

Urszula Skomra, Marcin Przybyś, Anna Trojak-Goluch

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

KIERUNKI BADAŃ NAUKOWYCH WSPIERAJĄCE DOSKONALENIE GENOTYPÓW CHMIELU*

Wstęp

Doskonalenie odmian chmielu jest jednym z najważniejszych czynników wzrostu produkcji. Wielkość i tempo postępu hodowlanego w chmielarstwie zależą od wykorzystania osiągnięć naukowych w zakresie genetycznych podstaw procesów i zjawisk związanych z ulepszaniem genotypów chmielu, a także wdrażania nowoczesnych metod wspierających prace hodowlane. W tworzeniu nowych odmian coraz szerzej wykorzystywane są techniki molekularne, ułatwiające dobór odpowiednich form rodzicielskich do krzyżowań oraz selekcję uzyskanych materiałów pod kątem pożądanых cech. Ulepszanie odmian chmielu wspomagane jest również metodami biotechnologicznymi, takimi jak poliploidyzacja genomów lub kultury tkankowe w warunkach *in vitro*. Zastosowanie nowoczesnych technologii do ulepszania genotypów chmielu będzie w najbliższej przyszłości jednym z najistotniejszych czynników wpływających na dynamikę postępu biologicznego w produkcji tego gatunku.

I. Markery molekularne

Rozwój technik molekularnych spowodował powstanie licznych systemów markerów molekularnych wspomagających prace hodowlane. Stwarza to możliwość prowadzenia selekcji roślin w oparciu o genotyp, a nie tylko na podstawie obserwacji fenotypowych. Dzięki temu proces selekcji został znacznie skrócony i przede wszystkim uniezależniony od warunków środowiska. Markery molekularne pozwalają na wykrywanie różnic w genomie na poziomie sekwencji nukleotydowej. Mogą więc być bardzo przydatnym narzędziem do precyzyjnego rozróżniania odmian chmielu, ustalania ich pokrewieństwa, określania płci potomstwa oraz wykrywania obecności genów warunkujących odporność na choroby lub szkodniki, a także cechy jakościowe.

Znajomość genetycznego zróżnicowania odmian chmielu oraz stopnia ich pokrewieństwa jest szczególnie istotna dla hodowców, pomaga bowiem w precyzyj-

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

nym konstruowaniu programów hodowlanych. Dobór odpowiednich partnerów do krzyżowań pozwala realizować strategie hodowlane skierowane na uzyskanie różnorodnych celów. Prawidłowa identyfikacja genotypów chmielu jest również podstawą funkcjonowania banków genów. Cechy morfologiczne roślin oraz skład chemiczny szyszek podlegają wpływom warunków środowiskowych, dlatego charakteryzują się dużą zmiennością w latach i rejonach uprawy. Z tego powodu identyfikacja genotypów chmielu w oparciu o obserwacje roślin i analizy chemiczne surowca bywa niewystarczająca, szczególnie w przypadku braku danych o pochodzeniu obiektów. Analiza zmienności na poziomie DNA umożliwia prawidłową identyfikację genotypów podobnych czy wręcz identycznych pod względem genetycznym, a także pozwala na uzyskanie precyzyjnych informacji o pochodzeniu odmian oraz ich pokrewieństwie. Prawidłowa identyfikacja odmian chmielu jest również istotna dla przemysłu piwowarskiego. Każda odmiana chmielu jest specyficzna pod względem zawartości oraz składu żywic i olejków chmielowych, nadaje więc piwu charakterystyczny smak i aromat. Skład chemiczny szyszek chmielowych jest w dużym stopniu modyfikowany przez czynniki glebowe i klimatyczne w poszczególnych rejonach uprawy chmielu oraz latach zbioru. Z tego powodu rozróżnianie odmian chmielu na podstawie parametrów chemicznych bywa zawodne, a w przypadku mieszaniny odmian jest właściwie niemożliwe. Metody molekularne oparte na analizie DNA rozwiązują te problemy, ponieważ wspomagają i ostatecznie potwierdzają rezultaty uzyskane na podstawie badań morfologicznych oraz analiz chemicznych.

Jeszcze kilka lat temu najczęściej wykorzystywaną techniką do identyfikacji odmian chmielu była metoda RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*). Polega ona na losowej amplifikacji polimorficznego DNA, dzięki zastosowaniu do reakcji PCR jednego dziesięcionukleotydowego startera o dowolnie wybranej sekwencji, co prowadzi do uzyskania kilku bądź kilkunastu produktów. T s u c h i y a i i n. (51) wykorzystali tę metodę do odróżnienia 12 komercyjnych odmian chmielu oraz potwierdzili jej skuteczność w rozpoznawaniu mieszaniny odmian. Š u s t a r - V o z l i č i J a v o r n i k (48) wykorzystali technikę RAPD do rozróżniania 65 odmian chmielu pochodzących z całego świata. Udało im się sklasyfikować poszczególne odmiany do grup europejskiej i północnoamerykańskiej. Użyteczność stosowania tej metody została również potwierdzona w kolejnych badaniach (30, 34). W ostatnich latach obserwuje się odejście od markerów molekularnych RAPD na rzecz markerów AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*) oraz mikrosatelitarnych. Jest to spowodowane tym, że markery RAPD, pomimo swojej prostoty i łatwości generowania, mają jedną zasadniczą wadę – niską powtarzalność, wynikającą głównie z obniżonej temperatury przyłączania starterów podczas reakcji PCR. Uzyskiwanie markerów AFLP polega na trawieniu zidentyfikowanego DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi, które różnią się częstością rozpoznawania miejsc restrykcyjnych (52). Pierwszy enzym – najczęściej *EcoRI*, trawi DNA z małą

