

REGENERACIJA IZ RAZLIČNIH IZSEČKOV PRI SORTI HMELJA AURORA

Suzana ŠKOF¹, Zlata LUTHAR²

UDK/UDC 633.791:57.084/.085 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 17. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Proučevali smo odzivnost treh vrst izsečkov: internodijev, listnih pecljev (petiol) in listnih diskov ter odstotek regeneracije pri sorti hmelja Aurora na treh gojiščih z različno vsebnostjo citokininov. Uspelo nam je dvigniti uspešnost regeneracije na gojišču z visoko vsebnostjo citokina in s selekcijo odzivnejšega genotipa. Najvišji odstotek regeneracije (17,7 %) smo dosegli z odzivnejšim genotipom Aurore na internodijih na gojišču z 2iP (N⁶-(2-izopentenil) adenin) 6 mg/l. Listni peclji so imeli najboljšo regeneracijo na istem gojišču (8,6 %), vendar so bili manj regenerativni kot internodiji. Listni diski so imeli najnižji odstotek regeneracije, vendar je bila regeneracija najbolj učinkovita na gojiščih z zeatin ribozidom 2 in 3 mg/l (4,2%).

Ključne besede: hmelj, regeneracija, tkivna kultura, citokinin

REGENERATION EFFICIENCY OF DIFFERENT EXPLANT TYPES OF HOP CV. AURORA

ABSTRACT

The regeneration capacity of different types of hop cv. Aurora explants (internodes, petioles and leaf disks) on three media with different cytokinines contents was tested. We managed to increase the regeneration efficiency on medium with a high cytokinin content and by the selection of a more responsive genotype. The highest rate of regeneration of internodal explants (17.7 %) was achieved with a more responsive genotype of cv. Aurora on medium supplemented with 2iP (N⁶-(2-isopentenyl) adenine) 6 mg/l. A lower efficiency of regeneration was observed with petioles as explants, with the best regeneration rate on the same medium (8.6 %). Leaf disks were the least responsive, with the highest rate of explants with shoots on medium with zeatin riboside 2 and 3 mg/l (4.2 %).

Key words: hop, regeneration, tissue culture, cytokinin

¹ asist., univ. dipl. ing. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

² izr. prof., dr., ibid

1 UVOD

Učinkovita *in vitro* regeneracija je osnovni predpogoj za genske transformacije. Hmelj je za regeneracijo v tkivni kulturi težavna rastlina in le omejeno število avtorjev poroča o učinkoviti regeneraciji hmelja, največkrat preko oblikovanja kalusa na izsečkih. Objavljeni so postopki regeneracije bodisi pri divjih varietetah [1, 2], bodisi pri nekaj komercialnih sortah hmelja [9, 3, 7, 6, 12, 8]. Direktno regeneracijo dveh čeških kultivarjev hmelja sta dosegla Rakouský in Matoušek [11]. O izboljšanju regeneracije slovenskega kultivarja Aurora poročajo tudi Ferant in sod. [5]. Različni izsečki (internodiji, listni peclji in listni diski) so bili različno odzivni, največjo sposobnost regeneracije so imeli večinoma internodiji in samo v enem primeru listni peclji [2]. Najpogosteje proučevani rastni hormoni za indukcijo regeneracije so bili indol-3-ocetna kislina (IAA), indole-3-maslena kislina (IBA), kinetin, 6-benzilaminopurin (BAP), zeatin ter tidiazuron (TDZ). Citokinini so najbolj vplivali na sposobnost regeneracije [12]. Vrsta in koncentracija uporabljenega citokinina je bila bistvena za organogeno sposobnost *in vitro* gojenih tkiv tudi pri drugih rastlinskih vrstah [4]. Uspešnost regeneracije pri hmelju je močno odvisna od genotipa [6], zato je potrebno prilagoditi protokol regeneracije za vsako sorto/kultivar posebej.

Z visoko koncentracijo citokinina v regeneracijskem gojišču in selekcijo odzivnega genotipa smo poskušali zvišati odstotek regeneracije pri najbolj razširjeni slovenski sorti hmelja Aurora, ki se je že v prejšnjih raziskavah izkazala za slabo regenerativno sorto z zelo nihajočim odstotkom regeneracije [12, 5].

