nadomestili s HMDS (heksametildisilazan) in vzorce pustili čez noč v digestoriju, da je HMDS izhlapel. Vzorce smo analizirali z mikrotomografom NeoScan N80, opremljenim s programsko opremo Neoscan80. Vzorec smo med slikanjem zavrteli za vsaj 180° s korakom vrtenja 0,2°. Po slikanju smo projekcijske slike uvozili v program Neoscan80, ki jih je pretvoril v 2D serijske prereze vzorca v z-osi. Le-te smo za namen 3D rekonstrukcije in segmentacije organov uvozili v program Dragonfly (Object Research Systems).

2.2 Svetlobna mikroskopija

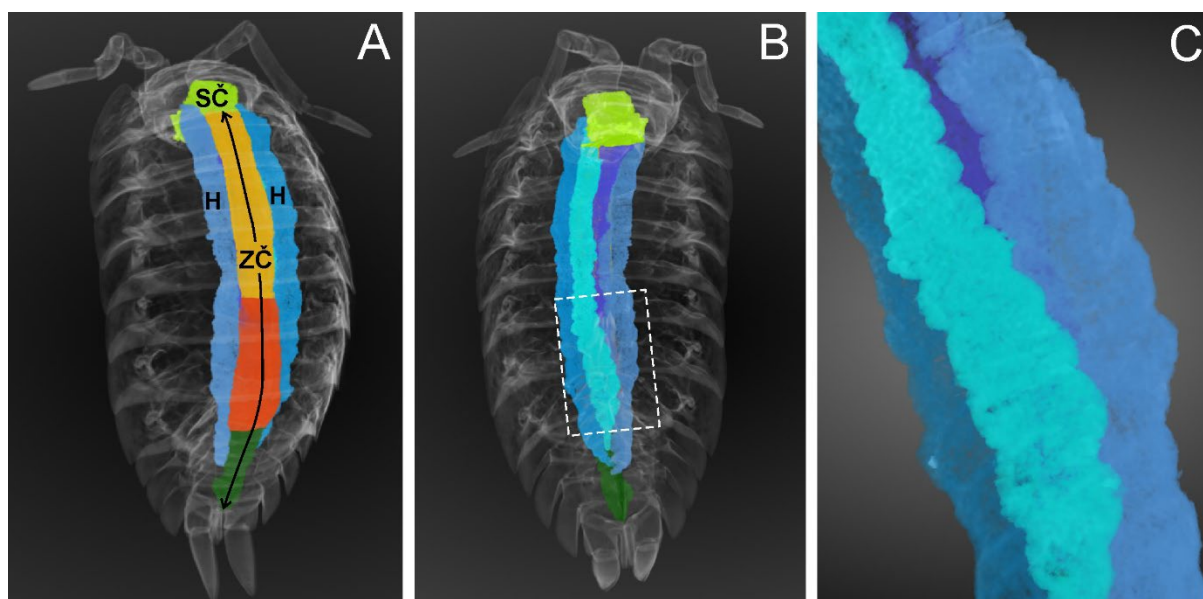
Odrasle samce smo fiksirali v 3,7% formalinu v 0,1M fosfatnem pufru in dekalificirali v 25% EDTA (etilendiamintetraocetna kislina). Za pripravo parafinskih blokov smo vzorce sprali s pufrom, dehidrirali v raztopinah etanola z naraščajočo koncentracijo od 50 % do 100 %, bistrili v ksilenu in nato infiltrirali s Paraplastom. Iz parafinskih blokov smo pripravili histološke rezine debeline 7 µm z mikrotomom RM2265 (Leica) in jih barvali po postopku hematoksilin-eozin. Pregledali in dokumentirali smo jih s svetlobnim mikroskopom Axioskop (Zeiss), opremljenim z digitalno kamero DFC290HD (Leica) ter programsko opremo LAS V4.0 (Leica).

Za pripravo poltankih rezin smo vzorce fiksirali s FA in GA ter dekalificirali z EDTA, sprali s pufrom in postfiksirali z 1 % OsO₄. Nato smo vzorce postopoma dehidrirali v raztopinah etanola z naraščajočo koncentracijo od 50 % do 100 % ter nazadnje v 100 % acetonu. Sledilo je vklapljanje vzorcev v smolo Agar 100. Impregnirane vzorce smo prenesli v čisto smolo, ki smo jo nato polimerizirali. Iz blokcev smo z ultramikrotomom Reichert Ultracut S (Leica)

pripravili poltanke rezine (0,5 μm) in jih barvali z mešanico barvil Azur II – metilen modro (barvanje po Richardsonu). Poltanke rezine smo slikali na enak način kot histološke rezine.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