częstością, natomiast drugi – *MseI* – z dużą. W wyniku działania enzymów otrzymuje się liczne fragmenty DNA, do których w kolejnym etapie AFLP dołączane są 10-30 nukleotydowe adaptory. Zawierają one dwie części – sekwencję rdzeniową o długości kilkunastu nukleotydów oraz sekwencję specyficzną dla miejsca restrykcyjnego. Na podstawie sekwencji adaptorów syntetyzuje się startery AFLP, które składają się z trzech części: regionu homologicznego do części rdzeniowej adaptoru (przy końcu 5'), części środkowej odpowiadającej sekwencji miejsca restrykcyjnego oraz części selekcyjnej (przy końcu 3'). Po przyłączeniu adaptorów, DNA jest poddawane dwóm amplifikacjom PCR – preamplifikacji oraz selektywnej amplifikacji. Te dwa ostatnie etapy przebiegają z użyciem specyficznych starterów posiadających przy końcu 3' od jednego (w przypadku preamplifikacji) do czterech selekcyjnych nukleotydów (w przypadku selektywnej amplifikacji). Liczba nukleotydów obecnych przy końcu 3' startera zastosowanego w ostatnim etapie AFLP warunkuje liczbę otrzymanych fragmentów DNA. Im jest ich mniej, tym liczba uzyskanych w efekcie produktów PCR jest większa (52). Badania prowadzone z wykorzystaniem markerów AFLP pozwoliły na określenie zakresu zróżnicowania genetycznego wśród odmian uprawnych chmielu oraz źródeł ich pochodzenia (16, 38, 50). Większość badaczy wyróżniła dwie główne grupy odmian, odzwierciedlające ich pochodzenie oraz kierunki hodowli. Pierwsza grupa obejmuje głównie genotypy aromatyczne, wywodzące się od odmiany botanicznej *Humulus lupulus var. lupulus* występującej na terenie Europy, natomiast druga grupa zawiera odmiany gorczykowe, uzyskane przez krzyżowanie form europejskich z dzikimi genotypami północnoamerykańskimi.

Mikrosatelity, czyli proste powtórzenia sekwencji (SSR) (ang. *simple sequence repeats*) są krótkimi (1-5 par zasad), powtarzającymi się okresowo fragmentami sekwencji DNA, które w dużej liczbie występują w genomach eukariotycznych. Zmienność długości mikrosatelit wynika ze zmian w liczbie powtórzeń wspomnianych krótkich fragmentów, które są łatwo wykrywane za pomocą reakcji PCR (44). Dużą zaletą markerów mikrosatelitarnych jest ich kodominujący charakter, pozwalający na rozróżnienie u heterozygot komponentów pochodzących od form rodzicielskich. Pierwsze badania nad mikrosatelitami u chmielu prowadzili B r a d y i i n. (6). Wyselekcjonowali oni 4 markery mikrosatelitarne użyteczne w określaniu zróżnicowania genetycznego chmielu uprawnego i dzikiego. Podobne badania prowadzili J a k š e i i n. (21), którzy dla czterech *loci* mikrosatelitarnych zidentyfikowali 63 allele. W późniejszym okresie opracowano 25 markerów mikrosatelitarnych, o motywach GA, GT, ACA, AGA, CAG i ACTC, które amplifikowały 256 różnych alleli (44). J a k š e i i n. (20) podjęli próbę porównania możliwości określenia zmienności genetycznej za pomocą dwóch rodzajów markerów molekularnych: mikrosatelit i AFLP. Uzyskane metodą UPGMA dendrogramy pokrewieństw genetycznych badanych genotypów chmielu wykazywały niską korelację między dwoma systemami markerów. Dendrogram stworzony dla markerów mikrosatelitarnych

wykazywał dość dobre grupowanie spokrewnionych genotypów chmielu, podczas gdy dendrogram AFLP lepiej odwzorowywał pokrewieństwa ściśle związanych ze sobą genotypów, a ponadto umożliwił odróżnienie geograficznie odległych genotypów.

Do oceny zróżnicowania genetycznego chmielu na podstawie jego rDNA, wykorzystywane były także markery molekularne RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) (35). Technika RFLP polega na generowaniu wielu fragmentów DNA powstających w czasie specyficznego trawienia za pomocą enzymów restrykcyjnych rozpoznających określone miejsca w łańcuchu DNA. Polimorfizm generowanych fragmentów wynika głównie z mutacji w miejscach restrykcyjnych. W chmielu rDNA występuje w dwóch wariantach długości 10,3 i 9,3 tysięcy par zasad i jest reprezentowane przez 3 fenotypy: A, B i C, które udało się ustalić dzięki zastosowaniu do trawienia restryktazy XhoI (35). Wyniki przeprowadzonych badań z wykorzystaniem markerów RFLP pozwoliły na stwierdzenie, że północnoamerykańskie odmiany chmielu wywodzą się ze skrzyżowania genotypów europejskich z miejscowymi – północnoamerykańskimi.

Techniki molekularne okazały się również niezwykle przydatnym narzędziem wspomagającym selekcję pożądanych genotypów chmielu w pracach hodowlanych. Markery molekularne związane z określonymi cechami pozwalają na szybką identyfikację właściwych osobników we wczesnych fazach rozwojowych roślin, co znacznie przyspiesza proces selekcji. W przypadku chmielu, który jest gatunkiem dwupiennym, niezwykle istotne jest wczesne rozpoznanie płci poszczególnych osobników. Jedynie osobniki żeńskie wytwarzają szyszki będące surowcem dla przemysłu piwowarskiego, dlatego podlegają one wielokierunkowej ocenie i selekcji w warunkach polowych. Obecność osobników męskich na plantacji jest niepożądana, ponieważ powodują one zapylenie kwiatostanów, a w konsekwencji wytworzenie nasion w szyszkach. Szyszki zawierające nasiona charakteryzują się gorszymi cechami jakościowymi, co utrudnia selekcję perspektywicznych genotypów. Zastosowanie markerów molekularnych pozwala na określenie płci roślin chmielu w fazie siewek. Eliminuje to konieczność oczekiwania na wytworzenie kwiatostanów, co w przypadku chmielu trwa zwykle 2-3 lata od wysiania nasion. W ostatnich latach opracowano markery mikrosatelitarne, stosowane do rozróżniania płci, wykrywające osobniki męskie. Zostały one opracowane dla chmielu europejskiego, północnoamerykańskiego i japońskiego (22). Do rozróżniania płci chmielu wykorzystano również markery ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*). Duży polimorfizm markerów ISSR bazuje na dużej liczbie i wysokiej zmienności mikrosatelit w genomie. Startery reakcji PCR w tej technice zawierają fragmenty komplementarne do motywów mikrosatelit, ale również 1-3 nukleotydowe kotwice na końcu 5' lub 3'. Pozwalają one na amplifikację regionów pomiędzy sąsiadującymi motywami mikrosatelitarnymi (10). Testowano 25 starterów ISSR na chmielu pochodzącym

z Rosji i Europy. Dwa z nich generowały fragmenty specyficzne dla męskich roślin chmielu. Na podstawie sekwencji tych fragmentów opracowano dwie pary starterów dla markerów STS (ang. *sequence tagged site*) użytecznych do wykrywania osobników męskich (10).

