

MOLEKULARNO GENETSKE RAZISKAVE HME LJJA

Branka JAVORNIK¹

UDC/UDK 633.791 : 631.522/.524 (045)

review article/pregledni znanstveni članek

prispelo/received: 24. 10. 2005

sprejeto/accepted: 15. 11. 2005

IZVLEČEK

V članku so predstavljene molekularno genetske raziskave hmelja, ki so bile opravljene z namenom prispevati k učinkovitejšemu žlahtnjenju novih sort hmelja. Kratko bodo opisane metode molekulskih markerjev, razvite za proučevanje hmelja ter rezultati vrednotenja genske variabilnosti kolekcije hmeljnih genotipov in akcesij v genski banki. Predstavljeni bodo rezultati kartiranja genoma hmelja za natančnejšo opredelitev genskih dejavnikov, ki pogojujejo visoko vsebnost alfa kislin ter odpornost na hmeljevo uvelost.

Ključne besede: hmelj, *Humulus lupulus* L., molekularni markerji, genetska variabilnost, kartiranje genoma

GENETIC RESEARCH ON HOPS

ABSTRACT

Hop growing has a tradition of more than 100 years in Slovenia, and there is significant agricultural production oriented towards export. The Slovenian Institute for Hop Research and Brewing (SIHRB) has released eleven hop varieties, four of which occupy the majority of hop fields in Slovenia. Such a varietal structure emphasizes the importance of "regional" hop breeding and the adaptation of hop varieties to specific growing conditions. Hop genetic studies have been set up in order to assist the hop breeding program at the SIHRB. The main approach of genetic research is rational use of the genetic diversity available from the hop germplasm collection, and gene incorporation or introgression by means of hop genome mapping, marker-assisted selection and/or cloning. Major effort is directed towards improving hop quality (resin content) and resistance to biotic stresses (*Verticillium* wilt and hop Damson aphid). We present a review on our research work on the development of the hop molecular markers, on the assessment of genetic variability and genome mapping and analysis of QTL markers.

Key words: hop, *Humulus lupulus* L., molecular markers, genetic variability, genome mapping

¹Dr. Branka Javornik, redna profesorica za genetiko in biotehnologijo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana.

1 UVOD

Hmelj v Sloveniji pridelujemo že več kot 100 let in je pomemben kmetijski pridelek, ki je večinoma namenjen izvozu. Vse sorte hmelja so bile požlahtnjene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu (IHPS) pod vodstvom žlahtniteljice dr. Dragice Kralj. Danes pridelujejo na 1462 ha hmeljišč (in 416 ha premene) pretežno slovenske sorte. Največ je sorte Aurora na več kot 60% hmeljskih površin, sledijo ji Savinjski golding (15%), Bobek (10%), Celeia (5%) in ostale. Moderna introducirana nemška sorta Magnum se prideluje samo na 5% površin. Ta sortna sestava poudarja pomen regionalnega žlahtnjenja hmelja zaradi prilagoditve kulture na specifične rastne razmere. Zadnje nove sorte hmelja so bile potrjene leta 1990 in v preteklem obdobju se je pokazala potreba po novih kultivarjih, zato je žlahtniteljski program ponovno oživel. Sedanji žlahtniteljski program je usmerjen k razvoju sort hmelja z izboljšano kvaliteto (visoka vsebnost alfa kislin), z odpornostjo na pomembnejše povzročitelje glivičnih bolezni (*Verticillium* spp., *Pseudoperonospora humuli*, *Sphaerotheca humuli*) in škodljivce (*Phorodon humuli*) ter združuje klasično žlahtnjenje z molekulskimi metodami. S pojavom zelo virulentnega patotipa (PG2) glive *V. albo-atrum* v letu 1997, ki povzroča letalno obliko hmeljeve uvelosti in posledično propadanje hmeljišč, ta bolezen predstavlja resno grožnjo vsem hmeljarskim območjem Slovenije. Najuspešnejši način ohranjanja in obnove proizvodnje hmelja na okuženih območjih predstavlja vzgoja odpornih oz. tolerantnih sort, saj za zatiranje hmeljeve uvelosti ni na voljo ustreznih fitofarmaceutskih pripravkov. Ker do nedavnega bolezni ni bila gospodarsko pomembna tudi ni bila vključena v predhodne žlahtniteljske programe, kar je glavni razlog za neodpornost večine slovenskih sort, ki so komercialno zanimive.