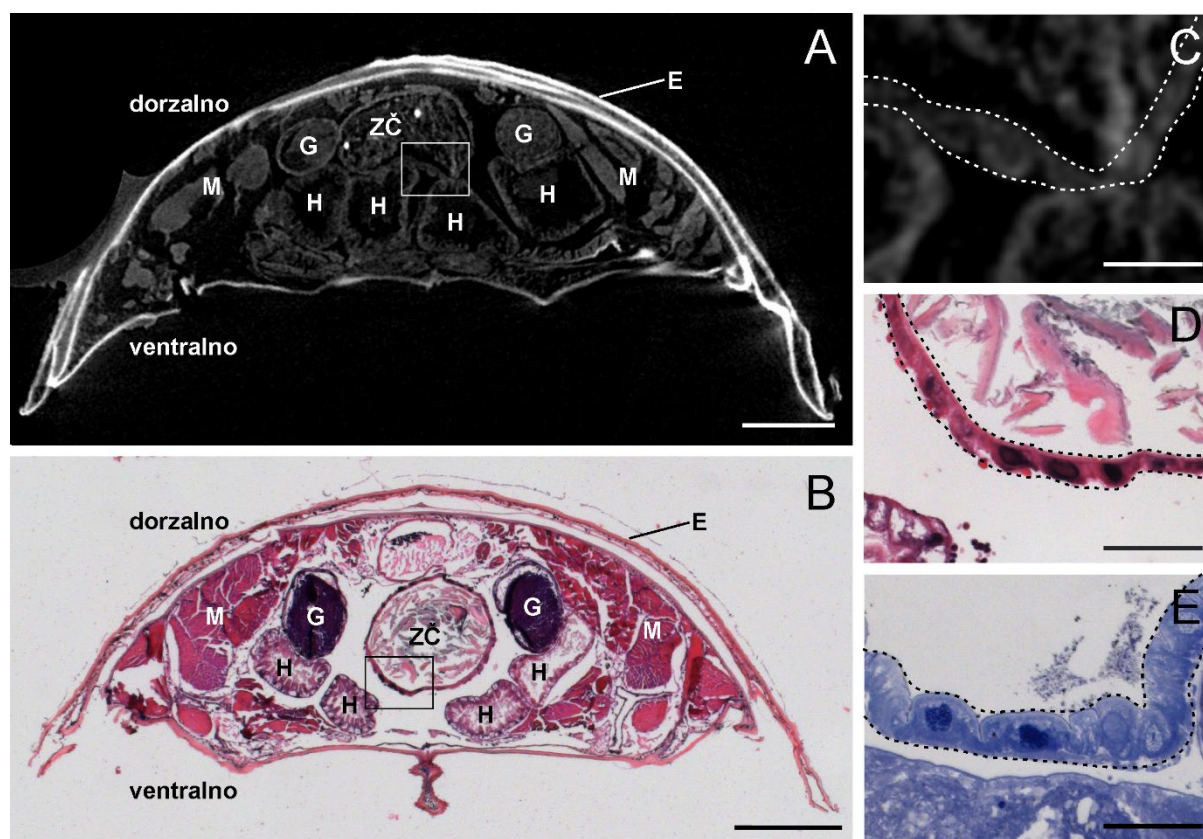
Z opisano pripravo vzorcev in postopkom slikanja z mikro-CT smo pridobili ustrezne podatke za analizo 3D zgradbe prebavnega sistema odraslih živali *P. Scaber* (Slika 1). Jasno so vidni vsi organi prebavnega sistema in njihova razporeditev znotraj organizma. Po segmentaciji je razvidna tudi razdelitev zadnjega črevesa na morfološko in funkcijsko različne regije: anteriorno komoro, papilarno regijo in rektum (Slika 1A). Razvidna je lokacija in oblika prebavnih žlez (hepatopankreasa), ki potekajo ventralno in vzporedno s prebavno cevjo in so spiralno zavite (Slika 1B in C).



Slika 1: 3D rekonstrukcija anatomije prebavnega sistema v odrasli živali *P. Scaber* po slikanju z mikro-CT in segmentaciji. **A.** Pogled z dorzalne strani živali. Razvidna je prebavna cev z zožitvami med funkcijsko različnimi regijami zadnjega črevesa. Sprednje črevo je označeno z zeleno, anteriorna komora z oranžno, papilarna regija z rdečo in rektum z zeleno. **B.** Pogled na ventralno površino živali, jasno so vidne štiri cevke hepatopankreasa. **C.** Po segmentaciji je jasno razvidna spiralna oblika cevk hepatopankreasa. **Okrajšave:** H – hepatopankreas, SČ – sprednje črevo, ZČ – zadnje črevo.

Na 2D virtualnih prerezih živali pridobljenih z mikro-CT in prikazanih s programom Dragonfly, je razvidna razporeditev organov v notranjosti intaktnega organizma in osnovna morfologija epitelov prebavnega sistema ter drugih tkiv (Slika 2). Na virtualnih prerezih po kontrastu zelo izstopa mineraliziran eksoskelet na površini živali, kontrastnost posameznih organov v notranjosti živali pa je podobna, saj imajo mehka tkiva podobno sestavo in so posledično podobno prepustna za rentgenske žarke (Slika 2A). Pri 3D segmentaciji organov si pomagamo s premikanjem po virtualnih prerezih vzorca, s čimer sicer lahko sledimo posamezni strukturi, vendar se je poznavanje vzorca, ki izhaja iz predhodnih histoloških analiz pokazalo kot neprecenljivo pri identifikaciji organov in tkiv na mikro-CT. Na voljo je veliko podatkov o funkcijski morfologiji prebavnega sistema živali *P. scaber* (Hames in Hopkin,

1989; Storch in Štrus, 1989; Štrus in sod., 1995; Štrus in sod., 2019) in ultrastrukturi celic v različnih epitelih prebavnega sistema živali (Hames in Hopkin, 1991; Žnidaršič in sod., 2003; Bogataj in sod., 2018). Omejitev ločljivosti in nekонтраstnost mehkih tkiv pri slikanju z mikro-CT ne omogoča analiz razporeditve in strukture epitelnih celic analiziranih organov (Slika 2C). Ločljivost slikanja z mikro-CT je odvisna od zmogljivosti mikrotomografa ter od priprave in sestave vzorca in je v splošnem okoli 1 μm (du Plessis in sod., 2017; O'Sullivan in sod., 2017), medtem ko je ločljivost rutinske svetlobne mikroskopije v rangi 0,4 μm (Alberts in sod., 2015). Pregled preparatov s svetlobnim mikroskopom omogoča pridobitev dodatnih bolj podrobnih informacij zaradi boljše prostorske ločljivosti (Slika 2B, D in E). Na histoloških rezinah je razporeditev posameznih organov, tkiv in celic v organizmu jasneje razvidna (Slika 2B). Meje med organi so jasne, razvidna je tudi zgradba tkiv in oblika in osnovna struktura celic (Slika 2D). Na poltankih rezinah (Slika 2E) pridobimo še več informacij o zgradbi celic. Za pridobitev celostne informacije na vseh nivojih od organizma do celic je tako ključna ne le kombinacija mikro-CT s svetlobno mikroskopijo, ampak tudi vključitev različnih tehnik svetlobne mikroskopije.



