

Hanna Olszak-Przybyś

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

METODY STOSOWANE W BADANIACH ZRÓŻNICOWANIA
ORAZ IDENTYFIKACJI ODMIAN CHMIELU*

Słowa kluczowe: chmiel, identyfikacja odmian chmielu, markery mikrosatelitarne, sekwencjonowanie

Wstęp

Odrębność każdej odmiany chmielu jest warunkowana przez zespół cech morfologicznych (kształt liści, pokrój rośliny, barwa pędów) i fizjologicznych (wielkość plonu, dynamika wzrostu rośliny, odporność na stres środowiskowy i choroby). Analiza tych cech odbywa się zarówno w systemie wieloletnich doświadczeń polowych, jak również w specjalistycznych laboratoriach, gdzie prowadzone są badania fitochemiczne czy molekularne. W badaniach tych porównuje się analizowane odmiany z wzorcem stanowiącym materiał referencyjny. Właściwa identyfikacja genotypów chmielu jest szczególnie ważna dla hodowców, ponieważ znajomość genetycznego podłoża najważniejszych cech odmianowych umożliwia precyzyjne tworzenie programów i strategii hodowlanych. Stanowi też podstawę funkcjonowania banków genów. Właściwa identyfikacja odmian chmielu jest również istotna dla przemysłu piwowarskiego, który wymaga surowca o zdefiniowanych i pożądanym cechach. W celu sprostania tym wymaganiom wprowadzono procedury kontroli tożsamości odmianowej plantacji produkcyjnych chmielu, jak również surowca chmielowego w postaci wysuszonych szyszek i granulatu.

Metody oparte na obserwacji cech morfologicznych roślin

W celu ustalenia odrębności odmianowej chmielu stosuje się szereg tradycyjnych metod, w tym ocenę fenotypową roślin. Taka ocena prowadzona jest najczęściej na

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

etapie wzrostu chmielu na plantacji, na podstawie obserwacji wybranych, charakterystycznych cech morfologicznych danej rośliny, takich jak: pokrój, barwa pędów, kształt liści oraz wielkość i kształt szyszek. Davis (4) w swojej pracy uwzględnił siedem podstawowych cech morfologicznych, na podstawie których prowadził identyfikację odmianową chmielu. Zauważył jednak, że metody obserwacyjne choć są skuteczne, mają też poważne wady. Przede wszystkim są czasochłonne i wymagają dużego doświadczenia obserwatora. Dodatkowo zarówno cechy morfologiczne, jak i fizjologiczne zależą nie tylko od zapisu genetycznego, ale również od warunków środowiska, dlatego mogą w pewnych granicach zmieniać się w zależności od rejonu lub roku uprawy. Na przykład takie cechy, jak: wielkość plonu, wysokość roślin, intensywność zabarwienia liści czy wielkość szyszek, zmieniają się wraz z nasłonecznieniem, sposobem uprawy czy czasem zbioru. Čerenak i in. (3) wykazali, że zmienne warunki środowiskowe mogą wpływać na cechy morfologiczne oraz skład chemiczny roślin i w konsekwencji utrudniać poprawną identyfikację odmian chmielu, szczególnie gdy ocenę prowadzi się w różnych regionach geograficznych. Wiarygodną identyfikację genotypów chmielu opartą na obserwacji roślin utrudnia również duże podobieństwo odmian, szczególnie kiedy rośliny znajdują się we wczesnych fazach rozwojowych, gdyż wiele kluczowych cech ujawnia się dopiero podczas dojrzewania szyszek. W sytuacji, kiedy zachodzi potrzeba rozpoznania młodych roślin chmielu bądź surowca w postaci wysuszonych i sprasowanych szyszek czy granulatu, metody obserwacyjne bazujące na porównywaniu cech morfologicznych są nieskuteczne, dają bowiem niejednoznaczne wyniki.

Metody oparte na badaniach fitochemicznych

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie możliwościami identyfikacji odmianowej chmielu przy użyciu metod chemicznych, głównie technik chromatografii gazowej (GC, ang. *gas chromatography*) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. *high-performance liquid chromatography*). Tego typu analizy pozwalają na określenie zawartości metabolitów wtórnych chmielu, takich jak: kwasy goryczkowe, olejki eteryczne czy polifenole. Skład metabolitów wtórnych w chmielu jest warunkowany genetycznie i charakterystyczny dla każdej odmiany (19, 23, 37, 52). Na przykład czeska odmiana Saaz wyróżnia się wysoką zawartością β -farnezeny (37), odmiana Magnum zawiera dużą ilość kwasu p-kumarowego (9), natomiast odmianę Nugget cechuje wyjątkowo wysoka zawartość kohumulonu (21). Pozyskanie danych dotyczących składu jakościowego i ilościowego związków chemicznych zawartych w odmianach chmielu umożliwia precyzyjne rozróżnianie tych odmian. Niektórzy autorzy proponują chromatograficzne metody identyfikacji genotypów chmielu oparte wyłącznie na zawartości specyficznych składników olejków eterycznych (6, 36). Inni badacze oprócz olejków wykorzystują w diagnostyce kwasy goryczkowe (20). Z kolei De Comman i in. (5) oprócz kwasów goryczkowych

