

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tine POKORN

**GENOTIPIZACIJA KULTIVARJEV HMELJA
(*Humulus lupulus L.*) S FLUORESCENTNIMI
MIKROSATELITNIMI MARKERJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tine POKORN

**GENOTIPIZACIJA KULTIVARJEV HMELJA
(*Humulus lupulus L.*) S FLUORESCENTNIMI
MIKROSATELITNIMI MARKERJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**HOP CULTIVARS (*Humulus lupulus L.*) FINGERPRINTING
WITH A FLUORESCENT LABELLED
MICROSATELLITE MARKERS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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 03.06.2010 za mentorja diplomskega dela potrdila doc. dr. Jerneja JAKŠETA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica: doc. dr. Darja KOCJAN AČKO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 20.06.2011

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

Tine POKORN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 631.791:631.526.32:575.822(043.2)
KG	rastlinska genetika/hmelj/sorte/mikrosatelitni markerji/humulus lupulus/mikrosateliti
KK	AGRIS F30
AV	POKORN, Tine
SA	JAKŠE, Jernej (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2011
IN	GENOTIPIZACIJA KULTIVARJEV HMELJA (<i>Humulus lupulus L.</i>) S FLUORESCENTNIMI MIKROSATELITNIMI MARKERJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 39 str., 6 pregl., 6 sl., 10 pril., 67 vir.
IJ	sl
JI	sl/ en
AI	Hmelj (<i>Humulus lupulus L.</i>) spada med konopljeve (Cannabaceae) in je dvodomna rastlina, njen gencenter je Kitajska. Gospodarsko pomembna je le ženska rastlina. Za genotipizacijo hmelja smo uporabili mikrosatelitne markerje. To so ponavljajoča zaporedja DNA, katerih motivi so dolgi od 2 do 8 bp. Večina analiziranih vzorcev sort je bila nabранa v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu, nekatere druge pa smo dobili preko mednarodnih kontaktov. Iz nabranih vzorcev rastline smo izolirali DNA, koncentracijo pa smo izmerili s pomočjo fluorometra. Mikrosatelitne lokuse smo predhodno testirali s PCR, kar nam je omogočilo, da smo izbrali optimalne lokuse. Statistična obdelava je potekala s pomočjo različnih statističnih programov, s katerimi smo določili: število alelov na lokus, število homozigotnih in heterozigotnih sort, genotipsko specifične alele ter druge statistične vrednosti za lokuse. Lokus HlGA27 je bil najbolj polimorfen z največ aleli, najmanj alelov pa ima lokus EMHL022. Določili smo tudi 30 specifičnih alelov pri 16 lokusih, s pomočjo katerih lahko takoj ločimo 17 različnih sort. V analizo je bilo vključenih tudi 14 triploidnih sort. Določili smo 54 sort, ki v parnih primerjavah med seboj ne kažejo nobenega razlikovanja med aleli. S pomočjo rezultatov genotipizacije smo pokazali, da lahko ločimo 107 genotipov hmelja s pomočjo le šestih lokusov, ostalih sort med seboj ne moremo ločiti. Določili smo tudi dva lokusa, s pomočjo katerih lahko med seboj ločimo vseh 13 slovenskih sort. Ta lokusa sta Ho0163 in 5-2.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 631.791:631.526.32:575.822(043.2)
CX	plant genetics/microsatellite markers/microsatellites/hops/humulus lupulus/cultivars/genotyping
CC	AGRIS F30
AU	POKORN, Tine
AA	JAKŠE, Jernej (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY	2011
TI	HOP CULTIVARS (<i>Humulus lupulus</i> L.) FINGERPRINTING WITH A FLUORESCENT LABELLED MICROsatellite MARKERS
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	IX, 39 p., 6 tab., 6 fig., 10 ann., 67 ref.
LA	sl
AL	sl/ en
AB	<p>Hop (<i>Humulus lupulus</i> L.) is a dioecious member of the Cannabaceae family. Its centre of origin is China. In terms of economy, only the female plants are important. In order to perform the fingerprinting of common hop, microsatellite markers were used. Microsatellite markers are short repeating sequences of DNA, with a core motif length of 2-8 bp. The majority of analyzed hop cultivars were collected in the hop orchard of the Slovenian Institute for Hop Research and Brewing in Žalec, whereas some other samples were obtained through international contacts. DNA was isolated from the collected plant samples and concentration was measured with the aid of fluorometry. Microsatellites were tested preliminary in PCR and this enabled us to choose the most optimal ones. Various statistical programmes carried out a statistical assessment of the genotypic data, enabling us to determine a number of alleles per locus, a number of homozygous and heterozygous species, genotypic specific alleles and other statistic values for loci. Locus HIGA27 was the most polymorphic with the greatest number of alleles, whereas EMHL022 had the smallest number of alleles. We also determined 30 specific alleles at 16 loci, enabling us to distinguish 17 different cultivars immediately. Fourteen triploid species were also included in the analysis. We determined 54 genotypes, whereby no differentiation between the alleles could be noticed in pair comparison. There were 216 such comparisons. Results showed that 107 genotypes of hop could be distinguished with the help of only six loci. We also determined two loci with which it was possible to distinguish all 13 analyzed Slovenian hop cultivars. These loci are Ho0163 and 5-2.</p>

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 NAMEN NALOGE	3
3 PREGLED OBJAV	4
3.1 TAKSONOMIJA	4
3.2 ZNAČIINOSTI HMELJA	5
3.3 KEMIJSKA SESTAVA HMELJNIH STORŽKOV	5
3.4 MIKROSATELITI	6
3.4.1 Značilnosti mikrosatelitov	6
3.4.2 Ničti aleli, uporabnost, prednosti in slabosti mikrosatelitov	7
3.4.3 Uporabnost mikrosatelitov za razlikovanje sort pri drugih rastlinskih vrstah	7
3.5 IDENTIFIKACIJA	8
3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	9
3.7 ZAČETNI OLIGONUKLEOTID M13 (-21)	10
4 MATERIAL IN METODE	12
4.1 RASTLINSKI MATERIAL	12
4.2 IZOLACIJA DNA IZ RASTLINSKEGA TKIVA	12
4.3 MERJENJE KONCETRACIJE DNA S FLUOROMETROM	12
4.4 IZBOR MIKROSATELITNIH LOKUSOV	13
4.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	13
4.5.1 Fluorescentni začetni oligonukleotid tailM13 (-21)	15
4.6 ANALIZA POMNOŽENIH VZORCEV	17
4.6.1 Priprava vzorcev za nanos na kapilarno elektroforezo	17
4.6.2 Elektroforeza vzorcev	17
4.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	18
5 REZULTATI	20
5.1 ANALIZA POSAMEZNIH LOKUSOV	21
5.2 TRIPLOIDNE SORTE	26

5.3	TRETJI AEL PRI DIPLOIDNIH SORTAH	26
5.4	PARNE PRIMERJAVE AELNIH RAZLIK	27
5.5	IDENTIFIKACIJA SORT HMELJA	28
5.6	IDENTIFIKACIJA SLOVENSKIH SORT HMELJA	28
6	RAZPRAVA IN SKLEPI	30
7	POVZETEK	33
8	VIRI	34
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prednosti in slabosti mikrosatelitnih markerjev (Schlötterer, 2004)	7
Preglednica 2: Prikaz potrebnih reagentov ter njihovi volumni na vzorec	14
Preglednica 3: Spektralni podatki za navedena barvila	16
Preglednica 4: Statistični podatki za posamezen lokus, predstavljene so vrednosti za število alelov (k), število obravnavanih sort (N), razpon alelov (min – max v bp), dejanska heterozigotnost (H_0), pričakovana heterozigotnost (H_e), verjetnostjo enakosti genotipov (PI), informacijska vrednost polimorfizma (PIC) in frekvenca ničtih alelov	21
Preglednica 5: Število parnih primerjav pri razlikovanju za 0 alelov, 1 alel, 38 alelov, 39 alelov in 40 alelov	27
Preglednica 6: Sistem ločevanja slovenskih sort hmelja	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz uporabe fluorescentnih začetnih oligonukleotidov z M13 (-21) sekvenco v PCR: A in B predstavlja lokusno specifičen začetni oligonukleotid, A ima pripeto M13 (-21) sekvenco. C je začetni oligonukleotid s fluorescentno nalepko 6FAM z enakim zaporedjem, kot ga ima M13 (-21). D v prvi PCR reakciji se začetni oligonukleotid M13 (-21) s sekvenco vgradi v PCR produkt. E produkti, nastali pri D, so matrica za fluorescentni začetni oligonukleotid (v našem primeru smo uporabili štiri barve: 6FAM, VIC, NED in PET). F končni produkt s fluorescentno nalepko se detektira s pomočjo kapilarne elektroforeze (Schuelke, 2000).	11
Slika 2: Emisijski spektri petih barvil, ki jih uporabljam pri genotipizaciji mikrosatelitnih lokusov hmelja, peto oranžno barvilo LIZ je namenjeno molekularnemu standardu (Applied Biosystems ..., 2010)	16
Slika 3: Standard LIZ 600 s fragmenti od 20 do 600 bp (številke nad vrhovi predstavljajo dolžino v bp)	20
Slika 4: Prikaz štirih lokusov z označenih z različnimi fluorescentnimi barvili (modra – 6FAM, zelena – VIC, črna – NED, rdeča – PET in oranžna - LIZ), 6FAM je lokus HIGT17, VIC GA4-P11-9, NED HIGA27, PET GA7-A6-14, prikazan je polimorfizem sorte ‘Agnus’. Genotipi 6FAM: 205: 179, VIC: 223: 219 NED: 237: 237 PET: 195: 185	20
Slika 5: Histogramska porazdelitev parnih primerjav	27
Slika 6: Prikaz razlikovanja števila genotipov glede na število lokusov	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Alel	alternativna oblika gena oz. DNA zaporedja na določenem mestu v kromosomu
CTAB	cetil trimetil-amonijev bromid
dATP	deoksiriboadenozin trifosfat
dCTP	deoksiribocitidin trifosfat
dGTP	deoksiribogvanozin trifosfat
dTTP	deoksiribotimidin trifosfat
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
Genetski markerji	značilni deli DNA, katerih dedovanje lahko sledimo
Lokus	mestomarkerja v molekuli DNA
MgCl ₂	magnezijev klorid
NaAc	natrijev acetat
NaCl	natrijev klorid
PCR	(ang. the polymerase chain reaction) verižna reakcija s polimerazo
Primer 1	začetni oligonukleotid
Primer 2	začetni oligonukleotid
Primer TAIL	začetni oligonukleotid z zaporedjem M13 (-21)
SSR	(ang. Simple Sequence Repeats), drugo ime za mikrosatelitni marker
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	tris hidroksimetil aminometan

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) naj bi se v Sloveniji pojavil že v 12. stoletju, začetki sodobnega hmeljarstva v Savinjski dolini pa segajo v drugo polovico 19. stoletja, ko je prvi hmeljski nasad zasadil Janez Hausenbichler (Cukala, 1965). Leto 1886 se šteje za začetek pridelave ‘Savinjskega goldinga’. Hmeljarstvo se je postopoma širilo in leta 1902 sta bili ustanovljeni Hmeljarna, ki je skrbela za prodajo hmelja in oznamkovalnica za hmelj (Kač, 1951).

Takojo po drugi svetovni vojni je bila ustanovljena hmeljarska zadruga ‘Hmezad’, ki je poskrbela za obnovo zemljišč in prodajo hmelja. Od leta 1961 do 1964 je Kmetijski kombinat Žalec združil agrokomplekse in jih zasadil s hmeljem. Leta 1970 so bile potrjene prve štiri slovenske sorte: ‘Ahil’, ‘Apolon’, ‘Atlas’, ‘Aurora’, leta 1980 tri nove: ‘Blisk’, ‘Bobek’ ter ‘Buket’. V letu 1990 pa so bili priznane še zadnje štiri triploidne sorte, serije ‘C’: ‘Cicero’, ‘Cekin’, ‘Celeia’ in ‘Cerera’. Poleg vseh naštetih je v sortno listo vpisana avtohtonata sorte ‘Savinjski golding’, od leta 2009 pa tudi ‘Dana’ (Pol stoletja hrama ..., 2002). Od vseh omenjenih sort je najbolj razširjena ‘Aurora’, sledijo ji ‘Celeia’ in ‘Bobek’ ter ‘Savinjski golding’. Slovenija spada danes med večje svetovne pridelovalke hmelja in pridela približno 2-3 % svetovnega pridelka hmelja. V letu 2001 je bilo pri Hmeljni komisiji vpisano 201 hmeljarsko posestvo in 2.058 ha hmeljskih nasadov, v letu 2010 pa le še 1.488 ha (Statistični urad RS, 2011). Največji pridelovalki hmelja na svetu sta Nemčija in ZDA. Po statističnih podatkih Food and Agricultural Organization (FAO STAT, 2011) iz leta 2008 je Nemčija pridelala za 39.700 metričnih ton (MT) hmelja na 8.193 ha zemljišč, ZDA pa 36.573 MT na površini 16.551 ha. Površina za pridelovanje hmelja se je leta 2008 povečala v obeh državah, v Nemčiji za 809 ha, v ZDA za 3.440 ha.

Skoraj tri četrtine hmeljskih nasadov je v Savinjski dolini, ostalo pa še na ormoško-ptujskem območju, v Račah pri Mariboru, Brežicah, Slovenj Gradcu, Radljah ob Dravi, Kozjem in Bistrici ob Sotli. Nasadi so pretežno zasajeni s slovenskimi sortami, vzgojenimi na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu (Pol stoletja hrama ..., 2002). Ker je hmeljarstvo kapitalsko in delovno ena izmed najintenzivnejših kmetijskih panog, je njen razvoj odvisen od uspešnega raziskovalno-razvojnega dela. Tega so se slovenski hmeljarji prav dobro zavedali in po drugi svetovni vojni je nazadnje dozorela zamisel o ustanovitvi samostojne raziskovalne organizacije, ki bi se posvetila predvsem raziskavam na področju žlahtnjenja hmelja, varstva hmelja pred boleznimi in škodljivci ter razvoju tehnologij pridelave hmelja (Pol stoletja hrama ..., 2002).

Prvega avgusta 1952 je Okrajna zadržna zveza v Celju uradno ustanovila Inštitut za hmeljarstvo, ki se danes imenuje Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

Hmelj se največ uporablja v proizvodnji piva. V pivo naj bi ga prvi dodali Nemci v 12. stoletju. Deluje kot bakteriostatik, kar je v tistem času omogočalo večjo obstojnost in transport na daljše razdalje. Pivovarstvo v Sloveniji ima že dolgo tradicijo, saj ohranjeni

dokumenti pričajo o tem, da naj bi varili pivo že v 13. stoletju. Ob koncu 19. stoletja so se obrtne in rokodelske pivovarne hitro širile po Slovenskem in največje med njimi so zvarile tudi do 3.000 hl piva. Po drugi svetovni vojni so v Sloveniji proizvajale pivo ljubljanska Pivovarna Union, Pivovarna Laško in Tovarna kisa, likerjev in sadnih sokov, zdajšnja Talis v Mariboru (Repe, 1993, cit. po pivovarstvo v Sloveniji ..., 2003).

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvodomna vzpenjajoča se trajnica, ki je močno heterozigotna. Gospodarsko pomembna je le ženska rastlina. Socvetje se oblikuje v navideznem klasu, ki se razvije v storžek. Hmeljni pridelek so neosemenjeni storžki. Žleze v storžkih proizvajajo alfa in beta kisline ter eterična olja. Osnovno število kromosomov pri hmelju je 10. Povečanje števila kromosomov iz 2x na 3x je v žlahtnjenju namenjeno pridobivanju sort z večjim pridelkom (Haunold in Zimmermann, 1972). V ZDA z uspehom izkoriščajo tudi triploidne moške rastline za opravljene diploidnih ženskih. S tem pospešijo rast in težo storžkov, ki so le delno osemenjeni (Haunold, 1974). V Angliji s pridobljenimi triploidnimi sortami niso zadovoljni. Imajo prevelike in prerahole storžke ter predolgo vegetacijo. Boljše rezultate so dosegli z diploidnim križanjem (Neve, 1978, cit. po NGCR Corvalis, 2000). Z uvajanjem ameriške dednine v procese žlahtnjenja so nastale v Evropi rodovitnejše diploidne sorte z velikim odstotkom alfa kislin, ki so dobro prilagojene strojnemu obiranju.

Podobne rezultate žlahtnjenja imamo tudi v Sloveniji. Pri vzgoji triploidov pa so ugotovili zanimive spremembe lastnosti. Triploidne rastline so bujnejše in adaptivnejše od diploidnega autotetraploidnega starša. Zaradi strojne obdelave je v hmeljiščih vedno več praznih mest in posledica tega so slabši pridelki (Kralj, 1987).

Sorte se med seboj razlikujejo po morfoloških lastnostih, vsebnosti kemijskih snovi kot tudi po agronomskih lastnostih. Sorte, ki imajo višjo vsebnost beta kislin, dajo pivu grenak okus, nekatere sorte se uporablajo tudi v druge namene (priprava raznih krem, čajev itd.).

Mikrosateli, znani tudi kot SSR (ang. simple sequence repeats), so odseki DNA, ki vsebujejo enostavne motive, dolge od 2 do 8 bp, ki se tandemsko ponavljajo. Motivi so lahko npr. dinukleotidni (AT)_n, trinukleotidni (ATT)_n ali tetranukleotidni (ACTC)_n. Visoka stopnja mutacij teh regij omogoča, da so mikrosateli zelo variabilni del genoma, kar izkoriščamo pri aplikacijah molekulskih markerjev. Mutacije teh lokusov največkrat nastanejo pri podvajanju DNA. Uporablja se jih v številnih študijah ekologije, genetskih raziskavah ter pri forenzičnih preiskavah.

2 NAMEN NALOGE

Identifikacija sort hmelja je še posebej pomembna za raziskovalce, pridelovalce, žlahtnitelje kot tudi za potrošnike. Namen pričajoče diplomske naloge je bil sledeč:

- 1) Pregled in izbira najbolj zanesljivih mikrosatelitnih markerjev iz seta 58 znanih lokusov.
- 2) Uporaba najboljših markerjev za identifikacijo svetovne zbirke sort hmelja.
- 3) Statistična obdelava dobljenih polimorfizmov in izbira najprimernejšega kompleta lokusov za identifikacijo.

Za diplomo smo izbrali 142 vzorcev sort hmelja od tega 13 slovenskih ter 129 svetovnih. Analizirali smo jih na 23 mikrosatelitnih lokusih.

3 PREGLED OBJAV

3.1 TAKSONOMIJA

Rod *Humulus* se je prvotno nahajal na severni polobli od 35° do 70° geografske širine, vključujuč Evropo, Azijo ter Severno Ameriko. Gencenter rodu *Humulus* je Kitajska, saj po sedanjih dognanjih od tam izhajajo vse tri vrste: *Humulus yunnanensis*, *Humulus japonicus* ter *Humulus lupulus*.

