

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mojca TOMŠIČ

**KARAKTERIZACIJA KARIOTIPA HERMAFRODITNIH RASTLIN
HMELJA (*Humulus lupulus* L.) Z UPORABO PRETOČNE
CITOMETRIJE IN ŠTETJA KROMOSOMOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**KARYOTYPE CHARACTERIZATION OF HERMAPHRODITE HOP
PLANTS (*Humulus lupulus* L.) WITH APPLICATION OF FLOW
CYTOMETRY AND CHROMOSOMES COUNTING**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete je dne 23.09.2013 za mentorja diplomskega dela potrdila prof. dr. Jerneja JAKŠETA in za somentorico doc. dr. Andrejo ČERENAK.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marijana JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Jernej JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Andreja ČERENAK
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Član: prof. dr. Borut BOHANEČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 30.09.2013

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mojca TOMŠIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 633.791:576.3 (043.2)
KG	hmelj/ <i>Humulus lupulus</i> /pretočna citometrija/štetje kromosomov/poliploidnost
KK	AGRIS F30
AV	TOMŠIČ, Mojca
SA	JAKŠE, Jernej (mentor)/ČERENAK, Andreja (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2013
IN	KARAKTERIZACIJA KARIOTIPA HERMAFRODITNIH RASTLIN HMEIJA (<i>Humulus lupulus</i> L.) Z UPORABO PRETOČNE CITOMETRIJE IN ŠTETJA KROMOSOMOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 40 str., 7 pregl., 14 sl., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Hmelj je dvodomna zelnata trajnica, ovijalka, ki kljub svoji dvodomnosti kaže tudi določeno stopnjo enodomnosti, vendar tudi tukaj lahko opazimo variabilnost fenotipa. Stopnjo dvodomnosti lahko razdelimo v več fenotipskih razredov. Namen diplomske naloge je preučiti kariotip izbranih hermafroditnih rastlin s pomočjo štetja kromosomov in merjenja velikosti genoma z metodo pretočne citometrije. Uporabili smo 56 enodomnih in 3 dvodomne rastline hmelja, ki so bile vzgojene v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Vsem 56 hermafroditnim rastlinam in 3 dvodomnim rastlinam smo z metodo pretočne citometrije uspešno izmerili velikost jedrnega genoma. Delni rezultati, ki so jih pridobili v laboratoriju leta 2009, so pokazali, da bi lahko hermafroditne rastline bile aneuploidi. Metodo štetja kromosomov smo lahko uporabili pri 32 od 59 rastlin, saj so se poganjki le pri teh rastlinah ukoreninili in koreninice le-teh so bile dovolj razvite za nadaljnje analize. Pri 20 rastlinah pa smo uspešno prešteli kromosome. Pri vseh 14 od 20 rastlin (brez domnevnih aneuploidov) smo potrdili ploidnost, ki smo jo izmerili z metodo pretočne citometrije. Pri 2 od 6 domnevnih aneuploidov smo potrdili aneuploidno število kromosomov. Na podlagi tega smo zavrgli tezo, da je samo aneuploidija glavni vzrok hermafroditnosti hmeljnih rastlin. Pretočna citometrija se je za določitev velikosti jedrnega genoma, v primerjavi s štetjem kromosomov, izkazala kot zelo učinkovita, hitra in zanesljiva metoda.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 633.791:576.3 (043.2)
CX	hop/ <i>Humulus lupulus</i> /flow cytometry/chromosomes counting/polyploidy
CC	AGRIS F30
AU	TOMŠIČ, Mojca
AA	JAKŠE, Jernej (supervisor)/ ČERENAK, Andreja (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY	2013
TI	KARYOTYPE CHARACTERIZATION OF HERMAPHRODITE HOP PLANTS (<i>Humulus lupulus</i> L.) WITH APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY AND CHROMOSOMES COUNTING
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	IX, 40 p., 7 tab., 14 fig., 38 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Hop is a herbaceous perennial vine, which despite its dioecious nature also shows a certain degree of monoecy. Also some phenotypic variability can be seen, too. The degree of dioecy can be divided into different phenotypic classes, based on the prevalence of one of the sexes. The aim of the presented thesis was to examine the karyotype of selected hermaphrodite hop plants by counting the chromosomes and by genome size measurement by flow cytometry method. We analysed 56 monoecyous and 3 dioecyous hop plants that had been grown in hop garden of Slovenian Institute for Hop Research and Brewing in Žalec. The size of nuclear genome for all 59 plants has been successfully measured with the means of flow cytometry. Partial results obtained in the laboratory in 2009 showed that hermaphrodite nature of the plants could be due to the aneuploidy. We were able to count the chromosomes only for 32 of 59 plants, since only the shoots of 32 plants had rooted and only root tips material of these plants had been available for further analysis. While the chromosomal squashes had been prepared for 32 plants, the chromosomes could be counted for 20 of them. In 14 out of the 20 plants (6 plants were presumable aneuploids) the ploidy was confirmed by method of flow cytometry. In 2 of 6 suspected aneuploids the aneuploidy number of chromosomes was confirmed. The argument that aneuploidy is the main cause of hermaphrodite hop plants was rejected. Flow cytometry was proved to be a very effective, quick and reliable method to determine the size of the nuclear genome compared to counting of the chromosomes.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SISTEMATIKA HMELJA	3
2.2 MORFOLOŠKE LASTNOSTI HMELJA	4
2.2.1 Podzemni vegetativni organi	4
2.2.2 Nadzemni vegetativni organi	4
2.2.3 Razmnoževalni (generativni) organi	4
2.3 SESTAVA HMELJNIH STORŽKOV	5
2.3.1 Hmeljne smole	5
2.3.2 Eterična olja	6
2.3.3 Polifenoli	6
2.4 UPORABA HMELJA	7
2.5 CELIČNI CIKEL	7
2.5.1 Interfaza	7
2.5.2 Mitoza	8
2.5.2.1 Profaza	8
2.5.2.2 Metafaza	8
2.5.2.3 Anafaza	9
2.5.2.4 Telofaza	9
2.6 KROMOSOMI EVKARIONTSKIH ORGANIZMOV	9
2.6.1 Zgradba kromosomov	10
2.7 KARIOTIP HMELJA	11
2.8 POLIPLOIDNOST HMELJA	12
2.9 VRSTE CVETOV IN NJIHOVA RAZPOREDITEV PRI HMELJU	13
2.10 PRETOČNA CITOMETRIJA	13

2.10.1	Delovanje pretočne citometrije in sestavni deli pretočnega citometra	16
3	MATERIAL IN METODE DELA	18
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	18
3.2	METODE DELA	18
3.2.1	Pretočna citometrija	18
3.2.1.1	Priprava raztopin	18
3.2.1.1.1	Raztopina Otto 1	18
3.2.1.1.2	Raztopina Otto 2 (barvilna raztopina)	18
3.2.1.2	Priprava vzorca za analizo	18
3.2.1.3	Duncanov test ($p < 0,01$)	19
3.2.2	Štetje kromosomov v metafaznih jedrih – priprava kromosomskih preparatov	19
3.2.2.1	Citostatik: ledeno mrzla voda	19
3.2.2.2	Fiksiranje v pripravljeni raztopini	19
3.2.2.3	Barvanje po Fuelgenu	19
4	REZULTATI	21
4.1	PRETOČNA CITOMETRIJA	21
4.1.1	Ploidnost, povprečne vsebnosti jedrne DNK in fenotip	21
4.1.2	Duncanov test ($p < 0,01$)	23
4.1.3	Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah z MM (moški) in FF (ženski) fenotipom	23
4.1.4	Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah s Fm fenotipom (pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi)	24
4.1.5	Fenotip in primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri domnevnih aneuploidih	25
4.1.6	Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri diploidnih genotipih in domnevnih aneuploidih	26
4.2	ŠTETJE KROMOSOMOV V METAFAZNIH JEDRIH	29
4.2.1	Rezultati metode štetja kromosomov pri diploidnih in triploidnih rastlinah (brez 6-ih domnevnih aneuploidov)	29
4.2.2	Rezultati metode štetja kromosomov pri domnevnih aneuploidih	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
6	POVZETEK	37
7	VIRI	38
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Taksonomska klasifikacija navadnega hmelja (<i>Humulus lupulus</i> - droga, 2013)	3
Preglednica 2: Fenotip, povprečne vsebnosti jedrne DNK in ploidnost pri enodomnih in dvodomnih rastlinah hmelja	22
Preglednica 3: Fenotip in povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah z MM (moški) in FF (ženski) fenotipom	24
Preglednica 4: Povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah s Fm fenotipom	25
Preglednica 5: Fenotip in povprečne vsebnosti jedrne DNK pri domnevnih aneuploidih	26
Preglednica 6: Fenotip in povprečne vsebnosti jedrne DNK pri diploidnih genotipih in domnevnih aneuploidih	28
Preglednica 7: Rezultati metode pretočne citometrije in metode štetja kromosomov	34

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: DNK histogram (skrajno levi vrh je standard) diploidne (2n) sorte 'Savinjski golding' (primer rezultatov raziskav iz laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)	15
Slika 2: DNK histogram (skrajno levi vrh je standard) triploidne (3n) sorte 'Celeia' (primer rezultatov raziskav iz laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)	15
Slika 3: DNK histogram (skrajno levi vrh je standard) tetraploidne (4n) sorte 'Apolon' (primer rezultatov raziskav iz laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)	16
Slika 4: Shematski prikaz delovanja pretočne citometrije (Ivančič, 2008)	17
Slika 5: Pri genotipu '12' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 30 kromosomov	29
Slika 6: Pri genotipu '13' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 30 kromosomov	30
Slika 7: Pri genotipu '33' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov	30
Slika 8: Pri genotipu '16' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 21 kromosomov	31
Slika 9: Kariotip genotipa '16' izdelan s programskim paketom Lucia	31
Slika 10: Pri genotipu '35' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 21 kromosomov	32
Slika 11: Pri genotipu '15' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov	32
Slika 12: Pri genotipu '20' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov	32
Slika 13: Pri genotipu '25' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov	33
Slika 14: Pri genotipu '34' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

angl. b.	angleška beseda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
gr. b.	grška beseda
lat. b.	latinska beseda
npr.	na primer
oz.	oziroma
RNK	ribonukleinska kislina
sod.	sodelavci
ssp.	podvrsta (subspecies)

1 UVOD

Hmelj je dvodomna zelnata trajnica, ki se ovija okrog opore in katere gencerter je Azija (Rode in sod., 2002; Majer in sod., 2002). V Evropi je stara kulturna rastlina, saj so jo že v osmem in devetem stoletju gojili v Franciji in na Bavarskem (Majer in sod., 2002). Najprej so hmelj začeli kultivirati v deželah, kjer je rasel kot samonikel in tudi njegovo raziskovanje se je začelo najprej v teh deželah (Mastnak, 1977). Hmeljarstvo se je razcvetelo v šestnajstem stoletju, središči hmeljarstva v Evropi pa sta bili Češka in Bavarska (Majer in sod., 2002). Divji hmelj raste v posameznih predelih zmerno toplega podnebja Evrope, Azije in Severne Amerike po sončnih, vlažnih legah, na bregovih rek in ob robovih gozdov. Lahko ga tudi gojimo in danes je tako razširjen po vsej Sloveniji, kjer raste po sončnih gozdnih obronkih in z grmovjem obraslih vodnih bregovih (Ekomuzej ..., 2013; *Humulus lupulus* - droga, 2013). Najbolje uspeva v globokih, dobro založenih, evtričnih (manj kislja in bazična tla), rahlih, primerno zračnih in dobro odcednih tleh (Friškovec in sod., 2002; Dvorec Trebnik, 2013).

V Sloveniji se prvi podatki o hmelju in hmeljarstvu pojavijo že okrog leta 1160 v urbarju škofjeloškega gospostva. Prelomnica v razvoju hmeljarstva na Slovenskem je nastala med vladavino cesarice Marije Terezije. Takrat so v Celovcu (1764), Gorici (1765), v Gradcu (1765) in Ljubljani (1767) ustanovili kmetijske družbe, ki so načrtno vzpodbujale in pospeševale uvajanje številnih industrijskih rastlin, med njimi tudi hmelja (Majer in sod., 2002).

Začetki sodobnega hmeljarstva v Savinjski dolini segajo v drugo polovico 19. stoletja, ko je prvi pravi hmeljski nasad zasadil žalski župan in veleposestnik Janez Hausenbichler, ki mu je leta 1876 prinesel sadike sorte 'Württemberg' takratni oskrbnik graščine Novo Celje Josip Bilger. Za začetek pridelave 'Savinjskega goldinga' pa je prelomno leto 1886, ko sta Janez Hausenbichler in Karl Haupt opravila prve poskuse s to sorto, ki se je v Savinjski dolini odlično obnesla. Hmeljarstvo se je postopoma širilo in leta 1902 je bila v Žalcu ustanovljena Hmeljarna, ki je skrbela za prodajo hmelja in leta 1908 oznamkovalnica za hmelj (Majer in sod., 2002; Ekomuzej ..., 2013).

Takoj po drugi svetovni vojni je bila v Žalcu ustanovljena hmeljarska zadruga »Hmezad«, ki je poskrbela za obnovo hmeljišč in med vojno uničene infrastrukture ter prodajo hmelja (Majer in sod., 2002; Ekomuzej ..., 2013). Kmetijski kombinat Žalec je od leta 1961 do 1964 združil zemljišča in jih zasadil s hmeljem. V slovenskih hmeljiščih so se leta 1972 začele širiti prve slovenske sorte, ki so bile vzgojene na Inštitutu: 'Aurora', 'Atlas', 'Ahil' in 'Apolon', ki so jim sledile sorte serije B in C. Leta 1952 pa je bil ustanovljen Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec (Ekomuzej ..., 2013).

Hmeljarstvo ima v Sloveniji dolgoletno tradicijo (MKO ..., 2013). Skoraj tri četrtine hmeljskih nasadov je v Savinjski dolini, kjer je hmeljarstvo ena od najbolj prepoznavnih pokrajinskih značilnosti in kmetijskih dejavnosti (Ekomuzej ..., 2013; MKO ..., 2013). Ostala hmeljišča pa so še na ormoško-ptujskem območju, v Slovenj Gradcu in Radljah ob Dravi. Nasadi so pretežno zasajeni s slovenskimi sortami, ki so vzgojene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec (Ekomuzej ..., 2013). Drugače pa je sedemnajst različnih sort hmelja, od tega jih pridelujejo sedem (MKO ..., 2013). V letu 2011 je v hmeljskih nasadih prevladovala sorta 'Aurora' (813 ha, 59 %), sledile so ji sorte 'Celeia' (179 ha, 13 %), 'Savinjski golding' (171 ha, 12 %), 'Bobek' (116 ha, 8 %) in 'Hallertauer Magnum' (59 ha, 4 %) (Pet letni ..., 2013).

