

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

Hmeljarski bilten

Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

28(2021)



Žalec 2021

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

Hmeljarski bilten Hop Bulletin

28(2021)



Žalec, 2021

Hmeljarski bilten / Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

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

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

Tehnično urejanje

Žan Trošt

Uredniški odbor /

Editorial board

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

Naslov uredništva,
politika /

Editorial office and
policy

Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija / Slovenia;
e-pošta / e-mail: barbara.ceh@ihps.si

Člani uredniškega odbora so tudi recenzenti prispevkov. Prispevki so najmanj dvojno recenzirani. Za jezikovno pravilnost odgovarjajo avtorji. S poslanim člankom se avtorji strinjajo tudi za spletno objavo revije. /

Articles are reviewed and revised. Authors are fully responsible for linguistic structure of the text. By sending an article, the authors agree for the online and printed publication of the journal.

Recenzenti
Reviewers

v tej številki izven uredniškega odbora:
outside the Editorial Board for this number:

Marjeta Eržen (IHPS), **Silvo Žveplan** (IHPS), **Gregor Leskošek** (IHPS), **Ana Karničnik** (IHPS), dr. **Miha Ocvirk** (IHPS), dr. **Vesna Zupanc** (BF UL), dr. **Igor Šantavec** (BF UL)

Domača stran /
Home page

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

Bilten zajemajo /
Indexed and
abstracted by

COBISS, CABI Publishing, EBSCO Publishing

Tisk / Printed by

Grafika Gracer d.o.o.

Avtorske pravice /
Copyright

© 2021 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije /
© 2021 Slovenian Institute of Hop Research and Brewing

Izdajo sofinancira Agencija za raziskovalno dejavnost RS. /

The issue was financially supported by the Slovenian Research Agency.

VSEBINA / CONTENTS

Tanja GUČEK in Sebastjan RADIŠEK Verifikacija metode PCR za določanje glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> in <i>Verticillium dahliae</i> Verification of PCR for detection of fungi <i>Verticillium nonalfalfae</i> and <i>Verticillium dahliae</i>	4
Magda RAK CIZEJ in Franček POLIČNIK Zmanjševanje populacije hmeljevega rilčkarja (<i>Neoplitus tigratus porcatus</i> [Panzer]) na hmelju (<i>Humulus lupulus</i> L.) Reduction population of the hop snout weevil (<i>Neoplitus tigratus porcatus</i> [Panzer]) on hop (<i>Humulus lupulus</i> L.)	16
Miha OCVIRK, Ksenija RUTNIK in Iztok Jože KOŠIR Vpliv bakra na indeks staranja hmelja Influence of copper content on hop storage index	26
Douglas MACKINNON in Martin PAVLOVIČ Review of hop market characteristics Pregled značilnosti trga hmelja.....	34
Gašper KORAT in Petra TERPINC Vpliv komercialnih kvasovk nottingham in belle saison na učinkovitost fermentacije in nekatere lastnosti piva The impact of commercial yeasts nottingham and belle saison on the efficiency of fermentation and certain beer properties	48
Tanja GUČEK CRISPR/cas sistemi: prihodnost določanja nukleinskih kislin CRISPR/cas systems: the future of nucleic acid detection	57
Maja DOBRAJC, Jernej JAKŠE in Sebastjan RADIŠEK Rastlinski virusi in viroidi v vodi Plant viruses and viroids in water	65
Jan Jurij ERŽEN, Anita KRANČIČ in Ivan PLANTAN Določanje vsebnosti kanabinoidov v komercialnih vzorcih konopljinih olj Determination of content of cannabinoids in commercial samples of cannabis oils	75
Matjaž GLAVAN, Luka HONZAK, Luka ŽVOKELJ, Rozalija CVEJIĆ, Boštjan NAGLIČ in Marina PINTAR Sistem za podporo odločanju o namakanju (SPON): primer uporabe v pridelavi hmelja Irrigation decision support system (SPON): example of use in hop production.....	85

VERIFIKACIJA METODE PCR ZA DOLOČANJE GLIVE *Verticillium nonalfalfae* IN *Verticillium dahliae*

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADISEK²

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Prispelo / received: 15. 10 2021

Sprejeto / accepted: 28. 11 2021

Izvleček

Z namenom pridobitve akreditacije za diagnostično metodo »PCR za določanje glive *Verticillium nonalfalfae* in *Verticillium dahliae*« (MDL 02) smo izvedli njeno verifikacijsko preskušanje. Metoda je del EPPO standarda PM7/78 (2) »*Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*«, zato je že bila delno validirana. V skladu z EPPO smernicami za validacijo metod PM 7/98 (4) smo analizirali rezultate predhodnih raziskav, izvedli oceno tveganja in pripravili plan za verifikacijo metode. V sklopu verifikacije metode smo analizirali analitično občutljivost, ponovljivost, obnovljivost ter vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate. Pri analitični občutljivosti smo mejo zaznavnosti (LOD) določili pri 1 pg in mejo določljivosti (LOQ) pri 0,1 ng. Ponovljivost in obnovljivost metode smo analizirali s kombinacijo primerjave 5 analitikov, 2 kompletov DNA polimeraz in 2 PCR inštrumentov na setu 14 vzorcev. Skupno smo analizirali 338 vzorcev in jih določili z 98,8 % natančnostjo. Dodatno smo analizirali 96 vzorcev izoliranih s CTAB reagentom in potrdili negativen vpliv izolacije na rezultate v primeru večjih odstopanj od protokola. Z raziskavo smo potrdili, da je verifikacija oziroma validacija metod ključna za zagotavljanje zanesljivih rezultatov.

Ključne besede: verticilijska uvelost hmelja, verifikacija, analitična občutljivost, ponovljivost, obnovljivost, CTAB reagent

VERIFICATION OF PCR FOR DETECTION OF FUNGI *Verticillium nonalfalfae* AND *Verticillium dahliae*

Abstract

In order to apply for accreditation of in-house method "PCR for detection of *Verticillium nonalfalfae* and *Verticillium dahliae*" (MDL 02) verification of method was performed. The method is part of EPPO standard PM 7/78 (2) "*Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*", so it has been partially validated. In accordance with EPPO guidelines for the validation of methods PM 7/98 (4) we

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

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

analyzed the results of previous research, performed a risk analysis and prepared a verification plan for the method. In the scope of verification we analyzed the analytical sensitivity, repeatability, reproducibility and the influence of nucleic acid isolation on the results. In the case of analytical sensitivity, the detection limit (LOD) was determined at 1 pg and the limit of quantification (LOQ) at 0.1 ng. The repeatability and reproducibility of the method were analyzed by comparing 5 operators, 2 kits and 2 PCR instruments on a set of 14 samples. A total of 338 samples were analyzed and determined with 98.8 % accuracy. Additional 95 samples isolated with CTAB reagent were analyzed and the negative impact of isolation on the results in the case of major deviations from protocol was confirmed. Our research confirmed that verification or validation of methods is crucial to obtain reliable results.

Key words: hop verticillium wilt disease, verification, analytical sensitivity, repeatability, reproducibility, CTAB reagent

1 UVOD

Za validacijo in verifikacijo metod, ki so v postopku akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 so na voljo EPPO smernice PM 7/98 (4) »Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity« (EPPO, 2019). Pri vsaki diagnostični metodi za določanje rastlinskih škodljivih organizmov je potrebno določiti analitično občutljivost, specifičnost (vključenost in ekskluzivnost), selektivnost, ponovljivost in obnovljivost. Del obnovljivosti je lahko tudi analiza robustnosti, ki kaže na stopnjo neobčutljivosti metode na odstopanja v izvedbi, okoliščinah in kakovosti materialov (starost in stanje vzorca, različni reagenti,...). Ločeno določanje robustnosti pogosto ni potrebno, ker je to že del razvoja metode (EPPO, 2019).

V postopku akreditacije izbrane metode je potrebno izvesti oceno tveganja in identificirati katera merila uspešnosti morajo biti ocenjena in v kakšnem obsegu. V sklopu ocene tveganja se pregleda namen uporabe metode (glede na potrebe naročnika), določi kriterije za uspešno izvedbo, pregleda podatke o validaciji in drugih predhodnih rezultatih. V primeru, da podatkov o izvedbi validacije ni, se izvede celotna validacija. Ko podatki niso zadostni se izvede delna validacija oziroma verifikacija. V primeru, da je uporabljena metoda predhodno že ustrezno validirana pa se lahko izvede samo verifikacija (EPPO, 2019).

Verifikacija zagotavlja objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo validirane metode v skladu z določenimi merili uspešnosti. Verifikacijo se lahko izvede z uspešnim sodelovanjem v med-laboratorijskih primerjavah, če so pri tem izpolnjene zahteve iz preglednice 1. Selektivnosti navadno v okviru verifikacije ni potrebno določati, razen če gre za serološke metode (EPPO, 2019).

V primeru, da je metoda predhodno že validirana se pripravi plan verifikacije pri katerem je potrebno upoštevati izid ocene tveganja. Nato se izvede verifikacijo glede na posamezno merilo uspešnosti v skladu z navodili v preglednici 1. Odstopanja od validirane metode so dovoljena v primeru proizvajalcev reagentov in uporabljene opreme, razen ko je le-to točno določeno (EPPO, 2019).

Preglednica 1: Navodila za izvedbo verifikacije metode (EPPO, 2019).

Merila uspešnosti	Metoda verifikacije
Analitična občutljivost	Analiziraj vsaj osem vzorcev pri določeni meji zaznavnosti (LOD).
Analitična specifičnost (vključenost in ekskluzivnost)	Izberi nekaj glavnih tarč (različne izolate) za določitev vključenosti in ne-tarč za določitev ekskluzivnost. Analiza mora biti izvedena na optimalni/srednji koncentraciji tarče.
Ponovljivost	Izvedi vsaj tri sočasne teste na istih vzorcih z nizko koncentracijo tarče.
Obnovljivost	Enako kot ponovljivost, samo da v različnih časovnih okvirih, če mogoče z različnimi analitiki in če je to pomembno z različno opremo.

Po izvedbi verifikacije se oceni ali laboratorij ustreza kriterijem določenim v validirani metodi. Rezultate se poda v verifikacijskem poročilu in določi ustreznost metode. V primeru, da verifikacija metode ni uspešna se odpravi napake in ponovno izvede verifikacijo oziroma validacijo. Če rezultati tudi po opravljenih modifikacijah metode niso ustrezni in v skladu z določenimi kriteriji, laboratorij ne more izvajati metode glede na uveljavljena merila uspešnosti (EPPO, 2019).

V Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin (DL) na IHPS je v postopku akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 diagnostična metoda MDL 02, ki omogoča molekularno identifikacijo gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* na hmelju in ostalih gostiteljskih rastlinah. Metoda MDL 02 omogoča na nivoju izolatov *V. nonalfalfae* iz hmelja dodatno določitev letalnega patotipa (PV), ki povzroča bolezen letalno obliko verticilijske uvelosti hmelja. Metoda je del EPPO standarda PM7/78 (2) »*Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*«, zato je predhodno že bila delno validirana (EPPO, 2020).

Po pregledu dosedanjih raziskav molekularne identifikacije gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* smo zbrali podatke o validaciji metode. V okviru analitične specifičnosti so bili v predhodnih raziskavah testirani specifični začetni oligonukleotidi (ZO) (preglednica 2). Analitično specifičnost je bila za *Verticillium nonalfalfae* testirana na 9 izolatih (Inderbitzin in sod., 2013) in dodatno na 50

izolatih Genske banke na IHPS (Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019) v okviru vključenosti (inclusivity). Ekskluzivnost (exclusivity) metode je bila testirana na izolatih drugih gliv (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019). Za *Verticillium dahliae* je bila vključenost testirana na 6 izolatih (Inderbitzin in sod., 2013) in dodatno na 12 izolatih iz Genske banke na IHPS (Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019). Ekskluzivnost je bila testirana na izolatih drugih gliv (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019).

Specifičnost je bila testirana tudi za ZO, ki določajo letalni patotip (4CHR4-F/R), v okviru vključenosti je bilo testirano 50 izolatov *V. nonalfalfae* iz hmelja, od tega je bilo 33 letalnih izolatov in 17 blagih. Ekskluzivnost je bila testirana na drugih gostiteljih *V. nonalfalfae* in netarčnih vrstah rodu *Verticillium*. Potrjeni so bili nespecifični signali pri *V. dahliae*, zato je potrebno predhodno določiti prisotnost *V. nonalfalfae* (NoF/NuR) in naknadno letalni patotip (EPPO, 2020).

Analitična občutljivost je bila analizirana v okviru raziskave Inderbitzin in sod., 2013. V raziskavi je bila določena meja zaznavnosti (LOD) 1 pg DNA na reakcijo. Analitična selektivnost je bila testirana v okviru specifičnosti, ko so bili testirani izolati iz različnih sort hmelja in različnih gostiteljev (hmelj, paprika, krizanteme, kumare, vinska trta) (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019).

V pregledani literaturi podatkov o ponovljivosti in obnovljivosti metode nismo zasledili, zato je bil namen naše analize, da jo sami izvedemo. Prav tako smo se odločili, da dodatno izvedemo analitično občutljivost, ki se lahko zaradi vpliva posameznih uporabljenih materialov razlikuje od določene. Hkrati smo želeli določiti tudi vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate, ker jo izvajajmo z lastno razvito CTAB metodo. Z izvedbo delne validacije oziroma verifikacije metode MDL 02 je bil naš namen, da zagotovimo objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo akreditirane metode.

2 MATERIAL IN METODE

Glede na rezultate predhodnih raziskav (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019) in EPPO standarda PM 7/78 (2) (EPPO, 2020) smo izvedli oceno tveganja in pripravili plan za verifikacijo metode. V okviru verifikacije smo izvedli analizo analitične občutljivosti, ponovljivosti, obnovljivosti ter vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate.

Metoda MDL 02 obsega izolacijo DNA iz namnožene glivne kulture z uporabo CTAB metode, ki ji sledi PCR analiza z ZO, ki so specifični za določitev vrste ali patotipa. Namnožene PCR produkte analiziramo z agarozno gelsko elektroforezo.

2.1 Izolati gliv

Izolati uporabljeni v raziskavi so del Referenčne zbirke škodljivih organizmov IHPS. Za *V. nonalfalfae* smo uporabili izolat T2 (šifra IHPS referenčne zbirke - 1VD (letalni patotip)), izolat T6 (šifra IHPS referenčne zbirke - 3VD (letalni patotip)) in izolat ZUPANC (šifra IHPS referenčne zbirke - 33VD (blagi patotip)). Za *V. dahliae* smo uporabili izolat PAP2008 (šifra IHPS referenčne zbirke - 45VD) in izolat krizantem (šifra IHPS referenčne zbirke - 188VD). Za negativno kontrolo izolacije (gliva, ki ni iz rodu *Verticillium*) smo uporabili izolat *Fusarium equiseti* (šifra IHPS referenčne zbirke - 33 F).

2.2 Izolacija nukleinskih kislin

Vzorec nam je predstavljala kultura glive na trdnem gojišču. Za DNA izolacijo smo s skalpelom postrgali približno 1 cm² kulture, ki smo jo prenesli v terilnico. V skladu z modificiranim protokolom CTAB izolacije (Kump in Javornik, 1996) smo dodali 2 mL CTAB pufra, ki je ogret na temperaturo 68 °C ter 0,5 g kremenčevega peska (očiščen karborundum 0,1–0,5 mm), ki ob trenju dodatno pospeši homogenizacijo tkiva. Mešanico smo trli toliko časa, da smo dobili tekočo homogenizirano zmes. Iz terilnice smo nato odpipetirali dva pod-vzorca volumna 700 µL v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Te smo nato 1 h inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 68 °C. Izolacijo smo nato nadaljevali v skladu s protokolom CTAB izolacije (Kump in Javornik, 1996).

Z namenom testiranja vpliva izolacije nukleinskih kislin na rezultat metode MDL 02 smo primerjali več različnih postopkov CTAB izolacije. Namen primerjave različnih postopkov je bil, da ugotovimo, če uporabljamo optimalno kombinacijo in kakšna odstopanja od standardnega postopka so še sprejemljiva. Po izolaciji smo izvedli PCR s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R).

Posamezni postopki (standardni postopek) so se razlikovali glede na:

1. uporabo različnih reagentov (samostojna priprava/ komercialni),
2. merjenje vzorca (1 cm²/ 2 cm²/brez merjenja),
3. tehtanje kremenčevega peska (0,5 g/ 1 g),
4. čas in temperatura inkubacije vzorcev v vodni kopeli (1 h pri 60 °C/ 1,5 h pri 60 °C/ 1 h pri 68 °C/ 1,5 h pri 68 °C/ 1 h pri 72 °C/ 1,5 h pri 72 °C),
5. čas precipitacije pri -20 °C (1 h/ 2h/ preko noči).

Pri vsakem od postopkov smo analizirali 6 vzorcev:

- 2 vzorca glive *Verticillium nonalfalfae* (1 VD, 33 VD)
- 2 vzorca glive *Verticillium dahliae* (45 VD, 188 VD)
- 1 negativen vzorec glive (33 F)
- NIC= negativna kontrola izolacije (samo CTAB pufer)

2.3 Verifikacija metode

2.3.1 Analitična občutljivost

Analitično občutljivost molekularne identifikacije gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* s specifičnimi ZO je bila analizirana v okviru raziskave Inderbitzin in sod., 2013. V raziskavi je bila določena meja zaznavnosti (LOD) 1 pg DNA na reakcijo.

Dodatno smo opravili analize serij redčitev (5-kratna do 10^{-7}) DNA vzorcev izoliranih iz različnih izolatov gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae*. Za vsak ZO smo pripravili serijo redčitev dveh vzorcev, skupno 16 vzorcev (NoF/NuR: 33 VD, 1 VD; ITS1/4: 1 VD, 45 VD; Df/r: 45 VD, 188 VD; 4CHR4-F/R: 1 VD, 3 VD). V okviru analize občutljivosti smo z ZO za interno kontrolo (ITS1/4) primerjali tudi dva različna kompleta reagentov DNA polimeraz (Promega in NEB), da bi ugotovili ali je trenutno uveljavljen postopek najbolj optimalen in ali je na voljo kakšna ustrezna alternativa.

2.3.2 Ponovljivost in obnovljivost

Ponovljivost in obnovljivost metode MDL 02 smo analizirali s primerjavo 5 analitikov, 2 kompletov DNA polimeraz (Promega, NEB) in 2 PCR inštrumentov (Eppendorf, Roche). Analizo vzorcev so različni analitiki izvedli na istem setu 14 vzorcev, od izolacije DNA do PCR analize s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R) (preglednica 2). Vzorce smo analizirali pri optimalni koncentraciji in pri LOQ.

2.4 PCR reakcija

2.4.1 Začetni oligonukleotidi (ZO)

PCR analizo smo izvedli s pari ZO, ki so specifični za posamezno vrsto oz. v primeru *V. nonalfalfae* za letalni patotip (preglednica 2). Vsak vzorec smo najprej namnožili z ZO za interno kontrolo (ITS1/4), ki služi za preverjanje uspešnosti DNA izolacije (preglednica 2), nato pa z ZO za glive (EPPO, 2020).

Preglednica 2: Zaporedja ZO za določanje vrste in patotipov gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* (EPPO, 2020).

Oznaka ZO	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Temperatura prileganja [°C]	Par identificira vrsto/patotip	Dolžina PCR produkta (bp)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55 °C		
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		Interna kontrola	650
NoF	CCTCGAAAAATCCACCAGCTCTA	64 °C	<i>V. nonalfalfae</i>	1310
NoNuR	GTGGTTGAGATCCTCACGCTTC			
4CHR4-F	CGAGGGCCCTTATACATCAA	64 °C	<i>V. nonalfalfae</i>	585
4CHR4-R	CTAATGAAGGCGGTG GGTA		(letalni patotip)	
Df	CCGGTCCATCAGTCTCTCTG	67 °C	<i>V. dahliae</i>	490
Dr	CTGTTGCCGCTTCACTCG			

2.4.2 PCR reakcija

Verifikacijo smo izvedli na inštrumentu Mastercycler nexus GSX 1 (Eppendorf, Nemčija) in LightCycler96 (Roche, Švica) z uporabo kompleta DNA polimeraz GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega, ZDA) in OneTaq DNA Polymerase (NEB, ZDA). Reakcijska mešanica in PCR program za določanje vrste in patotipov gliv *V. nonalfalfae* in *V. dahliae* z različnimi pari ZO je bil kot predhodno opisano v EPPO (2020). PCR produkte smo analizirali na 1,5 % agaroznem gelu v 1x TBE pufu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/mL). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 170 V in 180 mA, 60 min. Po končani elektroforezi smo agarozni gel analizirali na UV transiluminatorju sistema za slikanje gelov (Syngene, ZDA).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Izolacija nukleinskih kislin

V primerjavo različnih načinov izvedbe CTAB izolacije smo vključili velika odstopanja od standardnega postopka (2-kratna količina vzorca in kremenčevega peska, ± 8/4 °C nižje/ višje temperature inkubacije,...), ki jih pri rutinskih analizah ne izvajamo. Na ta način smo želeli dobiti širšo sliko kako lahko skrajne spremembe postopka vplivajo na rezultate in kakšne smiselne limite oziroma odstopanja si lahko postavimo. Pri analizi vpliva izolacije nukleinskih kislin smo analizirali 6 vzorcev (1VD, 33VD, 45VD, 188 VD, 33F, NIC) s petimi različnimi postopki, skupno 96 vzorcev (preglednica 3). Vse vzorce smo analizirali s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R). Pri ZO, ki določajo *V. dahliae* (Df/r) smo zaradi neustreznega začetnega materiala (starost izolata 45 VD) dobili več lažno negativnih rezultatov pri vseh postopkih, zato jih nismo vključili v primerjavo.

Pri različnih ZO (NoF/NuR, ITS1/4, 4CHR4-F/R) so bila med načini izvedbe odstopanja, v več primerih pa smo dobili tudi lažno negativne rezultate (preglednica 3). Pri treh parih ZO smo prisotnost glive določili s 93 % uspešnostjo (268 ustreznih določenih od 288 vseh). Negativen vpliv na rezultat smo potrdili v primeru, da so bila znotraj določenega koraka odstopanja med različnimi načini izvedbe.

Pri uporabi reagentov nismo potrdili vpliva, ker smo pri samostojno pripravljenih in komercialno dostopnih reagentih dobili enak rezultat. Negativen vpliv na končni rezultat smo potrdili (uspešna določitev glive v 89 %) pri povečani začetni količini analizirane glive (2 cm²), ker razmerje med količino glive in CTAB reagenta ni bilo ustrezno (preglednica 3). Zaradi prevelike količine micelija glivnih kultur je prišlo do slabše homogenizacije in prekomerne izolacije inhibitorjev PCR reakcije, kar se je izrazilo v obliki lažno negativnih rezultatov.

Prav tako smo negativen vpliv potrdili pri povečani količini (1 g) kremenčevega peska, pri kateri smo porušili ustrezno razmerje za uspešno homogenizacijo tkiva. Glede na le 60 % uspešnost določitve glive v vzorcu je pri CTAB izolaciji ustrezno doziranje kremenčevega peska ključno (preglednica 3).

Negativen vpliv na rezultate je imela tudi nižja temperatura inkubacije vzorcev v vodni kopeli pri 60 °C namesto 68 °C (uspešna določitev glive v 83 %). V tem primeru zaradi prenizke temperature v kombinaciji z 1 h inkubacijo ni prišlo do ustrezne lize celic in ponovno do lažno negativnih rezultatov (preglednica 3). V primeru, da smo čas inkubacije pri 60 °C podaljšali na 1,5 h so bili rezultati ustrezní. Na rezultate povišanje temperature iz 68 °C na 72 °C ni imelo negativnega vpliva, ker DNA ni tako termično nestabilna. Tudi pri primerjavi različnih časov precipitacije pri -20 °C nismo potrdili negativnega vpliva na določitev glive v vzorcu.

S primerjavo različnih načinov izvedbe CTAB izolacije smo tako določili negativen vpliv na rezultate pri 2-kratnem povečanju začetne količine glive (2 cm²) in kremenčevega peska (1 g) ter zmanjšani temperaturi inkubacije (1 h pri 60 °C). Rezultati se ujemajo z opažanji predhodnih analiz določanja gliv iz rodu *Verticillium* (Radišek in sod., 2003, 2004, 2006) in več letnim delom na optimizaciji postopka CTAB izolacije. S to analizo smo dobili podatke kateri koraki so v postopku bistveni in v katerih so dovoljena manjša odstopanja. V vsakem primeru je za uspešno izvedbo potrebno upoštevati protokol in vedno poleg vzorcev uporabiti tudi ustrezne kontrole izolacije in kvaliteten referenčni material.

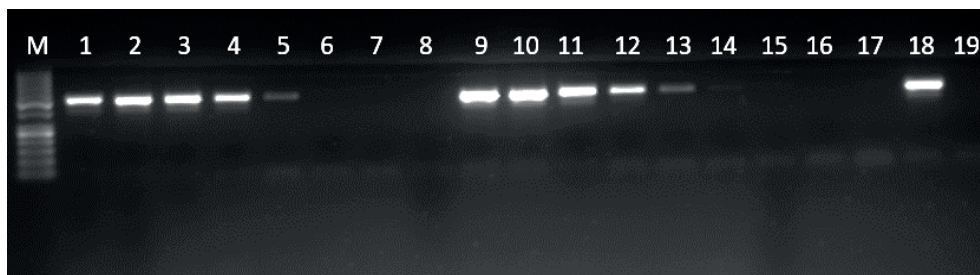
Preglednica 3: Vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate MDL 02.

Postopek	Primerjava CTAB izolacije*	Ustrezni rezultat/vsi vzorci			Vpliv na rezultat
		NoF/NuR	ITS1/4	4CHR4-F/R	
1	Samostojna priprava	6/6	6/6	5/6	Ni vpliva
	Komercialni reagenti	6/6	6/6	5/6	Ni vpliva
2	1 cm ² kulture	6/6	6/6	5/6	Ni vpliva
	2 cm ² kulture	5/6	6/6	5/6	Negativen
	Brez tehtanja/merjenja	5/6	6/6	6/6	Ni vpliva
3	0,5 g kremenčevega peska	5/6	5/6	6/6	Ni vpliva
	1 g kremenčevega peska	4/6	2/6	5/6	Negativen
4	1 h pri 60 °C	4/6	6/6	5/6	Negativen
	1,5 h pri 60 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	1 h pri 68 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	1,5 h pri 68 °C	6/6	5/6	6/6	Ni vpliva
	1 h pri 72 °C	6/6	5/6	6/6	Ni vpliva
	1,5 h pri 72 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
5	1 h pri -20 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	2 h pri -20 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	Preko noči pri -20 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
Skupaj		89/96	89/96	90/96	

*s krepkimi črkami so označeni standardni postopki

3.2 Analitična občutljivost

Analitična občutljivost metode MDL 02 je bila predhodno že določena (Inderbitzin in sod., 2013), v okviru verifikacije smo zato želeli določiti LOD in LOQ glede na naše reagente, opremo in izolate. Pri ZO NoF/NuR in Df/r smo vzorce zaznali do redčitve 10^{-4} (1 pg) in pri ITS1/4 in 4CHR4-F/R do redčitve 10^{-3} (0,01 ng). Na sliki 1 so podani rezultati za serijo redčitev (5-krat do 10^{-7}) za dva vzorca pomnožena z ZO Df/r. Iz slike je razvidno padanje intenzitete signala, ki je pri redčitvi 10^{-4} še komaj viden.



Slika 1: Analiza občutljivosti za ZO Df/r. Serija redčitev (5-kratna do 10^{-7}) za dva vzorca (45 VD od 1 do 8; 188 VD od 9 do 16) in kontrole (NIC= 17, PAC= 18, NAC= 19). M= velikostni standard, 50 bp.

Mejo zaznavnosti (LOD, koncentracija pri kateri z več kot 50 % zanesljivostjo zaznamo glivo) smo določili pri 1 pg oziroma 0,01 ng, kar se ujema z rezultati raziskave Inderbitzin in sod. (2013). Po opravljenih analizah vzorcev pri nizkih koncentracijah smo mejo določljivosti (LOQ, koncentracija pri kateri še dobimo pozitiven signal s 100 % zanesljivostjo) metode MDL 02 določili pri 0,1 ng oziroma redčitvi 10^{-2} .

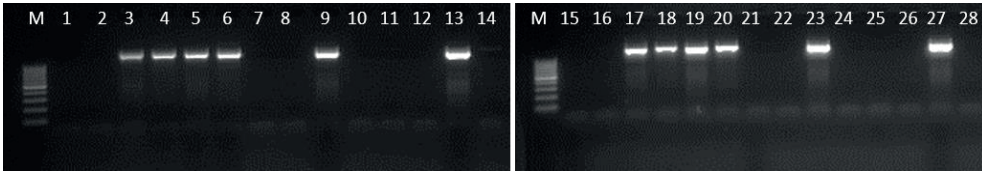
V primeru ZO za interno kontrolo ITS1/4 smo iste vzorce analizirali z dvema kompletoma DNA polimeraz (Promega in NEB) in dobili pri Promegi ustrezne rezultate, pri NEB pa v primeru višjih koncentracij tarče (5-kratna in 10^{-1} redčitev) lažno negativne rezultate. Primerjavo med kompleti DNA polimeraz smo izvedli tudi v okviru ponovljivosti in prav tako dobili lažno negativne rezultate v primeru 5-kratne redčitve, kar je bila najverjetneje posledica inhibicije. Zaradi nezanesljivih rezultatov smo se odločili, da NEB ni primeren za analizo višjih koncentracij in zato preostali del verifikacije izvedli samo s Promega kompletom reagentov.

3.3 Ponovljivost in obnovljivost

Rezultati analize ponovljivosti in obnovljivosti metode MDL 02 so bili primerljivi v enakih in različnih časovnih točkah, med analitiki in inštrumenti. V končno analizo rezultatov primerjave med kompleti DNA polimeraz nismo vključili, ker smo pri kompletu NEB potrdili vpliv inhibicije. Vsak analitik je na istem setu 14 vzorcev izvedel CTAB izolacijo in PCR s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R). Vzorce smo analizirali pri optimalni koncentraciji (5-kratna redčitev) in pri LOQ (redčitev 10^{-2}).

Pri treh analitikih smo dobili primerljive rezultate pri vseh analiziranih vzorcih pri vseh štirih parih ZO. Na sliki 2 so prikazani rezultati primerjave med dvema analitikoma za par ZO NoF/NuR, ki identificira vrsto *V. nonalfalae*. Iz slike je

razvidno, da so rezultati pri obeh analitikih enaki, razlika je le v intenziteti signalov, kar je posledica ločene CTAB izolacije.



Slika 2: Primerjava seta 14 vzorcev z ZO NoF/NuR med dvema analitikoma (1. analitik: od 1 do 14, 2. analitik: od 15 do 28). Vzorci od 3 do 6 (od 17 do 20) so pozitivni na *V. nonalfalae*, vzorci 1 in 2 (15 in 16) ter 7 in 8 (21 in 22) so *V. dahliae*. Vzorec 9 (23) je PIC 1= 1VD, vzorec 13 (27) je PAC 1= 1VD, preostale kontrole (PIC 2= 45 VD, NIC, PAC 2= 45 VD, NAC) so negativne. M= velikostni standard, 50 bp.

Pri dveh analitikih smo pri treh ZO dobili lažno negativen rezultate pri 4 vzorcih. Ko smo analizo ponovili so bili rezultati ustrezni. Lažno negativne rezultate smo dobili pri 5-kratni redčitvi vzorcev, medtem ko so bili pri 10^{-2} rezultati ustrezni. Prav tako samo za te vzorce dobili ustrezne pozitivne signale pri interni kontroli, zato sklepamo da ni bila težava v CTAB izolaciji ampak v inhibiciji PCR reakcije. Skupno smo s Promega komercialnim kompletom in štirimi pari začetnih oligonukleotidov analizirali 338 vzorcev, od tega smo dobili lažno negativen rezultat pri 4 vzorcih (1 vzorec pri NoF/NuR, 1 vzorec pri Df/r, 2 vzorca pri 4CHR4-F/R), tako da je natančnost pri pogojih ponovljivosti in obnovljivosti 98,8 %.