V družino konopljevk (Cannabaceae) spadata dva rodova, rod *Humulus* ter rod *Cannabis*. Leta 1964 je Burgess dognal, da rod *Humulus* sestavlja dve vrsti, *Humulus lupulus* in *Humulus japonicus*. Vendar je leta 1978 Ernest Small s preučevanjem herbarijskih primerkov ugotovil, da ima rod *Humulus* še tretjo vrsto *Humulus yunnanensis*, ki je bila pred tem pogosto zamenjana za *Humulus lupulus*. Le nekaj primerkov *H. yunnanensis* je dosegljivih in le malo poročil lahko zasledimo v literaturi. Uspeval naj bi na visoki nadmorski višini kitajske province Yunnan (NGCR Corvalis, 2000).

Vrste *H. japonicus* najdemo na Japonskem, Tajvanu in Kitajskem. Vrsta je dobro adaptirana na različne geografske lokacije, kar je posledica vztrajne rasti ter trpežnih in dobro letečih semen. Vrsti *H. lupulus* in *H. yunnanensis* sta bolj omejeni pri prilagajanju zaradi manj trpežnih semen, ki omejujejo razširjanje v različnih geografskih lokacijah, vendar pa imata boljše reprodukcijske značilnosti kot na primer rizomi.

Pri vrsti *Humulus lupulus* razlikujemo pet taksonomskih varietet glede na geografsko razširjenost: *H. lupulus* var. *lupulus* je evropski divji hmelj, *H. lupulus* var. *cordifolius* je japonski divji hmelj in tri varietete, ki jih najdemo na ameriškem srednjem zahodu *H. lupulus* var. *neomexicanus* na zahodnem delu severne Amerike, *H. lupulus* var. *pubescens* na vzhodnem delu Severne Amerike in *H. lupulus* var. *lupuloides* na vzhodnem delu Severne Amerike ter Kanade (Small, 1978). Medsebojna križanja vseh varietet so možna in dajo plodnega potomca (Neve, 1991).

Vse sorte hmelja izhajajo iz rodu *Humulus lupulus*. Čeprav večina sort izhaja iz evropskih hmeljev, najdemo v nekaterih sortah tudi dednino, ki so jo vnesli iz severno ameriških vrst hmelja.

Hmelj je trajnica, ki vsako leto požene iz podzemnih rizomov. V naravi se razširja s pomočjo rizomov ali pa semen. V proizvodnji je moška rastlina nezaželena zaradi osemenjenih storžkov, vendar je za pridobivanje novih sort le-ta nujno potrebna (NGCR Corvalis, 2000).

Humulus yunnanensis je dvodomna trajnica. Vrsta se loči od vrste *H. lupulus* predvsem po togosti oprijemalnih trihomov, dlakovosti listne površine, razporeditvi trihomov in večjem cvetnem prahu. Poleg naštetih lastnosti nima nobene vrednosti pri pridelovanju piva (Small, 1978).

Humulus japonicus je dvodomna enoletna ovijalka. Ženska in moška rastlina se v številu kromosomov razlikujeta, ženska rastlina ima $2n=16$, moška pa en kromosom več $2n=17$ (Winge, 1929, cit. po NGCR Corvalis, 2000; Ono, 1955, cit. po NGCR Corvalis, 2000; Sinoto, 1929, cit. po NGCR Corvalis, 2000).

Humulus lupulus ima diploidno število kromosomov $2n=2x=20$. Tetraploidi so v naravi redki, umetno so pridobljeni s podvojitvijo diploidnega števila kromosomov. Tetraploide se uporablja pri križanju z diploidi, da dobimo sterilne triploide $2n=2x=30$. Triploidne rastline hitreje rasejo in se uporabljajo za pridobivanje brez semenskih rastlin. Poleg tega se triplodne moške v proizvodnji uporablja za spodbujanje rasti storžkov ter povečanje brez semenskega pridelka (NGCR Corvalis, 2000).

3.2 ZNAČILNOSTI HMELJA

Hmelj je dvodomna ovijalka z enospolnimi cvetovi, vendar občasno najdemo tudi enodomne rastline ali rastline, ki imajo dvospolne cvetove (Haunold, 1972). Moške in ženske rastline najlažje ločimo po generativnih organih, saj sta spola med seboj morfološko enaka. Ženski cvetovi so močni, poenostavljeni in ležijo pod krovnimi listi in prilsti, na katerih so lupulinske žleze, ki vsebujejo eterično olje in druge učinkovine. Skupaj sestavljajo socvetje ali hmeljev storžek. Moški cvetovi so neopazni, zelenkasto-beli in združeni v viseča klasasta socvetja. Rastlina je vetrocvetka. Iz močno razvite korenike s številnimi koreninami zraste dlakavo, ovijajoče se steblo. Na steblu so oprijemalni trihomni, s katerimi se okoli opore ovije v smeri urinega kazalca (Baričevič, 1996). Iz kolenc glavnega steba rastejo stranski poganjki. Listi imajo srčasto dno, so dlanasto deljeni, imajo izrazite mrežaste žile in trde dlačice na spodnji listni ploskvi. Pri gojenem hmelju pridelujejo le ženske rastline, saj je v neoplojenih dozorelih storžkih veliko več lupulinskih žlez. Najbolje uspeva v rahilih, dobro odcednih in dobro založenih tleh.

3.3 KEMIJSKA SESTAVA HMELJNIH STORŽKOV

Hmeljni storžki vsebujejo okoli 10 % vode, 11-21 % smol, 0,2-0,5 % hitro hlapljivih olj ter druge snovi. Smolna frakcija je sestavljena iz grenčin, mehkih in trdnih smol. Primarne spojine so grenčine, iz njih pa nastanejo z oksidacijo in kondenzacijo mehke in trdne smole. Smole sestavljajo alfa in beta kisline. Različne vrste hmelja se razlikujejo po zgradbi grenčin in obstojnosti le-teh med skladiščenjem. Po trditvah Fanga in Bellisa alfa in beta kisline nastajajo istočasno, drugače pa naj bi bilo pri belgijskih hmeljnih sortah. Količina kislin je odvisna od rastišča, klimatskih razmer in stopnje zrelosti. Alfa kisline izločajo lupulinske žleze, ki se razvijejo na dnu krovnih listov in prilstov (cit. po *Humulus lupulus – droga*, 2011). Vsebnost alfa kislin in pridelek neke sorte sta genetsko določena, vendar se iz leta v leto lahko spreminja. Vsebnost alfa kislin posredno tudi določa ekonomsko vrednost hmelja, saj alfa kisline dajejo pivu značilno aromo. Beta kisline so zaradi slabe topnosti pivovarsko nepomembne, se pa v zadnjem času izvajajo študije uporabe beta kislin kot možni konzervans živilskih krmil. Aromatične sorte vsebujejo do 7 % alfa kislin, taki sorte sta ‘Savinjski golding’, ‘Celeia’, nad 7 % alfa kislin imajo t.i.

grenčične sorte to sta ‘Aurora’ in ‘Bobek’, čeprav imata lahko tudi vsebnost alfa kislin nižjo od 7 % (cit. po Inbarco Slovenia, 2011).

Količina in sestava eteričnega olja sta odvisna od vrste hmelja. Hmelj naj bi po podatkih Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu vseboval med 0,43 % - 3,15 % eteričnega olja.

3.4 MIKROSATELITI

Pred uvedbo sodobnih genetskih analiz je prepoznavanje sort rastlin in preučevanje sorodnosti temeljilo na morfoloških znakih, ki so močno pod vplivom okoljskih dejavnikov. Morfološki znaki hmelja so npr. oblika in krpastost listov, barva trte, število zobcev, bujnosc rasti. Zaradi nezanesljivosti pri določevanju s pomočjo vidnih znakov, so se v zadnjem času razširile metode, ki so vezane na genetske analize. Molekularni markerji so postali razširjeno orodje za študij populacijske genetike, kot tudi za določevanja očetovstva in sorodstvenih odnosov. V zadnjem času se največ uporablja mikrosatelite oziroma SSR markerje (Sclötterer, 2004).

3.4.1 Značilnosti mikrosatelitov

Mikrosateliti so del satelitne DNA. Satelitna DNA je sestavljena iz tandemsko ponavljačih se zaporedij, ki so v številnih kopijah prisotna v genomu višjih organizmov. Razdelimo jo lahko v tri skupine, in sicer na satelite (enota ponovitve je zelo dolga - nekaj tisoč baznih parov), minisatelite (enota ponovitve daljša od 10 bp) in mikrosatelite (enota ponovitve dolga od 2-8 bp) (Armour in sod., 1999, cit. po Štajner, 2010). Najbolj pogost motiv v rastlinah je AT/TA sledi pa AG/CT tip ponovitve (Morgante in Olivieri, 1993). Mikrosatelite delimo na popolne (sestavljeni samo iz enega motiva osnovne ponovitve, ki se ponavlja brez prekinitev, npr.: ctctctctctctctctct), nepopolne (ena ali več ponovitev vsebuje bazo, ki ne odgovarja osnovnemu motivu ponovitve, npr.: ctctctctgtctct), prekinjene (vsebujejo krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve, npr.: ctctctctctggctctct) in sestavljenе (vključujejo dva ali več mikrosatelitov, ki pa se med seboj razlikujejo po tipu ali motivu ponovitve, npr.: ctctctctctgatgatgatgat) (Štajner, 2010). Izraz prikrita enostavnost označuje DNA zaporedja, ki vsebujejo več prekinjenih ponovljivih motivov, kot bi pričakovali iz frekvence štirih baz naključne razporejenosti (Jakše, 2003). Za mikrosatelite je znano, da je mutacijska stopnja med posameznimi lokusi različna (Di Rienzo in sod., 1998, cit. po Štajner, 2010). Mnogi raziskovalci na osnovi številnih raziskav predvidevajo, da mutacijska stopnja narašča s številom ponovitev (Weber in Wong, 1993, cit. po Štajner, 2010), vendar pa obstaja premalo dokazov, da bi lahko to dejstvo upoštevali kot dejanski faktor razvoja mikrosatelitov.

3.4.2 Ničti aleli, uporabnost, prednosti in slabosti mikrosatelitov

V obrobnih regijah mikrosatelitskih lokusov tudi pogosto nastajajo mutacije (Orti in sod., 1997, cit. po Štajner, 2010) in posledica tega je lahko nastanek ničnih alelov, to je alelov, ki se v PCR reakciji ne pomnožijo. To se lahko pojavi kadarkoli in je posledica nukleotidnih substitucij, insercij in delecij, ki nastanejo v obrobnih regijah, zaradi česar začetni oligonukleotidi ne prepoznajo mest prileganja. Rezultat takšnega procesa so ničti aleli (Callan in sod., 1993, cit. po Štajner, 2010), ki se lahko ustalijo v populaciji.

Mikrosateliti so bili prvi markerji, ki so lahko popolnoma izkoristili PCR tehniko (Litt in Luty, 1989, cit. po Schlötterer, 2004). Lastnosti mikrosatelitov so visoka stopnja polimorfnosti in dokaj enakomerna porazdelitev v genomu. Zaradi teh lastnosti so postali uporabno orodje za ugotavljanje sorodnosti, genskem mapiranju in v populacijski genetiki (Goldstein in Schlötterer, 1999). Uporaba mikrosatelitov se je razširila v rastlinsko in živalsko genetiko, uporabna pa je tudi v forenziki (Queller, 1993, cit. po Schlötterer, 2004). Prednost in slabosti so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Prednosti in slabosti mikrosatelitnih markerjev (Schlötterer, 2004)

PREDNOSTI	SLABOSTI
visoka stopnja polimorfizma	zdrs polimeraze pri PCR in nastanek „stutter“ alelov (<i>in vitro</i> mutacije)
kodominantnost	težaven in drag razvoj markerjev
enostavna uporaba	uporaba denaturacijske elektroforeze
robustnost pomnoževanja	višji stroški uporabe

Genotipizacija z dinukleotidnimi zaporedji je težavnejša kot z daljšimi motivi, saj je težje ločevati sosednje alele, hitreje pride do zdrsa polimeraze in nastanejo t. i. aleli zdrsa (stutter-ji). V razpravah lahko zasledimo, da so pri različnih laboratorijih prišli z uporabo enakih lokusov do drugačnih alelov, zato je potrebno natančno upoštevati predpisane protokole (Jakše in sod., 2002).

3.4.3 Uporabnost mikrosatelitov za razlikovanje sort pri drugih rastlinskih vrstah

V veliki meri mikrosatelitne markerje uporabljam pri rastlinah, ki so agronomsko in ekonomsko pomembne. V članku, ki je izšel leta 2009, so genotipizirali 21 sort oljke (*Olea europaea*). Namen študije je bil, da bi iz literature izločili najbolj zanesljive lokuse, ki bi najbolje razlikovali med različnimi sortami oljk, kot tudi primerljivost med laboratoriji. V ta namen so v literaturi poiskali in našli 77 lokusov, ki so jih nato preliminarno testirali, da bi določili najbolj zanesljive lokuse (Carriero in sod., 2002). Med testiranjem so 40 lokusov zavrgli, ostalih 37 pa uporabili za genotipizacijo. Analiza je potekala med štirimi neodvisnimi laboratoriji, vsak od njih pa je imel drugačno metodologijo dela. S tem so

ugotavljalci, ali so rezultati med seboj primerljivi tudi glede na različnega protokole dela. S pomočjo pridobljenih rezultatov so objavili seznam priporočenih lokusov, kot tudi priporočene protokole za genetsko določevanje sort oljke (Baldoni in sod., 2009).

Poleg oljke so mikrosatelite uporabili tudi pri genotipizaciji sort vinske trte (*Vitis* ssp). Tu so uporabili tri-, tetra- in pentanukleotidne ponovitve, kar prinese določene prednosti pred dinukleotidnimi. Prednost tetra- in pentanukleotidnih zaporedij je manj zdrsov polimeraze, kar olajša ločevanje in določevanje sosednjih alelov (Meldgaard in Morling, 1997). S pomočjo predhodnih testov, ki so potekali na štirih sortah vinske trte (Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Bianca in 20/3), so izbrali 38 mikrosatelitnih markerjev. Rezultati, ki so jih pridobili pri raziskavi, omogočajo zanesljivo določevanje sorodnosti pri vinski trti, kot tudi seznam priporočenih mikrosatelitov za določevanje sort (Cipriani in sod., 2008).

3.4.3.1 Mikrosateliti pri hmelju

V raziskavi, ki je bila objavljena leta 2007 (Jakše in sod., 2007), so preskušali 24 novih lokusov, z motivi GA, GT, AGA, ACA in ACC. Lokuse so testirali na dveh genotipih pri različnih temperaturah za prileganje začetnih oligonukleotidov. Ugotovili so da je 59 lokusov močno polimorfnih, 24 monomorfnih, 34 pa je bilo multilokusnih – par začetnih oligonukleotidov je pomnoževal več genomskeh lokusov. Pri 18 lokusih ni bilo pomnoženih fragmentov. V nadaljnji analizi so uporabili 24 lokusov na 34 sortah hmelja. Uporabljeni lokusi so lahko v pomoč pri določanju sorodnosti med sortami hmelja kot tudi pri ločevanju sort med seboj.

Sorodnost med divjimi akcесijami hmelja so iskali tudi med kavkaziskimi, severno ameriškimi in evropskimi vzorci hmelja. Ugotovili so, da so si evroazijski divji hmelji genetsko podobni, kar pa ne velja za divje sorte s Kavkaza. Divje sorte hmelja na Kavzaku so geografsko ločene od evroazijskih, zato ni prišlo do križanja med seboj (Patzak, 2009).

Spol pri hmelju je fenotipsko določen šele v drugem letu rasti, zato je potrebno za potrebe žlahtnjenja spol določiti že pred samim sajenjem v nasad. Pri tem je lahko v pomoč mikrosatelit s trinukleotidnim motivom HlAGA7 (Jakše in sod., 2007). Dedovanje spola pri hmelju je določeno s heteromorfnim parom spolnih kromosomov – moške rastline imajo XY kombinacijo in ženske XX. Pri omenjeni študiji je bil uporabljen lokus HlAGA7 ter 174 različnih genotipov hmelja. Lokus je močno variabilen. Pri moških vzorcih hmelja so opazili popolno heterozigotnost (100 %), kar omogoča natančno določevanje moške rastline. Variabilnost tega lokusa pa omogoča tudi določevanje enodomnih rastlin.

3.5 IDENTIFIKACIJA

Identifikacijo določenih evropskih in svetovnih sort hmelja zasledimo tudi pri drugih avtorjih (Patzak in sod., 1999; Townsend in Henning, 2009; Patzak in sod., 2009), ki so uporabili različne metode določevanja sort hmelja: RAPD (ang. Random Amplification of Polymorphic DNA, AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism) in SSR.

RAPD metodo sta leta 1994 uporabili Abbotova in Fedelejeva za določevanje sadilnega materiala. Identifikacijo sta uporabili na sedmih sortah, ki so se med seboj težko morfološko ločile, s kemičnimi analizami storžkov pa so jih lahko med seboj ločili. Uspešnost uporabe RAPD markerjev pri identifikaciji 12 slovenskih sort hmelja s kombinacijo petih začetnih oligonukleotidov so dokazali tudi Jakše in sod. (1994). Poleg tega so Patzak in sod. (1999) uporabil štiri RAPD začetne oligonukleotide in uspešno določil češke sorte hmelja.

AFLP tehnika se lahko uporablja tudi za določevanje sort hmelja. Hartl in Seefelder sta leta 1998 dokazala primernost uporabe te tehnike za določevanje variabilnosti na osmih sortah hmelja. Kasneje so uporabili AFLP tehniko pri študiji genetske variabilnosti 90 sortah hmelja (Seefelder in sod., 2000).

Tehnika z uporabo mikrosatelitnih markerjev kaže največjo informacijsko vrednost polimorfizma in so večinoma zelo variabilni (Štajner, 2010). To tehniko smo uporabili tudi v diplomski nalogi. Patzak in sod. (2009) so uporabili mikrosatelitne markerje za določitev 74 čeških vzorcev hmelja in 62 sort iz drugih delov sveta. Večinoma zasledimo, da avtorji analizirajo večinoma sorte hmelja, ki so domačega porekla (Townsend in Henning, 2009; Patzak in sod., 2009). V diplomski nalogi smo s pomočjo mikrosatelitnih markerjev genotipizirali 142 vzorcev sort hmelja, od tega 13 slovenskih in 129 svetovnih.

3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Verižno reakcijo s polimerazo z angleško končnico PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) je leta 1980 s sodelavci zasnoval Kary Mullis (Saiki in sod., 1985), za kar so leta 1993 tudi dobili Nobelovo nagrado za kemijo. Avtomatizacijo PCR je leta 1985 omogočila izolacija termostabilnega encima polimeraze (Lawyer in sod., 1989).

Na začetku je bil encim DNA-polimeraza izoliran iz bakterije *Escherichia coli*. Velik problem pri tem je, ker je za denaturacijo DNA potrebna temperatura okoli 95 °C, encim izoliran iz *E. coli* pa ne prenese tako visoke temperature. Rešitev za to težavo je prinesla izolacija bakterije *Thermophilus aquaticus*, ki so jo izolirali iz vrelca v narodnem parku Yellowstone. Encim je termo stabilen tudi pri temperaturah blizu vreliča (Barlett in Stirling, 2003).