Slika 2: 2D virtualni prerezi in histološke rezine organizma *P. Scaber*. **A.** Zajem zaslona iz programa Dragonfly prikazuje 2D virtualni prerez živali pridobljen z mikro-CT. **B.** Prečni prerez živali pridobljen s svetlobno mikroskopijo, histološka rezina je obarvana s hematoksilinom in eozinom. **C** in **D.** Povečana izreza, ki sta označena na slikah A in B. Črevesni epitel je označen s pikami. **E.** Slika črevesnega epitela na poltanki rezini. **Merilce:** A in B - 0,5 mm; C, D, E - 100 μm . **Okrajšave:** E – eksoskelet, G – gonade, H – hepatopankreas, M – mišice, ZČ – zadnje črevo.

V primerjavi z metodo serijskega rezanja histološkega vzorca je analiza notranje zgradbe organizma z mikro-CT hitrejša in tehnično preprostejša, vendar pridobimo manj informacij o

histološki zgradbi. Za pripravo vzorca za analizo z mikro-CT potrebujemo približno 1-2 dni. Slikanje z mikro-CT lahko izvedemo takoj po postopku priprave vzorca, kar je v primeru uporabljenega postopka slikanja trajalo okoli 2 uri. Več časa smo potrebovali za segmentacijo notranjih organov, približno 8-16 ur. Priprava vzorca za serijske histološke rezine vključuje dodatne korake (dekalifikacijo, postfiksacijo, vklapljanje v paraplast/smolo) in traja 2-3 dni, nato moramo pridobiti še serijske rezine. Število serijskih rezin je odvisno od velikosti živali in debeline rezin. Preparate barvamo in nato zajemamo slike rezin s svetlobnim mikroskopom, pri velikih vzorcih je morda potrebno sliko celega prereza še sestaviti iz več posnetkov iste rezine. Sledi poravnavanje slik (registracija) ter nato 3D rekonstrukcija in segmentacija. Vse te postopke – sestavljanje slik, registracijo, 3D rekonstrukcijo in segmentacijo – lahko opravimo le z namensko programsko opremo. Pomanjkljivost metode histoloških serijskih rezin je tudi ta, da nam po rezanju intakten vzorec ni več na voljo, medtem ko po slikanju z mikro-CT, vzorec lahko shranimo, in dodatno analiziramo, na primer z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

4 SKLEPI

Pokazali smo, da opisani postopek priprave vzorcev, ki vključuje fiksacijo z aldehydi in sušenje s HMDS, ter opisani postopek slikanja z mikro-CT, omogočata analizo razporeditve organov in osnovne morfologije mehkih tkiv v notranjosti majhnih živali. Za bolj podrobno analizo zgradbe tkiv in celic pa je potrebna uporaba tehnik z boljšo ločljivostjo, kot je svetlobna mikroskopija. S kombinirano uporabo mikro-CT in svetlobne mikroskopije pridobimo celotno informacijo o 3D zgradbi organov in podrobne strukture tkiv in celic. Opisani pristop kombinacije teh dveh tehnik bomo uporabili tudi za analizo morfogeneze prebavnega sistema med razvojem *P. scaber*, saj nam omogoča celovito in raznoliko kvantitativno analizo morfoloških sprememb med razvojem. Za lažjo analizo mehkih tkiv bomo postopek priprave vzorca za mikro-CT dopolnili z uporabo kontrastnega sredstva OsO₄ (osmijev tetroksid).

ZAHVALA

Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) je financirala delo v sklopu raziskovalnega programa Integrativna zoologija in speleobiologija P1-0184 in delo mlade raziskovalke KK. Za delo je bila uporabljena oprema infrastrukturnega centra 'Mikroskopija bioloških vzorcev' (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

5 VIRI

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.
- Baird, E., & Taylor, G. (2017). X-ray micro computed-tomography. *Current Biology*, 27(8), R289–R291. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.066>