Tako sedaj ta bolezen narekuje smeri pri žlahtnjenju novih sort hmelja, saj je potrebno poleg drugih lastnosti (npr. visoka vsebnost alfa kislin) vključiti v sorte tudi dejavnike odpornosti na *Verticillium*.

Težava pri žlahtnjenju hmelja je njegova dolgotrajnost, saj traja vzgoja novih sort najmanj 10 let. Splošni interes panoge je čimhitrejši odziv žlahtnjenja na potrebe pridelovalcev in na zahteve industrije. Pri razširjenih poljščinah in hortikulturnih rastlinah se je izkazalo, da lahko sodobni molekulsko genetski pristopi bistveno prispevajo k učinkovitejši vzgoji izboljšanih novih kultivarjev. Zato smo tudi pri hmelju zastavili molekulsko genetski program, ki naj bi prispeval k boljšemu poznavanju lastnosti pomembnih za ekonomsko opravičeno pridelovanje hmelja ter za razvoj molekulskih orodij, ki bi lahko neposredno služila v žlahtnjenju hmelja. Program je sestavljen iz posameznih med seboj dopolnjujočih sklopov in sicer:

- Razvoj molekulskih markerjev hmelja.
- Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja.
- Izdelava genskih kart za identifikacijo markerjev vezanih z visoko vsebnostjo alfa kislin, odpornostjo na *Verticillium* in za določevanje kandidatnih genov.
- Uporaba genetskih informacij v žlahtnjenju s pomočjo markerjev ali pri eventualnih genskih transformacijah.

1.1 Razvoj molekulskih markerjev hmelja

Molekulski markerji izpolnjujejo veliko lastnosti, ki so želene pri vrednotenju genetske variabilnosti naravnih ali selekcioniranih populacij, za DNA tipiziranje v identifikacijskih namenih ali za kartiranje genomov. Te lastnosti so predvsem visok polimorfizem, velika pogostnost v genomu, neodvisnost od vplivov okolja, visoka informativnost, relativno preproste tehnike in visoka ponovljivost določevanja, možnost izmenjave podatkov med laboratoriji itd. Karakterizacija genetske variabilnosti ali polimorfizma populacije (kultivar, klon, linija,

akcesija) rastlin je pomembna, ker genetska raznolikost znotraj populacije ali vrste določa nivo prilagajanja na modifikacije in širino odzivnosti za izboljšanje kulturnih rastlin.

S pričetkom raziskovalnega dela pri hmelju smo razpolagali predvsem z metodološko preprostejšimi molekulskimi metodami kot je na primer RAPD metoda (naključno namnožena polimorfna DNA; RAPD markerji). Z RAPD markerji, ki so se izkazali ustrezni pokazatelji polimorfizma, smo vrednotili raznolikosti in sorodstvene odnose tako med domačimi sortami [7] kot tudi med genotipi zbranimi v obsežni kolekciji hmeljnih kultivarjev [25]. Zaradi večje informacijske vrednosti drugih molekulskih markerjev smo pričeli najprej z uporabo mikrosatelitov (SSR markerji), ki so jih razvili za hmelj avstralski raziskovalci [10] in nato z razvojem in karakterizacijo lastnih mikrosatelitskih lokusov pri hmelju [9, 19, 24]. Vpeljan je bil tudi AFLP (polimorfizem dolžine pomnoženih restrikcijskih fragmentov) markerski sistem, najprej z barvanjem s srebrom [10] in nato z avtomatsko fluorescenčno detekcijo [23], ki omogoča relativno hitro analizo genoma brez predhodnega poznavanja nukleotidnih zaporedij. Za uporabo AFLP markerjev pri različnih organizmih pa so bile potrebne posamezne optimizacije postopkov [17].