i olejków badali również zawartość flawonoidów. W ten sposób scharakteryzowali pod względem chemicznym odmiany chmielu, takie jak: Saaz, Wye Target i Nugget. Jelínek i in. (17) testowali metodą chromatografii siedem czeskich odmian chmielu, w których analizowali zawartość alfa i beta kwasów, olejków eterycznych i pojedynczych polifenoli. Otrzymane wyniki poddali ocenie statystycznej, która pozwoliła na wyodrębnienie odmian o podobnym składzie chemicznym. W swojej pracy udowodnili też unikalność odmian Agnus i Saaz pod względem zawartości β -farnezeny. Również Patzak i in. (35) podjęli próbę rozróżnienia genotypów chmielu na podstawie właściwości chemicznych. Naukowcy badali poziom alfa i beta kwasów w dzikim chmielu. Zaobserwowali wyraźne różnice w zawartości kohumulonu i kolupulonu pomiędzy genotypami: europejskim i północnoamerykańskim. Poziom kohumulonu w alfa kwasach dzikiego chmielu północnoamerykańskiego był znacznie wyższy niż w dzikim chmielu europejskim. Wspólną cechą wszystkich analiz chemicznych opartych na chromatografii jest to, że porównują one skład poszczególnych związków chemicznych badanej próbki ze składem próbek referencyjnych (10, 25) lub odpowiednimi wzorcami. Do celów identyfikacyjnych niezbędne są nie tylko badania jakościowe, ale również ilościowe charakterystycznych związków chemicznych. Uzyskane wyniki mogą być analizowane przy użyciu różnych metod. Na podstawie referencyjnej bazy danych można skonstruować schemat blokowy (20, 24), w którym określa się przedziały zawartości wybranych związków charakterystyczne dla poszczególnych odmian chmielu. Badana próbka charakteryzująca się określonymi zawartościami poszczególnych związków trafia do jednej z grup w bloku reprezentujących konkretną odmianę. Można również zastosować równoległe porównywanie kompozycji olejków eterycznych, gdzie poszczególne składniki są przedstawiane graficznie, najczęściej modelem typu MIN-MAX (18). Badane składniki olejków eterycznych nanosi się na oś odciętych, a ich względną zawartość na oś rzędnych. Po naniesieniu na wykres kilku próbek referencyjnych tej samej odmiany uzyskuje się zakres zawartości charakterystyczny dla tej odmiany. Jeśli zawartości poszczególnych składników próbki badanej mieszczą się w zakresach odmiany referencyjnej, oznacza to, że z dużym prawdopodobieństwem należy ona do tej odmiany. Fores i Schmidt (8) pogrupowali i oznaczyli w ten sposób ponad 20 odmian chmielu. Kralj i in. (21), bazując na technikach chromatografii i stosując model MIN-MAX, wyodrębnili 14 grup olejków eterycznych zależnych od genotypu i w ten sposób sklasyfikowali 95 odmian chmielu.

Metody molekularne

Skład chemiczny szyszek chmielowych jest warunkowany nie tylko genotypem, ale również w dużym stopniu jest modyfikowany przez czynniki środowiskowe. Z tego powodu rozróżnianie odmian chmielu na podstawie parametrów chemicznych bywa zawodne, a w przypadku mieszanki odmian jest wręcz niemożliwe. W takiej

sytuacji przydatne stają się techniki biologii molekularnej oparte na badaniach kwasów nukleinowych (DNA), które mogą ostatecznie potwierdzić rezultaty uzyskane na podstawie badań morfologicznych i chemicznych. Badanie odrębności genetycznej odmian chmielu technikami molekularnymi sprowadza się w istocie do poznania stopnia pokrewieństwa albo dystansu genetycznego wyrażanego poprzez poziom zróżnicowania sekwencji DNA w poszczególnych genotypach. Nawet odmiany bardzo podobne do siebie fenotypowo i charakteryzujące się zbliżonym składem związków chemicznych w tkankach wykazują różnice w budowie DNA. Techniki molekularne bardzo dobrze sprawdzają się w identyfikacji odmian, które uzyskano zarówno w drodze selekcji, jak i krzyżowania lub transformacji genetycznej. Ponadto metody, których podstawą są analizy DNA mają przewagę nad pozostałymi, gdyż umożliwiają identyfikację niezależnie od fazy rozwojowej badanych obiektów. Obecnie diagnostyka oparta na badaniu DNA odgrywa coraz większą rolę w ochronie zasobów genowych, identyfikacji linii hodowlanych oraz badaniach nad zmiennością genetyczną. Markery molekularne są szeroko wykorzystywane do genetycznego rozróżniania osobników zarówno na poziomie międzygatunkowym, jak również w obrębie danego gatunku czy populacji. Bardzo intensywnie rozwija się również hodowla molekularna, która wykorzystuje markery molekularne sprzężone z genami warunkującymi cechy fenotypowe do selekcji pożądanych genotypów. Do metod molekularnych sięga się również w diagnostyce chorób roślin w celu wykrycia i identyfikacji czynników chorobotwórczych. Idealne markery molekularne powinny odznaczać się wysokim stopniem polimorfizmu, dużą specyficznością oraz kodominującym charakterem dziedziczenia (49). Ponadto dobry marker genetyczny powinien być wykrywalny w prosty i szybki sposób. Powinien też wykazywać neutralność selekcyjną niezależną od czynników zewnętrznych i być równomiernie rozłożony w genomie. Istnieje szereg podziałów markerów, jak również metod genotypowania (30, 43, 47). Według Sztuby-Solińskiej (47) techniki oparte na analizie DNA można podzielić na techniki hybrydizacyjne DNA, techniki bazujące na amplifikacji PCR (losowej lub specyficznej) oraz techniki mieszane bazujące na wykorzystaniu endonukleaz restrykcyjnych i PCR. Spośród metod amplifikacji DNA (ang. *polymerase chain reaction*) wykorzystujących markery molekularne metoda RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA* – polimorfizm DNA amplifikowanego losowo) jest najprostszą techniką stosowaną w genetycznych badaniach roślin, w tym również w identyfikacji odmian chmielu. RAPD polega na szybkim powielaniu 1–10 fragmentów polimorficznego DNA o długości 100–200 par zasad. Reakcja amplifikacji prowadzona jest przy użyciu jednego dziesięcionukleotydowego startera o dowolnie wybranej sekwencji nukleotydów. Ze względu na dużą liczbę kombinacji różnych sekwencji starterów metoda RAPD jest często stosowana do mapowania genomów roślinnych, określania pokrewieństwa genetycznego i tworzenia map genetycznych. Marilyn i in. (27) wykorzystali tę technikę do rozróżnienia 7 niedojrzałych odmian chmielu, które wcześniej bez sukcesu próbowano scharakteryzować na podstawie