Głównym zadaniem prac hodowlanych jest uzyskanie odmian chmielu odpowiadających wymaganiom przemysłu piwowarskiego oraz plantatorów. Podstawowymi cechami branymi pod uwagę w ocenie wartości odmian są potencjał plonowania i zawartość alfa kwasów. Cechy te oceniane są w roślinach chmielu bezpośrednio na podstawie pomiaru wielkości plonu szyszek oraz ich analizy chemicznej. Najczęściej pierwsze wyniki plonowania i zawartości alfa kwasów można uzyskać w trzecim roku wzrostu roślin w warunkach polowych, przy czym ocenę należy prowadzić przez kilka lat ze względu na duże uzależnienie tych cech od warunków pogodowych, szczególnie u roślin młodych. Powoduje to znaczne wydłużenie cyklu hodowlanego. W celu przyspieszenia selekcji oraz zwiększenia efektywności prac hodowlanych podejmowane są próby odnajdywania *loci* cech ilościowych QTL (ang. *quantitative trait loci*), dotyczących zawartości alfa kwasów oraz plonu. Č e r e n a k i J a v o r n i k (8) wykorzystały markery AFLP i mikrosatelitarne do poszukiwania *loci* związanych z syntezą alfa kwasów. Analiza wyników wykazała istnienie 4 potencjalnych QTL-ów (alpha 1-4). Dalsze badania doprowadziły do odnalezienia potencjalnych QTL-ów dla plonu oraz wagi suchych szyszek (9, 19).

Ważnym kierunkiem hodowli chmielu jest odporność na choroby i szkodniki. Klasyczna hodowla odpornościowa opiera się na selekcji prowadzonej w warunkach dużego nasilenia czynnika chorobotwórczego. Mogą to być warunki naturalne lub sztuczne, jednak w obu przypadkach selekcji pożądanych genotypów dokonuje się na podstawie reakcji rośliny gospodarza na czynnik chorobotwórczy. Reakcja ta może wyrażać się poprzez występowanie objawów chorobowych o różnym nasileniu, wówczas selekcję pożądanych pojedynków można przeprowadzić na podstawie obserwacji symptomów. W przypadku braku objawów choroby stosuje się laboratoryjne metody oceny, takie jak serologiczny test ELISA lub analiza PCR. Testy biologiczne posiadają wiele ograniczeń. Przede wszystkim są uzależnione od warunków środowiska, fazy rozwojowej rośliny gospodarza oraz patogeniczności czynnika chorobotwórczego. Wymagają dużej staranności wykonania i wielu powtórzeń, dlatego są bardzo pracochłonne. Znaczący wzrost efektywności prac hodowlanych można uzyskać stosując markery molekularne identyfikujące geny warunkujące cechę odporności. Markery pozwalają na precyzyjną selekcję pożądanych genotypów we wczesnej fazie rozwoju roślin, z pominięciem pracochłonnych testów odpornościowych. Dotychczas opracowano markery AFLP dla pochodzącego z odmiany WyeTarget genu R2 warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego chmielu (*Podosphaera macularis*). Obecnie znanych jest 6 markerów AFLP dla genu R2, przy czym dwa są szczególnie silnie sprzężone z cechą odporności (1,7cM) (39). Opracowano również 2 markery AFLP dla pochodzącego z odmiany Buket

genu Rbu, który podobnie jak R2 warunkuje odporność na mączniaka prawdziwego (40). Prowadzone są również prace nad opracowaniem markerów związanych z odpornością chmielu na mszycę śliwowo-chmielową oraz werciliozę (8, 19).

W przyszłości markery molekularne będą stosowane coraz częściej, ponieważ w znaczny sposób przyspieszają proces hodowlany i ograniczają koszty. W chwili obecnej najczęściej stosowanym systemem markerów są mikrosatelity. Dotychczasowe badania z ich zastosowaniem ograniczały się do niewielkiej liczby markerów mikrosatelitarnych w granicach od 8 do 24 (4, 18, 22, 31), lecz ostatnio opracowano ponad 1000 nowych mikrosatelit (23). Większa liczba markerów molekularnych, które obejmują *loci* równomiernie rozłożone na chromosomach, jest niezbędna dla rozwoju narzędzi do mapowania genów, które znajdą zastosowanie w ulepszaniu roślin uprawnych (23). Dodatkowo, cały czas wprowadzane są nowe techniki, jak np. DarT (ang. *diversity arrays technology*) – bazująca na mikromacierzach. Przy użyciu tej metody zidentyfikowano ponad 700 polimorficznych markerów, które wykorzystano do rozróżniania chmielu pochodzącego z różnych rejonów geograficznych (17).

II. Poliploidyzacja genomów

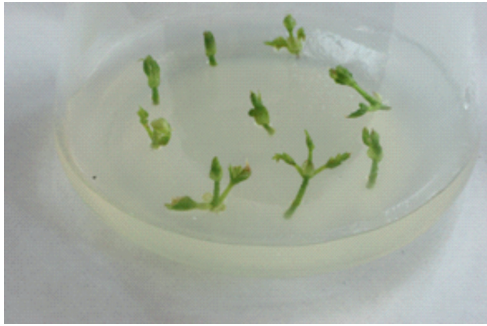
Szeroko stosowanym sposobem poprawy potencjału plonowania roślin uprawnych jest metoda poliploidyzacji genomów. W przypadku chmielu za najbardziej optymalny stopień ploidalności uważa się poziom triploidalny. Niewątpliwie największą zaletą triploidów ($2n=3x=30$ chromosomów) w porównaniu z roślinami diploidalnymi ($2n=2x=20$ chromosomów) jest to, że nie zawiązują one nasion w szyszkach (26). Z punktu widzenia przemysłu piwowarskiego, obecność nasion jest niepożądana, bowiem zawarte w nich tłuszcze i białka wpływają niekorzystnie na proces fermentacji piwa. Najważniejszą z użytkowego punktu widzenia właściwością jałowych roślin chmielu jest zdolność do wytwarzania wysokiej jakości surowca, tj. o większej zawartości żywic miękkich, garbników i polifenoli (24). Ponadto chmiel triploidalny, z uwagi na obecność dwóch genomów odmiany macecznej i jednego odmiany ojcowskiej, jest zbliżony genotypowo i fenotypowo do odmiany macecznej. W hodowli chmielu to podobieństwo roślin triploidalnych do osobników macecznych jest szczególnie istotne, gdyż pozwala na zachowanie większości korzystnych cech odmiany wyjściowej. Z drugiej jednak strony genom wniesiony przez rośliny męskie w mniejszym lub większym stopniu poszerza skalę zmienności gatunku oraz ułatwia otrzymanie genotypów o nowych cechach użytkowych, np. odporności na choroby. Wśród zalet chmielu triploidalnego należy również wymienić właściwość szybkiego zamykania szyszek po ich uformowaniu, co ogranicza możliwość porażenia przez grzyby *Pseudoperonospora humuli* i *Podosphaera macularis*, powodujące odpowiednio mączniaka rzekomego i prawdziwego chmielu (45). Szyszki są mniej podatne na kruszenie, co przy maszynowym zbiorze

i pakowaniu surowca pozwala uniknąć większych strat cennej dla browarnictwa lupuliny. Istnieje również pogląd, że rośliny triploidalne chmielu charakteryzuje większa niż w przypadku diploidów żywotność i bujność.