4 ZAKLJUČEK

Uporabnost metod za določanje rastlinskih škodljivih organizmov je odvisna od zanesljivosti, občutljivosti, ponovljivosti, hitrosti, zahtevnosti in cene. V primeru, da je metoda akreditirana je poleg omenjenih faktorjev ključna tudi validacija metode. Da lahko zagotovimo zanesljive rezultate je potrebno v laboratoriju vzpostaviti ustrezen sistem kakovosti, delati v skladu s standardom ISO/IEC 17025:2017 in EPPO smernicami (EPPO, 2019). Pri molekularnih metodah, kot je PCR, je podajanje rezultatov kvalitativno (negativno/pozitivno), zato je zagotavljanje ustreznih rezultatov še pomembnejše. Prisotnost škodljivih organizmov v vzorcu je mogoče zanesljivo določiti le z uporabo ustreznega referenčnega materiala in kontrol. Zelo pomembno pa je tudi vsakoletno sodelovanje v med-laboratorijskih primerjavah.

Z delno validacijo oziroma verifikacijo diagnostične metode za molekularno identifikacijo gliv *V. nonalfalae* in *V. dahliae* smo določili analitično občutljivost

metode (LOD pri 1 pg in LOQ pri 0,1 ng), ponovljivost in obnovljivost (98,8 % natančnost). Prav tako smo analizirali vpliv izolacije nukleinskih kislin na PCR rezultate in potrdili negativen vpliv pri 2-kratnem povečanju začetne količine glive (2 cm²) in kremenčevega peska (1 g) ter zmanjšani temperaturi inkubacije (1 h pri 60 °C). S to analizo smo dobili podatke kateri koraki so v postopku bistveni in v katerih so dovoljena manjša odstopanja. Z verifikacijo metode MDL 02 smo zagotovili objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo metode v skladu z določenimi merili uspešnosti.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Upravi RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Zahvala za odlično tehnično izvedbo verifikacije metode gre osebju v Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin na IHPS: Silviji Žgajner, Sabini Gobec, Mariji Grašinar in Maji Dobrajc.

5 VIRI

- EPPO. Diagnostics protocol PM 7/78 (2) *Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2020; 50(3): 462-476.
- EPPO. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2019; 49 (3): 530-563.
- Grgič, Z. Razvoj metode z zanko posredovanega izotermalnega pomnoževanja za določanje gliv rodu *Verticillium*. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2019: 140 strani.
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., Subbarao, K.V. Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR Assays. PLoS ONE. 2013; 8: e65990. doi:10.1371/journal.pone.0065990.
- Jeseničnik, T. Identifikacija in diferenciacija patogenih gliv rodu *Verticillium* z uporabo novih enostavnih in multipleks PCR označevalcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2014: 120 strani.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. Plant Science. 1996; 114: 149–158.
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Development of pathotype specific SCAR markers for the detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. Plant Disease. 2004; 88: 1115-1122.
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. European Journal of Plant Pathology. 2006; 116: 301-314.
- Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., Javornik, B. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Disease. 2003; 87: 633-638.

ZMANJŠEVANJE POPULACIJE HMELJEVEGA RILČKARJA (*Neoplintus tigratus porcatus* [Panzer]) NA HMELJU (*Humulus lupulus* L.)

Magda RAK CIZEJ¹ in Franček POLIČNIK²

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 20. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 17. 12. 2021

Izvleček

Hmeljev rilčkar (*Neoplintus tigratus porcatus* [Panzer]) je monofagni škodljivec, ki se prehranjuje izključno na rastlinah hmelja (*Humulus lupulus* L.). Ličinke vrtajo v podzemne dele rastlin ter ovirajo sprejem vode in hranil, s čimer povzročajo gospodarsko škodo. Rastline hmelja slabše rastejo, dosegaajo nižje pridelke in slabšo kakovost pridelka. V letih 2019 in 2020 smo proučevali učinkovitost treh pripravkov na zmanjševanje populacije hmeljevega rilčkarja. Pripravek Nemakil 330 je v letu 2019 statistično značilno zmanjšal število izvrtin na podzemnih delih stebela hmelja, posledično je bilo tudi manjše število ličink. V letu 2020 smo vključili še pripravka Maska in Maska Universal. Najboljši rezultat zmanjšanja populacije hmeljevega rilčkarja (število ličink in izvrtin) smo dosegli s kombinacijo pripravka Maska in Maska Universal.

Ključne besede: hmeljev rilčkar, *Neoplintus tigratus porcatus*, hmelj, *Humulus lupulus*

REDUCTION OF POPULATION OF THE HOP SNOUT WEEVIL (*Neoplintus tigratus porcatus* [Panzer]) ON HOP (*Humulus lupulus* L.)

Abstract

The hop snout weevil (*Neoplintus tigratus porcatus* [Panzer]) is a monophagous pest that feeds on hop plants (*Humulus lupulus* L.). Larvae cause damage with boreholes inside the underground parts of plants, resulting in impaired water and nutrients uptake and consequently financial loss. Hop plants grow slowly, reach lower yields and hop quality. In 2019 and 2020, we studied the effectiveness of the three products on the control of the population of hop snout weevils. In 2019, the Nemakil 330 statistically significantly reduced the number of holes in the underground parts of hop stems, which resulted in a smaller number of larvae. In 2020, we additionally included the Maska and Maska Universal. The best result of

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-pošta: magda.rak-cizej@ihps.si

² Mag. inž. hort., prav tam, e-pošta: franci.policnik@ihps.si

reducing the population of hop weevils (number of larvae and holes) was achieved with a combination of the Maska and Maska Universal.

Key words: hop snout weevil, *Neoplinthus tigratus porcatus*, hop plant, *Humulus lupulus*

1 UVOD

Hmeljev rilčkar (*Neoplinthus tigratus porcatus* [Panzer]=*Plinthus porcatus*) je monofagni škodljivec, ki se prehranjuje izključno na hmelju. Vrsta je poleg Slovenije prisotna v Avstriji, na Hrvaškem, Češkem, v Nemčiji, na Madžarski, v Italiji, na Poljskem, v Romuniji, na Slovaškem in v Ukrajini (Fauna Europaea..., 2021). V literaturi je navedeno, da se je hmeljev rilčkar preselil iz divjega hmelja na gojeni hmelj (*Humulus lupulus*). V Savinjski dolini so hmeljevega rilčkarja prvič opazili v velikem številu leta 1893, ko je bila zaradi številčnosti pojava, prvič vidno opazna škoda v hmeljiščih (Janežič, 1951). Odrasel osebek hmeljevega rilčkarja je temno rjave do črne barve, pokrovke so pokrite s sivimi luskami, v dolžino meri 12 do 14 mm. Ličinke so bele barve z rjavo glavo in brez nog. Škodo povzročajo ličinke z izjedanjem podzemnih delov hmelja (podzemna stebela in korenika). Poškodovana korenika hmelja in podzemni deli stebel imajo za posledico omejen sprejem in transport vode in hranil po rastlini (Dolinar in sod., 2002). V eni rastlini je lahko med 8 in 10 ličink hmeljevega rilčkarja, ob močnejšem napadu tudi do 20 (Janežič, 1951). Poškodovane rastline slabše rastejo, posledično rastline dosegajo nižji pridelek, ki je slabše kvalitete. Ob močnejšem napadu ličink hmeljevega rilčkarja lahko posamezne rastline hmelja popolnoma propadejo (Dolinar in sod., 2002).

Odrasli hrošči hmeljevega rilčkarja se pojavijo v začetku maja in v juniju. V tem času samice odlagajo jajčeca tik nad tlemi hmeljne rastline. Izležene ličinke se zavrtajo v podzemni del stebela, kjer se s prehranjevanjem pomikajo po hmeljni rastlini navzdol (Janežič, 1956). Ličinke hmeljevega rilčkarja prezimijo v podzemnih delih stebela in koreniki hmelja, kjer se zabubijo v spomladanskem času (Rak Cizej in Oset Luskar, 2012).

Ličinke hmeljevega rilčkarja so predstavljalje večje težave v slovenskih hmeljiščih pred prvo svetovno vojno (Dolinar in sod., 2002). V zadnjih dvajsetih letih je hmeljev rilčkar ponovno postal gospodarsko pomemben škodljivec hmelja, za kar je več razlogov. Spremenilo se je varstvo hmelja, kjer se ne uporablja sistemskih insekticidov, ki bi imeli stransko delovanje na hmeljevega rilčkarja, uporaba kontaktnih insekticidov je omejena, poleg tega se pogosto opuščajo fitosanitarni higienski ukrepi (pobiranje ostankov rezi in njihovo odstranjevanje iz hmeljišč). Pri tem moramo upoštevati, da je uporaba insekticidov za zatiranje rilčkarjev, iz okoljskega vidika in z vidika neučinkovitosti, nesprejemljiva. Zato je še vedno najpomembnejši ukrep izvajanje fitosanitarnih ukrepov, globlja rez, odstranjevanje

obrezlin iz hmeljišč, preveriti je potrebno morebitno uporabo biotičnih pripravkov kot so entomopatogene- glive, bakterije in virusi. Ker je ličinka hmeljevega rilčkarja v notranjosti rastlin, v podzemnem delu stebela in v koreniki, entomopatogeni organizmi težje dosežejo tarčni organizem.

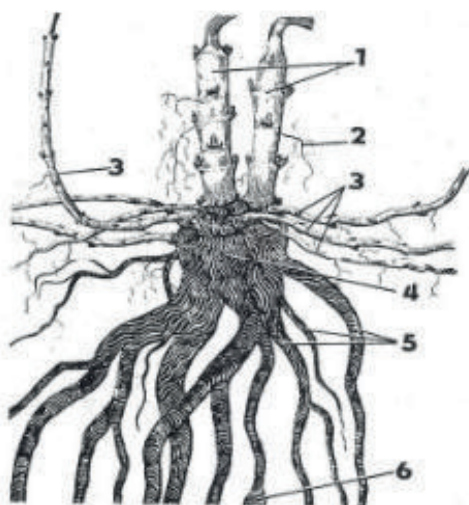
Zato smo pri zasnovi poskusa razmišljali o uporabi alternativnih pripravkov kot so npr. gnojila, ki imajo morebiten odvrčalen-repelenten učinek za odrasle rilčkarje, kar pomeni, da jim repelent prepreči dostop do rastlin kamor odlagajo jajčeca ali pa pripravki vsebujejo snov, ki ima delno insekticidno delovanje. Tako smo v poskusu uporabili pripravek Nemakil 330, ki je deklarirano kot gnojilo. Vsebuje velik delež organske snovi, ki je sestavljena iz govejega, perutninskega gnoja in gnoja kopitarjev. Poleg pa je dodana neemova pogača, kostna moka in ricinusovo drobljenec. Neemovo pogačo pripravljajo iz semen drevesne vrste *Azadirachta indica*, ki vsebuje snov azadirahthin. Kemijska snov je sekundarni metabolit semena omenjene drevesne vrste. Snov ima insekticidni učinek in sicer vpliva na nezmožnost celične delitve (apoptoza) in posledično nezmožnostjo tvorbe mikrotubulov (Bajwa in Ahmad, 2012). Pripravek Nemakil 330 poleg snovi azadirahthin vsebuje tudi ricinusov drobljenec, ki ga pridobivajo iz semena ricinusa (*Ricinus communis* L.). Ricinus vsebuje toksično snov ricin, ki ima to sposobnost, da inaktivira ribosomsko RNA, katera je odgovorna za sintezo proteinov. V celico vstopi z endocitozo in povzroči akutno celično smrt. Slednja snov je pokazala dobre rezultate za zatiranje gosenic kapusovega molja (*Plutella xylostella*) na kapusnicah (Kodjo in sod., 2011). V poskus smo vključili tudi pripravek Maska, ki vsebuje mleto koruzo aromatizirano z vonjem rdeče čebule, zelene in peteršiljevih listov in pripravek Maska Universal, ki je v tekoči obliki in vsebuje koncentriran macerat rdeče čebule, zelene in hrena pridobljen s posebnim tehnološkim postopkom.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Poskus v letu 2019/2020

V letu 2019 smo izvedli poskus v hmeljišču na sorti Aurora (starost nasada 10 let), na lokaciji Gomilsko (D96/TM: E:528463, N:136110). V tem hmeljišču so težave s hmeljevim rilčkarjem že več let. Poskus smo izvedli v 4 ponovitvah, ena ponovitev je vključevala 2 soležni vrsti v dolžini 10 metrov. Vsaka ponovitev je vključevala 20 rastlin, skupno smo imeli 80 rastlin/obravnavanje. V času prvega obsipanja hmelja, 6. junija 2019, ko je bil hmelj v razvojni fazi po BBCH 20 – 23 (oblikovanja stranskih poganjkov), smo v vrste okrog rastlin hmelja posuli gnojilo Nemakil 330 v odmerku 800 kg/ha. Po nanosu smo gnojilo zagrnili z obsipanjem rastlin. Spomladi, 24. marca 2020, po rezi hmelja, je sledilo vzorčenje podzemnih delov stebela in nato ocenjevanje poškodb od ličink hmeljevega rilčkarja. Na vsaki ponovitvi smo v osrednjem delu vsake vrste pobrali ostanke rezi na 10 rastlinah, skupno smo na obravnavanje pobrali ostanke rezi na 40 hmeljnih rastlinah, kar je

predstavljalo cca. 370 podzemnih delov stebela. Pobrane podzemne dele stebela hmelja smo ocenili v laboratoriju.



podzemni del rastline hmelja,
ki smo ga ocenjevali

Slika 1: Podzemni deli rastline hmelja: 1 – stebelno tkivo s spečimi očesci, 2 – adventivne korenine, 3 – stranski poganjki (tekači), 4 – koreninsko tkivo, 5 – glavne korenine, 6 – odebeljena glavna korenina z založno funkcijo (Ferant, 2012)



Slika 2: Mesto vboda hmeljevega rilčkarja, vidna poškodba (označeno s puščico)

Na vsakem podzemnem delu stebela smo prešteli število izvrtin, ki so bili posledica od vboda hmeljevega rilčarja, kamor je odložil jajčece (slika 2). Nato smo steblo prepолоvili in prešteli prisotnost ličink hmeljevega rilčkarja, katerim smo določili stadij razvoja na podlagi njihove dolžine in sicer stadij L1 (0,1-0,4 mm), L2 (0,5-0,8 mm), L3 (0,9-1,2 mm), L4 (1,3-1,7 mm) (Rak Cizej in Radišek, 2010; Rak Cizej in sod., 2011).

2.2 Poskus v letu 2020/2021

V letu 2020 smo na isti lokaciji kot v predhodnem letu (D96/TM: E:528463, N:136110), na isti sorti hmelja (Aurora), nadaljevali s poskusom zmanjševanja populacije hmeljevega rilčkarja z alternativnimi pripravki (gnojili, repelenti). Želeli smo ponovno uporabiti gnojilo Nemakil 330, vendar na tržišču ni bilo mogoče dobiti enakega gnojila kot smo ga uporabili v letu 2019. Namreč gnojilo ni več vsebovalo ricinusovega drobljenca, zato ga v poskus nismo ponovno vključili. V letu 2020 smo uporabili pripravka Maska in Maska Universal (v tekoči obliki), ki vsebuje koncentriran macerat rdeče čebule, zelene in hrena. Poskus smo izvedli v 4 ponovitvah, ena ponovitev je vključevala 2 soležni vrsti v dolžini 10 metrov. Vsaka ponovitev je vključevala 20 rastlin, skupno 80 rastlin/obravnavanje. Poleg kontrolnih parcel smo imeli še tri obravnavanja in sicer smo uporabili Maska (200 kg/ha), Maska Universal (3 % konc. - 3 l/ha) in Maska (100 kg/ha) + Maska Universal (3 % konc. - 3 l/ha). Pripravke smo na poskusu uporabili 25. maja 2020 pred prvim obsipanjem, ko je bil hmelj v razvojni fazi po BBCH 20 – 23. Pripravek Masko smo ročno nanесли v vrste okrog hmeljnih rastlin in ga takoj po nanosu zagrnili z obsipanjem. Pripravek Maska Universal smo na rastline nanесли foliarno z nahrbtno škropilnico Solo, pri čemer smo uporabili 100 l vode/ha in uporabili pritisk 3 bare. V letu 2021 smo v času rezi hmelja, 25. marca 2021 vzorčili podzemne dele stebela in nato ocenjevali poškodbe od ličink hmeljevega rilčkarja. Na vsaki ponovitvi smo v osrednjem delu vsake vrste pobrali ostanke rezi na 5 rastlinah, skupno smo na obravnavanje pobrali ostanke rezi na 40 hmeljnih rastlinah, kar je predstavljalo 252 podzemnih delov stebela. Pobrane podzemne dele stebela hmelja smo ocenili v laboratoriju in sicer število izvrtin in ličinke hmeljevega rilčkarja/podzemno steblo, enako kot v letu 2020.

2.3 Statistična obdelava podatkov

Pridobljene podatke smo statistično ovrednotili s statističnim programom (R version 3.6.3., The R Foundation for Statistical Computing), poleg smo za urejanje podatkov uporabili program Microsoft® Excel® 2013.

3 REZULTATI

3.1 Poskus v letu 2019/2020

Po rezi hmelja sorte Aurora (24. marca 2020) smo pobrali in pregledali podzemne dele stebela hmelja in sicer na kontrolnih parcelah smo skupno pregledali in ocenili 370 stebel, pri obravnavanju, kjer smo uporabili gnojilo Nemakil 330, pa 374. Na kontrolnih parcelah je bil delež napadenih podzemnih delov stebela hmelja 31,4 %, medtem ko pri obravnavanjih, kjer smo uporabili gnojilo Nemakil 330, je bil delež napadenih podzemnih delov stebela nižji in sicer 28,3 %. Večje število poškodb od hmeljevega rilčarja je bilo zaznani na podzemnih delih stebela, kjer nismo uporabili pripravka Nemakil 330. Na kontroli je bilo v povprečju večje število izvrtin od hmeljevega rilčarja (0,26 izvrtin/steblo) kot na parcelah, ker smo uporabili Nemakil 330 (0,20 izvrtin/steblo) čeprav ni bilo statistično značilnih razlik (preglednica 1).

Preglednica 1: Povprečno število izvrtin od hmeljevega rilčarja (*Neoplinthus tigratus porcatus*) na podzemnem delu stebela hmelja po posameznih obravnavanjih. Duncanov test, stopnja zaupanja 95 % ($F= 3.272$, $p<0,05$), Kontrola ($N=370$), Nemakil 330 ($N=374$). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji.

Obravnavanje	Povp. število izvrtin/podzemni del stebela	Standardni odklon
Kontrola	0,26a	±0,93
Nemakil 330	0,20a	±0,71

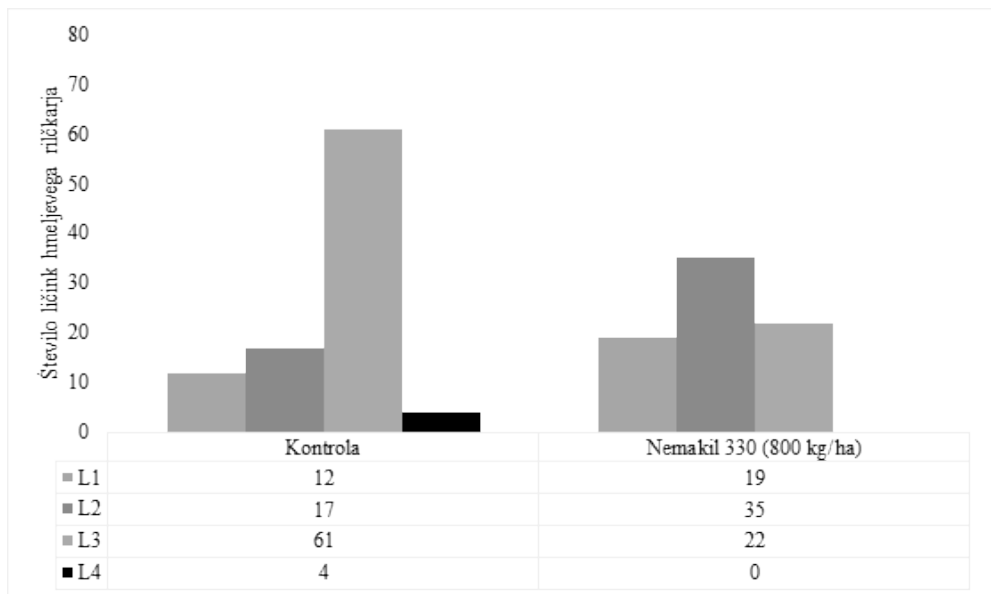
Na kontrolnih parcelah v vseh ponovitvah smo skupno našli 94 ličink hmeljevega rilčarja, ki so bile v različnih razvojnih stadijih (slika 3). Na parcelah, kjer smo uporabili Nemakil 330 smo skupno našli manj ličink in sicer 76, kar je bilo za 19,15 % manj kot na kontrolnih parcelah, kjer smo skupno našli 94 ličink. Tako so bile med obravnavanji glede števila ličink hmeljevega rilčarja statistično značilne razlike (preglednica 2).

Preglednica 2: Povprečno število ličink hmeljevega rilčarja (*Neoplinthus tigratus porcatus*) na podzemnem delu stebela. Duncanov test, stopnja zaupanja 95 % ($F=4.256$, $p<0,05$), Kontrola ($N=370$), Nemakil 330 ($N=374$). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji.

Obravnavanje	Povp. število ličink/podzemni del stebela	Standardni odklon
Kontrola	0,51b	±0,93
Nemakil 330	0,39a	±0,71

Ko smo razpolovili podzemni del stebela hmelja smo ugotovili, da se je ličinka hmeljevega rilčkarja pri debelejših delih podzemnega dela stebela počasneje premikala proti koreniki. Predvidevamo, da je imela dovolj hrane v zgornjem delu podzemnega dela stebela in se je zaradi tega počasneje premikala navzdol. Običajno so bili debelejši podzemni deli stebela pri obravnavanju, kjer smo uporabili gnojilo Nemakil 330.

Na kontrolnih parcelah je bilo največje število ličink v stadiju L3 in sicer skupno 61, kar je predstavljalo 64,89 delež vseh ličink, obravnavanje kjer smo aplicirali Nemakil 330 je bilo ličink v stadiju L3 približno za 36 % manj (slika 3). Pri obravnavanju, kjer smo tretirali z Nemakil 330, je bilo največji delež ličink v stadiju L2 in sicer 46,05 %.



Slika 3: Število ličink hmeljevega rilčkarja (*Neoplinthus tigratus porcatus*) posameznih razvojnih stadijev glede na obravnavanje (Kontrola $N=370$, Nemakil 330 $N=374$).

3.2 Poskus v letu 2020/2021

V letu 2020 smo s poskusom zatiranja hmeljevega rilčkarja nadaljevali, ocenjevanje je potekalo po istem protokolu kot v predhodnem letu. Primerjava poškodovanih in nepoškodovanih podzemnih delov stebela hmelja med obravnavanji ni bilo večjih razlik, namreč za hmeljevega rilčkarja je značilna velika heterogenost v nasadih. Pri obravnavanjih, kjer smo uporabili kombinacijo pripravka Maska (100 kg/ha) in sočasno še foliarni nanos pripravka Maska

Universal (3 l/ha) smo opazili večji delež nepoškodovanih delov podzemnih stebel (61 %), na kontrolni parceli je bil delež nepoškodovanih delov podzemnih delov stebel hmelja za 7 % manjši in sicer 54 %, statistično značilnih razlik med obravnavanji ni bilo (preglednica 3).

Preglednica 3: Povprečno število izvrtin hmeljevega rilčkarja (*Neoplinthus tigratus porcatus*) na podzemnem delu stebela. Duncanov test, stopnja zaupanja 95 % ($F=1.259$, $p<0,05$), Kontrola ($N=252$), Maska ($N=252$), Maska Universal ($N=252$), Maska Universal ($N=252$)). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji.

Obravnavanje	Povp. število izvrtin/podzemni del stebela	Standardni odklon
Kontrola	0,73a	±0,99
Maska (200 kg/ha)	0,69a	±0,82
Maska Universal (3 l/ha)	0,68a	±1,00
Maska (100 kg/ha) + Maska Universal (3 l/ha)	0,58a	±0,83

Prav tako nismo opazili statistično značilnih razlik med obravnavanji glede števila ličink na podzemnih delih stebela (preglednica 4). Na podzemnih delih stebela, kjer smo v kombinaciji uporabili Maska (100 kg/ha) in Maska Universal (3 l/ha) smo zaznali nižje povprečno število ličink na podzemnih delih stebela in sicer je bilo 0,35 ličinke/steblo, v primerjavi s kontrolo, kjer je bilo najdenih v povprečju 0,45 ličinke/steblo (preglednica 4).

Preglednica 4: Prikaz povprečnega števila ličink hmeljevega rilčkarja (*Neoplinthus tigratus porcatus*) na podzemni del stebela. Duncanov test, stopnja zaupanja 95 % ($F=0.812$, $p<0,05$), Kontrola ($N=252$), Maska ($N=252$), Maska Universal ($N=252$), Maska Universal ($N=252$)). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji.

Obravnavanje	Povp. število ličink/podzemni del stebela	Standardni odklon
Kontrola	0,45a	±0,78
Maska (200 kg/ha)	0,40a	±0,70
Maska Universal (3 l/ha)	0,41a	±0,86
Maska (100 kg/ha) + Maska Universal (3 l/ha)	0,35a	±0,65

4 RAZPRAVA

Hmeljev rilčkar (*Neoplinthus tigratus porcatus*) je škodljivec na hmelju (*Humulus lupulus*) zoper katerega za njegovo zatiranje v slovenskih hmeljiščih nimamo ustreznih pripravkov. V dveh poskusih, ki smo jih izvajali v letih 2019/2020 in 2020/2021 smo proučevali, kako z uporabo alternativnih sredstev (repelentov, gnojil z delnim insekticidnim delovanjem) pripomoremo k zmanjšanju poškodb in deležu ličink na podzemnem delu stebela. Namen raziskave je bil preučiti alternativne možnosti obvladovanja hmeljevega rilčkarja s pripravki, ki vsebujejo naravne snovi, katere se nahajajo bodisi v rastlinah ali rastlinskih stranskih produktih. Prav tako smo želeli, da so pripravki dovoljeni v ekološki pridelavi in so brez karenc oziroma čakalnih dob ter nimajo znanih negativnih vplivov na okolje.

V letu 2019/2020, ko smo uporabili pripravek Nemakil 330 (800 kg/ha), smo opazili statistično značilno manjše število najdenih ličink na podzemnem delu stebela kot na kontrolnih parcelah. Pripravek Nemakil 330, ki vsebuje ricinusov drobljenec in neemovo pogačo, posledično je vseboval učinkovini ricin in azadirahтин, ki sta imela učinek na zmanjšanje populacije hmeljevega rilčkarja. Do podobnih zaključkov s pripravkom Nemakil 330 so Bajwa in Ahmad, 2012 in Kodjo in sod., 2011 prišli tudi pri kapusovem molju (*Plutella xylostella*).

Večji delež nepoškodovanih podzemnih delov stebela ter manjše število ličink, je bilo zaznati tudi na obravnavanjih, kjer smo sočasno uporabili pripravek Maska (100 kg/ha) in Maska Universal (3 l/ha), z vsebnostjo koncentrata macerat rdeče čebule, zelene in hrena, ki so imele repelenten učinek na hmeljevega rilčkarja. Hmeljev rilčkar je škodljivec, ki ne povzroča takoj vidnih poškodb na rastlinah hmelja. Posledično je njegovo obvladovanje še toliko bolj zahtevno in trdovratno, saj se odrasli hrošči ne prehranjujejo na hmelju, škodo povzročajo njegove ličinke v notranjosti podzemnega dela stebela in v hmeljni koreniki. Tako bo v bodoče potrebno še bolj dosledno izvajati fitosanirane higienske ukrepe med katerimi sta najpomembnejši globlja rez in odstranjevanje obrezlin iz hmeljišč. Poleg tega bodo dobrodošli alternativni pripravki, ki zmanjšujejo populacijo hmeljevega rilčkarja in posledično tudi poškodb, ki jih povzročajo njegove ličinke.

5 VIRI

- Bajwa A. A., Ahmad A. Potential applications of Neem based products as biopesticides. *The Health*. 2012; 3(4): 116-120.
- Brewer M.J., Legg D.E., Gray A.M. Alfalfa Weevil Biology and Management. University of Wyoming extension. 2008; 1-10
- Ferant N. Hmelj. V: Hmelj od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.), Žalec 21-37. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 2012.135.
- Dolar M., Ferant N., Žolnir M., Simončič A., Knapič V. Priročnik za hmeljarje. Hmeljev hrošč. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. 2002; 73.

- Kodjo T. A., Gbénonchi M., Sadate A., Komi A., Yaovi G., Dieudonné M., Komla S. Bio-insecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions. *Journal of Applied Biosciences*. 2011; 43: 2899–2914.
- Fauna Europaea. 2021. *Neoplinthus tigratus* subsp. *porcatus* (Panzer 1798). https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/7ea16a8d-4226-40a0-abdd-84cf8cefc2db (26.11.2021)
- Janežič F. Varstvo rastlin pred boleznimi in škodljivci. Državna založba Slovenije. 1951; 350-351.
- Rak Cizej M., Oset Luskar M. Bolezni in škodljivci hmelja. V: Hmelj od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.), Žalec. 2012; 21-37
- Rak Cizej M., Radišek S. Prisotnost rilčkarjev v slovenskih hmeljiščih. *Hmeljarski bilten*. 2009; 16: 75–82.
- Slovenska sortna lista Hmelj. Dostopno na: https://www.gov.si/assets/organi-v-sestavi/UVHVVR/Rastlinski-semenski-material/Publikacija-Sortna-lista/SL_2019_splet.pdf (28.10.2019)
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. *Priročnik za hmeljarje*. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 2002; s. 31-38.
- Wolfenbarger S. N., Massie S. T., Ocamb C., Eck E. B., Grove G. G., Nelson M. E., Probst C., Twomey M. C., Gent. D. H. Distribution and Characterization of *Podosphaera macularis* Virulent on Hop Cultivars Possessing R6-Based Resistance to Powdery Mildew. *Plant Disease*. 2016; 100(6):1212-1221.
- Woods J. L., Gent, D. H. Susceptibility of Hop Cultivars to Downy Mildew: Associations with Chemical Characteristics and Region of Origin. *Plant Health Progress*. 2016; 17(1): 42-48.

VPLIV BAKRA NA INDEKS STARANJA HMELJA

Miha OCVIRK¹, Ksenija RUTNIK² in Iztok Jože KOŠIR³

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Prispelo / received: 25. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 10. 12. 2021

Izvleček

Med skladiščenjem hmelja je le-ta, poleg svetlobi in visoki temperaturi, lahko izpostavljen tudi kisiku. Zaradi prisotnosti kisika se v hmelju prične proces oksidacije, ki povzroči spremembo kemijske sestave hmelja in s tem padeč njegove kakovosti. Oksidacijski produkti imajo negativen vpliv na okus in aromo piva, zato je njihova vsebnost v hmelju nezaželena. Poleg same prisotnosti kisika, lahko oksidacijske procese dodatno pospešijo določeni kemijski elementi, kot sta baker (Cu) in železo (Fe), ki v kemiji veljata za dobra reducenta, kar pomeni, da privlačita kisikove atome. V raziskavi smo spremljali, kako vsebnost bakra vpliva na staranje hmelja, s spremljanjem indeksa staranja hmelja (HSI), ki velja za pokazatelja svežine hmelja. Iz rezultatov je razvidno, da se hmelj z višjimi vsebnostmi bakra stara hitreje kot hmelj brez oziroma z nizkimi vsebnostmi bakra.

Ključne besede: hmelj, staranje hmelja, HSI

INFLUENCE OF COPPER CONTENT ON HOP STORAGE INDEX

Abstract

Hops are during storage exposed to light and high temperature, but hops can also be exposed to oxygen. Due to its presence, the oxidation process begins, which causes a change in the chemical composition of hops secondary metabolites and thus a decrease in its quality. Oxidation products have a negative effect on the taste and aroma of beer, so their content in hops is undesirable. In addition to the presence of oxygen, the oxidation reaction is further accelerated by certain chemical elements, such as copper (Cu) and iron (Fe), which are considered good reductants in chemistry, which means that they attract oxygen atoms. In the study, we monitored how the copper content affects the aging of hops by monitoring the hop storage index (HSI), which is considered an indicator of hop freshness. The results show that hops with higher copper contents age faster than hops without or with low copper contents.