PCR je ena izmed najpomembnejših laboratorijskih tehnik, kar so jih kadarkoli iznašli. Metoda je hitra, cenovno dostopna ter enostavna za uporabo. Tehnika pomnožuje *in vitro* specifične fragmente DNA iz zelo majhnih vzorcev DNA ali celo vzorcev, ki so slabše kakovosti.

Metoda je tako uporabna, ker lahko denaturacijo, hibridizacijo in sintezo DNA večkrat ponovimo s preprostim spremenjanjem temperature reakcijske mešanice. Vsaka novo sintetizirana veriga DNA lahko služi kot nova matrica v naslednjem ciklu, tako da koncentracija tarčne matrice DNA narašča eksponentno. V postopku s 30 cikli se fragment

DNA pomnoži teoretično za okoli 10^9 . Možnosti uporabe PCR tehnike so velike od določanja nukleotidnega zaporedja, detekcije različnih virusnih bolezni do določanja stopnje sorodnosti rastlin in živali (Boyer, 2002).

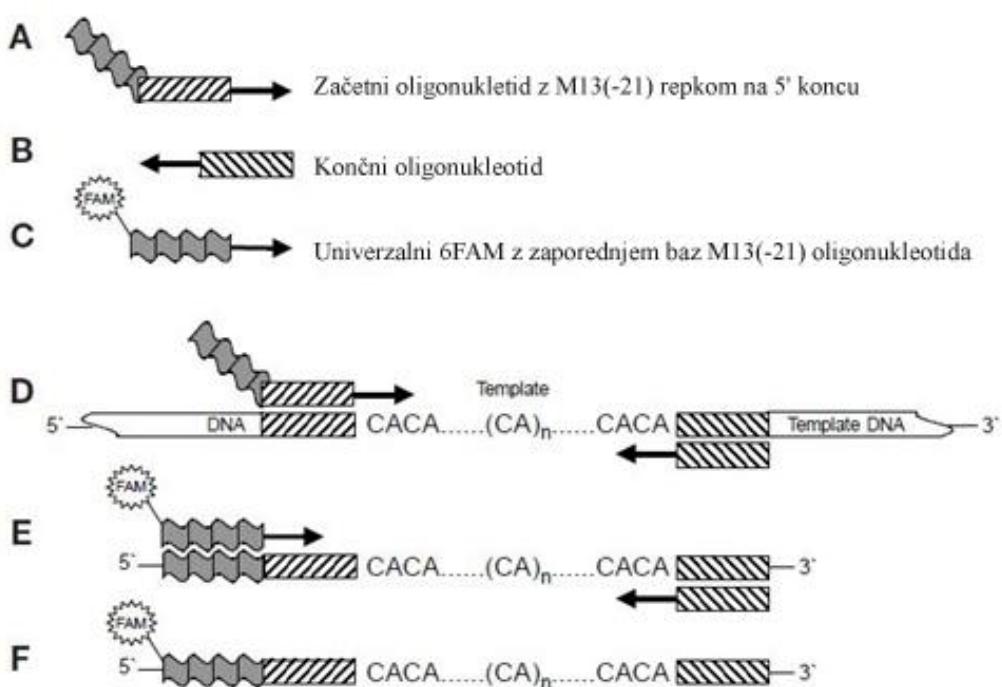
Mešanica za PCR sestavljajo različne komponente: voda, PCR pufer, $MgCl_2$, dNTP, začetni oligonukleotidi, matrična DNA in encim DNA-polimeraza *Taq*. Deionizirana voda predstavlja medij, v katerem druge komponente delujejo. PCR pufer vzdržuje ustrezni pH v reakciji in optimalno okolje za delovanje encima *Taq* DNA polimeraze. Mg^{2+} vsebuje ione, ki tvorijo kompleks z dNTP, začetnimi oligonukleotidi in matrično verigo DNA. dNTP so gradniki, ki jih encim polimeraza vgraje v novo nastalo verigo. Začetna oligonukleotida sta komplementarna začetnemu in končnemu delu DNA, ki ga želimo namnožiti. Začetni oligonukleotid omogoča, da encim DNA-polimeraza sintetizira komplementarno verigo od mesta na vzorčni DNA, kjer se le-ta nahaja (Innis in sod., 1990).

Sama tehnika sestoji iz treh stopenj. Prva je denaturacija, s katero ločimo verige matrične DNA. Inkubacija mešanice traja približno 30 sekund pri 95 °C. Nato sledi hibridizacija, hipna ohladitev mešanice od 95 °C do 55 °C (ali optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov), kar omogoči, da se začetni oligonukleotidi hibridizirajo z ustreznimi komplementarnimi regijami. Začetna oligonukleotida sta v matrici orientirana tako, da sta njuna 3'-konca usmerjena drug proti drugemu. Začetna oligonukleotida imata dvojno vlogo: določata začetni mestni podvajanja želenega segmenta DNA, hkrati pa služita kot začetna oligonukleotida s 3'-OH skupino za sintezo DNA. Če želimo zagotoviti uspešno hibridizacijo začetnih oligonukleotidov in preprečiti ponovno prilagajanje matričnih verig, dodamo v reakcijsko mešanico velik pribitek začetnih nukleotidov. Zadnja, tretja stopnja, je sinteza DNA. Sintezo omogoča encim DNA-polimeraza *Taq*. Temperaturo dvignemo na 72 °C. Encim podaljšuje oba začetna oligonukleotida in proizvaja dve verigi DNA. Encim je temperaturno obstojen, tako da reakcijo izvajamo pri visoki temperaturi, kar pospeši sintezo DNA. Sama sinteza navadno ni daljša od 30 sekund (Boyer, 2002).

3.7 ZAČETNI OLIGONUKLEOTID M13 (-21)

Genotipizacija se večinoma izvaja s pomočjo PCR, s točno določenimi začetnimi oligonukleotidi oz. primer-ji. Analiza pomnoženih mikrosatelitnih fragmentov poteka klasično na denaturacijskem gelu v procesu elektroforeze. Pomnoženi fragmenti DNA so radioaktivno označeni ali pa jih detektiramo s pomočjo barvanja s srebrom. Fragmenti se v procesu elektroforeze ločijo po dolžini. Drug, novejši način ločevanja fragmentov pa je z uporabo kapilarne elektroforeze in fragmentov, ki so fluorescentno označeni. Naprava s pomočjo laserja vzbuditi fluorescentne fragmente in detektira njihovo dolžino v procesu ločevanja. V ta namen moramo enemu začetnemu oligonukleotidu pripeti fluorescentno nalepko ali pa uporabimo tretji univerzalni začetni oligonukleotid (Schuelke, 2000). Prvi primer, kjer označujemo vsak začetni oligonukleotid, je cenovno zelo drag, saj znaša cena enega fluorescenčno označenega oligonukleotida od 70 - 100 €. Za namene genotipizacije, kjer se analizira veliko vzorcev in preizkuša veliko lokusov, je cena občutno previsoka. Da

bi zmanjšali stroške, ki nastanejo pri genotipizaciji, uporabimo drug pristop. Enemu izmed lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov dodamo na 5' konec 18 bp dolgo M13 (-21) zaporedje – TAIL (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'). V PCR reakcijo dodamo še tretji začetni oligonukleotid, ki ima omenjeno zaporedje in ima na 5' koncu pripeto fluorescentno nalepko. Pogoji PCR pomnoževanja morajo biti izbrani tako, da se v prvih ciklih lokusno specifični začetni oligonukleotid z M13 (-21) sekvenco veže na matrično DNA in pomnožuje lokus. Kasneje, ko se koncentracija začetnega oligonukleotida zmanjša, se lahko zniža temperatura in ga zamenja univerzalen začetni oligonukleotid, ki vgraje fluorescentna M13 (-21) zaporedja v PCR fragmente. Prednost te metode je, da so stroški močno zmanjšani, saj uporabljamo samo en fluorescentno označen oligonukleotid za vse lokuse. Metoda je priporočljiva za študije v manjših laboratorijih (Schuelke, 2000).



Slika 1: Shematski prikaz uporabe fluorescentnih začetnih oligonukleotidov z M13 (-21) sekvenco v PCR: A in B predstavlja lokusno specifičen začetni oligonukleotid, A ima pripeto M13 (-21) sekvenco. C je začetni oligonukleotid s fluorescentno nalepko 6FAM z enakim zaporedjem, kot ga ima M13 (-21). D v prvi PCR reakciji se začetni oligonukleotid M13 (-21) s sekvenco vgradi v PCR produkt. E produkti, nastali pri D, so matrica za fluorescentni začetni oligonukleotid (v našem primeru smo uporabili štiri barve: 6FAM, VIC, NED in PET). F končni produkt s fluorescentno nalepko se detektira s pomočjo kapilarne elektroforeze (Schuelke, 2000).

4 MATERIAL IN METODE

4.1 RASTLINSKI MATERIAL

V poskus smo vključili 13 slovenskih in 129 svetovnih sort hmelja. Večina vzorcev je bila nabранa v kolekcijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu, material nekaterih tujih sort pa smo dobili s pomočjo mednarodnih kontaktov. Nabrane vzorce, večinoma mlade liste rastlin, smo shranili v plastične vrečke in jih spravili do izolacije DNA naslednji dan pri 4 °C. Seznam sort hmelja prikazuje preglednica v prilogah A.

4.2 IZOLACIJA DNA IZ RASTLINSKEGA TKIVA

DNA za nekatere vzorce je bila že na voljo v laboratoriju katedre, izolirali smo DNA novo pridobljenih vzorcev. Izolacija celokupne genomske DNA je potekala po metodi Kump in sod. (1992). Količino rastlinskega materiala smo dobro zmleli v terilnici in nato v terilnico dodali 700-1000 µl CTAB ekstrakcijske raztopine [1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, NaCl, dH₂O] ter dobro premešali. Suspenzijo smo prelili v 1,5 ml mikrocentrifugirko ter inkubirali 90 minut pri 68 °C v vodni kopeli. Po preteklem času smo dodali 700 µl mešanice kloroform : izoamilalkohola v razmerju 24 : 1, močno premešali in centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 10.000 obratih/min (Eppendorf centrifuges 5804/R). Vodno fazo smo pazljivo (da nismo zajeli ostankov tkiva ali organske faze) prenesli v novo 1,5 ml centrifugirko, dodali 70 µl 3M natrijevega acetata (pH 5.2) ter 700 µl ledeno hladnega izopropanola in premešali. Vzorce smo za 30 minut postavili v zamrzovalnik na 20 °C. Vzorce smo nato centrifugirali 10 minut pri 4°C in 10.000 obratih/min. Nastalo oborino smo sprali s 500 µl 70 % etanola (spiranje soli). Zopet je sledilo centrifugiranje pri 10 minut na 4 °C in 10.000 obratih/min, nato smo odstranili ves etanol in oborino (usedlo DNA) posušili pri sobni temperaturi. Oborini smo dodali 60 µl pufra TE [1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, dH₂O] in shranili pri temperaturi 4 °C. DNA se je v raztopila v enem dnev. Vzorce smo nato shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Priprava raztopin za izolacijo DNA je predstavljena v prilogi B.

4.3 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA S FLUOROMETROM

Za merjenje koncentracije izolirane DNA pufru smo uporabili napravo DNA fluorometer DyNA Quant™ 200 (GE Healthcare). Delavno raztopino za merjenje smo pripravili iz 10 x TNE koncentrirane raztopine [100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, (pH 7)] z 10-kratnim redčenjem v destilirani vodi. Raztopino smo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter in ji dodali barvilo Hoechts 33258 v končni koncentraciji 0,1 µg/ml. Steklenico, v kateri smo pripravili delovno raztopino, smo zavili z alufolijo, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Barvilo se prednostno veže na dvojno vijačnico DNA, kar omogoča natančno določevanje koncentracije DNA, četudi so v vzorcu še vedno prisotne RNA molekule, nukleotidi in proteini. Za kalibracijo aparata smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg/ml DNA v 1 x TNE pufru). Merili smo s pomočjo kivete. Za merjenje koncentracije posameznega vzorca

DNA smo v kiveto dodali po 2 ml prej pripravljene [10x TNE pufer, dH₂O in Hoechts 33258] raztopine. Nato smo dodali še 2 µl DNA vzorca, dobro premešali in kiveto postavili v fluorometer ter izmerili koncentracijo. Po končanem merjenju vzorca smo kiveto splahnili s destilirano vodo in ponovili enak postopek za vsak posamezni vzorec. DNA vzorcev hmelja smo redčili na 20 ng/µl.

4.4 IZBOR MIKROSATELITNIH LOKUSOV

Izbrali smo 50 mikrosatelitnih lokusov, ki se pojavijo v literaturi (Brady in sod., 1996; Jakše in sod., 2002, 2008; Hadonou in sod., 2004; Štajner in sod., 2005) in jih preizkušali na osmih izbranih sortah: 'Agnus', 'Ahil', 'Aurora', 'Bor', 'Brewers gold', 'Cascade', 'Celeia' in 'Chang bei 2'. Ocenjevali smo polimorfizem, izrazitost in število alelov, stutterje ter pogoje pomnoževanja DNA fragmentov v PCR. Večje kot je bilo število alelov, bolje je bilo, prav tako bolj kot je bil alel izrazit, bolje je bilo. Želeli smo si tudi čim manj stutter-jev, ker je določevanje velikosti alelov lažje. Vsakemu lokusu smo dodelili tudi njegovo fluorescentno nalepko (6FAM, VIC, NED in PET). Med vsemi preizkušenimi lokusi smo izbrali 24 lokusov. Med samo genotipizacije pa smo naknadno odstranili še lokus GT4-F9-14, saj so bile prevelike težave z določanjem pravilnih alelov. Optimalne protokole pomnoževanja smo poiskali v literaturi (Brady in sod., 1996; Jakše in sod., 2002, 2008; Hadonou in sod., 2004; Štajner in sod., 2005) ali pa jih v našem laboratoriju optimizirali. Izbrani lokusi so prikazani v prilogi C.

4.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Namnoževanje DNA fragmentov je potekalo s PCR. V PCR tubice smo odpipetirali z multikanalno pipeto po 5 µl vzorca DNA (100 ng) vsake sorte hmelja in na kratko centrifugirali (centrifuga, rotor za mikrotiterske plošče), da je DNA odtekla iz stene PCR tubice. Skupno PCR mešanico smo pripravili v 1,5 ml centrifugirki. Uporabili smo sterilno dH₂O, 5x PCR pufer (Promega), 25 mM MgCl₂ (Promega), 10 mM deoksinukleotide (dATP, dCTP, dGTP in dTTP), 10 µM raztopino lokusno specifičnega para začetnih oligonukleotidov (začetni oligonukleotid 1 in začetni oligonukleotid 2) in 10 µM oligonukleotid TAIL (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'), ki je bil na 5' koncu označen s 6FAM, VIC, NED ali PET fluorescentno nalepko podjetja Applied Biosystems in encim GoTaq® DNA polimerazo (Promega) v koncentraciji 5 U/µl. Končni volumen PCR reakcije je znašal 15 µl. PCR reakcijo in vse komponente smo ves čas priprave hranili na ledu. Potrebni volumni reagentov in končne koncentracije so podane v preglednici 2.

Preglednica 2: Prikaz potrebnih reagentov ter njihovi volumni na vzorec

Reagent in koncentracija	Volumen na vzorec	Končna koncentracija
dH ₂ O	3,550 µl	
5x PCR pufer	3 µl	1x
MgCl ₂ (mM)	1,2 µl	2 mM
dNTP (2,5 mM vsakega dNTP)	1,2 µl	200 µM
Začetni oligonukleotid (µM)	0,3 µl	0,2 µM
Začetni oligonukleotid (µM)	0,3 µl	0,2 µM
Primer TAIL (µM)	0,375 µl	0,25 µM
encim TAQ (U)	0,075 µl	1,25 U

Potrebe količine za en vzorec smo pomnožili s številom vzorcev, ki smo jih pomnoževali s 5 % prebitkom. Naenkrat smo lahko pomnožili 96 vzorcev, ki jih lahko pomnožujemo v eni PCR napravi. Pomnoževanje smo izvedli v 96-mestnih PCR ploščah (Applied Biosystems) s pomočjo PCR naprav za ciklično termostatiranje Applied Biosystems 2720, GeneAmp PCR Systems 9700 (oba Applied Biosystems) in Biometra T Gradient (Biometra). Vse tri naprave delujejo na osnovi peltierjevega elementa. Po preizkušanju smo ugotovili, da so rezultati vseh treh naprav medsebojno primerljivi in smo jih uporabili pri nadaljnji analizah. V PCR tubice, kjer je bila že odpipetirana DNA (5 µl), smo nato dodali 10 µl PCR reakcijske mešanice na vzoreček. Celo ploščo smo nato vrtinčili, centrifugirali in dali v PCR napravo. Uporabili smo več različnih temperaturnih protokolov pomnoževanja, saj je prileganje začetnih oligonukleotidov na matrično DNA odvisno od vsakega para začetnih oligonukleotidov in tako vsak lokus lahko zahteva različne temperaturne pogoje. Uporabili smo šest različnih protokolov pomnoževanja: TD52, TD52+2, TD53, TD54, TD55 in protokol pomnoževanja za lokus HIAGA7, ki je zapisan pod prilogo C. Protokolom je skupno to, da je prvih pet ciklov t. i. „touch down“, kjer v fazi prileganja začetnih oligonukleotidov spuščamo temperaturo v vsakem ciklu za 1 °C. S tem dosežemo v prvih ciklih večjo specifičnost pomnoževanja. Številka protokola pove, kolikšna mora biti končna temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov v PCR po tem „touch down“ koraku. Protokoli pomnoževanja so bili optimizirani v predhodnih študijah katedre oz. povzeti po objavljeni literaturi (Brady in sod., 1996; Jakše in sod., 2002, 2008; Hadonou in sod., 2004; Štajner in sod., 2005). Profili pomnoževanja teh šestih ciklov so bili naslednji:

TD 52: 5 minut pri 94 °C, sledi 5 ciklov s temperaturo 94 °C v 45 sekundah, nato 30 sekund pri 57 °C, pri vsakem ciklu od petih se temperatura zniža za 1 °C, sledi 25 ciklov pri 52 °C, kar je temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov, konča se z 8 minutnim podaljševalnim korakom pri 72 °C.

TD 52+2: 5 minut pri 94 °C, sledi 5 ciklov s temperaturo 94 °C v 45 sekundah, nato 30 sekund pri 57 °C, pri vsakem ciklu od petih se temperatura zniža za 1 °C, sledi 27 ciklov pri 52 °C, kar je temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov, konča se z 8 minutnim podaljševalnim korakom pri 72 °C.

TD 53: 5 minut pri 94 °C, sledi 5 ciklov s temperaturo 94 °C v 45 sekundah, nato 30 sekund pri 58 °C, pri vsakem ciklu od petih se temperatura zniža za 1 °C, sledi 25 ciklov pri 53 °C, kar je temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov, konča se z 8 minutnim podaljševalnim korakom pri 72 °C.

TD 54: 5 minut pri 94 °C, sledi 5 ciklov s temperaturo 94 °C v 45 sekundah, nato 30 sekund pri 59 °C, pri vsakem ciklu od petih se temperatura zniža za 1 °C, sledi 25 ciklov pri 54 °C, kar je temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov, konča se z 8 minutnim podaljševalnim korakom pri 72 °C.