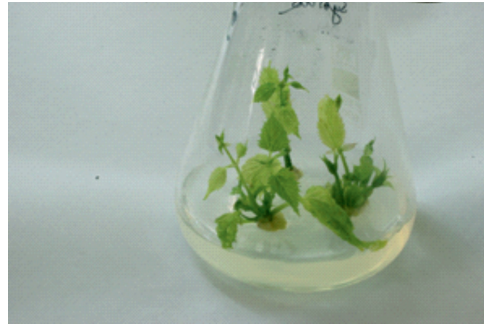
Próby badań nad poliploidalnym chmielem podjęto już w 1948 r., kiedy po raz pierwszy zastosowano chemiczną metodę poliploidyzacji roślin (11). W wyniku traktowania młodych siewek roztworem kolchicyny uzyskano rośliny miksoploidalne niektórych odmian chmielu. Wśród potomstwa otrzymanego ze swobodnego zapylenia zidentyfikowano rośliny triploidalne. Pionierskie prace D a r k ' a (10) nad chmielem triploidalnym, kontynuowane były przez N e v e ' a (45), następnie przez H a u n o l d ' a (13), a syntetyczne opracowanie na temat hodowli poliploidów chmielu zostało opracowane przez K r a l j (25). W Polsce prace zmierzające do otrzymania triploidów chmielu rozpoczęto pod koniec lat 60. ubiegłego stulecia w Wyższej Szkole Rolniczej w Lublinie (45). Kolejne badania prowadzono w latach 90., niestety nie zaowocowały one wprowadzeniem do rejestru triploidalnych odmian uprawnych.

Notowany w ostatnich latach wzrost potencjału produkcyjnego i konkurencyjności zagranicznych odmian w stosunku do polskiego chmielu skłoniły do podjęcia prób uzyskania jego odmian triploidalnych. Prace prowadzone są w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach, a wybrane do badań odmiany reprezentują różne typy użytkowe. Jedną z nich jest goryczkowa odmiana 'Marynka', charakteryzująca się wysoką zawartością alfa kwasów oraz korzystnymi cechami aromatu. Kolejne to supergoryczkowa odmiana 'Iunga' o zawartości alfa kwasów przekraczającej 12% i bardzo wysokim potencjale plonowania oraz aromatyczna odmiana 'Sybilla'.

W procesie uzyskiwania roślin triploidalnych pośrednim ogniwem są rośliny tetraploidalne ($2n=4x=40$ chromosomów). Są one krzyżowane z diploidalnymi osobnikami męskimi, dając w potomstwie formy triploidalne. W badaniach zastosowano metodę indukcji tetraploidów z wykorzystaniem środków mutagennych. W tym celu merystemy wierzchołkowe pochodzące z roślin rosnących w warunkach *in vitro* umieszczano w płynnej pożywce MS zawierającej różne stężenia kolchicyny: 0,01%, 0,05%, 0,1%. Inkubacja materiału roślinnego przebiegała na wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 25°C przez 24h, 48h i 72h przy oświetleniu ($20\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Po zakończeniu ekspozycji stożki wzrostu płukano w wodzie, przenoszono na pożywkę agarową MS w celu wzrostu pędów, a następnie ryzogenezy (rys. 1). Ostatecznie, żywotne i dobrze ukorzenione rośliny przenoszono do miniszklarenek wypełnionych mieszaniną torfu z perlitem. Dalszy wzrost roślin przebiegał w szklarni (rys. 3).



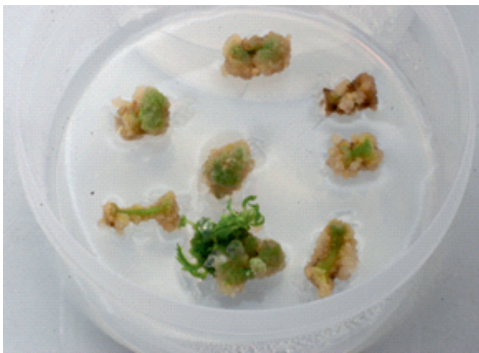
a)



b)

Rys. 1. Wzrost stożków wzrostu chmielu w kulturach *in vitro* po:
a) 5, b) 21 dniach od zabiegu kolchicynowania

Źródło: dokumentacja własna.



a)



b)

Rys. 2. Regeneracja pędów chmielu w kulturach *in vitro*. Fragmenty łodyg odmiany 'Sybilla' po:
a) 1, b) 28 dniach wzrostu na podłożu wzbogaconym w IAA i BAP

Źródło: dokumentacja własna.



Rys. 3. Młode sadzonki tetraploidalnych roślin chmielu

Źródło: dokumentacja własna.

Prowadzono również próby uzyskania tetraploidów, polegające na wykorzystaniu znacznego poziomu naturalnej endopoliploidyacji, występującej w komórkach somatycznych roślin. Zastosowano metodę organogenezy pośredniej pędów w kulturze *in vitro*. Technika ta jest uznawana za trudną z uwagi na to, że efektywność poliploidyacji zależy od kilku czynników, między innymi od użytego genotypu, składu pożywki, zawartości hormonów, jak i źródła eksplantatu. Do badań użyto opisane powyżej trzy odmiany chmielu oraz dwa rodzaje eksplantatów: fragmenty łodyg i ogonków liściowych. Materiał roślinny, po uprzedniej dezynfekcji, wyłożono na pożywkę do indukcji tkanki kalusowej (32). Po upływie 8 tygodni kalus został przeniesiony na podłoża inicjujące tworzenie pędów (rys. 2). W celu poprawy potencjału organogenetycznego tkanki kalusowej do podłoży wzrostowych dodano kwas indolilo-3-octowy (IAA) w stężeniach $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ w kombinacji z trzema cytokininami: benzyloaminopuryną (BAP) – 1 mg/l i 2 mg/l , N6-2- isopentyl adeniną (2iP) – $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i $6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ oraz rybozydem zeatyny $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Ogółem przetestowano 12 kombinacji pożywek. Wszystkie zregenerowane pędy o długości powyżej 1 cm odcinano od kalusa i przenoszono na pożywkę ukorzeniającą. Dobrze ukorzone rośliny przenoszono do substratu torfowego i adaptowano do warunków szklarniowych (rys. 3).

