

**Teresa Doroszewska, Urszula Skomra, Marcin Przybyś, Anna Czubacka,
Magdalena Grudzińska-Sterno***

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

**Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Szwecja*

UZYSKIWANIE ZDROWYCH SADZONEK CHMIELU JAKO ELEMENT
RESTRUKTURYZACJI ODMIANOWEJ**

Wstęp

Zdrowotność materiału sadzonkowego chmielu jest ważnym elementem wpływającym na dalszy wzrost i rozwój roślin, jak też plonowanie i jakość surowca. Chmiel jest rośliną wieloletnią, która może być uprawiana nawet kilkadziesiąt lat w jednym miejscu, ale optymalny okres użytkowania wynosi około 20 lat. Plantacje starsze stopniowo obniżają swoją produktywność. Jedną z przyczyn jest silne porażenie roślin przez wirusy. Do najgroźniejszych wirusów występujących na roślinach chmielu należą: wirus mozaiki jabłoni (*Apple mosaic virus* – ApMV) oraz wirus mozaiki chmielu (*Hop mosaic virus* – HpMV). Innym patogenem jest wiroid utajony chmielu (*Hop latent viroid* – HLVd). Patogeny te występują powszechnie w roślinach chmielu, rozprzestrzeniając się na plantacji przez mechaniczny kontakt bądź podczas wykonywania zabiegów pielęgnacyjnych (ApMV) lub są przenoszone przez owady (HpMV). Ich obecność wpływa negatywnie na wielkość i jakość plonu (10). Porażone rośliny chmielu charakteryzują się niższym potencjałem plonowania oraz mniejszą koncentracją alfa kwasów – głównego składnika szyszek wykorzystywanego przez przemysł piwowarski. Jak wykazują badania, różnica w koncentracji alfa kwasów pomiędzy roślinami zdrowymi i porażonymi przez wirusy i wiroida utajonego chmielu sięga od kilku do kilkudziesięciu procent (5, 7, 10). Wzrost zawartości alfa kwasów przekłada się bezpośrednio na wzrost dochodu gospodarstw chmielarskich, bowiem cena surowca jest uzależniona od zawartości alfa kwasów. Wyższa koncentracja alfa kwasów oznacza także korzyści dla firm zajmujących się przetwarzaniem szyszek chmielowych na granulaty i ekstrakt. Przy tych samych kosztach przerobu szyszek przetwórcy mogą uzyskać więcej alfa kwasów, które są przedmiotem obrotu z browarami.

** Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.7 w programie wieloletnim IUNG - PIB

Jedyną metodą walki z wirusami i wiroidem utajonym chmielu jest stosowanie zdrowego materiału szkółkarskiego do zakładania nowych plantacji. Uwalnianie roślin chmielu od wirusów i wiroida utajonego prowadzono metodą regeneracji merystemów wierzchołkowych w warunkach *in vitro* (3). Szybko dzielące się komórki merystemu nie są zasiedlane przez czynniki chorobotwórcze, jak ma to miejsce w wyspecjalizowanych tkankach. Poprzez pasażowanie na odpowiednie pożywki uzyskano ukorzenione rośliny będące przedmiotem dalszych prac badawczych i aplikacyjnych (rys. 1).

Celem prowadzonych prac było uzyskanie zdrowego materiału sadzonkowego poprzez opracowanie i wdrożenie właściwych metod diagnostycznych, sposobów rozmnażania oraz zapewnienie odpowiednich warunków wzrostu i rozwoju.

Metody diagnostyczne

Zastosowanie odpowiednich metod diagnostycznych stosownie do rodzaju patogena jest podstawowym elementem uzyskania zdrowego materiału sadzonkowego. W celu wykrywania obecności wirusów zastosowano metodę ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); (1, 12). Z uwagi na fakt, że rozmieszczenie cząstek wirusa w roślinie chmielu nie jest równomierne w diagnozowaniu tych patogenów bardzo ważny jest wybór odpowiedniego materiału do badań. Do wykrywania HpMV najlepiej nadają się liście stare, które zakończyły swój wzrost, natomiast w przypadku ApMV najlepsze rezultaty uzyskuje się używając młodych, intensywnie rosnących liści chmielu (9).

Do wykrywania obydwu wirusów w roślinach chmielu stosowano próbę składającą się z liści starych oraz młodych w stosunku wagowym 1 : 1. Odważano 0,1 g liści, które następnie homogenizowano w stosunku 1 : 20 z buforem PBS pH 7,4 z dodatkiem 2% poliwinylpyrolidonu (PVP), 0,05% Tween 20 i 0,2% albuminy z jaja kurzego. Homogenizację przeprowadzano w woreczkach polietylenowych przy użyciu praski firmy Bioreba AG, zamocowanej na wiertarce elektrycznej. Uzyskane homogenaty zlewano do probówek Eppendorfa. Test wykonywano według procedury obejmującej następujące etapy:

1. Płytki napełniano roztworem odpowiedniej surowicy (100 µl do każdego wgłębienia) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. W tym czasie przeciwciała adsorbowały się na porowatych ściankach wgłębienia, tworząc aktywną warstwę. Płytki spłukiwano usuwając nadmiar surowicy.