TD 55: 5 minut pri 94 °C, sledi 5 ciklov s temperaturo 94 °C v 45 sekundah, nato 30 sekund pri 60 °C, pri vsakem ciklu od petih se temperatura zniža za 1 °C, sledi 25 ciklov pri 55 °C, kar je temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov, konča se z 8 minutnim podaljševalnim korakom pri 72 °C.

Po prvem preizkušanju 50 začetnih oligonukleotidov smo izbrali 23 lokusov (parov začetnih oligonukleotidov), ki smo jih uporabili za pomnoževanje celotnega seta sort. V prilogi C je predstavljenih uporabljenih 23 parov začetnih oligonukleotidov z zaporedji, fluorescentno barvilo, ki se je uporabilo pri njihovi detekciji, in protokol pomnoževanja. Pomnoževanje vsake sorte smo vsaj dvakrat ponovili.

4.5.1 Fluorescentni začetni oligonukleotid tailM13 (-21)

Namen fluorescentnega TAIL začetnega oligonukleotida je bolj ekonomičen postopek analize (opisano pri pregledu literature - poglavje 3.7). Zaporedje za univerzalni primer M-13 (-21) (5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-3') dodamo v procesu sinteze začetnega oligonukleotida enemu začetnemu oligonukleotidu para, kot kaže shema:

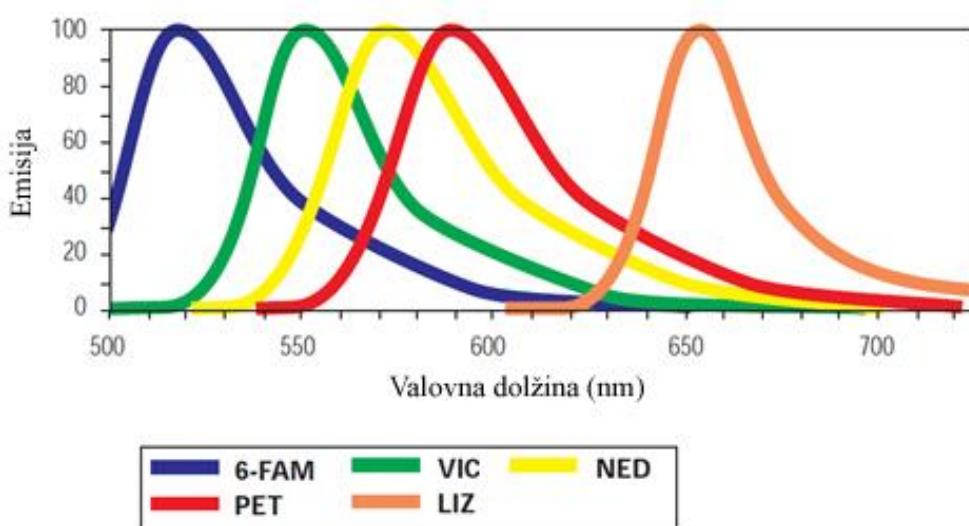
5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT + sekvenca začetnega oligonukleotida -3'

Lokusno specifičnega zaporedja oligonukleotida ne spremojamo. V PCR uporabimo še tretji začetni oligonukleotid samo s TAIL zaporedjem, ki je označen z želeno fluorescentno molekulo. V našem primeru smo uporabili štiri začetne oligonukleotide TAIL označene z barvili podjetja Applied Biosystems, ki omogočajo simultano ločevanje vseh štirih barvil naenkrat in s tem posledično kombinacije 4-ih lokusov v eni analizi. Barvila se komercialno imenujejo 6FAM, VIC, NED in PET in imajo različne spektralne značilnosti. Vsako od teh štirih fluorescentnih barvil oddaja fluorescenco pri različnih valovnih dolžinah. Med zbiranjem podatkov naprava loči fluorescentni signal na podlagi valovnih dolžin, ki jih nato prikaže s pomočjo CCD (charge-coupled device) kamere na predvidljiv

razporejen vzorec. 6FAM oddaja najkrajšo valovno dolžino, ki je prikazana kot modra, sledijo VIC (zelena), NED (rumena/črna), PET (rdeča) in LIZ, ki je prikazana kot oranžna. Slednje barvilo se uporablja izključno samo kot marker. Spektralni podatki za navedena barvila so predstavljena v preglednici 3 in na sliki 2.

Preglednica 3: Spektralni podatki za navedena barvila

Barvilo	Ekscitacija	Emisija
6FAM	492	517
VIC	538	554
NED	553	575
PET	558	595
LIZ	638	655



Slika 2: Emisijski spekttri petih barvil, ki jih uporabljamo pri genotipizaciji mikrosatelitnih lokusov hmelja, peto oranžno barvilo LIZ je namenjeno molekularnemu standardu (Applied Biosystems ..., 2010)

4.6 ANALIZA POMNOŽENIH VZORCEV

4.6.1 Priprava vzorcev za nanos na kapilarno elektroforezo

Po PCR pomnoževanju je sledilo združevanje vzorcev za nanos na kapilarno elektroforezo. Zaradi uporabe štirih različnih barvil pri genotipizaciji lahko po štiri različne lokuse, označene s štirimi različnimi barvili, med seboj združimo. Proses lahko opišemo kot post-PCR multiplexing. To smo naredili tako, da smo iz vsake PCR reakcije odpipetirali po 4 µl vsakega pomnoženega vzorca (6FAM, VIC, NED in PET), jih združili, dobro premešali in kratko centrifugirali. Po centrifugiranju smo prenesli 1 µl združenih vzorca v 96-mestno ploščo MicroAmp® (Applied Biosystems), ki je hkrati tudi kompatibilna s kapilarno elektroforetsko napravo. Za analizo smo morali dodati vsakemu vzorcu 0,5 µl molekularnega standarda LIZ 600 (Applied Biosystems) ter 10,6 µl formamida. Formamid je močan denaturant, ki poruši strukturo dvojne vijačnice DNA. Glede na število vseh vzorcev, ki smo jih pripravili za analizo, smo izračunali, koliko standarda in formamida potrebujemo, ter zmešali oboje skupaj v 1,5 µl centrifugirki, dobro premešali, centrifugirali ter z avtomatsko pipeto odpipetirali v ploščo po 11 µl na vzorec. Tako smo dobili enako količino standarda v vseh vzorcih. Plošče s pripravljenimi vzorci smo prelepili s samolepilnimi folijami (Brand), premešali in centrifugirali. Plošče smo zatem poslali na Oddelek za zootehniko (Groblje 3, Domžale), kjer so jih analizirali na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130XL (Applied Biosystems).

4.6.2 Elektroforeza vzorcev

Ločevanje in analiza vzorcev sta potekala na Oddelku za zootehniko, kjer je lociran sistem 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sistem temelji na principu kapilarne elektroforeze in je v celoti avtomatiziran in visoko zmogljiv. Namenjen je sekvenciranju in drugim tehnikam fragmentnih analiz. Omogoča detekcijo fragmentov na podlagi fluorescence, ki jo vzpodbudi s pomočjo laserja. Sistem vsebuje 16 kapilar in tako omogoča hkratno analizo 16 vzorcev. Za samo analizo smo predložili operaterju ustrezno tabelo s podatki (npr. imena sort ter uporabljene lokuse). Podatke analize smo pridobili s pomočjo medmrežja v obliki elektroferogramske datotek FSA. Datoteke smo uvozili v programske paket GeneMapper® 3.7 (Applied Biosystems), ki omogoča napredno analiziranje rezultatov. V omenjenem programu smo pridobili podatke o prisotnosti in dolžinah alelov in velikosti fluorescentnega signala.

Podatke o dolžinah alelov smo shranili v Excelovi datoteki, zapisali smo jih v obliki dvokolonskega formata, kjer smo zabeležili dolžino alela dvakrat pri homozigotu (npr 190 190), dva alela pri heterozigotu (npr. 190 194) oz. tri alele pri triploidih in nekaterih primerih tudi pri diploidnih sortah (npr. 190 194 198).

4.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Preglednica o dolžinah alelov je predstavljala vhodno datoteko za programe, s katerimi smo obdelovali podatke. Vhodna datoteka je bila v obliki Excelove datoteke ali v obliki enostavne tekstovne datoteke, odvisno od zahtev programskeih paketov.

Za analizirane sorte hmelja smo določili:

- število alelov na lokus,
- število homozigotov in heterozigotov,
- genotipsko specifične alele,
- in izračunali določene statistične vrednosti za lokuse – vrednost frekvence alelov, dejanska heterozigotnost, pričakovana heterozigotnost, frekvenca ničnih alelov, informacijska vrednost polimorfizma (PIC).

Statistična analiza je potekala s pomočjo različnih statističnih programov. Za izračun vrednosti frekvence alelov, dejanska heterozigotnost, pričakovana heterozigotnost, frekvenca ničnih alelov, informacijska vrednost polimorfizma (PIC), smo uporabili program Cervus 3.0, ki se izvaja v programskem okolju Windows (Kalinowski in sod., 2007).

Frekvenca alelov (p_i) je delež posameznega alela v populaciji, ki se izračuna po formuli:

$$p_i = \frac{\text{pogostost i - tega alela v populaciji}}{\text{pogostost vseh alelov v populaciji}} \quad \dots (1)$$

Dejanska heterozigotnost (H_0) (Ayala in Kiger, 1980, cit. po Jakše 2003): to je delež posameznikov v populaciji (vzorcu), ki so heterozigotni. Izračuna se po formuli:

$$H_0 = \frac{\text{število heterozigotnih posameznikov}}{\text{število v populaciji}} \quad \dots (2)$$

Pričakovana heterozigotnost (H_e) (Ayala in Kiger, 1980, cit. po Jakše, 2003): to so vsote kvadriranih vrednosti frekvenc lokusa, ki jih odštejemo od vrednosti 1. Ta koeficient so razvili predvsem za samoprašne populacije, kjer je večina posameznikov homozigotnih, lokus pa je v populaciji lahko zelo variabilen:

$$H_e = 1 - (\sum_{i=1}^n p_i^2) \quad \dots (3)$$

kjer je n število alelov na lokus.

Frekvenca ničnih alelov (Brookfield, 1996, cit. po Jakše, 2003): pri izračunu smo uporabili formulo, ki uporablja pričakovano in dejansko heterozigotnost:

$$r = \frac{H_E - H_o}{1 + H_e} \quad \dots (4)$$

Informacijska vrednost polimorfizma (PIC) (Botstein in sod., 1980; Hearne in sod., 1992, cit. po Jakše, 2003). Vrednost PIC prav tako izračunamo iz vrednosti frekvenc alelov in jo uporabljamo predvsem kot merilo, ali je lokus primeren za gensko kartiranje. Izračunamo jo po naslednji formuli:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad \dots (5)$$

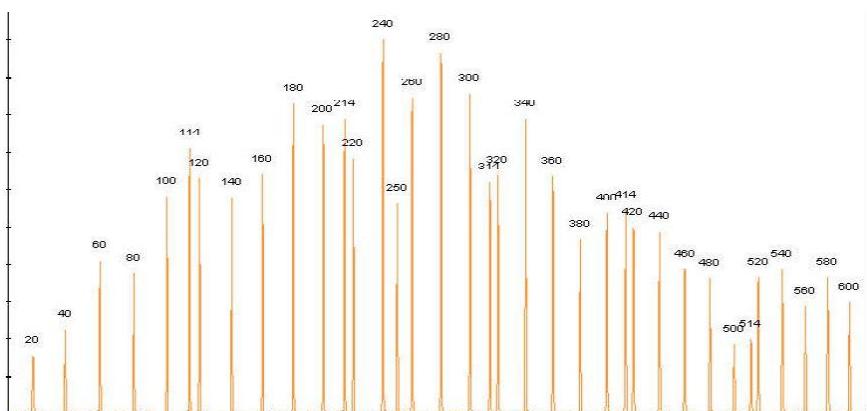
V programu MICROSAT 1.5 smo določili alele, ki se pojavijo samo v enem genotipu (enkratni, unikatni aleli). V programu Identity 1.0 (Wagner in Sefc, 1999) pa smo določili genotipe, ki se med seboj ne razlikujejo.

Pomembno poglavje uporabe mikrosatelitnih lokusov pri identifikaciji vzorcev ali sort je izbor najbolj informativnega in hkrati minimalnega seta markerjev, s katerim ločimo čim več genotipov. To naloge smo izvedli s pomočjo programske skripte, ki je napisana v R okolju – AMaCAID (Caroli in sod., 2011). Program je namenjen analizi genotipskih vzorcev več lokusov v velikih vzorcih. Program izračuna število in frekvenco pojavljanja različnih multilokusnih vzorcev (haplotipov) v molekularnih podatkih in izvede analizo razlikovanja genotipov za vsako kombinacijo markerjev. Tako nam omogoča, da odkrijemo minimalno število markerjev, ki jih potrebujemo za razlikovanje vseh različnih genotipov v našem vzorcu.

Izrisali smo tudi distribucijo števila alelnih razlik med 142 analiziranimi sortami hmelja za vse možne parne primerjave genotipov (skupaj 10.011 primerjav). Primerjave smo izvedli s pomočjo Excelovega vtičnika The Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1 (Animal genomics... 2008). Histogramsko porazdelitev rezultate primerjav smo predstavili v Excelu.

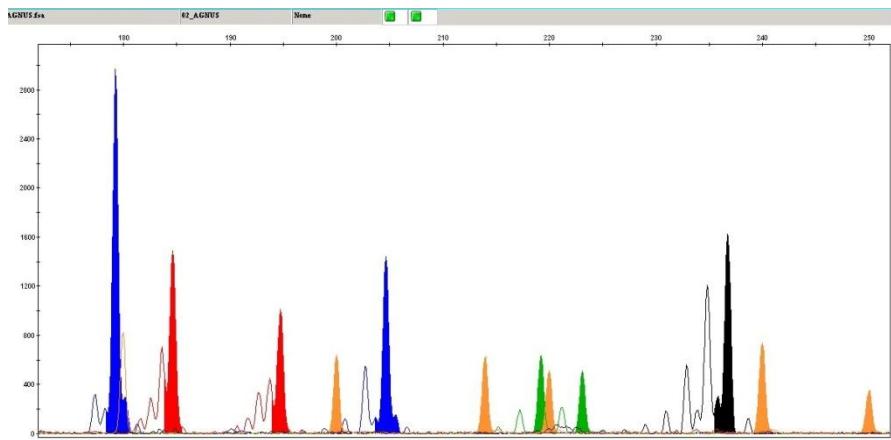
5 REZULTATI

Rezultate elektroforeze smo pridobili v obliki elektroferogramov v datoteki FSA preko elektronske pošte. Te smo analizirali s pomočjo programa Genemapper 3.7 (Applied Biosystems). V programu smo določili standard LIZ 600, ki se analizira v oranžnem območju spektra (slika 3) in ima naslednje dolžine fragmentov: 20, 40, 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440, 460, 480, 500, 514, 520, 540, 560, 580 in 600 bp. Parametri za analizo so bili privzeti za analizo mikrosatelitov. Po potrebi smo samo znižali nivo fluorescentne posamezne barve pod 50. V primeru, da avtomatska rutina ni analizirala standarda smo z ročnim določanjem posameznih vrhov oranžne barve standard popravili, kjer je bilo to možno.



Slika 3: Standard LIZ 600 s fragmenti od 20 do 600 bp (številke nad vrhovi predstavljajo dolžino v bp)

Genemapper program omogoča pregled petih barvnih spektrov - v našem primeru je to pomenilo štiri lokuse na enkrat in alele teh lokusov, kot kaže sliki 4.



Slika 4: Prikaz štirih lokusov z označenimi različnimi fluorescentnimi barvili (modra – 6FAM, zelena – VIC, črna – NED, rdeča – PET in oranžna - LIZ), 6FAM je lokus H1GT17, VIC GA4-P11-9, NED H1GA27, PET GA7-A6-14, prikazan je polimorfizem sorte 'Agnus'. Genotipi 6FAM: 205: 179, VIC: 223: 219 NED: 237: 237 PET: 195: 185

5.1 ANALIZA POSAMEZNIH LOKUSOV

Izmed 50 lokusov, ki smo jih preizkušali v prvem delu naloge, smo jih za nadaljnjo analizo izbrali 23, ki so se izkazali za najboljše v pred-testiranjih, kjer smo ocenjevali velikost vrhov, nagnjenost k zdrsom (stutter-ji), polimorfizem. Izbrani lokusi so predstavljeni v prilogi C. Lokuse smo okarakterizirali in te vrednosti so predstavljene v preglednici 5. Določili smo 219 alelov pri 23 lokusih, kar predstavlja 9,52 alela na posamezni lokus. S pomočjo statističnega programa Cervus smo dobili naslednje podatke: število alelov na lokus (k), število vseh obravnavanih sort (N), razpon alelov (min-max v bp), dejanska heterozigotnost (H_0), pričakovana heterozigotnost (H_e), verjetnostjo enakosti genotipov (PI), informacijska vrednost polimorfizma (PIC) in frekvenca ničnih alelov.

Povprečno število alelov med 23 lokusi je bilo 9,52. Najmanj polimorfen lokus EMHL022 ima le 3 alele, najbolj polimorfen HlGA27 pa 17 od tega je pet specifičnih. Največji razpon alelov ima lokus GT1-K1-4 od 125 bp do 215 bp, najmanj pa EMHL022 od 219 bp do 223 bp. Med vsemi lokusi v poizkusu je najbolj primeren lokus za gensko kartiranje (PIC vrednost) GA5-G3-10. Najmanjša razlika med dejansko in pričakovano heterozigotnostjo sort ima lokus GT4-F23-14, največjo pa lokus GA7-A6-14.

