

Agrovoc descriptors: hops, humulus lupulus, land varieties, varieties, gene banks, collections, plant breeding, biodiversity, genetic resources, natural resources, data collection, natural resources, genotypes, genetic markers, wild plants, international cooperation, plant breeding, varieties

Agris category code: F30

Vrednotenje genskih virov hmelja z molekulskimi markerji

Andreja ČERENAK¹, Jernej JAKŠE², Nataša ŠTAJNER², Branka JAVORNIK²

Received November 30, 2012; accepted December 05, 2012.

Delo je prispejlo 30. novembra 2012, sprejeto 05. decembra 2012.

IZVLEČEK

Genska banka hmelja zagotavlja dolgoročno gensko pestrost in ohranitev biotske raznovrstnosti v kmetijstvu. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije predstavlja genska banka hmelja zbirko akcesij hmelja, nabranih na naravnih rastiščih hmelja v Sloveniji in na območju bivše Jugoslavije, ter slovenske sorte hmelja. V kolekciji avtohtonega hmelja ženskih rastlin, ki je bila nabrana v začetku sedemdesetih let na območju bivše Jugoslavije, imamo zbranih 25 različnih akcesij hmelja. Zbirko genskih virov hmelja vsako leto povečujemo z novo nabranim materialom. Pri žlahtnjenju novih sort hmelja je takšna kolekcija avtohtonega, genetsko raznolikega materiala izrednega pomena. V članku so predstavljeni rezultati vrednotenja divjih genotipov, pridobljeni z molekulskimi pristopi.

Ključne besede: hmelj, genska banka, molekulski markerji

ABSTRACT

EVALUATION OF HOP GENETIC RESOURCES WITH MOLECULAR MARKERS

Hop gene bank provides long lasting preservation of genetic and biotic diversity in agriculture. At the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing genetic bank presents collection of hop accessions gathered on natural sites in Slovenia and ex-Yugoslavia, and Slovenian varieties as well. In the hop collection of female autochthonous plants we have 25 different accessions which were gathered in the early seventies on territory of ex-Yugoslavia. The hop gene bank is increasing every year with new collected material. In hop breeding program is such collection of autochthonous and genetically diverse material very important. The article presents results of evaluation of wild genotypes with molecular approaches.

Key words: hop, gene bank, molecular markers

1 UVOD

Navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvodomna trajnica iz družine konopljevok (Cannabaceae) in je znotraj družine edina rastlinska vrsta, pomembna v pivovarski industriji. Komercialno pomembna so le zrela ženska socvetja (storžki), zato v hmeljiščih gojimo le ženske rastline. Lupulin, ki nastaja v lupulinskih žlezah storžka, vsebuje različna eterična olja in hmeljne smole, ki dajejo grenkobo in aromo pivu.

V Sloveniji se hmelj prideluje že desetletja in pridelovanje je izrazito izvozno usmerjeno. Svetovni trg, kamor izvozimo preko 90 % slovenskega pridelka hmelja, narekuje vedno nove zahteve po kvaliteti hmelja. Potrebe po novih sortah so na trgu stalno prisotne, kar je posledica spremenjenih potreb po določenem tipu hmelja (hmelj z visokim odstotkom alfa-kislin, aromatični hmelj) ali spremenjene tehnologije pridelovanja oz. pojava novih boleznih in škodljivcev. Pri hmelju enostavna introdukcija iz drugih hmeljarskih območij