- Bogataj, U., Praznik, M., Mrak, P., Štrus, J., Tušek-Žnidarič, M., & Žnidaršič, N. (2018). Comparative ultrastructure of cells and cuticle in the anterior chamber and papillate region of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) hindgut. *ZooKeys*, 801, 427–458. <https://doi.org/10.3897/zookeys.801.22395>
- du Plessis, A., Broeckhoven, C., Guelpa, A., & le Roux, S. G. (2017). Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. *GigaScience*, 6(6), 1–11. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix027>
- Hames, C. A. C., & Hopkin, S. P. (1989). The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *Journal of Zoology*, 217(4), 599–627. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1989.tb02513.x>
- Hames, C. A. C., & Hopkin, S. P. (1991). A daily cycle of apocrine secretion by the B cells in the hepatopancreas of terrestrial isopods. *Canadian Journal of Zoology*, 69(7), 1931–1937. <https://doi.org/10.1139/z91-267>
- Huang, K., Rhee, D. J., Ger, R., Layman, R., Yang, J., Cardenas, C. E., & Court, L. E. (2021). Impact of slice thickness, pixel size, and CT dose on the performance of automatic contouring algorithms. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 22(5), 168–174. <https://doi.org/10.1002/acm2.13207>
- O’Sullivan, J. D. B., Behnsen, J., Starborg, T., MacDonald, A. S., Phythian-Adams, A. T., Else, K. J., Cruickshank, S. M., & Withers, P. J. (2017). X-ray micro-computed tomography (μCT): an emerging opportunity in parasite imaging. *Parasitology*, 145(7), 848–854. <https://doi.org/10.1017/s0031182017002074>
- Storch, V., & Štrus, J. (1989). Microscopic anatomy and ultrastructure of the alimentary canal in terrestrial isopods. *Monografia. Monitore Zoologico Italiano*, 4, 105–126.
- Štrus, J., Drobne, D., & Ličar, P. (1995). Comparative anatomy and functional aspects of the digestive system in amphibious and terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). In M. A. Alikhan (Ed.), *Terrestrial Isopod Biology* (pp. 15–23). A. A. Balkema.
- Štrus, J., Žnidaršič, N., Mrak, P., Bogataj, U., & Vogt, G. (2019). Structure, function and development of the digestive system in malacostracan crustaceans and adaptation to different lifestyles. *Cell and Tissue Research*, 377(3), 415–443. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03056-0>
- Zidar, P., Drobne, D., & Štrus, J. (1998). Determination of moult stages of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana*, 71(6), 646–654. <https://doi.org/10.1163/156854098x00644>
- Žnidaršič, N., Štrus, J., & Drobne, D. (2003). Ultrastructural alterations of the hepatopancreas in *Porcellio scaber* under stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(3), 161–174. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00158-8](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00158-8)

Zmožnost tvorbe aflatoksinov na mesnem gojišču pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus*

Iva ZAHIJA^{1*}, Mateja LUŠNIC POLAK¹, Tomaž POLAK¹, Barbka JERŠEK¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

* iva.zahija@bf.uni-lj.si

Zmožnost tvorbe aflatoksinov na mesnem gojišču pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus*

Izvleček: Cilj prispevka je bil ugotoviti vpliv sestave gojišča, temperature (15 in 25 °C) in časa (7 in 14 dni) na rast plesni vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus* ter tvorbo aflatoksinov (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2). Plesni so bile nacepljene na gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES, ang. Yeast Extract Sucrose Agar) in na mesno gojišče (CMA2GYE, ang. Cooked Meat Agar with Glucose and Yeast Extract). Rast plesni smo ocenili po 7 in 14 dneh z merjenjem premera kolonije (mm), vsebnost aflatoksinov (AF) pa smo določili z UPLC-MS/MS. Pri obeh vrstah plesni je bila rast boljša pri 25 °C, ne glede na vrsto gojišča. Tako po 7 in 14 dneh sta obe vrsti plesni rasli na gojišču CMA2GYE, pri čemer je bila velikost kolonij pri testiranih parametrih le 25 % manjša v primerjavi s standardnim gojiščem YES. Največjo vsebnost AF smo pričakovano določili v gojiščih YES po 14 dnevni inkubaciji pri 25 °C. Plesni so tvorile AF tudi na mesnem gojišču, tako pri 25 °C (6.200-11.400 ppb) kot tudi pri 15 °C (280-5.800 ppb), kar pomeni tveganje za varnost suhomesnatih izdelkov.

Ključne besede: plesni; *Aspergillus flavus*; *A. parasiticus*; aflatoksini; mesno gojišče; suhomesnati izdelki

Potential of aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) production on a meat-based medium by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*

Abstract: The objective of this paper was to determine the influence of two culture media, time of incubation (7 and 14 days) and temperature (15 and 25 °C) on the growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and production of aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2). Fungi were inoculated onto Yeast Extract Sucrose Agar (YES) and meat-based media (CMA2GYE). The growth of fungi was evaluated after 7 and 14 days by measuring the colony diameter (mm) and determination of aflatoxins (AFs) content with UPLC-MS/MS. For both species, at 25 °C growth and AFs production were better. After 7 and 14 days, both species grew on the CMA2GYE culture medium, with colony size being only 25% smaller for the tested parameters compared to the standard YES medium. As expected, the maximum AFs content was determined on YES after 14 days of incubation at 25 °C. Moulds also formed AFs in the meat-based medium at 25 °C (6.200-11.400 ppb) and also at 15 °C (280-5.800 ppb), which means risk to the safety of cured meat products.

Keywords: fungi; *Aspergillus flavus*; *A. parasiticus*; aflatoxins; meat-based media; cured meat products

1 UVOD

Mikotoksini so skupina toksičnih sekundarnih metabolitov, ki jih lahko proizvajajo plesni rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Fusarium* (Nazhand in sod., 2020). Med mikotoksini so aflatoksini (AF) najbolj akutno in kronično toksični za ljudi in živali. Glavni naravno proizvedeni so aflatoksini B1, B2, G1 in G2 (Bennett in Klich, 2003). AF proizvajajo predvsem plesni vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus*. Aflatoksin B1 (AFB1) je tudi teratogen in mutagen ter poznan kot najmočnejša rakotvorna spojina v naravi (IARC, 2002). Med najpomembnejšimi fiziološkimi dejavniki, ki vplivajo na proizvodnjo AF pri plesnih rodu *Aspergillus*, so temperatura, vrednost pH, aktivnost vode (a_w), viri dušika in ogljika ter svetloba. Preprosti ogljikovi hidrati, kot sta glukoza in saharoza, so prednostni vir ogljika pri biosintezi AF pri plesnih vrste *A. parasiticus* (Schmidt-Heydt in sod., 2010).