2. Poszczególne wgłębienia wypełniano homogenatem z liści badanych roślin. W każdym wgłębieniu badano próbkę z innej rośliny. Ponadto na płytce umieszczano roztwory kontroli negatywnej (bez wirusa) oraz pozytywnej (zawierającej cząstki wirusa), stanowiące punkty odniesienia podczas interpretacji wyników. Płytki umieszczano w lodówce na całą noc, tak aby cząstki wirusa, które ewentualnie znajdowały się w homogenacie weszły w reakcję z przeciwciałami tworząc trwałe kompleksy. Następnego dnia płytki spłukiwano.

3. Płytki napełniano koniugatem przeciwciał z enzymem (alkaliczną fosfatazą) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. W czasie inkubacji koniugat łączył się z cząstkami wirusa – reakcja zachodziła tylko w tych wgłębieniach, które we wcześniejszym etapie analizy wypełnione były homogenatem zawierającym cząstki wirusa. W miejscach, które wypełnione były próbkami z roślin zdrowych reakcja nie zachodziła i cały koniugat był usuwany z płytki podczas kolejnego płukania.

4. W ostatnim etapie płytki napełniano roztworem substratu (p-nitrofenylofosfat), który pod wpływem enzymu wchodzącego w skład koniugatu daje barwne produkty reakcji. Po napełnieniu substratem płytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez pół godziny, po czym przeprowadzano pomiar ekstynkcji spektrofotometrem Tecan Sunrise, przy długości fali 405 nm.

Przeciwciała wykrywające ApMV i HpMV oraz pozostałe odczynniki niezbędne do przeprowadzenia testu oraz kontrole pozytywną i negatywną zakupiono w firmie Loewe Biochemica GmbH.

W celu detekcji obecności wiroida utajonego chmielu, patogena pozbawionego białka płaszczka (CP), zastosowano technikę RT-PCR. Obecność patogena określano w preparatach całkowitych kwasów nukleinowych izolowanych z ogonków liściowych roślin chmielu.

Izolacja całkowitych kwasów nukleinowych

Świeżą masę tkanki roślinnej w ilości 100 mg homogenizowano w moździerzu z dodatkiem 650 ml buforu CTAB o składzie: 2% CTAB; 0,1 M Tris-HCL pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 0,4% β-merkaptoetanol (4). Homogenat przenoszono do próbówki 1,5 ml i inkubowano w 68°C przez 90 minut. Po wystudzeniu do temperatury otoczenia dodawano 850 ml mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (24 : 1), wytrząsano, a następnie wirowano przy 14 000 obr./min. przez 10 minut w temperaturze 4°C. Uzyskaną po wirowaniu fazę wodną w ilości 400 ml przenoszono do nowej próbówki, dodawano 500 ml chloroformu, wytrząsano i wirowano w tych samych warunkach. Fazę wodną ponownie przenoszono do nowej próbówki i ekstrahowano chloroformem. Następnie z fazy wodnej wytrącano kwasy nukleinowe w obecności 0,6 objętości zimnego izopropanolu oraz 0,1 objętości 3 M octanu sodu przy pH 7,4 przez 12 godzin w temperaturze -20°C. Po wirowaniu z prędkością 14 000 obr./min. przez 30 minut przemywano dwukrotnie 80% etanolem, a następnie suszono próżniowo i zawieszano w 31 ml wody Mili-Q z dodatkiem DEP (dietylopirowęglan).

Wykrywanie HLVD metodą RT-PCR

a) Oznaczanie ilościowe

Oznaczanie ilościowe RNA prowadzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru Eppendorf BioPhotometr. Do pomiaru pobierano 1 ml próbki kwasów nukleinowych, którą następnie rozcieńczano 70-krotnie wodą Mili-Q. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali 260 nm.

b) Reakcja RT-PCR

Do reakcji RT-PCR wykorzystano specyficzne primery dla wiroida utajonego chmielu zaprojektowane na podstawie sekwencji starterów zastosowanych przez Matouška J. i in. (6). Starter HLVd-R (5'-CCACCGGGTAGTTTCCAACCT-3') komplementarny do nukleotydów 200-181 w sekwencji HLVd oraz HLVd-F (5'-ATA-CAACTCTTGAGCGCCGA-3') homologiczny do nukleotydów 201-220. Syntezę cDNA przeprowadzono w 20 ml mieszaniny reakcyjnej zawierającej 2 mg RNA, 1 x bufor reakcyjny (MBI Fermentas), 5 mM startera HLVd-R, 0,5 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); (Fermentas), 1 U inhibitora RNaz (Fermentas), 0,125 mg/ml BSA (Fermentas), 10 U odwrotnej transkryptazy M-MuLV (Fermentas). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 42°C przez 60 minut, a następnie denaturowano przez 5 minut w 90°C.

c) Amplifikacja cDNA

Reakcję PCR prowadzono w objętości 20 ml mieszaniny reakcyjnej. Do 1 ml cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji dodawano mastermix zawierający: 1 x bufor PCR (Fermentas), 1,25 mM startera HLVd-R i 1,25 mM startera HLVd-F, 62,5 mM mieszaniny dNTP (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas). Jako ostatnią dodawano polimerazę Taq w ilości 1,25 U (Fermentas).

