

IDENTIFIKACIJA SLOVENSКИH SORT HMELJA Z MIKROSATELITSKIMI MARKERJI

Andreja ČERENAK¹, Jernej JAKŠE²

UDK/UDC 633.791 : 522.524 (497.4) (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 17. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

V članku je za identifikacijo slovenskih sort hmelja prikazana uporaba mikrosatelitskih markerjev. V molekularni analizi je bilo analiziranih šestnajst genotipov s tremi pari začetnih oligonukleotidov. Narejena je shema identifikacije sort na osnovi podatkov polimorfnihi mikrosatelitov, uporabna za žlahtnitelje hmelja, trgovce in pivovarje.

Ključne besede: hmelj, mikrosatelitski markerji, identifikacija sort

IDENTIFICATION OF SLOVENE HOP VARIETIES USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The article reports on the use of microsatellite markers for identification of Slovene varieties. Sixteen genotypes were analysed using three primer pairs for the molecular analysis. A scheme of cultivar identification based on polymorphic microsatellite data is provided which can be used by for hop breeders, merchants, and brewers.

Key words: hop, microsatellite markers, variety identification

¹ dr. znanosti, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² doc., dr. znanosti, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Biotehniška Fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Zanesljivo ločevanje sort hmelja in ugotavljanje sortne čistosti je v hmeljarstvu zelo pomembno. Nujno potrebno je na številnih področjih panoge, od pridelave, žlahtnjenja, trgovine hmelja do pivovarske industrije. Žlahtnitelji potrebujejo uporabno identifikacijsko orodje za ločevanje sort in posledično uveljavljanje svojih žlahtniteljskih pravic, hmeljarji pa želijo sortno čista hmeljišča za zagotavljanje optimalne pridelave hmelja. Identifikacija sort je pomembna v pivovarstvu, saj sta grenčica in aroma piva neposredno pogojeni z izvorom hmelja.

Za potrjevanje identitete hmeljnih sort se uporablja več tradicionalnih metod na podlagi vrednotenja fenotipa rastline. Že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja je Davis [4] predlagal sedem morfoloških značilnosti rastlin za ločevanje sort hmelja. Fenotipska vrednotenja so se v nadaljnjih letih izpopolnjevala in so postala zelo učinkovita, njihova glavna slabost je dolgotrajnost opazovanj. Poleg tega so fenotipske ocene močno pod vplivi okolja kot so rastni pogoji, področje gojenja in tudi čas opazovanj. V zadnjih 40 letih je bil povečan interes v smeri razvoja identifikacijskih metod na podlagi kemijskih analiz eteričnih olj in grenčičnih komponent hmelja, sestava katerih je genetsko kontrolirana [9, 13, 14, 16]. Proučevanje sestave eteričnih olj poteka na IHPS že od leta 1982. S primerjavo organoleptičnega ocenjevanja genotipov, vključenih v poskus v Žalcu in na sorodnem inštitutu v Nemčiji (Institut für Hopfenforschung, Hüll) so ugotovili, da je le-to precej subjektivno, saj so skladne rezultate dosegli le pri 62 % vzorcev. Variabilnost eteričnih olj je intenzivno proučevala Kraljeva s sod. [11], rezultat česar je med drugim razvit min-max model, sistem za klasifikacijo 95 hmeljnih kultivarjev v 14 skupin z uporabo 31 deskriptorjev. V zadnjih letih so bile v model dodane 3 nove nemške sorte [8], ista avtorja pa sta določila 5 slovenskih komercialno najbolj zanimivih sort hmelja z vključitvijo 78 hmeljnih vzorcev iz različnih področij gojenja v Sloveniji [10]. Vsekakor je večina identifikacij narejenih z uporabo kemijskih analiz svežih ali procesiranih produktov hmelja, na drugi strani pa razvoj metod molekularne genetike vodi k novim alternativam in pristopom.