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

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

dostikrat ni mogoča, zato na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) poteka žlahtnjenje hmelja že od leta 1952. Večina pridelovalnih površin hmelja (95 %) je v Sloveniji tako posajenih s sortami, ki so bile v tem času vzgojene pri nas. Dosedanje delo na področju žlahtnjenja hmelja v Sloveniji lahko razdelimo na več časovnih obdobj. Rezultat prvega žlahtniteljskega obdobja so štiri 'A sorte': 'Aurora', 'Ahil', 'Atlas' in 'Apolon' (Kralj in Wagner, 1971), ki se odlikujejo po večji količini smol, večjem pridelku in primernosti za strojno obiranje. Dobro se je uveljavila sorta 'Aurora', ki je posajena na okoli 60 % hmeljišč. V letu 1979 so bile priznane tri nove aromatične sorte hmelja serije 'B': 'Bobek', triploidni 'Blisk' in 'Buket' (Kralj in Wagner, 1980). Triploidne sorte hmelja: 'Celeia', 'Cerera', 'Cekin' in 'Cicero', so bile priznane 1990. leta, kot rezultat žlahtnjenja na kakovost Savinjskega goldinga. Vse štiri so pozne, imajo lastnosti aromatičnega hmelja in velik pridelek (Kralj, 1990). Zadnja sorta 'Dana', edina visoko

grenčična sorta, je bila vpisana v slovensko sortno listo leta 2009. V letu 2011 zaključuje 5 novih križancev preizkušanje vrednosti za pridelavo in uporabo v okviru vpisa na sortno listo.

Z razvojem molekularskih metod so se v žlahtnjenju rastlin uveljavili različni molekularski markerji, ki dopolnjujejo dosedanje žlahtniteljsko delo zaradi njihove velike informacijske vrednosti o genetskih lastnostih rastlin. Klasični postopki identifikacije rastlin temeljijo na različnih morfoloških, fenoloških in agronomskih markerjih, vendar je njihova slabost delovna in časovna dolgotrajnost.

Molekularske markerje smo učinkovito uporabili pri dveh raziskavah - določitvi mej v nasadu avtohtonih ženskih rastlin, ki so se v več letih zabrisale in pri določanju genetske strukture divjega hmelja, vzdrževanega v genski banki v Žalcu.

2 MATERIAL IN METODE DELA

2.1 Identifikacija divjih akcesij hmelja

V kolekciji avtohtonega hmelja ženskih rastlin, ki je bila nabrana v začetku sedemdesetih let na območju bivše Jugoslavije, imamo na IHPS zbranih 25 različnih akcesij hmelja. Zaradi objektivnih dejavnikov so se meje med posameznimi akcesijami zabrisale oz. jih na osnovi večletnega fenotipskega opazovanja ni možno določiti. Za natančno razmejitev genotipskih razlik med zbranimi akcesijami smo zato izvedli molekularsko analizo 51. rastlin.

2.1.1 Molekularska analiza

Za identifikacijo 25. divjih akcesij hmelja smo v analizo vključili 51 rastlin. Celokupno genomsko DNA smo ekstrahirali s CTAB metodo po Kump s sod. (1992). RAPD metodo smo izvedli po protokolu Šuštar-Vozlič in

Javornik (1999), pri čemer smo uporabili 9 različnih začetnih oligonukleotidov, namnožene fragmente DNA pa smo analizirali z agarozno elektroforezo. Rastline smo analizirali tudi s pomočjo štirih lokusno specifičnih mikrosatelitov (Brady s sod., 1996) namnoženih v PCR reakciji in ločenih z denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo (Jakše, 2000).

Polimorfne RAPD fragmente in mikrosatelitne alelne polimorfizme smo vnesli v binomsko matriko in izračunali Jaccardov koeficient podobnosti, na podlagi katerega smo s pomočjo UPGMA metode razvrstili genotipe v skupine. Izračuni so bili opravljeni s programskim paketom NTSYS-pc (Rohlf, 1998).

2.2 Genetska struktura divjega hmelja

V analizo genotipizacije in genetske strukture divjega hmelja smo vključili 67 akcesij hmelja. Rastline smo pridobili iz genske banke hmelja v Žalcu, nabrane pa so bile na območju Bosne in Hercegovine (2 genotipa), Hrvaške (4 genotipi), Makedonije (2 genotipa), Srbije (3 genotipi), Slovenije (6 genotipov), Rusije - Altaj (6 genotipov), Japonske (2 genotipa) in Gruzije (5 genotipov).