Kontaminacija mesa in mesnih izdelkov s plesnimi je običajno posledica kontaminirane surovine, opreme ali zraka. Posledica te kontaminacije so neugodne spremembe v mesu in mesnih izdelkih, ki pri potrošnikih lahko povzročajo okužbe, mikotoksikoze in alergijske reakcije (Lešić in sod., 2021). Mesni izdelki veljajo za odličen substrat za širjenje in kolonizacijo plesni in posledično možno tvorbo mikotoksinov. Prisotnost površinskih plesni je na splošno cenjena, zaradi njihovega prispevka k razvoju značilne arome in kakovosti suhomesnatih izdelkov, vendar mora biti izključena možnost naselitve mikotoksigenih plesni (Alapont in sod., 2014).

Za tradicionalno proizvodnjo suhomesnatih izdelkov so značilni nenadzorovani parametri, kot sta temperatura in relativna vlažnost ter nenadzorovana kakovost zraka. To omogoča intenzivno in tudi neželeno rast plesni, kar lahko posledično privede do razvoja neugodnih senzoričnih lastnosti in kontaminacije tradicionalnih mesnih izdelkov z mikotoksini (Perrone in sod., 2019).

Cilji te študije so bili ugotoviti vpliv sestave gojišča in temperature na rast plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus* ter zmožnost tvorbe AF omenjenih vrst plesni.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Vrste plesni

V raziskavi smo uporabili dva seva plesni rodu *Aspergillus*, ki proizvajata aflatoksine, in sicer plesen vrste *A. parasiticus* ŽMJ7 iz Zbirke kultur Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. *A. parasiticus* je bil izoliran iz zorilnice med tradicionalno pridelavo salam v Savinjski dolini (Slovenija). Identifikacija seva je bila izvedena glede na morfološke značilnosti in potrjena s sekvenciranjem gena β -tubulina (Sánchez-Montero in sod., 2019). Drugi sev so bile plesni vrste *A. flavus* CBS 573.65

(Culture Collection of fungi and yeasts; Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Nizozemska). Oba seva imata dobro sposobnost tvorbe AF (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2).

2.2 Gojišča

V raziskavo smo vključili naslednja gojišča: gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) in mesno gojišče (CMA2GYE). YES smo uporabili kot gojišče, ki se običajno uporablja za določitev tvorbe mikotoksinov. Gojišče CMA2GYE smo pripravili kot navaja Zahija in sod. (2023) in dodali 1 % glukoze in 0,2 % kvasnega ekstrakta, sestavine, ki se lahko uporabljajo v standardni proizvodnji suhomesnatih izdelkov. Po mnenju Yazid in sod. (2018) je uporaba polysintetičnih rastnih medijev, ki posnemajo naravne surovine, primerna za ekofiziološke študije *in vitro*. Gojišči sta bili avtoklavirani pri 121 °C (103 kPa) 20 minut, ohlajeni (45–50 °C) in razliti (25 ml) v petrijevke (Φ 90 mm). Vrednosti a_w so bile izmerjene v merilniku aktivnosti vode Novasina Lab Master podjetja Novasina AG (Švica) in znašata 0,994 za CMA2GYE in 0,986 za YES.

2.3 Inokulacija in inkubacija

Plesni smo gojili 7 dni na gojišču sladni ekstrakt (MEA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija) pri 25 °C, da smo dobili dobro sporulirajoče kulture. Suspenzije spor smo pripravili tako, da smo spore vsakega seva suspendirali v sterilni destilirani vodi z 0,1 % Tween 80. Končna koncentracija spor je bila ocenjena s štetjem konidijev v števni komori Thoma in razredčena na 10^5 spor ml^{-1} . Z vsako suspenzijo spor smo naredili enotočkovne inokulacije (10 μL) na gojiščih CMA2GYE in YES (3 paralelke) in jih inkubirali 7 in 14 dni pri 15 in 25 °C.

2.4 Meritev rasti plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus*

Po 7 in 14 dneh inkubacije posameznega gojišča (YES in CMA2GYE) pri 15 in 25 °C smo rast plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus* določili z merjenjem dveh pravokotnih premerov kolonij.

2.5 Analiza AF v gojiščih

Petrijevke s proučevanim gojiščem in plesnijo smo po 7 oziroma 14 dneh odstranili iz inkubatorja in shranili pri –20 °C. Za ekstrakcijo mikotoksinov smo celotno gojišče (25 mL) 15 minut ekstrahirali s 35 mL 80 % acetonitrila z 0,5 % HCOOH v ultrazvočni kopeli (Branson Ultrasonics Corporation, Brookfield, CT, ZDA). Nato smo mešanico filtrirali (Sartorius 388), ročno pretresli in ponovno filtrirali (0,2 μm najlonski filter, Phenomenex, Torrance, CA, ZDA) ter filtrat prenesli v HPLC vial. Vzorci za določitev vsebnosti AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 so bili analizirani v paralelkah.

Vse kemikalije in topila, uporabljena med postopkom ekstrakcije, so bila analitske kakovosti. Za postopek validacije smo uporabili standardno raztopino Aflatoxins Mix 4 34036 (Supelco, Bellefonte, PA BCJ3930). Ekstrakti so bili analizirani z UPLC–MS/MS in kvantificirani z metodo standardnega dodatka.