Slovenija se uvršča med svetovne pridelovalke hmelja (Ekomuzej ..., 2013). Pridelava hmelja v Sloveniji obsega približno 3 % svetovne pridelave hmelja (MKO ..., 2013). V letu 2010 se je hmelj prideloval na 1.488 ha, letna proizvodnja hmelja pa je znašala 2.073 ton. V letu 2011 so se površine skrčile na 1.376 ha hmeljskih nasadov, pridelka pa je bilo 2.154 ton, kar je več kot v letu 2010 (SURS ..., 2013). Približno 5 % slovenskega hmelja porabijo domače pivovarne, preostal hmelj pa izvozijo, v glavnem na trg Evropske unije (75 %) (Ekomuzej ..., 2013; Pet letni ..., 2013). Največje pridelovalke hmelja na svetu v letu 2011 so bile Nemčija (17.600 ha, 33.000 ton), ZDA (11.600 ha, 26.780 ha), Kitajska (5.796 ha, 16.100 ton), Češka (4.110 ha, 5400 ton), Poljska (1.768 ha, 1.900 ton), Slovenija (1.205 ha, 2200 ton) in Velika Britanija (1.069 ha, 1.600 ton) (IHGC ..., 2013).

Namen diplomske naloge je bil preučiti kariotip izbranih hermafroditnih rastlin hmelja s pomočjo štetja kromosomov in merjenja velikosti genoma z metodo pretočne citometrije. Predviden sistem dedovanja spola pri hmelju je na podlagi spolnih kromosomov, čeprav nekateri rezultati tudi kažejo, da bi lahko šlo za bolj kompleksen način dedovanja. Hmelj ima v diploidnem stanju 20 kromosomov ($2n = 20$). Delni rezultati pridobljeni v laboratoriju so pokazali, da bi lahko hermafroditne rastline bile aneuploidi (število kromosomov različno od diploidnega). V nalogi smo vključili uporabo dveh metod, klasično štetje kromosomov in metodo pretočne citometrije, za katero so že potrdili, da lahko ločuje razlike na podlagi enega kromosoma (Šesek in sod., 2000).

Predvidevamo, da bomo z diplomsko nalogo pridobili naslednje rezultate:

- uspešno bomo izmerili velikost genoma hermafroditnih rastlin hmelja s pomočjo metode pretočne citometrije,
- uspešno bomo prešteli število kromosomov izbranih hermafroditnih rastlin s pomočjo klasične mikroskopske tehnike,
- potrdili ali zavrgli bomo tezo o aneuploidiji kot možnemu vzroku hermafroditnosti hmeljnih rastlin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SISTEMATIKA HMELJA

Preglednica 1: Taksonomska klasifikacija navadnega hmelja (*Humulus lupulus* - droga, 2013)

DEBLO	Phylum	SEMENKE	Spermatophyta (Magnoliophyta)
PODDEBLO	Subphylum	KRITOSEMENKE	Magnoliophytina
RAZRED	Classis	DVOKALIČNICE	Magnoliopsida
PODRAZRED	Subclassis		Hamamelididae
NADRED	Superordo		Urticanae
RED	Ordo	KOPRIVOVCI	Urticales
DRUŽINA	Familia	KONOPLJEVKE	Cannabaceae
ROD	Genus	HMELJ	<i>Humulus</i>
VRSTA	Species		<i>lupulus</i>

Hmelj uvrščamo v red koprivovcev (Urticales), kamor spada tudi navadna kopriva in skupaj s konopljo v družino konopljevok (Cannabaceae) (Rode in sod., 2002). Rod *Humulus* sestavljajo tri vrste: navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.), enoletni japonski hmelj (*Humulus japonicus* L.), ki je razširjen na Kitajskem in Japonskem, in *Humulus yunnanensis* L. (Rode in sod., 2002; Natural history museum, 2013). O vrsti *Humulus yunnanensis* ni veliko znanega. Uspeva na visoki nadmorski višini na jugu Kitajske, zlasti v provinci Junnan. Obstaja nekaj herbarijskih rastlin, ki so shranjene v muzeju (Natural history museum, 2013).

V toku evolucije in z razširjanjem s prvotnih rastišč so se razvili različni tipi divjega navadnega hmelja, tako imenovane podvrste. Med seboj se razlikujejo po morfoloških (zgradba listov, ...) in geografskih značilnostih (Rode in sod., 2002). Glede na geografsko razširjenost ločimo pet taksonomskih podvrst, od katerih so 3 značilne za sever ameriške celine (Small, 1978):

- *Humulus lupulus* ssp. *lupulus* - evropski divji hmelj,
- *Humulus lupulus* ssp. *cordifolius* - japonski divji hmelj,
- *Humulus lupulus* ssp. *neomexicanus* - razširjen na zahodnem delu severne Amerike,
- *Humulus lupulus* ssp. *pubescens* - razširjen na ameriškem srednjem zahodu,
- *Humulus lupulus* ssp. *lupuloides* - razširjen na vzhodnem delu severne Amerike.

2.2 MORFOLOŠKE LASTNOSTI HMELJA

Rastlino hmelja sestavljajo podzemni vegetativni organi (korenika ali štor), nadzemni vegetativni organi (steblo, stranski poganjki in listi) in razmnoževalni organi. Nadzemni deli rastline na koncu vsake rastne sezone propadejo (Rode in sod., 2002).

2.2.1 Podzemni vegetativni organi

Podzemni deli pri zreli hmeljni rastlini so sestavljeni iz koreninskega tkiva in tkiva stebela, ki skupaj tvorita tako imenovano koreniko ali štor. Ta vsako leto prirašča. Življenjska doba hmeljne korenike, ki je odvisna od razmer na rastišču, kultivarja in načina obdelave, je 10 do 25 let (Rode in sod., 2002).

2.2.2 Nadzemni vegetativni organi

Ko glavno steblo ali hmeljna trta zraste v višino okoli 50 cm, dobi zmožnost ovijanja v smeri urinega kazalca in se močno razrašča. Vzpenja se po katerikoli opori in se nanjo opira s kljukastimi dlačicami, s katerimi je pokrito steblo. Na začetku je steblo zelnato, kasneje pa oleseni. Hmeljna trta, ki v dobi najhitrejše rasti prirašča tudi več kot 25 cm na dan, zraste v višino 7 do 9 m in ko pride do vrha opore se razrašča še v širino (Rode in sod., 2002).

Stranski poganjki, zalistniki so po zgradbi podobni stebelu in so razvejani. Njihovo število in oblika sta različna, predvsem odvisna od rastnih razmer (Rode in sod., 2002).

Listi na stebelu in stranskih poganjkih so razporejeni parno na vsakem kolencu in si ležijo nasprotno ali premenjalno, ko rastlina doseže določeno starost. Na isti rastlini so lahko različno oblikovani, kar imenujemo heterofilija. Listi imajo srčasto dno in so večkrat pernato deljeni. Mladi listi so le rahlo deljeni, starejši listi so običajno trikrpati ali petkrpati, redkeje sedemkrpati (Rode in sod., 2002). Krpatost je genetsko pogojena, deloma pa nanjo vpliva tudi okolje (Mastnak, 1977). Listi imajo nazobčan rob, dlakavo površino listov in lepo vidne listne žile, na katerih so dlačice ostrejšje (Rode in sod., 2002).

2.2.3 Razmnoževalni (generativni) organi

Hmelj je dvodomna rastlina, vetrocvetka, z enospolnimi cvetovi, včasih se pojavijo tudi enodomne rastline ali rastline, ki imajo dvospolne cvetove (Haunold, 1972; Rode in sod., 2002). Moške in ženske rastline so morfološko enake, razlikujejo se le po generativnih organih – socvetju (Baričevič, 1996).

Moški cvetovi so majhni, enostavni, rumeno zeleni in združeni v grozdasta socvetja na zgornjih stranskih poganjkih (Rode in sod., 2002).

Žensko socvetje je sestavljeno iz več skupinic po dveh krovnih listkov (brakteje), štirih prilistov (brakteole) in štirih cvetov, ki so na osrednji osi razporejeni premenjalno (cik-cak) (Rode in sod., 2002).

Storžek hmeljne rastline je dozorelo žensko socvetje (Rode in sod., 2002). Rumeno zeleni storžki, okrogle ali ovalne oblike, so običajno veliki od 20 do 30 mm in tudi več (Kocjan Ačko, 1999; Rode in sod., 2002). Na dnu krovnih listkov in prilistov se razvijejo lupulinske žleze. Število, oblika in velikost žlez, v katerih se nakopičijo eterična olja, grenčične smole in čreslovine, so značilnosti kultivarja. V naravi vsebuje hmeljev storžek tudi razvita semena, kar pa je pri pridelovanju nezaželeno, ker zmanjšajo kakovost pridelka. Osemenjeni storžki so večji, imajo grobo vretence z večjimi koti med kolenci, so manj zbiti in imajo manj lupulinskih žlez (Rode in sod., 2002). Zaradi tega v hmeljišča sadijo samo ženske rastline, moške rastline pa so v komercialnih nasadih ali v njihovi bližini nezaželene (Kocjan Ačko, 1999).

2.3 SESTAVA HMELJNIH STORŽKOV

Najvažnejše sestavine storžka hmeljne rastline so hmeljne smole, eterična olja in polifenoli, saj dajejo pivu okus, vonj in obstojnost. Najpomembnejši del hmeljnega storžka je lupulin (Rode in sod., 2002). To je rumen prah na krovnih listih storžkov, ki vsebuje grenčične in aromatične snovi, za pivovarstvo pomembne sestavine hmelja (Čeh Brežnik in Brežnik, 2003; Rode in sod., 2002). Hmeljne sestavine delujejo tudi antiseptično. To je skupina snovi, ki preprečujejo nastanek mikroorganizmov, to je npr. mlečnokislinskih bakterij, ki bi kvarile pivo. Torej hmelj vpliva tudi na trajnost piva (Kocjan Ačko, 1999).

Večino pridelka – storžkov porabijo v pivovarstvu kot dodatek pri proizvodnji piva, kjer je nenadomestljiva surovina, saj mu daje aromo, grenčino in tudi vpliva na kakovost pene. Aroma mora biti primerno intenzivna, kakovostna, čista in prijetna (Čeh Brežnik in Brežnik, 2003). Nekaj storžkov pa porabijo tudi v zdravilstvu (Kocjan Ačko, 1999).

2.3.1 Hmeljne smole

Hmeljne smole so najpomembnejša skupina sestavin storžka in so nosilec grenkega okusa piva (Rode in sod., 2002).

Glede na topnost v različnih topilih, se delijo na mehke in trde hmeljne smole. Vse hmeljne smole so topne v metanolu in dietiletru, mehke smole se topijo v nižjih ogljikovodikih (heksan), trde smole pa so netopni preostanek (Košir, 1995).

Mehke smole se delijo na alfa in beta kisline.

Najpomembnejše so alfa kisline, ki dajejo pivu značilno grenčico (Kocjan Ačko, 1999). Alfa kisline so zmes homologov (humulon, kohumulon, adhumulon) in analogov (prehumulon, posthumulon). Vsebnost kohumulona v alfa kislinah je v neposredni korelaciji s kakovostjo hmelja. Njegov delež je zato zelo pomemben, saj večji delež kohumulona povzroči grobo in nekakovostno grenčino piva (Košir, 1995).

Beta kisline so zmes homologov, od katerih so najpogostejše zastopani lupulon, kolupulon in adlupulon (Košir, 1995; Rode in sod., 2002). Zaradi slabe topnosti v vodi, ne prehajajo v pivino in ne prispevajo h grenkemu okusu piva (Rode in sod., 2002).

Trde smole se delijo na trde smole, ki so prisotne v svežem hmelju in trde smole, ki nastanejo kot oksidacijski produkt mehkih smol. So zelo slabo topne v sladici (Košir, 1995).

2.3.2 Eterična olja

Druga pomembna skupina sestavin hmeljnega storžka so eterična olja, ki dajejo pivu hmeljno aromo. Eterično olje je oljnata tekočina, ki jo dobimo, ko hlapne snovi izoliramo z destilacijo z vodno paro. Hmeljni storžki vsebujejo približno en odstotek eteričnih olj (Rode in sod., 2002).

Hmeljno eterično olje je sestavljeno iz več sto različnih sestavin, med katerimi so najpomembnejše mircen, humulen in kariofilen. Le-ti skupaj tvorijo do 90 odstotkov komponent eteričnega olja. Preostali del pa predstavljajo oksidacijski produkti teh sestavin in oksidacijski produkti hmeljnih smol. Zaradi hlapnosti eteričnega olja se njegova vsebnost med sušenjem in skladiščenjem zmanjšuje. Pri daljšem nepravilnem skladiščenju pride do neprijetnega vonja, ki ga povzroči oksidacija sestavin olja (Rode in sod., 2002).

2.3.3 Polifenoli

Polifenole lahko v grobem razdelimo na fenolne kisline, flavonoide, stilbene in lignane. Vpliv polifenolov v pivu ni velik. So pa pomembni med varjenjem piva, saj se vežejo z beljakovinami in jih obarjajo. Majhna količina polifenolov ima pozitiven vpliv na okus piva, stabilizira grenčico, poveča biološko in koloidno stabilnost piva ter stabilnost pene (Košir, 1995).

2.4 UPORABA HMELJA

Največ hmelja se seveda uporabi za varjenje piva. Pivu daje značilno aromo, grenčične smole dajejo grenak okus, preprečujejo razvoj bakterij in s tem pivo konzervirajo. Hkrati pa hmelj obarja tudi beljakovine in bistri pivo. Lupulin deluje pomirjevalno in uspavalno, povečuje izločanje urina, zmanjšuje napetost in krče v mišicah in ker greni, spodbuja tek. V zdravilstvu ga priporočajo za miren spanec in lajšanje prebavnih motenj živčnega izvora. V kulinariki se uporabljajo poganjki. Poganjki, ki se jih odstrani zgodaj spomladi, so podobni majhnim belušem, a imajo nekoliko bolj močan okus.

Iz hmeljevih stebel so včasih pridobivali vlakna za tkanine in celulozo za papir. Uporabljali so jih tudi za izdelovanje košar in drugih pletarskih izdelkov.

Pri prevelikih odmerkih ali predolgi uporabi koncentriranih hmeljnih pripravkov lahko nastane zastrupitev, ki se kaže kot bruhanje, splošna slabost in nezavest (Dvorec Trebnik, 2013).