Za izvajanje tovrstnih analiz smo morali v laboratoriju uvesti nove molekulske metode in ustrezno opremiti laboratorij za učinkovito delo. Izolacija in karakterizacija mikrosatelitskih markerjev se je izkazala kot delovno in finančno obsežna naloga, vendar nadaljujemo z izdelavo novih SSR markerjev hmelja, ker so se glede na naše in tuje izkušnje ravno ti markerji izkazali kot nepogrešljivi in visoko informativni predvsem pri kartiranju genoma heterozigotnih rastlin kot je hmelj. Sedaj razpolagamo z okoli 40 uporabnimi SSR markerji hmelja, sekvenciranih pa je že večje število klonov iz obogatenih SSR knjižnic, pripravljenih za optimizacijske postopke genotipizacije hmelja. Zaključimo lahko, da smo v preteklem obdobju naredili dober metodološki napredek ter da razpolagamo z zadovoljivo opremo in znanjem tudi za zahtevnejše molekulske analize rastlin in rastlinskih patogenov. Molekulske metode so bile tudi praktično uporabljane za identifikacijske namene pri določanju pristnosti hmeljnih kultivarjev [3], določevanju spola [1], iskanju markerjev povezanih z odpornostjo na hmeljevo uš [2], pri nejasnostih označb akcesij divjega hmelja v genski banki [8] in pri identifikaciji hmeljnih patotipov glive *V. albo-atrum* [18, 19].

1.2 Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja

Sodobni hmeljni kultivarji so vzgojeni s križanji, ki so omogočila vnos in kombiniranje lastnosti, kot so pridelek, hmeljna grenčica in aroma ter za odpornosti na bolezni in škodljivce. Sedanja žlahniteljska praksa uporablja pri ustvarjanju novih kombinacij različnih lastnosti kot izhodiščni žlahniteljski material hmeljne kultivarje, žlahniteljske linije in divje hmelje, ki izražajo željene lastnosti, običajno ocenjene s fenotipskimi znaki. Današnji osnovni žlahniteljski material se vzdržuje v kolekcijah hmeljne dednine s katerimi razpolagajo največji žlahniteljski centri hmelja med njimi tudi IHPS. V teh kolekcijah je ohranjena biodiverziteta hmelja, ki se je generirala skozi daljša obdobja načrtne selekcije in žlahtnjenja ter z zbiranjem divjih akcesij hmelja. Za učinkovitejšo uporabo ohranjene biodiverzitete za vzgojo novih sort hmelja pa je potrebno natančno poznavanje obsega in porazdelitve obstoječe genetske variabilnosti ter genetskih odnosov med razpoložljivimi hmeljnimi genotipi.

Za opis kolekcij hmelja in vrednotenje genetske diverzitete hmelja so se največ uporabljali morfološki in kemijski podatki. Posebnega pomena so kemijski parametri, ker so neposredno povezani s kakovostjo hmelja. Te vrste raziskav so nedvoumno opredelile razdelitev hmeljnih akcesij v geografsko ločene skupine [21, 22] ter hmeljne kultivarje v skupine, ki so odražali njihovo geografsko poreklo in njihove kakovostne lastnosti [13, 6]. Te

raziskave so razdelile hmelj na dve osnovni veliki, geografsko ločeni skupini, ameriški grenični hmelj in evropski aromatični hmelj, ter na skupino sodobnih, hibridnih hmeljnih kultivarjev. Prva vrednotenja genetske diverzitete hmeljnih akcesij z molekulskimi markerji je izvedla naša skupina in pozneje še druge študije [25, 20, 10, 16].