Amplifikacja obejmowała etapy:

1. denaturacja wstępna: 95°C przez 5 minut,
2. właściwa amplifikacja (35 cykli):
 - denaturacja 94°C przez 30 sekund,
 - annealing 58°C przez 30 sekund,
 - elongacja 72°C przez 30 sekund,
3. końcowa elongacja: 72°C przez 5 minut.

d) Elektroforeza produktów amplifikacji

Produkty amplifikacji analizowano w 2% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Na żel nanoszono po 10 ml mieszaniny po amplifikacji z dodatkiem 2 ml barwnika obciążającego 6 x Loading Dye (Fermentas). Jako marker wielkości wykorzystano pUC19 DNA trawiony *MspI* (MBI Fermentas). Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE przy napięciu 5 V/cm. Fragment DNA o długości 250 pb odpowiadał HLVd. Wynik elektroforezy oglądano pod UV i fotografowano.

Wykrywanie HLVd metodą RT-PCR stosowano dla roślin uzyskanych z hodowli *in vitro* oraz przed każdym cięciem pędów chmielu przeznaczonych do ukorzenia. Z uwagi na bardzo dużą liczebność roślin przeznaczonych każdorazowo do badań zastosowano metodę „prób zbiorczych”. Z każdej rośliny matecznej pobierano dolne liście, a następnie przygotowywano próbę zbiorczą zawierającą ogonki liściowe czterech różnych roślin. Izolację kwasów nukleinowych prowadzono według procedury opisanej powyżej. W przypadku uzyskania pozytywnego wyniku dla próby zbiorczej, ponownie, ale indywidualnie, testowano rośliny mateczne w obrębie „pozytywnej czwórki”.

Dobór odmian i uzyskanie roślin matecznych

Do prac nad uzyskaniem materiału sadzonkowego wolnego od wirusów i wirioida utajonego przeznaczono cztery odmiany chmielu, dwie odmiany należące do typu gorzycznego: Iunga i Magnum oraz dwie odmiany z typu aromatycznego: Sybilla i Lubelski. Odmiana Magnum jest odmianą niemiecką, trzy pozostałe zostały wyhodowane w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Iunga jest jedną z ostatnio wyhodowanych odmian, wpisaną do księgi ochrony wyłącznego prawa. Jest to odmiana o wysokiej zawartości alfa kwasów, łatwo naprowadzająca się na przewodniki, odpowiednia do zbioru maszynowego (8). Dobór odmian był podyktowany zapotrzebowaniem na określone typy surowca, jak też przydatnością odmian do uprawy polowej.

Rośliny uzyskane z merystemów (3), wolne od wirusów i wiroida utajonego chmielu, przenoszono sukcesywnie z pożywki agarowej do substratu torfowego. Pierwszy okres wzrostu roślin wyprowadzonych z warunków *in vitro* przebiegał w fitotronie w kontrolowanych warunkach temperatury i długości dnia. Aby zapewnić optymalne warunki wilgotnościowe ukorzenione rośliny sadzono w plastikowych pojemnikach z przezroczystymi przykrywkami. Rośliny pozostawały pod przykryciem około 2 tygodnie, następnie adaptowano je do warunków otoczenia i po przerośnięciu podłoża przez system korzeniowy przesadzano do większych doniczek (rys. 1). Wszystkie rośliny przebadano ponownie w kierunku obecności wirusów (ELISA) i wiroida utajonego (RT-PCR). Najwięcej roślin wykazujących obecność wirusów stwierdzono wśród odmiany Lubelski. Jest to najstarsza z odmian uwzględnionych w badaniach, o dużym nasileniu patogenów, a tym samym trudniejsza do uwolnienia (tab. 1).

Zdecydowanie więcej roślin wykazywało obecność wirusa mozaiki chmielu (HpMV) niż wirusa mozaiki jabłoni (ApMV), co może wynikać z większego zasiedlenia roślin wyjściowych pobieranych z plantacji wirusem mozaiki chmielu bądź mniejszą skutecznością jego eliminacji.