2.5 CELIČNI CIKEL

Celični cikel sestavljata dva dogodka: celična rast in celična delitev. Faze celične rasti skupaj označujemo kot interfazo, v kateri celica preživi največ časa, faze celične delitve pa mitozo in citokinezo (Dermastia, 2002). Pogosto se izraz mitoza uporablja kot sinonim za celično delitev, čeprav to ni. Mitoza je najpogostejša oblika jedrne delitve ali kariokineze, citokineza pa delitev citoplazme (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

2.5.1 Interfaza

Interfaza je obdobje med dvema zaporednima delitvama, torej telofazo ene jedrne delitve in profazo naslednje jedrne delitve. Kromatinske niti so v tej fazi najbolj odvit (despiralizirane) (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Glede na sintezo DNK jo delimo na tri faze ali periode: prva rastna faza ali presintetična perioda (G1), faza S ali perioda sinteze DNK (podvojevanje) in druga rastna faza ali postsintetična perioda (G2) (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Faza G1 (angl. b. gap = prekinitev, praznina) poteka med koncem predhodne mitoze in procesom DNK sinteze (Dermastia, 2002; Krajnčič, 1994). V tej fazi poteka sinteza RNK, lipidov, ogljikovih hidratov in beljakovin ter priprava za sintezo DNK. Sledi faza S, ki je obdobje podvojevanja DNK in sinteze jedrnih bazičnih beljakovin – histonov (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000). Faza G2 se začne na koncu faze S (po zaključeni DNK sintezi) in traja do začetka naslednje mitoze. Med fazo G2 celica zaključi priprave na novo mitotsko

delitev (Dermastia, 2002). V tej fazi poteka sinteza beljakovin delitvenega vretena in tvorba ATP (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

2.5.2 Mitoza

Izraz mitoza izvira iz gr. b. mitos, ki pomeni nit. Ime je po nitastih ali pentljastih kromosomih, ki se izoblikujejo pri mitotični delitvi (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Mitoza je indirektna somatska delitev jedra, pri kateri se genetski material razdeli na dve novi identični hčerinski celici. Vse celice, ki nastanejo so klone – genetsko enake celice. Število kromosomov v jedru se ohrani. Iz ene diploidne ($2n$) celice nastanejo dve diploidni celici. Mitozo lahko opazujemo v primarnih meristemskih tkivih, največkrat v za to opazovanje najprimernejših rastnih vršičkih korenin (Sinkovič, 2000).

Mitozo sestavljajo štiri sledeče si faze: profaza, metafaza, anafaza in telofaza. Proces je, ko se mitoza začne, normalno neprekinjen in vsaka faza neopazno prehaja v naslednjo (Bavdek, 1988).

2.5.2.1 Profaza

Profaza je prva stopnja mitoze in časovno traja najdlje. V začetku profaze (pro = prej) je kromatin v obliki dolgih, tankih, slabo spiraliziranih niti. Kromatinske niti se proti koncu profaze vse bolj spiralizirajo, s tem odebelijo in postanejo krajše. Tako nastanejo kondenzirani kromosomi. Vsak kromosom je sestavljen iz dveh kromatid, ki sta tesno med seboj spojeni in povezani s skupnim centromerom. Ob koncu profaze se prične tvoriti ovoj ali matriks kromosomov, izgine jedrce (nucleolus) in jedrna ovojnica (caryotheca). Tvoriti se začne delitveno vreteno (mitotični aparat), ki ga sestavljata dva centriola in mikrotubuli, ki so med njima (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

2.5.2.2 Metafaza

V metafazi (meta = vmes; srednja), ki sledi profazi, se delitveno vreteno dokončno izoblikuje. Kromosomi so v tej fazi najkrajši in najdebelejši ter zato najprimernejši za opazovanje, štetje in analizo kariotipa rastlinske vrste. V idealnem primeru so razporejeni v ekvatorialni ravnini celice - s svojimi centromeri se postavijo v ekvatorialno ravnino celic, kraki kromosomov pa se orientirajo proti celičnim polom. V metafazi se kromosomi začnejo deliti na dve kromatidi (hčerinska kromosoma), ki ostanejo povezani le še pri centromeri. Nanjo se pritrjujejo mikrotubuli delitvenega vretena (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

2.5.2.3 Anafaza

Anafaza je tretja in najkrajša faza mitoze. V anafazi (ana = vzdolž) niti delitvenega vretena dokončno ločijo hčerinski kromatidi in ju vlečejo proti poloma celice. Pri potovanju na celična pola se gibljejo kromosomi s centromeri naprej proti celičnim polom in za seboj vlečejo kromosomske krake. S tem potovanjem se konča anafaza. Ob koncu anafaze se v ekvatorialni ravnini celice začnejo zbirati Golgijevi vezikli, ki tvorijo celično ploščo (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

2.5.2.4 Telofaza

V zadnji stopnji mitoze, telofazi (telos = konec), poteka obraten proces kot v profazi. V telofazi, drugi časovno najdaljši fazi, se kromosomi despiralizirajo (evkromatinski del), podaljšajo, izgubijo ovoj ali matriks, tako da zopet govorimo o kromatinu. Heterokromatinski deli, ki sestavljajo kromocentre, ostanejo spiralizirani in so zaradi tega temneje obarvani. Spet se pojavi jedrce in jedrna ovojnica. Iz celične plošče nastane primordijalna celična stena ali osrednja lamela, ki predeli dve novo nastali celici (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Celični cikel traja povprečno od 20 do 30 ur, od tega traja mitoza krajši del od 1 do 2 uri (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000). Po končani mitози lahko celice preidejo v nov celični cikel (meristemska tkiva) – interfazi sledi nova delitev celice, ali pa preidejo v trajno stanje (trajna tkiva) – celice se ne delijo več in ostanejo vseskozi v interfazi (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000; Stušek in sod., 2001).

2.6 KROMOSOMI EVKARIONTSKIH ORGANIZMOV

Izraz kromosom (gr. b. chroma = barva, gr. b. soma = telo) pomeni telo, ki se intenzivno obarva (Bavdek, 1988). Kromosom je dolga, nitasta struktura v jedru vsake celice evkariotskih organizmov, ki jo po barvanju lahko vidimo pod mikroskopom (Strgar, 2002). Sestavljen je iz beljakovin (bazične beljakovine ali histoni, kisle beljakovine in preostale beljakovine), DNK in RNK (Sinkovič, 2000).

Kromosomi so nosilci dednih enot (genov). S svojo aktivnostjo usmerjajo in regulirajo metabolične in morfogenetske procese v celicah (Krajnčič, 1994). V času jedrne delitve se vzdolžno delijo in s tem omogočajo prenos dednega materiala iz ene celice v drugo in iz ene generacije v drugo (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000). Kromosomi so si po velikosti in obliki različni. Najpogostejše so v obliki niti, paličic, lahko pa so tudi kroglasti, če so majhni (Sinkovič, 2000).

2.6.1 Zgradba kromosomov

Kromosomi so najprimernejši za ugotavljanje njihove zgradbe in velikosti v metafazi mitotske jedrne delitve, saj so takrat maksimalno skrajšeni (Mastnak, 1977; Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Ponavadi ima metafazni kromosom eno zožitev, imenovano primarna zožitev. To je zoženi del kromosoma, ki razdeli kromosom na dva kraka, imenovani kromatidi. V primarni zožitvi je center za premikanje kromosomov, imenovan centromer ali kinetohor, na katerega se pritrdijo med delitvijo niti delitvenega vretena (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000). Potreben je za urejeno delitev in razmik kromatid (Strgar, 2002). Centromer predstavlja strukturno in funkcionalno odvisni (despiralizirani) in genetsko aktivni del kromosoma. Kraki kromosomov pa so zaviti (spiralizirani) in v času jedrne delitve genetsko neaktivni (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Glede na lego centromera razdelimo kromosome v štiri skupine (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000; Bavdek, 1988):

- Metacentrični kromosomi (gr. b. meta = vmes) – centromer je na sredini kromosoma; tak kromosom ima enako dolga kraka.
- Submetacentrični kromosomi (lat. b. sub = pod) – centromer je nekoliko pomaknjen iz središča kromosoma (0,3 : 0,7); tak kromosom ima en krak krajši in drugi daljši.
- Subtelocentrični (akrocentrični) kromosomi (gr. b. telos = konec; gr. b. akros = skrajni) – centromer je skoraj čisto na enem koncu kromosoma; tak kromosom ima en zelo kratek krak in drug zelo dolg krak.
- Telocentrični kromosomi – centromer je čisto na koncu kromosoma.

Nekateri kromosomi imajo še sekundarno zožitev, ki je razporejena na različnih mestih na kromosomih. V sekundarni zožitvi je nukleolarni organizator (NOR). To je center organizacije jedrca in je nujno potreben za njegovo oblikovanje v telofazi mitoze. Ta del kromosoma je despiraliziran in v času jedrne delitve genetsko aktiven. Če je sekundarna zožitev blizu konca kromosoma (subterminalno), se tvori na koncu kromosoma okrogel ali elipsast element, imenovan satelit in take kromosome s satelitom imenujemo SAT (sine acido thymonucleinico) kromosomi. To pomeni, da je ta predel kromosoma z manj DNK in več RNK in po pravilu sta v jedru vsaj en par kromosomov SAT kromosoma. Končni deli kromosomov se imenujejo telomere in se pogosto močneje obarvajo (videti so kot intenzivno obarvani gumbi). Telomere stabilizirajo oba končna dela kromosoma in onemogočajo zlepljanje kromosomov (Krajnčič, 1994; Sinkovič, 2000).

Med posameznimi fazami delitve jedra se zgradba kromosomov spreminja (Strgar, 2002). V anafazi in telofazi imajo kromosomi eno kromatido in eno dvojno vijačnico DNK. V

profazi in metafazi pa je vsak kromosom zgrajen iz dveh kromatid, izmed katerih vsaka vsebuje DNK dvojno vijačnico, to pa pomeni, da kromosom gradita dve dvojni vijačnici DNK (Jezernik in sod., 2012; Krajncič, 1994; Sinkovič, 2000). Od konca profaze, ko jedrce izgine, do sredine telofaze je vsaka kromatida zgrajena iz kromoneme in ovoja ali matriksa. Kromonema je spiralno zavita vrstica, sestavljena iz beljakovin in DNK (nukleoproteidi). Nastane s spiralizacijo kromatinske niti. Močnejše spiralizirani deli kromoneme so kromomere, ki se pod optičnim mikroskopom kažejo kot temno obarvana zrnca. Z despiralizacijo kromosomov v sredini telofaze ovoj ali matriks kromosomov, ki je sestavljen iz nitastih (fibrilarnih) in zrnatih (granularnih) struktur ribonukleoproteidov, razpade. Brez ovoja ali matriksa so kromosomi v predelu primarne in sekundarne zožitve (Krajncič, 1994; Sinkovič, 2000).

Na kromatinskih nitih (despiralizirani kromosomi) interfaznega jedra razlikujemo, glede na sposobnost obarvanja, odseke iz evkromatina in heterokromatina. Evkromatinski odseki se z bazičnimi barvili slabo obarvajo in so zato z mikroskopi slabše vidni, medtem ko se heterokromatinski odseki intenzivno obarvajo. Heterokromatin ima močno spiralizirano DNK, pri evkromatinu pa je DNK zrahljana in despiralizirana. Gensko aktivni so samo despiralizirani evkromatinski odseki kromatina, in sicer so najaktivnejši v času interfaze, v času mitoze in mejoze pa kromatin v glavnem ne opravlja nobene sintetične funkcije (Krajncič, 1994; Sinkovič, 2000).

2.7 KARIOTIP HMELJA

Kariotip je prikaz garniture kromosomov ene celice, torej opis števila, velikosti in oblike vseh kromosomov ene celice. Grafično predstavitev posameznih kromosomov v kromosomski garnituri celice pa imenujemo kariogram, kjer so s posebnim barvilom obarvani metafazni kromosomi razporejeni (v primeru diploidnih organizmov po parih) po velikosti od največjega do najmanjšega (Komel, 2006; Strgar, 2002). Kromosoma v diploidnih celicah, ki sta enake oblike, enake velikosti ter nosita istovrstne gene v enakem zaporedju, imenujemo homologna kromosoma (Stušek in sod., 2001). En homolog je od očeta, drugi pa od matere (Komel, 2006).

Celice hmelja so diploidne, saj imajo dve garnituri kromosomov, vsebujejo torej dve kopiji genoma (Komel, 2006). Kariotip hmelja vsebuje 20 kromosomov ($2n = 2x = 20$), ki jih po obliki in sestavi genov lahko razdelimo v 9 parov avtosomov in 1 par spolnih kromosomov (heterosomov). Spolna kromosoma sta X in Y. Ženske rastline imajo v svojih celicah dva kromosoma X, moške rastline pa imajo en kromosom X in en kromosom Y (Jakše in sod., 2008; Karlov in sod., 2003; Grabowska-Joachimiak, 2006). X kromosom je običajno večji in evkromatinski, Y kromosom pa je pogosto heterokromatinski (Mastnak, 1977; Grabowska-Joachimiak, 2006). Oba kromosoma nosita gene za določanje spola in gene, ki predstavljajo spolno vezano in delno spolno vezano dedovanje. Glede na avtosome se

spolni kromosomi na splošno razlikujejo po vidni strukturi, različni razporeditvi kromatina, počasnejšem ali hitrejšem razhajanju v anafazi I zoritvene delitve, načinu parjenja (konjugacije), genetskih razlikah (Mastnak, 1977). Predviden sistem dedovanja spola pri hmelju je na podlagi spolnih kromosomov, čeprav nekateri rezultati tudi kažejo, da bi lahko šlo za bolj kompleksen način dedovanja.

2.8 POLIPLIJDNOST HMELJA

Poliploidnost je stanje, ko je v jedru somatskih celic več kromosomov kot v normalni vrstno značilni garnituri kromosomov. Pri evploidiji je pomnožena celotna garnitura kromosomov, medtem ko pri anevploidiji manjkajo ali so nadštevilni samo posamezni kromosomi. Posledica poliploidnosti je večinoma povečanje celice, zato je zelo pomembna za žlahtnjenje rastlin (Strgar, 2002).

Žlahtnjenje pri hmelju je pogosto usmerjeno v pridobivanje poliploidnih rastlin, da bi pridobili sorte z boljšimi lastnostmi (Šesek, 2002). Pri hmelju predstavljajo optimalno stopnjo ploidnosti triploidi ($2n = 3x$). Triploidne rastline so v primerjavi z diploidi (Šuštar-Vozlič in sod., 2002):

- manj občutljive na peronosporo, ker hitreje prerastejo občutljivo fazo,
- potomstvo je bolj izenačeno,
- imajo žilave, a manj drobljive in večje storžke,
- rastline imajo daljše zalistnike in večje liste,
- rastna doba je daljša,
- imajo večji pridelek,
- manj osemenjeni storžki.

Številne triploidne sorte vzgajajo v različnih državah in jih uporabljajo v komercialni proizvodnji (Šesek in sod., 2000). Triploide dobimo, če tetraploidnega starša križamo z diploidnim (Šuštar-Vozlič in sod., 2002; Šesek in sod., 2000). Včasih zaradi nepravilne porazdelitve med delitvijo jedra hčerinski celici dobita premajhno ali preveliko število kromosomov in kot rezultat križanja ne nastane triploid ampak anevploid (Strgar, 2002; Šesek in sod., 2000). Anevplidi so za pridelovanje nezaželeni, zanimivi pa so za genetska proučevanja. Odkrivanje anevplidov s preštevanjem kromosomov je pogosto zelo težko, ker je postopek zahteven in je verjetnost napake velika. Alternativa je uporaba pretočne citometrije, ki se je izkazala za učinkovito, hitro in zanesljivo metodo (Šesek in sod., 2000).

