

PRVE BREZVIROIDNE RASTLINE HMELJA (*Humulus lupulus* L.) V SLOVENIJI

Lucija LESKOVŠEK¹, Sebastjan RADIŠEK², Nataša FERANT³, Andreja ČERENAK⁴,
Vlasta KNAPIČ⁵

^{1,2}Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Žalec

^{3,4}Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za rastline, tla in okolje, Žalec

⁵Fitosanitarna uprava RS, Sektor za zdravstveno varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije smo z namenom zagotovitve kakovostnega in neokuženega sadilnega materiala, začeli z eliminacijo hmeljevega latentnega viroida (HLVd) in vzgojo prvih brezviroidnih matičnih rastlin. Raziskave so pokazale, da okužba s HLVd vpliva na zmanjšanje količine pridelka, kar je posledica slabšega razvoja storžkov, obenem pa ima tudi vpliv na zmanjšanje vsebnosti alfa kislin v pridelanem hmelju. V Sloveniji je bila potrjena vsesplošna razširjenost hmeljevega latentnega viroida (HLVd) v matičnih rastlinah, tkivnih kulturah, brezvirusnih sadikah in pridelovalnih nasadih hmelja, čemur je v največji meri pripomoglo vegetativno razmnoževanje okuženih rastlin. Pri vzgoji novih sort se HLVd v procesu križanja izloči po naravni poti, saj se le redko prenaša preko semena, v primeru starih sort, pa je bilo potrebno izvesti eliminacijo HLVd s kulturo meristemov. Iz mladih poganjkov matičnih rastlin smo v aseptičnih razmerah izolirali meristeme in jih kultivirali *in vitro* na MS gojišču, ki je vsebovalo 2 mg/l BAP in 20 g/saharoze. Regenerirane rastline smo v stadiju 2 razvitih nodijev predstavili na gojišče za ukoreninjenje (0,2 mg/l IBA) in jih nato vsake 4 do 6 tednov prenesli na sveže gojišče, do starosti 3-4 mesecev v odvisnosti od sorte. Uspešnost regeneracije izoliranih meristemov apikalnih in lateralnih poganjkov hmelja se je gibala med 18 in 60 odstotki v odvisnosti od sorte. Po približno 4 mesecih smo rastline testirali na zastopanost HLVd z RT-PCR metodo. Z zdravimi rastlinami smo nadaljevali postopek aklimatizacije na razmere *in vivo* in jih nato vključili kot brezviroidne matične rastline v proizvodnjo certificiranega sadilnega materiala hmelja.

Ključne besede: hmelj, *Humulus lupulus*, matične rastline, viroid, HLVd, eliminacija, RT-PCR

ABSTRACT

FIRST VIROID-FREE HOP PLANTS (*Humulus lupulus* L.) IN SLOVENIA

The Slovenian Institute for Hop Research and Brewing has started the elimination of hop latent viroid (HLVd) and has obtained the first viroid-free mother plants. Establishing healthy plant material is clearly an essential prerequisite to get high and quality yield. Studies have revealed that HLVd is capable of causing moderate to severe yield loss in terms of cone yields and alpha-acid content. HLVd is widespread in Slovenian hops and has been detected in mother plants, tissue cultures, virus-free planting material and in commercial hop gardens,

¹ dr., Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² dr., prav tam

³ mag., prav tam

⁴ dr., prav tam

⁵ univ. dipl. inž. agr., Einspielerjeva 6, SI-1000 Ljubljana

which is a result of vegetative propagation of infected plants. HLVd could be eliminated naturally by breeding of new hop varieties, because it is rarely transmitted by the seeds. For HLVd elimination from old hop varieties, meristem culture technique has been used. The production of healthy plant material was performed by excising meristems from newly emerged sprouts of mother plants under aseptic conditions. The meristem tips were cultivated *in vitro* on a MS medium with 2 mg/l BAP and 20 g/l sucrose. When on the regenerated plants 2 internodes were developed, they were transferred to a MS growth medium with 0.2 mg/l IBA and every 4 to 6 weeks of culture were transferred into a fresh growth medium. *In vitro* regeneration ability varied between 18 and 60 % depended on the variety. After approximately 4 months, successfully regenerated hop plants were tested for the presence of HLVd by the RT-PCR method. Healthy hop plants, free of HLVd, were acclimatized to *in vivo* conditions and are used as a mother plants for further propagation of certified hop plant material.