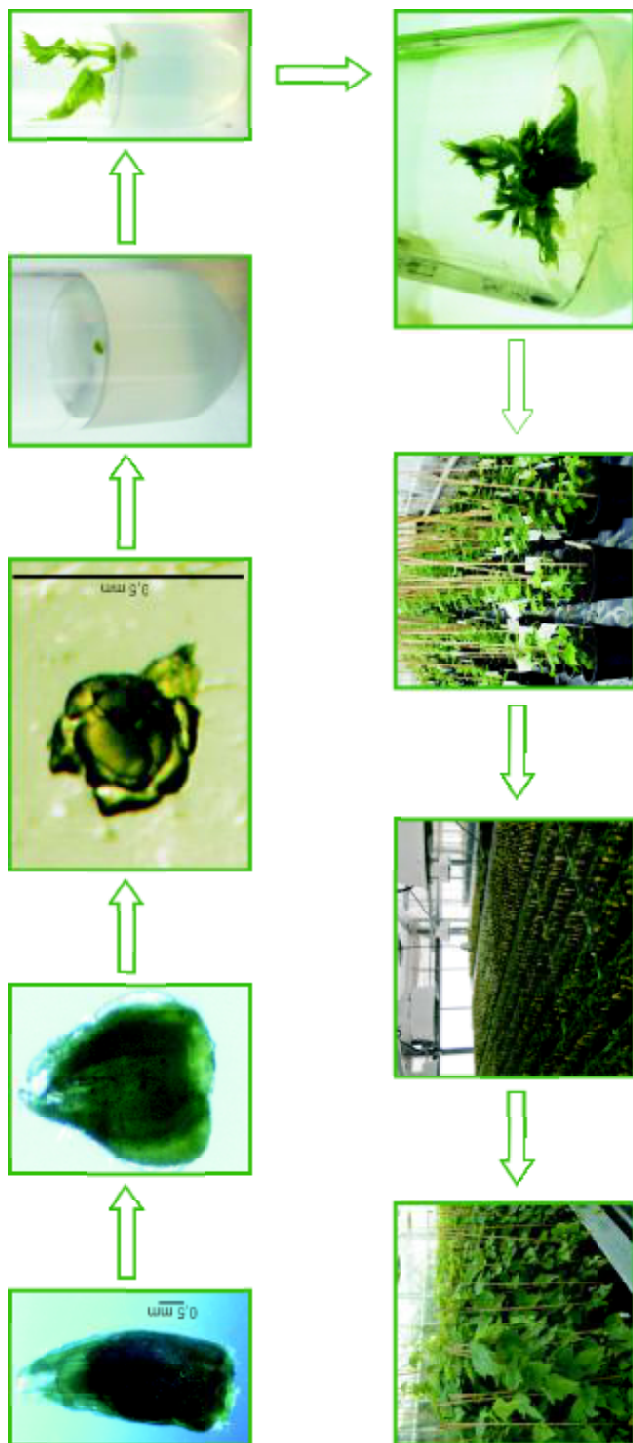
Rośliny regenerowane z merystemów były wprawdzie wstępnie badane, jednakże bardzo mała ilość cząsteczek mogła być niewykrywalna i wirus ulegał namnażaniu.

Tabela 1

Liczebność roślin poszczególnych odmian chmielu uzyskanych w pierwszym etapie badań

Grupy roślin	Odmiana chmielu				
	Iunga	Magnum	Sybilla	Lubelski	Razem
Rośliny uzyskane z merystemów	270	261	203	286	1020
Rośliny porażone przez HpMV	8	5	2	35	50
Rośliny porażone przez ApMV	3	1	2	12	18
Rośliny porażone przez HLVd	2	7	6	3	18
Rośliny zdrowe (mateczne)	257	248	193	236	934

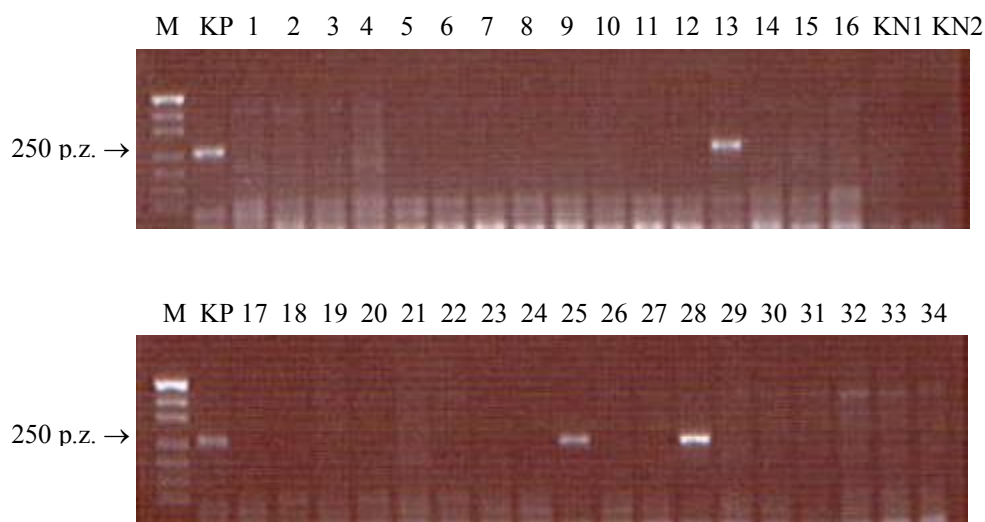
Źródło: Wyniki badań własnych.



Rys. 1. Sposób uzyskiwania zdrowych sadzonek chmielu z wykorzystaniem kultur *in vitro*

Źródło: Dokumentacja własna.

Obecność wiroida utajonego wykryto u 18 roślin spośród 1020 badanych w pierwszym etapie po wysadzeniu do ziemi. Na zdjęciu widoczne prążki, charakterystyczne dla tej samej masy cząsteczkowej produktu jaką posiada wiroid (rys. 2).



Rys. 2. Wykrywanie HLVd za pomocą techniki RT-PCR w próbkach roślinnych

Ścieżki: M – marker wielkości DNA, KP – kontrola pozytywna, KN1 – kontrola negatywna odwrotnej transkrypcji, KN2 – kontrola negatywna PCR, 1-16 – rośliny odmiany Sybilla, 17-21 – rośliny odmiany Iunga, 22-26 – rośliny odmiany Lubelski, 27-34 – rośliny odmiany Magnum
Źródło: Opracowanie własne.

Obecność wiroida stwierdzano częściej u odmian z mniejszym nasileniem występowania wirusów (Magnum, Sybilla), natomiast rzadziej u odmiany Lubelski, bardziej porażanej przez wirusy.