2.9 VRSTE CVETOV IN NJIHOVA RAZPOREDITEV PRI HMELJU

Poznamo naslednje vrste cvetov (Sinkovič, 2000):

- Dvospolni (hermafroditni) ali popolni cvetovi so cvetovi, ki imajo v istem cvetu razvite prašnike in pestič.
- Enospolni ali nepopolni cvetovi imajo razvite samo prašnike (moški cvetovi) ali samo pestič (ženski cvetovi).
- Sterilni ali jalovi cvetovi imajo razvito samo cvetno odevalo.

Hmelj je dvodomna rastlina. To pomeni, da na eni rastlini najdemo le moške ali le ženske cvetove (Rode in sod., 2002). Kljub svoji dvodomnosti kaže tudi določeno stopnjo enodomnosti (na eni rastlini so moški in ženski cvetovi), vendar tudi tukaj lahko opazimo variabilnost fenotipa (Jakše in sod., 2008; Škof in sod., 2010). Stopnjo dvodomnosti lahko razdelimo v več fenotipskih razredov, od pretežno ženskega fenotipa z nekaj moškimi cvetovi do pretežno moškega fenotipa z nekaj ženskimi cvetovi. Variabilnost se delno kaže tudi med različnimi leti opazovanj (Škof in sod., 2010). Enodomna spolna izraženost pri hmelju je verjetno posledica triploidne ali aneuploidne kromosomske garniture (za hmelj nenormalnega kromosomskega števila) (Jakše in sod., 2008; Škof in sod., 2010).

V poskusu leta 2009 so Škof in sod. (2010) preučevali 41 enodomnih rastlin hmelja, potomcev različnih križanj diploidnih staršev. Glede na njihov fenotip so jih razdelili v 6 razredov:

- FF – samo ženski fenotip
- Fm – pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi
- FM – 50 % ženski fenotip, 50 % moški fenotip
- Mf – pretežno moški fenotip z nekaj ženskimi cvetovi
- Mh – skoraj samo moški fenotip z nekaj morfološko hermafroditnimi cvetovi
- MM – samo moški fenotip

Z metodo pretočne citometrije so jim nato določili ploidnost. Pri 6 hermafroditnih rastlinah je metoda pretočne citometrije pokazala abnormalno količino DNK. Domnevali so, da so te rastline aneuploidi. V naši raziskavi pa smo preučili kariotip izbranih hermafroditnih rastlin s pomočjo štetja kromosomov in merjenja velikosti genoma z metodo pretočne citometrije.

2.10 PRETOČNA CITOMETRIJA

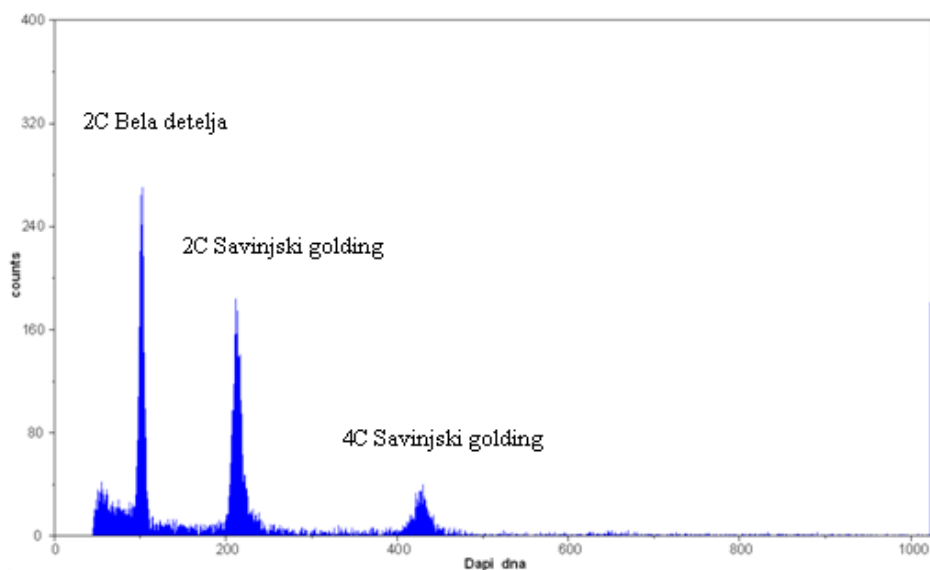
Pretočna citometrija, ki temelji na merjenju relativne intenzitete fluorescence delcev oziroma proučevanega materiala, je pogosto uporabljena in zelo učinkovita metoda za določanje velikosti jedrnega genoma. Uporablja se med drugim za merjenje relativne količine DNK v jedrih, kar omogoča proučevanje številnih lastnosti (Šesek, 2002).

Rezultat, ki ga dobimo z uporabo metode pretočne citometrije, je predstavljen v obliki DNK histograma in ta ponazarja frekvenčno porazdelitev delcev glede na relativno intenziteto fluorescence. Intenziteta fluorescence je sorazmerna količini DNK (položaj vrhov na x osi). DNK histogram je običajno sestavljen iz dveh vrhov, ki predstavljata jedra v G1 (dominanten vrh) in G2 (manjši vrh) fazi. Vsebnost jedrne DNK, ki se navadno izraža v pikogramih ($1 \text{ pg} = 10^{-9} \text{ g}$), se ugotavlja na podlagi primerjave položaja G1 vrhov pri vzorcu in standardu, za katero je vsebnost jedrne DNK znana. Velikost genoma posamezne vrste opisujemo s tako imenovano C vrednostjo, ki predstavlja količino DNK v nepodvojenem (G1 faza) haploidnem genomu določene vrste. 2C vrednost torej predstavlja količino DNK v podvojenem haploidnem genomu (G2 faza) oziroma v nepodvojenem diploidnem genomu (Šesek, 2002).

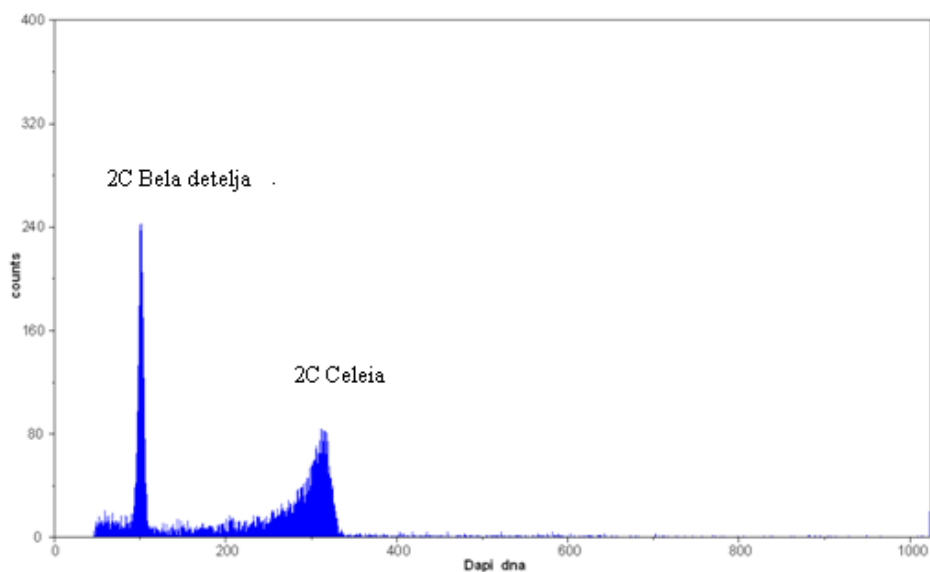
Izraz aneuploidija se nanaša na pojav abnormalne količine DNK, ker metoda pretočne citometrije meri količino DNK in ne števila kromosomov (Šesek in sod., 2000).

Merjenje vsebnosti DNK v interfaznih jedrih z metodo pretočne citometrije ima nekaj prednosti v primerjavi z določanjem števila kromosomov s klasično mikroskopsko tehniko. Metoda pretočne citometrije omogoča lažjo pripravo preparatov, je hitra, ne potrebuje delitve celic v določeni fazi, ne uničuje rastlin (potrebuje le nekaj mg tkiva) in omogoča zaznavo mikroploidije (Šesek, 2002).

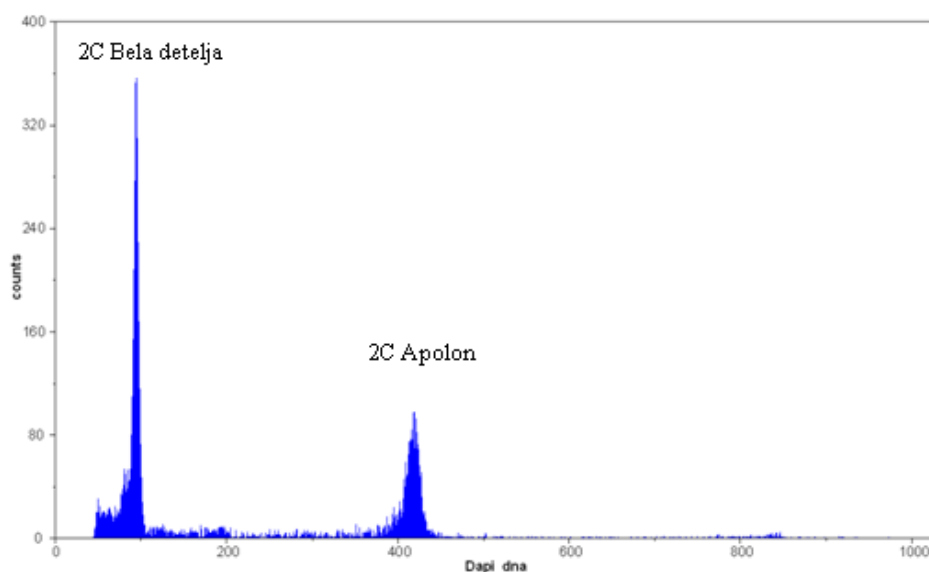
Primeri DNK histogramov diploida, triploida in tetraploida so prikazani na sliki 1, sliki 2 in sliki 3.



Slika 1: DNK histogram (skrajno levi vrh je standard) diploidne ($2n$) sorte 'Savinjski golding' (primer rezultatov raziskav iz laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)



Slika 2: DNK histogram (skrajno levi vrh je standard) triploidne ($3n$) sorte 'Celeia' (primer rezultatov raziskav iz laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)



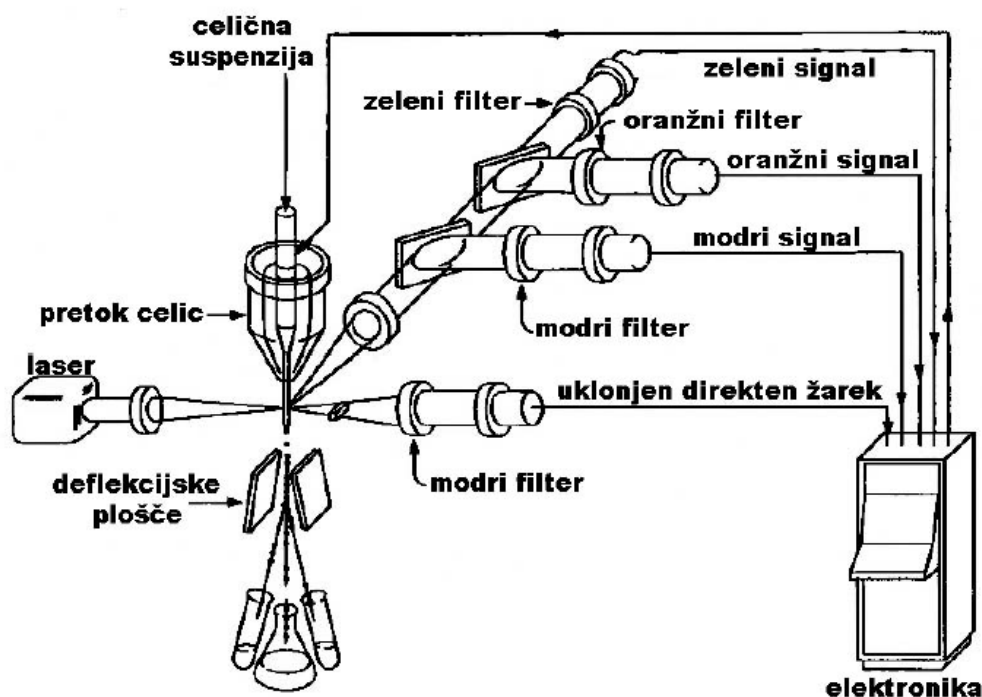
Slika 3: DNK histogram (skrajno levi vrh je standard) tetraploidne (4n) sorte 'Apolon' (primer rezultatov raziskav iz laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)

2.10.1 Delovanje pretočne citometrije in sestavni deli pretočnega citometra

Pretočna citometrija je metoda, s katero lahko merimo in analiziramo fizikalne in/ali kemične lastnosti celic. Merimo lastnosti vsake posamezne celice, ki v suspenziji v nizu, druga za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe (Onkološki inštitut Ljubljana, 2013; Kotnik in sod., 2001). V eni sekundi lahko analiziramo več tisoč celic (Invitrogen, 2013).

Shematski prikaz delovanja pretočne citometrije je prikazan na sliki 4. Svetlobni žarek zadane ob celico, kjer se lahko odbije in lomi, kar zaznamo preko direktnega detektorja, ali pa absorbira (Kotnik in sod., 2001; Ivančič, 2008). Če celice absorbirajo fotone, se fluorescentne molekule vzbudijo in ob sprostitvi emitirajo fotone, katere analiziramo preko različnih barvnih filtrov tako, da ločimo intenziteto posameznih valovnih dolžin. Iz dobljenih meritev lahko na tak način določimo velikost celic in notranjo zgradbo (Ivančič, 2008).

Najbolj uporabljena laserja sta helij-neonov (HeNe) in argonski laser. HeNe laser oddaja svetlobo rdeče barve z valovno dolžino 632 nm in rumene barve z 594 nm, argonski laser pa sveti modro svetlobo z valovno dolžino 488 nm (Ivančič, 2008).



Slika 4: Shematski prikaz delovanja pretočne citometrije (Ivančič, 2008)

Sestavni deli pretočnega citometra so (Invitrogen, 2013):

- pretočni sistem, ki potisne vzorec po cevki skozi svetlobni žarek,
- laserji, ki so vir svetlobe,
- optični sistem, ki zbira in usmerja svetlobo,
- detektorji, kateri zaznavajo svetlobo,
- elektronski in računalniški sistem z ustreznimi programi, ki pretvori in obdelava električne signale v digitalne podatke ter opravi potrebno analizo.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V raziskavi smo uporabili 59 rastlin hmelja, ki so bile vzgojene v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Pri vsaki rastlini smo isto rastlino uporabili kot material za metodo pretočne citometrije in za metodo štetja kromosomov v metafaznih jedrih. Uporabili smo 56 enodomnih rastlin, 2 diploidni dvodomni rastlini (ženski rastlini sort 'Savinjski golding' in 'Wye Target') in 1 triploidno dvodomno rastlino (sorta 'Celeia', ženska rastlina). Pri pretočni citometriji smo za standard uporabili belo deteljo (*Trifolium repens* L.), ki ima znano velikost jedrnega genoma in je stalno na voljo v rastlinjaku Biotehniške fakultete. Velikost jedrnega genoma bele detelje (*Trifolium repens* L.) je 2,07 pg / 2C (Arumuganathan in Earle, 1991).