Key words: hop, hop aging, HSI

¹ Dr., univ. dipl. kem. teh., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

² Mag. inž. kem. teh., prav tam, e-pošta: ksenija.rutnik@ihps.si

³ Dr., univ. dipl. kem., prav tam, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

1 UVOD

Proizvodnja piva je zaradi svoje bogate in dolgoletne tradicije tipičen primer tradicionalne biotehnologije. Vsem dobro znana okus in aroma piva sta rezultat finega in subtilnega ravnovesja med številnimi aktivnimi spojinami, ki izvirajo iz surovin uporabljenih v pivovarskem procesu, skupaj s tistimi, ki izvirajo iz kvasovk med fermentacijo. Kombinacija okusa in vonja je ključnega pomena za sprejemljivost piva s strani potrošnikov. Surovina, ki je večinoma odgovorna za tipično aromo piva, je nedvomno hmelj (*Humulus lupulus* L.). Poleg klasičnih kakovostnih parametrov hmelja je izjemno pomembna tudi t.i. skladiščna obstojnost hmelja, saj se pri daljšem in neprimernem skladiščenju kakovost hmelja hitro zmanjša, kar ima močan negativen učinek na aromo piva. Staranje hmelja se ovrednoti z indeksom staranja hmelja (Hop storage index - HSI). Med staranjem je hmelj izpostavljen več nezaželenim dejavnikom, kot so visoka temperatura ter prisotnost kisika in svetlobe. Ti dejavniki pospešijo proces staranja, ki spremeni kemijsko sestavo hmelja (Čerenak in Košir, 2016). Hmelj je ob nepravilnem skladiščenju izpostavljen t.i. avtooksidaciji. Gre za oksidacijo organske snovi, ki je izpostavljena zračnemu kisiku, in ravno do tega prihaja v nepravilno skladiščenem oz. pakiranem hmelju (Virant in Majer, 2003).

Vrednost HSI podaja stopnjo oksidacije alfa- in beta-kislin tekom skladiščenja. Določanje poteka z UV-VIS spektrofotometrično analizo hmelja. Alfa- in beta-kislina absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 325 nm, njihovi oksidacijski produkti pa pri valovni dolžini 275 nm. Indeks staranja hmelja predstavlja razmerje med absorbanco pri 275 nm in absorbanco pri 325 nm (A_{275}/A_{325}), torej razmerje med oksidacijskimi produkti kislin ter med samimi kislinami (Analytica-EBC 7.13, 2007). Kisik povzroča oksidacijo alfa-kislin, s čimer se zmanjša in spremeni grenkoba hmelja, hkrati pa preprečuje izomerizacijo alfa-kislin, ki je pomemben proces tekom hmeljenja piva. Oksidirane spojine povzročijo vonj po sesirjenemu, ki ga zaznamo pri starem hmelju (Mikyška in Krofta, 2012). Pakiranje storžkov hmelja ali briketov v nepredušno zaprte aluminijaste vrečke zagotavlja dobro zaščito pred izpostavljanjem hmelja zraku. Znano je, da so reakcije avtooksidacije katalizirane reakcije, kot katalizator pa nastopajo ioni prehodnih elementov (baker in železo). Ti elementi v stiku s kisikom izmenjujejo elektrone. Oksidacija je namreč proces oddajanja elektronov. Koncentracije bakra so v hmelju relativno visoke, okrog 100 mg/kg, saj se za zatiranje nekaterih bolezni hmelja uporabljajo bakrovi pripravki (Chrisfield in sodelavci, 2021). Dodatno težavo predstavlja termin tretiranja hmelja z bakrovimi pripravki, v kolikor se le tega uporablja za zaključna škropljenja in v kolikor v tem času ni obilnejših padavin, je koncentracija bakra v hmelju lahko zelo visoka. Kmetje tako nevede z bakrovimi pripravki v hmelj vnesejo katalizator, ki je odgovoren za hitrejše staranje hmelja. Do danes je znano, da uporaba starega hmelja (visoka vrednost HSI) povzroči različne, t.i. negativne arome in spremeni prijetno hmeljno grenkobo v neprijetno, ki zastaja v

ustni votlini. Starost hmelja lahko, glede na vrednost HSI indeksa, opišemo s 5 stopnjami (Foster, 2001):

- svež < 0,32
- rahlo postaran 0,33 – 0,40
- star 0,41 – 0,50
- močno star 0,51 – 0,60
- prestar > 0,61

Do danes je izkustveno znano, da je v pivu, hmeljenem s hmeljem čigar indeks HSI je 0,35, že moč zaznati nepravilnosti. V kolikor pa je zvarjeno pivo s hmeljem, ki ima indeks HSI 0,50, je tako rekoč označeno kot neprimerno.

Namen raziskave je bil ugotoviti korelacijo med vsebnostjo bakra v hmelju in hitrostjo staranja hmelja.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Priprava in pakiranje vzorcev

Analizirali smo 7 svežih vzorcev hmelja sorte Celeia (skladiščno manj obstojna sorta), ki so bili tretirani z različnimi fitofarmaceutskimi sredstvi v različnem časovnem intervalu. Vseh 7 vzorcev smo takoj po obiranju posušili na primerno vlago (okoli 10 %) v pilotni sušilnici IHPS. Pri dveh vzorcih hmelja smo še dodatno nanесли različni količini FFS v WG formulaciji, ki je vseboval 35 % Cu, v obliki bakrovega oksiklorida, z namenom umetno povečati koncentracijo bakra v vzorcih. Po aplikaciji smo tudi ta dva vzorca posušili na primerno vlago. Suhe vzorce storžkov hmelja smo v laboratoriju pripravili za nadaljnje analize. Štirideset gramov suhega vzorca smo zapakirali v vrečke, ki so omogočale dostop zraka, in jih hranili v hladilnici (4 °C) do analize. Analize smo izvajali enkrat mesečno pol leta. Tekom analiz smo tako dobili dinamiko spreminjanja vsebnosti HSI indeksa v vzorcih hmelja.

2.2 Opis vzorcev in začetne vrednosti merjenih parametrov

Obravnavanja:

- Vzorec hmelja Š2 je bil tekom rastne sezone 4x tretiran s 35 % bakrovim oksikloridom v WG formulaciji, v odmerku 5,5 kg pripravka na ha (skupaj 7,7 kg Cu na ha); ta vzorec hmelja smo še pred sušenjem še dodatno obogatili z bakrom (500 mL; 5 g/L).
- Vzorec hmelja Š3 tekom rastne sezone ni bil tretiran z bakrovimi pripravki.
- Vzorec hmelja Š4 je bil tekom rastne sezone 4x tretiran z raztopino bakrovih kelatov poliaminokarboksilnih kislin (baker 7,6 %), v odmerku 1,8 L/ha; skupaj 0,5 kg Cu na ha).

- Vzorec hmelja Š5 je bil tekom rastne sezone 4x tretiran z raztopino bakrovih poliamin kelatov (baker 8,0 %), v odmerku 1,8 L/ha, skupaj 0,6 kg Cu na ha).
- Vzorec hmelja M1 tekom rastne sezone ni bil tretiran z bakrovimi pripravki.
- Vzorec hmelja M2 je enak vzorcju M1, ki tekom rastne sezone ni bil tretiran z bakrovimi pripravki, z ročno škropilnico pa mu je bila dodana dvojna količina bakra pred sušenjem 500 mL; 10 g/L.
- Vzorec hmelja M3 je realen vzorec, ki je bil pred obiranjem dvakrat tretiran s 35 % bakrovim oksikloridom v WG formulaciji (skupaj 3,9 kg Cu na ha).

V preglednici 1 so podane začetne vrednosti alfa-kislin, beta-kislin, vrednosti HSI in vsebnosti bakra v posameznih vzorcih.

2.3 Analiza vsebnosti bakra

Baker v hmelju določamo z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. 1 g zračno suhega vzorca hmelja žarimo čez noč v žarilni peči pri temperaturi 550°C. Prežarjenem vzorcju po kapljicah dodajamo 5 mL 20 % HCl. Vzorec nekoliko segrejemo, da se pepel bolje raztopi, in ga nato vročega filtriramo v merilne bučke 50 mL. Ko se ekstrakt ohladi, ga dopolnimo z demineralizirano vodo do oznake. Vsebnost bakra izmerimo direktno iz osnovne raztopine s pomočjo atomske absorpcijske spektrometrije (AAS) (Bevc in Košir, 2005).

2.4 Indeks staranja hmelja

Vrednost HSI določamo spektrofotometrično. V posodico natehtamo 2,5 g zmlatega hmelja in dodamo 25 mL toluena. Vzorec stresamo 45 min, po pretečenem času vzorec prefiltriramo. V 50 mL bučko prenesemo 2,0 mL filtrata in dopolnimo do oznake z metanolom. Tako pridobimo raztopino A. Raztopino A nato redčimo z alkalnim metanolom (0,5 mL 6 M NaOH/250 mL MeOH) v razmerju 1:24 (v:v). Absorbanco nastale raztopine izmerimo z UV-VIS spektrofotometrom, ($\lambda = 275$ nm in 325 nm) glede na slepi vzorec, ki namesto filtrata vsebuje toluen. HSI izračunamo kot razmerje med absorbanco pri 275 nm in absorbanco pri 325 nm (Analytica-EBC 7.13, 2007).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pred hranjenjem vzorcev v hladilnici, smo vsem vzorcjem pripravljenega hmelja izmerili vsebnosti bakra, alfa- in beta-kislin ter začetne vrednosti HSI. Rezultati so predstavljeni v preglednici 1. Iz rezultatov je razvidno, da so vzorci med sabo po začetnih kakovostnih parametrih med sabo primerljivi. Iz vizualnega izgleda je bilo

mogoče sklepati, da so bili vzorci v primerljivem zdravstvenem stanju. Noben vzorec ni izstopal kot poškodovan.

Preglednica 1: Začetne vrednosti alfa-kislin, beta-kislin, HSI in vsebnosti bakra

Oznaka vzorca	alfa-kisline [%]	beta-kisline [%]	HSI	Cu [mg/kg]
M1	5,23	4,70	0,28	12,1
M2	4,62	4,24	0,27	551,2
M3	4,71	2,36	0,28	120,0
Š2	5,83	5,09	0,27	303,3
Š3	5,91	5,33	0,26	22,8
Š4	5,58	4,97	0,26	21,6
Š5	5,31	4,89	0,29	17,9

Iz preglednice 2 in slike 1, ki prikazujeta dinamiko spreminjanja vrednosti HSI, je razvidno, da se hmelj, ki vsebuje več bakra stara občutno hitreje, kot hmelj, ki vsebuje baker v nizkih vsebnostih (pod 25 mg/kg). Po štirih mesecih so imeli vrednost HSI pod ali enako 0,40 vsi vzorci, ki so vsebovali manj kot 25 mg/kg bakra (M1, Š3, Š4 in Š5), ostali trije vzorci pa so imeli to vrednost nad 0,44. Najnižje vrednosti HSI po štirih mesecih staranja so imeli vzorci M1 in vzorca Š4 in Š5, ki sta bila tretirana samo s hraniloma, ki sta vsebovala baker v kelatni obliki. Skupni odmerek bakra v zadnjih dveh primerih je bila tako samo 0,5 oziroma 0,6 kg Cu na ha, medtem, ko je bil odmerek Cu na ha v primeru vzorca Š2 kar 7,7 kg. Ti odmerki se odražajo tudi v izmerjenih koncentracijah bakra v vzorcih.

Za hmelj z vrednostmi HSI nad 0,40 velja, da je močno postaran in se pri proizvodnji piva pričakujejo negativni vplivi na sensoriko. To je razlog, da takšnemu hmelju močno upade tržna vrednost. Zaradi tega je izrednega pomena, da se staranje upočasni do te mere, da je hmelj pred predelavo v brikete in nadaljnje skladiščenje v tej obliki primerne kvalitete. Eden osnovnih dejavnikov ocene kvalitete so ravno vrednosti HSI pod 0,40. V praksi se predvideva, da je večina hmelja predelana v brikete v času 4 mesece po obiranju. Po predelavi se hrani v običajni embalaži (evakuirane ali z inertnim plinom prepihane zavarjene ALU vreče, brez prisotnosti kisika), na temperaturah pod 4 °C. V takšni obliki je hmelj potem stabilen, odvisno od kvalitete ob predelavi, vsaj naslednje eno leto.

Razlike v višanju vrednosti HSI po 5 mesecih staranja niso več tako izrazite, saj takrat HSI vrednost pri vseh vzorcih doseže in preseže vrednost 0,40. Najbolj se poviša vrednost pri vzorcu Š2 (štirikratno tretiranje z bakrovim oksikloridom na njivi), kjer celo preseže vrednost 0,50.

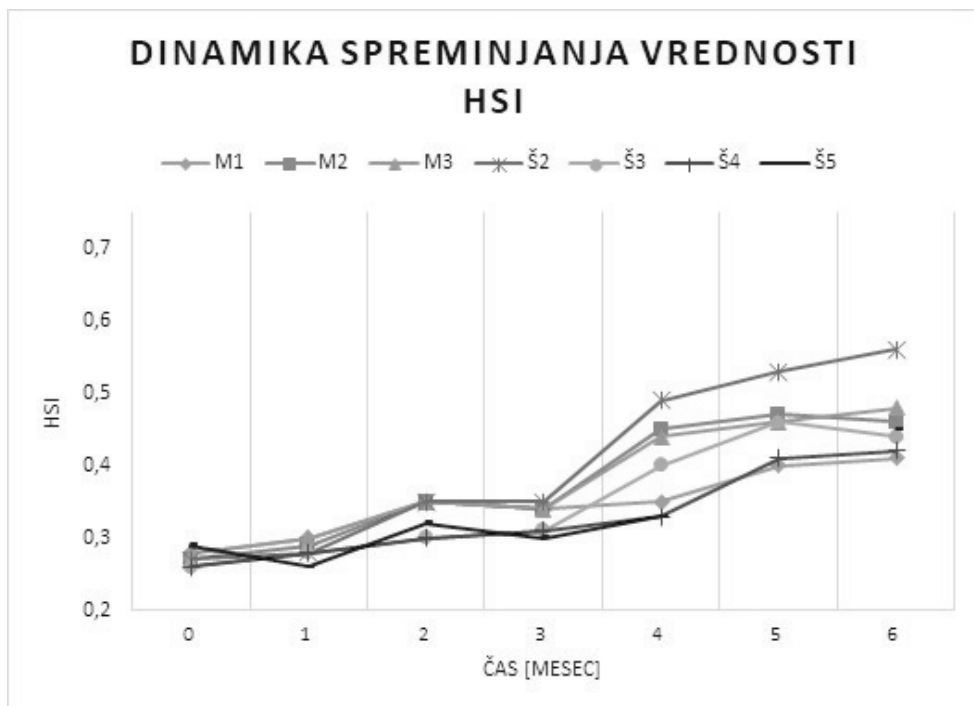
Po šestih mesecih hranjenja so vrednosti HSI v vseh vzorcih že močno povišane. Kljub temu je najnižjo vrednost HSI dosegel vzorec M1, ki tekom rastne sezone ni bil tretiran z bakrovim pripravkom, prav tako mu baker ni bil dodan pred sušenjem. Vzorci Š3, Š4 in Š5, ki so vsebovali nizke vrednosti bakra (med 17 in 23 mg/kg), so se starali s primerljivo hitrostjo, vendar nekoliko počasneje v primerjavi z vzorci, ki so bakra vsebovali več. Vzorec z največ bakra M2 (551,2 mg/kg) je dosegel HSI 0,56.

S tem se je zmanjšal čas absorpcije bakra v samo rastlino, kar je posledično pomenilo manj časa od pričetka oksidacijskih procesov.

Preglednica 2: Dinamika spreminja vrednosti HSI

Vzorec/čas [mesec]/HSI	Cu [mg/kg]	0	1	2	3	4	5	6
M1	12,1	0,28	0,30	0,35	0,34	0,35	0,40	0,41
M2	551,2	0,27	0,29	0,35	0,34	0,45	0,47	0,46
M3	120,0	0,28	0,30	0,35	0,34	0,44	0,46	0,48
Š2	303,3	0,27	0,28	0,35	0,35	0,49	0,53	0,56
Š3	22,8	0,26	0,28	0,30	0,31	0,40	0,46	0,44
Š4	21,6	0,26	0,28	0,30	0,31	0,33	0,41	0,42
Š5	17,9	0,29	0,26	0,32	0,30	0,33	0,42	0,45

Na splošno je največji porast vrednosti HSI se je zgodil med 3. in 4. mesecem, ko je vrednost HSI pri vzorcih, ki vsebujejo več kot 25 mg/kg, narasla krepko nad 0,40 s čimer označimo t.i. star hmelj, ki ima za posledico odstopanja oz. zaznavanje produktov staranja v sami aromi piva. Vzorci z manj bakra primerljivo vrednost dosežejo nekje med 5. in 6. mesecem. Celoten diagram, prikazan na sliki 1, potrjuje tezo, da se hmelj z dodanim bakrom v začetni fazi stara občutno hitreje kot hmelj, ki ga vsebuje manj. Opazimo lahko tudi, da se HSI najprej ne povečuje – dokler se ne začne oksidacija, ko pa se enkrat oksidacija prične, se začne HSI indeks močno povečevati, se pa tekom daljšega časovnega intervala ta hitrost staranja nekoliko umiri.



Slika 1: Spreminjanje vrednosti HSI med skladiščenjem hmelja

4 ZAKLJUČEK

Vsebnost bakra, ki se nahaja v storžkih hmelja po obiranju, sušenju in pakiranju vpliva na hitrost procesov oksidacije in s tem staranja hmelja. Ta vpliv je še posebej izražen v prvih štirih mesecih po obiranju. V tem času se običajno hmelj predela večinoma v brikete, ki se v nadaljevanju skladiščijo pod primernimi pogoji (nizka temperatura, preprečen dostop kisika). V nadaljevanju skladiščenja količina prisotnega bakra ne pride več do izraza, čeprav so vrednosti HSI v vzorcih, ki vsebujejo višje koncentracije bakra še vedno višje od tistih vzorcev, kjer je prisotnega bakra manj. Zaradi tega sklepamo, da bi bilo v prizadevanju za doseganje upočasnjene staranja smiselno razmisliti o zmanjševanju količine uporabljenih pripravkov, ki vsebujejo baker, še posebej v zaključnih tretiranjih pred obiranjem. V vsakem primeru je primerna alternativa čimprejšnja predelava hmelja v briketirane ali ekstrahirane proizvode, za katere je ob pravilnem skladiščenju znano bistveno upočasnjeno staranje.

5 VIRI

- Analytica-EBC/European Brewery Convention. Section 7 Hops, Method 7.13, Hop storage index of hops and hop pellets, The Brewers of Europe, Bruselj, 2016
- Bevc M., Košir I.J. Določevanje mineralnih komponent v rastlinskih tkivih in gnojevkah – baker (Cu), Preskusne metode za rastlinska tkiva, MRG 06, 2005.
- Chrisfield Benjamin J. Gugino Beth K. Hopfer Helene Elias Ryan J., Effect of Copper-Based Fungicide Treatments on the Quality of Hop Produced in the Northeastern United States, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2021; 1-11.
- Čerenak A., Košir I.J. Skladiščna obstojnost slovenskih dišavnih sort hmelja, *Hmeljarski bilten*. 2016; 23: 5-13.
- Foster A. The quality chain from hops to hop products. Proceedings of the Technical Commission IHGC of the 48th IHGC Congress. Canterbury. 2001.
- Mikyska A., Krofta K. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage, *Journal of the Institute of Brewing*. 2012; 118: 269–279.
- Virant M., Majer D. Hop storage index – indicator of a brewing quality. Proceedings of the Technical Commission IHGC of the 49th IHGC Congress. Sofia, 2003.

REVIEW OF HOP MARKET CHARACTERISTICS

Douglas MacKINNON¹ and Martin PAVLOVIČ²

Pregledni članek / Review article

Prispelo / Received: 25. 10. 2021

Sprejeto / Accepted: 22. 11. 2021

Abstract

The paper provides a review on basic hop market characteristics. While illustrating sources, collation and management of hop supply statistics - a market concentration within the four issues are debated: (i) breweries as a primary customer group ten of which controlled 72% of global beer production, (ii) strong merchants' companies, (iii) main production countries, where in 2020 the United States and Germany embraced 73% of the hop acreage and (iv) a growing concentration of ownership of hop varieties.

Keywords: hop industry, hop market, proprietary varieties, price of hops

PREGLED ZNAČILNOSTI TRGA HMELJA

Izveleček

Prispevek ponuja pregled osnovnih značilnosti trga hmelja. Poleg ponazoritve virov tržnih informacij ter zbiranja in uporabe statistik ponudbe hmelja ilustrira štiri segmente koncentracije trga s hmeljem: (i) pivovarne, kot edino gospodarsko pomembno skupino kupcev, od katerih jih deset nadzoruje 72 % svetovne proizvodnje piva, (ii) dominantna trgovska podjetja, (iii) glavne države pridelovalke, kjer so leta 2020 v ZDA in Nemčiji pridelovali na 73 % vseh površin hmelja in (iv) naraščajočo koncentracijo lastništva sort hmelja.

Ključne besede: hmeljarstvo, hmeljski trg, lastniške sorte, cena hmelja

1 MARKET STATISTICS COLLATION

The brewing industry receives information regarding the international hop supply situation primarily from the several published sources: The BarthHaas® Report (BarthHaas, 2020), Hop Guidelines (Hopsteiner, 2020), USDA NASS data and the International Hop Growers' Convention (IHGC) Economic Commission reports

¹ Prof. dr., Faculty of Agriculture and Life Sciences UM & IHPS, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-mail: martin.pavlovic@ihps.si

² M.Sc., 318 Highland Dr., Santa Maria, CA 93455, USA, PhD Student, University of Maribor, e-mail: doug@demackinnon.com

(IHGC, 2021a). Within the hop industry, these information sources are valued but are bolstered by an informal network through which news regarding current events and pricing spreads rapidly. The two large hop merchant companies mentioned above offer the industry a comprehensive look at the global industry at least once each year via their reports. This offers their readers a comprehensive look at market statistics in hindsight enabling the calculation of the balance present in the market for those who know how to interpret the data. In addition, the IHGC as a nonprofit global hop industry network acts also as an important source of collecting the world's commercial hop supply data in the form of acreage, production of hops and alpha-acids, variety structure, and demand data in the form of contracted/spot hops percentage and average price information. As of October 2021, there were 21 country members - hop producers' organizations and 14 corporate members - hop trading companies (IHGC, 2021a). There are several other hop producing countries around the globe such as Serbia, Bulgaria, Turkey, Japan and India whose data were not contained within the IHGC reports. Their lack of participation did not affect the report as their production was insignificant and not export oriented.

The IHGC organization tracks global hop production data. It is the only non-merchant organization to do so on a regular basis. As such, it provides an invaluable service to the industry. The organization holds meetings three times each year, in April, July-August and November. The timing of these meetings is strategic to allow updates on planting activity in the spring, progress of the crop prior to harvest and a recap of yields and production in November. In 2020, North American and European Union countries produced 91.2 percent of total IHGC-tracked production with the United States (U.S.) and Germany combined responsible for 77 percent (IHGC, 2021a). Attendance by interested members from the (U.S.), Germany and the Czech Republic often outnumbered the delegates from the rest of the participating countries.

Despite the name of the organization implying that it is a grower organization, members of the IHGC in 2021 are mostly involved with the sales of hops (i.e., merchants and growers who sell direct to brewers). For decades, market prices had been openly reported and discussed between merchants in this forum. That could have been misinterpreted as collusion or price fixing, but little attention was ever paid to the workings of the tiny organization. In 2019, to eliminate the possibility for any such misinterpretation to occur, the organization amended its bylaws to address potential antitrust concerns. From then on, no specific price information could be discussed in that forum.

2 CONCENTRATION IN THE HOP INDUSTRY

Since the documented origins of hopped beer thousands of years ago (DeLyser and Kasper, 1994), hops remain a key component in the production of beer. The global hop industry is concentrated structurally in several different ways. It has only one primary customer group (i.e., breweries), ten of which controlled 71.6% of global production in 2019 (BarthHaas, 2020). Non-beer demand for hops, a figure not often reported in the hop industry, represented approximately 200 metric tons of alpha-acids, or 1.4% of production, in 2012 (Cooberg and Hintermeier, 2012), the most recent figures publicly available. This type of concentration among buyers creates a concentrated oligopsony with leadership (Galal, 1968). Large entities with disproportional influence over the market can effectively use their size to negotiate favorable terms to which smaller brewers would not have access (OECD, 2012). Macro breweries, and, in 2020, the largest craft breweries, comprised a significant portion of demand and were an important part of any seller's portfolio. The threat of the potential loss of business with one of these entities in the ultra-competitive hop market, where competitors will gladly undermine their competitor's business for personal gain, cannot be allowed thereby strengthening their oligopsony powers.

The second point of concentration in the industry is trade. There are four primary merchant groups through which the world's hop trade flows directly or is influenced. These four firms are Barthhaas®, HopSteiner, Yakima Chief Hops™ and Hopfenverwertungsgenossenschaft Hallertau e.G. (more commonly referred to as HVG). Insiders estimate the market share of these four entities between 70-80% of the total annual hop trade (IHGC, 2021a).

The third point of concentration in the industry is production (Figure 1). The U.S. and Germany produced 39.49 and 33.04 percent of the world's hop acreage respectively in 2020. The balance of global acreage (i.e. 27 percent of total global acreage) was divided by 19 producing countries (IHGC, 2021a). Some American growers have a distinct competitive advantage. In the U.S. states of Washington and Idaho, growers can plant hops in the spring and harvest them in the fall of the same year. In some other hop producing regions, they are harvested for the first time only in the second or third year after planting. Farm size in the U.S. is an order of magnitude larger than competing hop producing countries offering American hop growers an economy of scale not available to their competitors enabling unique cultural and business practices.

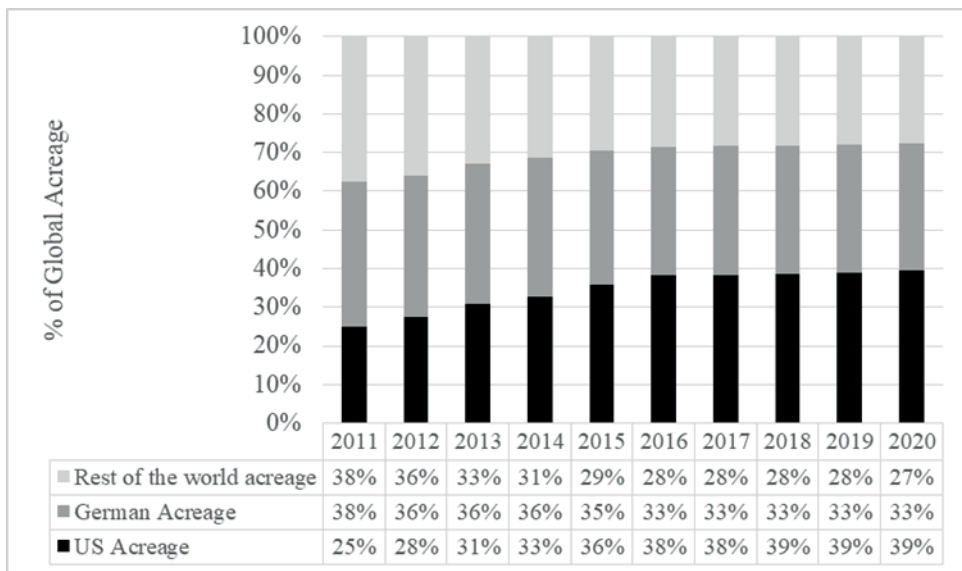


Figure 1: Global Hop Acreage (%) by Production Region (IHGC, 2021a).

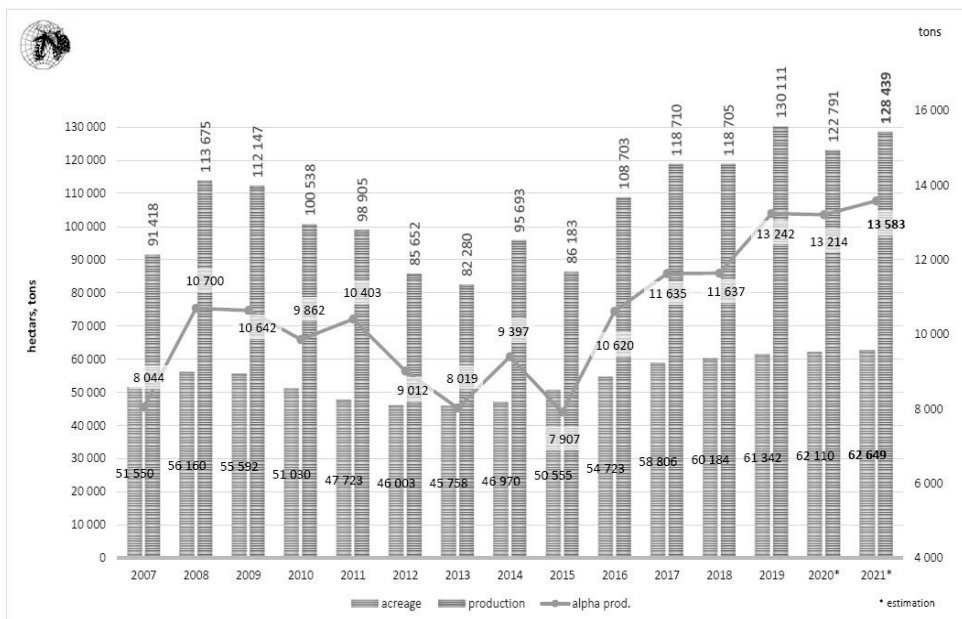


Figure 2: IHGC hop supply statistics 2007-2021 (IHGC, 2021a).

Until 1998, varieties reported by the USDA and the IHGC were public. The proportion of proprietary and public hop varieties changed after 1997, when the USDA NASS reported no proprietary varieties. A fourth point of concentration within the industry has evolved in the years since. The growth in popularity of proprietary varieties has led to a concentration of ownership of the varieties produced in the U.S. By 2021, proprietary varieties accounted for over two-thirds of the U.S. industry. The rapid reorientation toward varieties registered with IPR after 2010 represented efforts by hop growers, merchants and craft brewers to differentiate themselves from their competitors (MacKinnon and Pavlovič, 2019).

The time frame does however include the period during which we may witness the meteoric rise in popularity of proprietary varieties between 2012-2021 (IHGC, 2021a; IHGC, 2021b). This gave the grower community, in particular a small group of growers, enormous power to influence the narrative regarding pricing. Premium prices for proprietary varieties influence prices for public varieties, which must produce a competitive return per acre, or they will no longer be produced (Mahoney, 2021).

3 HOP MARKET CYCLES

Until 2010, the market demonstrated its inelasticity through extreme price swings as it cycled between surpluses and shortages approximately once every 10-12 years (Figure 3). A similar cycle existed in Europe, in the U.S. and other producing countries as the market is global. Under shortage conditions, the common oils nearly all hop varieties share makes the market highly elastic as brewers seek to satisfy their demand regardless of variety. Shortages in supply of hops occurred in 1980, 1991 and 2007.

The supply-demand situation will likely always be in a constant state of flux and in need of management. The hop market, when left to the free market, has tended to oscillate on either side of mean prices over time. In other words, the market tends to move toward some form of balance. Given the number of endogenous and exogenous variables affecting hop supply and demand, relative stability of the market without the influence of external forces is highly unlikely.