Preglednica 4: Statistični podatki za posamezen lokus, predstavljene so vrednosti za število alelov (k), število obravnavanih sort (N), razpon alelov (min – max v bp), dejanska heterozigotnost (H_0), pričakovana heterozigotnost (H_e), verjetnostjo enakosti genotipov (PI), informacijska vrednost polimorfizma (PIC) in frekvenca ničnih alelov

Lokus	k	N	Razpon alelov (min – max bp)	H_0	H_e	PIC	PI	Ničti aleli
Ho0163	11	142	170 192	0,592	0,663	0,631	0,204	+0,073
ACA1-K9-3	11	142	169 227	0,845	0,707	0,671	0,188	-0,110
HIAGA7*¹	10	134	173 232	0,843	0,801	0,772	0,119	-0,027
5-2*	11	133	161 198	0,812	0,803	0,775	0,116	-0,007
GT4-F23-14	6	140	154 179	0,221	0,217	0,209	0,638	-0,001
HlGT17	12	140	172 205	0,907	0,786	0,759	0,121	-0,089
11a59*	12	142	196 275	0,754	0,601	0,546	0,321	-0,132
GA6-N13-14	6	142	207 227	0,514	0,660	0,605	0,274	+0,132
EMHL015*	5	137	171 179	0,372	0,533	0,433	0,512	+0,164
HlGA31	9	141	172 235	0,504	0,472	0,434	0,390	-0,038
GA4-K16-8	8	141	179 203	0,780	0,710	0,656	0,240	-0,055

Se nadaljuje

¹ * Označuje tistih šest lokusov, ki so potrebni za določitev 107 sort hmelja

nadaljevanje

Lokus	k	N	Razpon alelov (min – max bp)		H ₀	H _e	PIC	PI	Ničti aleli
GA4-P11-9*	13	140	203	247	0,786	0,669	0,632	0,213	-0,102
HIGA27	17	142	202	266	0,775	0,757	0,733	0,126	-0,020
GT1-K1-4*	15	142	125	215	0,866	0,710	0,666	0,210	-0,118
HI-AGA1	10	142	270	306	0,803	0,725	0,690	0,176	-0,069
GA5-G3-10	15	139	114	183	0,914	0,863	0,845	0,065	-0,033
ACC2-D3-3	7	141	209	233	0,489	0,422	0,398	0,403	-0,103
GT1-A11-1	4	140	143	187	0,686	0,631	0,568	0,320	-0,042
HI-AGA4	7	142	219	267	0,592	0,519	0,450	0,437	-0,073
EMHL022	3	140	219	223	0,171	0,158	0,147	0,740	-0,037
HIGT16	6	139	225	248	0,655	0,673	0,610	0,289	+0,021
HIGA24	11	141	228	278	0,752	0,788	0,755	0,139	+0,022
GA7-A6-14	10	141	179	199	0,929	0,761	0,721	0,168	-0,110
POVPREČNE VREDNOSTI	9,52	140,13	6	7	0,68	0,64	0,60	$3,13 \times 10^{-15}^2$	

S programom Microsat smo določili 29 specifičnih alelov pri 30 sortah. Specifične alele imajo sorte prikazane v prilogi D. Pet specifičnih alelov smo določili pri lokusu HIGA27, največ specifičnih alelov 4 ima sorta ‘Southern promise’.

Lokus Ho163

Lokus ima dinukleotiden mikrosatelitni motiv, pri njem smo določili 11 alelov (priloga E). Pet triploidnih sort je imelo prisotne tri alele: ‘Hüller biterer’, ‘Liberty’, ‘Symphony’, ‘Mount hood’ in ‘Topaz’ (priloga F). Pri tem lokusu smo določili tudi dve diploidni sorti s po tremi aleli: ‘Emerald’ in ‘Ringwood special’ (priloga G). Najbolj pogost alel lokusa je 176 s frekvenco 0,54 (priloga E). Alel 181 je specifičen za sorto ‘Kazak’ (priloga D). Skupaj je 58 sort homozigotnih in 84 heterozigotnih. Dejanska heterozigotnost je 0,59, pričakovana 0,66.

Lokus ACA1-K9-3

Lokus ima trinukleotiden mikrosatelitni motiv ACA, pri njem smo določili 11 alelov (priloga E). Štiri triploidne sorte so imele tri alele: ‘Crystal’, ‘Blisk’, ‘Topaz’ in ‘Willamette’ (priloga F). Najbolj pogost alel je 221 s frekvencama 0,48. Specifičen alel 169 ima ‘Aquila’ (priloga D). Skupaj je homozigotnih sort 22, heterozigotnih pa 120. Pričakovana heterozigotnost je 0,707, dejanska pa 0,845.

² Zmnožek vrednosti

Lokus HIAGA7

Lokus ima trinukleotiden mikrosatelitni motiv AGA, pri njem smo določili 10 alelov (priloga E). Alela 195 je najbolj pogost s frekvenco 0,33. Ne zasledimo specifičnih alelov. Štiri triploidne sorte so imele tri alele: 'Crystal', 'Symphony', 'Blisk' in 'Cicero' (priloga F). Dodatni tretji alel se pojavi pri diploidni sorti 'Emerald' (priloga G). Skupaj je homozigotnih sort 21, heterozigotnih pa 113. Pričakovana heterozigotnost je 0,801, dejanska pa 0,843.

Lokus 5-2

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv, pri njem smo določili 11 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel je 196 s frekvenco 0,33. Pojavilo se je tudi 29 sort, ki so imele tri alele. Dejanske triploidne sorte so prikazani v prilogi F. Alel 161 se je pojavil kot dodatni tretji alel tudi pri diploidnih sortah (priloga H), dodatni tretji alel 188 pa se je pojavil pri diploidni sorti 'Emerald' (priloga G). Specifičen alel 186 se pojavi pri sorti 'Southeren promise' (priloga D). Homozigotnih sort je 25, heterozigotnih 108. Pričakovana heterozigotnost je 0,803, dejanska pa 0,812.

Lokus GT4-F23-14

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GT, določili smo 6 alelov (priloga E). Najbolj zastopan alel je 154 s frekvenco 0,88. Alel 173 je specifičen za 'Ringwood special' (priloga G). Posebnost smo opazili pri sorti 'Comet', alel 165 se pojavi le pri eni od ponovitev, čeprav smo uporabili enako DNA. Triploidna sorta, ki je imela tri alele pri tem lokusu je 'Topaz' (priloga F), z dodatnim tretjim aleлом se je pojavila tudi ena diploidna sorta 'Ringwood special' (priloga G). Skupaj je bilo 109 homozigotnih in 31 heterozigotnih sort. Pričakovana heterozigotnost je 0,217, dejanska pa 0,221.

Lokus HIGT17

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GT, določili smo 12 alelov (priloga E). Najbolj zastopan alel pri lokusu je 199 s frekvenco 0,38. Specifičen alel 193 se je pojavil pri sorti 'Saphir' (priloga D). Tri triploidne sorte so imele tri alele: 'Crystal', 'Blisk' in 'Mount hood' (priloga F). Skupaj je bilo heterozigotnih sort 127 ter 13 homozigotnih. Pričakovana heterozigotnost je 0,786, dejanska pa 0,907.

Lokus 11a59

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv, določili smo 12 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel je 208 s frekvenco 0,56. Alel 204 je specifičen za 'Kazak', alel 222 za 'Aquila' (priloga D). Dve triploidni sorte imata tri alele: 'Cekin' in 'Topaz' (priloga F). Dodatni tretji alel imata tudi dve diploidni sorte: 'Southern brewer' in 'Ringwood special' (priloga G). Skupaj je homozigotnih sort 35, heterozigotnih pa 107. Pričakovana heterozigotnost je 0,601, dejanska pa 0,754.

Lokus GA6-N13-14

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 6 alelov (priloga E). Najpogostejši alel je 223 s frekvenco 0,49. Alel 207 je specifičen za sorto 'Glacier' (priloga D). Skupaj je homozigotnih sort 69, heterozigotnih 73. Pri tem lokusu se sorte s tremi aleli ne pojavijo. Pričakovana heterozigotnost je 0,660, dejanska pa 0,514.

Lokus EMHL015

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv, določili smo 5 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel je 175 s frekvenco 0,56. Pri tem lokusu se sorte s tremi aleli ne pojavijo. Skupaj je homozigotnih sort 51, heterozigotnih 86. Pričakovana heterozigotnost je 0,533, dejanska pa 0,372.

Lokus HIGA31

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 9 alelov (priloga E). Specifični alel 235 ima sorto 'Chinook' (priloga D). Tri triploidne sorte imajo tri alele pri tem lokusu: 'Symphony', 'Blisk' in 'Topaz' (priloga F). Skupaj je 70 homozigotnih sort in 71 heterozigotih. Pričakovana heterozigotnost je 0,472, dejanska pa 0,504.

Lokus GA4-K16-8

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 8 alelov (priloga E). Pet triploidnih sort ima tri alele na lokusu: 'Hüller biterer', 'Cekin', 'Cerera', 'Cicero' in 'Pacific gem' (priloga F) in en diploid z dodatnim tretjim alelom: 'Ringwood special' (priloga G). Skupaj je 31 homozigotov in 110 heterozigotov. Pričakovana heterozigotnost je 0,710, dejanska pa 0,780.

Lokus GA4-P11-9

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 13 alelov (priloga E). Najbolj zastopan alel je 223 s frekvenco 0,53. Pri tem lokusu imamo tudi tri specifične alele 247 pri 'Cicero', 235 pri 'Comet' in 227 pri 'Tettnanger' (priloga D). Šest triploidnih sort ima tri alele: 'Liberty', 'Symphony', 'Celeia', 'Cerera', 'Cicero' in 'Pacific gem' (priloga F) in en diploid s dodatnim tretjim alelom: 'Tettnanger' (priloga G). Skupaj je 30 homozigotnih sort ter 110 heterozigotnih. Pričakovana heterozigotnost je 0,669, dejanska pa 0,786.

Lokus HIGA27

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo, največ, 17 alelov (priloga E). Alel 237 je najbolj zastopan pri tem lokusu s frekvenco 0,44. Pojavi se pet sort s specifičnimi aleli: 219 pri 'Kazak', 253 pri 'Brewers gold', 260 pri 'Groene bel', 264 'Diva' in 266 pri 'Saphir' (priloga D). Štiri triploidne sorte imajo tri alele: 'Crystal', 'Cerera', 'Millennium' in 'Mount hood' (priloga F) in ena diploidna sorta z dodatnim tretjim alelom 'Brewers gold' (priloga G). Skupaj je 32 homozigotnih, 110 heterozigotnih. Pričakovana heterozigotnost je 0,757, dejanska pa 0,775.

Lokus GT1-K1-4

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GT, določili smo 15 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel pri tem lokusu je 168 s frekvenco 0,43. Specifični aleli, ki se tu pojavijo so 150 pri 'Ringwood special', 197 pri 'Zenith', 203 pri 'Glacier' in 215 pri 'Buket' (priloga D). Sedem triploidnih sort ima tri alele: 'Crystal', 'Liberty', 'Symphony', 'Blisk', 'Mount hood', 'Topaz' in 'Willamette' (priloga F) in ena diploidna sorta z dodatnim tretjim alegom: 'Ringwood special' (priloga G). Skupaj je 19 homozigotnih sort in 123 heterozigotnih. Pričakovana heterozigotnost je 0,710, dejanska pa 0,866.

Lokus HI-AGA1

Lokus ima trinukleotidni mikrosatelitni motiv AGA, določili smo 10 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel je 303 s frekvenco 0,45. Štiri triploidne sorte imajo tri alele: 'Hüller biterer', 'Liberty', 'Millennium' in 'Mount hood' (priloga F) in tri diploidne sorte z dodatnim tretjim alegom: 'Emerald', 'Ringwood special' in 'Southern brewer' (priloga G). Skupaj je 28 homozigotnih sort in 114 heterozigotnih. Pričakovana heterozigotnost je 0,725, dejanska pa 0,803.

Lokus GA5-G3-10

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 15 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel je 181 s frekvenco 0,23. Specifični alel 159 se pojavi pri sorti 'Glacier'. Osem triploidnih sort ima tri alele: 'Crystal', 'Symphony', 'Blisk', 'Celeia', 'Cerera', 'Mount hood', 'Pacific gem' in 'Willamette' (priloga F). Skupaj je 12 homozigotnih sort, heterozigotnih 127. Pričakovana heterozigotnost je 0,863, dejanska pa 0,914.

Lokus ACC2-D3-3

Lokus ima trinukleotidni mikrosatelitni motiv ACC, določili smo 7 alelov (priloga E).. Najpogostejsi alel je 215 s frekvenco 0,75. Specifičnih alelov pri tem lokusu ni. Triploidna sorta s tremi aleli je pri tem lokusu 'Blisk'. Skupaj je 72 homozigotnih sort, heterozigotnih 69. Pričakovana heterozigotnost je 0,422, dejanska pa 0,489.

Lokus GT1-A11-1

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GT, določili smo 4 alele (priloga E). Najbolj zastopan alel je 181 s frekvenco 0,52. Ni specifičnih alelov. Pojavi se ena diploidna sorta z dodatnim tretjim alegom 'Chelan' (priloga G). Skupaj je homozigotnih sort 44, heterozigotnih 96. Pričakovana heterozigotnost je 0,631, dejanska pa 0,686.

Lokus HI-AGA4

Lokus ima trinukleotidni mikrosatelitni motiv AGA, določili smo 7 alelov (priloga E). Najbolj pogost alel je 231 s frekvenco 0,63. Sorta 'Dunav' ima specifični alel 234. Tri triploidne sorte s tremi aleli se pojavijo pri tem lokusu: 'Crystal', 'Liberty' in 'Cekin' (priloga F). Skupaj je homozigotnih sort 58, heterozigotnih 84. Pričakovana heterozigotnost je 0,519, dejanska pa 0,592.

Lokus EMHL022

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv, določili smo le 3 alele, najmanj med vsemi lokusi (priloga E). Najbolj zastopan je alel 219 s frekvenco 0,91. Sort s tremi aleli pri tem lokusu ni. Skupaj je homozigotnih sort 116, heterozigotnih 24. Pričakovana heterozigotnost je 0,158, dejanska pa 0,171.

Lokus HIGT16

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GT, določili smo 6 alelov (priloga E). Prevladuje alel 225 s frekvenco 0,43. Imamo tudi dva specifična alela 244 pri ‘Southern promise’ in 248 pri ‘Ellupolo’ (priloga D). Triploidna sorta s tremi aleli je ‘Liberty’. Skupaj je homozigotnih sort 48, heterozigotnih 91. Pričakovana heterozigotnost je 0,673, dejanska pa 0,655.

Lokus HIGA24

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 11 alelov (priloga E). Prevladuje alel 252 s frekvenco 0,30. Specifična alela sta 240 pri ‘Southern promise’ in 278 pri ‘Pacific gem’ (priloga D). Pri večini sort se pojavi tudi alel 192, za katerega predpostavljamo, da je alel dodatnega lokusa kot je to znano tudi pri lokusu 5-2. Štiri triploidne sorte imajo tri alele: ‘Crystal’, ‘Blisk’, ‘Cerera’ in ‘Pacific gem’ (priloga F). Število homozigotnih sort je 35, heterozigotnih 106. Pričakovana heterozigotnost je 0,788, dejanska pa 0,752.

Lokus GA7-A6-14

Lokus ima dinukleotidni mikrosatelitni motiv GA, določili smo 10 alelov (priloga E). Najpogosteje se pojavi alel 185 s frekvenco 0,34. Določili smo tri specifične alele: 187 pri ‘Saphir’, 197 pri ‘Ringwood special’ in 199 pri ‘Southern promise’ (priloga D). Štiri triploidne sorte imajo tri alele: ‘Blisk’, ‘Cerera’, ‘Millennium’ in ‘Mount hood’ (priloga F). Dodatni tretji alel se pojavi pri diploidni sorti ‘Ringwood special’. Skupaj je homozigotnih sort 10, heterozigotnih 131. Pričakovana heterozigotnost je 0,761, dejanska pa 0,929.

7.1 TRIPLOIDNE SORTE

Med vsemi sortami smo analizirali tudi 14 triploidnih sort, ki so vse kazale na določenih lokusih pričakovani trialelnim genotipskim profil. Te sorte so predstavljene v prilogi F. Največ trialelnih profilov ima sorta ‘Blisk’, kar na devetih lokusih, sledi sorta ‘Crystal’ na osmih lokusih. Triploidna sorta ‘Celeia’ ima le na treh lokusih trialelni genotipski profil. Največ triploidnih sort 8 s tremi aleli se pojavi pri lokusu GA5-G3-10.

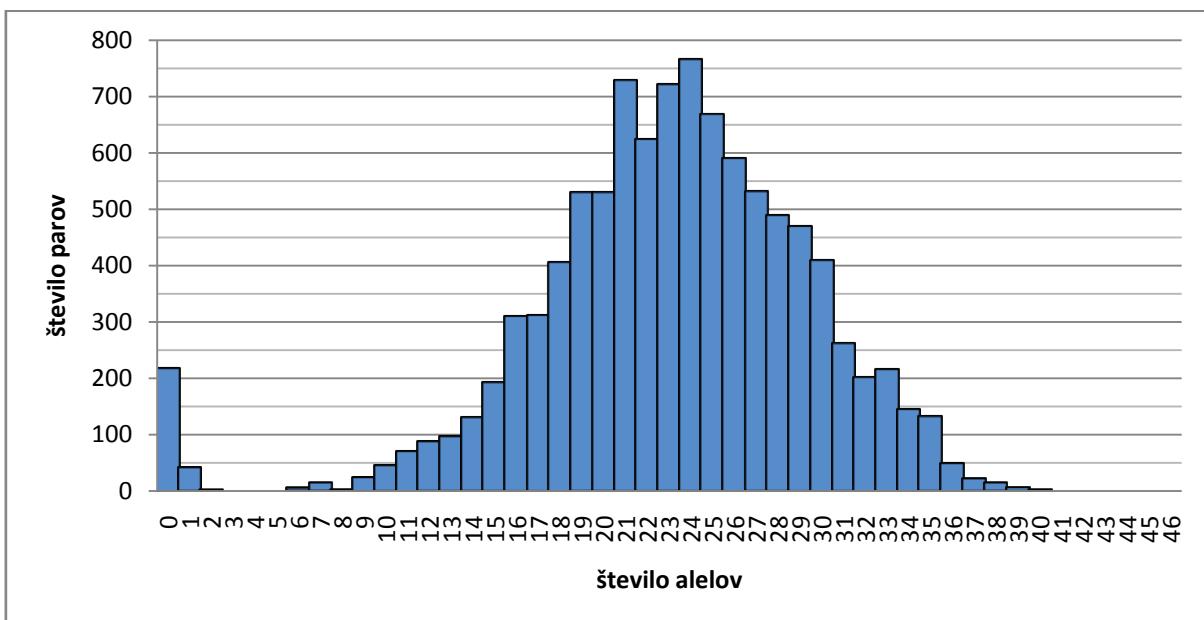
7.2 TRETIJ ALEL PRI DIPLOIDNIH SORAH

Pri določenih diploidnih sortah smo določili pojav dodatnega tretjega alela pri nekaterih lokusih. Priloga G prikazuje diploidne sorte s tremi aleli na določenih lokusih. Sorta ‘Ringwood special’ ima na sedmih lokusih dodatni tretji alel, sledi ji sorta ‘Emerald’ na štirih, sorta ‘Southern brewer’ na dveh, ostale tri sorte ‘Brewers gold’, ‘Chelan’ in ‘Tettnanger’ imajo dodatni tretji alel na enem lokusu. Seznam sort z dodatnim fragmentom

161, ki je dodatno pomnožen lokus (Jakše in sod., 2001) pri lokusu 5-2 pa je prikazan v prilogi H.

7.3 PARNE PRIMERJAVE ALELNIH RAZLIK

Distribucijo števila alelnih razlik med 142-imi analiziranimi sortami hmelja za vse možne parne primerjave genotipov (skupaj 10.011 primerjav) prikazuje slika 6. Primerjave smo izvedli s pomočjo Excelovega vtičnika The Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1.