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Uporabili smo rastline slovenske sorte hmelja Aurora iz kolekcije Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Poganjke hmelja smo gojili *in vitro* na mikropropagacijskem gojišču v steklenih kozarčkih [5]. Vsake 6–8 tednov smo narezali hmelj na izsečke z nodiji in jih subkultivirali na sveže mikropropagacijsko gojišče in jih tako razmnožili. Rastline smo gojili v rastni komori pri 16/8 h (svetloba/tema) fotoperiodi in temperaturi 24 ± 1 °C ter osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Regeneracija

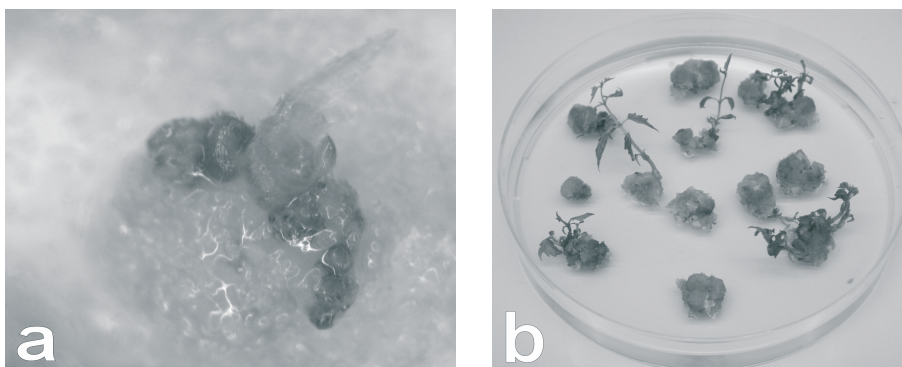
Za učinkovitost regeneracije smo uporabili tri tipe izsečkov: internodije, listne peclje in listne diske sorte hmelja Aurora. Izsečke smo gojili v petrijevkah na treh različnih gojiščih pod istimi pogoji kot pri mikropropagaciji hmelja. Gojišča za regeneracijo so bila sestavljena kot je opisano v Okada in sod. [10] z izjemo vsebnosti citokinina, ki je bil pri gojišču A 2iP (N^6 -(2-izopentenil) adenin) v koncentraciji 6 mg/l, pri gojiščih B in C pa zeatin ribozid v koncentracijah 2 oz. 3 mg/l. Frekvenco regeneracije smo ocenjevali v dvo tedenskih intervalih do treh mesecev po inokulaciji izsečkov. Na vsako gojišče smo inokulirali vsaj 100 izsečkov vsakega tipa in poskus vsaj dvakrat ponovili in izračunali skupni odstotek regeneracije. Kot regenerativni izseček smo upoštevali tistega, ki je imel vsaj 1 cm velik regenerant oz. regenerante.

Regenerante smo nato prestavili na gojišče za izdolževanje in koreninjenje poganjkov, enake sestave kot gojišče za mikropropagacijo, le namesto citokinina BAP smo dodali avksin IBA 0,1 mg/l.

3 REZULTATI

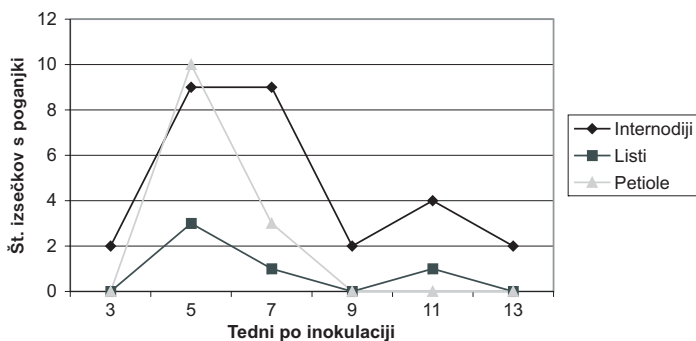
Kalusno tkivo se je začelo formirati na koncih oz. reznih ploskvah internodijev v 8-10 dneh po inokulaciji. Na listnih pecljih se je formiralo zelo veliko kalusnega tkiva, več kot na internodijih, medtem ko je na listnih diskih nastalo le malo kalusa ob robovih listne oz. rezne ploskve.

Prve organogene strukture - globule (slika 1a) so se začele pojavljati na kalusu že po 10-14 dneh po inokulaciji in prvi regeneranti (slika 1b) že po 8 dneh po inokulaciji na gojišču B in C ter po 20 dneh na gojišču A. Večina regenerantov je nastala v enem do dveh mesecih, največ v petem tednu po inokulaciji (slika 2 in 3).