Celokupno genomsko DNA smo ekstrahirali iz svežih, mladih listov hmelja z modificirano CTAB metodo (Kump in Javornik, 1996). Koncentracijo celokupne genomske DNA proučevanih vzorcev smo izmerili s pomočjo DNA fluorometra DyNA Quant™ 200 (Amersham Bioscience).

2.2.1 Analiza mikrosatelitov

Namnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR z že znanimi začetnimi oligonukleotidi je bilo izvedeno na osnovi protokolov objavljenih v Jakše s sod. (2004) in Štajner s sod. (2005).

PCR vzorce mikrosatelitskih lokusov smo ločevali v poliakrilamidnem denuracijskem gelu (ReproGel High Resolution, Amersham Biosciences) (Štajner, 2003).

Za natančno določanje dolžine mikrosatelitskih alelov smo uporabili dolžinski standard (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 500 bp Amersham Biosciences). Ker med elektroforezo pride do odklona potovanja v različnih delih gela smo za poravnavo fragmentov enake dolžine uporabili notranje standarde. Pri elektroforezi posameznega mikrosatelitskega lokusa smo vedno uporabili 2 interna standarda, krajšega in daljšega od pričakovane dolžine mikrosatelitskih alelov.

Elektroforeza PCR reakcije je potekala na avtomatski laserski napravi ALFexpress II (DNA Analysis System, Amersham Biosciences) in sicer od 200 do 350 min

(odvisno od pričakovane dolžine lokusa), pri temperaturi 55 °C in toku 15 W. Katodni in anodni pufer smo pripravili z 0,5 × koncentriranim TBE.

2.2.2 Določanje dolžine alelov

Rezultat dela po zgoraj opisanih metodah so bili številni geli, ki smo jih analizirali s programsko opremo AlleleLocator 1.03 (Amersham Biosciences). Pri vrednotenju polimorfizma smo najprej določili dolžinski standard in na osnovi tega pridobili informacijo o dolžinah vseh namnoženih fragmentov in preverili dolžine notranjih standardov. Mikrosatelitske alele smo določali v programski opciji, ki v pogledu prikaže krivulje, saj smo tako na osnovi velikosti krivulje lahko bolj zagotovo od alelov ločili tiste namnožitve, ki nastanejo zaradi zdrsa Taq polimeraze v procesu prepisovanja.

2.2.3 Statistična obdelava podatkov

Vrednotenje polimorfizma in genetske sorodnosti

V analizo vrednotenja raznolikosti mikrosatelitskih lokusov smo vključili različne mere variabilnosti: število alelov na lokus, dejansko heterozigotnost (H_o , ki predstavlja delež posameznikov v vzorcu, ki so heterozigotni), pričakovano heterozigotnost (H_e , ki predstavlja delež populacije, ki bi bila heterozigotna, v primeru, da bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja, hkrati pa predstavlja zmožnost markerja za ločevanje med genotipi):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

, kjer je p frekvenca i -tega alela

Informacijska vrednost polimorfizma (PIC) (Botstein in sod., 1980) predstavlja informativnost posameznega markerja oz. stopnjo pri kateri z markerjem nedvoumno določimo genetsko identiteto posameznika in je uporabna predvsem kot merilo primernosti

lokusa za gensko kartiranje. PIC vrednost vključuje tako število alelov odkritih na posameznem lokusu, kot tudi frekvence posameznih alelov:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Navedene mere raznolikosti smo izračunali s programom Identity (1.0 version, University of Vienna).

Genetska oddaljenost med akcesijami je bila izračunana kot log-transformiran delež skupnih alelov med pari hmeljnih akcesij

(Bowcock in sod., 1994). Na osnovi genetske oddaljenosti pa smo s programom Microsat 1.5 (Minch s sod., 1997) naredili matriko, ki smo jo s pomočjo Fitch-Margolism algoritma (Fitch and Margolism, 1967) uporabili za razvrstitev hmeljnih akcesij v skupine. Pri tem smo uporabili program PHYLIP 3.6 verzija (Felsenstein, 1993), aplikacija Fitch.