Tehnika naključno nanožene polimorfne DNA (RAPD) [1, 7], sekvenčno označena mesta (STS) [2], polimorfizem dolžine pomnoženih restrikcijskih fragmentov (AFLP) [5, 15] in mikrosateliti oz. enostavne ponavljajoče se sekvence (SSR) [3, 6] so metode, ki so do neke mere že bile uporabljene za identifikacijo sort hmelja. Zaradi velike ponovljivosti in primerljivosti rezultatov med različnimi laboratoriji so najbolj obetavni mikrosatelitski markerji, predvsem zaradi robustnosti, enostavne izvedbe amplifikacije in visoke stopnje polimorfnosti. Mikrosatelitska DNA sestoji iz zaporedja majhnih ponavljajočih se enot, običajno dolgih 1 do 6 baznih parov, ki so razpršene po celotnem eukariotskem genomu. Polimorfizem mikrosatelitov predstavlja dolžina osnovnega motiva ter število tandemskih ponovitev, ki se lahko enostavno določijo s pomnoževanjem v polimerazni verižni reakciji (PCR). Rezultat kombinacije podatkov več visoko polimorfni mikrosatelitskih lokusov so individualni alelni profili, ki omogočajo ločevanje genotipov.

Cilj našega dela je bilo zagotoviti sistem identifikacije slovenskih sort hmelja z mikrosatelitskimi markerji. Rezultati dela bodo lahko uporabni za identifikacijo sort ne glede na razvojno stopnjo rastline.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Material

V analizo smo vključili vse slovenske sorte hmelja (Aurora, Ahil, Atlas, Apolon, Blisk, Buket, Bobek, Celeia, Cerera, Cicero, Cekin in Savinjski golding) ter štiri tetraploide, pridobljene s kolhicinskim tretiranjem sort Ahil, Apolon, Atlas in Savinjski golding.

2.2 Izolacija DNA

Za izolacijo celokupne genomske DNA hmelja smo uporabili metodo CTAB po uveljavljenem protokolu [12]. Iz svežih, mladih listov hmelja, ki smo jih nabrali v kolekcijskem nasadu na IHPS, smo vzeli približno 1-2 cm² rastlinskega tkiva in ga v terilnici dobro homogenizirali ob dodatku 1 ml CTAB ekstrakcijskega pufru [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 % (v/v) -merkaptotetanol], predhodno segretega na 68 °C. Vzorce smo ekstrahirali z mešanico fenola, kloroforma in izoamilalkohola v razmerju 25:24:1. DNA smo oborili z dodatkom 1/10 volumna 3 M Na-acetata (pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in z enim volumnom ledeno-hladnega izopropanola. Usedlino (zgoščeno DNA) smo sprali s 70 % etanolom in jo raztopili v TE pufru [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in vzorce shranili pri 4 °C. Koncentracijo DNA smo izmerili s pomočjo mini fluorometra TKO100 (Hoefer Scientific, San Francisco, ZDA).

2.3 Namnoževanje mikrosatelitskih markerjev

Za namnoževanje mikrosatelitskih lokusov smo uporabili predhodno objavljene pare začetnih oligonukleotidov [3]. Lokusno specifični začetni oligonukleotidi so bili izdelani pri MWG-Biotech (Ebersberg, Nemčija). PCR reakcija je vsebovala 50 ng genomske DNA, 1 enoto *Taq* DNA polimeraze (Boehringer Mannheim, Nemčija), 1x PCR pufer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3), 0,5 μM koncentracijo vsakega začetnega oligonukleotida in 0,2 mM koncentracijo vsakega deoksinuklotid trifosfata (Boehringer Mannheim, Nemčija). Po 3 minutni denaturaciji pri 94 °C je sledilo 26 ciklov s ponavljanjem:

- 45 sekund pri 94 °C
- 30 sekund pri 55 °C
- 90 sekund pri 72 °C

s končno inkubacijo vzorcev 7 minut pri 72 °C v Perkin Elmer 480 cikličnem termostatu.

2.4 Zaznavanje namnožene DNA

Namnožene mikrosatelitske markerje smo ločili z uporabo vertikalne denuracijske poliakrilamidne gelske elektroforeze (S2; Life Technologies, Carlsbad, California). Po pravilnem tretiranju obeh plošč smo med plošči nanесли denuracijski poliakrilamidni gel pripravljen iz 7,5 M uree, 1x TBE elektroforetskega pufru in 5% raztopine akrilamid: bisakrilamid, pripravljene iz 40% založne raztopine z razmerjem 19:1. Raztopino smo po filtraciji vakumirali, pred vlitjem gela pa smo dodali 0,5 μl TEMED-a in 2 μl 10% amonpersulfata. Elektroforeza in zaznavanje namnožene DNA po barvanju s srebrom sta potekala po protokolu Promega Silver Sequence™ z manjšimi modifikacijami [6].