Key words: hop, *Humulus lupulus*, mother plants, viroid, HLVd, elimination, RT-PCR

1 UVOD

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) smo z namenom zagotovitve kakovostnega in zdravega sadilnega materiala, začeli z eliminacijo hmeljevega latentnega viroida (HLVd) in vzgojo prvih brezviroidnih matičnih rastlin. Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki so se v rastlinski celici sposobni sami razmnoževati in povzročajo različne pomembne bolezni višjih rastlin. Evropski hmelj je vsesplošno okužen s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd), ki povzroča latentno bolezen hmelja in na večini sort ne kaže vidnih bolezenskih znamenj. Rastline slabi na celični ravni in tako negativno vpliva na pridelek in vsebnost alfa kislin in eteričnih olj (Barbara in sod., 1990). V Angliji so v primerjavi okuženih rastlin s HLVd z neokuženimi ugotovili, da je pridelek alfa kislin lahko manjši za 20 do 50 %, odvisno od sorte (Morton in sod., 1993). V Sloveniji je bila potrjena vsesplošna razširjenost hmeljevega latentnega viroida (HLVd) v matičnih rastlinah, tkivnih kulturah, brezvirusnih sadikah in pridelovalnih nasadih hmelja, čemur je v največji meri pripomoglo vegetativno razmnoževanje okuženih rastlin. Pri vzgoji novih sort se HLVd v procesu križanja izloči po naravni poti, saj se le redko prenaša preko semen. V primeru že uveljavljenih sort, pa je bilo potrebno izvesti eliminacijo HLVd s kulturo meristemov.

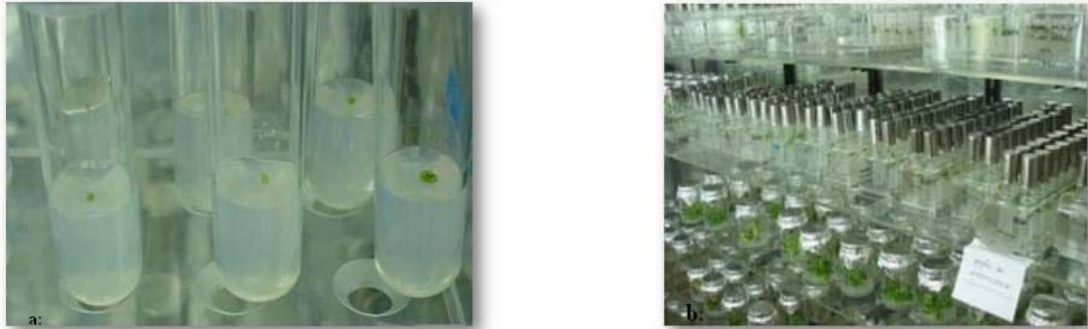
2 MATERIAL IN METODE

Za eliminacijo viroida smo kot izvorni material uporabili izvorne matične rastline slovenskih sort hmelja (Savinjski golding, Aurora, Celeia, Bobek, Atlas, Cerera, Buket, Blisk) in nemške sorte Magnum, ki jih vzdržujemo v rastlinjaku na IHPS za potrebe razmnoževanja in vzgoje sadik hmelja. V začetku meseca marca, ko so izvorne matične rastline zaele odganjati, smo nabrali poganjke, jih razkužili v 1,66 % raztopini dinatrij dikloroizocianurne kisline (Sigma Aldrich) z dodatkom močila Tween-20. Iz razkuženih brstov smo pod stereomikroskopom izolirali rastne vršičke z meristemom in najmanj dvema primordialnima listoma.