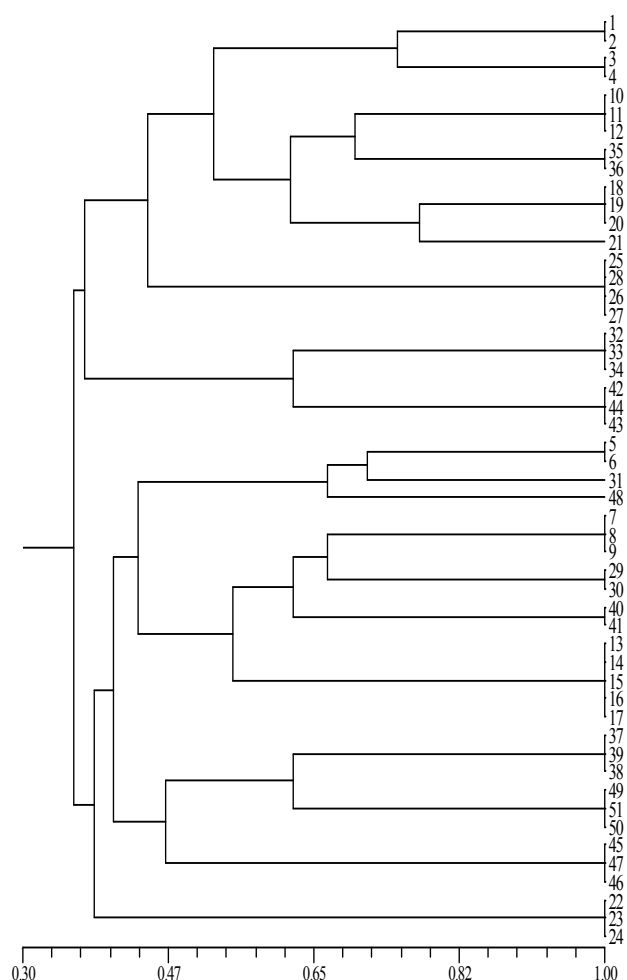
Na osnovi mer genetske oddaljenosti smo z metodo razvrščanja v skupine analizirali genetsko strukturo in število skupin genetske dednine (materiala). Pri tem smo uporabili program Structure (Pritchard s sod., 2000).

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Identifikacija divjih akcesij hmelja

Za uspešno vzgojo novih kultivarjev hmelja je kolekcija avtohtonega, genetsko raznolikega materiala izrednega pomena. Zbirka posajenih rastlin iz geografsko različnih območij in nadaljnja selekcija le-teh predstavlja pomemben člen v žlahtnjenju kmetijskih rastlin.

Z rezultati dveh markerskih sistemov smo lahko razmejili različne akcesije, kar je po dokončnem izrednotenju omogočilo klasifikacijo rastlin v kolekcijskem nasadu avtohtonega hmelja. Skupno smo našli 20 različnih genotipov (sl. 1). V enem primeru ima pet zaporednih rastlin isti genotip, drugače pa so isti genotipi zastopani z dvema ali tremi rastlinami. V dveh primerih pa je ostala v nasadu le še po ena rastlina nekega genotipa. Uporabljeni RAPD in mikrosatelitni markerji so dali identične rezultate.