Uzyskane w tej serii badań zdrowe rośliny stanowiły tzw. rośliny mateczne (nuclear stock), przeznaczone jako materiał wyjściowy do dalszych rozmnożeń. Dalszy wzrost roślin matecznych przebiegał w szklarni o ściśle określonych parametrach.

Rozmnażanie i uzyskiwanie materiału sadzonekowego

Uzyskanie dobrych sadzonek warunkowane jest jakością i wigorem roślin matecznych, z których pobierane są pędy. Optymalnym materiałem są dobrze wykształcone odcinki pędu długości około 5 cm, z jedną parą liści (jeden węzeł), posiadające w kątach liści pąki śpiące. Ograniczenie powierzchni transpiracji poprzez przycięcie blaszki liściowej ułatwia proces ukorzenia (rys. 3 i 4).

Traktowanie przyciętych pędów odpowiednio dobranymi auksynami poprawia proces ryzogenezy, podobnie jak odpowiednie podłoże. Do ukorzenia sadzonek chmielu stosowano standardowy ukorzeniacz, dostępny w sklepach ogrodniczych. Mieszanka



Rys. 3. Cięcie pędów i przygotowanie do ukorzenia

Źródło: Dokumentacja własna.



Rys. 4. Fragment pędu z przy-
ciętymi liśćmi i widocznymi
pąkami śpiącymi

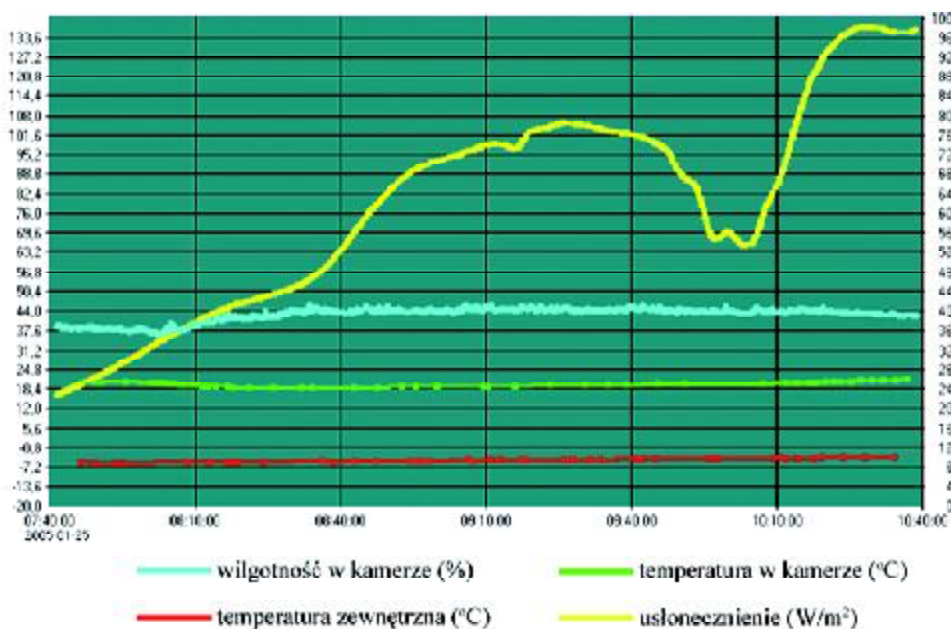
Źródło: Dokumentacja własna.

podłoża warzywnego i perlitu w stosunku 3 : 1 dała dobre efekty. Przy utrzymywaniu temperatury około 25°C okres ukorzenia wynosił 3-5 tygodni. Ważnym elementem jest zapewnienie odpowiedniej wilgotności. Przez pierwsze dwa tygodnie sadzonki były utrzymywane pod przykryciem i codziennie zraszane. W tym czasie pojawiały się pierwsze korzenie i pędy. Gdy system korzeniowy przerastał całe podłoże, a pędy osiągały długość 10-20 cm, rośliny przesadzano do większych doniczek. Efektywność ukorzenia sadzonek zielnych wynosiła 85-90%. Z każdej rośliny matecznej uzyskiwano od kilku do kilkunastu sadzonek.

Bardzo ważnymi czynnikami wpływającymi na właściwy proces ukorzenia, jak też wzrost i rozwój sadzonek są odpowiednie warunki szklarniowe (wilgotność, temperatura, usłonecznienie). Przykładowy obraz takich warunków przedstawia wykres tych danych rejestrowanych przez system komputerowy (rys. 5).

W takich warunkach, nawet zimą, pomimo niskiej temperatury na zewnątrz wzrost sadzonek przebiegał dobrze. Dobre wyniki uzyskano też dzięki utrzymywaniu określonej długości dnia. Rośliny w różnych fazach wzrostu wymagają odpowiednich warunków termicznych, wodnych i świetlnych (tab. 2).

Dla sadzonek będących w okresie ukorzenia stosowano wyższą temperaturę, ponadto przy dużym usłonecznieniu stosowano częściowe lub całkowite zacielenie. Odpowiednią temperaturę dla poszczególnych grup roślin, w zależności od warunków zewnętrznych, utrzymywano poprzez programowany system ogrzewania, cieniowa-



Rys. 5. Parametry w kamerze z ukorzenionymi sadzonkami chmielu w godzinach 7⁴⁰-10⁴⁰
 Źródło: Opracowanie własne.