RAPD in AFLP analize so nedvoumno potrdile ločitev hmeljne dednine v dve geografski skupini, evropsko in severno-ameriško, ter znotraj evropske skupine genetsko opredelile grupiranje hmeljnih kultivarjev v podskupine, ki so odražale preteklo žlahniteljsko prakso v posameznih regijah (Anglija, Bavarska, Češka) ali značilnosti žlahniteljskih programov (Slovenija, ZDA, Anglija, Japonska, Nova Zelandija, Avstralija). Molekulsko genetske študije so relativno dobro opredelile raznolikosti in variabilnosti ženskih kultiviranih akcesij v hmeljnih kolekcijah. Manj raziskav pa je bilo opravljenih na divjih hmeljih ter moških akcesijah. Med temi raziskavami je zanimiva molekulska analiza diverzitete geografsko raznolikih divjih hmeljev [15, 16], ki predvideva, da sta se ameriški in evropski hmelj ločila pred 1.05 do 1.27 milijoni let ter, da so zaznavne tudi variabilnost znotraj teh dveh geografskih skupin. Za žlahnitelje pa je lahko zanimiv podatek o stopnji raznolikosti med kultiviranim in divjim hmeljem, kar je analizirala naša skupina [12].

Za evropski hmelj je bilo ugotovljeno, da se divji in kultiviran hmelj sicer signifikantno razlikujeta, vendar se nahaja vsa diverziteta znotraj obeh skupin, ki izkazujeta približno enako stopnjo variabilnosti. Ali povedano drugače, variabilnost med hmeljnimi kultivarji je enako velika kot variabilnost med divjimi akcesijami, vendar se obe dve variabilnosti razlikujeta, s čimer se nakazuje, da divje akcesije vsebujejo še neuporabljen vir genetske variabilnosti. Dosedanja proučevanja genetske raznolikosti hmelja so prinesla znanja in rezultate, ki so potencialno uporabni v žlahtnjenju hmelja. Vendar je za učinkovito uporabo diverzitete s pomočjo asocijacijskih študij, posebno za obvladovanje kompleksnih, ekonomsko pomembnih lastnosti, kot je vsebnost alfa kislin, potrebno natančno poznavanje populacijske strukture znotraj kolekcij genskih virov za identifikacijo in pravilno interpretacijo povezav med funkcijsko in molekulsko diverziteto. To je eden izmed možnih načinov kako genetsko definirati kompleksno lastnost vendar so zato potrebne nadaljnje študije.

1.3 Kartiranje genoma hmelja

Za kartiranje genoma hmelja smo se odločili, ker želimo poiskati markerje vezane za kvantitativne lokuse, ki so povezani z visoko vsebnostjo alfa kislin ter za določitev markerjev vezanih za odpornost na *Verticillium*. Identifikacija obeh vrst markerjev bi služila neposredno v žlahtnjenju hmelja in bi lahko bistveno doprinesla k učinkovitosti in krajšemu času vzgoje novih sort hmelja. Poleg tega želimo poiskati gen(e), ki pogojujejo odpornost na *Verticillium* in tako proučiti molekularne mehanizme patogeneze, ker bi le poznavanje in razumevanje teh mehanizmov omogočilo dolgoročneje reševanje hmeljeve uvelosti.

Genske karte, dobljene s primerjavo rekombinacijskih frekvenc med pari markerjev, omogočajo proučevanje dedovanja kromosomskih regij pri kontroliranem križanju. Z razvojem molekularnih tehnik se je število markerjev zelo povečalo, kar je omogočilo izdelavo genskih kart vezanih markerjev pri večini agronomsko pomembnih rastlinah, kot so ječmen, koruza, riž, soja, solata, krompir, paradižnik itd. Saturirane karte so uporabne za kartiranje monogenih lastnosti kot tudi za razčlenitev kvantitativnih lastnosti. Osnovni princip kartiranja za obe vrsti lastnosti je podoben, to je tesna vezanost med markerjem in fenotipom ter skupna segregacija pri kontroliranem križanju. Tako določeni vezani markerji nam nato lahko služijo v žlahtnjenju s pomočjo markerjev (MAS, marker assisted selection). Monogene lastnosti z lahko določljivim fenotipom, kot na primer nekatere bolezni, je relativno enostavno vključiti v

gensko karto. Kartiranje kvantitativnih lastnosti (QTL) je bolj kompleksno, ker jih pogojuje več genov, katerih ekspresija je večkrat odvisna od zunanjih dejavnikov. S pomočjo saturiranih genskih kart je možno tudi izolirati gene na osnovi njihove lokacije na kromosomu brez poznavanja njihovega produkta in sicer z metodo pozicijskega kloniranja, kjer z identifikacijo tesno vezanih markerjev na obeh straneh željenega gena določimo segment DNA z genom.