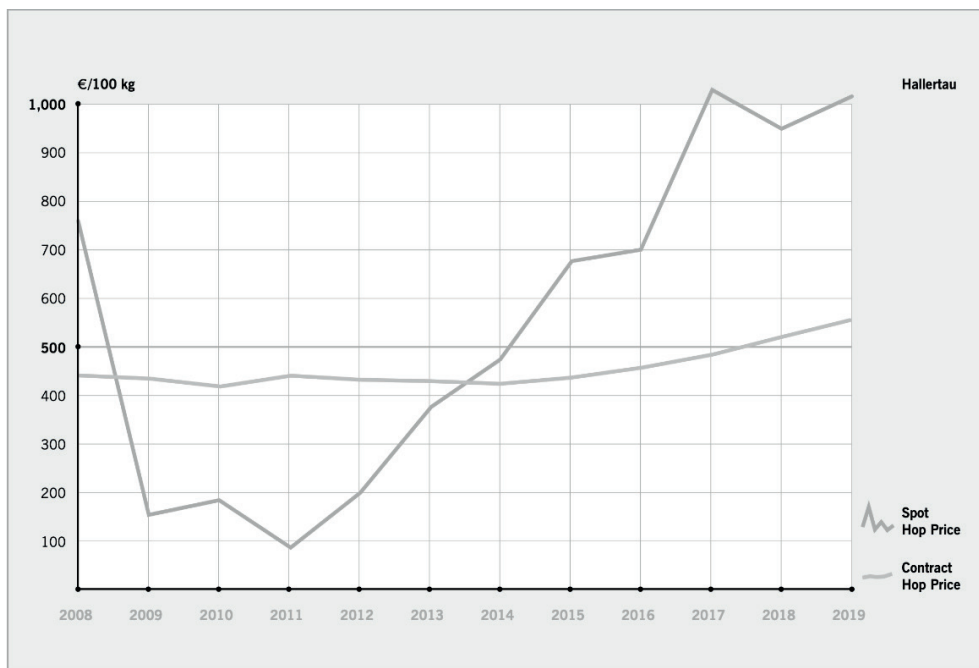


Figure 3: *The Hop Cycle 1994-2020 as manifested in Europe (Hopsteiner, 2020).*

The imperfect information under which the hop industry operates does not enable a precise reading of the equilibrium situation in real time. During a deficit, when stocks are low relative to demand (i.e., perceived shortage), growers demand five-year forward contracts to increase production. During times of surplus, the Delayed Surplus Response (DSR) introduced by the authors in Hoponomics (MacKinnon and Pavlovič, 2021), and inelastic demand creates backwardation removing brewer incentives to lock in forward prices through contracting. The perception among hop growers and merchants (who are also growers) is that contracts provide stability and opportunities for recapitalization and investment in their farm. Prices for long-term crisis contracts have traditionally been above long-term season average prices (MacKinnon and Pavlovič, 2020b).

Subsequent contract renegotiations, reduced acreage and decreasing season average price reductions followed every price spike following the shortages mentioned earlier. We may infer that during these times of perceived crisis brewers were forced into contracts they neither wanted or needed resulting in production that created market disequilibrium. Given the cost to change acreage and the loss of contracted revenue, forward contracts, may in fact lead to lower profits than spot market competition and prices would otherwise yield (Cabral and Villas-Boas, 2005).

Due to their similar quantity and quality of essential oils and hop resins, most varieties have substitutes. Largely homogeneous hop products created the need for differentiation among competitors. In the 1980's, hop merchants began creating processed products with Intellectual Property Rights (IPR). Originally, these were attractive to the customer as they increased brewing efficiency. These innovative products were very successful but ultimately decreased the size of the market providing a temporary advantage to the innovator while creating a Bertrand Supertrap (Cabral and Villas-Boas, 2005). As a commodity in a market with inelastic demand during times of oversupply, alpha acid sales often go to the lowest-cost producer. This can result in a Nash equilibrium of the Bertrand model (Hermalin, 2003).

Three times during the 20th century, using the authority of the United States Department of Agriculture (USDA), American hop farmers sought to control the quantity of hops available to the market via Federal Marketing Orders (FMOs). Between 1966-1986 Washington State hop prices remained volatile, fluctuating on average 7.71% per year with the median fluctuation of 6.25% (USDA 2013). Price and supply control experiments can lead to various forms of market failures and create market inefficiencies (Tothova, 2011). When a shortage occurred in the late 1970's and early 1980's due to crop failures, the Hop Administrative Committee (HAC) that regulated the third FMO abandoned its original guidelines (Folwell et al., 1985) in pursuit of increasing long-term global market share for American hops, an effort that failed. By 1986, farmers voted for the termination of the order (Associated Press, 1986).

4 PROPRIETARY HOP VARIETIES

As reported in November 2020 to the International Hop Growers' Convention (IHGC, 2021b), 67.2 percent of the world's commercial varieties had some form of IP (i.e. patents or trademarks). In 2006, of 155 unique varieties, forty (25.8%) had some form of IP associated with them. The trend is clear. What remains unclear are whether the effect of IP rights upon the landscape of the hop industry will be permanent. Production of proprietary varieties has thus far been limited to the region in which the variety was developed except for a brief time when Amarillo® VGXPO1 was produced in Germany.

The development of a new viable commercial hop variety can take over ten years (Perrault, 2016). The greater degree of specificity, control and profit incentivized private hop breeding companies to invest further in innovation because they could define it and thus seek to protect and enforce their rights (Bugos and Kevles, 1992). The presence of IP introduced constraints to the market that had not previously existed, which affected planting decisions (Stiglitz, 1977). In 1998, the first proprietary varieties met the reporting threshold of the USDA National

Agricultural Statistical Service (NASS) that state a variety must be produced by three or more entities to data may be aggregated thereby protecting the anonymity of the producer. The USDA NASS reported acreage and production for the first U.S. proprietary hop varieties with IPR in their annual National Hop Report (NHR). The reader may safely assume that varieties were in production prior to this however but simply did not meet the USDA reporting threshold. Indeed, according to their web site, Yakima Chief Ranches, one of the companies that would in 2003 become part of the Hop Breeding Company, was founded by "three hop-farming families, the Carpenters, the Smiths and the Perraults" who "came together to form a new hop production and research farm" with "a directive to develop new hop varieties" began working with variety development efforts in the 1980's (YCH Hops, 2021).

Table 1: Five largest U.S. hop variety development companies and their respective shares of the proprietary variety market in 2020 by acreage and production (MacKinnon and Pavlovič, 2021).

	Variety Development Company	Market Share of U.S. Proprietary Acreage in 2020	Market share of U.S. Proprietary Production in 2020
1	Hop Breeding Company (HBC)	72.02%	70.35%
2	HopSteiner	12.44%	16.19%
3	Association for the Development of Hop Agronomy (ADHA)	5.30%	3.83%
4	Virgil Gamache Farms (VGF)	5.22%	4.96%
5	CLS Farms	3.85%	3.31%

Proprietary hop varieties remained an insignificant share of global production until 2010, when the focus of the global hop industry shifted. The U.S. craft beer industry began growing at an unprecedented rate. In some cases, craft brewers used over 435g/hl of hops (at 12% alpha, this would equate to 52g/hl of alpha-acids) whereas macros on average used less than 3.5g/hl of alpha-acids, the global average hopping rate at the time. As they pursued their passion, small craft brewers were also willing to pay premium prices. Craft brewer money therefore represented a disproportionately large portion of the market relative to the volume of beer produced by their macro counterparts. The reader may infer on Figure 4 their effect on the industry was overwhelming based on the sudden change in hopping rates between 2010 and 2012 (BarthHaas, 2020).

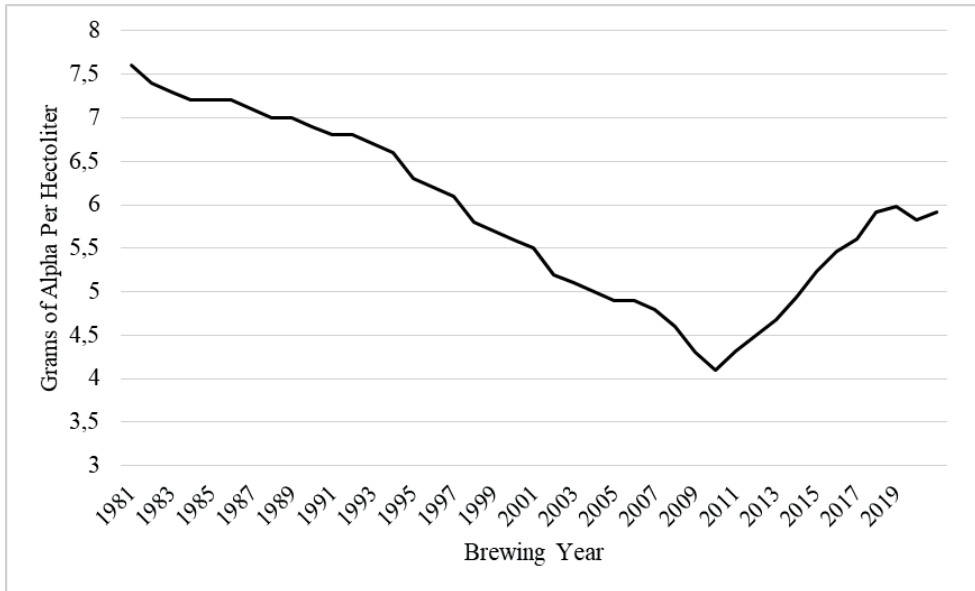


Figure 4: *Hopping Rates 1991-2019 (MacKinnon and Pavlovič, 2021).*

As the U.S. craft beer industry continued to grow, it consumed ever larger quantities of the U.S. proprietary hop varieties. In response, between 2011 and 2019, American hop acreage increased 97.8% (George, 2019), a change that consisted largely of proprietary varieties. Constrained Pareto optimality led to the counterintuitive expansion of varieties with greater inelasticity while more elastic varieties were restricted (Stiglitz, 1977). Premium prices for proprietary varieties influenced prices for public varieties, had to produce a competitive return per acre, or they would no longer be produced (Mahoney, 2021).

The popularity of proprietary varieties reported by the USDA NASS rose from zero in 1997 to 70.19 percent of U.S. acreage and 73.44 percent of U.S. production in 2020 according to the 2020 NHR. Until the existence of varieties with IP, it was not possible to calculate market share for any hop merchant companies using public data. Sales to breweries is the metric most thought of with regards to market share. Acreage and picking capacity are the scarcest resources in the hop industry. The market share of hop acres devoted to a proprietary variety, or a group of proprietary varieties owned by a company, enables the calculation of influence over hop acreage market share possible. Without first winning the battle for acreage market share, a proprietary variety or its owners cannot succeed in the battle for market share of sales to breweries as the product will not exist.

A company with patented plant material that wanted the growth of its IP to spread would, in theory, benefit greatly from marketing its products through every merchant or interested party in the industry so long as the sales were in response to demand and not speculative in nature. Some of the companies that have developed proprietary hop varieties appear to restrict sales of their IP by not making them available to all merchants equally. This would be curious behavior for an independent variety development company. Perhaps not coincidentally, some of the companies developing proprietary hop varieties share ownership with the large merchant companies or farms through which they primarily market and distribute their IP. One might infer from this that proprietary varieties are a means by which individuals who own shares in both merchant firms and variety development companies consider using the proprietary varieties to create a competitive advantage over their competitors.

Through producer licensing agreements, some IP owners in 2021 retained ownership of their plant material. They can control the pesticides allowed during production process. They can dictate harvest schedules on third-party farms. They can control and retain all rights to take delivery of and sell their product. This has resulted in a hierarchical structure within the hop industry. Those who do not own IP are reduced to contract growers working at the behest of those who do. Those who own hop varieties with IP did an amazing job at cultivating and curating a valuable public image for their proprietary varieties. Their brand image contributes significantly to their uniqueness. Brewers believed that new innovative hop flavors offered by proprietary varieties combined with their skills were responsible for their brewing success (MacKinnon and Pavlovič, 2020a).

5 HOP PRICES

Price is not the primary motivating factor with regards to purchasing (Chen and Lent, 1992). Without access to perfect information and with so many extrinsic variables, it is impossible to make exact predictions regarding the future of the market even as harvest is underway (Kruschke, 2013). Hop growers have long had a saying that can often be heard during harvest when yields are discussed: *"You don't know what you've got until it's in the bale"*.

Equilibrium in the hop market is a concept that passes under the veil of secrecy as surpluses turned to deficits under the free market. It was never achieved for any meaningful period and was never maintained prior to the dominance of proprietary varieties. Some participants in the industry are less informed. Creating an accurate image of brewer demand for hops has always been a challenging task. It is greatly simplified by the presence of proprietary varieties. Price is responsive to the quantity of hops perceived to be available to the market. If an entity can control that perception, they can control the price (MacKinnon and Pavlovič, 2021).

Ultimately, demand for hops manifests itself through the customer's willingness to contract hops, which can only be measured in hindsight.

During times of oversupply, demand for hops does not change in response to lower prices although it may appear so due to increases in sales volume. When hops are dumped onto the market in this fashion, it satisfies future demand rather than increasing demand for the product in that crop year. Acreage reductions corresponding to the volume of hops sold at discount seldom occurs even though evidence for a shift in demand is obvious. This is evidence of the DSR, a term created by the authors, mentioned above.

Reduced cross elasticity, regulation of supply and growing demand between 2010-2020 enabled a sustained period of premium hop prices and increased contracting rates among breweries due to the increasing prevalence of branded proprietary products (MacKinnon and Pavlovič, 2019). These significant changes could be harbingers of things to come. It may also represent a prolonged a swing in the market that will correct itself on a longer time scale than previous boom and bust cycles. By 2021, the lasting effect of proprietary varieties on the future of the market was not yet clear except as it pertained to the inflated value of forward contracting rates within the industry (Figures 5 and 6).

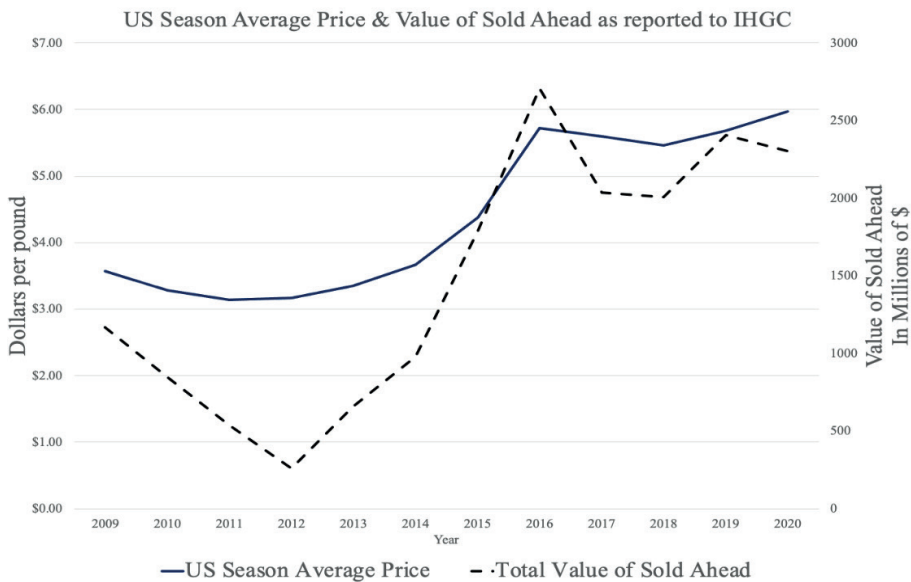


Figure 5: U.S. Season Average Price (SAP) and Value of Sold Ahead 2009-2020. Adapted from IHGC sold ahead data as reported by U.S. between 2000-2020 (IHGC, 2021a).

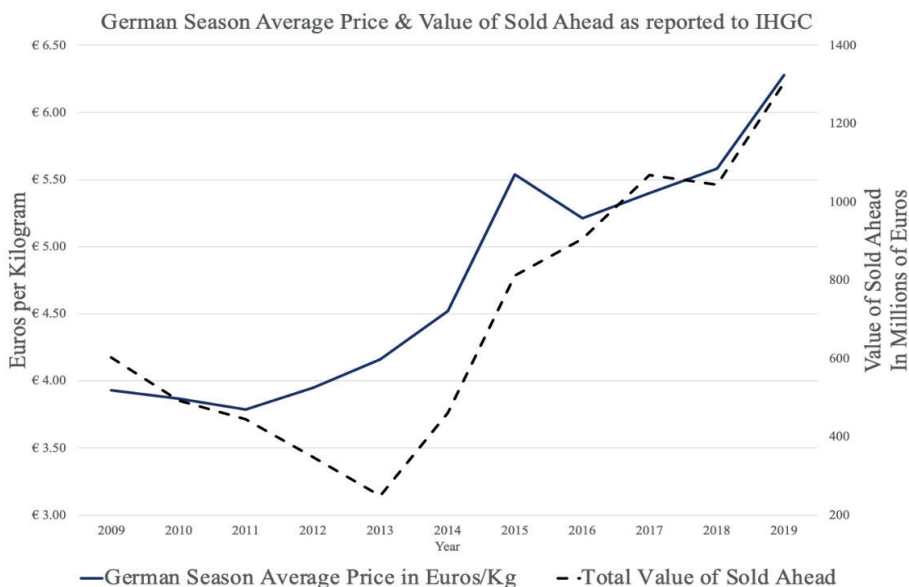


Figure 6: German SAP and Value of Sold Ahead 2009-2020. Adapted from IHGC sold ahead data as reported by Germany between 2000-2020 (IHGC, 2021a).

6 CONCLUSIONS

For the foreseeable future, the hop industry will remain a hyper competitive environment in which details regarding strategy and operations remain partial secrets. This is likely the primary reason for the dearth of published information on the workings of the hop market. For somebody involved in the hop trade, it would be financially risky to divulge such facts in an industry where so much power is wielded by so few. Those in power have no interest in exposing their tactics. Monopolies are inherently unstable and do not last forever. The future remains uncertain.

Demand for hops manifests itself through the customer's willingness to purchase hops which can only be measured in hindsight. Creating an accurate image of brewer demand for hops is a challenging task. Price is responsive to the quantity of hops perceived to be available to the market. Demand is slow to react to changes in price. Severe changes are necessary to increase sales.

The concept of hop supply represents an estimate. It is a perception by members of the brewing and hop industry regarding the quantity of hop products available to the market at any given time, which can change with circumstances in the market. So long as an event does not occur that changes that perception, it represents reality. Supply is reported by growers and merchants.

Growers and merchants alike, jostle for power in a unique industry. As they adapt to myriad changes, they attempt to preserve and grow their wealth and spheres of influence. For some, current trends will represent an existential crisis. There has long been a struggle for power between rivals. Vague images of a potential future in which a potential victor emerges are starting to emerge. Whether the brewing industry will continue to enable the concentration of power remains to be seen.

7 REFERENCES

- Associated Press (1986). Hop Growers Vote to End Marketing Order, Los Angeles Times. September 10, 1986. Available at <https://www.latimes.com/archives/la-xpm-1986-09-10-fi-13182-story.html> (accessed May 20, 2020).
- BarthHaas (2020). The Barth Report 1949-2020. BarthHaas GmbH & Co. KG. Available at <https://www.barthhaas.com/en/downloads/> (accessed October 10, 2021).
- Bugos G., Kevles D. (1992). Plants as Intellectual Property. *Osiris*, 7: 74-104.
- Cabral L., M. Villas-Boas M. (2005). Bertrand Supertraps. *Management Science*, 51: 559-613.
- Chen Z., Lent, R. (1992). Supply Analysis in an Oligopsony Model. *American Journal of Agricultural Economics* 74: 973-979.
- Cooberg H., Hintermeier P. (2012). Market report April 2012. Working paper, Economic Committee of the International Hop Growers' Convention. Available at: http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/2012_NOV_IHGC_Hop_Market_Report.pdf (accessed February 22, 2020).
- Delyser D.Y., Kasper W.J. (1994). Hopped Beer: The Case for Cultivation. *Economic Botany* 48, 166-170.
- Folwell R.J., Mittelhammer R.C., Hoff F.L., Hennessy P.K. (1985). The Federal Hop Marketing Order and Volume-Control Behavior. *Agricultural Economics Research* 37: 17-32.
- Galal M.B. (1968). Concentrated Oligopsony with Leadership: A Theory. *The American Economist*. 12(2): 69-74.
- George A. (2019). Hop Growers of America. Statistical Packet 2006-2019. HGA Annual Convention, United States.
- Hermalin B.E. (2003). *Introduction to Game Theory & The Bertrand Trap.*: University of California. Berkeley: 1-19.
- Hopsteiner. (2020). Guidelines for hop buying. Simon H. Steiner, Hopfen, GmbH, Mainburg, Germany, 16 p.
- IHGC. (2021a). Economic Commission Summary Reports. IHGC Secretariat's archives 1997-2021. http://www.hmeljgiz.si/ihgcdoc/2021_FEB_IHGC_EC_Report.pdf (accessed October 20, 2021).
- IHGC. (2021b). Hop variety list 2021. IHGC Secretariat. Available at the IHGC home page: http://www.hmelj-giz.si/ihgcdoc/IHGC_HopVarietyList_2021.xlsx (accessed November 15, 2021).
- Kruschke J. (2013). Bayesian Estimation Supersedes the t Test. *Journal of Experimental Psychology* 142: 573-603.

- MacKinnon D., Pavlovič M. (2019). Global hop market analysis within the International Hop Growers' Convention. *Hop Bulletin*, 26: 99-108.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2020a). Impact of the varietal structure and beer types changes on a global hop market. V: PRIŠENK, Jernej (ur.). *Razvojni vidiki prenosa znanja v skupni kmetijski politiki po letu 2020*, 8. konferenca DAES, Maribor, 1. izd. Maribor: Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije, str. 163-177.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2020b). A Bayesian analysis of hop price fluctuations. *Agricultural Economics*, 66(12): 519-526.
- MacKinnon D., Pavlovič M. (2021). *Hoponomics: Market analysis applied to the hop industry 1980–2020*. (Schriftenreihe Agrarwissenschaftliche Forschungsergebnisse, Bd. 81). Hamburg: Verlag Dr. Kovač, 200 p.
- Mahoney P. (2021). VP Supply Chain Barthhaas®. The Haas® HopCast™ 2021 Hop Harvest Update ft. <https://www.johnihaas.com/news-views/> (accessed October 26, 2021).
- NHR. (2019). *National Hop Report, Hop statistics 2002-2019*. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service. Olympia, WA, USA.
- OECD. (2012). *Competition and Commodity Price Volatility*. Directorate for Financial and Enterprise Affairs Competition Committee. Paris, France.
- Perrault J. (2016). Hop Breeding. Why, how, and the impact of new variety evaluation and selection. *World Brewing Congress*, August 13-17, 2016, Denver CO, U.S.A.
- Stiglitz J.E., Dixit A.K. (1977). Monopolistic Competition and Optimum Product Diversity. *The American Economic Review* 67: 297-308.
- Tothova M. (2011). Main Challenges of Price Volatility in Agricultural Commodity Markets. In: Piot-Lepetit I., M'Barek R. (eds) *Methods to Analyse Agricultural Commodity Price Volatility*. Springer, New York, NY. pp. 13-29.
- USDA NASS. (2013). *WA Hops 1915-2013*. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistical Service. Available at https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Historic_Data/hops/wahops.pdf (accessed October 10, 2019).
- YCH Hops. (2021). Yakima Chief – Hopunion LLC. <https://www.yakimachief-ranches.com/about/> (accessed October 20, 2021).

VPLIV KOMERCIALNIH KVASOVK NOTTINGHAM IN BELLE SAISON NA UČINKOVITOST FERMENTACIJE IN NEKATERE LASTNOSTI PIVA

Gašper KORAT¹ in Petra TERPINC²

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 20. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 7. 12. 2021

Izvelek

Ob uporabi dveh vrst komercialnih kvasovk smo spreminjali količino ekstrakta v osnovni sladici, količino inokuluma ter izbirali med dvema temperaturama, pri katerih je potekala fermentacija. Ugotovili smo, da na kinetiko fermentacije vplivajo vsi parametri, najbolj opazen pa je vpliv temperature. Rezultati so pokazali, da na prevrelost in stopnjo alkohola v pivu najbolj vpliva temperatura v kombinaciji z uporabljenim sevom kvasovk. Zabeležili smo le manjši vpliv testiranih dejavnikov na FAN in grenčico v pivu.

Ključne besede: kvasovke, fermentacija, ekstrakt, alkohol, IBU, FAN

THE IMPACT OF COMMERCIAL YEASTS NOTTINGHAM AND BELLE SAISON ON THE EFFICIENCY OF FERMENTATION AND CERTAIN BEER PROPERTIES

Abstract

We used two commercial yeast species, changed the original extract and the amount of inoculum, and choose between two fermentation temperatures. We found that fermentation kinetics were affected by all parameters, with the effect of temperature being the most pronounced. The results showed that temperature, in combination with the yeast strain used, had the greatest effect on attenuation and alcohol content of the beer. We found little effect of the tested factors on FAN and the bitterness of the beer.

Key words: yeasts, fermentation, extract, alcohol, IBU, FAN

¹ Dipl.inž. živ. in preh., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: gk1585@student.uni-lj.si

² Doc. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: petra.terpinc@bf.uni-lj.si

1 UVOD

S pojmom fermentacija opisujemo tisti korak v proizvodnji piva, v katerem iz pive pridobimo mlado pivo. V mikrobiološkem smislu se fermentacija nanaša na samo rast kvasovk; njihova populacija se poveča od štiri- do šestkrat (Boulton, 2013). Eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na potek ter rezultat fermentacije, je količina ekstrakta v osnovni sladici, tj. merilo vseh topnih komponent v sladici pred alkoholno fermentacijo. Ekstrakt v pivu pred destilacijo imenujemo navidezni ekstrakt, saj prisotni alkohol znižuje gostoto in s tem vpliva na izmerjeno vrednost. Z destilacijo piva pridobimo destilacijski ostanek, ki mu lahko določimo pravi ekstrakt ter destilat, v katerem lahko izmerimo delež alkohola v pivu (Oliver, 2012). Vsebnost ekstrakta je dober pokazatelj problemov s konverzijo sladkorjev, pove nam, kdaj se fermentacija umirja oziroma je zaključena, največji pomen pa ima pred samo fermentacijo, ker nakazuje končno stopnjo alkohola v pivu (Sparhawk, 2012).

Pri fermentaciji se ne porabljajo le sladkorji iz sladice, na samo rast kvasovk in tvorbo aromatičnih spojin pomembno vpliva tudi vsebnost prostega dušika (FAN); ta je odvisna od izhodne surovine, priprave slada, procesa drozganja (Hill in Stewart, 2019) in pogojev fermentacije (Boulton, 2013). S pojmom FAN v pivovarstvu opisujemo vse dušikove spojine v sladici, ki jih lahko kvasovke asimilirajo ali metabolizirajo: alfa aminokislina, amonijak in majhne peptide (Hill in Stewart, 2019). Kvasovke potrebujejo vir dušika za tvorbo aminokislin in nukleotidov, iz katerih se kasneje tvorijo proteini, nukleinske kisline in koencimi. Večja kot je koncentracija FAN v sladici, več bo nastalo hlapnih komponent (višjih alkoholov in estrov), kar lahko vodi v slabše senzorične lastnosti. Nasprotno, prenizek FAN pomeni nezadosten potek fermentacije (Kallmayer, 2014). Aminokislina so nadalje prekursorji za nastanek višjih alkoholov in aldehydov – dveh razredov spojin, ki sta zelo pomembna pri razvoju neželenih senzoričnih lastnosti piva. Zato lahko že majhne spremembe v njihovi koncentraciji povzročijo precejšnja odstopanja pri okusu in aromi končnega produkta (Ferreira in Guido, 2018).

Kvasovke so glavni proizvodni organizem pri proizvodnji kvalitetnega piva. Fermentirajo sladkorje, pri čemer nastajata alkohol in ogljikov dioksid ter številni sekundarni metaboliti, ki pomembno prispevajo h končnemu senzoričnemu profilu piva. Slednjega definira tudi izbira seva kvasovk. Pivske kvasovke vrste *Saccharomyces* delimo na *ale* kvasovke ali kvasovke zgornjega vrenja ter *lager* kvasovke ali kvasovke spodnjega vrenja (Bukolich in Bamforth, 2013). Količina kvasovk ob inokulaciji vpliva na hitrost fermentacije in zavisi od seva kvasovk, pogojev fermentacije in željenih lastnosti končnega produkta (Briggas in sod., 2004).

Kontrola temperature med fermentacijo je najlažji in najbolj efektiven način kontroliranja hitrosti fermentacije (Kuharczyk in Tuszynski, 2018). Fermentacija pri nižjih temperaturah daje lager piva z boljšim okusom in aromo, medtem ko višje temperature vodijo v povečano aktivnost kvasovk, izgubo stabilnosti pene in barve piva, znižanje pH vrednosti ter v hitrejšo izgubo grenkih komponent (Kuharczyk in Tuszynski, 2018). Pozitivna stran visokih temperatur fermentacije je krajši čas, ki je potreben za znižanje potencialnih priokusov, povzročenih s strani vicinalnih diketonov (Briggas in sod., 2004). Ale piva imajo kljub višjim temperaturam fermentacije prisotne kompleksnejše arome kot lager piva, višje temperature pomenijo hitrejšo fermentacijo in tvorbo večjih količin estrov in hlapnih alkoholov (Sitka, 2019). Zelo nizka temperatura ob inokulaciji kvasovk lahko vodi v počasnejšo kinetiko.

Glavni vir grenčice v hmelju so alfa-kislina, ki se med kuhanjem sladice izomerizirajo v izo-alfa-kislina. Grenčica velikokrat predstavlja občutek trpkosti in suhosti; razmerje med grenčico in sladkostjo v pivu je pri kakovostnem pivu uravnoteženo. Grenčica v pivu se meri v enotah IBU (*international bitterness units*). Glavne alfa-kislina v hmelju so humolon, adhumolon in kohumolon. Ti homologi imajo med kuhanjem sladice drugačne izkoristke. Prav tako imajo različne izo-alfa-kislina različne vplive na grenčico in lastnosti pene v pivu (Oliver, 2012).

2 MATERIALI IN METODE DELA

2.1 Kvasovke

Za inokulacijo sladice smo uporabili dva seva komercialnih ale kvasovk: Lallemand Nottingham in Lallemand Belle saison (Technical Data Sheet, 2020).

2.2 Priprava sladice

Za pripravo sladice smo uporabili ječmenov slad (svetli (85 %) in karamelni (15 %)) ter vodo v razmerju 1:4, m/v. Režim drozganja je bil sledeč: 30 min / 45 °C, 30 min / 52 °C, 30 min / 63 °C, 60 min 72 °C, 10 min 78 °C. Fazi precejanja je sledilo 1 h kuhanje sladice, ko smo vreli sladici dodali hmeljne brikete sort Aurora (0,07 %) in Savinjski golding (0,07 %). Pivina je po zaključeni sedimentaciji vsebovala 18 % ekstrakta (FAN: 217,2 mg/L; IBU: 33,1). Za potrebe eksperimenta smo jo del razredčili z vodo na 11 % (FAN: 131,0 mg/L; IBU: 24,7).

2.3 Rehidracija kvasovk in inokulacija sladice s kvasovkami

Kvasovke smo rehidrirali v 10-kratni količini prevrete in na 32 °C ohlajene vode, po 15 min smo v vodi suspendirane kvasovke premešali in jim 5 min kasneje dodali enako količino sladice, da smo preprečili osmotski in temperaturni šok. Po 15 min so bile kvasovke pripravljene za dodajanje v fermentacijsko posodo. V fermentacijsko steklenico smo odmerili 500 mL na sobno temperaturo ohlajene pивine z 18 oz. 11 ut. % ekstrakta. Po dodatku ustrezne količine kvasovk, smo steklenice zaprli z vrelnimi vehami in prestavili v prostor s temperaturo 20 °C oz. 10 °C. Vsi poskusi so bili izvedeni v treh paralelkah. Po sedmih dneh smo s fermentacijo zaključili.

2.4 Gravimetrično spremljanje fermentacijskega poskusa s tehtanjem

Potek alkoholne fermentacije smo periodično spremljali s tehtanjem fermentacijskih posod. Iz spremembe mas smo izračunali količino oddanega ogljikovega dioksida v časovni enoti in na podlagi teh vrednosti izrisali krivuljo kemijske kinetike fermentacije.

2.5 Kemijske analize

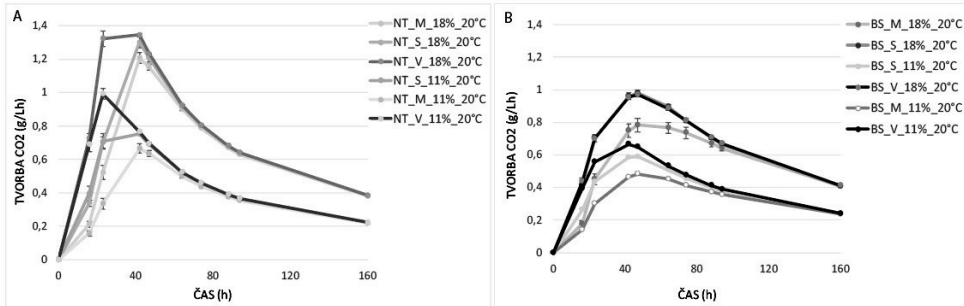
Izvedli smo naslednje analize: navidezni in pravi ekstrakt (Analytica-EBC, 9.4, 2004), alkohol v pivu (Analytica-EBC, 9.2.1, 2008), grenčica v pivu (MEBAK, 2.17.1., 2013b) in prosti aminokislinski dušik (MEBAK, 2.6.4.1, 2013a).