Slika 5: Histogramska porazdelitev parnih primerjav

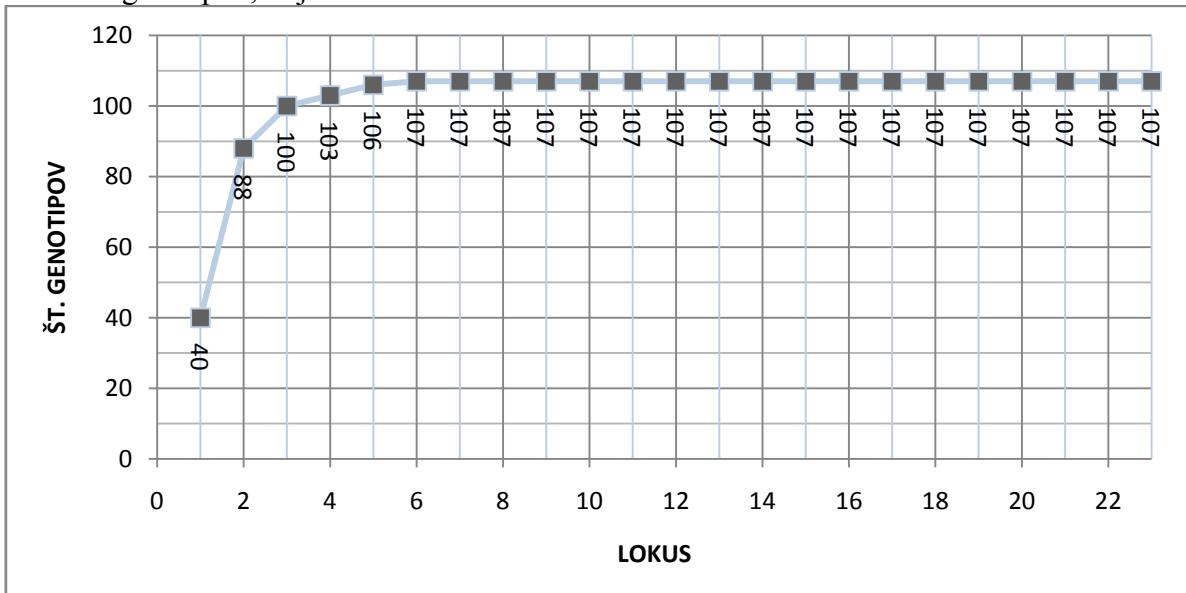
Določili smo 54 sorte, pri katerih v parnih primerjavah med seboj ne opazimo nobenega razlikovanja med aleli – ujemanje alelov je 100 %, takih parnih primerjav je bilo 216 (preglednica 5). Sorte so predstavljene v prilogi I. Določili smo tudi tiste sorte, ki se v parnih primerjavah razlikujejo v le enem alelu, (priloga I), takih parnih primerjav je bilo 40 (preglednica 5). Razlikovanje v 24 aleilih smo zasledili pri 764 parih primerjav – največ v raziskavi (slika 5). Največje število različnih alelov imajo sorte, ki se razlikujejo med seboj v 38-ih, 39-ih in 40-ih aleilih (priloga I in slika 5). Par sort, ki bi se med seboj ločil pri vseh 46-ih aleilih ne obstaja.

Preglednica 5: Število parnih primerjav pri razlikovanju za 0 alelov, 1 alel, 38 alelov, 39 alelov in 40 alelov

Razlikovanje v 0 alelov	Razlikovanje v 1 alelu	Razlikovanje v 38-ih aleilih	Razlikovanje v 39-ih aleilih	Razlikovanje v 40-ih aleilih
216 parov primerjav	40 parov primerjav	13 parov primerjav	6 parov primerjav	2 para primerjav

S pomočjo programske skripte, ki je napisana v R okolju – AMaCAID, smo določili šest lokusov, s katerimi lahko ločimo 107 genotipov hmelja med seboj (slika 6). Ti lokusi so:

HlAGA7, 5-2, 11a59, EMHL015, GA4-P11-9 in GT1-K1-4. Ostalih 35 genotipov ne moremo ločiti na nobenem od 23-ih analiziranih lokusov. Slika 6 prikazuje število različnih genotipov, ki jih lahko določimo z različnim številom lokusov.



Slika 6: Prikaz razlikovanja števila genotipov glede na število lokusov

7.4 IDENTIFIKACIJA SORT HMELJA

Po ročnem pregledu rezultatov, na osnovi rezultatov Microsatellite Toolkita in AMaCAID skripte smo 54 sorte razvrstili v 15 skupin genotipov, ki imajo na vseh lokusih identičen alelni profil in jih med seboj nismo uspeli ločiti. Te sorte so predstavljene v prilogi J. V prvo največjo skupino spada 20 sorte. Skupina predstavlja selekcijo stare pokrajinske sorte žateškega hmelja. Sledi ji skupina z 8 sorte, kjer sta tudi sorte 'Savinjski golding' in 'Fuggle'. Skupina predstavlja klonske selekcije stare angleške sorte 'Fuggle'. Dvanajst parov sorte je bilo tudi identičnih, tu je všteta tudi analiza dveh vzorcev sorte 'Yeoman'.

7.5 IDENTIFIKACIJA SLOVENSKIH SORT HMELJA

Med 142 sorte je bilo tudi 13 slovenskih sorte hmelja: 'Apolon', 'Atlas', 'Aurora', 'Blisk', 'Bobek', 'Buket', 'Cekin', 'Celeia', 'Cerera', 'Cicero', 'Savinjski golding', 'Dana' in '31/299-nova sorta', medtem ko sorta 'Ahil' v pričujoči raziskavi ni bila analizirana. S pomočjo AMaCAID skripte smo določili lokus GA7-A6-14 s pomočjo katerega vidimo 9 različnih haplotipov slovenskih sorte: 'Apolon', '31/299-nova sorta', 'Cerera', 'Buket', 'Blisk' in 'Dana' imajo edinstven genotip, medtem ko ne moremo ločiti 'Celeia' in 'Savinjskega goldinga', isti genotip pa imajo tudi 'Cicero', 'Cekin' in 'Aurora'. Za ločitev vseh sorte sta najbolj optimalna kombinacija lokusa 1 in 4, to sta lokusa Ho0163 in 5-2, s pomočjo katerih ločimo med seboj vseh 13 analiziranih slovenskih sorte hmelja. Sistem ločevanja slovenskih sorte je predstavljen v preglednici 6.

Preglednica 6: Sistem ločevanja slovenskih sort hmelja

sorta	Ho0163	5-2
‘Cekin’	176: 174	196: 192
‘Blisk’	176: 174	196: 194: 161
‘Atlas’	176: 174	196: 196
‘Aurora’	176: 176	192: 190
‘Dana’	176: 176	196: 161
‘Savinjski golding’	176: 176	196: 192: 161
‘Cicero’	176: 176	196: 192: 190
‘Buket’	178: 176	196: 192
‘31/299 nova sorta’	180: 176	192: 161
‘Apolon’	186: 174	196: 192
‘Cerera’	186: 176	192: 190: 161
‘Bobek’	186: 176	196: 192
‘Celeia’	186: 176	196: 194: 192

8 RAZPRAVA IN SKLEPI

Metoda izolacije hmeljne DNA s CTAB detergentom po Kump in sod. (1992) se je izkazala za učinkovito pri hmelju. Postopek temelji na uporabi kationskega detergenta v raztopini z visoko ionsko močjo ($> 0,7 \text{ M NaCl}$). V teh pogojih tvori cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) komplekse s proteini in z večino kislih polisaharidov, medtem ko nukleinskih kislin ne obori (Sambrook in Russell, 2001). Tudi sicer omenjeno metodo v laboratoriju katedre uporabljajo pri izolaciji DNA iz različnih rastlinskih vrst. Tudi številne druge študije hmeljne dednine potrjujejo uporabnost CTAB izolacije pri hmelju (Abbot in Fedele, 1994; Brady in sod., 1996). Merjenje koncentracije DNA s fluorometrom je tudi potrdilo uspešnost izolacije, saj so se koncentracije DNA gibale v območju od 109 ng/ μl do 3810 ng/ μl . To pomeni, da smo skupaj izolirali DNA pri enem vzorcu v razponu od 6,5 do 22,8 μg .

Genotipizacija s pomočjo fluorescentnih začetnih oligonukleotidov je natančna, hitra in zanesljiva metoda in superiora v primerjavi z ostalimi načini detekcije mikrosatelitov kot sta na primer detekcija z radioaktivnimi elementi (Brady in sod., 1996) ali barvanje s srebrom (Jakše in sod., 2001). Prednost te metode je tudi spremljanje barv različnega spektra v eni kapilari, kar nam omogoča, da lahko istočasno spremljamo vsaj štiri lokuse, kot smo to izvedli v našem primeru. Računalniška analiza nam omogoča, da med seboj hitro primerjamo sorte oz. genotipe na enakih ali različnih lokusih. Program Genemapper omogoča tudi izvoz podatkov v tekstovnem formatu in s tem omogoča uporabo in analizo genotipskih podatkov v drugih programih.

Naš prvi cilj naloge je bil izbrati primeren set mikrosatelitnih lokusov za analizo svetovnih sort hmelja iz znanega nabora objavljenih mikrosatelitnih lokusov (Brady in sod., 1996; Jakše in sod., 2002, 2008; Hadonou in sod., 2004; Štajner in sod., 2005). V prvem koraku smo iz literature izbrali set 58-ih lokusov, ki so bili po podatkih najbolj polimorfni in kazali pomnoževanje enega lokusa. Na podlagi rezultatov preliminarnega pomnoževanja teh lokusov smo izbrali 23 lokusov, ki smo jih analizirali na vseh 142-ih sortah. Pri izboru lokusov smo se odločali glede na velikost in jasnost signala, detektiran polimorfizem in nagnjenost k produciranju alelov, ki so posledica velikega števila zdrsa polimeraze. Uporabljeni lokusi so imeli dinukleotidne in trinukleotidne motive, 18 lokusov je bilo dinukleotidnih in 5 trinukleotidnih. Prednost trinukleotidnih lokusov je v tem, da je zdrs polimeraze pri njih znatno manjši in je s tem lažje določanje velikosti alelov (Hearne in sod., 1992; Diwan in Cregan, 1997).

Pri vseh 23-ih lokusih smo uspešno pomnožili več alelov, se pravi, da so bili lokusi polimorfni. Pri 142-ih vzorcih/sortah hmelja (128 diploidnih, 14 triploidnih) svetovne kolekcije smo na 23-ih lokusih namnožili 219 fragmentov DNA oz. alelov. Povprečno smo pomnožili 9,52 alelov na lokus. Najmanj polimorfen lokus EMHL022 ima le tri alele, najbolj polimorfen HlGA27 pa 17, od tega je pet specifičnih. Zanimivo je to, da omenjeni lokus ni eden izmed tistih šestih, s katerimi je mogoče določiti 107 sort. Brady in sod.

(1996) so z uporabo štirih parov začetnih oligonukleotidov odkrili manjše povprečno število alelov na lokus (6,8), je pa res, da so analizirali samo 24 hmeljnih genotipov v študiji. Povprečno število alelov na lokus je podobno nedavni študiji 24-oh lokusov (Jakše in sod., 2008), kjer so določili pri 34-ih divjih akcesijah hmelja 9,9 povprečno alelov na lokus.

Največji razpon alelov ima lokus GT1-K1-4 od 125 bp do 215 bp, najmanj pa EMHL022 od 219 bp do 223 bp. Pri nekaterih sortah, kjer sta prisotna zelo dolg in kratek alel, smo opazili pojav, ki ga imenujejo dominanca kratkega alela (Wattier in sod., 1998). To lahko opazimo tako, da je daljši alel slabše intenzitete v primerjavi s krajskim aleлом. Avtorji to razlagajo s kompeticijo kratkega alela v reakciji PCR. Za lokuse smo izračunali tudi druge mere variabilnosti in razlikovanja: dejansko heterozigotnost (H_0), pričakovano heterozigotnost (H_e), verjetnostjo enakosti genotipov (PI), informacijsko vrednost polimorfizma (PIC) in frekvenco ničnih alelov. Med vsemi lokusi v poizkusu je najbolj primeren lokus za gensko kartiranje (PIC vrednost) GA5-G3-10. Najbolj polimorfen je HIAGA27 in ima 17 alelov, najmanj polimorfen je EMHL022 in ima le tri alele.

Identifikacija hmeljnih kultivarjev je pomembna pri ločevanju sadilnega materiala (Abbot in Fedele, 1994; Čerenak in sod., 2003), pri identifikaciji pristnosti tržnega pridelka – hmeljnih storžkov (Araki in sod., 1998) in pri upravljanju z genskimi viri v genskih bankah (Hokanson in sod., 1998).

Z alelnim polimorfizmom smo ločili 107 od skupno analiziranih 142 vzorcev v raziskavi. S pomočjo programske skripte AMaCAID (Caroli in sod., 2011) smo ugotovili, da bi bilo potrebno za identifikacijo 107-ih genotipov hmelja uporabiti samo šest lokusov, to so: HIAGA7, 5-2, 11a59, EMHL015, GA4-P11-9 in GT1-K1-4. Preostalih 35 genotipov ne moremo ločiti med seboj. Povprečno število alelov med temi šestimi lokusi je 9. Vseh 13 slovenskih sort ločimo s pomočjo lokusa Ho0163 in 5-2 (preglednica 6).

Verjetnost enakosti genotipov (PI, preglednica 4), ki se uporablja tudi kot merilo ločevanja, je kljub večjemu številu alelov na lokus zaradi njihove neenakomerne frekvenčne porazdelitve relativno visoka. PI je najnižja pri lokusu GA5-G3-10 (0,065, se pravi, da na vsakih 15 osebkov v populaciji lahko dobimo dva z enakim genotipom), najvišja pa pri lokusu EMHL022 (0,74, približno na vsake 1,3 osebka imata dva enak genotip). Če vrednosti PI med seboj pomnožimo na vseh 23-ih lokusih, je rezultat $3,13 \times 10^{-15}$. To pomeni, da imata v naši hipotetični populaciji dva izmed $3,2 \times 10^{14}$ osebkov enak genotip na vseh lokusih.

Na 16 lokusih smo odkrili tudi 30 genotipno specifičnih alelov (priloga D), ki omogočajo takojšno identifikacijo 17 sort med vsemi 142-imi analiziranimi.

Naredili smo tudi frekvenčno porazdelitev parne primerjave različnosti alelov med genotipi. Vseh primerjav je bilo 10.011. Rezultat ponazarja slika 6. Pri 216 parih

primerjavah sort smo ugotovili, da se ne razlikujejo v nobenem alelu – sem sodi 15 skupin genotipov, v kateri so identični genotipi in jih med seboj nismo ločili. Pri 40 parnih primerjavah genotipov se te razlikujejo samo v enem alelu. V to skupino spadajo po vsej verjetnosti sorte, ki so mutanti klonske selekcije sort, saj razlika samo v enem alelu pri 23-ih lokusih ne more biti rezultat spolnega razmnoževanja, ampak kvečjemu rezultat npr. somatske mutacije, ki se je obdržala s klonsko selekcijo. Iz porazdelitve ostalih števil razlik parnih primerjav vidimo, da krivulja spominja na Gaussovo krivuljo. Taka porazdelitev je značilna za spolno razmnožene rastline (Achtak in sod., 2010). Krivulja doseže vrh pri 24-ih alelih, ki se razlikujejo pri 764 primerjavah. Od tu naprej se frekvence zmanjšujejo do 39 različnih alelov. Nobena parna primerjava se ne razlikuje v 40-ih, 41-ih, 42-ih, 43-ih, 44-ih, 45-ih ali 46-ih alelih.

Triploidne sorte, v analizo jih je bilo vključenih 14, so po pričakovanjih imele na vsaj enem lokusu trialelni profil (priloga F). Težava triploidnih sort je, da smo uporabljali statistične programe, ki ne omogočajo izračunavanja statistike za tretji alel. Zaradi tega smo morali tretji alel odstraniti iz analize.

Trialelne profile smo odkrili na določenih lokusih tudi pri 26 diploidnih sortah. Prvi tak primer je bil opisan pri lokusu 5-2 (Jakše in sod., 2001), kjer so s segregacijsko analizo dokazali, da gre za pomnoževanje dodatnega alela. Tudi v našem primeru smo pri velikem številu sort na omenjenem lokusu 5-2 kot tretji alel zasledili fragment 161 bp, (priloga H). V našem primeru, so tretji aleli pri drugih lokusih zelo redki, zato verjetno ne gre za pomnoževanje dodatnega lokusa, razen pri lokusu HIGA24, kjer ima fragment 192 analiziranih 15 sort. Pojav tretjega alela bi lahko razložili z identičnim pojavljanjem treh alelov pri vinski trti. Pri trti pride do himerizma rastnega vršička, ta mutacija se nato stabilizira preko klonske selekcije (Pelsy, 2010). Verjetno gre za podoben mehanizem tudi pri hmelju, saj je razmnoževanje zelo podobno kot pri vinski trti, le da do sedaj tak tip mutacij pri hmelju še ni bil opisan.

Dobljene rezultate genotipizacije in identifikacije bomo uporabili za gradnjo podatkovne baze sort hmelja, tako kot so to naredili že pri nekaterih drugih rastlinskih vrstah. Za vinsko trto (*Vitis vinifera*) obstaja več mikrosatelitnih zbirk, med njimi so: VIVC (Vitis International Variety Catalogue), ki omogoča identifikacijo 46-ih evropskih sort z uporabo šestih mikrosatelitskih markerjev, švicarska mikrosatelitska podatkovna zbirka (SVMD - Swiss Vitis Microsatellite Database) vključuje genotipe za 170 sort vinske trte analizirane na šestih mikrosatelitskih lokusih, obstajajo tudi grške, italijanske in hrvaške mikrosatelitne zbirke (Štajner, 2010). Podobne zbirke so narejene tudi za določevanja oljk (*Olea europaea*) (Bandelj Mavšar, 2006).

9 POVZETEK

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) spada med konopljevke (Cannabaceae) in je dvodomna rastlina, katere gencenter je Kitajska. Gospodarsko pomembna je le ženska rastlina zaradi hmeljnih storžkov.

Za genotipizacijo hmelja smo uporabljali mikrosatelitne markerje, to so odseki ponovljive DNA, katerih osnovni motivi so dolgi od 2 do 8 bp. Motivi so tako dinukleotidni, trinukleotidni, tetranukleotidni ali višjega razreda (do 8 bp). Visoka stopnja mutacij teh regij omogoča, da so mikrosatelični zelo variabilni del genoma, kar izkoriščamo pri aplikacijah molekulskih markerjev.

Večina vzorcev sort hmelja je bila nabранa v koleksijskem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu, nekatere druge pa pridobljene s pomočjo mednarodnih kontaktov. Iz nabranih vzorcev rastline smo izolirali DNA po metodi Kump in sod. (1992), koncentracijo pa smo izmerili s pomočjo fluorometra Dyna QuantTM 200. Mikrosatelični so bili predhodno testirani, da smo kasneje izbrali najbolj optimalne za genotipizacijo. Namnoževanje fragmentov DNA je potekalo s pomočjo PCR tehnike. Končane plošče smo poslali na Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete, kjer je potekala analiza na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130XL.

Statistična obdelava je potekala s pomočjo različnih statističnih programov: vtičnika za Excel the Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1, Cervus 3.0, AMaCAID in MICROSAT 1.5. Za analizirane sorte smo določili: število alelov na lokus, število homozigotnih in heterozigotnih sort, genotipsko specifične alele ter druge statistične vrednosti za lokuse.