Tabela 2

Optymalne parametry w warunkach szklarniowych dla poszczególnych grup roślin

Parametry	Sadzonki ukorzeniane	Sadzonki ukorzenione	Rośliny mateczne po okresie jarowizacji		
			bezpośrednio	po 10 dniach	po 20 dniach
Długość dnia (h)	12	12	8	8	12
Temp. dnia (°C)	24	22	10	18	20
Temp. nocy (°C)	22	18	10	18	20
Nawadnianie	ręczne	zalewowe	brak	wg potrzeb (ręczne)	kropelkowe (50 ml/dobę)

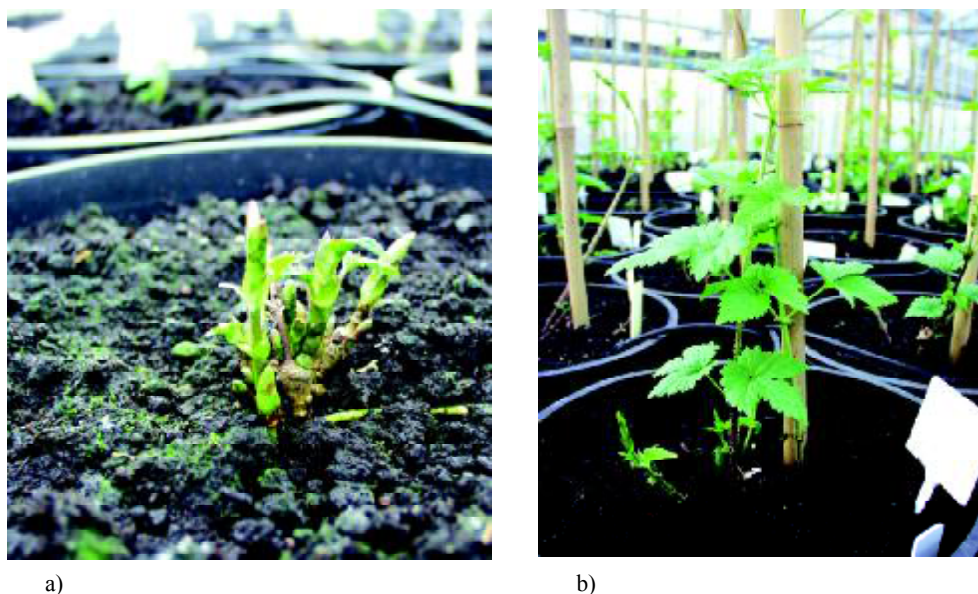
Źródło: Wyniki badań własnych.

nia i otwierania okien. Dostosowywano też system nawadniania połączony z nawożeniem.

Chmiel do prawidłowego rozwoju wymaga procesu jarowizacji, polegającej na działaniu niskiej temperatury przez pewien okres. Warunkuje to dobry rozwój pędów o odpowiedniej grubości, zdolnych do asymilacji i co istotne, przy pozyskiwaniu sadzonek, do utworzenia silnego systemu korzeniowego. W warunkach naturalnych jarowizacja odbywa się na plantacji w okresie zimowym. Zbliżone warunki zastosowano przy uzyskiwaniu sadzonek w szklarni. Po ścięciu części nadziemnej ograniczono podlewanie i obniżono temperaturę w kamerach. Następnie rośliny mateczne, jak też niektóre sadzonki wymagające zimowania wynoszono na zewnątrz, na specjalnie przygotowane podłoże, zabezpieczając je jednocześnie przed nadmiernym spadkiem temperatury w bryle korzeniowej. Po okresie spoczynku i ponownym przeniesieniu do szklarni stosowano określone parametry (tab. 2). Początkowo utrzymywano krótki dzień i niską temperaturę, a w miarę adaptacji roślin wydłużano dzień i podwyższano temperaturę oraz rozpoczynano nawadnianie roślin. Dobór sposobu nawadniania warunkowany jest przez stadium wzrostu rośliny oraz wielkość sadzonek i ich liczebność. Dla roślin matecznych rosnących w dużych wazonach stosowano nawadnianie kropelkowe (rys. 6a), zaś młode sadzonki stojące w dużym zagęszczeniu nawadniano metodą zalewową. Chmiel jest rośliną pnącą, toteż nieodzownym warunkiem przy utrzymywaniu roślin matecznych, jak też przy wzroście młodych sadzonek jest stosowanie przewodników (rys. 6b).

Zabiegi pielęgnacyjne i utrzymanie zdrowotności

Dla prawidłowego rozwoju roślin matecznych, stanowiących materiał wyjściowy dla uzyskiwania sadzonek, jak też do wzrostu sadzonek, wymagany jest odpowiedni stan odżywienia. Systematyczne nawożenie makro- i mikroelementami zapewniało dobrą kondycję roślin. Nawożenie NPK było aplikowane poprzez kropelkowy system nawadniający w przypadku roślin matecznych oraz systemem zalewowym dla sadzonek. Mikroelementy dawkowano w postaci oprysków wieloskładnikowymi nawozami dolistnymi, które stosowano co 10-15 dni w zależności od tempa wzrostu roślin. Po-



a)

b)

Rys. 6. Rozwój pędów u roślin matecznych chmielu; a) bezpośrednio po okresie jarowizacji, b) w okresie naprowadzania roślin na przewodniki