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Na sliki 1 je prikazana odvisnost izločenega CO₂ v sladici od časa fermentacije. Poleg hitrejše kinetike pri kvasovkah Nottingham, lahko v prvih 48 h opazimo tudi višje maksimalne vrednosti, ki jih te dosežejo, v primerjavi s kvasovkami Belle Saison.

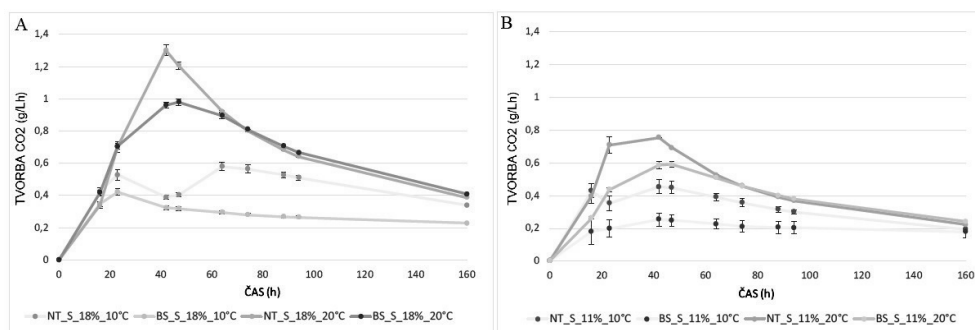
Razlike pri inokulaciji večjih količin kvasovk se bolj odrazijo pri kvasovkah Nottingham, zlasti na začetku fermentacije. To bi lahko pripisali večjemu številu živih in aktivnih celic, ki začnejo hitreje porabljati sladkorje v sladici in izločati CO₂. Bolj kot se fermentacija umirja, bolj poenotene so si vrednosti, saj v sladici ni na voljo več veliko fermentabilnih sladkorjev, ki bi jih kvasovke še lahko uporabile. Ker je rast novih celic pogojena s količino kisika, ki je na voljo v sladici, je povečanje števila celic skoraj neodvisno od začetne koncentracije celic pod enakimi pogoji. V primerjavi z majhno količino inokuliranih kvasovk vodijo večje količine v manjše število celičnih delitev. Količina inokuliranih kvasovk pa vendarle vpliva na rast kvasovk v primeru, da je ta količina prenizka. To vodi v nižji prirast kvasovk, posledično do počasnejše ali celo zaustavljene fermentacije

(Briggas in sod., 2004), vendar je bila v našem primeru 50 g/100 L na spodnji priporočeni meji, zato tako drastičnih posledic nismo zabeležili.



Slika 1: Vpliv količine kvasovk na kinetiko fermentacije piva pri 20 °C; A (kvasovke Nottingham, 11 % oz. 18 % ekstrakta), B (kvasovke Belle Saison, 11 % oz. 18 % ekstrakta), M – majhna količina kvasovk 50 g/100 L, S – srednja količina kvasovk 100 g/100 L, V – velika količina kvasovk 150 g/100 L.

Na sliki 2 je prikazano, kako temperatura fermentacije vpliva na njen potek, uporabili smo srednjo količino inokuluma. Na obeh grafih najprej opazimo strm vzpon krivulje kvasovk Nottingham pri 20 °C, razlika je med kvasovkama očitnejša pri sladici z 11 % ekstraktom. Pri 10 °C smo izmerili večjo aktivnost kvasovk Nottingham kot Belle Saison. Zato lahko kvasovkam Nottingham pripišemo burno fermentacijo s hitrim začetkom. Vpliv temperature se dobro opazi na obeh grafih, pri 20 °C je fermentacija hitrejša. Po drugi strani, nizka temperatura še posebej prizadene aktivnost kvasovk Belle Saison, za katere tudi proizvajalec navaja, da je optimalna fermentacijska temperatura med 15 °C in 35 °C, medtem ko je za kvasovke Nottingham med 10 °C in 22 °C. Na sliki 2 lahko opazimo tudi razliko med fermentacijo v sladici z visokim in nizkim začetnim ekstraktom. Fermentacije v sladici z 18 % začetnega ekstrakta dosegajo višje vrednosti izločenega CO₂, to bi lahko pripisali večji koncentraciji substrata. Vrednosti proti koncu so v sladici z 18 % začetnega ekstrakta nekoliko višje, zaradi česar predvidevamo daljši čas fermentacije ali večji preostanek nepovretil sladkorjev.



Slika 2: Vpliv temperature in vrste kvasovk na kinetiko fermentacije piva pri srednji količini inokuluma; A (kvasovke Nottingham in Belle Saison 18 % ekstrakta), B (kvasovke Nottingham in Belle Saison, 11 % ekstrakta)

Primerjava preglednice 1 in 2 pove, da so stopnje prevrelosti pri kvasovkah Belle Saison v večini višje, kar pomeni, da porabijo več ekstrakta kot kvasovke Nottingham. Vidimo lahko, da imajo kvasovke Belle Saison nižje fermentacijske sposobnosti pri nizkih temperaturah kot kvasovke Nottingham, še zlasti se to izrazi pri sladici z več ekstrakta. Pri slednjih so stopnje prevrelosti pri 10 °C le nekoliko nižje kot pri 20 °C, torej so te kvasovke bolj prilagojene nižjim temperaturam. S primerjavo različnih količin kvasovk opazimo, da ta parameter bistveno ne vpliva na končno stopnjo prevrelosti. To je verjetno posledica daljšega časa, ki so ga imele kvasovke na voljo za fermentacijo in so, ne glede na število celic, porabile ves ekstrakt, ki so ga lahko. Če ob isti količini inokuluma primerjamo še vpliv ekstrakta v osnovni sladici na končno stopnjo prevrelosti pri 20 °C, lahko opazimo, da začetna količina ekstrakta nima bistvenega vpliva na stopnjo prevrelosti.

Preglednica 1: Prevrelost piva, delež alkohola (vol %), vrednost FAN (mg/L), grenčica (IBU) po 7 dneh fermentacije pri različni količini inokuliranih kvasovk Nottingham.

OZNAKA VZORCA	NOTTINGHAM			
	PREVRELOST	ALKOHOL	FAN	GREŇČICA
S_18%_10°C	60,86 ± 0,08	7,44 ± 0,02	95,3 ± 4,7	21,9 ± 0,00
S_18%_20°C	66,62 ± 0,31	4,00 ± 0,40	53,3 ± 2,2	16,4 ± 0,9
S_11%_10°C	61,35 ± 1,43	7,11 ± 0,05	39,3 ± 0,0	14,8 ± 0,4
S_11%_20°C	66,01 ± 0,19	7,52 ± 0,04	30,4 ± 0,3	14,7 ± 0,8
M_18%_20°C	65,19 ± 0,23	4,25 ± 0,20	63,4 ± 2,2	16,1 ± 0,1
V_18%_20°C	67,41 ± 0,38	4,51 ± 0,05	45,3 ± 0,7	15,0 ± 0,4
M_11%_20°C	66,71 ± 1,18	7,48 ± 0,04	25,5 ± 0,9	14,5 ± 0,1
V_11%_20°C	67,94 ± 0,06	4,34 ± 0,04	18,4 ± 0,0	14,0 ± 0,2

Preglednica 2: *Prevrelost piva, delež alkohola (vol %), vrednost FAN (mg/L), grenčica (IBU) po 7. dneh fermentacije pri različni količini inokuliranih kvasovk Belle Saison.*

OZNAKA VZORCA	BELLE SAISON			
	PREVRELOST	ALKOHOL	FAN	GREŇČICA
S_18%_10°C	41,26 ± 0,31	7,80 ± 0,10	135,1 ± 1	20,0 ± 1,3
S_18%_20°C	70,90 ± 0,04	4,68 ± 0,08	77,0 ± 2,6	19,2 ± 0,4
S_11%_10°C	59,01 ± 6,59	4,57 ± 0,04	65,8 ± 0,0	13,0 ± 0,3
S_11%_20°C	70,32 ± 0,68	8,17 ± 0,04	39,5 ± 5,3	13,6 ± 0,7
M_18%_20°C	70,25 ± 0,04	4,21 ± 0,00	85,4 ± 0,1	19,3 ± 0,8
V_18%_20°C	71,93 ± 1,03	4,84 ± 0,02	71,3 ± 0,1	19,4 ± 0,6
M_11%_20°C	70,01 ± 1,00	7,85 ± 0,00	41,8 ± 3,4	13,6 ± 0,3
V_11%_20°C	71,86 ± 0,00	4,80 ± 0,03	33,7 ± 0,1	15,2 ± 1,8

Ob pregledu podatkov o deležu alkohola v pivu opazimo podobnosti s pravo stopnjo prevrelosti, saj sta ta dva parametra povezana (Sparhawk, 2012). Tudi tu se najbolj opazi vpliv temperature in vrste kvasovk na delež alkohola. Pri nižjih temperaturah je pri kvasovkah Belle Saison nastalo skoraj pol manj alkohola kot pa pri višjih temperaturah. Pri kvasovkah Nottingham pa ta razlika ni tako očitna. Vendar tukaj opazimo še močan vpliv količine ekstrakta v osnovni sladici na delež alkohola v pivu, kar je logično, saj lahko iz več sladkorjev, ki jih imajo kvasovke na voljo, nastane več alkohola. Tudi tu opazimo, da količina inokuliranih kvasovk v večji meri ne vpliva na delež alkohola v pivu.

Pri sladici z 12 % ekstraktom se priporoča cca. 130 mg FAN/L. Prenizek FAN onemogoča normalen razvoj kvasovk in lahko privede do podaljšane t. i. lag faze, nepopolne fermentacije ali do razvoja sulfidov. V stacionarni fazi rasti so potrebe po FAN dokaj nizke, višje koncentracije so potrebne le v fazah rasti (Hill in Stewart, 2019). V našem primeru je sladica z 11 % ekstrakta sledila navedenim priporočilom, prav tako smatramo, da je bila vrednost ustrezna v izhodni sladici z 18 % ekstrakta. FAN je bil v sladici z manj ekstrakta pričakovano nižji, kar je posledica večje razredčitve na začetku (del sladice smo pri vzorcih z 11 % ekstrakta nadomestili z vodo, ki ni vsebovala prostih aminokislin). Delež ekstrakta v osnovni sladici je vplival tudi na končne vrednosti, ki so v primeru nižjega ekstrakta nižje. Pri temperaturah fermentacije 10 °C smo opazili, da se vrednosti znižujejo počasneje (podatki niso prikazani) in ne dosežejo tako nizkih vrednosti (preglednici 1 in 2). To bi se lahko dogajalo zaradi počasnejše fermentacije pri tej temperaturi (Kuharczyk in Tuszyński, 2018). Pri podatkih, ki kažejo vpliv različne količine kvasovk, bi pričakovali, da bodo najmanjše spremembe opazne pri mali količini kvasovk (50 g/100L), vendar so bile te vrednosti bolj podobne vzorcem z

veliko količino kvasovk (150 g/100 L) kot pa vzorcem s srednjo količino (100 g/100 L). To nam pokaže, kako pomembna je pravilna izbira količine kvasovk za posamezno fermentacijo. Razlike so opazne tudi pri primerjavi vpliva vrste kvasovk, kvasovke Belle Saison so porabile nekoliko več FAN. To lahko povežemo z navedbami proizvajalca, ki pravi, da daje ta vrsta bolj aromatična piva (Technical ..., 2020b), saj je za tvorbo aromatičnih spojin praviloma potrebna zadostna količina FAN (Hill in Stewart, 2019).

Primerjava vzorcev, kjer je bila temperatura fermentacije različna, kaže, da med vzorci ni bilo večjih razlik v določeni grenčici, sklepamo lahko, da se vrednost IBU znižuje neodvisno od spremembe temperature. So pa razlike vidne pri uporabi različnih vrst kvasovk v povezavi z različnimi količinami ekstrakta v osnovni sladici. To bila lahko bila posledica tega, da kvasovke med fermentacijo vežejo nekaj izo-alfa-kislin, zaradi česar lahko pivo izgubi na grenčici (Colby, 2014). Neodvisno od količine inokuluma, je bila pri 18 % ekstrakta hitrejša izguba IBU opazna pri kvasovkah Nottingham, medtem ko smo pri 11 % ekstraktu zabeležili različen trend. Pri vzorcih z večjo količino ekstrakta v osnovni sladici, se je tudi vrednost IBU bolj znižala. To je prav tako opazil avtor članka, ki je preučeval spremembe vrednosti IBU med celotnim postopkom izdelave piva (Justus, 2018). Ob primerjavi vseh različnih dejavnikov lahko opazimo, da na izgubo grenkih snovi preučevani dejavniki ne vplivajo bistveno.

4 ZAKLJUČEK

Rezultati analiz so pokazali, da višja temperatura vpliva na hitrost fermentacije, še posebej v začetku. Pri spremljanju kinetike fermentacije smo opazili še, da kvasovke Nottingham začno fermentirati hitreje in burneje, prav tako sta na hitrejšo fermentacijo vplivali večja količina kvasovk in ekstrakta v osnovni sladici. Kvasovke Belle Saison pri nizkih temperaturah fermentirajo slabše kot kvasovke Nottingham. Količina ekstrakta v osnovni sladici vpliva na aktivnost kvasovk v smislu hitrosti fermentacije, saj kvasovke pri sladici z nižjim ekstraktom niti v vrhu fermentacije ne dosežejo takšnih hitrosti kot kvasovke pri sladici z višjim ekstraktom. Na prevrelost sta imela največji vpliv temperatura in sev kvasovk, kjer smo zaznali večjo prevrelost pri kvasovkah Belle Saison in pri višjih temperaturah. Analize stopnje alkohola po koncu fermentacije so pokazale, da pri višji temperaturi nastane več alkohola. To je bolj očitno pri kvasovkah Belle Saison. Padec FAN je manjši pri nižjih temperaturah in srednji količini uporabljenih kvasovk, kvasovke Belle Saison pa porabijo več FAN kot kvasovke Nottingham. Kar se tiče grenčice, na padec IBU enot ne vpliva veliko dejavnikov, so pa opazne razlike pri vzorcih z višjo začetno količino ekstrakta v povezavi z uporabljenimi kvasovkami.

5 VIRI

- Analytica-EBC, metoda 9.21 – Alcohol in beer by distillation, 2008, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Analytica-EBC, metoda 9.4 – Original, real and apparent extract and original gravity of beer, 2004, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Bokulich, N. A. in Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77(2), 157-172.
- Boulton, C. (2013). *Encyclopaedia of brewing*. John Wiley & Sons.
- Briggas, D. E., Boulton C. A. in Brookes P. A. (2004). *Brewing science and practice*. Woodhead Publishing Limited
- Colby, C. (2014). Different yeast strains yield different IBUs. *Beer and Wine Journal* <https://beerandwinejournal.com/yeast-strains-ibus/>
- Ferreira, I. M. in Guido, L. F. (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. *Fermentation*, 4(2), 1-23. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>
- Hill, A. E. in Stewart, G. G. (2019). Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*, 5(1), 1-22. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010022>
- Justus A. (2018). Tracking IBU through the brewing process: the quest for consistency. *MBAA Technical Quarterly*, 55(3) 67-74.
- Kallmayer, M. (2004). Making sense of FAN (free amino nitrogen). *Drayman's Brewery*. <https://draymans.com/making-sense-of-fan-free-amino-nitrogen>
- Kucharczyk, K. in Tuszyński, T. (2018). The effect of temperature on fermentation and beer volatiles at industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(13), 230-235.
- MEBAK, metoda 2.6.4.1. - Free amino nitrogen, MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan; MEBAK, 2013a: 86-89.
- MEBAK, metoda 2.17.1. - Bittering units (EBC), MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan; MEBAK, 2013b: 240-243.
- Oliver, G. (2012). *The Oxford companion to beer*. Oxford University Press.
- Sitka J. (2019). Controlling fermentation temperature. *Vermont Brew Your Own: 1 str.* <https://byo.com/article/controlling-fermentation-temperature-techniques>
- Sparhawk A. (2012). Defining beer gravity. *CraftBeer.com* <https://www.craftbeer.com>
- Technical Data Sheet. (2020). BELLE SAISON. LALLEMAND Inc. <https://www.lallemantbrewing.com/en/canada/product-details/belle-saison-beer-yeast>
- Technical Data Sheet. (2020). NOTTINGHAM. LALLEMAND Inc. <https://www.lallemantbrewing.com/en/canada/product-details/nottingham-high-performance-ale-yeast>

CRISPR/CAS SISTEMI: PRIHODNOST DOLOČANJA NUKLEINSKIH KISLIN

Tanja GUČEK¹

Pregledni članek / review paper
Prispelo / received: 18. 10. 2021
Sprejeto / accepted: 15. 12. 2021

Izvleček

V zadnjih 40 letih so svet pretresle številne epidemije, ki so jih povzročili virusi kot je HIV, SARS, H1N1, Ebola, Zika in med zadnjimi SARS-CoV-2, vsem znan kot povzročitelj bolezni COVID-19. V vseh primerih je odziv javnega zdravstva na prisotno virusno grožnjo oviralo pomanjkanje hitrega, dostopnega in zanesljivega molekularnega diagnostičnega testiranja. Kljub temu, da živimo v zelo razviti družbi, ki je ustvarila številne tehnološke čudeže, hitro in natančno določanje patogenov še vedno predstavlja kritično točko tako v humani kot v rastlinski virologiji. Metode, ki omogočajo hitro, občutljivo in specifično določanje nukleinskih kislin so pogosto zahtevne in cenovno neugodne. Velik potencial v rastlinski diagnostiki predstavlja uporaba CRISPR/Cas sistemov, zaradi velike občutljivosti, specifičnosti, hitrosti, fleksibilnosti, robustnosti in preproste uporabe. CRISPR/Cas v kombinaciji s hitrimi testi omogoča poceni, natančno in hitro določanje, ki je primerno tudi za uporabo na terenu. V preglednem članku so opisane različne aplikacije CRISPR/Cas metod za določanje nukleinskih kislin, med drugimi tudi možnost določanja viroidov.

Ključne besede: Crispr, Cas proteini, metode za določanje, nukleinske kisline, viroid

CRISPR/CAS SYSTEMS: THE FUTURE OF NUCLEIC ACID DETECTION

Abstract

Over the past 40 years, the world has been shaken by a number of epidemics caused by viruses such as HIV, SARS, H1N1, Ebola, Zika and most recently, SARS-CoV-2, known to all as the causative agent of COVID-19. In all cases, the public health response to the present viral threat was hampered by a lack of rapid, accessible, and reliable molecular diagnostic testing. Despite living in a highly developed society, that has created many technological marvels, the rapid and

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

accurate identification of pathogens still represents a critical point in both human and plant virology. Methods that enable rapid, sensitive and specific analysis of nucleic acids are often complex and cost-inefficient. The use of CRISPR/Cas systems represents great potential in plant diagnostics, due to its sensitivity, specificity, speed, flexibility, robustness and ease of use. CRISPR/Cas in combination with lateral flow assays (LFA) allows cost-effective, accurate and fast detection, which is also suitable for field use. In this review, several CRISPR/Cas applications for nucleic acid detection are discussed, including their potential for viroid detection.

Key words: Crispr, Cas proteins, detection methods, nucleic acids, viroid

1 UVOD

Rastlinski patogeni povzročajo obsežne ekonomske izgube in predstavljajo veliko grožnjo trajnostnem kmetijstvu (Mahas in sod., 2021). Med temi pomembno mesto zajemajo RNA virusi rodu Potexvirus (družina Alphaflexiviridae), Potyvirus (družina Potyviridae) in Tobamovirus (družina Virgaviridae), ki so zelo nalezljivi in razširjeni po celem svetu (Aman in sod., 2020). Zmanjšanje količine in kakovosti pridelka povzročajo tudi viroidi, ki imajo zelo širok spekter gostiteljev in lahko okužijo kmetijske in okrasne rastline ter nekatere drevesne vrste (Hadidi in sod., 2003). Eden izmed pomembnejših dejavnikov pri uspešnem nadzoru širjenja bolezni je zmožnost hitre in natančne določitve njenih povzročiteljev.

Za identifikacijo specifičnih tarčnih nukleinskih kislin so bile v rastlinski virologiji razvite številne metode, katerih uporabnost je odvisna od zanesljivosti, občutljivosti, ponovljivosti, hitrosti, zahtevnosti in cene (Narayanasamy, 2011). Med temi v sodobni diagnostiki prevladujejo tehnike na osnovi PCR, sekvenciranja in metod izotermalnega pomnoževanja (Guček in sod., 2017, Aman in sod., 2020). Kljub številnim izboljšavam imajo te metode še vedno omejitve, kot so cena, čas, oprema, zahtevno načrtovanje, posledično visoko usposobljen kader in vpliv inhibitorjev, kar pogosto vodi v neustrezne rezultate (Mahas in sod., 2021). Omenjeno tako oteži možnost hitrega in enostavnega določanja, zato je potrebno razviti nove metode s posodobljenimi rešitvami.

Velik potencial v rastlinski diagnostiki predstavlja uporaba CRISPR sistema v kombinaciji s Cas proteini kot so Cas12a, Cas13a in Cas14 (Chen in sod., 2018; Gootenberg in sod., 2017; Harrington in sod., 2018). CRISPR/Cas12a sistem ima možnost cis- in trans-rezanja enoverižnih DNA molekul (ssDNA), slednji posledično omogoča določanje nukleinskih kislin, cis- pa se uporablja za genetski inženiring. V zadnjih petih letih je bil CRISPR sistem razvit za določanje številnih patogenov, zaradi ato-molarne (aM, 10^{-18}) občutljivosti, specifičnosti, hitrosti, fleksibilnosti, robustnosti in preproste uporabe. Visoka občutljivost je mogoča ob

predhodni namnožitvi tarče s PCR, LAMP ali RPA (pomnoževanje rekombinazne polimeraze, ang. recombinase polymerase amplification) (Wang in sod., 2020).

2 CRISPR/Cas sistemi

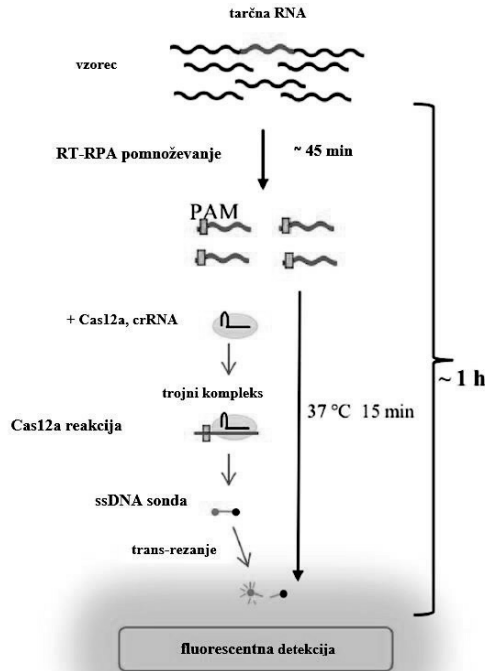
Metoda CRISPR/Cas je ena od novejših diagnostičnih metod, v osnovi razvita za genski inženiring, ki temelji na sistemu, ki ga bakterije in arheje uporabljajo za obrambo pred virusi (Jinek in sod., 2012; Wang in sod., 2020). CRISPR (angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, slo. gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromskih ponovitev) sistem se v kombinaciji s Cas proteini (ang. CRISPR-associated endoribonuclease systems, slo. s CRISPR povezane endonukleaze) (Cas12a, Cas13a in Cas14) uporablja za določanje nukleinskih kislin (Chen in sod., 2018; Gootenberg in sod., 2017; Harrington in sod., 2018). Cas13a deluje kot RNaza, ki jo lahko CRISPR RNA (crRNA) molekule reprogramirajo v rezanje označenih ne-tarčnih RNA molekul (Gootenberg in sod., 2017). Podobno Cas12a vsebuje z DNA-aktivirano splošno aktivnost, da deluje kot DNaza, ki lahko neodvisno reže nespecifične enoverižne DNA (ssDNA) molekule, ko nastane kompleks Cas12a/crRNA/tarčna DNA (Chen in sod., 2018). Kompleks Cas12a-crRNA lahko specifično prepozna in reže tarčno zaporedje s prepoznavanjem motiva PAM (ang. protospacer adjacent motif) in komplementarnostjo med tarčo in crRNA (Chen in Doudna, 2017) (slika 1). Prepoznavanje motiva PAM je odvisno od specifičnega zaporedja (5'-TTTN), ki ga prepozna Cas12a protein, in je osnova, da lahko Cas12a protein deluje kot helikaza in odvijje tarčno DNA (Sundaresan in sod., 2017). Po odvitju se crRNA veže na tarčo, kar naprej aktivira nespecifično trans-rezanje ssDNA (Chen in sod., 2018).

V kombinaciji Cas proteinov z utišanimi fluorescentnimi sondami in korakom namnožitve tarče (PCR, RPA, LAMP), so bile razvite številne metode za določanje nukleinskih kislin, kot so SHERLOCK (Gootenberg in sod., 2017), HUDSON (Myhrvold in sod., 2018), DETECTR (Chen in sod., 2018), HOLMES (Li in sod., 2018, 2019) in E-CRISPR (Dai in sod., 2019). Omenjene metode se razlikujejo glede na analiziran vzorec (DNA/RNA), vrsto predhodnega pomnoževanja (PCR/RPA/LAMP), način detekcije (fluorescenca/hitri testi/elektrokemija), občutljivost (pM/aM/zM), možnost kvantifikacije, časovni obseg ter možnost uporabe na terenu (preglednica 1) (Wang in sod., 2020).

Zaradi ato-molarne občutljivosti (aM) in specifičnosti, so bile CRISPR/Cas aplikacije razvite predvsem pa hitro določanje virusov kot so ZIKA, Denge, HPV-16 in SARS-CoV-2, ker čas testiranja skrajšajo na 1 uro (Gootenberg in sod., 2017; Myhrvold in sod., 2018; Dai in sod., 2019; Broughton in sod., 2020).

CRISPR/Cas sistem je pogosto uporabljen tudi zaradi velike specifičnosti, saj zazna spremembe na nivoju že enega nukleotida in je lahko primeren za analizo

SNP (ang. single nucleotide polymorphism, slo. enojni nukleotidni polimorfizmi), ki jih lahko zaznamo z vnosom spremembe v crRNA zraven SNP in testiranjem vsake tarče s specifično in spremenjeno crRNA (Myhrvold in sod., 2018).



Slika 1: CRISPR/Cas-RT-RPA sistem za pomnoževanje in fluorescentno določanje RNA tarče. Z uporabo Cas12a, crRNA in ssDNA sonde tarčo lahko določimo v 1 uri (Li in sod., 2018).

Veliko prednost pred ostalimi metodami predstavlja tudi uporaba hitre »izolacije«, ki ne potrebuje zahtevne izolacije nukleinskih kislin, ki je velikokrat kritični korak pri določanju patogenov (Myhrvold in sod., 2018). Metoda CRISPR je tako v kombinaciji z RPA, ki ima glede na ostale načine predhodnega pomnoževanja najboljšo občutljivost, in kompatibilnimi hitrimi testi (ang. lateral flow assay, LFA), primerna tudi za uporabo na terenu. Sistem CRISPR/Cas-RPA kljub cenovno ugodni in hitri analizi (1 h) omogoča občutljivo določanje, ki je primerljivo s qPCR (ang. quantitative PCR) in ddPCR (ang. digital-droplet PCR) (Gootenberg et al., 2017).

Preglednica 1: Reprezentativne aplikacije določanja nukleinskih kislin s CRISPR/Cas13 in Cas12 proteini (povzeto po Wang et al., 2020).

Protein	Metoda	Nukleinska kislina	Pomnoževanje	Izotermalnost	Odčitavanje	Občutljivost*	Kvantifikacija	Čas	Prenosljivost	Referenca
Cas 13	SHERLOCK	RNA/DNA	RPA	DA	Fluorescenca	aM	NE	2 - 5 h	DA	Gootenberg in sod., 2017
	SHERLOCK v2	RNA/DNA	RPA	DA	Fluorescenca Kolorimetrični hitri testi	zM	DA	0,5 - 3 h	DA	Gootenberg in sod., 2018
	HUDSON + SHERLOCK	RNA/DNA	RPA	DA	Fluorescenca Kolorimetrični hitri testi	aM	NE	< 2 h	DA	Myhrvold in sod., 2018
Cas 12	DETECTR	DNA	RPA	DA	Fluorescenca	aM	NE	~1 h	DA	Chen in sod., 2018
	HOLMES	DNA/RNA	PCR	NE	Fluorescenca	aM	NE	~1 h	NE	Li in sod., 2018
	E-CRISPR	DNA	/	DA	Elektrokemija	pM	DA	~1 h	DA	Dai in sod., 2019
	HOLMESv2	DNA/RNA	LAMP	DA	Fluorescenca	aM	DA	~1 h	DA	Li in sod., 2019

*aM, ato (10^{-18}) molarno; zM, zepto (10^{-21}) molarno; pM, piko (10^{-15}) molarno

2.1 CRISPR/cas sistemi in viroidi

Viroidi so najmanjši in najenostavnejši rastlinski patogeni (246- 401 nt), ki se hitro širijo, tako med rastlinami istega gostitelja kot tudi med različnimi gostitelji (Flores in sod., 2005). Tako obstaja tveganje, da se zaradi zelo intenzivnega globalnega trgovanja z rastlinskim materialom lahko pojavijo nove viroidne bolezni, ki na nekem gostitelju ne kažejo bolezenskih znamenj, na drugem pa povzročijo pravo epidemijo (Hadidi in sod., 2017).

Viroidi so lahko prisotni v rastlinah, ki ne kažejo bolezenskih znamenj, in so pod mejo detekcije metod, ki so v rutinski uporabi. Optimizacija metod za določanje rastlinskih patogenov, kot so viroidi, je zelo zahtevna, vsaka kombinacija viroid-gostitelj je namreč specifična, prav tako viroidi po rastlini niso homogeno razporejeni, zato je zelo pomembno že samo vzorčenje. Njihova koncentracija se hitro spreminja in je zelo odvisna od vplivov okolja (Malfitano in sod., 2005; Mumford in sod., 2000). Za določanje viroidov v hmelju so najpogosteje v uporabi PAGE, dot-blot in RT-PCR. Omenjene metode omogočajo zanesljivo določanje, vendar so časovno obsežne, občutljive na inhibitorje in zdravju škodljive (Guček in sod., 2017). Za viroide v hmelju je bila nedavno razvita občutljivejša metoda RT-PCR v realnem času (RT-qPCR), ki omogoča sočasno določanje več tarč in kvantifikacijo (Guček, 2020). Zaradi številnih omejitev omenjenih metod velik potencial v diagnostiki viroidov predstavlja uporaba CRISPR sistema v kombinaciji s Cas proteini kot so Cas12a, Cas13a in Cas14 (Chen in sod., 2018;

Gootenberg in sod., 2017; Harrington in sod., 2018) ob predhodni namnožitvi tarče s PCR ali RPA. Metoda CRISPR je bila po naših podatkih za viroide razvita samo za ASSVd v jablani, ki v kombinaciji z RT-RPA omogoča vizualno določanje brez izolacije in drage opreme (Jiao in sod., 2020). ASSVd so določili na osnovi CRISPR/Cas12a-RT-RPA sistema in metodo razvili za določanje štirih virusov pri jablani. Z razvito metodo jim je uspelo določiti viruse in viroid neposredno iz ekstrakta listov v času manj kot ene ure (Jiao in sod., 2020).

3 ZAKLJUČEK

Na področju rastlinske virologije razvoj novih metod za določanje patogenov, zaradi specifičnih interakcij med rastlinami in patogeni, ne poteka tako hitro kot v humani diagnostiki. Pojav in razvoj bolezni rastlin lahko preprečimo oziroma omejimo z uporabo fitofarmaceutskih sredstev, vzgojo odpornih sort in zanesljivo diagnostiko. Obstajajo tudi povzročitelji bolezni kot so virusi in viroidi, ki lahko povzročijo neozdravljive bolezni. Za omejitev širjenja le-teh bolezni je ključna hitra in zanesljiva diagnostika. Ne glede na velik napredek pri določanju rastlinskih patogenov v zadnjih 50. letih, imajo metode, ki so v rutinski uporabi, še vedno številne omejitve, kot so cena, čas, oprema, zahtevno načrtovanje, posledično visoko usposobljen kader in vpliv inhibitorjev, kar pogosto vodi v neustrezne rezultate.