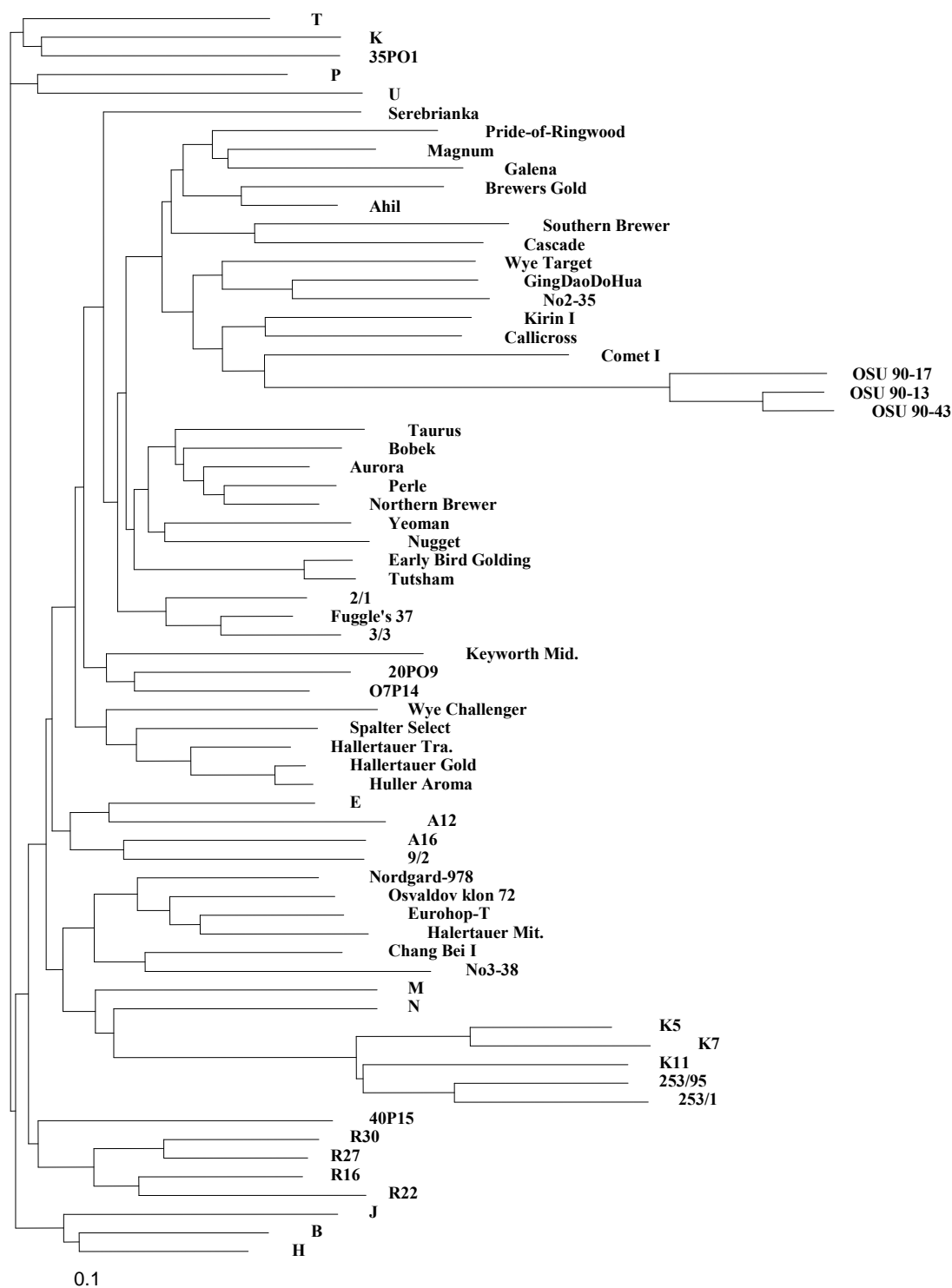


Slika 1: Analiza 51 rastlin v genski banki hmelja z Jaccardovim koeficientom podobnosti (razvidna je razdelitev na 20 različnih genotipov v skladu s sadilnimi mesti v vrsti)

3.2 Genetska struktura divjega hmelja

Genetska diverziteta hmelja je že bila obravnavana pri različnih skupinah akcesij in kultiviranega hmelja (Murakami in sod., 2006; Jakše in sod., 2004), vendar pa slednja (Štajner in sod., 2008) predstavlja analizo z največjim številom uporabljenih mikrosatelitnih markerjev.