Lokus HIGA27 je najbolj polimorfen s 17 aleli, najmanj alelov ima pa EMHL022, le 3. Določili smo tudi 30 specifičnih alelov pri 16 lokusih s pomočjo katerih lahko takoj ločimo 17 različnih sort. Največ specifičnih alelov, kar 4, ima sorta 'Southern promise'. V analizo je bilo vključenih tudi 14 triploidnih sort. Trialelni genotipski profil smo določili pri vseh sortah, največ pri sorti 'Blisk' na 9 lokusih, sledi ji sorta 'Crystal' na 8 lokusih (priloga F).

Določili smo 54 sorte, pri katerih v parnih primerjavah med seboj ne opazimo nobenega razlikovanja med aleli: takih primerjav je 216. S pomočjo rezultatov smo pokazali, da lahko ločimo 107 genotipov hmelja s pomočjo le 6 lokusov, ostalih med seboj ne moremo ločiti. Ostalih 35 genotipov smo razdelili v 15 skupin. Sorte v posamezni skupini imajo enak genotip. V enem alelu se razlikuje 40 parov primerjav, v 41-ih, 42-ih, 43-ih, 44-ih, 45-ih ali 46-ih alelih se ne razlikujeta nobena genotipa.

10 VIRI

- Achtak H., Ater M., Oukabli A., Santoni S., Kjellberg F., Khadari B. 2010. Traditional agroecosystems as conservatories and incubators of cultivated plant varietal diversity: the case of fig (*Ficus carica* L.) in Morocco. BMC Plant Biology, 10: 28
- Animal Genomics Laboratory, UCD. 2008. The Excel microsatellite toolkit (20.mar. 2011) <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/> (22. maj 2011)
- Applied Biosystems, 2010
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_039944.pdf (1. jun. 2011)
- Applied Biosystems, 2011
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html> (1. jun. 2011)
- Araki S., Tsuchiya Y., Takashio M., Tamaki T., Shinotsuka K. 1998. Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 56: 81-130
- Baldoni L., Cultrera N. G., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G. G., Buonamici A., Porceddu A., Sarri S., Ojeda M. A., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimoneti A., Muzzalupo I., Casagrande A., Lain O., Messina R., Testolin R., 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. Molecular Breeding, 24: 213-231
- Bandelj Mavsar D. 2006. Mikrosatelitski markerji in njihova uporabnost v oljkarstvu. Series Historia Naturalis, 16, 2: 209-222
- Baričevič D. 1996. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti - surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za agronomijo: 81 str.
- Barlett J. M. S., Stirling D. 2003. PCR Protocols 2nd, volume 226. New Jersey, Human Press: 1033 str.
- Brady J. L., Scott N. S., Thomas M. R. 1996. DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). Euphytica, 91: 277-284
- Boyer R., 2002. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

- Caroli S., Santoni S., Ronfort J. 2011. AMaCAID: a useful tool for Accurate Marker Choice for Accession Identification and Discrimination. *Molecular Ecology Resources*, 11, 3
- Carrier F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSR) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 301-307
- Cipriani G., Teresa Marrazzo M., Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M., Testolin R. 2008. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biology*, 8: 127
- Colby C. 2008. Hop Harvest Update, 2008. Brew (nov. 2008) <http://www.byo.com/component/resource/article/1724-2008-hop-harvest-update> (1. april. 2008)
- Cukala L. 1965. Problematika hmeljskega trga. V: Celjski zbornik. Celje, Celjska tiskarna v Celju: 93-147
- Čerenak A., Jakše J., Javornik B. 2003. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers. *The Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62, 1: 1-7
- Diwan N., Cregan P. B. 1997. Automated sizing of fluorescent-labelled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 723-733
- FAOSTAT. 2008
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (1. april 2011)
- Goldstein D., Schlötterer C. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford: 352 str.
- Hartl L., Seefelder S. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 112-116
- Hadonou A. M., Walden R., Darby P. 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.) *Molecular Ecology Notes*, 4, 2: 280–282
- Haunold A. 1972. Polyploid breeding with hop *Humulus lupulus* L. *Technical Quarterly of Masters Brewers Association of America*, 9, 1: 36-40

Haunold A., Zimmermann C. E. 1974. Pollen collection, crossing and seed germination of hop. *Crop Science*, 14: 774-76

Hearne C.M., Ghosh S., Todd J.A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genetics*, 8, 8: 288–294

Hokanson S. C., Szewc-McFadden A. K., Lamboy W. F., McFerson J. R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 671-683

Hop Report. 2008. Agriculture and Rural development.

http://ec.europa.eu/agriculture/markets/hops/report2008/tables_en.pdf (1. april. 2004)

Humulus lupulus-droga

<http://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/humulus.htm> (20. feb. 2011)

Inbarco Slovenia. 2011.

http://www.inbarco.si/docs/inbarco_catalog.pdf (20. mar. 2011)

Innis M. A., Gelfand D. H, Sninsky J. J., White T. J. 1990. PCR Protocols, Academic Pres, Inc., San Diego: 482 str.

Kač L. 1951. Hmeljarstvo v Savinjski dolini. V: Celjski zbornik. Celje, Celjska tiskarna v Celju: 67-84

Kalinowski S. T., Taper M. L. Marshall T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1006

Kralj D. 1987. Žlahnjenje rodovitnega aromatičnega hmelja (*Humulus lupulus* L.) z metodo poliploidije. V: VI. Jugoslovanski simpozij za hmeljarstvo, Žalec, marec 1989. Dolinar M., Žalec, Institut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 7-23

Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visoko molarne DNA iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani – Kmetijstvo, 59: 63-66

Lawyer F. C., Stoffel S., Saiki R. K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 11: 6427-6437

Jakše J., Bandelj D., Javornik B. 2002. Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus L.*) Molecular Ecology Notes, 2, 4: 544–546

Jakše J., Šuštar-Vozlič J., Javornik B. 1994. Identification of hop cultivars by RAPD markers. V: Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture, December 5th - 7th 1994, Rogla, Slovenia. Javornik B., Bohanec B., Kreft I. (eds.). Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Centre for Plant Biotechnology and Breeding: 147-151

Jakše J., Kindlhofer K., Javornik B. 2001. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. Genome, 44: 773-782

Jakše J. 2003. Izolacija mikrosatelitnih lokusov na kromosomski DNA hmelja (*Humulus lupulus L.*) z obogatitvenim postopkom. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 141 str.

Jakše J., Štajner N., Kozjak P., Cerenak A., Javornik B. 2007. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus L.*). Molecular Breeding, 21, 2: 139-148

Jakše J., Luthar Z., Javornik B. 2008. New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus L.* Molecular Ecology Resources, 8, 4: 769-772

National hop report - 2008 Hop Production Up 34 Percent. 2008. NASS (18. Dec. 2008)
<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/nass/hops//2000s/2008/hops-12-18-2008.pdf> (1. april 2008)

NCGR-Corvallis - Humulus Germplasm, 2010, United States Department of Agriculture (16. avg. 2010).
<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11069> (21. jan. 2011)

Neve R.A. 1991. Hops. Chapman and Hall, New York: 266 str.

Meldgaard M., Morling N. 1997. Detection and quantitative characterization of artificial extra peaks following polymerase chain reaction amplification of 14 short tandem repeat systems used in forensic investigation. Electrophoresis, 18: 1928-1935

Microsatellite DNA Methodology. 2001. Department of Biology, Davidson College
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/microsatellite.html> (20. jan 2011)

Microsatellite. 2010. Citizendum (13. feb 2010).

<http://en.citzendum.org/wiki/Microsatellite> (20. jan. 2011)

Morgante M., Olivieri A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182

Opisna sortna lista Republike Slovenije. Opisna sortna lista za hmelj 2009. 2009. Ljubljana, Republika Slovenija Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 18 str

Patzak J., Oriniaková P., Matouek J., Svoboda P. 1999. Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. *Rostlinná Výroba*, 45: 165-172

Patzak J., Nesvadba V., Henychová A., Karel Krofta K. 2009. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus L.*) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 2: 136–145

Pelsy F. 2010. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity*, 104: 331-340

Pivovarstvo v Sloveniji skozi zgodovino. 2003. E-juurnal – Slovenian project work (14. nov 2003)
[http://ejournal.eduprojects.net/slo/index.php?action\[\]=%IArticleShow::showArticle%20%273668%27%29](http://ejournal.eduprojects.net/slo/index.php?action[]=%IArticleShow::showArticle%20%273668%27%29) (1. april. 2011)

Pol stoletja hrama zelene učenosti. 2002. Institut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. http://www.ihps.si/index.php?option=com_content&task=view&id=5&Itemid=6&lang=si (20. jan. 2011)

Polymerase chain reaction. 2005. Integrated DNA Technologies (2005)
<http://www.scribd.com/doc/21566547/Polymerase-Chain-Reactio> (01. feb. 2011)

Saiki R.K., Scharf S., Falooma F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 4732: 1350-1354

Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 2.344 str.

Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5: 63-69

- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.
Nature America, 18: 233-234
- Seefelder S., Ermaier H., Schweizer G., Seigner E. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. Plant Breeding, 119: 257-263
- Small E. 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographical taxa of *Humulus*. Systematic Botany, 3, 1: 37-76
- Statistični urad RS. 2011. Površine s poljščinami, Slovenija (30. Sep. 2010)
http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=3444 (20.mar. 2011)
- Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Acta agriculturae Slovenica, 95, 2: 183-192
- Štajner N., Jakše J., Kozjak P., Javornik B. 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science, 168, 1: 213-221
- Townsend M. S., Henning J. A. 2009. AFLP Discrimination of Native North American and Cultivated Hop. Published in Crop Science, 49, 2: 600–607
- Wagner H.W., Sefc K. M. 1999. IDENTITY 1.0. Vienna, Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences.
- Wattier, R., Engel, C.R., Saumitou-Laprade, P., Valero, M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). Molecular Ecology, 7, 11: 1569–1573

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Jerneju Jakšetu za vso pomoč, nasvete in navodila pri pisanju diplomske naloge.

PRILOGA A
Seznam vseh genotipiziranih sort

št.	sorta	ploidnost	poreklo
1	‘31/299-nova sorta’	2n	Slovenija
2	‘Apolon’	2n	Slovenija
3	‘Admiral’	2n	Anglija
4	‘Agnus’	2n	Češka
5	‘Aquila’	2n	ZDA
6	‘Aromat’	2n	Češka
7	‘Atlas’	2n	Slovenija
8	‘Aurora’	2n	Slovenija
9	‘Bačka’	2n	Srbija
10	‘Blisk’	3n	Slovenija
11	‘Bobek’	2n	Slovenija
12	‘Bor’	2n	ZDA
13	‘Braustern’	2n	Nemčija
14	‘Brewers gold’	2n	VB
15	‘Buket’	2n	Slovenija
16	‘Bullion’	2n	Anglija
17	‘Callicross’	2n	Nova Zelandija
18	‘Cascade’	2n	ZDA
19	‘Cekin’	3n	Slovenija
20	‘Celeia’	3n	Slovenija
21	‘Cerea’	3n	Slovenija
22	‘Chang bei 1’	2n	Kitajska
23	‘Chang bei 2’	2n	Kitajska
24	‘Chelan’- Probasco	2n	ZDA
25	‘Chinook’	2n	ZDA
26	‘Cicero’	3n	Slovenija

št.	sorta	ploidnost	poreklo
27	‘Citra’	2n	ZDA
28	‘Cluster’	2n	ZDA
29	‘Cobbs’	2n	VB
30	‘Cogneau’	2n	Poljska
31	‘Columbus’	2n	ZDA
32	‘Comet’	2n	ZDA
33	‘Crystal’	3n	ZDA
34	‘Dana’	2n	Slovenija
35	‘Diva’	2n	VB
36	‘Dunav’	2n	Srbija
37	‘Early bird golding’	2n	VB
38	‘Eastwell golding’	2n	Anglija
39	‘Ellupulo’	2n	Argentina
40	‘Emerald’	2n	Nemčija
41	‘Estera’	2n	Poljska
42	‘First choice’	2n	Nova Zelandija
43	‘Fuggle’	2n	VB
44	‘Fukuyutaka’	2n	Japonska
45	‘Galena’	2n	ZDA
46	‘Ging dao do hua’	2n	Kitajska
47	‘Glacier’	2n	ZDA
48	‘Golden star’	2n	Japonska
49	‘Groene bel’	2n	Belgija
50	‘Hallertauer gold’	2n	Nemčija
51	‘Hallertauer mittelfruher’	2n	Nemčija
52	‘Hallertauer tradition’	2n	Nemčija

Se nadaljuje

nadaljevanje

št.	sorta	ploidnost	poreklo
53	'Harmony'	2n	Češka
54	'Herald'	2n	VB
55	'Herkules'	2n	Nemčija
56	'Hersbrucker'	2n	Nemčija
57	'Hüller aroma'	2n	Nemčija
58	'Hüller bitterer'	3n	Nemčija
59	'Iwanovecki'	2n	Poljska
60	'Izabela'	2n	Poljska
61	'Kazak'	2n	ZDA
62	'Keyworth midseason'	2n	VB
63	'Kirin 1'	2n	Japonska
64	'Kirin 2'	2n	Japonska
65	'Kitamidori'	2n	Japonska
66	'Kostromsky'	2n	Poljska
67	'Kruglak siriak'	2n	Poljska
68	'Late cluster'	2n	ZDA
69	'Liberty'	3n	ZDA
70	'Lublinsky'	2n	Poljska
71	'Magnum'	2n	Nemčija
72	'Marynka'	2n	Poljska
73	'Mathon'	2n	VB
74	'Merkur'	2n	Nemčija
75	'Millenium'	3n	ZDA
76	'Mounth hood'	3n	ZDA
77	'Nadwislandsky'	2n	Poljska
78	'Neoplanta'	2n	Srbija
79	'Nordgard 1478'	2n	Danska

št.	sorta	ploidnost	poreklo
80	'Nordgard 978'	2n	Danska
81	'Northeren brewer'	2n	VB
82	'Nugget'	2n	ZDA
83	'Omega'	2n	VB
84	'Opal'	2n	Nemčija
85	'Osvalдов klon 126'	2n	Češka
86	'Osvalдов klon 72'	2n	Češka
87	'Outenqua'	2n	Južna Afrika
88	'Pacific gem'	3n	Nova Zelandija
89	'Perle'	2n	Nemčija
90	'Petrovački červenjak'	2n	Češka
91	'Poljski klon 12'	2n	Poljska
92	'Poljski klon 34'	2n	Poljska
93	'Precoce de bourgogne'	2n	Francija
94	'Premiant'	2n	Češka
95	'Pride of kent'	2n	VB
96	'Pride of ringwood'	2n	Avstralija
97	'Record'	2n	Nemčija
98	'Ringwood special'	2n	Avstralija
99	'Saazer'	2n	Češka
100	'Saladin'	2n	Belgija
101	'Saphir'	2n	Nemčija
102	'Sara'	2n	Belgija
103	'Savinjski golding'	2n	Slovenija
104	'Serebrjanka'	2n	Rusija
105	'Sirem'	2n	Češka
106	'Sladek'	2n	Češka

Se nadaljuje

Nadaljevanje

št.	sorta	ploidnost	poreklo	št.	sorta	ploidnost	poreklo
107	'Smaragd'	2n	Nemčija	125	'Vojvodina'	2n	Srbija
108	'Smooth cone'	2n	Nova Zelandija	126	'Warrior'	2n	ZDA
109	'Southeren brewer'	2n	Južna Afrika	127	'White bine'	2n	Belgija
110	'Southeren star'	2n	Južna Afrika	128	'Willamette'	3n	ZDA
111	'Southern promise'	2n	Južna Afrika	129	'Würtenberger'	2n	Nemčija
112	'Spalter select'	2n	Nemčija	130	'Wye challenger'	2n	VB
113	'Spalter'	2n	Nemčija	131	'Wye northdown'	2n	VB
114	'Star'	2n	Belgija	133	'Wye target'	2n	VB
115	'Sterling'	2n	ZDA	134	'Wye viking'	2n	VB
116	'Strissel spat'	2n	Francija	135	'Yeoman 1'	2n	VB
117	'Symphony'	3n	ZDA	136	'Yeoman 2'	2n	VB
118	'Tardif de bourgogne'	2n	Francija	137	'Zenith'	2n	VB
119	'Taurus'	2n	Nemčija	138	'Zlatan'	2n	Češka
120	'Tettnanger'	2n	Nemčija	139	'Žateški polurani červenjak'	2n	Češka
121	'Topaz'	3n	Avstralija	140	'Žitomirski klon 16'	2n	Ukrajina
122	'Tutsham'	2n	VB	141	'Žitomirski klon 18'	2n	Ukrajina
123	'Univerzal'	2n	Rusija	142	'Žitomirski klon 34'	2n	Ukrajina
124	'Urožajni'	2n	Rusija				

PRILOGA B

Priprava raztopin za izolacijo rastlinske DNA

CTAB pufer (1000 ml)

CTAB	20 g
1M Tris-HCl, pH 8	100 ml
0,5M EDTA, pH 8	80 ml
NaCl	81,8 g
dH ₂ O	do 1000 ml

nato avtoklaviramo, pred uporabo dodamo še 2 ml merkaptoetanola

TE pufer (1000 ml)

1M Tris-HCl, pH 8	10 ml
0,5M EDTA, pH 8	2 ml
dH ₂ O	do 1000 ml

0,5M EDTA, pH 8 (200 ml)

EDTA	37,22 g
dH ₂ O	do 200 ml

nato avtoklaviramo

1M TRIS, pH 8 (100 ml)

TRIS	12,11 g
dH ₂ O	do 100 ml

nato avtoklaviramo

3M NaAc (natrijev acetat), pH 5,2 (100 ml)

NaAc	24,61 g
dH ₂ O	do 100 ml

nato avtoklaviramo

PRILOGA C

Spodnja preglednica prikazuje lokuse, ki smo jih uporabili pri genotipizaciji sort hmelja,
uporabljeni fluorescentni barvila in protokole pomnoževanja

Št.	Ime lokusa	Začetni oligonukleotidi	TAIL	Protokol pomnoževanja
1	Ho0163	TCAACACCATTGGCCTCA * ³ TGGAGACGAAGAACCCAC	6FAM	TD 55
2	ACA1-K9-3	ATCCTTCTCTATTACATACTCAGC *CCTATGACGGTTCTATGAGTGC	6FAM	TD 52
3	HlAGA7	*ACAAGCAGTAATGATGAGGA TCCAAGTCTCTCAATTAGGAA	6FAM	Glej spodaj ⁴
4	5-2	*CGAATGGTCCTAGATATCCCC CAGTAATGGATGCTTGAAGGC	6FAM	TD 55
5	GT4-F23-14	*GGATGGTCACCGTCTTCTTT CAATTGATGTGAAGGGTGTGTTG	6FAM	TD 55
6	HlGT17	*GGTCCTTAGTCACTTGCCAAT GAECTGTTGAAGCACAATCAA	6FAM	TD 54
7	11a59	*GCTTCAACCCTCTAATTCTGACC AGAAGGGATACACTCGGTTAATCC	VIC	TD 55
8	GA6-N13-14	*CAAGTGCTCCGAAGTTGAA TCAATCCAAACAACAACAAA	VIC	TD 55
9	EMHL015	*AATCTGTTGACATGGGTGT CACATATATATAAACACACAGAGACG	VIC	TD 55
10	HlGA31	CAAACTTGGTGCTCTAAGATGAA *CGTTTCCCAACACCTAGTTC	VIC	TD 55
11	GA4-K16-8	*AGCTTCCAAGCACTCCAATG GACAGCAAGAGAGGGCTGAGTT	VIC	TD 52+2
12	GA4-P11-9	*CCTAGTCTCGATGCGTCACA CCTCAGGAATCCACCAAAAAA	VIC	TD 55
13	HlGA27	*ATGCAAACGAATGAGCCTT CCATAACCCAATAATCAAACCA	NED	TD 54
14	GT1-K1-4	ACCATGGATATATGTGTAAGATACC *GCATGATTAAAGGTTGCCTCA	NED	TD 52
15	Hl-AGA1	*TCAAGAGCACAAATCCAAA AAGGGAGATACACGTAAAG	NED	TD 53
16	GA5-G3-10	*GCACAAACCAGAGCTCCCTTA CTCGAAATCCAAACAACAC	NED	TD 55
17	ACC2-D3-3	*ATTCACTCCCACCTCTCACC GGAGTTCTGGACTGGGATCA	NED	TD 52
18	GT1-A11-1	AACAAAAACATAAAACAAACACACA *GCCTCAAAACTCAGGGATCA	NED	TD 55
19	Hl-AGA4	ACATAATCAAATCCACCAAAC *AGGACGAAAAGGATTGAAG	PET	TD 53