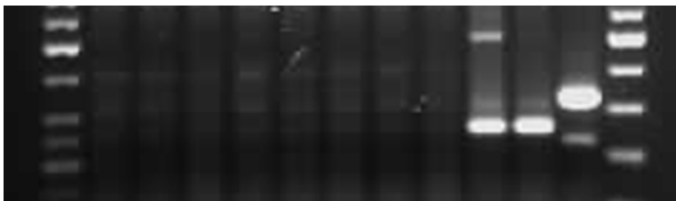
Za iniciacijo brstov smo izolirane meristeme kultivirali na gojišče MS z 2 mg/l rastnega regulatorja benzilaminopurina (BAP) (slika 1 a; b). Regeneriranim rastlinam smo v fazi 2-3 internodijev izolirali celokupne nukleinske kisline po CTAB metodi, čemur je sledila RT-PCR reakcija (Hataya in sod., 1992) s katero smo analizirali prisotnost HLVd (slika 2).

Po testiranju na prisotnost viroida smo rastline s pozitivnim signalom za HLVd ustrezno odstranili, tiste z negativnim signalom pa smo predstavili na gojišče MS z 0,2 mg/l indolocetne kisline (IBA). Rastline smo subkultivirali na 4 do 6 tednov na sveže gojišče do oblikovanja korenin. Po potrebi smo pri posameznih regenerantih odstranili kalus, ki se pri regeneraciji hmelja pogosto oblikuje in prekine dostop hranil v rastlino ter ovira nadaljnjo rast. Brezviroidne rastline, ki so že imele oblikovane korenine, smo presadili v šotne tabletko

(gnojilo Nitramix - 12:6:6) in jih prestavili v mini rastlinjake, kjer smo nadzorovali vlago, jih oskrbovali z vodo in hranili.



Slika 1: a) b) Kultiviranje izoliranih meristemov na gojišču MS z 2 mg/l BAP v rastni komori.



Slika 2: Prikaz RT-PCR analize.

Po približno 4 tednih smo aklimatizirane rastline prestavili v večje lončke s šotnim substratom in prenesli v rastlinjak na vzdrževanje rastlinskega materiala za potrebe nadaljnjega razmnoževanja in vzgoje brezviroidnih certificiranih sadik hmelja (slika 3 a; b).



Slika 3: a) Aklimatizacija brezviroidnih rastlin v šotnih tabletkah; b) vzgoja brezviroidnih sadik hmelja v rastlinjaku.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za uspešno pridelavo hmelja je potrebno zagotoviti zdrav sadilni material, saj le tako lahko pričakujemo kakovosten in visok pridelek, preprečimo pa tudi nadaljnje širjenje viroidnih bolezni. V okviru strokovne naloge s področja varstva in registracije sort rastlin ter semenarstva (področje Vzgoja osnovnega genetskega materiala) smo eliminirali viroid HLVD

pri pomembnejših, tržno zanimivih slovenskih sortah hmelja kot so: Savinjski golding, Aurora, Celeia, Bobek, Atlas, Cerera, Buket, Blisk in nemški sorti Magnum. Tehnika je dokaj zahtevna, saj moramo biti precej hitri in natančni, da ne poškodujemo meristema, ki meri manj kot 0,5 milimetra. Uspešnost regeneracije izoliranih meristemov apikalnih in lateralnih poganjkov hmelja se je gibala med 18 in 60 odstotki v odvisnosti od sorte. Po približno 4 mesecih smo rastline testirali na prisotnost HLVd z molekularno tehniko RT-PCR. Z zdravimi rastlinami smo nadaljevali postopek aklimatizacije na *in vivo* pogoje in jih vključili kot brezviroidne matične rastline za proizvodnjo certificiranega sadilnega materiala hmelja.

4 LITERATURA

- Morton A., Barbara D.J., Adams A.N., 1993. The distribution of hop latent viroid within plants of *Humulus lupulus* and attempts to obtain viroid-free plants. *Annals of Applied Biology* 123: 47-53.
- Barbara D.J., Morton A., Adams A.N., Green C.P., 1990. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the U.K. *Annals of Applied Biology* 117: 359-366.
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Tanikoshi T., Shikata E., 1992. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58: 677-684.