3.2 METODE DELA

3.2.1 Pretočna citometrija

3.2.1.1 Priprava raztopin

Raztopini smo pripravili po prirejenem protokolu po Ottu (1988).

3.2.1.1.1 Raztopina Otto 1

Pripravili smo 200 ml raztopine Otto 1. Najprej smo zatehtali 4,2 g monohidrata citronske kisline (citronska kislina $\times$ H₂O) in mu dodali 1,0 ml detergenta Tween 20. Nato smo dolili bidestilirano (deoionizirano) vodo do oznake 200 ml na bučki.

3.2.1.1.2 Raztopina Otto 2 (barvilna raztopina)

Pripravili smo 200 ml raztopine Otto 2. Najprej smo zatehtali 28,56 g Na₂HPO₄ (dinatrijhidrogenfosfat) $\times$ 12H₂O in mu dodali 1,0 ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) založne raztopine. Na koncu smo do oznake 200 ml na bučki dolili bidestilirano vodo.

3.2.1.2 Priprava vzorca za analizo

Vzorci za analizo smo pripravili po prirejenem protokolu po Ottu (1988).

Košček mladega lista hmelja in detelje smo v razmerju približno 2 (hmelj) : 1 (detelja) v plastični petrijevki z dodatkom raztopine Otto 1 nasekljali z ostro britvico, da so jedra celic lažje prešla iz tkiva listov. Nastalo suspenzijo smo precedili skozi najlonsko cedilce v

kiveto za pretočni citometer in ji dodali raztopino Otto 2 v razmerju približno 1 (precejena nasekljana lista) : 4 (raztopina Otto 2).

Tako pripravljene vzorce smo analizirali na pretočnem citometru model Partec PAS flow cytometer. Vsako meritev smo ponovili štirikrat. Kot rezultat smo dobili DNK histograme. Izračunali smo povprečne vsebnosti jedrne DNK in standardne odklone ($\bar{x} \pm s$). Diploidno belo deteljo smo uporabili kot standard, da smo pretočni citometer umerili na znano količino DNK.

3.2.1.3 Duncanov test ($p < 0,01$)

Duncanov test za oceno razlik med povprečnimi vrednostmi DNK vsebnosti ($p < 0,01$) smo izvedli s pomočjo Statgraphics Centurion programa.

3.2.2 Štetje kromosomov v metafaznih jedrih – priprava kromosomskih preparatov

3.2.2.1 Citostatik: ledeno mrzla voda

Nabrane poganjke v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu smo prenesli v laboratorij in jih dali v vodo, katero smo menjavali na približno 2 dni, da so se ukoreninili. Ko so koreninice dosegle dolžino 3 do 4 cm, smo jih odstranili z mladih rastlin in jih dali v 1,5 ml centrifugirke z ledeno mrzlo bidestilirano vodo. 1,5 ml centrifugirke smo nato dali v stiropor škatlo, katero smo do polovice napolnili z mrzlo vodo, drugo polovico pa z ledom. Vse skupaj smo pustili v hladilniku 24 ur.

3.2.2.2 Fiksiranje v pripravljeni raztopini

Drugi dan smo koreninice fiksirali v raztopini 96 % etanola in 100 % očetne kisline pripravljene v razmerju 3:1 za najmanj 24 ur. V tej raztopini lahko koreninice shranjujemo do 7 dni. Ker smo jih hoteli shraniti za več kot 1 teden, smo po izpiranju v bidestilirani vodi koreninice dali v 1,5 ml centrifugirke napolnjene z 96 % etanolom. Na tak način v hladilniku ostanejo 1 leto primerne za opazovanje.

3.2.2.3 Barvanje po Fuelgenu

Fiksirane koreninice smo hidrolizirali v 1 ml 1N HCl, 14 minut na 60 °C in obarvali v Fuelgenovem (= Schiffovem) reagentu (komercialno kupljena raztopina, Merck) najmanj za 1 uro na sobni temperaturi. Nato smo izdelali kromosomske preparate s »squash« tehniko. Na objektno stekelce smo dali 1 koreninico. S skalpelom smo pod lupo odrezali približno 2 mm koreninske čepice (vijolično obarvani del), dodali kapljico vode in

jo zmečkali s skalpelom. Nato smo s pipeto dodali eno kapljico acetokarmina in prekrili s krovnim stekelcem. Preparat smo prekrili s papirnato brisačko in nekajkrat močno pritiskali s topo konico flomastra po krovnem stekelcu, da se je preparat razporedil pod krovnim stekelcem in iztisnil zrak. Preparat smo nato fiksirali tako, da smo ga skozi konico ognja plamena 2-3 krat hitro potegnili. Sledil je le še pregled pod svetlobnim mikroskopom model NIKON ECLIPSE 80i. Pri povečavi 100× smo uporabili imerzijsko olje. Preparete, kjer smo odkrili kromosome, smo slikali s fotoaparatom, ki je sestavni del mikroskopa in jih shranili v digitalni obliki na PC računalniku. Slike smo nato pregledovali s pomočjo programske opreme LUCIA CYTOGENETICS 2 ver 2.3.

4 REZULTATI

V raziskavi smo uporabili 59 rastlin hmelja, ki so bile vzgojene v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Pri 56 rastlinah smo nabrali poganjke 11.05.2010. Pri vsaki rastlini smo isto rastlino uporabili kot material za metodo pretočne citometrije in za metodo štetja kromosomov v metafaznih jedrih.

4.1 PRETOČNA CITOMETRIJA

V poskusu leta 2009 so Škof in sod. (2010) z metodo pretočne citometrije določili ploidnost 40 hermafroditnim rastlinam. Takrat so delni rezultati, ki so jih pridobili v laboratoriju, pokazali, da bi lahko hermafroditne rastline bile aneuploidi. Mi smo določili ploidnost še 16, torej smo z metodo pretočne citometrije določili ploidnost 56 hermafroditnim rastlinam. Ploidnost smo z metodo pretočne citometrije določili tudi 3 dvodomnim rastlinam.

4.1.1 Ploidnost, povprečne vsebnosti jedrne DNK in fenotip

Povprečne vsebnosti jedrne DNK so bile izračunane pri 56 enodomnih in 3 dvodomnih rastlinah (preglednica 2).

Metoda pretočne citometrije je pokazala, da je 22 od 50 enodomnih rastlin (brez 6-ih domnevnih aneuploidov) in dvodomna rastlina 'Celeia' triploidna. Povprečne vsebnosti jedrne DNK so med 6.33 ± 0.06 pg (genotip '43') in 6.62 ± 0.05 pg (genotip '14'). 28 od 50 enodomnih rastlin (brez 6-ih domnevnih aneuploidov) in dvodomni rastlini 'Savinjski golding' in 'Wye Target' sta diploidni s povprečnimi vsebnostmi jedrne DNK med 4.33 ± 0.04 pg (genotip '4') in 4.47 ± 0.04 pg (genotip '45').

17 od 50 enodomnih rastlin (brez 6-ih domnevnih aneuploidov) je pretežno ženskega fenotipa z nekaj moškimi cvetovi (Fm fenotip) in vse so diploidne. 22 od 50 enodomnih rastlin (brez 6-ih domnevnih aneuploidov) je pretežno moškega fenotipa z nekaj ženskimi cvetovi (Mf fenotip) in vse so triploidne. Le 1 od 50 enodomnih rastlin (brez 6-ih domnevnih aneuploidov) je FM fenotip (niti ženski, niti moški fenotip ne prevladuje) in je diploidna. 9 od 50 enodomnih rastlin (brez 6-ih domnevnih aneuploidov) je FF fenotip (samo ženski fenotip) in 1 rastlina je MM fenotip (samo moški fenotip). Vse so diploidne. Izkazalo se je, da teh 10 rastlin ni enodomnih, ampak so dvodomne, ker na eni rastlini najdemo le ženske ali le moške cvetove.

Preglednica 2: Fenotip, povprečne vsebnosti jedrne DNK in ploidnost pri enodomnih in dvodomnih rastlinah hmelja

Genotip	Vrsta in sadilno mesto (na polju)	Družina križanja	Fenotip*	Vsebnost DNK (pg)**	Ploidnost
1	50/196	279D112 X 01J 3/70	Mf	6.54 ± 0.05	3n
3	51/182	285/75 X 19058	Mf	6.54 ± 0.04	3n
4	57/62	272/138 X M2/1	MM	4.33 ± 0.04 a	2n
5	58/54	279/120 X 00O 8/169	FF	4.40 ± 0.04 abcdef	2n
6	58/55	279/120 x 00O 8/169	Mf	6.60 ± 0.09	3n
7	67/193	271/75 X MM	FF	4.40 ± 0.03 abcdef	2n
8	71/70	MERKUR PROSTO	Mf	6.50 ± 0.12	3n
9	71/158	MERKUR X SH2	Mf	6.43 ± 0.09	3n
10	152/90	279/73 x 302/1	Mf	6.49 ± 0.09	3n
12	161/100	279/73 x 295/61	Mf	6.54 ± 0.02	3n
13	160/80	285/79 x 5v/38	Mf	6.56 ± 0.07	3n
14	160/95	285/79 x 5v/38	Mf	6.62 ± 0.05	3n
15	158/51	Taurus x 21436	Fm	4.49 ± 0.05 ghi	2n+1?
16	158/68	Taurus x 21436	Fm	4.57 ± 0.03 j	2n+1?
17	159/24	31/87 prosto	Mf	6.51 ± 0.08	3n
19	131/59	WT x 2/1	Fm	4.43 ± 0.04 efgh	2n
20	131/73	WT x 2/1	Fm	4.51 ± 0.02 ij	2n+1?
21	131/74	WT x 2/1	Fm	4.45 ± 0.05 fghi	2n
22	131/85	WT x 2/1	Fm	4.38 ± 0.05 abcde	2n
23	131/107	WT x 2/1	Fm	4.38 ± 0.01 abcde	2n
25	131/123	WT x 2/1	Fm	4.50 ± 0.03 ij	2n+1?
26	131/129	WT x 2/1	FF	4.44 ± 0.02 efghi	2n
27	132/1	WT x 2/1	FF	4.40 ± 0.04 bcdef	2n
28	132/10	WT x 2/1	FF	4.38 ± 0.02 abcde	2n
29	132/13	WT x 2/1	Fm	4.42 ± 0.04 defg	2n
30	132/23	WT x 2/1	FF	4.42 ± 0.03 cdef	2n
31	132/24	WT x 2/1	Fm	4.42 ± 0.03 defg	2n
32	132/39	WT x 2/1	Fm	4.41 ± 0.02 abcd	2n
33	132/45	WT x 2/1	Fm	4.41 ± 0.02 bcdef	2n
34	132/71	WT x 2/1	Fm	4.49 ± 0.06 ghi	2n+1?
35	132/74	WT x 2/1	FF	4.50 ± 0.01 hi	2n+1?
36	132/80	WT x 2/1	Fm	4.40 ± 0.01 abcdef	2n
39	132/73	WT x 2/1	Fm	4.46 ± 0.01 defg	2n
40	132/79	WT x 2/1	Mf	6.46 ± 0.04	3n
41	131/76	WT x 2/1	Fm	4.41 ± 0.03 bcd	2n
42	131/94	WT x 2/1	Mf	6.44 ± 0.06	3n
43	131/98	WT x 2/1	Mf	6.33 ± 0.06	3n
44	131/113	WT x 2/1	Mf	6.42 ± 0.02	3n
45	131/115	WT x 2/1	Fm	4.47 ± 0.04 defg	2n
46	147/115	20/58 x OP	Mf	6.47 ± 0.05	3n
47	161/55	279/73 X 295/61	Mf	6.37 ± 0.03	3n
49	174/33	20/115 X 302/1	Mf	6.37 ± 0.06	3n
50	174/34	20/115 X 302/1	Mf	6.49 ± 0.05	3n
51	174/37	20/115 X 302/1	Mf	6.35 ± 0.03	3n
52	174/45	20/115 X 302/1	Mf	6.47 ± 0.02	3n
53	174/49	20/115 X 274/124	Mf	6.48 ± 0.04	3n
54	188/156	31/87 PROSTO	Fm	4.35 ± 0.01 abcd	2n
55	194/259	17/72 X 272/93	FF	4.40 ± 0.02 abcdef	2n
56	190/21	DANA PROSTO	Fm	4.36 ± 0.03 abcd	2n
57	192/94	DANA X 306/52	Fm	4.36 ± 0.02 abcd	2n
59	186/237	35/158 X 20/108	Mf	6.39 ± 0.04	3n
60	187/95	301/11 X 5V/38	FM	4.41 ± 0.01 cdef	2n
61	189/23	285/79 X 19/136	Fm	4.41 ± 0.01 bcdef	2n
62	191/53	275/24 X 306/104	FF	4.34 ± 0.02 ab	2n
63	275/24 X 306/104	275/24 X 306/104	FF	4.36 ± 0.02 abcd	2n
64	191/164	276/163 X 5V/38	Fm	4.46 ± 0.01 fghi	2n
65	SG		FF	4.34 ± 0.04 abc	2n
66	WT		FF	4.39 ± 0.03 abcdef	2n
67	CEL		FF	6.49 ± 0.02	3n

Se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2

Legenda:

SG = 'Savinjski golding'; WT = 'Wye Target'; CEL = 'Celeia'

* FF – samo ženski fenotip; Fm – pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi; FM – 50 % ženski fenotip, 50 % moški fenotip; Mf – pretežno moški fenotip z nekaj ženskimi cvetovi; MM – samo moški fenotip

** Vrednosti označene z isto črko se značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($p < 0,01$). Primerjali smo diploidne genotipe in domnevne aneuploide.

4.1.2 Duncanov test ($p < 0,01$)

Z Duncanovem testom ($p < 0,01$) smo primerjali povprečne vsebnosti jedrne DNK pri diploidnih genotipih in domnevnih aneuploidih. Test smo izvedli s pomočjo Statgraphics Centurion programa.

4.1.3 Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah z MM (moški) in FF (ženski) fenotipom

Najprej smo opravili primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah z MM (moški) in FF (ženski) fenotipom (preglednica 3). V te primerjave nismo vključili domnevnih aneuploidov.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale značilne razlike v povprečni vsebnosti jedrne DNK med genotipom '4' (rastlina z MM (moški) fenotipom) in genotipi '27', '30', '26' (rastline s FF (ženski) fenotipom). Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri genotipu '4' je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri ostalih genotipih.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale značilne razlike v povprečni vsebnosti jedrne DNK med genotipom '62' in genotipoma '30', '26'. Med slednjima ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri genotipu '62' je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipoma '30' in '26'.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med sorto Savinjski golding in genotipom '63' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri njima je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipu '26'.