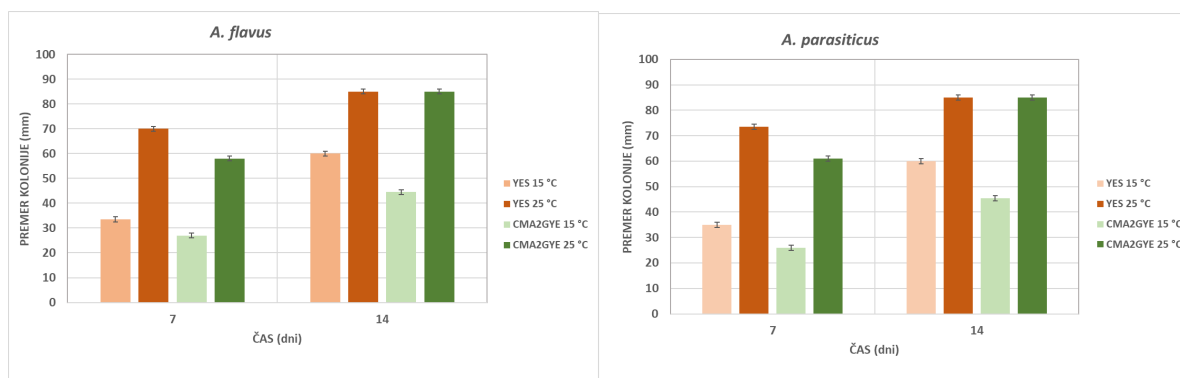
2.6 Analiza UPLC–MS/MS

Za določitev AF je bila za ločevanje in kvantifikacijo uporabljena analiza UPLC–MS/MS z reverzno fazo. Kromatografsko ločevanje smo izvedli s kolono ACQUITY UPLC® BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm). Komponente mobilne faze so bile: 1 mM amonijevega acetata v vodi + 0,5 % očetne kisline + 0,1 % mravljinčne kisline (v/v) (mobilna faza A) in acetonitril + 0,5 % očetne kisline + 0,1 % mravljinčne kisline (mobilna faza B) (720007377, september 2021, Waters). Prehod MRM je bil 313 > 285 za kvantifikacijo in 313 > 241 za potrditev. Identifikacija AF je bila izvedena s primerjavo retencijskih časov in podatkov masne spektrometrije ter kvantificirana iz površine vrhov, glede na predhodno določene umeritvene krivulje.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Rast plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus*

Rast plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus* smo določili na gojiščih YES in CMA2GYE pri 15 in 25 °C po 7 in 14 dneh inkubacije (slika 1). Največji povprečni premer kolonije po 7 in 14 dneh je bil pri obeh vrstah plesni dosežen na gojišču YES, ne glede na temperaturo inkubacije. Na gojišču CMA2GYE je bila rast počasnejša v primerjavi z gojiščem YES. Rast kolonij plesni vrst *A. parasiticus* in *A. flavus* je bila po 14 dneh pri 25 °C omejena z velikostjo gojišč YES in CMA2GYE v petrijevki, medtem ko so bile pri 15 °C kolonije obeh vrst plesni na gojišču CMA2GYE manjše kot na gojišču YES. Rezultati kažejo na dober potencial rasti plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus* na gojišču CMA2GYE tudi pri nižji temperaturi od optimalne.

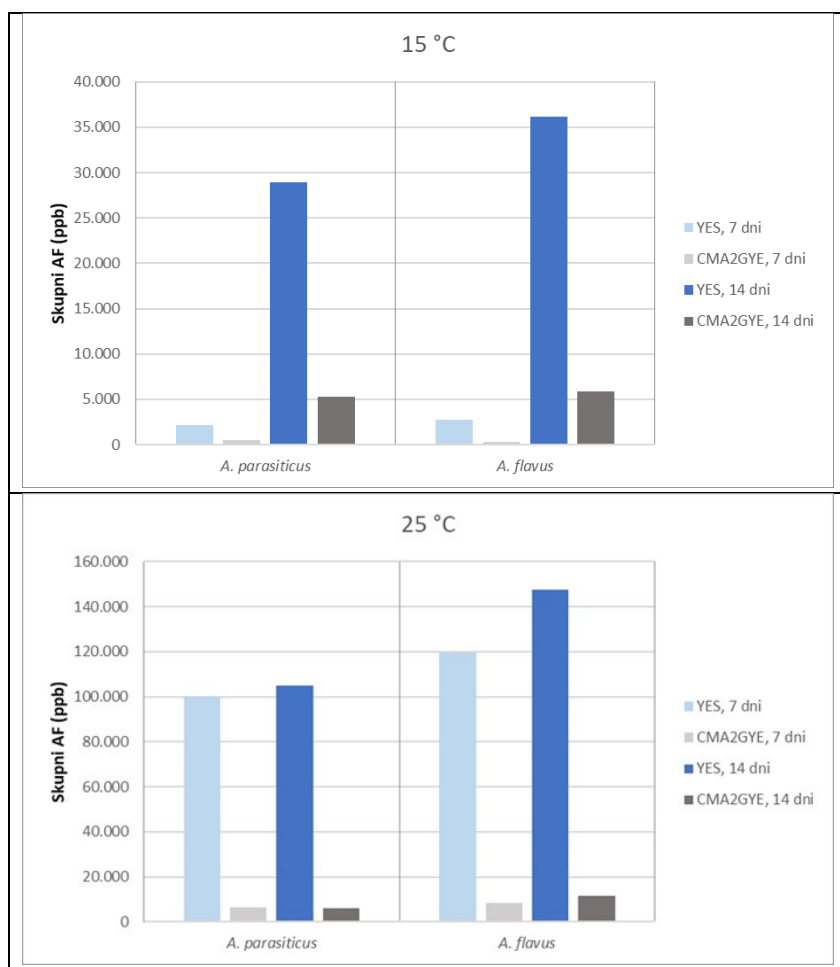


Slika 1: Povprečni premer kolonij plesni vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus* na gojiščih YES (saharozni agar s kvasnim ekstraktom) in CMA2GYE (mesno gojišče z dodatkom 1 % glukoze in 0,2 % kvasnega ekstrakta) po 7 in 14 dneh pri 15 in 25 °C.