Velik potencial za določanje rastlinskih patogenov, kot so virusi in viroidi, predstavlja uporaba CRISPR sistema, ki omogoča ogromno različnih aplikacij. Do sedaj razvite metode CRISPR sistema se razlikujejo glede na uporabljene Cas proteine, analiziran vzorec (DNA/RNA), vrsto predhodnega pomnoževanja (PCR/RPA/LAMP), način detekcije (fluorescenca/hitri testi/elektrokemija), občutljivost (pM/aM/zM), možnost kvantifikacije, časovni obseg ter možnost uporabe na terenu. Metoda je kljub zelo veliki občutljivosti (aM, 10^{-18}) in specifičnosti, hitra, fleksibilna, robustna in preprosta za uporabo. Zaradi številnih prednosti zato ni nenavadno, da je bil v zadnjih petih letih CRISPR sistem razvit za določanje številnih patogenov, tako v humani kot rastlinski virologiji. V prihodnosti bodo različne aplikacije CRISPR sistema omogočale hitro in zanesljivo določanje rastlinskih patogenov in bodo znatno pripomogli k izboljšani sliki trajnostnega kmetijstva v svetu.

Zahvala. Avtorica se za finančno podporo zahvaljujem Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077).

4 VIRI

- Aman, R., Mahas, A., Marsic, T., Hassan, N., Mahfouz, M.M. "Efficient, Rapid, and Sensitive Detection of Plant RNA Viruses With One-Pot RT-RPA-CRISPR/Cas12a Assay." *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610872>.
- Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G., et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020; 38(7): 870-874. doi:10.1038/s41587-020-0513-4
- Chen, J. in Doudna, J. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nat Rev Chem* 1. 2017; 0078. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0078>
- Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Tian, X., Doudna, J.A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes single-stranded DNase activity. *bioRxiv*. 2018; 1-5. doi:10.1101/226993
- Dai, Y., Somoza, R.A., Wang, L., et al. Exploring the Trans-Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the Development of a Universal Electrochemical Biosensor. *Angew Chemie - Int Ed*. 2019; 58(48): 17399-17405. doi:10.1002/anie.201910772
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A. E., Daròs, J. A., Di Serio, F. "Viroids and viroid-host interactions." *Annual Review of Phytopathology*. 2005; 43: 117-139.
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* (80-). 2017; 356(6336): 438-442. doi:10.1126/science.aam9321
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Kellner, M.J., Joung, J., Collins, J.J., Zhang, F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018; 360(6387), 439–444.
- Guček, T., Trdan, S., Jakše, J., Javornik, B., Matoušek, J., Radišek, S. Diagnostic techniques for viroids. *Plant Pathology*. 2017; 66(3): 339-358, doi: 10.1111/ppa.12624.
- Guček, T. *Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju : doktorska disertacija = Biology of citrus bark cracking viroid (CBCVd) and development of methods for detection of viroids in hop : doctoral dissertation*. 2020. Ljubljana: [T. Guček], XIV, 139 str., [33] str. pril., ilustr. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=121584>.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J. *Viroids*. CSIRO Publishing, 2003, Collingwood, Australia.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P. *Viroids and Satellites*. Academic Press. 2017.
- Hammond, R.W. in Zhang, S. 2016. Development of a rapid diagnostic assay for the detection of tomato chlorotic dwarf viroid based on isothermal reverse-transcription-recombinase polymerase amplification. *J Virol Methods*. 236:62-67. doi:10.1016/j.jviromet.2016.06.013
- Harrington, L.B., Burstein, D., Chen, J.S., et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*. (80-). 2018;362(6416): 839-842. doi:10.1126/science.aav4294
- IHPS. 2020. Končno poročilo s področja strokovnih nalog zdravstvenega varstva rastlin za leto 2019. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (Žalec).
- Ivanov, A. V., Shmyglya, I. V., Zherdev, A. V., Dzantiev, B.B., Safenkova, I. V. The challenge for rapid detection of high-structured circular rna: Assay of potato spindle tuber viroid based on recombinase polymerase amplification and lateral flow tests. *Plants*. 2020; 9(10): 1-11. doi:10.3390/plants9101369

- Jakše, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matoušek, J., Javornik, B. "Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVD) as a highly aggressive pathogen on hop." *Plant Pathology*, 2015; 64(4): 831-842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>.
- Jiao, J., Kong, K., Han, J., et al. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant Biotechnol J.* 2020; Published online:1-12. doi:10.1111/pbi.13474
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. A. Programmable Dual-RNA – Guided. *Science*, 2012; 337: 816-822.
- Kappagantu, M., Villamor, D.E. V., Bullock, J.M., Eastwell, K.C. A rapid isothermal assay for the detection of Hop stunt viroid in hop plants (*Humulus lupulus*), and its application in disease surveys. *J Virol Methods.* 2017; 245: 81-85. doi:10.1016/j.jviromet.2017.04.002
- Lee, H.J., Kim, H.J., Lee, K., Jeong, R.D. Rapid detection of peach latent mosaic viroid by reverse transcription recombinase polymerase amplification. *Mol Cell Probes.* 2020; 53(May): 101627. doi:10.1016/j.mcp.2020.101627
- Li, S.Y., Cheng, Q.X., Li, X.Y., et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov.* 2018; 4(1): 18-21. doi:10.1038/s41421-018-0028-z
- Li, L., Li, S., Wu, N., Wu, J., Wang, G., Zhao, G., Wang, J., HOLMESv2: a CRISPR-cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synth. Biol.* 2019; (10): 2228–2237.
- Mahas, A., Hassan, N., Aman, R., et al. Lamp-coupled crispr–cas12a module for rapid and sensitive detection of plant dna viruses. *Viruses.* 2021; 13(3). doi:10.3390/v13030466.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N., Alioto D. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology.* 2005; 87: 115-121.
- Mumford R.A., Walsh K., Boonham N. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2000; 30: 431-435.
- Myhrvold, C., Freije, C.A., Gootenberg, J.S., et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80-). 2018.; 360(6387): 444-448. doi:10.1126/science.aas8836
- Narayanasamy P. Detection of Viruses and Viroid Pathogens in Plants, *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Viral and Viroid Pathogens*, 2011;. 3: 7-220.
- Sundaresan, R., Parameshwaran, H.P., Yogesha, S.D., Keilbarth, M.W., Rajan, R. RNA-Independent DNA Cleavage Activities of Cas9 and Cas12a. *Cell Rep.* 2017; 21(13): 3728-3739. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.100
- Wang, M., Zhang, R., Li, J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. *Biosens Bioelectron.* 2020;165(July):112430. doi:10.1016/j.bios.2020.112430

RASTLINSKI VIRUSI IN VIROIDI V VODI

Maja DOBRAJC¹, Jernej JAKŠE² in Sebastjan RADIŠEK³

Pregledni članek / review paper

Prispelo / received: 21. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 22. 12. 2021

Izvleček

Neoporečnost vode za uporabo v kmetijstvu v zadnjih desetletjih ogrožajo negativni okoljski vplivi, med katere uvrščamo tudi kontaminiranost z rastlinskimi patogeni. Vse težji dostop in pomanjkanje vode sta vodila v spremembe načinov pridelave rastlin za namen prehrane. Uveljavljajo se namakalni sistemi, hidroponska vzgoja, vzgoja rastlin brez substratov ter številne druge, pri čemer se uporabljajo vodni viri kot so potoki, reke, jezera ali pa sistemi kroženja hranilne raztopine za namen pridelave rastlin. Takšni vodni viri so pogosto pot prenosa rastlinskih patogenov, kot so rastlinski virusi in viroidi, ki lahko povzročajo izpad pridelka. Rastlinski virusi in viroidi so v vodnih sistemih pogosto prisotni v nizkih koncentracijah, kar otežuje njihovo zaznavanje z običajnimi tehnikami. Tako so se tekom tehnološkega in znanstvenega napredka razvile občutljivejše in specifične diagnostične metode detekcije virusov in viroidov v vodi, ki omogočajo kontrolo in s tem tudi preprečevanje širjenja z vodnimi sistemi.

Ključne besede: detekcija, prenos z vodo, rastlinski virusi, viroidi

PLANT VIRUSES AND VIROIDS IN WATER

Abstract

In recent decades water quality is threatened by different environmental impacts, like contamination with plant pathogens. Because of harder water access and water scarcity, crop production in soilless cultures, using closed or open hydroponic systems, has been increasing worldwide. Those types of crop production can be sourced from surface water supplies such as ponds, lakes, rivers, and reservoirs and, as such, can harbour diseasecausing microorganisms, including several plant viruses and viroids, which causes many symptoms on plants and leads to production loss. Water contamination with plant pathogens is difficult to detect and

¹ mag. biol. in ekol. z naravovar., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: maja.dobrajc@ihps.si

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

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

confirm without efficient diagnostic methods, so with technological and scientific diagnostic methods would plant production be more controlled and efficient.

Key words: detection, plant viruses, transmission with water, viroids

1 UVOD

Kvaliteta vode je vse bolj podvržena vplivom globalnega segrevanja, suše in onesnaževanja. Proučevanje prisotnosti in prenosa virusov v vodi je aktivno prisotno že 50 let, vendar je bilo v preteklosti posvečeno predvsem patogenom, ki negativno vplivajo na zdravje ljudi. Zavedanje, da je pri prisotnosti in prenosu rastlinskih virusov posredno ogroženo tudi zdravje in kvaliteta življenja ljudi, je pri raziskovalcih in širši množici prisotno le krajši čas (Gosalves in sod., 2003). Rastlinski virusi in viroidi so prisotni v morju, jezerih, rekah, potokih, namakalnih in drenažnih vodah, izviri in podtalnih vodah (Panayotou in sod., 1997). Prisotnost rastlinskih patogenov v vodah je pomemben dejavnik onesnaženja in povzročja njihovo razširjanje med kmetijskimi površinami, kar lahko privede do večjih ekonomskih izgub in pojava novih gostiteljev (Erdiller in sod., 1994). Kontrola nadzora nad patogeni v vodah bi tako morala obsegati predvsem vodne vire, namakalne sisteme, vode pri pridelavi rastlin brez tal in hranilne raztopine za hidroponsko vzgojo rastlin, kjer lahko voda predstavlja glavni vir kontaminacije (Sevik, 2011). Z vodotoki se lahko rastlinski virusi razširjajo na daljše razdalje in okužijo večje število pridelovalnih površin. Prisotnost virusov *Tobacco mosaic virus* (TMV) in *Cucumber mosaic virus* (CMV) so dokazali v vodnih vzorcih Donave in Save, ki so bile vir namakanja za okoliške pridelovalne površine (Tosic in Tosic, 1984). V vodnih vzorcih na območju Ankare so dokazali prisotnost virusov *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Erdiller, 1994). V Sloveniji so med letoma 2004 in 2006 vzorčili gramoznice iz rastlinjakov, v katerih so bile okužene rastline ter zaznali prisotnost virusa ToMV (*Tomato mosaic virus*) (Boben in sod., 2007). Koncentracija virusov v vodah je lahko zelo nizka, kljub temu pa je njihova infektivnost za okužbo rastlin visoka, zato jih je brez prehodnega koncentriranja težko zaznati (Mehle in Ravnikar, 2012), kar velja tudi za viroide (Ruščič in sod., 2013). Kontaminacija vode z virusi in viroidi je problematična, v kolikor le-ti okužijo rastline, na katerih se pojavijo bolezenska znamenja in zaradi katerih se zmanjša kvaliteta in količina pridelka. V celotnem procesu od kontaminacije vira do pojava bolezenskih znamenj je najpomembnejša sposobnost infektivnosti patogena, ki jo dokazujemo z mehansko okužbo gostiteljskih rastlin in tudi potencialnih novih gostiteljev. Biološki testi so bili v preteklosti ključni za detekcijo in determinacijo rastlinskih patogenov, danes pa se glede na vrsto patogenov uporabljajo številne serološke in molekularne metode (Legrand, 2015). Najpogosteje uporabljena serološka metoda v diagnostiki rastlinskih virusov je *ELISA* (angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test (Clark in Adams, 1977).

Med občutljive in specifične molekularne metode za diagnostiko rastlinskih virusov in viroidov pa uvrščamo kot najpogosteje uporabljene metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR) za DNA viruse ter reverzno transkripcijo s PCR za RNA viruse in viroide (RT-PCR) (Candresse in sod., 1998).

2 ZNAČILNOSTI RASTLINSKIH VIRUSOV IN VIROIDOV

2.1 Rastlinski virusi

Rastlinski virusi sodijo v skupino najmanjših patogenov, ki povzročajo bolezenska stanja na rastlinah. Viruse sestavljajo nukleinske kisline v obliki DNA ali RNA, obdane s kapsido, redkeje tudi z lipidno ovojnico. Najpogosteje so nitaste, paličaste, izometrične ali bacilaste oblike, velikosti od 18–1000 nm (ICTV, 2012). Virusi imajo različne spektre gostiteljev, saj nekatere vrste okužujejo le posamezno rastlinsko vrsto, spet drugi imajo številne vrste gostiteljev. V gostitelja vstopijo skozi rane ali preko vektorjev. Prenos najpogosteje poteka z vegetativnim razmnoževanjem, cvetnim prahom, s semeni, mehansko in z vektorji. Na rastlinah povzročajo ekonomsko škodo v obliki zmanjšanja kvalitete in kvantitete pridelka, manjše kaljivosti semen, rasti sejancev in mladih rastlin, slabšega klitja. Bolezenska znamenja, rast in razvoj rastlin so odvisni od seva in vrste virusa, sorte, starosti in kondicijskega stanja samega gostitelja ter časa izpostavljenosti okužbi (Hull, 2009). Bolezenska znamenja se lahko pojavijo lokalno ali sistemsko in so izražena kot mozaični vzorci na listih, klorotične in nekrotične lezije, rumenenje, razbarvanost v obliki črt in prog, vihanje listov, zaostanek v rasti, spremenjena zgradba plodov, tumorji (Gergerich in Dolja, 2006). Za zatiranje bolezní, ki jih povzročajo rastlinski virusi, na tržišču ni pripravkov, zato njihovo zatiranje temelji na uporabi zdravega sadilnega materiala, zatiranju vektorjev, sajenju odpornih sort in uničevanju okuženih rastlin (Viršček Marn, 2016).

2.2 Viroidi

Viroidi so najmanjši znani povzročitelji bolezní na rastlinah. So krožne molekule RNA z izrazito sekundarno strukturo z dolžino 246–401 baznih parov, ki ne kodirajo peptidov ali proteinov (Flores in sod., 2005). Izvor viroidov je še vedno nepojasnen, zanimivo pa je, da so agresivni bolezenski izbruhi, za katere so kasneje kot povzročitelje potrdili viroide, opisani šele v 20. stoletju. Kljub temu obstajajo posredni dokazi, da so bile nekatere viroidne bolezní prisotne že pred tisočletji, in da viroidi predstavljajo celo žive fosile prvih RNA molekul (Bar Joseph, 2003; Di Serio in sod., 2017). Večina danes poznanih viroidov povzroča bolezní na ekonomsko pomembnih kmetijskih in okrasnih rastlinah, ki jim je skupno predvsem vegetativno razmnoževanje (Kovalskaya in Hammond, 2014). Patogeneza viroidov je kompleksen fenomen, saj se lahko različni viroidi na istem gostitelju izrazijo latentno ali s številnimi bolezenskimi znamenji. Okužene rastline

imajo pogosto zavrto rast, pojavlja se rumenenje in vihanje listov, deformacija in zaostala rast cvetov in sadežev ter trohnenje koreninskega sistema (Kovalskaya in Hammond, 2014). Bolezenska znamenja so posledica interakcije med viroidom, gostiteljem in okoljem (Ding in Itaya, 2007). Hitro širjenje viroidne okužbe preprečuje popolno uničenje nadzemnih in podzemnih delov okuženih rastlin, razkruževanje delovnih strojev in opreme, redno pregledovanje nasadov in nadzirano gojenje zdravega matičnega rastlinskega materiala (Hammond in Owens, 2006; Radišek in sod., 2017).

3 VIRUSI IN VIROIDI V VODAH

3.1 Izvor in prisotnost v okoljskih vodah

Za rastlinske patogene, kot so virusi in viroidi, je znano, da se v okoljske vode sproščajo iz poškodovanih ali razpadajočih korenin okuženih rastlin, posledično lahko tudi iz komposta (Yarwood, 1960; Mehle in sod., 2017). Za številne rastlinske viruse, ki okužujejo gojene rastline v hidroponskih sistemih, je znano njihovo sproščanje v hranilno raztopino iz živega koreninskega sistema (Koenig, 1986). Končni cilj kanalizacijskih in drenažnih vod so pogosto potoki, reke, jezera in morja, kamor se skupaj z odpadno vodo stekajo tudi številni rastlinski patogeni, s tem pa se širi pot prenosa (Koenig in sod., 1988). Med prvimi je viruse v okoljskih vodah proučeval Yarwood in leta 1960 dokazal prisotnost virusov Tobacco necrosis virus (TNV) in Tobacco mosaic virus (TMV) v drenažnih vodah. Virus sta se v drenažne vode izločala iz korenin okuženih rastlin trnate kleome (*Cleome spinosa*) in tobaka (*Nicotiana tabacum*) (Yarwood, 1960). V zadnjih dvajsetih letih pa se število raziskav na področju prenosa rastlinskih virusov z vodo povečuje, v kanalih, rekah, jezerih, vodotokih, ribnikih in oceanih so zasledili rastlinske viruse iz vsaj sedem različnih rodov, med drugimi rodove (Carmoviruses, Cucumoviruses, Diathoviruses, Tobamoviruses, Necroviruses, Potexviruses in Tombusviruses) (Mehle in Ravnikar, 2012). Kljub temu, da so virusi in viroidi v vodah prisotni v nizkih koncentracijah, so stabilni, kar jim omogoča uspešno okužbo rastlin. Mehle in sod. (2014) so dokazali kontaminacijo vode z virusom Potato virus Y (PVY) in viroidom Potato spindle tuber viroid (PSTVd), pri čemer imata patogena večji vpliv v hidroponskih sistemih, kjer kontaminirana hranilna raztopina kroži v sistemu in so s tem gojene rastline kontinuirano podvržene prisotnosti patogena, zato je možnost okužbe povečana.

3.2 Preživetje virusov in viroidov v vodi

Za večino rastlinskih virusov, ki so jih zaznali v okoljskih vodah kot so ToMV, TMV, Tomato bushy stunt virus (TBSV), Carnation mottle virus (CaRMV), velja visoka stabilnost. In vitro so virusi stabilni kar 50–3000 ur (Burt in sod., 1996). Za virus TNV je znano, da je stabilnejši v vlažnem kot v suhem okolju (Yarwood,

1960). Poleg stabilnosti virusov in viroidov je pomembna tudi njihova infektivnost. Pares in sod. (1992) so zaznali, da virusa ToMV in Pepper mild mottle virus (PMMoV) v hranilni raztopini ohranita infektivnost do šest mesecev. Za virus Pepino mosaic virus (PepMV) so Prezelj in sod. (2009) dokazali stabilnost do treh tednov pri temperaturi 20°C. Mehle in sod. (2014) so dokazali preživetje virusa PVYNTN kar deset tednov. Za viroide je značilna izrazita sekundarna struktura RNA krožne molekule, zato se zanje predvideva visoka stabilnost v vodnih okoljih (Ruščić in sod., 2013).

3.3 Prenos z vodo v kmetijstvu

Rastlinski virusi in viroidi, ki se sproščajo v okoljske vode, se lahko razširjajo na daljše razdalje (Castello in sod., 1995), k temu pa doprinesejo tudi nekatere kmetijske dejavnosti, kot so namakalni sistemi in hranilne raztopine (Park in sod., 1999). Prisotnost teh patogenov ima velik pomen, v kolikor kontaminiranost vode povzroči tudi okužbo samih rastlin. Semena fižola pred sejanjem namakajo v vodi, pri čemer sta Teakle in Morris (1981) ugotovila, da iz semen, namočenih v vodi, kontaminirani z virusom *Southern bean mosaic virus* (SBMV), zrastejo okužene rastline. Virusi pa lahko iz kontaminiranih vodnih matriksov v rastline vstopijo skozi njihov koreninski sistem. Prenos virusov iz vode v rastline je učinkovitejši, v kolikor imajo rastline poškodovane koreninske laske ali koreninski sistem zaradi same rasti (Koenig, 1986). Okužba poganjkov pa je odvisna od koncentracije patogenov v vodi in uspešnosti okužbe, kar so potrdili pri virusu ToMV (Pares in sod., 1992). Prenos z namakalno vodo je opisala Koenig (1988) na primeru virusa nekroze in rumenih žil pese (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYVV). Širjenje rastlinskih virusov v hidroponskih sistemih so dokazali Büttner in sod. (2008) kot so virus pegavosti in uvelosti paradižnika (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV), virus mozaika repnjaka (*Arabidopsis mosaic virus*; ArMV), virus kodravosti listov pelargonije (*Pelargonium leaf curl virus*; PLCV) in virus linijskega vzorca pelargonije (*Pelargonium line pattern virus*; PLPV). Zaradi kroženja hranilne raztopine v hidroponskem sistemu je s tem lahko ogrožena celotna pridelava.

4 DOLOČANJE VIRUSOV IN VIROIDOV V VODI

4.1 Metode koncentriranja in izolacije

Izolacija nukleinskih kislin je prva stopnja determinacije prisotnega patogena v vzorcu. Pri vodi je izolacija odvisna od tipa vodnega vzorca. Pri virusih, ki so prisotni v nizkih koncentracijah, kot so na primer enterični virusi, tipična izolacija poteka z uporabo adsorpcijsko-elucijskih metod z elektronegativnimi membranskimi filtri, ki jih pogosto spremlja tudi koncentriranje eluata s PEG precipitacijo ali s centrifugiranjem. Alternativna metoda je tudi čiščenje nukleinskih kislin direktno z metodo elektronegativnih membranskih filtrov,

uporabljenih v adsorpcijsko-elucijskih metodah. Koncentriranje s centrifugalnimi filtri se prav tako uporablja kot direktna metoda pri koncentriranju manjših volumnov (manj kot 20 ml) pri vodnih vzorcih, ki imajo visoke koncentracije patogenov. Za viruse, ki so prisotni v večjih volumnih (več kot 30 l), kot je testiranje podtalnice in pitne vode, so v uporabi postopki koncentriranja z Nanoceram filtri, filtri iz steklene volne, celulozno-estrski filtri in ultrafiltri z votlimi vlakni (Symonds in sod., 2018). Opisane metode koncentracije rastlinskih patogenov iz vodnih vzorcev so dolgotrajne, z visokimi finančnimi vložki, zato je v zadnjem času najpogosteje v uporabi učinkovitejša metoda monolitnih kromatografskim nosilcev (CIM). Metoda CIM temelji na vezavi virusa na monolitski kromatografski nosilec, ki se eluira s pufrom, le-ta pa vsebuje visoko koncentracijo soli (Branović in sod., 2003). S CIM metodo so uspešno koncentrirali virus ToMV (Boben in sod., 2007), PVY (Rupar in sod., 2013) in viroid PSTVd (Rušić in sod., 2013) iz različnih tipov vodnih vzorcev. Po koncentriranju rastlinskih patogenov je nato možna določitev le-teh z različnimi metodami. Za izolacijo RNA virusov in viroidov iz vodnih matriksov so v uporabi različni komercialni kompleti. Rutjes in sod. (2005) so primerjali dve izolacijski metodi pri izolaciji RNA iz velikih volumnov vodnih vzorcev. Ugotovili so, da je konvencionalna metoda, ki vsebuje korake ultrafiltracije, dvofazne separacije in gelsko kromatografijo, manj občutljiva in zanesljiva kot metoda izolacije s komercialnim kitom, pri kateri je izplen RNA večji, prav tako pa med postopkom odstrani možne inhibitorje. S komercialno metodo izolacije so uspeli detektirati le dva od petih pozitivnih vzorcev, pri čemer so z metodo s komercialnim kitom detektirali štiri od petih pozitivnih vzorcev.

4.2 Metode detekcije

Biološki testi temeljijo na sposobnosti indikatorskih rastlin, da se po umetni mehanski inokulaciji ali cepljenju z določenim patogenom, razvijejo značilna bolezenska znamenja. Uporabljajo se za namen detekcije rastlinskih patogenov, predvsem virusov in viroidov. V preteklosti so bili biološki testi ključnega pomena za detekcijo rastlinskih patogenov, zaradi nespecifičnosti pa jih izpodrivajo drugi laboratorijski testi in metode (Legrand, 2015). Kljub temu pa imajo dandanes biološki testi še vedno velik pomen pri detekciji novih sevov patogenov in odzivu indikatorskih rastlin, ki jih z modernimi metodami ni mogoče potrditi (EPPO, 2006). Uspešnost inokulacije in razvoja okužbe gostitelja je odvisna od stabilnosti in koncentracije patogena, občutljivosti gostiteljske rastline in okoljskih razmer (Legrand, 2015). Rastlinske viruse so v vodah po koncentriranju dokazovali z mehansko okužbo testnih rastlin (Pleše in sod., 1996), ki so pogosto pripomogle tudi namnoževanju virusa za poznejšo analizo z drugimi specifičnimi testi (Koenig in sod., 2004). Medtem, ko je bila pred časom najbolj razširjena metoda za detekcijo DNA virusov metoda ELISA, jo danes že izpodrivajo molekularne metode, ki omogočajo določevanje prisotnosti nukleinskih kislin, kar pa je

skupnega zgradbi virusov in viroidov. Med temi se za zaznavanje virusov v vodi uporabljajo predvsem metode na osnovi PCR tehnik. Tako so Gosalves in sod. (2003) za namen detekcije virusa Melon necrotic spot virus (MNSV) v rastlinah, namakalnih vodah in hidroponski hranilni raztopini razvili metodo reverzne transkripcije verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR), ki je virus zaznal pri nižjih koncentracijah kot serološka metoda ELISA. Podobno so Castello in sod. (1999) z RT-PCR in z določanjem nukleotidnega zaporedja produktov PCR dokazali prisotnost virusa ToMV v oblakih, megli in ledu. Zelo pomembno raziskavo so izvedli tudi slovenski raziskovalci, ki so na osnovi koncentriranja vodnih vzorcev s pomočjo monolitnih kromatografskih kolon in RT-qPCR razvili metodo za zaznavanje Pepino mosaic virusa (PepMV) and Potato spindle tuber viroida (PSTVd) (Mehle in sod., 2017).

5 SKLEPI

V različnih okoljskih vodah, kot so drenažne vode, reke, potoki, jezera in oceani so identificirali številne stabilne rastlinske viruse, ki so se ohranjali zunaj živih celic dlje časa in okužujejo širši spekter gostiteljev. V okoljske vode se sproščajo skozi poškodovan koreninski sistem ali iz razpadajočih organskih ostankov rastlin, prav te vode pa so pogost vir namakalnih sistemov. Kontaminacija vode z rastlinskimi patogeni predstavlja pomembno pot prenosa na večje razdalje, povečuje možnost razširjanja okužbe na širšem področju pridelovalnih površin, kar lahko privede do novih, do sedaj neznanih gostiteljev za posamezni rastlinski patogen. Širjenje okužbe z vodo je mogoče tudi v primeru zaprtih vodnih sistemov, kot je hidroponika, kjer lahko vir okužbe predstavlja vnos okuženih sadik, s katerimi se lahko virusi in viroidi sproščajo v hranilno raztopino. Velik izziv predstavlja tudi detekcija, saj so koncentracije virusov in viroidov v vodnih sistemih izredno nizke. Pri tem ovire premagujemo z metodami koncentriranja, novimi metodami izolacije, predvsem pa s tehnikami molekularnih metod (PCR tehnike), ki jih odlikuje visoka stopnja občutljivosti.

6 VIRI

- Bar Joseph, M. (2003). Natural history of viroids – horticultural aspects. V: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Semancik, J. S. (ur.). Viroids (str. 246–251). CSIRO Publishing, Australia.
- Boben, J., Kramberger, P., Petrovic, N., Cankar, K., Peterka, M., Trancar, A.S., Ravnikar, M. (2007). Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. Eur. J. Plant Pathology, 118:59–71.
- Branovič, K., Forcic, D., Ivancic, J., Strancar, A., Barut, M., Kosutic-Gulija, T., Zgorelec, R., Mazuran, R. (2003). Application of short monolithic columns for improved detection of viruses. Journal of Virological Methods, 110:163–171.

- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J. (1996). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.'
- Büttner, C., Bandte, M., Echevarria Laza, H.J., Paschek, C., Ulrichs, D., Schwarz, D., Pestemer, W. (2008). Transmission of viruses in soilless cultivation systems. V: 9th International Congress of Plant Pathology, Turin 24-28th August: 1 str.
- Candresse, T., Hammond, R.W., Hadidi, A. (1998). Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reactions (PCR). V: Hadidi, A., Khetrpl, R.K., Koganezawa, H. (ur.). Plant virus disease control (str. 409–410). St. Paul, APS Press.
- Castello, J.D., Lakshman, D.K., Tavantzis, S.M., Rogers, S.O., Bachand, G.D., Jagels, R., Charlisle, J., Liu, Y. (1995). Detection of infectious Tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology*, 85:1409–1412.
- Clark, M.F. in Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34:475–483.
- Di Serio, F., Navarro, B., Flores, R. (2017). Origin and Evolution of Viroids. V: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Palukaitis, P. (ur.). *Viroids and Satellites* (str. 125–134). Academic Press, UK.
- Ding, B., Itaya, A. (2007). Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *The American Phytopathological Society*, 20 (1):7–20.
- EPPO (2006). Post-entry quarantine for potato. *Phytosanitary procedures PM 3/21(2)*, pp. 19. EPPO, Paris (FR).
- Erdiller, G. in Akbas, B. (1994). Plant viruses in Ankara rivers and lakes. *Journal of Turkish Phytopathology*, 23:119–126.
- Flores, R., Hernandez, C., de Alba, A. E. M., Daros, J. A., Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid–host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43:117–139.
- Gergerich, R.C. in Dolja, V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*, APS.
- Gosalves, B., Navarro, J.A., Lorca, A., Botella, F., Sanchez-Pina, M.A., Pallas, V. (2003). Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*, 113:87–93.
- Hammond, R. W. in Owens, R. A. (2006). Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. *The American Phytopathological Society*.
- Hull, R. (2009). *Comperative plant virology*, second edition. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA, San Diego, California, USA, London, UK.
- ICTV (2012). *Virus taxonomy*. Elsevier Academic Press, 1–1327.
- Koenig, R. (1986). Plant viruses in rivers and lakes. *Advances in Virus Research*, 31:321–333.
- Koenig, R., Lesemann, D.E., Burgermeister, W. (1988). Isolation of Carnation ringspot virus from a canal near a sewage plant cDNA Hybridization analysis, serology and cytopathology. *Journal of Phytopathology*, 121:346–356.
- Koenig, R., Pfeilstetter, E., Kegler, H., Lesemann, D.E. (2004). Isolation of two strains of a new Tombusvirus (Havel river virus, HaRV) from surface waters in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 110:429–433.
- Kovalskaya, N. in Hammond, R. W. (2014). Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science*, 228:48–60.