W celu oceny stopnia ploidalności roślin poddanych działaniu kolchicyny, jak również uzyskanych w wyniku organogenezy pośredniej pędów, wykorzystano nowoczesną technikę pomiaru zawartości DNA z użyciem cytometru przepływowego Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ S.C. Identyfikacja roślin tetraploidalnych odbywała się w fazie młodych sadzonek, co pozwoliło na wczesną selekcję genotypów różniących się stopniem ploidalności i ograniczenie zajmowanej powierzchni szklarniowej.

Analiza cytometryczna roślin traktowanych kolchicyną wykazała obecność osobników o różnym stopniu ploidalności, w tym diploidów $2n=2x=20$, tetraploidów $2n=4x=40$ oraz miksoploidów, tj. zawierających w tkankach somatycznych zarówno komórki diploidalne, jak i tetraploidalne. Spośród trzech badanych odmian największą efektywność poliploidyacji uzyskano dla odmiany 'Iunga'. W wyniku przeprowadzonych prac uzyskano ponad 70 roślin tetraploidalnych. W przypadku odmiany 'Marynka' skuteczność poliploidyacji wyniosła od kilku do kilkudziesięciu procent. Efektem tego było uzyskanie 48 roślin tetraploidalnych. Najslabiej zabiegowi poliploidyacji poddała się odmiana 'Sybilla' z której uzyskano 28 tetraploidów.

Analiza zawartości DNA roślin uzyskanych w wyniku organogenezy pośredniej wykazała wyraźny wpływ genotypu na efektywność poliploidyacji. Największy udział roślin tetraploidalnych stwierdzono u odmiany 'Iunga', a najmniejszy u odmiany 'Marynka'. Ponadto na efektywność poliploidyacji miał wpływ rodzaj użytego eksplantatu. U wszystkich badanych odmian największy procentowy udział tetraploidów stwierdzono wśród regenerantów uzyskanych z ogonków liściowych, a najmniejszy w populacji roślin zregenerowanych z łodygi.

Otrzymane w trakcie badań rośliny teraplodoidalne posłużyły jako materiał wyjściowy do uzyskania triploidów $2n=3x=30$. Wykonano krzyżowania z dziko rosnącymi diploidalnymi osobnikami męskimi, w wyniku których uzyskano populację roślin triploidalnych. Rośliny te zostaną ocenione pod względem cech agronomicznych w następnych latach badań.

III. Kultury merystemów i uwalnianie roślin od wirusów i wiroidów

Specyfika uprawy chmielu, podobnie jak innych roślin wieloletnich, rodzi wiele problemów związanych z brakiem zmianowania. Jednym z nich jest systematyczne obniżanie się zdrowotności roślin, spowodowane nagromadzeniem patogenów, zarówno w roślinach jak i w glebie. Na plantacjach chmielu uprawia się wyłącznie rośliny żeńskie, które są rozmnażane w sposób wegetatywny, co dodatkowo sprzyja rozprzestrzenianiu patogenów. Sytuację tę potęguje fakt, że uprawa chmielu w Polsce jest bardzo skoncentrowana. Około 1300 ha, tj. blisko 83% areалу, znajduje się w lubelskim rejonie uprawy, przy czym największe skupisko plantacji chmielu umiejscowione jest na żyznych madach nadwiślańskiej gminy Wilków. Szczególnie niebezpieczne dla upraw wieloletnich są patogeny, takie jak wirusy i wiroidy, których nie można zwalczać przy użyciu chemicznych metod ochrony roślin. Do najgroźniejszych wirusów występujących w roślinach chmielu należą: wirus mozaiki jabłoni *Apple mosaic virus* (ApMV) oraz wirus mozaiki chmielu *Hop mosaic virus* (HpMV) (41). Spośród wiroidów, na plantacjach chmielu w Polsce najczęściej notowany jest wiroid utajony chmielu *Hop latent viroid* (HpLVd) (43). Patogeny te występują powszechnie, nie powodując najczęściej widocznych objawów chorobowych. Mimo to, potencjał plonowania oraz koncentracja alfa kwasów w szyszkach porażonych roślin są najczęściej niższe w porównaniu ze zdrowymi (15, 28, 29, 33).

Brak widocznych objawów porażenia przez wirusy i wiroida utajonego utrudnia identyfikację roślin chorych i uniemożliwia ich eliminację z plantacji. Taka sytuacja powoduje niekontrolowane rozprzestrzenianie się patogenów i, w konsekwencji, zwiększanie liczby porażonych roślin wraz z wiekiem plantacji. Jest to powodem stopniowego obniżania się produktywności chmielników. Jedyną skuteczną metodą ograniczania tych patogenów jest stosowanie zdrowego materiału szkółkarskiego do zakładania nowych plantacji chmielu. Niestety, z powodu powszechnego występowania wirusów i wiroida utajonego w roślinach chmielu oraz bezobjawowego przebiegu infekcji, tradycyjny materiał rozmnożeniowy, jakim są szto-bry, nie może być używany do produkcji zdrowych sadzonek. Szto-bry pozyskuje się z istniejących plantacji chmielu podczas corocznego cięcia karp. Zabieg ten wykonywany jest w okresie spoczynku roślin, najczęściej wiosną, przed rozpoczęciem wegetacji, co niestety jest dodatkowym czynnikiem utrudniającym weryfikację zdrowotności rozmnażanych roślin. Wraz ze szto-brymi, na nowo zakładane

plantacje przenoszone są wszystkie patogeny zasiedlające podziemne pędy chmielu, w tym również wirusy i wiroid utajony. Takie plantacje chmielu już w momencie ich zakładania charakteryzują się niską zdrowotnością roślin, co powoduje szybkie obniżenie produktywności.