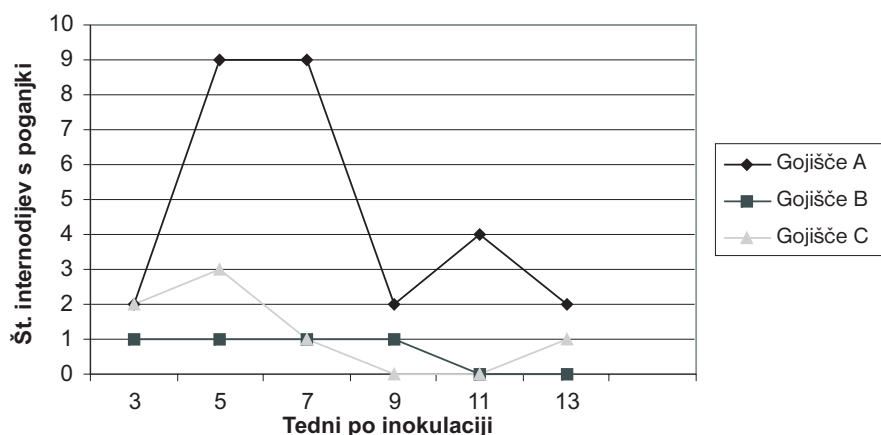
Slika 1: Regeneracija sorte hmelja Aurora na internodijih na gojišču A: a - organogene strukture na kalusu; b - regeneranti na kalusu

Figure 1: Shoots of hop cv. Aurora emerging on internodal explants on medium A: a - organogenic structures on callus; b - shoots on callus



Slika 2: Regeneracija sorte hmelja Aurora na internodijih, listnih pecljih in listnih diskih na gojišču A v dvotedenskih intervalih

Figure 2: Regeneration of hop cv. Aurora from internodes, petioles and leaf disks explants on medium A in two weeks intervals



Slika 3: Regeneracija hmelja cv. Aurora na internodijih na gojiščih A, B in C v dvotedenskih intervalih
Figure 3: Regeneration of hop cv. Aurora from internodes on media A, B in C in two weeks intervals

Tri mesece po inokulaciji izsečkov na gojiščih za regeneracijo smo prešteli samo tiste izsečke, na katerih so nastali vsaj 1 cm dolgi poganjki (preglednica 1).

Preglednica 1: Učinkovitost regeneracije iz internodijev, listnih pecljev in listnih diskov sorte hmelja Aurora na različnih gojiščih

Table 1: Regeneration efficiency from internodes, petioles and leaf disks of hop cv. Aurora on different culture media

Gojišče	Internodiji s poganjki* (%)		Petiole s poganjki* (%) genotip RN/330	Listni diski s poganjki* (%) genotip RN/330
	Genotip RN/330	Ostali genotipi		
A	17,7	11,1	8,6	3,7
B	5,8	2,9	0	4,2
C	7,2	4,2	7,3	4,2

* Upoštevali smo samo izsečke z vsaj 1 cm velikimi poganjki

Ugotovili smo, da je specifičen genotip Aurore, ki smo ga poimenovali RN/330, bolj odziven kot preostali genotipi, saj smo dobili višje odstotke internodijev s poganjki na vseh gojiščih in sicer 17,7 % na gojišču A, 5,8 % na gojišču B in 7,2 % na gojišču C (preglednica 1) v primerjavi s preostalimi genotipi, ki so imeli 11,1 %, 2,9 % oz. 4,2 % regenerativnih internodijev na gojiščih A, B oz. C.

Odstotek regeneracije pri listnih pecljih je bil najvišji 8,6 % na gojišču A, 7,3 % na gojišču C, na gojišču B pa regenerantov ni bilo (preglednica 1). Regeneracija poganjkov na listnih diskih je bila najboljša 4,2 % na gojiščih B in C, nekoliko nižja 3,7 % pa na gojišču A.

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

Proučevali smo uspešnost regeneracije v tkivni kulturi sorte hmelja Aurora. Preizkusili smo odzivnost treh vrst izsečkov: internodijev, listnih pecljev in listnih diskov na treh gojiščih z različno vsebnostjo citokininov (2iP 6 mg/l; zeatin ribozid 2 in 3 mg/l).