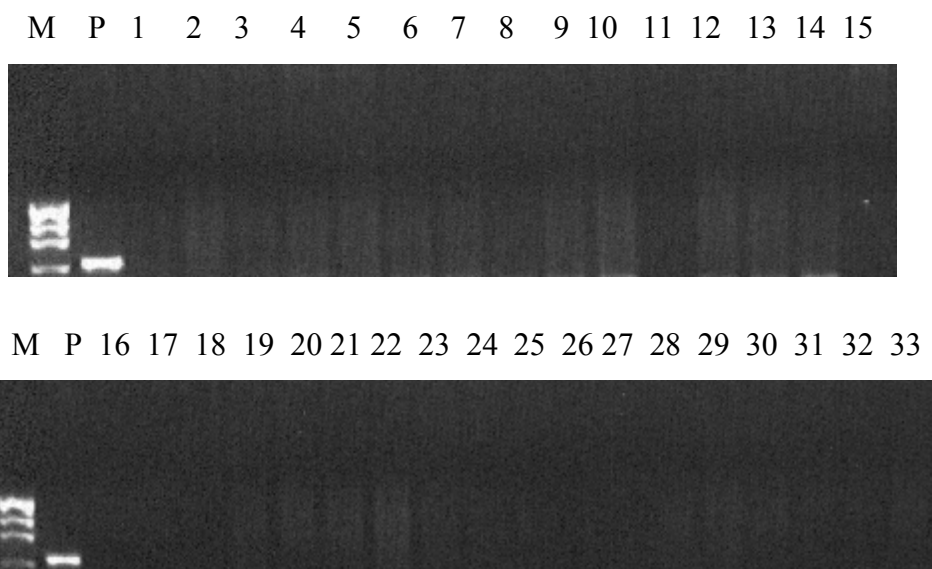
Źródło: Dokumentacja własna.

nadto stosowano preparat stymulujący wzrost po cięciu roślin matecznych oraz po przesadzeniu ukorzenionych sadzonek do doniczek.

Utrzymanie zdrowotności sadzonek uwolnionych od wirusów i wiroida utajonego jest niezwykle ważnym elementem na każdym etapie ich uzyskiwania. Rośliny chmielu wolne od patogenów nie posiadają cechy odporności warunkowanej genetycznie, co oznacza, że bardzo łatwo mogą podlegać wtórnej infekcji. Aby uniknąć przeniesienia wirusa przez owady stosowano zabezpieczenia w postaci siatek ochronnych we wszystkich oknach w szklarni. Dodatkowo prowadzono profilaktyczne zabiegi ochronne przed pojawieniem się szkodników ważnych dla chmielu (mszyca śliwowo-brzoskwiniowa, przędziorek chmielowiec, mączlik szklarniowy). Ochrona materiału matecznego i sadzonkowego obejmowała też zabiegi przeciwko chorobom grzybowym, w szczególności powodowanym przez mączniaka rzekomego i prawdziwego chmielu. Sadzonki będące w trakcie procesu ukorzeniania, przy wysokich parametrach wilgotności sięgającej 100%, dodatkowo chroniono przed szarą pleśnią.

Z uwagi na fakt, że wirusy występujące na chmielu, podobnie jak wiroid utajony, nie dają objawów chorobowych diagnozę materiału matecznego prowadzono systematycznie przed każdorazowym cięciem. Ponadto w sposób losowy diagnozowano wyrosnięte sadzonki. Pozwoliło to na skuteczną eliminację patogenów pojawiających się w pojedynczych roślinach w początkowym etapie prac. Badania serologiczne prowadzone metodą ELISA nie wykazywały obecności wirusów, podobnie badania mo-

lekularne dawały negatywny wynik, świadczący o braku wiroida utajonego w dalszych etapach rozmnażania (rys. 7).



Rys. 7. Analiza molekularna metodą RT-PCR roślin matecznych w kierunku obecności wiroida utajonego chmielu; M – marker wielkości, P – kontrola pozytywna, (1-11 rośliny odmiany Lunga, 12-18 – Lubelski, 19-25 – Sybilla, 26-33 – Magnum)

Źródło: Opracowanie własne.

Podsumowanie

W wyniku prowadzonych prac uzyskano 337 067 sadzonek czterech odmian chmielu całkowicie wolnych od wirusów i wiroida utajonego oraz od szkodników i chorób grzybowych (tab. 3). Uzyskane w IUNG-PIB zdrowe sadzonki chmielu zostały w całości przekazane plantatorom i wdrożone do uprawy polowej (rys. 8). W celu utrzymania zdrowotności sadzonek w warunkach polowych oraz ich prawidłowego wzrostu i rozwoju na plantacji produkcyjnej opracowano fitosanitarne i agrotechniczne zasady sadzenia (2) oraz sposoby zabezpieczania zdrowych plantacji chmielu przed chorobami wirusowymi (11).