Prace nad uzyskaniem zdrowego materiału szkółkarskiego chmielu skupiały się początkowo na uwalnianiu roślin od wirusów. W tym celu stosowano regenerację wierzchołków wzrostu połączoną z termoterapią w temperaturze 35°C (1). Metoda ta pozwalała na skuteczną eliminację wszystkich wirusów występujących w roślinach chmielu i była szeroko stosowana w programach produkcji zdrowego materiału szkółkarskiego w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Republice Czeskiej oraz USA (2, 27, 37, 47). Metodę tę stosowano również w Polsce do uwalniania od wirusów naszych rodzimych odmian chmielu (7, 42). Niestety, regeneracja wierzchołków wzrostu połączona z termoterapią nie eliminowała z roślin chmielu innego groźnego patogena, jakim był wiroid utajony. Co więcej, wysoki poziom porażenia materiału roślinnego poddawanego termoterapii sugerował, że oddziaływanie wysokiej temperatury mogło stymulować namnażanie tego termofilnego patogena (3, 43). W celu uwolnienia roślin chmielu jednocześnie od wirusów i wiroida utajonego należało wyeliminować terapię podwyższoną temperaturą i zastąpić ją zastosowaniem merystemów do regeneracji w kulturach *in vitro*. Szybko dzielące się komórki merystemu są w mniejszym stopniu zasiedlane przez czynniki chorobotwórcze niż ma to miejsce w wyspecjalizowanych tkankach, dlatego istnieje duże prawdopodobieństwo, że rośliny wyprowadzone bezpośrednio z merystemów wierzchołkowych będą wolne od patogenów. Niezwykle istotna w tej metodzie jest dokładność izolacji merystemu oraz jego wielkość. Aby zwiększyć prawdopodobieństwo uzyskania roślin zdrowych należy pobierać merystemy małe, bez zawiązków liści. Z drugiej strony, bardzo małe merystemy mają mniejszą szansę na przeżycie po izolacji. Zarówno wielkość izolowanego merystemu, jak i warunki jego regeneracji w kulturach *in vitro* muszą być opracowane indywidualnie dla każdej odmiany chmielu. W Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach metoda ta została opracowana i wykorzystana w praktyce do eliminacji wirusów i wiroida utajonego z roślin czterech odmian chmielu (12, 13). W wyniku prowadzonych prac uzyskano ponad 330 000 całkowicie zdrowych sadzonek odmian ‘Magnum’, ‘Sybilla’, ‘Iunga’ i ‘Lubelski’.

Produkcja takiego elitarnego materiału szkółkarskiego przebiegała w dwóch etapach. W pierwszym etapie uzyskano rośliny poszczególnych odmian chmielu metodą regeneracji merystemów wierzchołkowych w warunkach *in vitro*. Regeneracja z merystemów wierzchołkowych nie gwarantuje, iż wszystkie rośliny będą wolne od patogenów, dlatego bardzo ważnym elementem procesu produkcji była diagnostyka roślin wyprowadzonych z kultur *in vitro* przy użyciu metod adekwatnych do rodzaju patogena. Do wykrywania obecności wirusów stosowano immunoenzymatyczną metodę

DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) z odpowiednim zestawem przeciwciał. Do detekcji wiroida wykorzystywano metodę molekularną opartą na technice RT-PCR. Jedynie rośliny otrzymane bezpośrednio z merystemów wierzchołkowych oraz zdiagnozowane jako wolne od wirusów i wiroida utajonego chmielu mogły stanowić rośliny mateczne, wykorzystywane jako materiał wyjściowy do kolejnych rozmnożeń. Drugi etap produkcji zdrowych sadzonek polegał na cyklicznym, wegetatywnym rozmnażaniu roślin matecznych przez sadzonki zielne uzyskane z niezdrewniałych fragmentów pędu obejmujących jedną parę liści. Metoda rozmnażania chmielu przez sadzonki zielne charakteryzuje się bardzo dużą wydajnością. Z jednej rośliny matecznej można uzyskać w sezonie wegetacyjnym ponad 100 roślin potomnych, podczas gdy metodą ukorzeniania sztobrów uzyskuje się tylko około 10 roślin. Celem wykluczenia obecności wirusów i wiroida utajonego na poszczególnych etapach produkcji, systematycznie przed każdym cięciem materiału matecznego prowadzono diagnozę w kierunku obecności tych patogenów. Ponadto w sposób losowy badano również gotowe sadzonki chmielu przeznaczone do przekazania plantatorom. Aby ograniczyć występowanie owadów będących wektorami wirusów, wszystkie okna w szklarni zabezpieczono specjalnymi siatkami ochronnymi, profilaktycznie wykonywano również zabiegi ochronne przeciwko niebezpiecznym dla chmielu szkodnikom i patogenom. Zachowanie tych środków ostrożności pozwoliło na uzyskanie materiału szkółkarskiego chmielu o najwyższym stopniu zdrowotności.

Wdrożenie do praktyki zdrowych sadzonek chmielu było znaczącym elementem poprawy jakości surowca. Szyszki uzyskane ze zdrowych roślin charakteryzowały się wyższą zawartością żywic ogółem, a szczególnie żywic miękkich, w porównaniu z surowcem pochodzącym z plantacji założonych przy użyciu sadzonek tradycyjnych, uzyskanych przez ukorzenianie sztobrów (tab. 1). Różnica w koncentracji alfa kwasów była szczególnie duża w przypadku odmiany 'Lubelski', która jest uprawiana od ponad 40 lat i jest bardzo silnie porażona przez wirusy, co wynika z badań prowadzonych w IUNG (41). Zdrowe rośliny tej odmiany charakteryzowały się zawartością alfa kwasów wyższą o ponad 72% w porównaniu z porażonymi. Uwolnienie roślin chmielu od wirusów i wiroida utajonego wpływało również korzystnie na zawartość olejków eterycznych oraz ich skład (tab. 2). Szczególnie duży wzrost zawartości olejków obserwowano u odmiany 'Iunga'. W szyszkach z roślin wolnych od wspomnianych wyżej patogenów była ona wyższa o 47%. Chmiel odmiany 'Lubelski' charakteryzował się nie tylko wyższą zawartością olejku, ale również jego lepszym składem. W olejku z tego chmielu obserwowano wyższą zawartość składników, które korzystnie wpływają na aromat piwa, tj. humulenu, kariofilenu oraz farnezeny, zmniejszyła się natomiast zawartość niekorzystnego myrcenu.