składu olejków eterycznych. Z kolei Tsuchiya i in. (50) użyli metody RAPD do rozróżnienia 12 komercyjnych odmian chmielu oraz potwierdzili jej skuteczność w identyfikowaniu mieszaniny różnych odmian chmielu. Pillay i Kenny (38, 39) prowadzili badania, w których wykorzystali markery RAPD i RFLP do opisanie różnic pomiędzy chmielem uprawnym i dzikim, jak również różnic pomiędzy *Humulus lupulus* a *Humulus japonicus*. Murakami (31) użył 25 markerów RAPD do scharakteryzowania 51 odmian chmielu pochodzących z całego świata. Badane odmiany zakwalifikował do 6 różnych klastrow, a różnice pomiędzy poszczególnymi klastrami wyjaśnił na podstawie zależności genetycznych związanych z ich pochodzeniem. Użyteczność metody RAPD potwierdzili także w swoich badaniach Šuštar-Vozlic i Javornik (48), którzy wykorzystali ją do identyfikacji genetycznej 65 odmian chmielu. Udało im się też przyporządkować poszczególne odmiany do dwóch grup o zróżnicowanym pochodzeniu, tj. europejskiej i północnoamerykańskiej. Podobne badania prowadzili Shigeki i in. (46). Naukowcy identyfikowali odmiany chmielu, wykorzystując markery RAPD, które następnie sekwencjonowali w celu syntezy specyficznych starterów. Za pomocą uzyskanych starterów odróżnili jedenaście odmian chmielu. Co więcej, wykorzystali tę technikę do wykrywania próbek stanowiących mieszanek odmian chmielu. Przydatność techniki RAPD w identyfikacji genotypów chmielu została też potwierdzona w pracach Patzaka i in. (34) oraz Murakami (32). Obecnie technika RAPD nie jest już szeroko wykorzystywana. Niska powtarzalność metody wynikająca z obniżonej temperatury przyłączania starterów podczas reakcji PCR spowodowała odejście od markerów RAPD na rzecz innych markerów molekularnych.

Metoda AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów) łączy w sobie zalety RAPD oraz techniki RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) opracowanej w 1974 r. przez Grodzicker i współpracowników (11). Początek technice AFLP nadał Zabeau (56), który w 1993 r. opatentował metodę SRFA (ang. *Selective Restriction Fragment Amplification*), natomiast autorem ostatecznego kształtu i nazwy metody był Vos (51). Metoda AFLP daje możliwość szybkiego uzyskania wyników, ale również gwarantuje wysoką powtarzalność. Najważniejsze jednak, że w odróżnieniu od wielu technik molekularnych opartych na metodzie PCR zastosowanie AFLP nie wymaga wcześniejszej znajomości sekwencji badanego DNA. Markery AFLP uzyskuje się poprzez trawienie identyfikowanego DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi różniącymi się częstotliwością rozpoznawania miejsc restrykcyjnych. Do tego celu najczęściej stosuje się enzymy restrykcyjne *EcoRI* i *MseI* trawiące DNA odpowiednio z małą oraz dużą częstotliwością. Przeprowadzone w ten sposób trawienie prowadzi do wygenerowania dużej liczby fragmentów DNA, do których następnie dołączane są 10–30-nukleotydowe adaptory. Sekwencje adaptorów oraz miejsc pozostałych po trawieniu są rozpoznawane przez komplementarne do nich startery. W kolejnych etapach następuje dwukrotna ampli-

fikacja fragmentów: preamplifikacja oraz selektywna amplifikacja. Dzięki temu, że startery mają na końcach 3' dodatkowe nukleotydy, następuje selekcja powielanych fragmentów. Na etapie preamplifikacji startery posiadają po jednym dodatkowym nukleotydzie, ale już przy drugiej amplifikacji startery mają aż po trzy dodatkowe nukleotydy. Liczba nukleotydów obecnych przy końcu 3' startera użytego w ostatnim etapie analizy AFLP warunkuje liczbę otrzymanych fragmentów DNA. Im jest ich mniej, tym liczba uzyskanych fragmentów DNA jest większa. Technika AFLP jest droższa od RAPD, jednak ze względu na możliwość analizy wielu *loci* jednocześnie, rzeczywisty koszt przypadający na jeden marker jest niższy. Podsumowując, takie cechy opisywanej metody, jak wysoka czułość, wydajność w generowaniu dużej liczby fragmentów DNA, jak również możliwość identyfikacji bardzo dużej liczby polimorficznych nukleotydów i powtarzalność sprawiły, że technika oparta na markerach AFLP znalazła zastosowanie w identyfikacji zarówno zmienności sekwencyjnej, jak i metylacyjnej. Powstało szereg prac badawczych wykorzystujących markery AFLP do oceny podobieństwa genetycznego różnych gatunków roślin użytkowych, w tym również odmian chmielu. Hartl i Seefelder (12) w swoich badaniach oznaczyli osiem niemieckich odmian chmielu. Użyli 60 markerów w ośmiu kombinacjach i uzyskali 523 fragmenty AFLP, z których 145 odznaczało się polimorfizmem. Badacze nie zaobserwowali jednak różnic między odmianami Saazer, Spalter i Tettninger. W związku z tym przyjęli, że odmiany te pochodzą z hodowli selekcyjnej genetycznie homogenicznej populacji. Fakt, że testowane odmiany wykazały duże podobieństwo zarówno w cechach morfologicznych, jak i w składzie chemicznym, stanowi potwierdzenie, że ich genomy różnią się od siebie jedynie niewielkim regionem. Również Fleischer i in. (7) udowodnili, że technika AFLP jest użytecznym narzędziem do określania poziomu zmienności genetycznej zarówno w obrębie jednej odmiany chmielu, jak również pomiędzy odmianami. Badacze testowali odmianę Tettninger, której pochodzenie genetyczne było dotychczas nieznanne. Przy użyciu zestawu sześciu kombinacji starterów przeanalizowali reprezentatywną próbę 279 osobników pochodzących z tej odmiany i w ten sposób ocenili poziom jej zmienności genetycznej. Dodatkowo porównali odmianę Tettninger z 16 pokrewnymi odmianami chmielu. Badania prowadzili na materiale genetycznym, który uzyskali z liści, szyszek i osadek chmielu. Wykazali, że wszystkie źródła materiału roślinnego dają powtarzalne wyniki, tym samym potwierdzili przydatność metody w analizach różnego rodzaju materiału genetycznego. Dotychczas markery AFLP były częstym narzędziem stosowanym w celu oceny stopnia zróżnicowania genetycznego wśród odmian chmielu oraz określenia źródeł ich pochodzenia (13, 42). Powstałe publikacje wyróżniają zazwyczaj dwie główne grupy odmian, które odzwierciedlają ich pochodzenie. Pierwszą grupę stanowią genotypy aromatyczne wywodzące się od odmiany botanicznej *Humulus lupulus* var. *lupulus*, powszechnie występującej na terenie Europy, natomiast druga grupa obejmuje odmiany goryczkowe pozyskane na drodze krzyżowania form europejskich z genotypami północnoamerykańskimi.