Regeneracija pri hmelju je močno odvisna od genotipa [6], zato smo poskušali dvigniti odstotek regeneracije s selekcijo odzivnejšega genotipa. Tudi drugi avtorji [1, 5] poročajo o razlikah v regeneracijski sposobnosti med različnimi genotipi in o problemih stabilne regeneracije. Sorta Aurora se je že v prejšnjih raziskavah izkazala za slabo odzivno sorto [12] z nizko regenerativno sposobnostjo. S predhodno regeneracijo *in vitro* iz internodijev (podatki niso prikazani) nam je uspelo pridobiti odzivnejši genotip (RN/330) Aurore, ki je pokazal na vseh preizkušanih gojiščih višji odstotek regeneracije kot preostali genotipi Aurore. Pri odzivnejšem genotipu RN/330 je bila dosežena stabilna regeneracija, ki je zelo malo variirala med ponovitvami, medtem ko je pri ostalih genotipih znotraj sorte Aurora odstotek regeneracije zelo nihal. Najvišji odstotek regeneracije (17,7 % internodijev s poganjki) smo dosegli na internodijih odzivnejšega genotipa na gojišču A z 2iP 6 mg/l v primerjavi s preostalimi genotipi, ki so na istem gojišču imeli le 11,1 % regeneracijo. Naš najvišji odstotek regeneracije je višji od doslej objavljenih rezultatov pri sorti Aurora. Ferant in sod. [5] poročajo o najboljši regeneraciji (12,5 %) pri Aurori na gojišču z dodatkom 3,5 mg/l citokinina BAP. Šuštar-Vozlič in sod. [12] so dosegli enak najvišji odstotek regeneriranih izsečkov (12,5 %) na gojišču z dodatkom 5 mg/l kinetina. Oboji poročajo, da so najbolj odzivni tip izsečkov internodiji, medtem ko so bili listni peclji manj odzivni, listi pa sploh ne. Tudi večina drugih avtorjev poroča o internodijih kot najprimernejših izsečkih za regeneracijo [11, 1, 6, 12, 8]. V našem primeru so imeli listni peclji najboljšo regeneracijo (8,6 %) na istem gojišču kot internodiji (gojišče A z 2iP 6 mg/l), vendar so bili manj regenerativni kot internodiji (17,7 %). Listni diski so imeli najnižji odstotek regeneracije, vendar je bila regeneracija najbolj učinkovita na gojiščih z zeatin ribozidom 2 in 3 mg/l (4,2 %). Listni peclji so bili najbolj regenerativni pri varieteti hmelja Eroica [2], nihče pa ne poroča o uspešni regeneraciji iz listnih diskov.

Rezultati naše študije nam bodo služili kot osnova za novejšo biotehnološke metode vnosa genov z namenom izboljšati agronomsko pomembne lastnosti (npr. odpornost na bolezni) v najbolj razširjeno slovensko sorto hmelja.

5 LITERATURA

1. Batista, D., Sousa, M.J., Pais, M.S., Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Bragança and var. Brewers's Gold.- In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 32(1996) s. 37-41.
2. Batista, D., Ascensão, L., Sousa, M.J., Pais, M.S., Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures.- Plant Science, 151(2000) s. 47-57.

3. Connell, S.A., Heale, J.B., Development of an *in vitro* selection system for novel sources of resistance to Verticillium wilt in hops.- V: Withers, L., Anderson, P.G. (ur.) Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworth, London, (1986) s. 451-459.
4. D'Onofrio, C., Morini, S., Development of adventitious shoots from in vitro grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration.- *Biologia Plantarum*, 49(2005) s. 17-21.
5. Ferant, N., Javornik, B., Luthar, Z., Regeneracija hmelja (*Humulus lupulus* L.) pri cv. Aurora.- *Hmeljarski bilten*, 8(2001) s. 19-25.
6. Gurriarán, M.J., Revilla, M.A., Tamés, R.S., Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brevers Gold and Nugget.- *Plant Cell Reports*, 18(1999) s. 1007-1011.
7. Heale, J.B., Legg, T., Connell, S., *Humulus lupulus* L. (Hop): *in vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance.- V: Bajaj, Y.P.S. (ur.) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin Heidelberg New York, (1989) s. 264-285.
8. Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M., Weber, G., Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.).- *Plant Cell Reports*, 22(2003) s. 210-217.
9. Motegi, T., Differentiation of shoots from hop stem callus culture.- *Kyoyubo kenkyu Neupo Iwate Ika Daigaku*, 14(1979) s. 15-17.
10. Okada, Y., Saeki, K., Inaba, A., Suda, N., Kaneko, T., Ito, K., Construction of a gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter.- *Journal of Plant Physiology*, 160(2003) s.1101-1108.
11. Rakouský, S., Matoušek, J., Direct organogenesis in hop-a prerequisite for the application of *A. tumefaciens*-mediated transformation.- *Biologia Plantarum*, 36(1994) s. 191-200.
12. Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Bohanec, B., Studies of Somaclonal Variation in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Phyton-Annales Reis Botanica*, 39(1999) s. 283-287.