Wyższa jakość surowca przekłada się na wzrost dochodu gospodarstw chmielarskich, bowiem cena chmielu uzależniona jest często od zawartości alfa kwasów w szyszkach. Ponadto surowiec taki łatwiej znajduje nabywcę, co jest niezwykle

istotne w obecnej, bardzo trudnej sytuacji na rynku chmielu. Innym bardzo ważnym aspektem stosowania zdrowego materiału szkółkarskiego jest ograniczenie rozprzestrzeniania się patogenów. Powszechnie stosowana praktyka pozyskiwania sadzonek z istniejących chmielników prowadzi często do rozmnażania roślin starych, porażonych przez czynniki chorobotwórcze lub też wykazujących znaczny stopień degeneracji, spowodowany wieloletnią uprawą w monokulturze. Sztabry pozyskiwane są z roślin będących w stanie spoczynku i pozbawionych części nadziemnej, co utrudnia eliminację egzemplarzy wykazujących niekorzystne cechy lub objawy chorobowe. W Polsce plantacje chmielu, z których pozyskiwany jest materiał rozmnożeniowy, nie podlegają kwalifikacji przez wyspecjalizowane inspekcje. Decyzja o rozmnażaniu roślin jest uzależniona wyłącznie od plantatora, który często nie jest świadomy istniejących zagrożeń. W przypadku wirusów i wiroida utajonego

Tabela 1

Zawartość żywic chmielowych (wg Wöllmera) w szyszkach odmian 'Lubelski' i 'Iunga' pochodzących z roślin zdrowych oraz porażonych przez wirusy i wiroida utajonego chmielu

Badana odmiana chmielu		Żywice ogółem (% s. m.)	Żywice miękkie (% s. m.)	Żywice twarde (% s. m.)	Alfa kwasy (KW) (% s. m.)	Frakcja beta (% s. m.)
'Lubelski'	szyszki z roślin zdrowych	19,3	17,0	2,3	7,6	9,4
	szyszki z roślin porażonych	15,6	13,7	1,9	4,4	9,3
'Iunga'	szyszki z roślin zdrowych	29,4	25,9	3,5	14,5	11,4
	szyszki z roślin porażonych	28,1	24,4	3,7	12,8	11,6

Źródło: wyniki badań własnych.

Tabela 2

Zawartość i skład olejków chmielowych w szyszkach odmian 'Lubelski' i 'Iunga' pochodzących z roślin zdrowych oraz porażonych przez wirusy i wiroida utajonego chmielu

Badana odmiana chmielu		Olejki ogółem (ml·100g ⁻¹)	Myrcen (%)	Humulen (%)	Kariofilen (%)	Farnezen (%)
'Lubelski'	szyszki z roślin zdrowych	1,4	39,4	33,9	7,2	1,3
	szyszki z roślin porażonych	1,2	46,7	25,2	6,3	0,9
'Iunga'	szyszki z roślin zdrowych	2,2	59,8	15,7	6,0	0,7
	szyszki z roślin porażonych	1,5	52,0	25,3	5,2	1,3

Źródło: wyniki badań własnych.

chmielu, nawet staranna weryfikacja zdrowotności, przeprowadzona w pełni sezonu wegetacyjnego, nie zapobiega rozmnożeniu roślin porażonych, gdyż patogeny te najczęściej nie wywołują widocznych objawów chorobowych. Tradycyjna metoda rozmnażania chmielu z wykorzystaniem sztobrów stwarza więc wysokie ryzyko przeniesienia wielu groźnych czynników chorobotwórczych na nowe plantacje.

Podsumowanie

Wykorzystanie w doskonaleniu genotypów chmielu metod i technologii opartych na najnowszej wiedzy ułatwia wybór odpowiednich komponentów rodzicielskich do krzyżowań, wpływa na zwiększenie efektywności selekcji oraz umożliwia ocenę materiałów hodowlanych we wczesnych stadiach rozwoju roślin, co ogranicza liczebność genotypów przeznaczonych do dalszych etapów hodowli. Wymiernym efektem wdrożenia tych technik jest skrócenie cyklu hodowlanego oraz obniżenie kosztów wytworzenia nowych odmian o pożądanym cechach. Intensyfikacja prac hodowlanych jest niezwykle istotna z uwagi na dużą dynamikę zmian na rynku chmielu.

Podstawowym czynnikiem wpływającym na zakres wykorzystania postępu biologicznego jest zasób wiedzy producentów. Dzięki stałej współpracy pomiędzy środowiskiem naukowym a plantatorami chmielu, efekty badań są wdrażane do praktyki, przyczyniając się do unowocześnienia produkcji oraz wzrostu jej efektywności.

Literatura

1. Adams A. N.: Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. *J. Hort. Sci.*, 1975, **50**: 151-160.
2. Adams A. N., Darby P., Ebbels D. L.: Production and distribution of virus-tested hops in the U.K. *Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases*, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) *Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft*, 1989: 127-130.
3. Barbara D. J., Morton A., Adams A. N.: Assessment of UK hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. *Ann. appl. Biol.*, 1990, **116**: 265-272.
4. Bassil N. V., Gilmore B.: Genic SSRs for European and North American hop (*Humulus lupulus* L.) *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2008, **55**: 959-969.
5. Brady J. L., Scott M. R., Thomas M. R.: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS), *Euphytica*, 1996, **91**: 277-284.
6. Cajza M., Zielińska L., Lubik M.: Elimination of viruses from the hop and propagation of virus-free plant material in the west Poland. *Journal of Plant Protection Research*, 1996, **37**: 59-66.
7. Čerenak A., Javornik B.: Marker assisted selection in hop breeding. *Acta Hort.*, 2005, **668**: 35-39.
8. Čerenak A., Satovic Z., Jakše J., Luthar Z., Carovic-Stanko K., Javornik B.: Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 2009, **170**: 141-154.