Dolžina alelov je bila določena s primerjavo z dolžinskimi AFLP 10 bp dolgimi fragmenti. Najdaljši alel je bil označen s črko A, sledili so mu krajši aleli, označeni z naslednjimi črkami abecede.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Pri vseh namnožitvah smo dobili jasne in nedvoumne DNA produkte. Prisotnost dveh fragmentov na enem lokusu smo smatrali za heterozigoten genotip in namnožitev le enega fragmenta za homozigotno stanje (Slika 1). Prisotnosti treh alelov nismo zasledili, kar je v skladu s pričakovanji, saj triploidi niso bili vključeni v raziskavo.

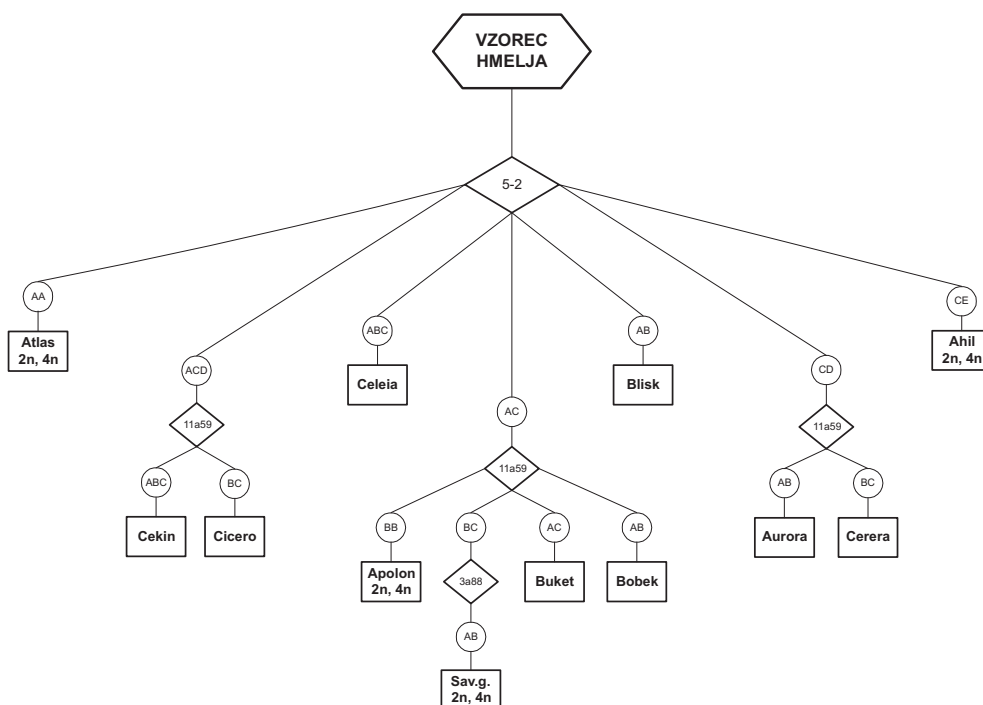
Preglednica 1: Dolžina alelov na mikrosatelitskih lokusih v baznih parih

Table 1: Length of alleles at microsatellite loci in base pairs

Lokus	Aleli				
	A	B	C	D	E
5-2	184	182	180	178	166
11a59	196	194	184		
3a88	198	194			