Metodą podobną do AFLP jest technika DArT (ang. *Diversity Arrays Technology*), która zamiast frakcjonowania produktów reakcji PCR, np. na żelu akrylamidowym, wykorzystuje hybrydyzację badanego DNA z sondami umieszczonymi na mikromacierzach. Źródłem zmienności w technice DArT jest polimorfizm pojedynczych nukleotydów SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*), zmiany insercyjno-delecyjne (InDel), zmiany w metylacji DNA oraz sekwencje powtórzeniowe (44). Podobnie jak AFLP technika DArT nie wymaga znajomości sekwencji DNA. Wymaga natomiast opracowania bibliotek genomowych w celu uzyskania sond. Etap tworzenia sond jest najbardziej pracochłonną częścią tej techniki. Wadą metody DArT jest potencjalne ryzyko użycia w analizie identycznych sond. Ponieważ sondy nie są sekwencjonowane, nie można wykluczyć, że sondy o identycznej sekwencji zostaną zastosowane kilka razy, co może spowodować znaczne zmniejszenie liczby użytecznych markerów (14). Kolejnym ograniczeniem techniki DArT jest dominujący charakter markerów DArT oraz ograniczona pojemność mikromacierzy. Zaletę metody stanowią natomiast wewnętrzne kontrole, które zapewniają dokładność i wiarygodność wyników nawet do ok. 99,8% (54). Procedura DArT polega na izolacji genomowego DNA, a następnie jego trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację cytozyny. Najczęściej stosuje się enzymy typu *Pst* I, *Rag* I oraz *Bst* NI. Dzięki użyciu *Pst* I generowane są fragmenty DNA, które pochodzą głównie z rejonów kodujących genomu. Na kolejnym etapie analizy do uwolnionych fragmentów dołączane są adaptory (syntetyczne dupleksy DNA), które umożliwiają powielenie fragmentów. Powielone fragmenty o określonej masie cząsteczkowej są następnie klonowane, a wektory zawierające sklonowane fragmenty służą do tworzenia sond na mikromacierzach. Pierwotnie metodę DArT opracowano dla diploidalnego genomu ryżu (1). Obecnie technika wykorzystywana jest dla dowolnych gatunków, w tym także dla chmielu. Pierwsze badania nad chmielem z wykorzystaniem markerów DArT prowadzili Howard i in. (13). Przy zastosowaniu 720 polimorficznych markerów naukowcy zidentyfikowali 92 odmiany chmielu, które pochodziły z Europy, Ameryki i Australii. Wśród testowanych odmian wyodrębnili i scharakteryzowali dwie główne pule genetyczne: północnoamerykańską i europejską. Zaobserwowali dużą rozbieżność między grupą północnoamerykańską a grupą europejską i mieszańcami. Wszystkie genotypy chmielu północnoamerykańskiego zostały zgrupowane w jednym klastrze, podczas gdy drugi klaster zawierał zarówno genotypy europejskie, jak i mieszańcowe. Naukowcy, bazując na metodzie średnich połączeń (UPGMA, ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*), stwierdzili, że genotypy mieszańcowe wykazują większe podobieństwo genetyczne do genotypów europejskich niż do północnoamerykańskich. McAdam (29) również zastosował technologię DArT do genotypowania odmian chmielu. Zidentyfikował 1241 polimorficznych markerów dla 497 badanych odmian. Wykonana analiza filogenetyczna pozwoliła na wyodrębnienie dwóch puli genowych: europejskiej i północnoamerykańskiej, przy czym wykazała wyraźną genetyczną odrębność mieszańców. Uzyskane zależności genetyczne zgadzały się

z aktualną wiedzą na temat filogenetyki chmielu, co pozwoliło badaczom potwierdzić przydatność technologii DArT do identyfikacji odmianowej chmielu.

Sekwencje mikrosatelitarne (STR, ang. *short tandem repeats*) są to proste, tandemowe powtórzenia składające się z jednego do sześciu nukleotydów. Liczba powtórzeń określonego motywu wynosi zazwyczaj od 10 do 50, natomiast łączna długość sekwencji mikrosatelitarnej waha się w granicach od 60 do 400 par zasad. Mikrosatelity występują głównie w obrębie niekodujących fragmentów DNA, ale można je również znaleźć w sekwencjach kodujących oraz w obszarach pozagenowych. Sekwencje mikrosatelitarne dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla, a ich funkcje polegają głównie na regulacji aktywności genów oraz uczestniczeniu w procesach metabolicznych cząsteczek DNA. Główną zaletą markerów mikrosatelitarnych jest wysoki poziom polimorfizmu, czyli występowanie w populacji kilku lub nawet kilkunastu różnych form alleli danej sekwencji. Kolejną zaletą mikrosatelit jest ich kodominujący charakter umożliwiający rozróżnianie u heterozygot komponentów pochodzących od form rodzicielskich. Prosty model dziedziczenia oraz szybka metoda analizy umożliwiają szerokie zastosowanie tych markerów w różnych dziedzinach nauki, w tym również w hodowli i identyfikacji osobniczej – także odmian chmielu. Pierwsze badania przy użyciu markerów mikrosatelitarnych w chmielu prowadzili Brady i in. (2). Wytypowali oni 4 markery przydatne w określeniu stopnia zróżnicowania genetycznego pomiędzy chmielem dzikim i uprawnym. Čerenak i in. (3) udowodnili, że 5 par polimorficznych markerów mikrosatelitarnych wystarczy żeby rozróżnić 63 odmiany chmielu (wyjątek stanowiły odmiany uzyskane w drodze selekcji lub mutacji). Również Jakš e i in. (15) podjęli próbę określenia różnorodności genetycznej dzikich odmian chmielu w porównaniu z chmielem uprawnym. W swojej pracy ocenili zmienność genetyczną markerów AFLP i mikrosatelitarnych dla 124 odmian chmielu dzikiego (z Europy, Azji i Ameryki Północnej) oraz chmielu uprawnego (były to zarówno odmiany, jak i linie hodowlane). Zidentyfikowali łącznie 63 allele, przy czym największą ich liczbę wykryli w grupie dzikich odmian chmielu pochodzących z terenów Europy. Z kolei największą liczbę alleli unikatowych zanotowali dla genotypów chmielu dzikiego wywodzącego się z obszaru Ameryki. Tak duża liczba wykrytych alleli unikatowych świadczy o wysokiej różnorodności genetycznej amerykańskiej puli genowej. Badacze skonstruowali również dendrogram, w którym wyróżniono 10 różnych klastrow zawierających identyfikowane genotypy. Otrzymane w wyniku analizy skupień klastry odzwierciedlały związki pomiędzy geograficznym pochodzeniem poszczególnych genotypów chmielu. Największą odrębność genetyczną stwierdzono w przypadku dzikich odmian chmielu amerykańskiego, które na drzewie filogenetycznym utworzyły jedno odległe skupienie. Co więcej, naukowcy w swojej pracy dokonali porównania zmienności genetycznej badanych genotypów chmielu określonej przy użyciu markerów mikrosatelitarnych i AFLP. Skonstruowane metodą UPGMA dendrogramy wykazały niską korelację pomiędzy dwoma rodzajami markerów. Drzewko filogenetyczne stworzone na pod-