Preglednica 3: Fenotip in povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah z MM (moški) in FF (ženski) fenotipom

Genotip	Fenotip*	Vsebnost DNK (pg)**
4	MM	4.33 ± 0.04 a
62	FF	4.34 ± 0.02 ab
Savinjski golding	FF	4.34 ± 0.04 abc
63	FF	4.36 ± 0.02 abcd
28	FF	4.38 ± 0.02 abcde
Wye Target	FF	4.39 ± 0.03 abcdef
55	FF	4.40 ± 0.02 abcdef
7	FF	4.40 ± 0.03 abcdef
5	FF	4.40 ± 0.04 abcdef
27	FF	4.40 ± 0.04 bcdef
30	FF	4.42 ± 0.03 cdef
26	FF	4.44 ± 0.02 efghi

* FF – samo ženski fenotip; MM – samo moški fenotip

** Vrednosti označene z isto črko se značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($p < 0,01$).

4.1.4 Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah s Fm fenotipom (pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi)

Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK smo opravili tudi pri rastlinah s Fm fenotipom (pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi) (preglednica 4). Tudi v te primerjave nismo vključili domnevnih aneuploidov.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipi '54', '57', '56', '32' in '41' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri vseh je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipih '19', '21' in '64'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipoma '23' in '22' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri njima je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipoma '21' in '64'. Med slednjima ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK.

Preglednica 4: Povprečne vsebnosti jedrne DNK pri rastlinah s Fm fenotipom

Genotip	Vsebnost DNK (pg)*
54	4.35 ± 0.01 abcd
57	4.36 ± 0.02 abcd
56	4.36 ± 0.03 abcd
32	4.41 ± 0.02 abcd
23	4.38 ± 0.01 abcde
22	4.38 ± 0.05 abcde
36	4.40 ± 0.01 abcdef
41	4.41 ± 0.03 bcd
61	4.41 ± 0.01 bcdef
33	4.41 ± 0.02 bcdef
31	4.42 ± 0.03 defg
29	4.42 ± 0.04 defg
39	4.46 ± 0.01 defg
45	4.47 ± 0.04 defg
19	4.43 ± 0.04 efgh
21	4.45 ± 0.05 fghi
64	4.46 ± 0.01 fghi

* Vrednosti označene z isto črko se značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($p < 0,01$).

4.1.5 Fenotip in primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri domnevnih aneuploidih

Pri 6 od 56 enodomnih rastlin je metoda pretočne citometrije pokazala abnormalno količino DNK. To so bili genotipi '15', '34', '35', '25', '20' in '16'. Domnevali smo, da bi rastline lahko bile aneuploidnega izvora. 5 od 6 domnevnih aneuploidov je pretežno ženskega fenotipa z nekaj moškimi cvetovi (Fm fenotip), ena rastlina (genotip '35') pa je FF fenotip (samo ženski fenotip) (preglednica 5). Torej ta rastlina ni enodomna, ampak dvodomna.

Z Duncanovim testom ($p < 0,01$) smo primerjali povprečne vsebnosti jedrne DNK teh šestih genotipov (preglednica 5). Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipi '15', '34', '35', ki so domnevnega aneuploidnega značaja, ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Njihove povprečne vsebnosti jedrne DNK so med 4.49 ± 0.05 pg (genotip '15') in 4.50 ± 0.01 pg (genotip '35'), kar pomeni, da so bile njihove povprečne vsebnosti jedrne DNK statistično značilno manjše kot pri genotipu '16'. Povprečna vsebnost jedrne DNK pri genotipu '16' je 4.57 ± 0.03 pg.

Preglednica 5: Fenotip in povprečne vsebnosti jedrne DNK pri domnevnih aneuploidih

Genotip	Fenotip*	Vsebnost DNK (pg)**
15	Fm	4.49 ± 0.05 ghi
34	Fm	4.49 ± 0.06 ghi
35	FF	4.50 ± 0.01 hi
25	Fm	4.50 ± 0.03 ij
20	Fm	4.51 ± 0.02 ij
16	Fm	4.57 ± 0.03 j

* FF – samo ženski fenotip; Fm – pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi

** Vrednosti označene z isto črko se značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($p < 0,01$).

4.1.6 Primerjave glede povprečne vsebnosti jedrne DNK pri diploidnih genotipih in domnevnih aneuploidih

Primerjali smo tudi povprečne vsebnosti jedrne DNK diploidnih genotipov in domnevnih aneuploidov (preglednica 6).

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale značilne razlike v povprečni vsebnosti jedrne DNK med genotipom '4' in genotipi '41', '27', '61', '33', '60', '30', '31', '29', '39', '45', '19', '26', '21', '64', '15', '34', '35', '25', '20', '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri genotipu '4' je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri ostalih genotipih. Genotip '4' je imel tudi med vsemi diploidnimi genotipi in domnevnimi aneuploidi najmanjšo povprečno vsebnost jedrne DNK, ki je znašala 4.33 ± 0.04 pg.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale značilne razlike v povprečni vsebnosti jedrne DNK med genotipom '62' in genotipi '60', '30', '31', '29', '39', '45', '19', '26', '21', '64', '15', '34', '35', '25', '20', '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri genotipu '62' je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri ostalih genotipih.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale značilne razlike v povprečni vsebnosti jedrne DNK med sorto Savinjski golding in genotipi '31', '29', '39', '45', '19', '26', '21', '64', '15', '34', '35', '25', '20', '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri sorti Savinjski golding je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri ostalih genotipih.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipi '54', '57', '63', '56', '32' in '41' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri vseh je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipih '19', '26', '21', '64', '15',

'34', '35', '25', '20' in '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipi '23', '28' in '22' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri vseh je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipih '21', '64', '15', '34', '35', '25', '20' in '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med sorto Wye Target, genotipi '36', '55', '7', '5', '27', '61', '33', '60' in '30' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri vseh je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipih '15', '34', '35', '25', '20' in '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipi '31', '29', '39' in '45' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri vseh je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipih '35', '25', '20' in '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale značilne razlike v povprečni vsebnosti jedrne DNK med genotipom '19' in genotipi '25', '20', '16'. Med slednjimi ni bilo značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri genotipu '19' je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri ostalih genotipih.

Statistične primerjave pri $p < 0,01$ so pokazale, da med genotipi '26', '21', '64', '15', '34' in '35' ni značilnih razlik v povprečni vsebnosti jedrne DNK. Pri vseh je bila povprečna vsebnost jedrne DNK statistično značilno manjša kot pri genotipu '16'. Genotip '16' je imel med vsemi diploidnimi genotipi in domnevnimi aneuploidi največjo povprečno vsebnost jedrne DNK, ki je znašala 4.57 ± 0.03 pg.

Preglednica 6: Fenotip in povprečne vsebnosti jedrne DNK pri diploidnih genotipih in domnevnih aneuploidih

Genotip	Fenotip*	Vsebnost DNK (pg)**
4	MM	4.33 ± 0.04 a
62	FF	4.34 ± 0.02 ab
Savinjski golding	FF	4.34 ± 0.04 abc
54	Fm	4.35 ± 0.01 abcd
57	Fm	4.36 ± 0.02 abcd
63	FF	4.36 ± 0.02 abcd
56	Fm	4.36 ± 0.03 abcd
32	Fm	4.41 ± 0.02 abcd
23	Fm	4.38 ± 0.01 abcde
28	FF	4.38 ± 0.02 abcde
22	Fm	4.38 ± 0.05 abcde
Wye Target	FF	4.39 ± 0.03 abcdef
36	Fm	4.40 ± 0.01 abcdef
55	FF	4.40 ± 0.02 abcdef
7	FF	4.40 ± 0.03 abcdef
5	FF	4.40 ± 0.04 abcdef
41	Fm	4.41 ± 0.03 bcd
27	FF	4.40 ± 0.04 bcdef
61	Fm	4.41 ± 0.01 bcdef
33	Fm	4.41 ± 0.02 bcdef
60	FM	4.41 ± 0.01 cdef
30	FF	4.42 ± 0.03 cdef
31	Fm	4.42 ± 0.03 defg
29	Fm	4.42 ± 0.04 defg
39	Fm	4.46 ± 0.01 defg
45	Fm	4.47 ± 0.04 defg
19	Fm	4.43 ± 0.04 efgh
26	FF	4.44 ± 0.02 efghi
21	Fm	4.45 ± 0.05 fgghi
64	Fm	4.46 ± 0.01 fgghi
15	Fm	4.49 ± 0.05 ghi
34	Fm	4.49 ± 0.06 ghi
35	FF	4.50 ± 0.01 hi
25	Fm	4.50 ± 0.03 ij
20	Fm	4.51 ± 0.02 ij
16	Fm	4.57 ± 0.03 j

* FF – samo ženski fenotip; Fm – pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi; FM – 50 % ženski fenotip, 50 % moški fenotip; MM – samo moški fenotip

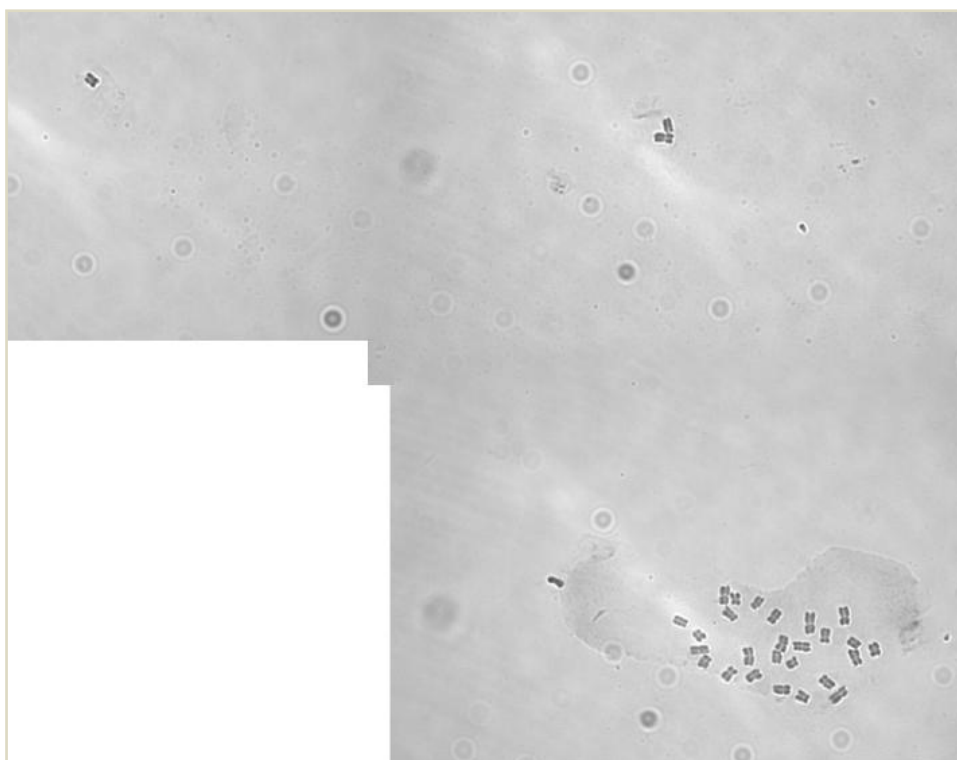
** Vrednosti označene z isto črko se značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($p < 0,01$).

4.2 ŠTETJE KROMOSOMOV V METAFAZNIH JEDRIH

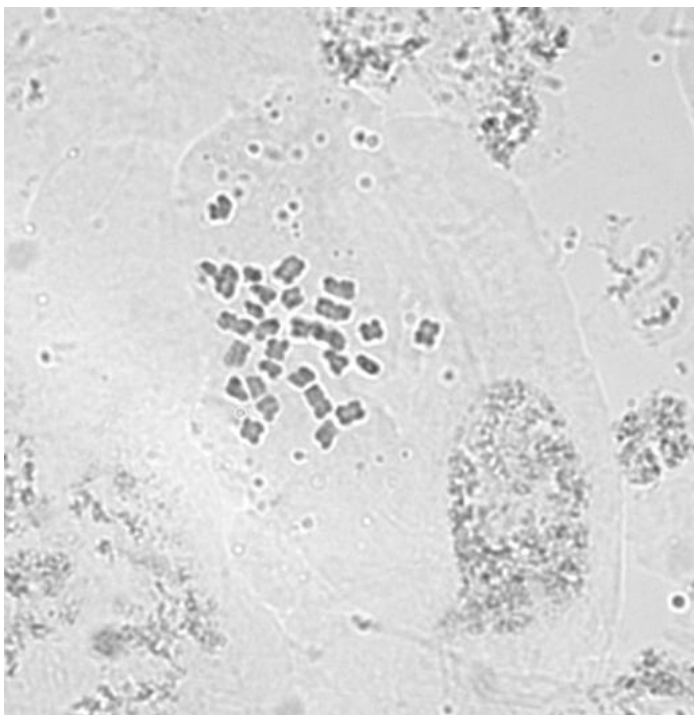
Nabrane poganjke rastlin iz kolekcijskega nasada Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu smo prenesli v laboratorij in jih dali v vodo, da so se ukoreninili. Ko so koreninice dosegle dolžino 3 do 4 cm, smo jih odstranili in jih uporabili za poskus. Metodo štetja kromosomov v metafaznih jedrih smo lahko uporabili pri 32 rastlinah, saj so se poganjki pri teh rastlinah ukoreninili in koreninice le-teh niso propadle. Koreninic je bilo za 86 centrifugirk z volumnom 1,5 ml. Ker je preostalo iz poskusa izvedenega leta 2009 še 37 centrifugirk (s koreninicami od 6 rastlin), smo jih v našem poskusu leta 2010 uporabili skupaj 123. Pri 20 rastlinah smo uspešno prešteli kromosome (preglednica 7).