3.2 Tvorba aflatoksinov

Rezultati analize vsebnosti AF so pokazali, da so na tvorbo sekundarnih metabolitov pri plesnih vrste *A. flavus* in *A. parasiticus* vplivali medij (substrat), čas (7 in 14 dni) in temperatura (15, 25 °C) (slika 2). Dve različni temperaturi smo izbrali zaradi njune pomembnosti, saj 15 °C

predstavlja običajni maksimum med shranjevanjem suhomesnatih izdelkov izven hladilnika, 25 °C pa predstavlja optimalno temperaturo za tvorbo AF.



Slika 2: Vsebnost aflatoksinov plesni vrst *Aspergillus flavus* in *A. parasiticus* v gojiščih YES (saharozni agar s kvasnim ekstraktom) in CMA2GYE (mesno gojišče z dodatkom 1 % glukoze in 0,2 % kvasnega ekstrakta) po 7 in 14 dneh inkubacije pri 15 in 25 °C.

Pri *A. parasiticus* je tvorba AF dosegla "plato" pri 25 °C po 7 dneh v gojišču YES, saj je po 14 dneh prišlo do manjšega povečanja skupne vsebnosti AF (5 %). Medtem je pri *A. flavus* prišlo do povečanja vsebnosti skupnih AF (20 %). Tvorba AF v gojišču CMA2GYE je bila po 7 in 14 dneh podobna, čeprav smo pri plesnih vrste *A. parasiticus* 7. dan opazili nekoliko višjo vsebnost, medtem ko je bila vsebnost skupnih AF nekoliko višja 14. dan pri plesnih vrste *A. flavus* (slika 2).

Pri 15 °C se je proizvodnja AF v gojišču YES povečevala tudi po 7. dnevu in dosegla največjo vrednost po 14 dneh. Proizvodnja AF na CMA2GYE je bila podobna za oba seva 7. in 14. dan, čeprav je plesen vrste *A. parasiticus* tvorila nekoliko višjo koncentracijo 7. dan, medtem ko je bila vsebnost skupnih AF nekoliko višja 14. dan pri plesnih vrste *A. flavus* (slika 2). Na splošno sta obe vrsti plesni pri 15 °C tvorili manj AF kot pri 25 °C. To potrjuje, da je temperatura eden ključnih okoljskih dejavnikov pri proizvodnji AF (Abbas in sod., 2009).

Po 14 dneh inkubacije je bila vsebnost AF v gojišču YES približno 5 do 6-krat višja (*A. parasiticus*, 15 °C; *A. flavus*, 15 °C), oz. 13 do 17-krat višja (*A. parasiticus*, 25 °C; *A. flavus*,

25 °C) kot v CMA2GYE. Ne glede na to, rezultati kažejo, da plesni na mesnem gojišču tudi pri nižji temperaturi tvorijo AF.

AFB1 je predstavljal 94–97 % vseh AF (podatki niso prikazani). Na splošno smo med dvema sevoma opazili manjše razlike v tvorbi AF (slika 2). V gojišču CMA2GYE so plesni tvorile manj AF v primerjavi z gojiščem YES. Gojišče YES je bogat vir sladkorja (150 g/L saharoze) v primerjavi z gojiščem CMA2GYE, v katerega smo dodali le 1 % glukoze.

Čeprav so bile vsebnosti AF pri 15 °C nizke (289–36 131 ppb), to še vedno lahko predstavlja nevarnost tvorbe AF v suhomesnatih izdelkih med skladiščenjem.

Prejšnje študije so pokazale tudi razlike v tvorbi aflatoksinov pri različnih sevih plesni rodu *Aspergillus* v različnih medijih; Yahyaraeyat in sod. (2013) so poročali, da so plesni vrste *A. parasiticus* ATCC 56775 tvorile 13.717,88 ppb skupnih AF 5. dan in 22.283,3 ppb 9. dan v tekočem gojišču YES pri 25 °C. Ferreira in sod. (2013) so poročali o 1.334.700 ppb AFB1 in AFB2 v tekočem gojišču YES po 7 dneh pri 27 °C. Peromingo in sod. (2016) so zaključili, da sta oba seva, *A. parasiticus* in *A. flavus*, tvorila AFB1 v mesnem gojišču pri temperaturi ≥ 15 °C in $a_w \geq 0,90$. Yogendrarajah in sod. (2015) so ugotovili, da je nujno poročati o toksigenosti seva plesni skupaj z rastnim substratom in ravnimi razmerami. Naši rezultati se ujemajo z rezultati Abdel-Hadija in sod. (2012), ki so poročali, da so primerne temperature za plesni vrste *A. flavus* na gojišču YES za tvorbo AFB1 med 25–30 °C pri a_w 0,99. Druga študija, izvedena v Italiji, s sevom *A. flavus*, izoliranim iz koruze, je prav tako pokazala, da je optimalna temperatura za tvorbo AFB1 25 °C (Giorni in sod., 2011).

Casquete in sod. (2017) so opazili majhne razlike pri rasti in zmožnosti tvorbe AF med tremi sevi plesni vrste *A. flavus* pri različnih a_w v modelnem sistemu sira. Prejšnje študije so pokazale razlike v tvorbi aflatoksina pri različnih sevih *A. flavus* pri 25 °C v različnih medijih (Bernáldez in sod., 2017; Peromingo in sod., 2016).