stawie markerów mikrosatelitarnych charakteryzowało się poprawnym grupowaniem spokrewnionych ze sobą genotypów. Z kolei dendrogram wygenerowany z wykorzystaniem markerów AFLP nie tylko dużo lepiej odzwierciedlał stopnie pokrewieństwa ściśle związanych ze sobą genotypów, ale również dawał możliwość rozróżnienia geograficznego. W kolejnych badaniach Jakše i in. (16), wykorzystując 26 komercyjnych odmian chmielu oraz 10 dzikich osobników, zaprojektowali nowe markery mikrosatelitarne, a następnie sprawdzili ich przydatność do identyfikacji genotypów chmielu. Spośród 34 testowanych par markerów 27 z powodzeniem amplifikowało, dlatego wykorzystano je do rozróżniania odmian chmielu. Zastosowane markery mikrosatelitarne umożliwiły wyraźny podział testowanych genotypów chmielu w zależności od regionu ich pochodzenia, typu użytkowego oraz rodowodu. Podobne badania prowadzili Stajner i in. (45), którzy opracowali 25 markerów mikrosatelitarnych. Przy ich użyciu dokonali oceny polimorfizmu 67 odmian chmielu, w tym 34 odmian uprawnych oraz 33 dzikich osobników. Zaprojektowane przez nich markery wzbogacone o motywy GA, GT, ACA, AGA, CAG i ACTC amplifikowały 256 alleli w 25 *loci*, średnio 10,6 allela na jeden *locus*. Uzyskana wysoka wartość wskaźnika polimorfizmu (PIC, ang. *Polymorphic Information Content*) dla użytych markerów świadczy o tym, że są one wysoce przydatne w mapowaniu genomu chmielu oraz identyfikacji odmianowej. Również w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach prowadzono badania nad wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych do określenia tożsamości odmian chmielu uprawianego w Polsce (22). W toku badań wytypowano zestaw sześciu markerów molekularnych (H1AGA7, H1AGA8, H1GA23, H1GA27, H1GT16, H1GT17), które amplifikowano w dwóch multipleksowych reakcjach PCR. Badaniom poddano dziewięć odmian chmielu, w tym: pięć odmian polskich (Lubelski, Marynka, Sybilla, Iunga i Lomik) i cztery odmiany niemieckie (Hallertauer Taurus, Hallertauer Tradition, Perle i Hallertauer Magnum). Zastosowane markery mikrosatelitarne okazały się być polimorficzne dla wszystkich badanych odmian chmielu. Ogółem amplifikowano 31 alleli. Najbardziej przydatny w rozróżnianiu dziewięciu odmian chmielu był marker H1GT17, który charakteryzował się wysoką wartością PIC i niską wartością prawdopodobieństwa identyczności (PI, ang. *Probability of Identity*). Badacze w swojej pracy dowiedli, że użycie wyżej wymienionych markerów umożliwia nie tylko precyzyjną identyfikację odmian chmielu, ale daje również możliwość wiarygodnej identyfikacji surowca chmielowego zarówno w postaci wysuszonych szyszek, jak i granulatu. W pracy analizowano materiał jednorodny pochodzący z jednej odmiany, jak również mieszanki złożone z szyszek dwóch odmian (Marynka i Lubelski) wymieszanych w różnych proporcjach. Z sukcesem zidentyfikowano mieszankę z 10% udziałem innej odmiany w surowcu. W przypadku domieszek niższych niż 10% zaobserwowano zanikanie alleli, natomiast domieszek stanowiących poniżej 1% nie udało się wykryć. Oceniono, że wysoka czułość metody, pozwalająca na wykrycie nawet niewielkich domieszek obcych odmian w surowcu,

daje szerokie możliwości wykorzystywania tej techniki zarówno w celach badawczych, jak i komercyjnych. Ten sam zespół naukowców prowadził również badania, których celem była ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian chmielu na tle odmian zagranicznych zgromadzonych w banku genów rodzaju *Humulus* w IUNG-PIB. Przebadano materiał roślinny pobrany ze 103 odmian chmielu, w tym 20 odmian polskich. W badaniach genetycznych wykorzystano 20 markerów mikrosatelitarnych odznaczających się wysokim poziomem polimorfizmu, które amplifikowano w 8 reakcjach multiplex PCR. Z ich udziałem wykryto łącznie 176 alleli (średnio 8,8 na *locus*). Najbardziej polimorficzny był marker H1GA23, który amplifikował 16 alleli, natomiast najmniej – marker 10316303, który amplifikował zaledwie 3 allele. Wyniki genotypowania wykorzystano do obliczenia frekwencji alleli oraz ich efektywnej liczby (N_e , ang. *Effective number of alleles*). Na podstawie frekwencji alleli wyliczono dwa wskaźniki polimorfizmu: wskaźnik wartości polimorfizmu (PIC) i prawdopodobieństwo identyczności (PI). Wykazano, że najbardziej przydatnym markerem do odróżniania odmian był *locus* H1GT17. Wykonano również analizę struktury genetycznej, która wykazała obecność dwóch grup genetycznych. Określono je jako europejską i amerykańską pulę genową. Amerykańska pula genowa stanowiła ponad 70% wszystkich badanych odmian chmielu. Analiza struktury genetycznej wykazała również obecność odmian o mieszanym pochodzeniu. Większość z nich stanowiły odmiany użytkowe uzyskane na drodze krzyżowań międzyodmianowych. Dendrogram skonstruowany metodą przyłączania sąsiadów (NJ, ang. *Neighbor-Joining*) wykazał obecność dwóch klastrow: europejskiego i mieszanego. Klaster europejski skupił odmiany europejskie o aromatycznym typie użytkowym. Klaster mieszany zgrupował odmiany pochodzenia amerykańskiego o goryczkowym typie użytkowym oraz odmiany o genotypie mieszanym z wyraźnym udziałem puli genowej północnoamerykańskiej. Badacze stwierdzili wysokie zróżnicowanie genetyczne wśród odmian polskiej hodowli i określili podobieństwo genetyczne pomiędzy odmianami polskimi i zagranicznymi.