4.2.1 Rezultati metode štetja kromosomov pri diploidnih in triploidnih rastlinah (brez 6-ih domnevnih anevploidov)

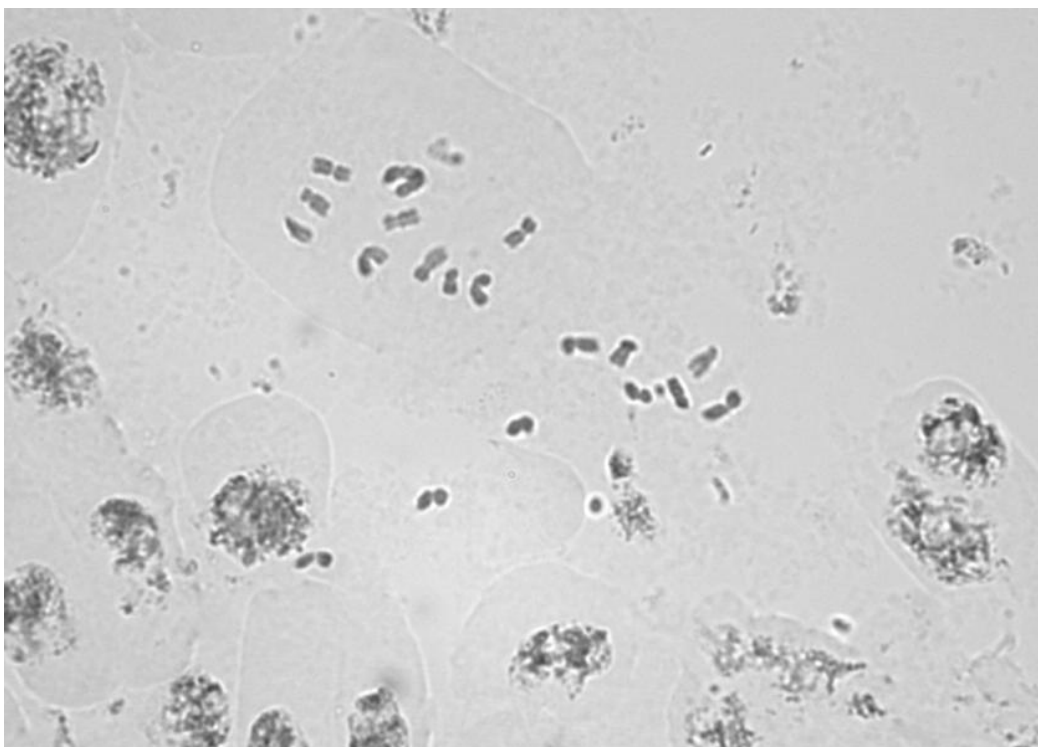
Z določanjem števila kromosomov s klasično mikroskopsko tehniko smo pri genotipih '3', '12' (slika 5), '13' (slika 6), '46', '47', '52' in pri sorti 'Celeia' potrdili triploidno število ($2n = 30$). Diploidno število ($2n = 20$) smo potrdili pri genotipih '22', '27', '33' (slika 7), '55', '56' in pri sortah 'Savinjski golding', 'Wye Target' (preglednica 7).



Slika 5: Pri genotipu '12' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 30 kromosomov



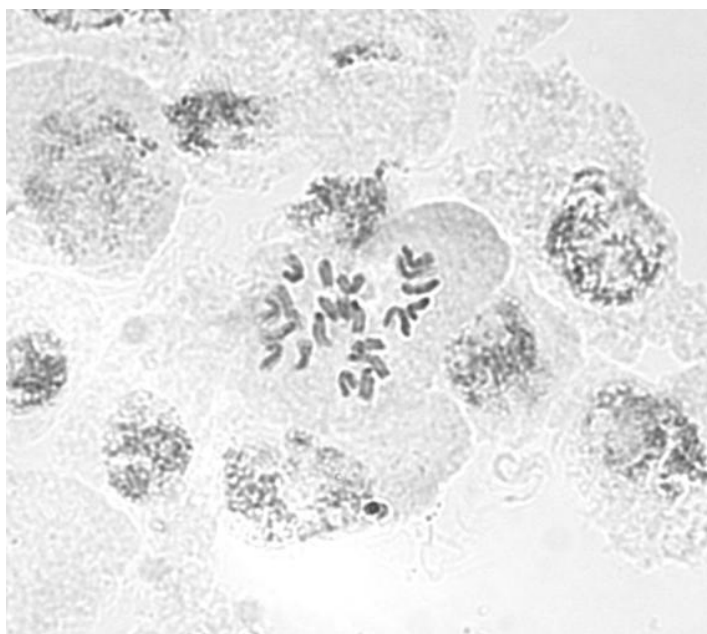
Slika 6: Pri genotipu '13' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 30 kromosomov



Slika 7: Pri genotipu '33' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov

4.2.2 Rezultati metode štetja kromosomov pri domnevnih aneuploidih

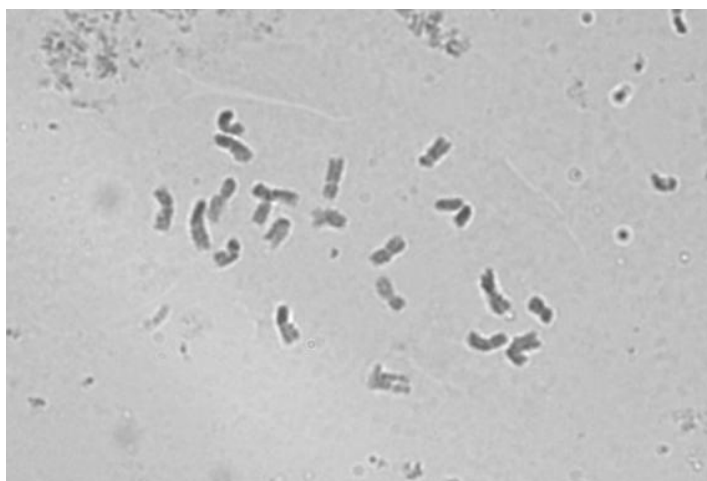
Pri 6-ih rastlinah, ki so imele abnormalno količino DNK in smo domnevali, da imajo le te aneuploidno število, smo z metodo štetja kromosomov v metafaznih jedrih potrdili aneuploidnost za 2 rastlini. Pri genotipih '16' (slika 8 in slika 9) in '35' (slika 10) smo namreč prešteli 21 kromosomov ($2n + 1 = 21$). Genotipi '15' (slika 11), '20' (slika 12), '25' (slika 13) in '34' (slika 14) pa niso aneuploidi, ampak diploidi, saj smo pri njih prešteli 20 kromosomov ($2n = 20$) (preglednica 7).



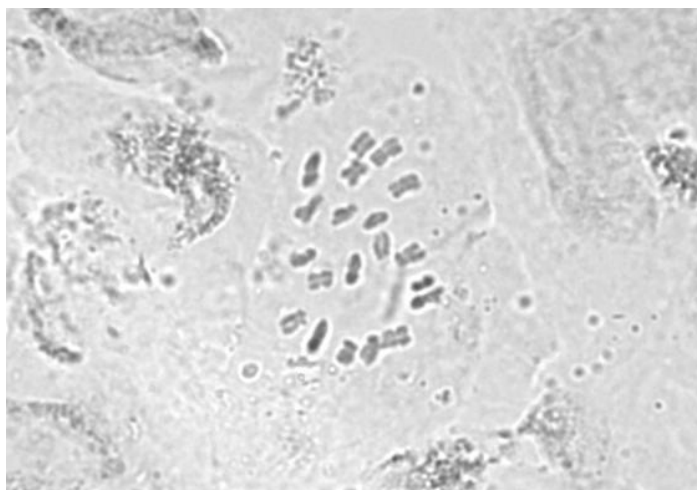
Slika 8: Pri genotipu '16' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 21 kromosomov



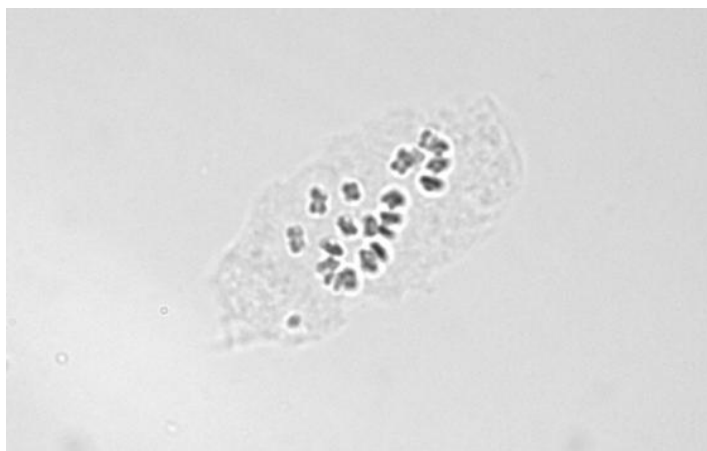
Slika 9: Kariotip genotipa '16' izdelan s programskim paketom Lucia



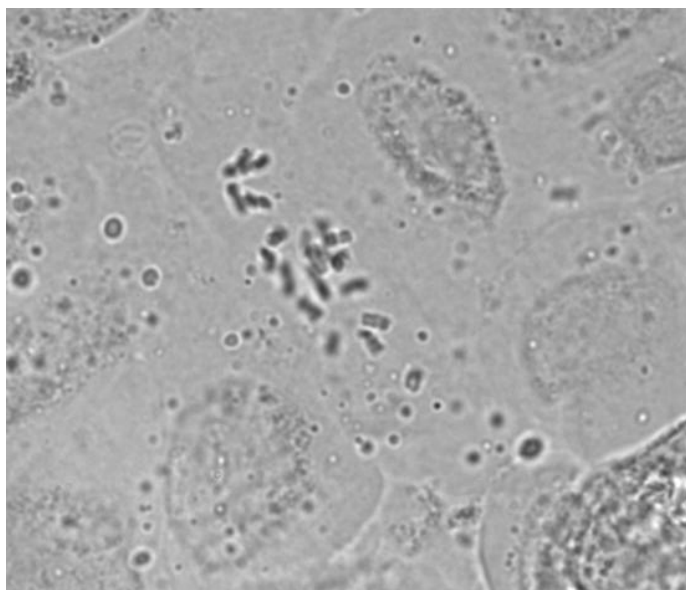
Slika 10: Pri genotipu '35' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 21 kromosomov



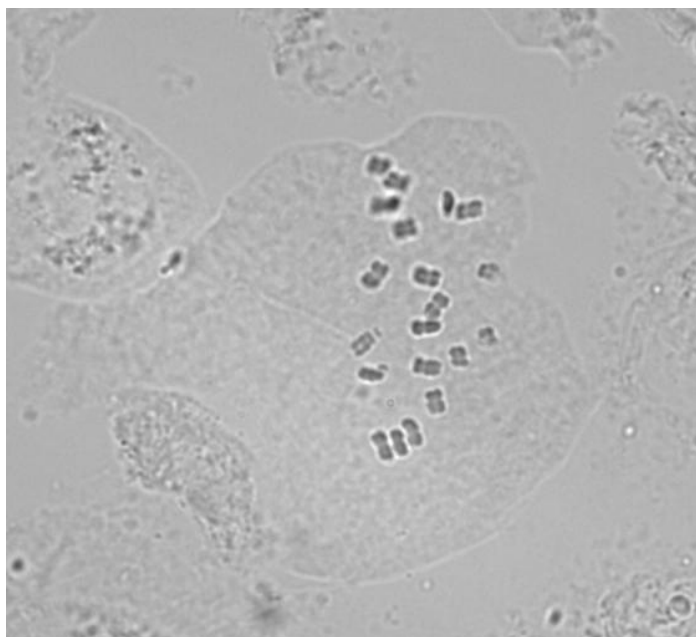
Slika 11: Pri genotipu '15' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov



Slika 12: Pri genotipu '20' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov



Slika 13: Pri genotipu '25' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov



Slika 14: Pri genotipu '34' smo pri povečavi $\times 100$ prešteli 20 kromosomov

Preglednica 7: Rezultati metode pretočne citometrije in metode štetja kromosomov

Št. vzorca (enaka kot pri poskusu leta 2009)	Vrsta in sadilno mesto (na polju)	Družina križanja	Ploidnost 2009/2010	nabiranje poganjkov 11.5.2010	Število kromosomov	št. 1,5 ml centrifugirk v našem poskusu	št. 1,5 ml centrifugirk v poskusu leta 2009
1	50/196	279D112 X 01J 3/70	3n	DA		1	
3	51/182	285/75 X 19058	3n	DA	30	3	
4	57/62	272/138 X M2/1	2n	DA			
5	58/54	279/120 X 00O 8/169	2n	DA			
6	58/55	279/120 x 00O 8/169	3n	DA			
7	67/193	271/75 X MM	2n	DA			
8	71/70	MERKUR PROSTO	3n	DA			
9	71/158	MERKUR X SH2	3n	DA		1	
10	152/90	279/73 x 302/1	3n	DA		1	
12	161/100	279/73 x 295/61	3n	DA	30	1	
13	160/80	285/79 x 5v/38	3n	DA	30	5	
14	160/95	285/79 x 5v/38	3n	DA		2	
15	158/51	Taurus x 21436	2n+1?	DA	20	4	5
16	158/68	Taurus x 21436	2n+1?	DA	21	6	17
17	159/24	31/87 prosto	3n	DA		4	
19	131/59	WT x 2/1	2n	DA			
20	131/73	WT x 2/1	2n+1?	DA	20	3	4
21	131/74	WT x 2/1	2n	DA		1	
22	131/85	WT x 2/1	2n	DA	20	2	
23	131/107	WT x 2/1	2n	DA		1	
25	131/123	WT x 2/1	2n+1?	DA	20	4	
26	131/129	WT x 2/1	2n	DA			
27	132/1	WT x 2/1	2n	DA	20	6	7
28	132/10	WT x 2/1	2n	DA			
29	132/13	WT x 2/1	2n	DA			
30	132/23	WT x 2/1	2n	DA			
31	132/24	WT x 2/1	2n	DA			
32	132/39	WT x 2/1	2n	DA		1	
33	132/45	WT x 2/1	2n	DA	20	2	
34	132/71	WT x 2/1	2n+1?	DA	20	4	
35	132/74	WT x 2/1	2n+1?	DA	21	6	2
36	132/80	WT x 2/1	2n	DA			
39	132/73	WT x 2/1	2n	DA			
40	132/79	WT x 2/1	3n	DA			
41	131/76	WT x 2/1	2n	DA			
42	131/94	WT x 2/1	3n	DA		1	
43	131/98	WT x 2/1	3n	DA		2	
44	131/113	WT x 2/1	3n	DA			
45	131/115	WT x 2/1	2n	DA			
46	147/115	20/58 x OP	3n	DA	30	1	
47	161/55	279/73 X 295/61	3n	DA	30	3	
49	174/33	20/115 X 302/1	3n	DA			
50	174/34	20/115 X 302/1	3n	DA			
51	174/37	20/115 X 302/1	3n	DA			
52	174/45	20/115 X 302/1	3n	DA	30	5	
53	174/49	20/115 X 274/124	3n	DA			
54	188/156	31/87 PROSTO	2n	DA		2	
55	194/259	17/72 X 272/93	2n	DA	20	2	
56	190/21	DANA PROSTO	2n	DA	20	1	
57	192/94	DANA X 306/52	2n	DA		2	
59	186/237	35/158 X 20/108	3n	DA			
60	187/95	301/11 X 5V/38	2n	DA			
61	189/23	285/79 X 19/136	2n	DA			
62	191/53	275/24 X 306/104	2n	NE			
63	275/24 X 306/104	275/24 X 306/104	2n	NE			
64	191/164	276/163 X 5V/38	2n	NE			
65	SG		2n	DA	20	1	2
66	WT		2n	DA	20	3	
67	CEL		3n	DA	30	5	

SG = 'Savinjski golding'; WT = 'Wye Target'; CEL = 'Celeia'

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Pretočna citometrija se je za določitev velikosti jedrnega genoma, v primerjavi s štetjem kromosomov, izkazala kot zelo učinkovita, hitra in zanesljiva metoda. Omogoča lažjo pripravo preparatov, ne potrebuje delitve celic v določeni fazi in ker potrebuje le nekaj mg tkiva, ne uničuje rastlin oz. je neinvazivna metoda. Določitev ploidnosti s štetjem kromosomov pa je pogosto zelo težko izvesti. Postopek zahteva veliko dela in časa, da bi lahko z zanesljivostjo ugotovili dejansko število kromosomov. V nasprotnem primeru je verjetnost napake velika (Šesek in sod., 2000; Šesek, 2002).