Za kartiranje kvantitativnih lokusov za vsebnost alfa kislin smo uporabili F1 družino potomcev križanja Magnum x 2/1 ter AFLP in SSR markerje. Ta družina je segregirala kvantitativno glede vsebnosti alfa kislin določene v letih 2002, 2003, in 2004. Najprej smo izdelali moško in žensko gensko karto vezanih markerjev, nato pa smo z analizo kvantitativnih lastnosti določili štiri (*alpha1*, *alpha2*, *alpha3* in *alpha4*) kvantitativne markerje kot pokazatelje vsebnosti alfa kislin. Najbolj obetaven za uporabo v žlahtnjenju je marker *alpha2*, ker se nahaja na genski karti skupaj z enim izmed AFLP markerjev [4, 5]. Pri tem kartiranju smo dobili zelo dobre prve rezultate in bomo z delom nadaljevali z nanašanjem večjega števila SSR markerjev na regije kvantitativnih markerjev ter s testiranjem njihove stabilnosti tako da pričakujemo neposredno uporabne rezultate v bližnji prihodnost.

Za kartiranje genov za odpornost na hmeljevo uvelost je bila vzgojena družina križancev iz odporne sorte Wye Target in domačega občutljivega moškega hmelja 2/1. Izdelava genske karte in iskanje vezanih markerjev je relativno zahteven projekt zaradi obsežnosti dela pri multiplikaciji križancev v družini in ocenjevanju bolezenskih znakov. Družina je posajena na poskusnem polju in razmnoženi so bili potaknjenci za testiranje na odpornost na hmeljevo uvelost. Opravljena so bila predhodna testiranja na testnih kultivarjih za ocenjevanje stopnje okuženosti hmelja z letalnim patotipom *Verticillium albo-atrum* v rastnih komorah in pripravljena je shema okuževanja in ocenjevanja bolezenskih znakov za 90 križancev družine. V laboratoriju pa se izvaja genotipizacija 156 križancev z novimi SSR markerji. Oprejemljivejši rezultati bodo v prihodnjem letu, v prvi fazi pa pričakujemo identifikacijo vezanih markerjev za odpornost na *Verticillium*.

2 ZAKLJUČEK

V prispevku so prikazani rezultati in tekoče delo programa genetskih raziskav hmelja z namenom seznaniti širši krog zainteresiranih za tovrstne raziskave, ki naj bi prispevale k boljšemu poznavanju lastnosti pomembnih za ekonomsko opravičeno pridelovanje hmelja ter za razvoj molekulskih orodij, ki bi lahko neposredno služila v žlahtnjenju hmelja. V prikazu niso zajete raziskave, ki se nanašajo na iskanje analognih sekvenc rezistentnih genov v hmelju ter proteomske raziskave odpornosti hmelja na hmeljevo uvelost. Z dosedanjimi rezultati smo lahko delno zadovoljni predvsem zaradi tega, ker bi želeli povečati obseg in učinkovitost dela. Ta pa žal v veliki meri zavisi od razpoložljivih kadrovskih in finančnih zmožnosti. Vsekakor pa je program genetskih raziskav hmelja primer uspešnega medinštitutskega sodelovanja med Inštitutom za hmeljarsvo in pivovarstvo Slovenije in Biotehniško fakulteto ter dobrega dela mnogih sodelavcev programa.

ZAHVALA

Za navedene rezultate v prispevku so zaslužni dr. Andreja Čerenak, dr. Jernej Jakše, dr. Sebastjan Radišek, Branka Juvančič, dr. Zlatko Šatović, dr. Jelka Šuštar-Vozlič ter številni drugi sodelavci z IHPS in Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, BF.