Do badań zróżnicowania genetycznego chmielu na podstawie jego rDNA wykorzystywano również markery molekularne polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Technika RFLP jest metodą hybrydacyjną i polega na trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi. Endonukleazy rozpoznają określone miejsca (4–6 par zasad) i specyficznie trawią DNA. Produkty trawienia są następnie rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i nanoszone na naładowane dodatkowo membrany. Polimorfizm jest rozpoznawany za pomocą sond (krótkich, znakowanych odcinków DNA), które są komplementarne do homologicznych fragmentów DNA znajdujących się na membranie. Identyfikowanym źródłem zmienności w tej metodzie są mutacje w obrębie miejsc trawienia oraz potencjalne modyfikacje zasad azotowych. Różnorodność genetyczna może być też wynikiem wystąpienia delekcji i insercji lub różnic w liczbie sekwencji powtórzonych, zawartych pomiędzy miejscami trawienia. Technika RFLP umożliwia

identyfikację wielu *loci* jednocześnie. Markery RFLP cechuje kodominujący charakter dziedziczenia oraz możliwość rozpoznawania dominujących i recesywnych alleli, z tego względu są one przydatne w selekcji materiałów hodowlanych i tworzeniu map genetycznych. Mapy te są następnie uzupełniane markerami genowymi za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy DNA. Technikę RFLP wykorzystali w swojej pracy Pillay i Kenny (40), którzy w ten sposób ocenili zmienność genetyczną chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) i dzikiego. Badacze wykryli, że w rDNA chmielu znajdują się dwa warianty długości 10,3 i 9,3 tysięcy par zasad, reprezentowane przez trzy fenotypy: A, B i C. Przeprowadzone przez nich mapowanie miejsc restrykcyjnych wykazało, że rDNA chmielu jest strukturalnie podobne do rDNA większości roślin wyższych, a długości powtórzeń rDNA u różnych genotypów chmielu są w dużym stopniu jednorodne. Fenotyp A okazał się być charakterystyczny dla dzikich i uprawnych chmieli pochodzących z Europy i Azji. Fenotyp B dominował w odmianach północnoamerykańskich, natomiast fenotyp C wystąpił tylko w rodzimym chmielu północnoamerykańskim i stanowił tym samym potencjalny marker molekularny służący do identyfikacji amerykańskiej puli genowej. Wyniki badań przeprowadzonych przy udziale markerów RFLP dostarczyły dowodów na to, że północnoamerykańskie odmiany chmielu wywodzą się ze skrzyżowania genotypów europejskich z miejscowymi – północnoamerykańskimi.

Metody genetyczne

Współczesne metody identyfikujące polimorfizm wykorzystują głównie różne techniki sekwencjonowania. Pierwsze, szybkie i stosunkowo wydajne procedury sekwencjonowania kwasów nukleinowych opracowano w drugiej połowie lat 70. ubiegłego wieku; dziś znane są pod nazwą sekwencjonowania pierwszej generacji. Wówczas niemal równocześnie wprowadzono na rynek dwie techniki umożliwiające poznanie sekwencji zasad w DNA, tj. metodę chemicznej degradacji DNA zaproponowaną przez Maxama i Gilberta (28) oraz metodę terminacji łańcucha stworzoną przez zespół Sangera (41). Początkowo obie techniki cieszyły się jednakowym uznaniem, jednakże ostatecznie to metoda Sangera stała się bardziej powszechna i popularna, między innymi ze względu na możliwość automatyzacji. W kolejnych latach technika zaproponowana przez Sangera ulegała licznym modyfikacjom, na przykład poprzez zastosowanie znaczników fluorescencyjnych, rekombinowanych polimeraz czy zastąpienie żeli poliakrylamidowych automatycznymi sekwenatorami. Konwencjonalna metoda Sangera bazuje na właściwościach dideoksynukleotydów, czyli nukleotydów nieposiadających grupy hydroksylowej. W czasie procesu przyłączania dideoksynukleotydu do nowo syntetyzowanego DNA dochodzi do zahamowania wydłużania nici z powodu braku grupy hydroksylowej, która jest niezbędna przy tworzeniu wiązania fosfodiesterowego. Matrycę dla sekwencjonowania stanowi w tej metodzie tylko jednoniciowy DNA, natomiast materiałem wyjściowym do sekwencjonowania jest pula

identycznych jednoniciowych cząsteczek DNA. W mieszaninie reakcyjnej oprócz nukleotydów znajdują się również terminatory – dideoksynukleotydy (zmodyfikowane wersje nukleotydów), które są losowo wbudowywane w cząsteczkę DNA. Dzięki temu powstają fragmenty DNA o różnej długości. Sekwencje produktów odczytywane są elektroforetycznie w osobnych kanałach dla każdego nukleotydu. W celu wizualizacji produktów reakcji stosuje się znaczniki fluorescencyjne. Taki sposób odczytu sekwencji umożliwia identyfikację różnych nukleotydów w jednej próbówce, tym samym czyni sekwencjonowanie dużo szybszym i łatwiejszym do wykonania. Po raz pierwszy technikę Sangera zastosowano do poznania sekwencji DNA faga o długości 5,4 tys. nukleotydów. W kolejnych latach zsekwencjonowano w ten sposób setki genomów innych organizmów, w tym także ludzki genom mitochondrialny. Opatentowanie metod sekwencjonowania pierwszej generacji było ogromnym osiągnięciem dla biologii, gdyż od tej pory sekwencjonowanie genomów stało się stosunkowo szybkie i proste. Zaproponowana przez Sangera technika została również wykorzystana w badaniach nad genetycznym pochodzeniem chmielu. Yamauchi (55) rozróżnił w ten sposób 21 odmian chmielu z Europy i USA. Porównał dane sekwencyjne pod kątem obecności SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) i uznał kombinacje markerów SNP jako przydatne do identyfikacji testowanych odmian chmielu. Co więcej, rozpoznał poprawnie mieszanekę dwóch różnych odmian w przetworzonym surowcu chmielu i wykrył 5% udział jednej odmiany w drugiej. Metoda Sangera jest nadal często używana w laboratoriach jako kontrolna, z uwagi na wysoką dokładność i umiarkowaną długość odczytów sekwencji – zazwyczaj od 500 do 1 000 nukleotydów. Ma jednak pewne niedoskonałości. Jej główną wadą jest brak możliwości multipleksowania i wynikające z tego powodu wysokie koszty sekwencjonowania.