Naše predvidevanje, da bomo uspešno izmerili velikost genoma hermafroditnih rastlin hmelja s pomočjo metode pretočne citometrije, se je izkazalo za pravilno. Vsem 56 hermafroditnim rastlinam (40 rastlinam iz poskusa 2009 in 16 rastlinam v našem poskusu) in 3 dvodomnim rastlinam smo z metodo pretočne citometrije uspešno izmerili velikost jedrnega genoma. Delni rezultati, ki so jih pridobili v laboratoriju leta 2009, so pokazali, da bi lahko hermafroditne rastline bile aneuploidi. Šest hermafroditnih rastlin je namreč kazalo na abnormalno količino DNK.

Metoda pretočne citometrije je pokazala, da je 39,3 % enodomnih rastlin triploidnih, od katerih so bile vse Mf fenotipa (pretežno moški fenotip z nekaj ženskimi cvetovi). Diploidne enodomne rastline so Fm (pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi), FM (50 % ženski fenotip, 50 % moški fenotip), FF (samo ženski fenotip) in MM (samo moški fenotip) fenotipa. Izkazalo se je, da rastline s FF (ženski) in MM (moški) fenotipom niso enodomne, ampak so dvodomne, ker na eni rastlini najdemo le ženske ali le moške cvetove.

Povprečne vsebnosti jedrne DNK so pri triploidnih rastlinah med 6.33 ± 0.06 pg (genotip '43') in 6.62 ± 0.05 pg (genotip '14'), torej približno za 1,5 krat večje kot pri diploidnih rastlinah (brez 6-ih domnevnih aneuploidov), pri katerih so povprečne vsebnosti jedrne DNK med 4.33 ± 0.04 pg (genotip '4') in 4.47 ± 0.04 pg (genotip '45'). Med vsemi diploidnimi rastlinami in domnevnimi aneuploidi je pri rastlini z MM fenotipom (genotip '4') najmanjša povprečna vsebnost jedrne DNK, znašala 4.33 ± 0.04 pg.

Pri 6-ih enodomnih rastlinah je metoda pretočne citometrije pokazala abnormalno količino DNK. To so bili genotipi '15', '34', '35', '25', '20' in '16'. Njihove povprečne vsebnosti jedrne DNK so med 4.49 ± 0.05 pg (genotip '15') in 4.57 ± 0.03 pg (genotip '16'), kar pomeni, da so njihove povprečne vsebnosti jedrne DNK bistveno večje kot pri vseh diploidnih rastlinah. Zaradi tega smo domnevali, da so te rastline lahko aneuploidi s povečanim številom kromosomov. Med vsemi diploidnimi rastlinami in domnevnimi aneuploidi je pri genotipu '16' (domnevni aneuploid) največja povprečna vsebnost jedrne DNK, znašala 4.57 ± 0.03 pg. 5 domnevnih aneuploidov je Fm fenotip (pretežno ženski

fenotip z nekaj moškimi cvetovi), ena rastlina pa je FF fenotip (samo ženski fenotip). Torej ta rastlina ni enodomna, ampak dvodomna.

Naše predvidevanje, da bomo uspešno prešteli število kromosomov izbranih hermafroditnih rastlin hmelja s pomočjo klasične mikroskopske tehnike, pa se je izkazalo za napačno. Metodo štetja kromosomov v metafaznih jedrih smo lahko uporabili le pri 32 od 59 rastlin, saj so se poganki le pri teh rastlinah ukoreninili in koreninice le-teh niso propadle. Pri 20 rastlinah pa smo s pomočjo klasične mikroskopske tehnike vseeno uspešno prešteli kromosome.

Če izvzamemo domnevne aneuploide, smo pri vseh ostalih, torej pri 14 od 20 rastlin, potrdili ploidnost, ki smo jo izmerili z metodo pretočne citometrije.

Pri 2 od 6 rastlin, pri katerih je metoda pretočne citometrije pokazala abnormalno količino DNK in smo zaradi tega domnevali, da so aneuploidi, smo potrdili aneuploidno število. Pri genotipih '16' (Fm fenotip (pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi)) in '35' (FF (ženski) fenotip) smo namreč prešteli 21 kromosomov ($2n + 1 = 21$). Pri genotipih '15', '20', '25' in '34', vsi so Fm fenotip (pretežno ženski fenotip z nekaj moškimi cvetovi), pa smo prešteli 20 kromosomov ($2n = 20$) in so zato diploidi in ne aneuploidi. Na podlagi tega smo zavrgli tezo o aneuploidiji kot edinem možnem vzroku hermafroditnosti hmeljnih rastlin.

Dobljene rezultate bomo lahko uporabili pri razjasnjevanju dedovanja spola pri hmelju. Ta raziskava je ena prvih, ki je poizkušala ovrednotiti hermafroditnost na podlagi nenormalnega števila kromosomov.

6 POVZETEK

Hmelj je dvodomna zelnata trajnica, ovijalka, ki kljub svoji dvodomnosti kaže tudi določeno stopnjo enodomnosti, vendar tudi tukaj lahko opazimo variabilnost fenotipa. Stopnjo dvodomnosti lahko razdelimo v več fenotipskih razredov. Variabilnost se delno kaže tudi med različnimi leti opazovanj. Gospodarsko pomembne so le ženske rastline. Večino pridelka – storžkov porabijo v pivovarstvu in v zdravilstvu. Hmeljarstvo ima v Sloveniji, ki spada med večje svetovne pridelovalke hmelja, dolgoletno tradicijo. Skoraj tri četrtine hmeljišč je v Savinjski dolini. Večina doma pridelanega hmelja izvozijo, v glavnem na trg Evropske Unije.

Namen diplomske naloge je bil preučiti kariotip izbranih hermafroditnih rastlin s pomočjo štetja kromosomov in merjenja velikosti genoma z metodo pretočne citometrije. Uporabili smo 59 rastlin hmelja, ki so bile vzgojene v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Pri vsaki rastlini smo isto rastlino uporabili kot material za merjenje z metodo pretočne citometrije in za metodo štetja kromosomov. Uporabili smo 56 enodomnih rastlin, katere so kazale določeno stopnjo hermafroditnosti, 2 diploidni dvodomni rastlini (ženski rastlini sort 'Savinjski golding' in 'Wye Target') in 1 triploidno dvodomno rastlino (sorta 'Celeia', ženska rastlina). Pri pretočni citometriji smo za standard uporabili belo deteljo (*Trifolium repens* L.).

Vsem 56 hermafroditnim rastlinam in 3 dvodomnim rastlinam smo z metodo pretočne citometrije uspešno izmerili velikost jedrnega genoma. Delni rezultati, ki so jih pridobili v laboratoriju Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani leta 2009, so pokazali, da bi lahko hermafroditne rastline bile aneuploidi. Metodo štetja kromosomov smo lahko uporabili le pri 32 od 59 rastlin, saj so se poganjki le pri teh rastlinah ukoreninili in koreninice le-teh so bile dovolj razvite za nadaljnje analize. Pri 20-ih rastlinah pa smo uspešno prešteli kromosome. Če izvzamemo domnevne aneuploide, smo pri vseh ostalih, torej pri 14 od 20 rastlin, potrdili ploidnost, ki smo jo izmerili z metodo pretočne citometrije. Pri 2 od 6 domnevnih aneuploidov smo potrdili aneuploidno število kromosomov – obstoj dodatnega kromosoma. Na podlagi tega smo zavrgli tezo, da je samo aneuploidija glavni vzrok hermafroditnosti hmeljnih rastlin.

Pretočna citometrija se je za določitev velikosti jedrnega genoma, v primerjavi s štetjem kromosomov, izkazala kot zelo učinkovita, hitra in zanesljiva metoda. Določitev ploidnosti s štetjem kromosomov je bila pogosto zelo težka, saj je bil postopek zahteven in časovno zelo potraten.

7 VIRI

- Arumuganathan K., Earle E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208–218
- Baričević D. 1996. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. Ljubljana, samozaložba: 81 str.
- Bavdek S. 1988. Citologija z osnovami citogenetike za študente veterinarstva: Študijski pripomoček za interno uporabo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo: 271 str.
- Čeh Brežnik B., Brežnik M. 2003. Hmelj. *Kmetovalec*, 71, 7: 5-7
- Dermastia M. 2002. Študijsko leto 2002/2003. Biologija celice: Teze predavanj za študente prvega letnika Visoke strokovne šole za zdravstvo v Izoli: 99 str.
- Dvorec Trebnik. Hmelj.
<http://www.trebnik.com/?id=74> (18.jan. 2013)
- Ekomuzej hmeljarstva in pivovarstva Slovenije.
<http://www.ekomuzej-hmelj.si/> (10.jan. 2013)
- Friškovec I., Zmrzлак M., Knapič M. 2002. Zasnova novega nasada. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, IHPS: 137-150
- Grabowska-Joachimia A., Śliwińska E., Piguła M., Skomra U., Joachimia A. J. 2006. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc. (Cannabaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 75, 3: 207-214
- Haunold A. 1972. Polyploid breeding with hop *Humulus lupulus* L. *Technical Quarterly of Masters Brewers Association of America*, 9, 1: 36-40
- Humulus lupulus* – droga.
<http://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/humulus.htm> (7.jan. 2013)
- IHGC – International hop growers' convention. Economic commission – Summary reports.
<http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/IHGC%20hop%20supply.pdf> (14.maj 2013)
- Invitrogen. Flow cytometry.
http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html
(1.feb. 2013)
- Ivančič M. 2008. Uporaba laserjev v industriji. Seminar. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko, Oddelek za fiziko: 17 str.

- Jakše J., Štajner N., Kozjak P., Čerenak A., Javornik B. 2008. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 21: 139-148
- Jezernik K., Veranič P., Sterle M. 2012. Celična biologija: Učbenik za študente Medicinske fakultete. Ljubljana, DZS: 264 str.
- Karlov G.I., Danilova T.V., Horlemann C. Weber G. 2003. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica*, 132: 185-190
- Kocjan Ačko D. 1999. Hmelj. Naša žena, 3: 91-92
- Komel R. 2006. Genetika – od dvojne vijačnice do kloniranja: Učbenik za gimnazije in srednje tehniške šole. Ljubljana, Rokus: 127 str.
- Košir I. 1995. Kemizem in analitika hmelja. Hmeljarski bilten, 4: 73-83
- Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Malovrh T., Simčič S., Škoberne M., Wraber-Herzog B. 2001. Imunologija. Priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 75 str.
- Krajncič B. 1994. Botanika: razvojna in funkcionalna morfologija z anatomijo. Maribor, Visoka kmetijska šola: 402 str.
- Majer D., Virant M., Pavlovič M. 2002. Hmeljarstvo v svetu in pri nas. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, IHPS: 17-19
- Mastnak C. 1977. Citogenetske raziskave avtohtonega hmelja (*Humulus lupulus* L.) v Jugoslaviji. Diplomsko naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Biološki oddelek: 52 str.
- MKO – Ministrstvo za kmetijstvo in okolje. Hmelj.
http://www.mko.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/hmelj/ (10.jan. 2013)
- Pet letni program razvoja 2012 – 2016. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Žalec, IHPS: 41 str.
http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Kmetijstvo/Program_IHPS_koncna.pdf (12.jan. 2013)
- Natural history museum. Hops.
<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/life/plants-fungi/seeds-of-trade/print.dsml?ref=hops> (13.maj 2013)

Onkološki inštitut Ljubljana. Pretočna citometrija.

<http://www.onko->

[si.si/dejavnosti/zdravstvena_dejavnost/oddelek_za_citopatologijo/#c242](http://www.onko-si.si/dejavnosti/zdravstvena_dejavnost/oddelek_za_citopatologijo/#c242) (31.jan. 2013)

Otto F. 1988. High resolution DNA-flow cytometry using DAPI. Partec, protocol 1. Partec, Münster, Arlesheim: 6 str.

Rode J., Zmrzlak M., Kovačevič M. 2002. Hmeljna rastlina. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, IHPS: 21-30

Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko: Za študente visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – agronomija in hortikultura. Ljubljana, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete: 176 str.

Small E. 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho–geographic taxa of *Humulus*. Systematic Botany, 3: 37-76

Strgar J. 2002. Biologija. Tržič, Učila International: 489 str.

Stušek P., Podobnik A., Gogala N. 2001. Biologija 1 - Celica. Ljubljana, DZS: 122 str.

SURS – Statistični urad Republike Slovenije. Pridelava poljščin.

http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502402S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2 (12.jan. 2013)

Šesek P., Šuštar-Vozlič J., Bohanec B. 2000. Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 439:16-18

Šesek P. 2002. Proučevanje kromosomske organizacije in medvrstne sorodnosti pri izbranih kmetijskih rastlinah z uporabo metod fluorescenčne in situ hibridizacije in pretočne citometrije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 84 str.

Škof S., Čerenak A., Jakše J., Bohanec B., Javornik B. 2010. Sex expression and ploidy in monoecious hop plants. V: Knjiga povzetkov. 5. slovenski simpozij o rastlinski biologiji z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 6-9 sept. 2010. Dolenc Koce J., Vodnik D., Pongrac P. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za biologijo rastlin: 59

Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. 2002. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, IHPS: 31-49

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Jerneju Jaksetu, najlepša hvala za vso strokovno pomoč in za vse nasvete pri nastajanju mojega diplomskega dela.

Največja zahvala pa gre vama, mama in ata, ki mi vedno znova vlivata voljo in pogum za nove izzive. Hvala vama, ker verjameta vame, me podpirata in mi vedno stojita ob strani.

Hvala tudi tebi Jurij za vso potrpežljivost in podporo, s katero si mi dajal novih moči za nadaljnje delo.

Hvala sestrama Maji in Darji za vso spodbudo, s katero sta mi vedno znova naredile probleme lažje.

Iskrena hvala tudi doc. dr. Andreji Čerenak, prof. dr. Borutu Bohancu, prof. dr. Marijani Jakše, Ani, Tanji, Tinetu, pa tudi vsem ostalim, ki ste prispevali dragocen delež k nastanku tega diplomskega dela.