- Legrand, P. (2015). Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: a review. *Bulletin*, 45 (2):240–251.
- Mehle, N. in Ravnikar, M. (2012). Plant viruses in aqueous environment: survival, water mediated transmission and detection. *Water Research*, 46, 16:4902–4917.
- Mehle, N., Gutierrez-Aguirre, I., Prezelj, N., Delić, D., Vidic, U., Ravnikar, M. (2014). Survival and Transmission of Potato Virus Y, Pepino Mosaic Virus, and Potato Spindle Tuber Viroid in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:1455–1462.
- Mehle, N., Kogovšek, P., Rački, N., Jakomin, T., Gutierrez-Aguirre, I., Kramberger, P., Ravnikar, M. (2017). Filling the gaps in diagnostics of Pepino mosaic virus and Potato spindle tuber viroid in water and tomato seeds and leaves. *Plant Pathology*, 66:1191–1201.
- Panayotou, P.C. (1997). Water-borne plant viruses: National Agricultural Research Foundation, Heraklion, Crete. *Hellenic Virology*, 2:18–30.
- Pares, R.D., Gunn, L.V., Cresswell, G.C. (1992). Tomato mosaic virus infection in a recirculating nutrient solution. *Journal of Phytopathology*, 135, 3:192–198.
- Park, W.M., Lee, G.P., Ryu, K.H., Park, K.W. (1999). Transmission of Tobacco mosaic virus in recirculating hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 79:217–226.
- Pleše, N., Juretić, N., Mamula, D., Polak, Z., Krajačić, M. (1996). Plant viruses in soil and water of forest ecosystems in Croatia. *Horn, Austria, Phytion*, 36, 1:135–143.
- Prezelj, N., Delić, D., Gutierrez-Aguirre, I., Tušek-Žnidarič, M., Mehle, N., Ravnikar, M. (2009). Preživetje in infektivnost virusa mozaika pepina (PepMV) v vodnem okolju. V: Maček, J. Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. (ur.) (457-460). Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije.
- Radišek, S., Guček, T., Leskošek, G., Benko Beloglavec, A., Jakše, J., Javornik, B. (2017). Huda viroidna zakrnelost hmelja. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec.
- Riley, M.R., Gerba, C.P., Elimelech, M. (2011). Biological approaches for addressing the grand challenge of providing access to clean drinking water. *Journal of Biological Engineering*, 5 (2):1–10.
- Rupar, M., Ravnikar, M., Tušek-Žnidarič, M., Kramberger, P., Glais, L., Gutierrez-Aguirre, I. (2013). Fast purification of the filamentous Potato virus Y using monolithic chromatographic supports. *Journal of Chromatography, A*, 1272:33–40.
- Ruščić, J., Gutierrez-Aguirre, I., Urbas, L., Kramberger, P., Mehle, N., Škorić, D., Barut, M., Ravnikar, M., Krajačić, M. (2013). A novel application of methacrylate based short monolithic columns: concentrating Potato spindle tuber viroid from water samples. *Journal of Chromatography, A*, 1274:129–136.
- Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H.H.J.L., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M. (2005). Isolation and Detection of Enterovirus RNA from Large-Volume Water Samples by Using the NucliSens miniMAG System and Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Applied Environmental Microbiology*, 71(7):3734–3740.
- Sevik, M.A. (2011). Water Pollution: Water-Borne Plant Viruses. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1):40–47.
- Symonds, E.M., Karena, H., Nguyen, H., Harwood, V.J., Breitbart, M. (2018). Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. *Water research*, 144:1–12.

- Teakle, D.S., Morris, T.J. (1981). Transmission of Southern bean mosaic virus from soil to bean seeds. *Plant Diseases*, 65:599–600.
- Tosic, M. in Tosic, D. (1984). Occurrence of Tobacco Mosaic virus in water of the Danube and Sava Rivers. *Journal of Phytopathology*, 110:200–202.
- Viršček Marn, M. (2016). Predstavitev rastlinskih virusov. V: Mavrič Pleško, I. (ur.) *Rastlinski virusi in njihovo poimenovanje* (str. 13–18.). Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana.
- Yarwood, C.E. (1960). Release and preservation of virus by roots. *Phytopathology*, 50:111–114.

DOLOČANJE VSEBNOSTI KANABINOIDOV V KOMERCIALNIH VZORCIH KONOPLJINIHL OLJ

Jan Jurij ERŽEN¹, Anita KRANČIČ² in Ivan PLANTAN³

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 24. 11. 2021

Izvleček

V članku je predstavljena raziskava, v okviru katere smo preiskovali nivoje vsebnosti kanabinoidov v komercialno dostopnih izdelkih olj, izdelanih iz konopljinih semen. Analizirali smo 12 različnih konopljinih olj in v njih določali vsebnosti kanabivarina (CBDV), tetrahidrokanabivarina (THCV), kanabidiola (CBD), kanabikromena (CBC), tetrahidrokanabinola (d9-THC) ter kanabigerola (CBG). Analize smo izvedli s plinsko kromatografijo v povezavi z masno selektivnim detektorjem, pri čemer smo določili mejo kvantifikacije (QL) metode 2,1 ppm ter mejo detekcije (DL) 0,7 ppm. Vsebnosti preiskovanih kanabinoidov so se med vzorci zelo razlikovale, pri čemer je najbolj izstopal CBD. Največ pozornosti smo zaradi njegove psihoaktivne narave in omejitev namenili rezultatom vsebnosti d9-THC. V konopljinih oljih se sicer večino d9-THC nahaja v njegovi kislinski obliki (d9-THCA), ki nima enakega farmakološkega oziroma toksikološkega učinka, kljub temu pa je potrebno upoštevati njegovo skupno vsebnost, v katero sta zajeti obe obliki (d9-THC + d9-THCA). Dobljene rezultate smo primerjali s smernicami, znotraj katerih v Sloveniji Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) omejuje skupno dovoljeno količino d9-THC v prehranskih izdelkih iz konoplje in ugotovili, da le četrtnina izdelkov ustreza trenutno predpisanim smernicam.

Ključne besede: konopljino olje, kanabinoidi, tetrahidrokanabinol, plinska kromatografija, masno selektivni detektor.

¹ Mag. ing. agr., SFP d.o.o., Medenska cesta 4a, 1000 Ljubljana, e-naslov: jurij@spectralfingerprints.com

² Univ. dipl. kem., isti naslov, e-naslov: info@spectralfingerprints.com

³ Dr., mag. farm., isti naslov, e-naslov: ivan@spectralfingerprints.com

DETERMINATION OF CONTENT OF CANNABINOIDS IN COMMERCIAL SAMPLES OF CANNABIS OILS

Abstract

The article presents a study in which we investigated the levels of cannabinoids in commercially available oil products made from hemp seeds. We analyzed 12 different hemp oils and determined the contents of cannabivarin (CBDV), tetrahydrocannabivarin (THCV), cannabidiol (CBD), cannabichromen (CBC), tetrahydrocannabinol (d9-THC) and cannabigerol (CBG). The analyzes were performed by gas chromatography coupled with a mass-selective detector with determined quantification (QL) and detection (DL) limits at 2.1 ppm and 0.7 ppm, respectively. The contents of the investigated cannabinoids varied greatly between the samples, with CBD standing out the most. Due to its psychoactive nature and limitations, most attention was paid to the results of d9-THC content. In hemp oils, most tetrahydrocannabinol is found in its acid form (d9-THCA), which does not have the same pharmacological or toxicological effects, but it is still necessary to take into account its total value, which consists of both forms (d9-THC + d9-THCA). The obtained results were compared with the Slovenian recommended guidelines within which the National Institute of Public Health (NIJZ) limits the total amount of tetrahydrocannabinol in cannabis food products and it was found that only a quarter of the products meet the currently prescribed guidelines.

Key words: hemp oil, cannabinoids, tetrahydrocannabinol, gas chromatography, mass selective detector.

1 UVOD

Konoplja nas skozi zgodovino že tisočletja spremlja kot prehranska, tekstilna in zdravilna rastlina. Znano je, da je v času kitajskih cesarjev 2700 pr.n.š. imela močno vlogo v vsakdanjem življenju, kar kažejo najdbe ohranjenih socvetij in semen konoplje v grobnicah na Kitajskem (Russo in sod., 2008).

V Evropi konopljo tradicionalno poznamo predvsem v tekstilnem in prehranskem pomenu, kjer je kultura gojenja za steblo, vlakna in seme prisotna že več stoletij (Fleming in Clarke, 1998). V 60. letih 20.st. je tobačna in alkoholna industrija močno vplivala na gibanje prohibicije konoplje, ki se je iz Združenih držav Amerike hitro razširila tudi na Evropska tla.

Gojenje konoplje je imelo velik gospodarski pomen v času nekdanje Jugoslavije. Konoplja je zelo znana po raznovrstnosti uporabe in aplikacijah v različnih panogah, kot sta npr. gradbeništvo in avtomobilska industrija, kjer se uporabljajo konopljini plastični in betonski kompoziti (Karus in Vogt, 2000).

Šele v 21. stoletju je s ponovno oživitvijo raziskav izraelskih in ameriških raziskovalnih skupin prišla do izraza tudi uporaba konoplje za lajšanje simptomov

zdravstvenih težav. V vseh obdobjih je konopljino seme ostalo neizpodbiten vir prehranskih vlaknin in uravnotežene vsebnosti omega-3 in omega-6 maščobnih kislin v olju, prav tako pa njegov beljakovinski delež prekaša večino pridelovalnih rastlin v kmetijstvu (do 30 % beljakovinskega deleža v semenu) (Citti in sod., 2018). Glede na možnosti raznovrstne uporabe v različnih panogah konopljo kljub predsodkom in menjavi statusov legalnosti uvrščamo med pomembnejšo gojeno kmetijsko rastlino.

V zadnjih desetletjih na pomenu pridobivajo tudi kanabinoidi, pri čemer jih je do sedaj znanih in sintetiziranih že vsaj 152. Najbolj znani so tetrahidrokanabinol (d9-THC), kanabigerol (CBG), kanabidiol (CBD), kanabinol (CBN) ter njihove izomere. Za nekatere obstajajo tudi klinične študije, ki dokazujejo pozitivne učinke na zdravje. Gre predvsem za CBD, ki se je izkazal za učinkovitega pri zdravljenju trdovratne oblike epilepsije, seboreje in drugih vnetnih bolezni (WHO, 2018).

Zaradi bogate prehranske vrednosti so v zadnjih desetletjih na trgu močno prisotni razni izdelki iz konoplje, med katerimi prednjači uporaba hladno stiskanega olja iz semena in neluščeno ali oluščeno seme, ki vsebuje visok delež beljakovin. Izdelki, ki vsebujejo olje iz semen, beljakovinske sredice ali dele pogače po stiskanju, se nato uporabljajo kot polizdelek za pekovske potrebe (Carus in Sarmiento, 2016).

Pri proizvodnji konopljinega olja poznamo postopek hladnega stiskanja, ki je industrijsko prehranski standard za ohranjanje zdravih oz. hranilnih komponent, vendar pa pri tem lahko prihaja do kontaminacije z žleznimi trihomi ženskega socvetja konoplje, saj dozorevajo sočasno z semenom (Citti in sod., 2018). Namen zorenja kanabinoidov in terpenov v trihomih je predvsem defenzivno evolucijske narave, saj rastlina skuša obraniti seme pred hranjenjem ptičev ali herbivorov, dokler ni zrelo in godno za prehrano živali, kar zagotavlja raznos semena na dolge razdalje (Pate, 1983).

Brez natančnih in temeljitih procesov čiščenja semena (predvsem zaradi adhezivnosti terpenofenolne smole, ki se ob mehanskih dražljajih sprosti iz voskastih žleznih trihomov) obstaja resnična nevarnost kontaminacije semenskega pridelka z ostanki trihomov vsebujočih kanabinoidov (Leizer in sod, 2000).

S temeljitim sušenjem in večkratnim čiščenjem z razpihovanjem, bi se po načelu dobre prakse morali izogniti tej nevarnosti, kar pa je v praksi lahko težko izvedljivo. Že sami pogoji v času predelave oz. čiščenja semena lahko vplivajo na adhezivne lastnosti smole. Npr. relativna zračna vlaga v okolici in v prostoru lahko povzročita, da se smola dosti težje odlepi od povrhnjice semena.

Čeprav se v kratkem pričakuje enotna regulacija, pa v EU trenutno še ni usklajenih predpisov glede prisotnosti kanabinoidov v konopljinem olju. Večina držav v Evropi je omejila skupno količino d9-THC (le-ta zajema tako vsebnost tetrahidrokanabinola kot tudi njegove kislinske oblike (d9-THCA)) v konopljinem

olju in to na različnih vrednostih. V Nemčiji je ta meja postavljena na 5 ppm, medtem ko je na Hrvaškem in v Švici 20 ppm (NIJZ, 2017). To mejo (20 ppm) kot najvišjo dopustno mejo za konopljinu olje svetuje tudi EIHA - Evropsko združenje za industrijsko konopljo (EIHA position paper, 2021).

Pri nas je Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) izdal smernice, v katerih je definiran predvsem akutni referenčni odmerek (ARfD) za skupno vsebnost d9-THC, ki ga je postavila EFSA (European Food Safety Authority) pri 1 µg/kg telesne mase na dan. Dopustno mejo za izdelek se določi z oceno tveganja za potrošnika. Le-ta se torej določa za vsak primer posebej. Pri tem se upošteva z ustrezno analizno metodo določeno skupno količino d9-THC (v našem primeru v olju), ki se jo ovrednoti z ozirom na ARfD ter priporočeno dnevno dozo. Če priporočena dnevna doza ni navedena na sami etiketi proizvoda, se za izračun uporabi povprečna količina zaužitega olja, ki je določena glede na vseevropske podatke za olja in meri 2 jedilni žlici olja na dan (30 mL ~ 28 g) (NIJZ, 2018). Na osnovi tega lahko enostavno izračunamo priporočeno dnevno dozo d9-THC za odraslega človeka, ki pri 70 kg telesne teže znaša 2,5 ppm, pri telesni teži 12 kg (otroci) pa je celo pod 0,5 ppm. Kot zanimivost lahko omenimo še, da nekatere sosednje države kot priporočilo postavljajo konopljine izdelke v kategorijo, katerih uporaba je dovoljena le za polnoletne osebe (Kladar in sod., 2021).

Tako nizki nivoji so s stališča prakse in sposobnosti uporabljenih agronomskih procesov težko dosegljivi, prav tako pa nimajo utemeljene osnove z ozirom na varnost potrošnika, saj se večina skupnega d9-THC nahaja v njegovi kislinski obliki (d9-THCA), ki pa seveda nima enakega farmakološkega oziroma toksikološkega učinka.

Ker proizvajalci redno ne testirajo konopljinega olja, ki ga dajejo na trg, je kot posledica naključnih inšpekcijskih nadzorov prišlo celo do umikov nekaterih izdelkov iz različnih evropskih tržišč (tudi v Sloveniji). V zadnjem času je najbolj udaren umik konopljinega olja iz Lidla na nemškem trgu.

V naši raziskavi smo prejeli 12 različnih anonimnih vzorcev konopljinega hladno stiskanega olja in v njih analizirali sledove kanabinoidov z metodo plinske kromatografije v povezavi z masno selektivnim detektorjem. Namen raziskave je narediti preliminarno študijo za preverjanje vsebnosti sledov kanabinoidov v prehranskih oljih iz semen konoplje in ugotoviti razloge in potencialne ključne dejavnike za kontaminacijo s sledovi kanabinoidov.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Standardi in kemikalije

Uporabljeni standardi in kemikalije:

- Kanabidivarin (CBDV), Dr. Ehrenstorfer, DRE-A10946040ME-1000, 1000 µg/mL (raztopina v metanolu), delovni standard.
- Tetrahidrokanabivarin (THCV), Dr. Ehrenstorfer, DRE-A17405170ME-1000, 1000 µg/mL (raztopina v metanolu), delovni standard.
- Kanabidiol (CBD), Dr. Ehrenstorfer, DRE-A10946000ME-1000, 1000 µg/mL (raztopina v metanolu), delovni standard.
- Kanabikromen (CBC), Dr. Ehrenstorfer, DRE-A10945900ME-1000, 1000 µg/mL (raztopina v metanolu), delovni standard.
- Tetrahidrokanabinolna kislina (d9-THCA), Dr. Ehrenstorfer, DRE-A17405150AL-1000, 1000 µg/mL (raztopina v acetonitrilu), delovni standard.
- Kanabigerol (CBG), Dr. Ehrenstorfer, DRE-A10946100ME-1000, 1000 µg/mL (raztopina v metanolu), delovni standard.
- 2-propanol p.a., Riedel-de Haen, 33539, topilo.

2.1.1 Priprava raztopin standardov

Raztopine delovnih standardov CBDV, THCV, CBD, CBC, d9-THCA ter CBG kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko ter dopolnimo s topilom (2-propanol) do oznake volumna (raztopina RS1). Odpipetiramo 1000 µL raztopine RS1 ter prenesemo v 20 mL bučko ter dopolnimo s topilom (2-propanol) do oznake volumna (raztopina RS2). Odpipetiramo 2000 µL raztopine RS2 ter prenesemo v 10 mL bučko ter dopolnimo s topilom (2-propanol) do oznake volumna (razt. TUKS, $c = 0,10 \mu\text{g/mL}$). V preglednici 1 so zbrani podatki o pripravi raztopin standardov.

2.2 Vzorci

Vzorke konopljinega olja smo pridobili bodisi na tržišču bodisi direktno od proizvajalcev. Zaradi zagotavljanja anonimnosti so olja navedena le po internih laboratorijskih oznakah ter ne po celotnem imenu. Tekom raziskave smo analizirali 12 različnih vzorcev olj z oznakami: V527, V542, V556, V557, V565, V566, V567, V568, V569, V570, V571 in V591.

Preglednica 1: Priprava raztopin standardov

Standard	Koncentracija [µg/mL]	Celoten faktor redčenja	Koncentracija v razt. TUKS [µg/mL]	Koncentracija razt. TUKS glede na pripravo vzorca 10 mg/mL
CBDV	999	10000	0,10	10 ppm
THCV	1015	10000	0,10	10 ppm
CBD	1000	10000	0,10	10 ppm
CBC	1002	10000	0,10	10 ppm
d9-THCA	1000	10000	0,10	10 ppm
CBG	999	10000	0,10	10 ppm

2.2.1 Priprava vzorcev

V 50 mL bučko natančno zatehtamo okoli 500 mg posameznega vzorca ter dopolnimo s topilom (2-propanol) do oznake volumna ($c \approx 10$ mg/mL). V preglednici 2 so zbrani podatki o pripravi vzorcev.

Preglednica 2: Priprava vzorcev

Oznaka vzorca	Zatehta [mg]	Faktor redčenja	Koncentracija [µg/mL]
V527	514,57	50	10291,4
V542	518,35	50	10367,0
V556	549,30	50	10986,0
V557	528,73	50	10574,6
V565	506,68	50	10133,6
V566	525,69	50	10513,8
V567	530,68	50	10613,6
V568	531,26	50	10625,2
V569	532,89	50	10657,8
V570	518,32	50	10366,4
V571	519,70	50	10394,0
V591	522,51	50	10450,2

2.3 Analizna metoda

Analize so bile izvedene s plinskim kromatografom Agilent 6890, sklopljenim z masno selektivnim detektorjem Agilent 5975C. Za separacijo komponent smo uporabili kromatografsko kolono Agilent HP-5 dimenzij 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm s konstantnim pretokom nosilnega plina (vodik 6.0) 2 mL/min. Temperatura injektorja je znašala 320 °C ter volumen injiciranja 1 μL . Temperaturni program peči: 180 °C (0,5 min), gradient₁ 12.5 °C/min do 230 °C (1 min), gradient₂ 12.5 °C/min do 320 °C (5 min). Masni detektor je bil nastavljen na SIM (single ion monitoring) način, pri čemer smo spremljali najintenzivnejše fragmente (m/z) posameznih preiskovanih analitov:

- CBDV: m/z 203,0
- THCV: m/z 286,0
- CBD, CBC, d9-THC: m/z 231,0
- CBG: m/z 193,0.

Meja kvantifikacije (QL) metode znaša 2,1 ppm ter meja detekcije (DL) 0,7 ppm.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Ustrezno delovanje kromatografskega sistema (TUKS – Test Ustreznosti Kromatografskega Sistema) smo tekom analize preverili s štirikratnim injiciranjem raztopine standardov ($n = 4$), pri čemer smo spremljali sipanje meritev površine posameznega kromatografskega vrha kanabinoida kot relativni standardni odmik (RSD) od povprečne vrednosti. Vsi rezultati so znotraj interno predpisanega laboratorijskega kriterija, ki za ta koncentracijski nivo znaša $\text{RSD} \leq 20\%$. Rezultate prikazuje preglednica 3.

Iz rezultatov analiz vzorcev vidimo, da se vsebnosti preiskovanih kanabinoidov v vzorcih zelo razlikujejo. Največje razlike se, kot je bilo tudi pričakovano, kažejo pri vsebnosti CBD, ki se nahajajo v razponu od 16 do kar 850 ppm. Razlike med vsebnostmi CBDV, CBC ter CBG so manjše. V nobenem izmed vzorcev nismo detektirali tetrahidrokanabivarina THCV.

Tako za proizvajalce kot tudi potrošnike so verjetno najbolj zanimivi rezultati skupne vsebnosti tetrahidrokanabinola (d9-THC), ki je zaradi svoje psihoaktivne narave zamejen najnižje. Kot smo že omenili se sicer v oljih, pridobljenih iz konopljinih semen, večina skupnega d9-THC nahaja v njegovi kislini obliki (d9-THCA), ki nima enakega farmakološkega oziroma toksikološkega učinka pa vendar se gleda le njegovo skupno vsebnost. Če si postavimo mejo glede na v uvodnem delu izračunane podatke povprečnega slovenskega potrošnika (odrasla oseba, telesna teža 70 kg), le-ta znaša zgolj 2,5 ppm. Kot vidimo iz rezultatov, zbranih v preglednici 4, temu kriteriju ustrezajo le trije od dvanajstih vzorcev oz. z

drugimi besedami le ena četrtina. Najvišja določena vsebnost tetrahidrokanabinola je pri tem znašala 27 ppm. Absolutno gledano sicer te vrednosti nikakor niso alarmantno visoke, vsekakor pa z ozirom na trenutno regulativo za proizvajalce predstavljajo tveganje, da se njihove izdelke umakne iz trga.

Preglednica 3: TUKS parametri

Injiciranje	Površina (CBDV)	Površina (THCV)	Površina (CBD)	Površina (CBC)	Površina (d9-THC*)	Površina (CBG)
1	53563	16778	44785	61132	5467	12297
2	51612	15177	44810	63518	4844	10040
3	53001	15495	43121	53266	5553	10451
4	51302	15560	42873	54769	5962	10916
<i>Povprečje</i>	52370	15753	43897	58171	5457	10926
<i>Standardni odmik</i>	1086	704	1044	4933	462	982
<i>RSD, %</i>	2,1	4,5	2,4	8,5	8,5	9,0

**Opomba:* Pri plinski kromatografiji se tetrahidrokanabinolna kislina (d9-THCA) zaradi visoke temperature v procesu dekarboksilacije pretvori v prosti tetrahidrokanabinol (d9-THC). Rezultati se zato podajajo kot skupni d9-THC.

Vsakega izmed 12 vzorcev smo tekom analize injicirali trikrat in rezultat vsebnosti posameznega kanabinoida podali kot povprečje treh meritev. Združeni rezultati meritev so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: Rezultati analiz vzorcev

Vzorec	Vsebnost CBDV [ppm]	Vsebnost THCV [ppm]	Vsebnost CBD [ppm]	Vsebnost CBC [ppm]	Vsebnost d9-THC [ppm]	Vsebnost CBG [ppm]
V527	3	< DL	282	15	9	39
V542	2	< DL	185	14	20	72
V556	2	< DL	147	9	4	28
V557	4	< DL	219	14	9	11
V565	4	< DL	235	11	8	17
V566	4	< DL	104	7	17	< DL
V567	< DL	< DL	57	4	< QL (1)	< DL
V568	8	< DL	850	54	27	50
V569	3	< DL	214	10	9	13
V570	2	< DL	54	4	8	< DL
V571	< DL	< DL	16	< DL	< DL	< DL
V591	< DL	< DL	61	6	< DL	94

Ne glede na to, da smo se v naši raziskavi omejili le na analize konopljinega olja, bi najverjetneje lahko sklepali, da bi podoben trend opazili tudi pri drugih konopljinih izdelkih (npr. pijači). Pridobljeni rezultati tako verjetno predstavljajo

zadosten argument, da bi bilo smotrno zagotoviti bolj pogosto testiranje konopljinih izdelkov ter posledično poskrbeti za bolj nadzorovano proizvodnjo.

4 ZAKLJUČEK

Tekom raziskave smo analizirali 12 različnih komercialno dostopnih konopljinih olj in v njih na osnovi plinske kromatografije z masno selektivno detekcijo določali vsebnosti kanabivarina (CBDV), tetrahidrokanabivarina (THCV), kanabidiola (CBD), kanabikromena (CBC), tetrahidrokanabinola (d9-THC) ter kanabigerola (CBG). Vsebnosti kanabinoidov so se med posameznimi vzorci olj precej razlikovale, pri čemer je izstopal predvsem CBD. Največ pozornosti smo namenili rezultatom tetrahidrokanabinola, saj je zaradi svoje psihoaktivne narave njegov dovoljen nivo zamejen. Čeprav se v kratkem pričakuje enotna regulacija, trenutno v EU še ni usklajenih predpisov glede dopustne meje. Posledično so v različnih državah dopustne meje različno postavljene, pri nas pa jih ureja NIJZ. Meja je v Sloveniji odvisna od akutnega referenčnega odmerka (EFSA: skupna vsebnost d9-THC znaša 1 µg/kg telesne mase na dan) ter priporočene dnevne doze izdelka (v našem primeru olja). Za odraslo osebo s telesno težo 70 kg ta meja znaša zgolj 2,5 ppm in iz rezultatov, pridobljenih tekom naše študije, lahko vidimo, da le četrtnina izdelkov ustreza temu kriteriju. Rezultati po eni strani predstavljajo za proizvajalce tveganje, da se njihove izdelke umakne iz trga, po drugi strani pa nakazujejo potrebo po (pogostejšem) testiranju konopljinih izdelkov z namenom zagotavljanja bolj nadzorovane proizvodnje. Nenazadnje pa rezultati verjetno tudi pozivajo k ponovni evalvaciji oziroma uskladitvi dopustnih mej z ozirom na varnost potrošnika. Pri tem je potrebno tudi upoštevati, da se večina od skupnega d9-THC v konopljinih oljih nahaja v njegovi kislinski obliki, ki pa seveda nima enakega farmakološkega oziroma toksikološkega učinka.

5 VIRI

- Carus, M., & Sarmiento, L. (2016). The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers. European Industrial Hemp Association, 1-9.
- Citti, C., Pacchetti, B., Vandelli, M.A., Forni, F., Cannazza, G. (2018). Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 149, 532-40.
- Fleming, M.P., Clarke, R.C. (1998). Physical evidence for the antiquity of Cannabis sativa L. *Journal of the International Hemp Association*, 5 (2), 80-95.
- Karus, M. & Vogt, D. (2004). European hemp industry: Cultivation, processing and product lines. *Euphytica*, 140 (1), 7-12.
- Kladar, N., Čonić, B.S., Božin, B., Torović, L. (2021). European hemp-based food products—Health concerning cannabinoids exposure assessment. *Food Control*, 129, 108233.

- Lachenmeier, D.W. & Walch, S.G., (2020). Evidence for side effects of cannabidiol (CBD) products and their non-conformity on the European food market–response to the European Industrial Hemp Association. F1000Research, 9.
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S. and Raskin, I. (2000). The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, functional & medical foods*, 2 (4), 35-53.
- NIJZ Nacionalni inštitut za javno zdravje (2017). Dopolnjeno zaključno poročilo o realizaciji predloženega programa dela na CRP raziskovalnem projektu (V3-1637).
- NIJZ Nacionalni inštitut za javno zdravje (2018). Strokovno mnenje glede varnosti živil, ki vsebujejo industrijsko konopljo in za zdravje sprejemljivih vsebnosti tetrahidrokanabinola (THC) in kanabidiola (CBD) v živilskih izdelkih – posodobljeno mnenje.
- Pate, D.W. (1983). Possible role of ultraviolet radiation in evolution of Cannabis chemotypes. *Economic Botany*. 37 (4), 396-405.
- Russo, E.B., Jiang, H.E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., Del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D.J., Zhao, Y.X., Bera, S., Zhang, Y.B. (2008). Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *Journal of experimental botany*. 59 (15), 4171-4182.
- World Health Organization and WHO Expert Committee on Drug Dependence. Fourtieth report. (2018). WHO technical report series. World health organization.

SISTEM ZA PODPORO ODLOČANJU O NAMAKANJU (SPON): PRIMER UPORABE V PRIDELAVI HMELJA

Matjaž GLAVAN¹, Luka HONZAK², Luka ŽVOKELJ³, Rozalija CVEJIC⁴,
Boštjan NAGLIČ⁵ in Marina PINTAR⁶

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 23. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 22. 12. 2021

Izvleček

Nestrokovno izvajanje namakanja lahko negativno vpliva na kakovost in količino pridelka, posledično se lahko povečajo stroški delovanja namakalnega sistema, poveča se poraba vode ter možnost izgub vode v podtalje, s čimer se lahko izpirajo rastlinska hranila in ostanki sredstev za varstvo rastlin. Strokovno ustrezno izvajanje namakanja pomeni, da izvajalec namakanja na podlagi potreb rastlin po vodi določa časovni okvir in količino dodane vode s ciljem doseganja čim učinkovitejše rabe vode. Pretekle raziskave in projekti v Sloveniji so pokazali, da pridelovalci v Sloveniji pogosto namakajo po občutku in na podlagi preteklih izkušenj. V tem prispevku predstavljamo vzpostavitev in delovanje sistema podpore odločanju o namakanju (SPON), ki je bil razvit v okviru projekta LIFE ViVaCCAdapt in pozneje nadgrajen v EIP projektu PRO-PRIDELAVA. SPON temelji na meritvah vsebnosti vode v tleh, agrometeorološke napovedi Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO) in izračunu potreb po namakanju z modelom ARSO IRRFIB. Z dodanimi vhodnimi podatki o tleh, razvojni fazi rastline in načinu namakanja ter petdnevne napovedi potencialne evapotranspiracije in količine padavin izračunava obrok namakanja za določeno kulturo. SPON pridelovalcem omogoča učinkovitejšo rabo vode za namakanje.

Ključne besede: kmetijstvo, namakanje, podnebne spremembe, sistem za podporo odločanju o namakanju, SPON

¹ Doc. Dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: matjaz.glavan@bf.uni-lj.si

² Univ. dipl. meteorol., BO-MO, d.o.o., Bratovševa ploščad 4, 1000 Ljubljana, e-pošta: luka@bo-mo.si

³ Mag. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: luka.zvokelj@bf.uni-lj.si

⁴ Dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: rozalija.cvejic@bf.uni-lj.si

⁵ Dr., univ. dipl. inž. agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: bostjan.naglic@ihps.si

⁶ Prof. Dr., univ. dipl. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marina.pintar@bf.uni-lj.si

IRRIGATION DECISION SUPPORT SYSTEM (SPON): EXAMPLE OF USE IN HOP PRODUCTION

Abstract

Improper irrigation can negatively affect the quality and quantity of crops, resulting in increased irrigation system operating costs, increased water consumption and the possibility of water losses, which can leach plant nutrients and residues of plant protection products. Professionally correct implementation of irrigation means that an irrigator, based on the plants water needs, determines the timing and quantity of water application with the purpose of achieving efficient water use. Past research and projects in Slovenia have shown that growers in Slovenia often irrigate by feeling and based on past experience. As a part of this research, we present the establishment and operation of the Irrigation Decision Support System (SPON), which was developed within the LIFE ViVaCCAdapt project and later upgraded in the EIP PRO-PRIDELAVA project. SPON is based on measurements of soil water content, agro-meteorological forecasts of the Slovenian Environment Agency (ARSO) and calculation of irrigation water needs using the model of the ARSO IRRFIB. With added input data on soil, phenology and irrigation method, and a five-day forecast of potential evapotranspiration and precipitation, it calculates the irrigation rate for a given crop. SPON enables growers to use irrigation water more efficiently.

Keywords: agriculture, irrigation, climate change, irrigation decision support system, SPON

1 UVOD

Od učinkovitosti izvajanja namakanja je odvisno, koliko vode rastlina porabi na enoto pridelka. Med pridelovalci in strokovnjaki se pojavlja mnogo dilem o tem, kdaj in koliko namakati za dosego optimalne kakovosti in količine pridelka in katero orodje uporabiti za izvajanje pravilnega namakanja.

Pretekle raziskave v Sloveniji so pokazale, da pridelovalci v Sloveniji pogosto namakajo po občutku in na podlagi preteklih izkušenj. Tako se namakanje izvaja prepozno, prehitro, preredito ali prepogosto in v premajhnih ali prevelikih namakalnih obdobjih (Cvejić in sod., 2020). Neoptimalna preskrba z vodo se odraža v: (1) zdravstvenem stanju rastlin (več bolezni rastlin in večja poraba fitofarmaceutskih sredstev), (2) količini, kakovosti in obstojnosti pridelka, (3) zmanjšanem sprejemu hranil v rastlino, (4) zmanjšani učinkovitosti in slabši razgradnji fitofarmaceutskih sredstev, (5) povečanem spiranju hranil in ostankov fitofarmaceutskih sredstev v podtalje in (6) slabši učinkovitosti rabe vode.