Nenadzorovane okoljske razmere lahko predstavljajo veliko tveganje za kontaminacijo mesnih izdelkov z AF (Tai in sod., 2020). Kombinacijo okoljskih razmer, ugodnih za tvorbo AF, lahko predstavljajočasne razmere med predelavo in skladiščenjem, vendar lahko nastala kontaminacija traja do zadnjega koraka proizvodnje, ker so AF kemijsko stabilni med skladiščenjem in predelavo ter tudi razmeroma toplotno stabilni znotraj temperaturnega območja predelave hrane. Pomembno se je izogibati razmeram, ki lahko vodijo do njihovega nastanka (Turner in sod., 2009).

Kontaminacija s plesnimi rodu *Aspergillus* predstavlja potencialno tveganje, saj lahko te plesni med skladiščenjem in predelavo rastejo in tvorijo aflatoksine, kar vpliva na zmanjšanje kakovosti in varnosti hrane. Prisotnost že manjše vsebnosti aflatoksinov lahko predstavlja tveganje za potrošnike (Galván in sod., 2021).

4 SKLEPI

Sestava substrata in temperatura pomembno vplivata na zmožnost tvorbe aflatoksinov plesnih vrst *A. parasiticus* in *A. flavus*.

Na osnovi dobljenih rezultatov rast plesni ne bi smela biti edini parameter, ki velja za dober napovednik kontaminacije z AF. Kinetika tvorbe AF je pokazala drugačen profil na mesnem gojišču v primerjavi s standardnim gojiščem. Oba seva plesni rodu *Aspergillus* sta pokazala zmožnost tvorbe aflatoksinov na CMA2GYE.

Temperatura vpliva na tvorbo AF pri plesnih vrst *A. parasiticus* in *A. flavus*. Na splošno je bila rast podobna pri obeh testiranih sevih. Glede na rezultate, se je potrebno med shranjevanjem suhomesnatih izdelkov izogibati višjim temperaturam. Znižanje temperature s 25 na 15 °C bi vplivalo na zmanjšano tvorbo AF.

5 VIRI

- Abbas, H., Wilkinson, J., Zablotowicz, R., Accinelli, C., Abel, C., Bruns, H., & Weaver, M. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2–3), 142–153. <https://doi.org/10.1080/15569540903081590>
- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society, Interface*, 9(69), 757–767. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0482>
- Alapont, C., López-Mendoza, M. C., Gil, J. V., & Martínez-Culebras, P. V. (2014). Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(1), 93–104. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.849007>
- Bernaldez, V., Córdoba, J. J., Magan, N., Peromingo, B., & Rodríguez, A. (2017). The influence of ecophysiological factors on growth, aflR gene expression and aflatoxin B1 production by a type strain of *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.030>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Ruiz-Moyano, S., & Martín, A. (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6987–6996. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12865>
- Ferreira, F. D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C. C., da Costa, C. L., Mallmann, C. A., Janeiro, V., Ferreira, F. M. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., & Machinski, M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 136(2), 789–793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.003>
- Galván, A. I., Rodríguez, A., Martín, A., Serradilla, M. J., Martínez-Dorado, A., & Córdoba, M. de G. (2021). Effect of Temperature during Drying and Storage of Dried Figs on

- Growth, Gene Expression and Aflatoxin Production. *Toxins*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/toxins13020134>
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., & Battilani, P. (2011). Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: Influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*, 4(4), 425–432. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1300>
- International Agency for Research on Cancer. (2002). Aflatoxins. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 82). IARC Press. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans>
- Lešić, T., Zadavec, M., Zdolec, N., Vulić, A., Perković, I., Škrivanko, M., Kudumija, N., Jakopović, Ž., & Pleadin, J. (2021). Mycobiota and Mycotoxin Contamination of Traditional and Industrial Dry-Fermented Sausage Kulen. *Toxins*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/toxins13110798>
- Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., & Santini, A. (2020). Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. *Foods*, 9(5), 644. <https://doi.org/10.3390/foods9050644>
- Peromingo, B., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Delgado, J., & Rodríguez, M. (2016). Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. *Meat Science*, 122, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.024>
- Perrone, G., Rodriguez, A., Magista, D., & Magan, N. (2019). Insights into existing and future fungal and mycotoxin contamination of cured meats. *Current Opinion in Food Science*, 29, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.012>
- Sánchez-Montero, L., Córdoba, J. J., Peromingo, B., Álvarez, M., & Núñez, F. (2019). Effects of environmental conditions and substrate on growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum*: Relative risk assessment of OTA in dry-cured meat products. *Food Research International*, 121, 604–611. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.025>
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., & Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*, 26(4), 241–246. <https://doi.org/10.1007/s12550-010-0062-7>
- Tai, B., Chang, J., Liu, Y., & Xing, F. (2020). Recent progress of the effect of environmental factors on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production on foods. *Food Quality and Safety*, 4(1), 21–28. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyz040>

- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
- Yahyaraeyat, R., Khosravi, A. R., Shahbazzadeh, D., & Khalaj, V. (2013). The potential effects of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on growth, aflatoxin production and transcription of aflatoxin biosynthesis pathway genes of toxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 649–655. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200045>
- Yazid, S. N. E., Thanggavelu, H., Mahrer, N., Selamat, J., & Samsudin, N. I. P. (2018). Formulation of maize- and peanut-based semi-synthetic growth media for the ecophysiological studies of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in maize and peanut agro-ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 282, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.007>
- Yogendrarajah, P., Devlieghere, F., Njumbe Ediage, E., Jacxsens, L., De Meulenaer, B., & De Saeger, S. (2015). Toxigenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method. *Food Microbiology*, 52, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.016>
- Zahija, I., Jeršek, B., Demšar, L., Polak, M. L., & Polak, T. (2023). Production of Aflatoxin B1 by *Aspergillus parasiticus* Grown on a Novel Meat-Based Media. *Toxins*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/toxins15010025>