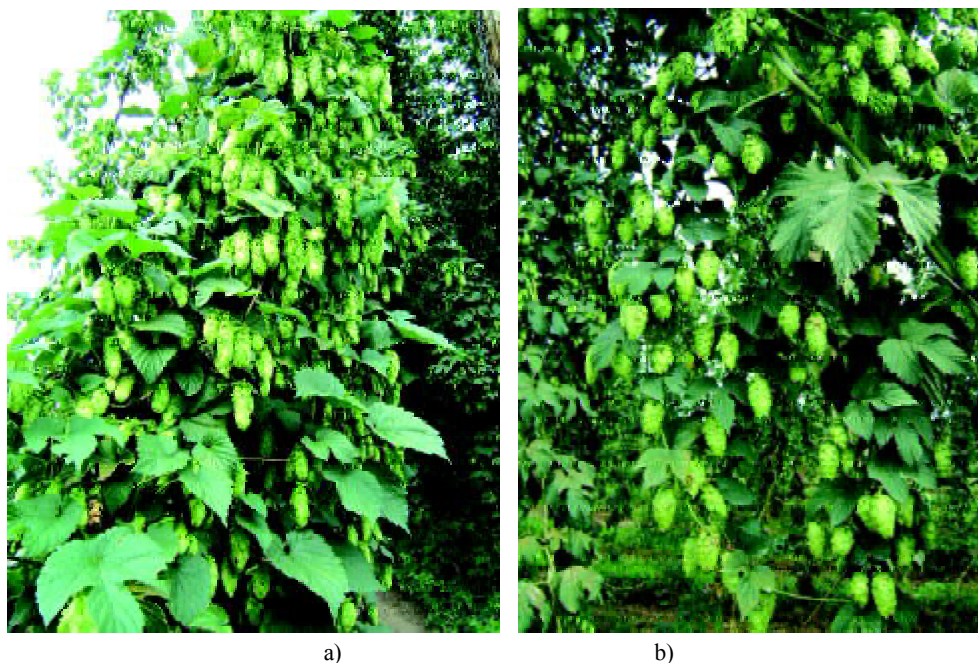
Prowadzone są badania nad monitorowaniem zdrowotności plantacji założonych z sadzonek uwolnionych od patogenów, jak też nad określeniem wpływu zdrowotności na plonowanie i jakość surowca. Wstępne wyniki badań wskazują, że chmiel uwolniony od wirusów i wiroida utajonego charakteryzuje się większą zawartością alfa kwasów oraz lepszym składem olejków eterycznych (badania własne, dane niepublikowane), co świadczy o dużym znaczeniu zdrowotności materiału sadzonkowego.

Tabela 3

Liczba uzyskanych sadzonek chmielu wolnych od wirusów i wiroida utajonego

Odmiana	Liczba sadzonek
Lubelski	22 163
Sybilla	113 228
lunga	96 800
Magnum	104 876
Razem	337 067

Źródło: Opracowanie własne.



Rys. 8. Plantacja chmielu założona na bazie zdrowych sadzonek chmielu odmiany a) Sybilla, b) lunga

Źródło: Opracowanie własne.

Literatura

1. Clark M. F., Adams A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 1977, **34**: 475-483.
2. Dwornikiewicz J.: Fitosanitarne i agrotechniczne zasady sadzenia chmielu. Instr. upowszech., IUNG-PIB, Puławy, 2006, **114**.
3. Grudzińska M., Solarska E., Czubańska A., Przybyś M., Fajbuś A.: Elimination of *Hop latent viroid* from hop plants by cold treatment and meristem tip culture. *Phytopathol. Pol.*, 2006, **40**: 21-30.
4. Kiefer E., Heller W., Ernst D.: A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol. Biol. Repr.*, 2000, **18**: 33-39.

5. Krofta K., Kroupa F.: Qualitative indicators of virus-free hops of Czech provenance. Rostlinná Výroba, 1995, **8**: 383-388.
6. Matoušek J., Patzak J., Oriniaková P., Chrástková V., Svoboda P.: Genotype-dependent sensitivity of hop (*Humulus lupulus* L.) to HLVD infection; HLVD sequence stability and its field distribution within Žatec hop collection garden. Proc. Sci. Commission IHGC, 1997, 87-94.
7. Patzak J., Matoušek J., Krofta K., Svoboda P.: Pathogenic effects of HLVD. Proc. Sci. Commission. Canterbury, England, 2001, 52-56.
8. Skomra U.: Nowa odmiana chmielu – lunga. Cz. I. Charakterystyka botaniczna. Przem. Ferm. i Owoc. Warzyw., 2005, **3**: 30.
9. Skomra U.: Wpływ niektórych czynników na wykrywalność HMV i PNRSV w chmielu testem ELISA. Pam. Puł., 2001, **126**: 95-105.
10. Skomra U.: Występowanie wirusów w roślinach chmielu (*Humulus lupulus* L.) na Lubelszczyźnie. Pam. Puł., 2001, **126**: 107-124.
11. Solarska E.: Zabezpieczenia zdrowych plantacji chmielu przed chorobami wirusowymi. Instr. upowszech., IUNG-PIB Puławy, 2006, **113**.
12. Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E., Clark M. F., Adams A. N.: The detection of viruses by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). J. Gen. Virol., 1976, **33**: 165-167.

Prace badawcze związane z uzyskiwaniem zdrowego materiału sadzonkowego zostały wykonane przy finansowym wsparciu Grupy Żywiec.

Adres do korespondencji:

doc. dr hab. Teresa Doroszevska
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 081 886 34 21 w. 216
e-mail: dorter@iung.pulawy.pl