9. Danilova T. V., Karlov G. I.: Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 2006, **151**: 15-21.
10. Dark S. O. S.: The use of poliploidy in hop breeding. Wye College, University of London, Dept. of Hop Research. Annual Report, 1952: 34.
11. Doroszevska T., Skomra U., Przybyś M., Czubacka A., Grudzińska-Sterno M.: Uzyskiwanie zdrowych sadzonek chmielu jako element restrukturyzacji odmianowej. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2008, **13**: 97-110.
12. Grudzińska M., Solarska E., Czubacka A., Przybyś M., Fajbuś A.: Elimination of *Hop latent viroid* from hop plants by cold treatment and meristem tip culture. *Phytopathol. Pol.*, 2006, **40**: 21-30.
13. Haunold A.: Polyploid breeding with hop *Humulus lupulus* L. *Technical Quarterly Master Brewers Assoc. of America*, 1972, **9(1)**: 36-40.
14. Hay F. S., Close R. C., Beatson R.: The effect of virus infection on the yield and alpha/beta-acid content of the hop variety Superalpha. *Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases*, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) *Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft*, 1989: 137-148.
15. Henning J. A., Steiner J. J., Hummer K. E.: Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA. *Crop Sci.*, 2004, **44**: 411-417.
16. Howard E. L., Whittock S. P., Jakše J., Carling J., Matthews P. D., Probasco G., Henning J. A., Darby P., Čerenak A., Javornik B., Kilian A., Koutoulis A.: High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DART). *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, **122**: 1265-1280.
17. Jakše J., Bandelj D.: Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Ecology Notes*, 2002, **2(4)**: 544-546.
18. Jakše J., Čerenak A., Radišek S., Satovic Z., Luthar Z., Javornik B.: QTL mapping of verticillium resistance and yield traits in hop. *Proc. of the Sci. Com. IHGC, Lublin, Poland*, 2011: 45-47.
19. Jakše J., Kindlhofer K., Javornik B.: Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome*, 2001, **44**: 773-782.
20. Jakše J., Satovic Z., Javornik B.: Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 2004, **47**: 889-899.
21. Jakše J., Stajner N., Kozjak P., Čerenak A., Javornik B.: Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 2008, **21**: 139-148.
22. Koelling J., Coles M. C., Matthews P. D., Schwekendiek A.: Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. *Molecular Breeding*, 2012, **30**: 479-484.
23. Koutoulis A., Roy A. T., Price A., Sherriff L., Leggett G.: DNA ploidy level of colchicine treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae*, 2005, **105**: 263-268.
24. Kralj D.: Diploid and polyploid breeding with hop. *EUCARPIA Meeting Section on Mutation and Poliploidy*, Novi Sad, 1976.
25. Kralj D., Kump M.: Polyploidy in hop breeding, *Humulus lupulus* L. In.: Horn W., Jensen, C. J., Odenbach W., Schieder O.: *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Walter de Gruyter and Co., Berlin and New York, Germany, 1986.
26. Kremheller H. Th., Ehrmaier H., Gmelch F., Hesse H.: Production and propagation of virus-free hops in Bavaria, Federal Republic of Germany. *Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases*, Rauischholzhausen (A. Eppler Edt.) *Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft*, 1989: 131-134.

27. K r e m h e l l e r H. T h., E h r m a i e r H., R o ß b a u e r G.: Reinfestation of virus-free hop plantings with prunus necrotic ringspot and hop mosaic – viruses and the effect of these viruses on yield, alpha-acids and symptom expression. Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauschholzhausen (A. Eppler Edt.) Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 1989: 149-156.
28. K r o f t a K., K r o u p a F.: Qualitative indicators of virus-free hops of Czech provenance. Rostlinna Vyroba, 1995, **8**: 383-388.
29. M u r a k a m i A.: Hop variety classification using the genetic distance based on RAPD. J. Inst. Brew., 2000, **106**: 157-161.
30. M u r a k a m i A., D a r b y P.: Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, **53**: 1553-1562.
31. O k a d a Y., S a e k i K., I n a b a A., S u d a N., K a n e k o T., I t o K.: Construction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter. Journal of Plant Physiology, 2003, **160**: 1101-1108.
32. P a t z a k J., M a t o u š e k J., K r o f t a K., S v o b o d a P.: Pathogenic effects of HLVd. Proc. Sci. Commission. Canterbury, England, 2001: 52-56.
33. P a t z a k J., S v o b o d a P., O r i n i a k o v a P., M a t o u š e k J.: Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. Rostlinna Vyroba, 1999, **45(4)**: 165-172.
34. P i l l a y M., K e n n y S. T.: Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop, *Humulus lupulus* L. Theoretical Applied Genetics, 1996, **93**: 333-340.
35. P r o b a s c o G., W i n s l o w S.: The use of shoot-tip culture to eliminate viruses from hop varieties grown in the United States. MBAA Technical Quarterly, 1986, **23**: 26-31.
36. S e e f e l d e r S., E h r m a i e r H., S c h w e i z e r G., S e i g n e r E.: Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. Plant Breeding, 2000, **119**: 257-263.
37. S e e f e l d e r S., L u t z A., S e i g n e r E.: Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.). IHGC Proceedings of the Scientific Commission, George, 20-25 February 2005, South Africa: 31-34.
38. S e e f e l d e r S., S e i g n e r E.: Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. IHGC Proceedings of the Scientific Commission, Dobrna-Žalec, 24-27 June 2003, Slovenia: 8-11.
39. S k o m r a U.: Występowanie wirusów w roślinach chmielu (*Humulus lupulus* L.) na Lubelszczyźnie. Pam. Puł., 2001, **126**: 107-124.
40. S o l a r s k a E., S k o m r a U.: Uszlachetnianie materiału nasiennego chmielu. Uszlachetnianie materiałów nasennych – materiały konferencyjne, Olsztyn-Kortowo, 1994: 301-304.
41. S o l a r s k a E., S k o m r a U., K i t l i Ń s k a J., W o j c i e r o w s k i J.: The occurrence of hop latent viroid (HLVd) in hop plants in Poland. Phytopathol. Pol., 1995, **10**: 55-59.
42. S t a j n e r N., J a k š e J., K o z j a k P., J a v o r n i k B.: The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science, 2005, **168**: 213-221.
43. S v o b o d a P.: Kultivace izolovaných vrcholů chmiele (*Humulus lupulus* L.) *in vitro*. Rostlinna Vyroba, 1992, **38**: 523-528.
44. Š u s t a r - V o z l i č J. Š., J a v o r n i k B.: Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. Plant Breeding, 1991, **118(2)**: 175-181.
45. T a r k o w s k i C., Z u b L.: Chmiel poliploidalny i jego wartość użytkowa. Postępy Nauk Rolniczych, 1959, **2(56)**: 45-50.
46. T o w n s e n d M. S., H e n n i n g J. A.: Potential heterotic groups in hop as determined by AFLP analysis. Crop Sci. 2005, **45**: 1901-1907.

47. Tsuchiya Y., Araki S., Takashio M., Tamaki T.: Identification of hop varieties using specific primers derived from RAPD markers. *J. Ferment. Bioeng.*, 1997, **84** (2): 103-107.
48. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**(21): 4407- 4414.

Adres do korespondencji:

dr Urszula Skomra
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 220
e-mail: urszula.skomra@iung.pulawy.pl