Se nadaljuje

³ * Predstavlja sekvenco 5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3', ki je pripeta na začetni oligonukleotid

⁴ 95 °C 5 min, sledi 28 ciklov po 45 s pri 94 °C, 30 s pri 54 °C in 1 min 30 s pri 72 °C

nadaljevanje

Št.	Ime lokusa	Začetni oligonukleotidi	TAIL	Protokol pomnoževanja
20	EMHL022	*AGGCGATAGTTGGCTTCT TCACCCCTGGAGAAGACAAAAAA	PET	TD 55
21	HlGT16	*CCGTGATAACAATCTACCCAAA CTCCAGTCAGCAATCTCTCAA	PET	TD 54
22	HlGA24	*AGCAACGTAGTGGAGGCA GCAACCACGAGACCTAACGC	PET	TD 54
23	GA7-A6-14	*GGCAAGGCTAACCAACCATTAA CTGTTCCCGCCAAATTAAA	PET	TD 55

PRILOGA D

Prikaz specifičnih alelov za posamezni lokus pri analiziranih sortah hmelja

Št.	Lokus	Alel (bp)	Sorta
1	Ho0163	182	‘Kazak’
2	ACA1-K9-3	169	‘Aquila’
3	5-2	186	‘Southeren promise’
4	GT4-F23-14	173	‘Ringwood special’
5	HlGT17	193	‘Saphir’
6	11a59	204	‘Kazak’
7	11a59	222	‘Aquila’
8	GA6-N13-14	207	‘Glacier’
9	HlGA31	235	‘Chinook’
10	GA4-P11-9	227	‘Tettnanger’
11	GA4-P11-9	235	‘Comet’
12	GA4-P11-9	247	‘Aquila’
13	HlGA27	219	‘Kazak’
14	HlGA27	253	‘Brewers gold’
15	HlGA27	260	‘Groene bel’

Št.	Lokus	Alel (bp)	Sorta
16	HlGA27	264	‘Diva’
17	HlGA27	266	‘Saphir’
18	GT1-K1-4	150	‘Ringwood special’
19	GT1-K1-4	197	‘Zenith’
20	GT1-K1-4	203	‘Glacier’
21	GT1-K1-4	215	‘Buket’
22	GA5-G3-10	159	‘Glacier’
23	Hl-AGA4	234	‘Dunav’
24	HlGT16	244	‘Southern promise’
25	HlGT16	248	‘Ellupolo’
26	HlGA24	240	‘Southern promise’
27	HlGA24	278	‘Pacific gem’
28	GA7-A6-14	187	‘Saphir’
29	GA7-A6-14	197	‘Ringwood special’
30	GA7-A6-14	199	‘Southern promise’

PRILOGA E

Prikaz razpona alelov (bp) in njihove frekvence pri posameznem lokusu

Št.	Lokus	Razpon alelov (bp)											
1	Ho0163	170	172	174	176	178	180	182* ⁵	186	188	190	192	
	Frekvence alelov	0,0176	0,0352	0,0423	0,5387	0,0106	0,0599	0,0035	0,1796	0,0070	0,0070	0,0986	
2	ACA1-K9-3	169*	178	181	186	192	201	207	210	213	221	227	
	Frekvence alelov	0,0035	0,0634	0,0106	0,2254	0,0070	0,0528	0,0141	0,0986	0,0070	0,4754	0,0423	
3	HIAGA7	173	185	192	195	198	211	220	223	226	232		
	Frekvence alelov	0,0187	0,0448	0,1455	0,3321	0,0746	0,0149	0,1418	0,2052	0,0075	0,0149		
4	5-2	161	168	180	184	186*	188	190	192	194	196	198	
	Frekvence alelov	0,0301	0,0113	0,0226	0,0075	0,0038	0,1579	0,2030	0,1090	0,1015	0,3308	0,0226	
5	GT4-F23-14	154	158	162	171	173*	179						
	Frekvence alelov	0,8821	0,0536	0,0071	0,0071	0,0036	0,0464						
6	HIGT17	172	175	177	179	187	189	191	193*	195	197	199	205
	Frekvence alelov	0,0107	0,0143	0,0250	0,0429	0,0179	0,1357	0,0429	0,0036	0,0143	0,1464	0,3786	0,1679
7	11a59	196	204*	206	208	210	220	222*	224	238	242	260	275
	Frekvence alelov	0,2817	0,0035	0,0070	0,5634	0,0211	0,0458	0,0035	0,0141	0,0176	0,0282	0,0070	0,0070

Se nadaljuje

⁵ * označuje specifične alele

nadaljevanje

Št.	Lokus	Razpon alelov (bp)									
8	GA6-N13-14	207*	217	219	221	223	227				
	Frekvence alelov	0,0035	0,0845	0,2923	0,0951	0,4894	0,0352				
9	EMHL015	171	173	175	177	179					
	Frekvence alelov	0,0146	0,3905	0,5620	0,0255	0,0073					
10	HIGA31	172	174	178	180	182	186	188	200	235*	
	Frekvence alelov	0,0071	0,1844	0,7021	0,0106	0,0177	0,0355	0,0319	0,0071	0,0035	
11	GA4-K16-8	179	181	183	185	187	199	201	203		
	Frekvence alelov	0,0106	0,0177	0,0355	0,3333	0,0213	0,3794	0,1879	0,0142		
12	GA4-P11-9	203	205	207	215	217	219	221	223	227*	229
	Frekvence alelov	0,0429	0,0107	0,1536	0,0107	0,0357	0,0214	0,1750	0,5250	0,0036	0,0071
										0,0036	
13	HIGA27	202	212	214	219*	223	225	227	229	233	235
	Frekvence alelov	0,0211	0,1268	0,0211	0,0035	0,0951	0,0282	0,0141	0,0458	0,1479	0,0070
										0,4401	0,0176
14	GT1-K1-4	125	144	148	150*	164	168	170	184	186	188
	Frekvence alelov	0,0563	0,0141	0,0176	0,0035	0,0141	0,4331	0,3099	0,0176	0,0387	0,0528
										0,0035	0,0035
15	HI-AGA1	270	273	279	285	288	291	294	300	303	306
	Frekvence alelov	0,2430	0,0176	0,0211	0,0317	0,0458	0,0739	0,0106	0,4472	0,0176	0,0915
16	GA5-G3-10	114	126	132	140	142	144	146	148	154	159*
	Frekvence alelov	0,0252	0,0072	0,1367	0,0360	0,1727	0,1007	0,0755	0,0072	0,0216	0,0036
										0,0144	0,0216
										0,0072	0,2266
											0,1439

Se nadaljuje

nadaljevanje

Št.	Lokus	Razpon alelov (bp)										
17	ACC2-D3-3	209	212	215	218	224	227	233				
		Frekvence alelov	0,0213	0,0106	0,7482	0,0638	0,1206	0,0248	0,0106			
18	GT1-A11-1	143	181	185	187							
		Frekvence alelov	0,0321	0,5179	0,2036	0,2464						
19	Hl-AGA4	219	222	231	234*	251	260	267				
		Frekvence alelov	0,2887	0,0211	0,6303	0,0035	0,0141	0,0106	0,0317			
20	EMHL022	219	221	223								
		Frekvence alelov	0,9143	0,0786	0,0071							
21	HIGT16	225	240	242	244*	246	248*					
		Frekvence alelov	0,4281	0,1475	0,0719	0,0036	0,3453	0,0036				
22	HIGA24	228	236	238	240*	242	244	246	248	252	256	278*
		Frekvence alelov	0,0674	0,0177	0,1312	0,0035	0,1560	0,2766	0,0142	0,0142	0,3014	0,0142
23	GA7-A6-14	179	181	185	187*	189	191	193	195	197*	199*	
		Frekvence alelov	0,0142	0,0071	0,3440	0,0035	0,1206	0,2943	0,0922	0,1170	0,0035	0,0035

PRILOGA F

Seznam triploidnih sort s trialelnim genotipskim profilom na posameznem lokusu

SORTA	LOKUS 1	LOKUS 2	LOKUS 3	LOKUS 4	LOKUS 5	LOKUS 6	LOKUS 7	LOKUS 8	LOKUS 9
‘Crystal’	ACA1-K9-3	HIAGA7	HIGT17	HIGA27	GT1-K1-4	GA5-G3-10	HI-AGA4	HIGA24	
Genotipi	221:210: 178	198: 192: 173	199: 197: 195	233: 223: 214	186: 168: 125	183: 165: 132	267: 231: 219	256: 244: 238	
‘Hüller biterer’	Ho0163	5-2	GA4-K16-8	HI-AGA1					
Genotipi	186: 180: 176	196: 190: 188	201: 199: 181	306: 303: 297					
‘Liberty’	Ho0163	GA4-P11-9	GT1-K1-4	HI-AGA1	HI-AGA4	HIGT16			
Genotipi	192: 180: 176	223: 221: 207	186: 184: 168	303: 288: 285	267: 231: 219	246: 242: 225			
‘Symphony’	Ho0163	HIAGA7	HIGA31	GA4-P11-9	GT1-K1-4	GA5-G3-10			
Genotipi	192: 186: 176	222: 211: 195	182: 178: 174	223: 221: 203	170: 168: 144	181: 144: 114			
‘Blisk’	ACA1-K9-3	HIAGA7	HIGT17	HIGA31	GT1-K1-4	GA5-G3-10	ACC2-D3-3	HIGA24	GA7-A6-14
Genotipi	221: 186: 178	222: 195: 192	199: 197: 195	185: 177: 174	170: 168: 125	181: 144: 132	227: 224: 209	252: 244: 230	195: 191: 185
‘Cekin’	11a59	GA4-K16-8	HI-AGA4						
Genotipi	210: 208: 196	201: 199: 185	231: 222: 219						
‘Celeia’	5-2	GA4-P11-9	GA5-G3-10						
Genotipi	196: 194: 192	223: 221: 217	181: 179: 169						
‘Cerera’	GA4-K16-8	GA4-P11-9	HIGA27	GA5-G3-10	HIGA24	GA7-A6-14			
Genotipi	201: 199: 185	223: 221: 217	237: 225: 223	181: 169: 132	252: 244: 242	191: 189: 185			

Se nadaljuje

nadaljevanje

SORTA	LOKUS 1	LOKUS 2	LOKUS 3	LOKUS 4	LOKUS 5	LOKUS 6	LOKUS 7
‘Cicero’	H1AGA7	5-2	GA4-K16-8	GA4-P11-9			
Genotipi	222: 198: 195	196: 192: 190	201: 199: 185	223: 221: 219			
‘Millennium’	5-2	H1GA27	H1-AGA1	GA7-A6-14			
Genotipi	198: 196: 188	237: 233: 212	294: 291: 273	195: 191: 185			
‘Mount hood’	Ho0163	H1GT17	H1GA27	GT1-K1-4	H1-AGA1	GA5-G3-10	GA7-A6-14
Genotipi	192: 180: 176	199: 195: 189	233: 229: 214	186: 170: 168	303: 291: 288	183: 165: 163	191: 185: 179
‘Pacific gem’	GA4-K16-8	GA4-P11-9	GA5-G3-10	H1GA24			
Genotipi	201: 185: 182	223: 221: 203	181: 163: 154	278: 252: 242			
‘Topaz’	Ho0163	ACA1-K9-3	5-2	GT4-F23-14	11a59	H1GA31	GT1-K1-4
Genotipi	192: 186: 176	221: 181: 178	196: 190: 168	179: 158: 154	238: 220 208	187: 181: 174	168: 148: 125
‘Willamette’	ACA1-K9-3	GT1-K1-4	GA5-G3-10				
Genotipi	221: 186: 178	170: 168: 125	181: 154: 132				

PRILOGA G

Diploidne sorte, pri katerih smo določili tudi tretji alel, dodatni alel 161 pri lokusu 5-2
prikazuje priloga H

	‘Brewers gold’	‘Chelan’	‘Emerald’	‘Southern brewer’	‘Ringwood special’	‘Tettnanger’
Lokus 1 genotip	H1GA27 253:237: 202	GT1-A11-1 187:185:181	Ho0163 186:180:176 ⁶	11a59 220:208:196	Ho0163 192:186:176	GA4-P11-9 227:223:207
Lokus 2 genotip			HIAGA7 232:220:195	HI-AGA1 288:285:279	GT4-F23-14 179:173:154	
Lokus 3 genotip			5-2 196:190:188		11a59 275:220: 208	
Lokus 4 genotip			HI-AGA1 306:303:297		GA4-K16-8 201:183:181	
Lokus 5 genotip					GT1-K1-4 168:150:125	
Lokus 6 genotip					HI-AGA1 303:285:279	
Lokus 7 genotip					GA7-A6-14 197:195:191	

⁶ V oklepajih je zapisana velikost alelov v bp

PRILOGA H

Seznam sort pri lokusu 5-2, pri katerih smo določili alel 161.

Št.	Sorta	Aleli (bp)
1	‘Blisk’ (3n)	196: 194: 161
2	‘Cascade’	196: 194: 161
3	‘Cerera’ (3n)	192: 190: 161
4	‘Columbus’	196: 194: 161
5	‘Estera’	196: 192: 161
6	‘Fuggle’	196: 192: 161
7	‘Hallertauer mittelfruher’	194: 188: 161
8	‘Herkules’	190: 184: 161
9	‘Kazak’	194: 190: 161
10	‘Kitamidori’	196: 194: 161
11	‘Liberty’	194: 190: 161
12	‘Late cluster’	196: 192: 161
13	‘Osvalдов klon 126’	196: 192: 161
14	‘Poljski klon 12’	196: 192: 161
15	‘Pride of kent’	196: 192: 161
16	‘Saladin’	196: 192: 161
17	‘Savinjski golding’	196: 192: 161
18	‘Southern promise’	192: 186: 161
19	‘Southern star’	196: 192: 161
20	‘Spalter select’	196: 188: 161
21	‘Star’	196: 192: 161
22	‘Sterling’	194: 190: 161
23	‘Willamette’ (3n)	196: 192: 161

PRILOGA I

Seznam sort, ki se med seboj razlikujejo v nič alelih, enem alelu, 38 alelih, 39 alelih in 40 alelih

V 0 alelih	'Aromat', 'Aurora', 'Bačka', 'Braustern', 'Bullion', 'Cascade', 'Chang bei 1', 'Chang bei 2', 'Cluster', 'Columbus', 'Early bird golding', 'Emerald', 'Estera', 'Eastwell golding', 'First choice', 'Fuggle', 'Ging doa do hua', 'Golden star', 'Hüllerbiterer', 'Iwanovecki', 'Kastromsky', 'Kirin 1', 'Kirin 2', 'Kruglak siriak', 'Late cluster', 'Ljubljinsky', 'Nadwislandsky', 'Nordgard 1478', 'Nordgard 978', 'Osvalдов klon 126', 'Osvalдов klon 72', 'Petrovački červenjak', 'Poljski klon 12', 'Poljski klon 34', 'Precoce de bourgogne', 'Record', 'Saazer', 'Saladin', 'Savinjski golding', 'Sirem', 'Spalter select', 'Spalter', 'Star', 'Strissel spat', 'Tardif de bourgogne', 'Univerzal', 'White bine', 'Wurtenberger', 'Wye challenger', 'Yeoman 1', 'Yeoman 2', 'Zlatan'
V 1 alelu	'Aromat', 'Braustern', 'Chang bei 1', 'Cobbs', 'Early bird golding', 'Eastwell golding', 'Iwanovecki', 'Kastromsky', 'Kruglak siriak', 'Ljubljinsky', 'Mathon', 'Nadwislandsky', 'Northern brewer', 'Žateški polurani červenjak', 'Žitomirski klon 16', 'Žitomirski klon 18', 'Žitomirski klon 34'
V 38 alelih	'Atlas', 'Brewers gold', 'Bullion', 'Citra', 'Columbus', 'Comet', 'Dana', 'Diva', 'Ellupulo', 'Glacier', 'Hülleraroma', 'Kazak', 'Ringwood special', 'Saphir', 'Sladek', 'Topaz', 'Wye challenger'
V 39 alelih	'Aquila', 'Callicross', 'Comet', 'Ging doa do hua', 'Hüller aroma', 'Kazak', 'Ringwood special', 'Warrior'
V 40 alelih	'Callicross', 'Diva', 'Kazak', 'Ringwood special'

PRILOGA J
Skupine sort, ki imajo enak genotip

Skupina	Št. sort	Imena sort
1	20	‘Aromat’, ‘Iwanovecki’, ‘Kostromsky’, ‘Kruglaksiriak’, ‘Lubljinsky’, ‘Nadwislandsky’, ‘Osvaldov klon 72’, ‘Petrovački červenjak’, ‘Poljski klon 34’, ‘Precoce de bourgogne’, ‘Sirem’, ‘Spalter’, ‘Univerzal’, ‘Saazer’, ‘Tardif de bourgone’, ‘Žateski polurani červenjak’, ‘Žitomirski klon 18’, ‘Žitomirski klon 16’, ‘Žitomirski klon 34’, ‘Zlatan’
2	8	‘Estera’, ‘Late cluster’, ‘Osvaldov klon 126’, ‘Poljski klon 12’, ‘Saladin’, ‘Star’, ‘Savinjski golding’, ‘Fuggle’
3	2	‘Record’, ‘White bine’
4	2	‘Cascade’, ‘Columbus’
5	2	‘Backa’, ‘Wurtenberger’
6	2	‘First choice’, ‘Aurora’
7	2	‘Golden star’, ‘Kirin 2’
8	2	‘Braustern’, ‘Chang bei 1’
9	2	‘Bullion’, ‘Wye challenger’
10	2	‘Chang bei 2’, ‘Kirin 1’
11	2	‘Early bird golding’, ‘Eastwell golding’
12	2	‘Nordgard 1478’, ‘Nordgard 978’
13	2	‘Yeoman 1’, ‘Yeoman 2’
14	2	‘Cluster’, ‘Ging dao do hua’