Dążenie do zwiększenia wydajności procesu sekwencjonowania oraz chęć poznania genomów kolejnych gatunków stymulowały badaczy do opracowania nowych technologii pozwalających na podniesienie wydajności i zmniejszenie kosztów. Stworzono wysoko przepustowe sekwenatory umożliwiające jednoczesne sekwencjonowanie milionów fragmentów DNA. Wprowadzono na rynek sekwencjonowanie drugiej i trzeciej generacji, które określane jest wspólnym mianownikiem sekwencjonowania następnej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*). Technologie NGS generują ogromną liczbę wyników, które następnie są przetwarzane z udziałem specjalistycznych bioinformatycznych narzędzi. Ma to ogromne znaczenie, szczególnie dla badań nad genomami roślinnymi, które zazwyczaj charakteryzują się dużymi rozmiarami związanymi z występowaniem poliploidalności oraz obecnością wielu sekwencji niekodujących. W dużym uproszczeniu technika NGS polega na unieruchomieniu na płytce krótkich fragmentów DNA, przyłączeniu badanego DNA, następnie jego namnożeniu i równoczesnym sekwencjonowaniu. W technologii NGS można stosować różne sposoby odczytu sekwencji: sekwencjonowanie przez ligację oraz sekwencjonowanie przez syntezę. Do metod sekwencjonowania opartych na syntezie należy technologia firmy Illumina opatentowana w 2006 r. Metoda ta

obejmuje trzy główne etapy: przygotowanie bibliotek DNA, amplifikację fragmentów DNA oraz sekwencjonowanie z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów. Obecnie technologia Illuminy jest szeroko stosowana w badaniach genetycznych. Natsume i in. (33) wykorzystali tę metodę do sekwencjonowania genomów dwóch odmian chmielu: Saazer i Shinshu Wase oraz dzikiego chmielu japońskiego (*H. lupulus* var. *cordifolius*). Udało im się uzyskać 80% sekwencji genomu odmiany Shinshu Wase. Dodatkowo, stosując technikę sekwencjonowania RNA (RNA-Seq), zidentyfikowali geny zaangażowane w procesy metaboliczne związane z biosyntezą związków odpowiadających za aromat testowanych odmian. Z kolei Wang i in. (53), wykorzystując technikę sekwencjonowania przez syntezę, opisali kompletny genom chloroplastowy chińskiej odmiany chmielu Fubei-1, jednocześnie określając jej pokrewieństwo z innymi taksonami z rodziny *Cannabaceae*. Wykonana analiza filogenetyczna wskazała na bliskie pokrewieństwo pomiędzy odmianą Fubei-1 i odmianami Saazer oraz Hallertauer. Podobne badania prowadzili również Ling i Zhang (26), którzy opisali i scharakteryzowali sekwencję genomu chloroplastowego *H. yunnanensis*, endemicznego gatunku chmielu pochodzącego z Chin. Za pomocą sekwencjonowania następnej generacji określili wielkość genomu tego gatunku (153,612bp) oraz opisali 112 unikatowych genów, w tym: 78 genów kodujących białka, 30 genów tRNA i 4 geny rRNA. Przeprowadzili również analizę filogenetyczną, która wykazała, że *H. yunnanensis* jest bliżej spokrewniony z *H. scandens* niż z *H. lupulus*.

Podsumowanie

Jeszcze kilkanaście lat temu metodami najczęściej wykorzystywanymi do identyfikacji odmian chmielu były proste techniki obserwacyjne polegające na rozpoznawaniu i rozróżnianiu charakterystycznych cech fenotypowych roślin. Następnie w celu rozróżnienia genotypów chmielu zaczęto stosować metody chemiczne oparte głównie na chromatografii gazowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz proste techniki molekularne wykorzystujące markery molekularne typów: AFLP, RFLP czy RAPD. Obecnie coraz większą rolę w identyfikacji i genetycznej charakterystyce odmian chmielu zaczynają odgrywać nowoczesne technologie sekwencjonowania. Dynamiczny rozwój NGS stwarza badaczom szerokie możliwości szybkiego poznawania sekwencji DNA całych genomów, co z kolei ułatwia identyfikację odmianową oraz pomaga w określeniu związków rodowodowych.

Literatura

1. Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszyński G., Mohler V., Lehmensiek A., Kuchel H., Hayden M.J., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Kilian A.: Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, **113**:1409-1420.

2. Brady J.L., Scott M.R., Thomas M.R.: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite markers sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica*, 1996, **91**: 277-284.
3. Čerenak A., Jakše J., Javornik B.: Identification and Differentiation of Hop varieties using simple sequence repeat markers. *Journal of the ASBC*, 2004, **62**:1-7.
4. Davis E.L.: Variation in cultivated varieties of *Humulus lupulus* L. and its relation to the possible sources of these varieties. Washington University in St. Louis, 1957, p. 13-30.
5. De Cooman L., Everaert E., De Keukeleire D.: Quantitative analysis of hop acids, essentials oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. *Phytochemical Analysis* 1998, **9**: 145-150.
6. Eri S., Khoo B.K., Lech J., Hartman T.G.: Direct thermal desorption- gas chromatography and chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**: 1140-1149.
7. Fleischer R., Horlemann C., Schwekendiek A., Kling C., Weber G.: AFLP fingerprinting in hop: analysis of the genetic variability of the Tettng variety. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, **51**: 211-220.
8. Forest A., Schmidt R.: The characterisation and classification of hop varieties. EBC-Symposium on hops, Zoeterwoude, The Netherlands, 1994, p. 251-269.
9. Goiris K., Sryn E., Jaskula B., Van Opstaele F., De Rouck G., De Cooman L.: Hop polyphenols: potential for beer flavour and flavour stability. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Prague*, 2005, p. 130-146.
10. Green C.P.: Use of a chromatography data system to identify varieties in binary mixtures of hop. *Journal of the Institute of Brewing*, 1997, **103**: 293-296.
11. Grodzicker T., Williams J., Sharp P., Sambrook J.: Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia*, 1974, **39**: 439-446.
12. Hartl L., Seefelder S.: Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **96**: 112-116.
13. 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.
14. Jaccound D., Peng K., Feinstein D., Kilian A.: Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**: 4e25.
15. Jakše J., Zlatko S., Javornik B.: Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) Genome, 2004, **47(5)**: 889-899.
16. Jakše J., Štajner N., Luthar Z., Jeltsch J.M., Javornik B.: Development of transcript-associated microsatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 2011, **28**: 227-239.
17. Jelinek L., Sneiderger M., Karabin M., Dostalek P.: Comparison of Czech hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences*, 2010, **28(4)**: 309-316.
18. Kac M., Kralj D.: Studying biodiversity of hop (*Humulus lupulus* L.) accessions from the composition of their essential oils. *Acta Horticulturae*, 1998, **476**: 313-319.
19. Kenny S.T.: Identification of US-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1988, **48**: 3-8.
20. Kenny S.T. Identification of US-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analyses. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1990, **48(1)**: 3-8.
21. Kralj D., Zupanec J., Vasilj D., Kralj S., Psenicnik J.: Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. *Journal of the Institute of Brewing*, 1991, **97**: 197-206.