Predstavljena raziskava je del širše zasnovanega proučevanja genotipov z več mikrosatelitskimi markerji. V članku je izpostavljena shema določevanja slovenskih sort hmelja v primeru, da je potrebno analizirati hmeljni vzorec neznanega porekla. Z uporabo lokusa 5-2, ki smo ga uvrstili na začetek določevanja sort, smo slovenske sorte razdelili na 7 enot. Sorte Atlas, Ahil, Blisk in Celeia so bile s specifičnim genotipom določene že v prvi fazi analize. Velika večina ostalih sort je bila ločena z namnoževanjem na lokusu 11a59, pri čemer smo na tej stopnji uspešno določili sorte Aurora, Apolon, Buket, Bobek, Cekin, Cicero in Cerera. Slednjo sorto, Savinjski golding smo določili z lokusom 3a88. Vsi tetraploidni genotipi, dobljeni s tretiranjem s kolhicinom so imeli elektroforetski profil enak diploidnemu donorju, zato v skladu s pričakovanji niso bili ločljivi. Njihovo ločevanje za samo panogo ni pomembno, saj se tetraploidi v slovenskih hmeljiščih ne pridelujejo.

Zaključimo lahko, da so mikrosatelitski markerji uspešen markerski sistem za ločevanje slovenskih sort hmelja. Poudariti je potrebno, da je za analizo primeren katerikoli del rastline ne glede na stopnjo razvoja, na rezultat analize pa ne vpliva področje gojenja in drugi vplivi okolja.



Slika 1: Shema identifikacije slovenskih sort hmelja z mikrosatelitskimi markerji. Krogi označujejo genotip (preglednica 1), romboidi pa lokuse, uporabljene v analizi.

Figure 1: Flowchart for the identification of Slovene varieties using microsatellite markers. Circles indicate obtained genotypes (Table 1) and rhomboids indicate loci used in analysis.

4 VIRI

1. Abbot, M.S., Fedele, M.J., A DNA-based varietal identification procedure from hop leaf tissue.-J. Inst. Brew. 100(1994), s. 283-285.
2. Araki, S., Tsuchiya, Y., Takashio, M., Tamaki, T., Shinotsuka, K., Identification of hop cultivars by DNA marker analysis.- J. Amer. Soc. Brew. Chem. 56 (1998), s. 81-130.
3. Brady, J.L., Scott, N.S., Thomas, M.R., DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS).-Euphytica 91(1996), s. 277-284.
4. Davis, E.L., Variation in cultivated varieties of *Humulus lupulus* L. and its relation to the possible sources of these varieties. - Doct. Diss. Ser., Publ. no. 17(1956), Univ. microfilms, Ann Arbor, Michigan.

5. Hartl, L., Seefelder, S., Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs.- Theor. Appl. Genet. 96(1998), s. 112-116.
6. Jakše, J., Kindlhofer, K., Javornik, B., Assessment of genetic variation and differentiation of hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by microsatellite and AFLP markers.- Genome 44(2001), s. 773-782.
7. Jakše, J., Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Identification of hop cultivars by RAPD markers.- Proc. Int. Colloq. Impact Plant Biotech. Agric., Rogla, Slovenia, 5-7 December 1994. Ljubljana, Centre for Plant Biotechnology and Breeding, University of Ljubljana, Agronomy Department, s. 147-151.
8. Kač, M., Kovačevič, M., Solid phase microextraction of hop volatiles. Potential use for determination and verification of hop varieties.- J. Chromatogr. A 918(2001), s. 159-167.
9. Kenny, S.T., Identification of US-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analysis.- J. Amer. Soc. Brew. Chem. 48(1988), s. 3-8.
10. Kovačevič, M., Kač, M., Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. - Food Chem. 77(2002), s. 489-494.
11. Kralj, D., Zupanec, J., Vasilj, D., Kralj, S., Pšeničnik, J., Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. - J. Inst. Brew. 97(1991), s. 197-206.
12. Kump B., Svetek S., Javornik B., Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv.- Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 59(1992), s. 63-66.
13. Lemmens, G.W.C., The breeding and parentage of hop varieties.- Brew. Dig. May (1998), s. 16-26.
14. Perpete, P., Varietal Discrimination of hop pellets by essential oil analysis I. Comparison of fresh samples.- J. Amer. Soc. Brew. Chem. 56(1998), s. 104-108.
15. Townsend M.S., Henning J.A., Moore, D.L., AFLP analysis of DNA from Dried Hop Cones.- Crop Sci. 40(2000), s. 1383-1386.
16. Wagner, T., The quantity and composition of bitter resins chemotaxonomic characteristics of hop varieties.- Pharm. J. Slov. 34(1983), s. 77-83.