3 VIRI

1. Čerenak, A., Jakše, J., Javornik, B., Application of sex-linked marker in hop (*Humulus lupulus* L.) breeding.- V: Glavač Damjan (ur.), Ravnik-Glavač (ur.). 2nd Congress of Genetic Society of Slovenia with International Participation, Bled, September 13-17, 2000. Congress proceedings, Ljubljana: Slovensko genetsko društvo, 2000, p. 371-372.
2. Čerenak, A., Javornik, B., Analysis of DNA markers for damson hop aphid resistance in hop.- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 79(2001)2, p. 361-369.
3. Čerenak, A., Jakše, J., Javornik, B. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers.- J. Am. Soc. Brew. Chem., 62(2003)1, p. 1-7.
4. Čerenak, A., Kartiranje genoma hmelja (*Humulus lupulus* L.) z AFLP markerji. Ljubljana, Doktorske disertacije, Biotehniška fakulteta, 2004, pp. 114.
5. Čerenak, A., Šatovič, Z., Javornik, B., Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content.- Genome, 2005, (sprejeto vtisk).
6. Henning, J.A., Steiner, J.J., Hummer, K.E., Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA.- Crop Science, 44(2003)2, p. 411-417.
7. Jakše, J., Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Identification of hop cultivars by RAPD markers.- In: Javornik, B., B. Bohanec, and I. Kreft (Eds.), Proc. of IPBA, 5-7 Dec, 1994, Rogla, Slovenia, p. 147-151.
8. Jakše, J., Čerenak, A., Javornik, B., Molekularni markerji pri proučevanju genskih virov hmelja (*Humulus lupulus* L.).- V: Tajnšek, A., (ur.), Šantavec, I., (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2000: zbornik simpozija : proceedings of symposium, [Moravske Toplice, 14. in 15. december 2000], (Novi izzivi v poljedelstvu). Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2000, p. 144-148.
9. Jakše, J., Javornik, B., High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.).- Plant Mol. Biol. Report, 19(2001), p. 217-226.
10. Jakše, J., Kindlhofer, K., Javornik, B., Assesment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers.- Genome, 44(2001), p. 773-782.
11. Jakše, J., Bandelj-Mavsar, D., Javornik, B., Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.).- Mol. ecol. notes(Print), 2(2002)4, p. 544-546.
12. Jakše, J., Šatovič, Z., Javornik, B., Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulu lupulus* L.).- Genome, 47(2004), p. 889-899.
13. Kralj, D., Zupanec, J., Vasilj, Đ., Kralj, S., Pšeničnik, J., Variability of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.).- J. Inst. Brew. 97(1991), p. 197-206.
14. Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., Molecular evolution of hops, *Humulus lupulus*.- In Proceedings of the Scientific Commission, I.H.G.C., held 24-27 June 2003, Dobrna, Slovenia. Edited by E. Seigner. By Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Hüll, Germany, 2003, p. 92-96.
15. Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L.- Genetic Resources and Crop Evoltion, 2005, (vtisku).

16. Patzak, J., Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.).- Euphytica 121(2001), p. 9-18.
17. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B., Optimisation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*).- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 77(2001)2, p. 139-146.
18. Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., Javornik, B., Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis.- Plant Disease, 87(2003)6, p. 633-638.
19. Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop.- Plant Disease 88(2004)10, p. 1115-1122.
20. Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., Seigner, E., Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hops, *Humulus lupulus*, as determined by amplification fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data.- Plant Breeding, 119(2001), p. 257-233.
21. Small, E., A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*.- Systematic Botany 3(1978), p. 37-76.
22. Stevens, J.F., Taylor, A.W., Nickerson, G.B., Ivancic, M., Henning, J., Hanunold, A., Deinzer, M.L., Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol.- Phytochemistry, 53(2000), p. 759-775.
23. Štajner, N., Javornik, B., Bandelj-Mavsar, D., Protocol used for AFLP by automatic laser fluorescence analysis.- Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo, 81(2003)1, p. 39-45.
24. Štajner, N., Jakše, J., Kozjak, P., Javornik, B., The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.).- Plant Science, Limerick, 168(2004)1, p. 213-221.
25. Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis.- Plant Breeding, 118(1999), p. 75-181.