V analizi so se genotipi iz Kavkaza (K5, K7, K11, 253/95 in 253/1) razporedili v isto skupino, medtem ko so se genotipi, nabrani na divjih rastiščih bivše Jugoslavije, razporedili v dve manjši skupini (prva skupina genotipi T, K, P, 35P01, U in druga skupina J, B in H. Skupina ruskih divjih genotipov (R30, R27, R22 in R16) se je v skladu s podatki o najdiščih razporedila v isto skupino.



Slika 2: NJ dendrogram 67-ih akcesij hmelja narejen na osnovi matrike podobnosti koeficienta Dps' (1-delež skupnih alelov).

Pomembna aplikacija molekularnih markerjev je vrednotenje genske raznolikosti rastlinskih genotipov, kar smo povzeli v članku. Rezultati

imajo uporabno vrednost pri identifikaciji genotipov in so pomemben vir informacij za žlahtnjenje hmelja.

4 VIRI

- Abbott, M. S., Fedele, M. J. 1994. A DNA based varietal identification procedure for hop leaf tissue. *Journal of the institute of brewing*, 100, p. 283-285.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, s. 314-331.
- Brady, J. L., Scott, N. S., Thomas, M. R. 1996. DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica*, 91, p. 277-284.
- Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368, s. 455-457.
- Eurostat, 2011. European Commission eurostat [Database on the Internet]. [cited 2011 August]. Available from <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics. University of Washington, Seattle
- Fitch, W.M., Margoliash, E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, s. 279-284.
- Haunold, A. 1991. Cytology and Cytogenetics of Hops. In: *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution*, Part B. Ed. by Tsuchiya T. & Gupta P.K., (Elsevier Sci. Publish.). p. 551-563.
- Jakše, J. 2000. Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja (*Humulus lupulus* L.) z mikrosatelitnimi markerji. Magistrsko delo, 89 s.
- Jakše, J., Šatović, Z., Javornik, B. 2004. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 47, s. 889-899.
- Kralj, D. 1990. Novi hmeljarski kultivarji: cerera, celeia, cekin in cicero. *Hmeljar*, 3, s. 3.
- Kralj, D., Friškovec, I. 1993. Hmeljni kultivarji v Sloveniji. *Hmeljar*, 63, s. 23-28.
- Kralj, D., Wagner, T. 1971. Prve slovenske sorte hmelja. *Sodobno kmetijstvo*, 9, s. 408-411.
- Kralj, D., Wagner, T. 1980. Novi slovenski kultivarji hmelja – bobek, blisk in buket. *Sodobno kmetijstvo*, 7-8, s. 281-286.
- Kump, B., Svetek, S., Javornik, B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo*, 59, s. 63-66.
- Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L. 1997. MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, ver. 1.5d. Stanford University, Stanford, CA
<http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat>
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 3, s. 583-590.
- Polley, A., Seigner, E., Ganai, M. W. 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*, 40, s. 357-361.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, s. 945-959.
- Rohlf, J. F. 1998. NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. Exeter software, Setauket, New York, USA.
- Štajner, N. 2003. Razvoj novih mikrosatelitskih DNA markerjev za genotipizacijo in gensko kartiranje hmelja (*Humulus lupulus* L.): doktorska disertacija = Isolation of microsatellites and their use for genotyping and mapping of hop (*Humulus lupulus* L.): doctoral dissertation. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, s. 93.
- Štajner, N., Jakše, J., Kozjak, P., Javornik, B. 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 168, s. 213-221.
- Štajner, N., Šatović, Z., Čerenak, A., Javornik, B. 2008. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. *Euphytica*, vol. 161, no. 1-2, p. 301-311.
- Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B. 1999. Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant breeding*, 118, s. 175-181.