Vodenje strokovno pravilnega namakanja temelji na meritvah količine vode v tleh, vremena (evapotranspiracija, padavine) in rastlin (faza razvoja in koeficient

rastline, efektivna globina korenin) (Hunsaker in sod., 2015; Soulis in sod., 2015). Vodenje namakanja opisuje postopek, s katerim izvajalec namakanja določa časovni okvir in količino dodane vode. Kot navaja Hillel (2004), sta v povezavi s tem bistveni dve vprašanji: kdaj pričeti namakati in koliko vode dodati z namakanjem. Na prvo vprašanje je odgovor, da tako pogosto, da rastline niso v stresu zaradi pomanjkanja vode ter da je ekonomsko sprejemljivo. Na drugo vprašanje je odgovor, da dodati toliko vode, da se nadomesti evapotranspiracija (ET) in da se hkrati prepreči izgube vode pod območje glavnine koreninskega sistema. Tam (2006) navaja, da je potrebno upoštevati tudi učinkovitost namakanja, ki je razmerje med količino vode, ki jo dovedemo na namakalno površino ter količino vode, ki jo rastline dejansko porabijo. Namakanje se lahko izvaja z uporabo več pristopov, ki, kot navaja Abubaker (2009), lahko temeljijo na spremljanju količine vode v tleh, agrometeoroloških podatkov ali stresa rastlin. Spremljanje vlažnosti tal je eden izmed najpomembnejših pristopov za vodenje namakanja. Za ta namen je lahko uporabljenih več naprav in pristopov, kot so gravimetrično določanje vsebnosti vode v tleh, prstni (ročni) in vizualni preizkus, uporaba različnih analognih ali elektronskih senzorjev (Abubaker, 2009). Spremljanje agrometeoroloških podatkov je pristop, pri katerem se količina dodane vode z namakanjem odmeri glede na izmerjene vrednosti evapotranspiracije v nekem časovnem obdobju. Za ta pristop se lahko uporabijo različni vodnobilančni modeli (Hillel, 1990). Pristop spremljanja stresa rastlin lahko zajema direktno vizualno ugotavljanje stresa zaradi pomanjkanja vode, metodo merjenja temperature rastlin ter metode, kot so določanje indeksa pomanjkanja vode v rastlini ali potencial vode v listih (Jackson, 1982; Abubaker, 2009). Študije v različnih delih sveta so pokazale, da ima pravilno vodenje namakanja pomembno vlogo pri doseganju večjih prihrankov vode in produktivnosti porabe vode za nadzemno kapljično namakanje različnih rastlin (Bucks in sod., 1988; Jensen in sod., 1990; Hunsake in sod., 1998; Jones, 2004; Pereira in sod., 2009; Evett in sod., 2012; Allen in sod., 2005; Darouich in sod., 2014).

V Sloveniji imamo nekaj izkušenj na področju izdajanja namakalnih nasvetov. Za namakanje hmelja Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije že vrsto let izdaja priporočila za začetek namakanja za več tipov tal. Postopek temelji na gravimetričnem določanju količine vode v tleh, ki je zahteven tako fizično kot časovno in ne omogoča dinamičnega sledenja vsebnosti vode v tleh. Na Agenciji RS za okolje pa izvajajo priporočila za začetek namakanja ob uporabi modela IRRFIB, ki izračunava vodno bilanco tal (Sušnik, 2005; Sušnik, 2014, Valher, 2016). Oba načina svetovanja imata ključno pomanjkljivost, da pri določitvi potreb po namakanju ne upoštevata trenutne vsebnosti vode v tleh.

V slovenskem prostoru se v zadnjih letih, zaradi vse pogostejših suš, povezanih s podnebnimi spremembami, krepi zavedanje, da je namakanje nujno potreben tehnološki ukrep za vzdrževanje kmetijske pridelave. Pospešeno se odvijajo tudi

posodobitve zastarelih namakalnih sistemov in gradnje novih. Zaradi vseh teh dejstev postaja strokovno pravilno izvajanje namakanja aktualna tema v kmetijstvu. Uporabniki namakanja brez strokovne podpore ne bodo mogli izvajati strokovno pravilno. Ustrezen določitev začetka namakanja in količine dodane vode z namakanjem skoraj vsem uporabnikom namakalnih sistemov v Sloveniji predstavlja izziv.

V tem prispevku predstavljamo delovanje Sistema podpore odločanju o namakanju (SPON), ki je bil razvit v okviru projekta LIFE ViVaCCAdapt in pozneje nadgrajen v EIP projektu PRO-PRIDELAVA. SPON je bil v obdobju 2020-2021 testno uporabljen pri pridelavi hmelja na izbrani kmetiji v Savinjski dolini. Podana je analiza stroškov in koristi uporabe SPON v pridelavi hmelja.

2 MATERIAL IN METODE DELA

2.1 Vzpostavitev infrastrukture za spremljanje vsebnosti vode v tleh

Infrastruktura za spremljanje vsebnosti vode v tleh obsega komunikacijsko napravo s SIM kartico, baterijo in sončno celico za napajanje baterije. Vse skupaj je nameščeno v vodotesno ohišje, sončna celica pa se nahaja na vrhu ohišja. S komunikacijsko napravo so povezani merilniki vsebnosti vode v tleh. Za namen izvajanja projekta smo uporabili merilnike SM150T proizvajalca Delta-T Devices Ltd., Cambridge, VB, ki poleg vsebnosti vode v tleh merijo tudi temperaturo. Na območju namakanih površin morajo biti merilniki nameščeni na primerno mesto. V trajnih nasadih (npr. hmeljiščih, vinogradih, sadovnjakih) smo jih namestili v vrsti med rastlinami. Pri ostalih kulturah (vrtnine, poljščine) smo jih namestili na sredino gredic oziroma tam, kjer so tla najbolj reprezentativna za celotno površino. Merilniki vsebnosti vode v tleh ne merijo neposredno, temveč merijo relativno dielektričnost tal, ki je močno pogojena z vsebnostjo vode v tleh. Za uporabo merilnikov SM150T izmerjeno relativno dielektričnost tal s pomočjo kalibracijskih enačb, ki jih priporoča proizvajalec, pretvorimo v vsebnost vode v tleh v volumskih odstotkih. Splošna polinomska kalibracijska enačba proizvajalca SM150T za povprečna mineralna tla je prikazana v enačbi 1 (Delta-T Devices, 2016).

$$\theta = -0.0714 + 1.7190V - 3.7213V^2 + 5.8402V^3 - 4.3521V^4 + 1.2752V^5 \quad \text{Enačba 1}$$

kjer je θ vsebnost vode v tleh (vol. %), V pa je izhodni podatek v voltih.

V primeru, da ne želimo uporabiti splošne kalibracijske enačbe, lahko sonde specifično kalibriramo za določen tip tal, kjer so vstavljene sonde. To se izvede v laboratoriju na neporušenem vzorcu tal. V okviru projekta PRO-PRIDELAVA smo merilnike talno specifično kalibrirali za največjo možno natančnost meritev.

Merilnike vsebnosti vode v tleh smo namestili na ustrezno globino, kjer se nahaja glavna masa korenin namakane kulture (pri hmelju je globina aktivnih korenin, ki črpajo največ vode na globini do 40 cm). Merilne elektrode smo skrbno namestili v neporušen del tal. Ob vgradnji smo pazili, da je bil stik med merilnimi elektrodami in tlemi tesen, saj so v nasprotnem primeru meritve napačne. V preteklih projektih smo ugotovili, da je za delovanje sistema napovedi za namakanje bolje, če je na lokaciji vgrajenih več merilnikov, zato smo v tem projektu vgradili štiri. Prve tri merilnike smo namestili horizontalno na globini glavne mase korenin (na globini 20 cm) in so bili namenjeni izračunu vsebnosti vode v tleh. Z uporabo treh merilnikov na enaki globini se je preprečilo morebitno nepravilno delovanje enega od treh merilnikov, nameščenih v območju korenin. Četrty merilnik smo namestili pod glavno maso korenin (na globino 40 cm), in je pomagal nadzorovati morebitno pronicanje vode v globlji del tal oz. pod glavno maso korenin rastlin.

Po namestitvi merilnikov vode v tleh smo tla skrbno zasuli ter merilnike priključili na komunikacijsko napravo. V sklopu projekta smo na vsakem merilnem mestu namestili tudi dežemer.

2.2 Določanje vodno zadrževalnih lastnosti tal

V okviru projekta smo določili vodno zadrževalne lastnosti tal, ki so potrebne za upravljanje namakanja. Poljsko kapaciteto tal za vodo (PK) smo določili v laboratoriju z napravo HYPROP® (Schindler, 1980; UMS, 2015), točko venenja (TV) pa z uporabo tlačne posode (Richards, 1941). Ko smo določili osnovne parametre fizikalnih lastnosti tal, smo določili tudi kritično točko (KT), ki predstavlja količino vode pri tenziji/matričnem potencialu vode v tleh, ko začne rastlina del energije, ki bi jo sicer porabila za rast in oblikovanje pridelka, porabljati za premagovanje matričnega potenciala vode v tleh. Rastline imajo različno sposobnost odvzema vode iz tal in so različno odporne proti suši, zato je KT vrstno in tudi sortno specifična. KT smo izračunali na podlagi faktorja p , ki označuje delež lahko dostopne vode za posamezno rastlino v določenih tleh (npr. za korenček je faktor p 0,35, za hmelj 0,50, za solato 0,30, za jagode 0,15 itd.). Z namakanjem smo poskušali vzdrževati vodo v tleh med KT in PK.

2.3 Spremljanje fenoloških faz rastline

Različne rastline imajo različne potrebe po vodi. Te potrebe se med rastno dobo rastlin spreminjajo. V nekaterih fenofazah rastlin je za doseganje kakovosti in količine pridelka izjemno pomembno, da rastlina dobi dovolj vode. V drugih primerih je koristno, če je dobi dovolj, a ne preveč, saj so tako kakovost, skladiščna sposobnost in okus pridelka boljši. Za potrebe projekta smo za vsako kulturo določili fenofaze, ki najbolj vplivajo na različne zahteve rastlin po vodi. Čas začetka in konca posameznih fenofaz je ključen podatek za izračune vodne bilance.

Rastline imajo v različnih fenofazah različne koeficiente rastline (kc), ki so potrebni za izračun potencialne evapotranspiracije (ETc).

V okviru projekta smo določile fenofaze ter kc in globino glavne mase korenin za najpogostejše kmetijske kulture v Sloveniji. Preglednica 1 prikazuje te podatke na primeru hmelja v Savinjski dolini.

Preglednica 1: Fenofaze za hmelj v Savinjski regiji, izbrane v okviru projekta EIP PRO-PRIDELAVA za namen uporabe v Sistemu podpore odločanja o namakanju (SPON)

Kultura: Hmelj
Faktor p: 0,5
Število fenofaz: 7

	Opis fenofaze	BBCH	Občutljivost na sušni stres	Kc	Globina korenin (cm)	Začetek rastle dobe (dan, mesec)	Čas trajanja (dni)
1	prvi poganjki	9		0,30	40	15. 4.	7
2	prvi par listov razgrnjen	11		0,30	40		28
3	pojav stranskih poganjkov (prvi par)	21		0,60	40		30
4	rastlina dosegla vrh opore	38	občutljiva	0,90	40		30
5	začetek cvetenja	61	zelo občutljiva	1,15	40		20
6	storžki končna velikost	79	zelo občutljiva	1,15	40		25
7	zrelost storžkov, pobiranje pridelka	89		0,60	40		20

2.4 Vodna bilanca v tleh

Na vodno bilanco v zgornjem sloju tal v globini glavne mase korenin rastlin vpliva več dejavnikov. Oblika in pokrovnost površine vplivata na količino infiltriranih padavin; tekstura in vodno zadrževalne lastnosti tal vplivajo na globino pronicanja ter kapilarni dvig vode. Vodno bilanco lahko uravnavamo z namakanjem, s katerim neposredno nadomestimo izgubo vode zaradi ET. Meritve ET so zaradi številnih

dejavnikov, ki vplivajo na ta proces, težavne in redko dostopne, zato se za oceno tega člena vodne bilance pogosto uporabljajo izračuni na osnovi energijske bilance. Referenčna evapotranspiracija (ET_o) je definirana kot ET z referenčne površine, ki jo pokriva travna ruša, visoka 12 centimetrov, in je dobro oskrbovana z vodo (Allen in sod., 1998). Za oceno, koliko vode rastlina potrebuje v določeni fazi rasti, potrebujemo vrednost potencialne evapotranspiracije (ET_c), ki smo jo izračunali kot produkt med k_c in ET_o (Enačba 2).

$$ET_c = ET_o \times k_c \quad \text{Enačba 2}$$

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Računski del SPON

Osnova računskega dela SPON temelji na izračunu vodne bilance z modelom Agencije Republike Slovenije za okolje IRRFIB. Model IRRFIB izračuna obrok namakanja za določeno kulturo ob uporabi vhodnih podatkov o tleh, fenologiji in načinu namakanja ter petdnevne napovedi potencialne evapotranspiracije in količine padavin.

IRRFIB je v osnovi mišljen za neprekinjeno delovanje čez celotno rastno sezono, pri čemer na začetku predpostavimo, da je količina vode v tleh enaka PK. Vnaprej je potrebno podati datume nastopa posameznih fenofaz, ki se jih prilagodi in popravi v času dejanskega nastopa fenofaze. Simulacije se lahko popravlja tudi z meritvami količine vode v tleh na terenu.

IRRFIB vodno bilanco (VB) na i -ti dan izračuna kot je prikazano v enačbi 3:

$$VB(i) = VB(i-1) + \text{padavine}(i) - ET_c(i) + V_v(N) \quad \text{Enačba 3}$$

pri čemer je $V_v(N)$ zaloga vode iz preteklih dni, če je zaradi večje količine padavin nastal presežek vode nad vrednostjo pri PK.

Pri izračunu smo upoštevali še naslednje pogoje: (i) v kolikor je bila VB večja kot količina vode pri PK na določeni globini, smo jo nastavili na PK in presežek shranili v V_v , (ii) v kolikor je bila VB nižja od količine vode pri TV na določeni globini, smo jo nastavili na TV, (iii) v kolikor je bila VB manjša od količine vode pri KT na določeni globini, smo ET_c zmanjša za polovico.

Koeficient rastline k_c in globino korenin za posamezen dan IRRFIB izračuna iz datuma nastopa trenutne fenofaze in predvidenega nastopa naslednje z linearno shemo.

IRRFIB je v osnovi namenjen za kontinuiran zagon za celotno rastno sezono, zato so bile potrebne določene prilagoditve. Z namenom, da smo čim manj posegali v izvorno kodo modela smo dodatne funkcionalnosti (npr. minimalni obrok namakanja, učinkovitost namakanja na podlagi tehnologije namakanja) razvili izven modela. V sam IRRFIB smo implementirali le dve dodatni strategiji namakanja, in sicer (i) namakanje do PK in (ii) namakanje do 85 % rastlinam razpoložljive vode, torej do točke, kjer je. $TV+0,85*(PK-TV)$.

3.2 Delovanje Sistema podpore odločanju o namakanju (SPON)

Sistem SPON izračuna priporočeni obrok (v mm in m^3) in čas namakanja (v urah) za 5 dni vnaprej, pri čemer upošteva informacije o trenutni vsebnosti vode v tleh na podlagi merilnikov vodno zadrževalnih lastnosti tal (PK, TV), potrebi rastline po vodi glede na fenofazo, vremensko napoved (padavine, evapotranspiracija) ter tehnologijo namakanja. SPON je sestavljen iz podatkovne baze in štirih modulov.

V **podatkovno bazo** se shranjujejo podatki o:

- uporabniških nastavitvah, in sicer izbrana kultura, regija ter podatki o tleh (PK in TK) in namakanju (rastlinjak, zastirka, tehnologija namakanja, minimalni in maksimalni obrok namakanja, strategija namakanja ipd.),
- kulturah (kc in globina korenin za vsako fenofazo ter trajanje posamezne fenofaze),
- vremenskih napovedih,
- meritvah vsebnosti vode v tleh in
- napovedi namakanja.

Modul »Meritve vode v tleh« prenese podatke o vsebnosti vode v tleh od ponudnikov opreme in jih shrani v podatkovno bazo.

Modul »Vremenska napoved« prenese napoved dnevne referenčne evapotranspiracije in padavin, ki jih Agencija za okolje Republike Slovenije pripravi za 15 regij (<http://www.meteo.si/met/sl/agromet/forecast/>), ter napovedi shrani v podatkovno bazo.

Modul »Program za izračun potreb po namakanju«, ki temelji na vodnobilančnem modelu IRRFIB, na podlagi vseh razpoložljivih podatkov izračuna priporočilo za namakanje ter ga vpiše v podatkovno bazo. Izračuni se zaženejo vsak dan med rastno sezono ob 9.30 uri zjutraj.

Modul »Spletni vmesnik« je razdeljen na štiri področja:

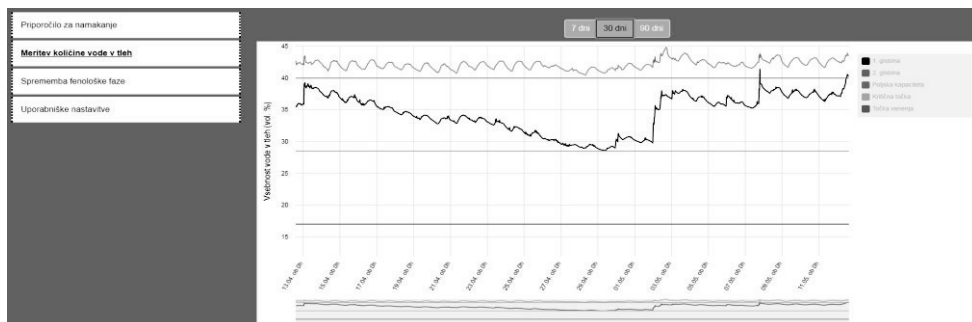
- **Priporočilo za namakanje**, kjer so v tabelarični obliki podane 5-dnevne napovedi potencialne evapotranspiracije, višine padavin ter priporočene količine vode za namakanje v mm in m^3 na površino ter trajanje namakanja v urah (slika 1).

Priloga	Datum	Padavine (mm)	Evapotranspiracija (mm)	Količina vode za namakanje (mm oz. L/m ²)
Meritev količine vode v tleh	05.05.	7,3	4,6	5,3
Sprememba fenološke faze	06.05.	4,2	0,4	8,3
Uporabniške nastavitve	07.05.	1,9	4	10,1
	08.05.	2,8	2,7	14,4
	09.05.	6,9	3,4	1

Datum izdanega priporočila: 05.05.2021

Slika 1: Prikaz priporočila za namakanje v Sistemu podpore odločanju o namakanju (SPON).

- **Graf meritev vsebnosti vode v tleh** za do 90 dni nazaj; na grafu so označene tudi značilne točke tal, in sicer PK, KT in TV (slika 2),



Slika 2: Prikaz meritev vsebnosti vode v tleh (vol %) v Sistemu podpore odločanju o namakanju (SPON).

- **Sprememba fenološke faze**, kjer lahko uporabnik vidi (i) trenutno fenofazo z datumom njenega nastopa, (ii) naslednjo fenofazo s predvidenim datumom začetka in (iii) predhodno fenofazo z datumom njenega začetka ter popravi trenutno fenofazo (slika 3).

Priloga	Priloga za namakanje	Trenutna fenološka faza Opis: 4. Datum začetka: 27.03.2021	Vnos spremembe fenološke faze Nazaj - ta fenološka faza se še ni začela, začela se bo čez: 3 dni 5 dni 10 dni
	Meritev količine vode v tleh	Prejšnja fenološka faza Opis: 3. Datum začetka: 07.03.2021	Naprej - nastopila je že naslednja fenološka faza: Predčerašnjim Včeraj Danes
	Sprememba fenološke faze	Naslednja fenološka faza Opis: 5. Predviden datum začetka: 06.05.2021	Potrdi spremembo
	Uporabniške nastavitve		

Slika 3: Spremljanje fenološke faze v Sistemu podpore odločanju o namakanju (SPON).

- **Uporabniške nastavitve**, kjer lahko uporabnik pregleda nastavitve o kulturi, regiji, podatkih o tleh (poljska kapaciteta, točka venenja), zastirki, tehnologiji namakanja, minimalnem in maksimalnem obroku namakanja, strategiji namakanja itd. (slika 4).

Slika 4: Prikaz uporabniških nastavitvev v Sistemu podpore odločanju o namakanju (SPON).

3.3 Analiza izvedljivosti v hmeljarstvu

Prednosti uporabe sistema SPON v hmeljarstvu omogočajo kmetom pravočasno prilagoditev na spremenljive vremenske dogodke, s čimer je povezano preprečevanje in blaženje posledic suše. Sistem omogoča boljšo izkoriščenost že nameščene namakalne opreme ter s tem tudi manjšo porabo vode za namakanje. Zaradi visoke dohodkovne učinkovitosti pridelave hmelja je bila uporaba sistema SPON s strani kmetijskih svetovalcev ocenjena kot zelo priporočljiva ter smiselna.

V hmeljarstvu je potrebno biti še posebej pozoren pri namestitvi opreme, saj je natančnost delovanja odvisna od pravilnosti montaže merilnikov za spremljanje vlažnosti tal. Zaradi specifične izvedbe kapljičnega namakanja v hmeljarstvu (kjer so kapljične cevi nameščene na vrhu žičnice) je bilo v nekaterih primerih, zaradi slabega reagiranja merilnikov, spremljanje količine vode v tleh, v kombinaciji s tehnologijo namakanja, ocenjeno kot zahtevno. S pravilno uporabo sistema SPON se v hmeljarstvu pričakuje povečanje pridelka in njegove kakovosti in s tem povečanje dobička.

3.4 Stroški vzpostavitve in vzdrževanja

Okvirna cena za zagon SPON na eni lokaciji, je okoli 2.400 EUR (leta 2021). Od tega vgradnja opreme za izvajanje meritev vsebnosti vode v tleh stane 1.700 EUR (leto 2021). Komplet vključuje štiri merilnike vsebnosti vode v tleh, vključno s komunikacijsko napravo (modem + SIM kartico), dežemerom, solarnim panelom in polnilno baterijo. Cene med ponudniki se razlikujejo (Preglednica 2). Stroški vzdrževanja se gibljejo okoli 100-200 EUR/letno in so odvisni od garancijskih

pogojev in potreb po svetovanju. Strošek opreme in analiz je lahko za kmete tudi manjši v kolikor se država odloči za finančno podporo preko mehanizma neposrednih plačil v okviru ukrepov investicij v kmetijska gospodarstva in namakalne sisteme.

V preglednici 2 so predstavljeni skupni stroški za postavitev ene merilne naprave na pridelovalni površini v prvem letu.

Preglednica 2: *Skupni stroški za vzpostavitev sistema SPON na terenu v prvem letu (cene za leto 2021).*

VRSTA STROŠKA	Cena (EUR brez DDV)
Laboratorijske analize	
- Pedološke analize (priprava vzorca tal, pH, org. snov, P ₂ O ₅ , K ₂ O, tekstura)	50,00
- Paket analize vodno zadrževalnih lastnosti tal (poljska kapaciteta, točka venenja)	420,00
Oprema za meritve vsebnosti vode v tleh	
- Komplet štirih sond, vključno s komunikacijsko napravo (modem + SIM kartica), dežemerom, solarnim panelom in polnilno baterijo	1.700,00
Mesečne storitve za najem SIM	
- 12 mesečni strošek prenosa podatkov v SPON	30,00
Svetovanja ob priključitvi sistema (kmetijsko svetovanje)	
Svetovanje ter nadzor pri priključitvi v prvem letu	100,00
- Prvi pogovor s kmetom o SPON (1h), Popis namakalnega sistema (1h), Drugi pogovor o fenofazah in uporabi SPON (1h), Občasno vsebinsko svetovanje (1h)	
Tehnična delovanje SPON (Agencija RS za okolje)	
- Vnos novega uporabnika (2h)	100,00
- Posodabljanje in kontrola podatkov (1h)	
STROŠKI SKUPAJ	2.400,00

4 SKLEPI

Model SPON je enostaven za uporabo v trajnih nasadih (npr. hmelj, jablane, vinska trta), kjer ni potrebe po vsakoletnem prestavljanju vgrajenih merilnikov vsebnosti vode v tleh. Merilniki zaradi plitvega koreninskega sistema ne-trajnih rastlin (npr. vrtnine, poljščine) večinoma niso nameščeni dovolj globoko, zaradi česar bi se ob vsakoletni redni obdelavi tal (kot npr. oranje) lahko poškodovali. V izogib poškodbam je potrebno pred vsako obdelavo tal merilnike izkopati in jih po setvi ali sajenju ponovno pravilno vgraditi v okolico mesta, kjer so bila odvzeta tla za analizo vodno zadrževalnih lastnosti tal. Več pozornosti je potrebno nameniti tudi rednemu spremljanju fenofaz rastlin, saj je rastna doba v primerjavi s trajnimi

kulturami običajno krajša, fenofaze se hitreje spreminjajo in imamo lahko v enem letu več različnih kultur na istem mestu.

Kmetovalci, ki se želijo priključiti v sistem SPON, morajo najprej imeti informacije o lastnostih pridelovalne površine (lokacija površine, vodno zadrževalne lastnosti tal ter popis namakalne opreme). Imeti morajo tudi vgrajeno opremo za merjenje vsebnosti vode v tleh. Glede na trenutno stanje znaša okvirna cena za analize vodno zadrževalnih lastnosti tal okoli 450 EUR. Cena kompleta štirih merilnikov vsebnosti vode v tleh, komunikacijske naprave v vodotesnem ohišju s solarnim panelom, SIM kartico, polnilno baterijo ter dežemerom se giblje okoli 1,700.00 EUR.

SPON izračunava priporočila za namakanje, ki so za 25 % nižja od potreb za dosežek PK, zaradi česar se zmanjša verjetnost izgube vode v podtalje, saj se morebitne padavine bolje izkoristijo. Nekajletne pridobljene izkušnje v okviru projekta LIFE ViVaCCAdapt so pokazale, da je z vzdrževanjem omenjene nižje vsebnosti vode v tleh mogoče doseči vsaj 24 % zmanjšanje porabe vode, energije in izpustov CO₂, ki nastajajo zaradi namakanja (Cvejić in sod., 2020).

Izzivov pri vpeljavi SPON je še veliko. Enega izmed večjih predstavlja vprašanje, kam namestiti merilnike vsebnosti vode v tleh, da bodo meritve čim bolj značilne za celotno njivo ali nasad. Pri tem je lahko v veliko pomoč poznavanje heterogenosti lastnosti zemljišča s strani lastnikov oz. obdelovalcev. Posebno pozornost je potrebno nameniti pravilnosti vgradnje merilnikov v tla. Merilniki so namreč zelo občutljive naprave, saj na njihove meritve vplivajo že manjše motnje v tleh, ki jih lahko povzročijo na primer skelet (kamni), odmrli rastlinski deli, drugačna gostota tal, ali mikrozaslojenost tal, ki jo lahko povezana tudi z načinom namakanja. Poleg tega je za čim bolj natančne meritve potrebno preveriti, ali je v danih tleh, ob uporabi izbranega merilnika, potrebna talno specifična kalibracija. Največji izziv pa zagotovo predstavlja izobraževanje pridelovalcev za povečanje zavedanja o pomenu izvajanja strokovno pravičnega namakanja.

Zahvala. Projekt je financiral Evropski kmetijski sklad za razvoj podeželja: Evropa investira v podeželje in Republika Slovenija, št. nepovratnih sredstev 33133–1005/2018/19 (EIP PRO-PRIDELAVA). Prejemnik podpore iz Programa razvoja podeželja RS 2014–2020. Agenciji Republike Slovenije za okolje (ARSO) se zahvaljujemo za pravico do uporabe modela IRRFIB.

5 VIRI

- Abubaker, J. Irrigation scheduling for efficient water use in dry climates. Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Deptment of Soil Sciences. 2009; 49 s.
- Allen, R. G., Perreira, L. S., Raes, D. in Smith, M. Crop evapotranspiration – guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and drainage paper 56. Rome, Food and Agriculture Organization. 1998; 300 s.
- Allen, R.G., Walter, I.A., Elliott, R.L., Howell, T.A., Itenfisu, D., Jensen, M.E., Snyder, R.L. The ASCE standardized reference evapotranspiration equation. Am. Soc. Civil Eng., Reston, VA. 2005
- Bucks, D.A., Allen, S.G., Roth, R.L., Gardner, B.R. Short staple cotton under micro and level-basin irrigation methods. *Irrig. Sci.* 1988; 9, 161–176.
- Cvejić, R., Černič-Istenič, M., Honzak, L., Pečan, U., Železnikar, Š., Pintar, M. Farmers Try to Improve Their Irrigation Practices by Using Daily Irrigation Recommendations—The Vipava Valley Case, Slovenia. *Agronomy*. 2020; 10(9): 1238.
- Darouich, H.M., Pedras, C.M.G., Goncalves, J.M., Pereira, L.S. Drip vs. Surface irrigation: a comparison focusing on water saving and economic returns using multicriteria analysis applied to cotton. *Biosystems Eng.* 2014; 122, 74–90.
- Delta-T Devices. (2016). User manual for the SMT150T soil moisture sensor. Delta-T Devices, Cambridge, VB. Pridobljeno s https://www.delta-t.co.uk/wp-content/uploads/2017/01/SM150_Manual_version_1.2.pdf (27. 11. 2021)
- Evelt, S.R., Schwartz, R.C., Casanova, J.J., Heng, H.K. Soil water sensing for water balance, ET and WUE. *Agric. Water Manage.* 2012; 104 (1), 1–9.
- Hillel, D. Role of irrigation in agricultural systems. V: Stewart B. A., Niel-sen D. R. *Irrigation of Agricultural Crops: Agronomy 30*. American Society of Agronomy. Madison. 1990; 30: 5-30
- Hillel D. Introduction to environmental soil physics. Elsevier/Acad. Press, San Diego, CA. 2004; 494 str.
- Hunsaker, D.J., Clemmens, A.J., Fangmeier, D.D. Cotton response to high frequency irrigation. *Agric. Water Manage.* 1998; 37 (1), 55–74.
- Hunsaker, D., French, A., Waller, P., Bautista, E., Thorp, K., Bronson, K., and Andrade-Sanchez, P. Comparison of traditional and ET-based irrigation scheduling of surface-irrigated cotton in the arid southwestern USA. *Agricultural Water Management*. 2015; 10: 209-224.
- Jackson, R. D. Canopy temperature and crop water stress. *Advance in irrigation volume 1*, Academic Press, New York. 1982; 43-85
- Jensen, M.E., Burman, R.D., Allen, R.G. Evapotranspiration and irrigation requirements, Am. Soc. Civ. Eng. Manuals and Reports on Engineering Practices No. 70, ASCE; New York, N.Y. 1990; 360 str.
- Jones, H.G. Irrigation scheduling: advantages and pitfalls of plant-based methods. *J. Exp. Bot.* 2004; 55 (407), 2427–2436.
- Pereira, L.S., P, Paredes, E.D., Cholpankulov, O.P., Inchenkova, Teodoro, Horst, M.G. Irrigation scheduling strategies for cotton to cope with water scarcity in the Fergana Valley, Central Asia. *Agric. Water Manage.* 2009; 96 (5): 723–735.
- Richards, L.A. A pressure-membrane extraction apparatus for soil solutions. *Soil Sci.* 1941; 51:377–386

- Schindler, U. Ein Schnellverfahren zur Messung der Wasserleitfähigkeit im teilgesättigten Boden an Stechzylinderproben. Arch. Acker- u. Pflanzenbau u. Bodenk. Berlin. 1980; 24, 1–7. Cited in: Peters, A. and Durner, W. Simplified Evaporation Method for Determining Soil Hydraulic Properties, Journal of Hydrology. 2008; 356, 147–162
- Soulis, K., Elmaloglou, S., Dercas, N. Investigating the effects of soil moisture sensors positioning and accuracy on soil moisture based drip irrigation scheduling systems, Agricultural Water Management. 2015; 148: 258-268.
- Sušnik, A. IRRFIB model and its practical usage for drought estimation in Slovenia. In: Maracchi, G., L. Kajfez-Bogataj, S. Orlandini, F. Rossi & M. Barazutti (eds.): Irrigation and pest and disease models: Evaluation in different environments and web-based applications. European Commission, Brussels. 2005; 36-42.
- Sušnik A. Zasnove kazalcev spremljanja suše na kmetijskih površinah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo. 2014; 256 str.
- Tam, S., Irrigation scheduling with tensiometers. V: Water Conservation Factsheet. Ministry of Agriculture and Lands, Canada, Order No. 577. 2006; 100-2, 10 str.
- UMS. Manual HYPROP, Version 2015-01, 96 pp. UMS GmbH, Gmunder Straße 37, Munich, Germany. 2015; URL www.metergroup.com/hyprop-2/#support (27. 11. 2021)
- Valher A. Primerjava modelov za računanje vodne bilance tal. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko. 2016; 81 str.