22. Korbecka-Glinka G., Skomra U., Olszak-Przybyś H.: Cultivar identification in dry hop cones and pellets using microsatellite loci. *European Food Research and Technology*, 2016, **242(9)**. DOI: 10.1007/S00217-016-2715-z
23. Lemmens G.W.C.: The breeding and parentage of hop varieties. *Brewers Diges*, 1998, **(5)**: 16-26.
24. Lermusieau G., Collin S.: Varietal discrimination of hop pellets. II. Comparison between fresh and aged samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2001, **59(1)**: 39-43.
25. Likens S.T., Nickerson G.B.: Identification of hop varieties by gas chromatographic analysis of their essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1967, **15(5-6)**: 525-530.
26. Ling L.Z., Zhang S.D.: The complete chloroplast genome of *Humulus yunnanensis* and phylogenetic analysis of the genus *Humulus*. *Mitochondrial DNA B: Resources*, 2019, **4(2)**: 2681-2682.
27. Marilyn S., Abbott M.S., Mary J., Fedele M.J.: A DNA-based varietal identification procedure for hop leaf tissue. *Journal of the Institute of Brewing*, 1994, **100**: 283-285.
28. Maxam A.M., Gilbert W.: A new method for sequencing DNA. *PNAS*, 1977, **74(2)**: 560-564.
29. McAdam E.: Molecular and quantitative genetic analyses of hop (*Humulus lupulus* L.). University of Tasmania, 2013, **2**: 10-27.
30. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A.: Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 2009, **1(1)**: 19-35.
31. Murakami A.: Hop variety classification using genetic distance based on RAPD. *Journal of the Institute of Brewing*, 2000a, **106**: 157-161.
32. Murakami A.: Genetic distance based on RAPD and its application to hop breeding. *Breeding Science*, 2000b, **50**: 23-28.
33. Natsume S., Takagi H., Shiraishi A., Murata J., Toyonaga H., Patzak J., Takagi M., Yaegashi H., Uemura A., Mitsuoka Ch.: The draft genome of Hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. *Plant and Cell Physiology*, 2014, **56(3)**: 428-441.
34. Patzak J., Oriniakova P., Matoušek J., Svoboda P.: Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. *Rostl. Vyr.*, 1999, **45**: 165-172.
35. Patzak J., Nesvadba V., Krofta K., Henychova A., Marzoev A.I., Richards K.: Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome*, 2010, **53(7)**: 545-57.
36. Peacock V.E., McCarty P.: Varietal identification of hops and hop pellets. *Technical quarterly – Master Brewers Association of America*, 1992, **29**: 81-85.
37. Perpete P.: Varietal Discrimination of hop pellets by essential oil analysis I. Comparison of fresh samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1998, **56**: 104-108.
38. Pillary M., Kenny S.T.: Chloroplast DNA differences between cultivated hop *Humulus lupulus* and the related species *H. japonicus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, **89**: 372-378.
39. Pillary M., Kenny S.T.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop. *Humulus lupulus*: Level of genetic variability and segregation in F₁ progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996a, **92**: 334-339.
40. Pillary M., Kenny S.T.: Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop. *Humulus lupulus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996b, **93**: 333-340.
41. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, **74(12)**: 5463-5467.
42. Seefelder S., Seigner E.: Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. *IHGC Proceedings of the Scientific Commission, Dobrna-Žalec*, 2003, p. 8-11.
43. Semagn K., Bjornstad A., Ndjioudjop M.: An overview of molecular methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 2006, **525(25)**: 2540-2568.
44. Seroczynska A., Kilian A.: Technologia DArT-nowe narzędzie do analizy zmienności genetycznej. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2010, **555**: 373-388.

45. Š t a j n e r N., Jakš e J., Kozjak P., Javornik B.: The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 2004, **168**: 213-221.
46. S h i g e k i A., Tsuchiya Y., Takashio M., Tamaki T., Shinotsuka K.: Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2018, **56(3)**: 93-98.
47. S z t u b a - S o l i Ń s k a J.: Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos-Problemy Nauk Biologicznych*, 2005, **54(2-3)**: 227-239.
48. Š u š t a r - V o z l i č J., Javornik B.: Genetic relationship in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L. determined by RAPD analysis. *Plan Breeding*, 1999, **118**: 175-181.
49. T o m a r R.S., Parakhia M., Patel S.V., Golakiya B.A.: Molecular markers and plant biotechnology. Hardcover, 2010, p. 273-332.
50. T s u c h i y a Y., Araki S., Takashio M., Tamaki T.: Identification of hop varieties using specific markers derived from RAPD markers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **84(2)**: 103-107.
51. V o s P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Homes 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.
52. W a g n e r T.: The quantity and composition of bitter resins-chemotaxonomic characteristics of hop varieties. *Pharm. J. Slov.*, 1983, **34**: 77-83.
53. W a n g G., Fan C., Qiu Y., Zhao Y., Zhang J., Xin H., Li X.: The complete chloroplast genome of *Humulus lupulus* cv. Fubei01 (Rosales: *Cannabaceae*). *Mitochondrial DNA B Resour.*, 2021, **6(8)**: 2439-2441.
54. X i a L., Peng K., Yang S., Wentzl P., de Vincente M.C., Fregene M., Kilian A.: DArT for high-throughput genotyping of Cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, **110(6)**: 1092-1098.
55. Y a m a u c h i H.: Hop-variety identification using first-and second- generation sequencing. *Next Generation Sequencing*, 2016, **11**: 323-338.
56. Z a b e a u M., Vos P.: Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, publication number EP 0534858, 1993.

Adres do korespondencji:

mgr Hanna Olszak-Przybyś
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 930
e-mail: Hanna.Olszak@iung.pulawy.pl

AUTOR

Hanna Olszak-Przybyś

ORCID

0000-0003-3170-5188