



Jornadas de LÚPULO e CERVEJA

Novas oportunidades de negócio

Livro de atas

Bragança, 13-14-15 de julho 2015

editores

Manuel Ângelo Rodrigues · Jorge Sá Morais · João Paulo Miranda de Castro

organização



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA
Centro de Investigação de Montanha



Título: Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio.
Livro de atas

Editores: Manuel Ângelo Rodrigues (CIMO/IPB9)
Jorge Sá Morais (ESA/IPB)
João Paulo Miranda de Castro (CIMO/IPB)

Organização: Instituto Politécnico de Bragança
ISBN: 978-972-745-202-6
Handle: <http://hdl.handle.net/10198/11625>
Edição: Instituto Politécnico de Bragança – Dezembro de 2015

Design da capa: Serviços de Imagem do IPB
Contacto: jpmc@ipb.pt

Apoios:



Conteúdo:

<u>O LÚPULO: DA CULTURA AO EXTRATO. TÉCNICA CULTURAL TRADICIONAL</u>	1
<u>O LÚPULO: CULTIVARES E EXTRATO</u>	11
<u>PRODUÇÃO E TECNOLOGIA DE CEREAIS: NOTAS BREVES SOBRE O CULTIVO DE CEVADA EM PORTUGAL</u>	23
<u>PRODUÇÃO E TECNOLOGIA DE CEREAIS: PROCESSO DE MALTAGEM DA CEVADA</u>	37
<u>LEVEDURAS E FERMENTAÇÕES: O CASO DA CERVEJA</u>	53
<u>A CULTURA DO LÚPULO EM BRAGANÇA. ASPETOS AGRONÓMICOS INOVADORES E POTENCIAL E EXPANSÃO</u>	63
<u>OBTENÇÃO DE PLANTAS DE <i>HUMULUS LUPULUS</i> L. RESISTENTES A VÍRUS</u>	71
<u>MACROZONAGEM DA APTIDÃO DO SOLO PARA A CULTURA DO LÚPULO NO DISTRITO DE BRAGANÇA</u>	83
<u>UM FUTURO PARA A PRODUÇÃO DE LÚPULO EM PORTUGAL</u>	99
<u>LÚPULO: APLICACIÓN INDUSTRIAL DE LA TECNOLOGÍA DE GASES COMPRIMIDOS.</u>	101

Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L. resistentes a vírus

M^a. João Sousa¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

A biotecnologia vegetal tornou-se uma ferramenta fundamental no melhoramento das mais variadas espécies. Na sua vertente de transformação genética, abriu novos horizontes de interesse agrícola e económico, no controlo de doenças e pragas. No lúpulo, a perda de produtividade, devido a infeções virais, levou a que a estratégia de transformação genética, para introdução de resistência a vírus, se tornasse extremamente interessante. Neste trabalho, procurou-se estabelecer condições para obter um sistema de transformação eficiente, com base na introdução do gene da cápside viral. Testou-se o sistema de micropropagação e de regeneração em duas cultivares (Eroica e Brewer's Gold) e num clone espontâneo (Bragança). Utilizaram-se diferentes meios base e diferentes explantes (folhas, pecíolos e entrenós). Este sistema de regeneração, permitiu desenvolver dois processos de transformação: 1) mediado por *Agrobacterium* e 2) bombardeamento de partículas. Foram testados diferentes parâmetros de transformação (plasmídeos, tempos de corte, co-cultura, meios de seleção). Verificou-se a transformação por diferentes técnicas de análise molecular e obteve-se transformação estável em qualquer dos processos. Após 2 anos em terra, as plantas transformadas utilizando os dois processos, foram testadas para o gene da *cpArMV*, apresentando resultados positivos.

Palavras-chave: cultura *in vitro*; *Humulus lupulus* L.; transformação genética; Cápside viral do Arabis mosaico vírus (*cpArMV*)

Introdução

O *Humulus lupulus* L. é uma espécie herbácea perene e dióica da família *Cannabaceae*, de grande valor económico na indústria cervejeira [1]. A sua distribuição espontânea ocorre em zonas temperadas, encontrando-se no hemisfério norte acima dos 32° de latitude até aos 55° [2]. A sua utilização na indústria cervejeira só começou no século XII, mas no século XV a sua utilização era universal e hoje o lúpulo produzido para este fim, é uma significativa fonte de rendimento em vários países [3]. Esta é uma

espécie sensível a um vasto conjunto de pragas e doenças (Nemátodos, insetos, fungos, bactérias, vírus e viróides), o que causa grandes reduções no conteúdo em α -ácidos, comprometendo a qualidade e conseqüente comercialização [4]. Os primeiros trabalhos de cultura *in vitro* de lúpulo são da década de 70 do séc. XX [5]. Atualmente a cultura *in vitro* é a ferramenta essencial para multiplicação (clonagem), manutenção de stocks, e melhoramento com a transformação genética. A obtenção de plantas após transformação genética é um dos possíveis objetivos da regeneração de plantas *in vitro*, e da sua propagação *in vitro*, permitindo o melhoramento da planta em várias vertentes como a produção e resistência a doenças. Neste trabalho desenvolveu-se um protocolo reprodutível para estabelecimento, propagação, regeneração e transformação de lúpulo.

Material e Métodos

Micropropagação e Organogénese

Material vegetal

O material vegetal utilizado nos diferentes ensaios foi obtido de plantas femininas de lúpulo de duas cultivares (var.) – Brewers Gold (BG) e Eróica (Er) – propagadas *in vitro*, e de um clone espontâneo da região de Bragança que se denominou Clone Br. A var. BG foi estabelecida em cultura a partir de explantes recolhidos de plantas existentes no Jardim Botânico de Lisboa. A var. Er foi micropropagada a partir de explantes obtidos de material cedido pela Bralupulo.

Condições de propagação

Na propagação das plantas utilizou-se meio de Adams [6] modificado (20 g/L de glucose e 0,75 mg/L de ácido indolbutinico (IBA) e 0,2 mg/L de benzil amino-purina (BA), que denominamos Adams 1.

Para micropropagação das plantas foram inoculados os meristemas axilares e apicais. Os meristemas foram colocados na vertical no meio de cultura (esterilizado por autoclavagem de 15 minutos a 120°C e 1 atm) e mantidos num fotoperíodo de 16/8h (luz/escurecimento) obtido com lâmpadas “day-light” 35 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A subcultura das plantas ocorreu a intervalos de 6 semanas

Indução de meristemas adventícios (organogénese)

Os meios testados foram os de Adams [6], MS [7] e SH [8]. Foram utilizados 10 mL de meio sólido em cada tubo de cultura (7 g/L de agar-agar). Como fonte de carbono utilizou-se a sacarose (15 g/L). As diferentes suplementações hormonais testadas encontram-se na Tabela 1. O anti-oxidante utilizado em todos os meios foi a Cisteína (15 mg/L). As condições de luz e fotoperíodo foram as utilizadas na micropropagação. Foram inoculados segmentos de entrenós (Fig. 1), e pecíolos de folhas.

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O processo de co-cultura iniciou-se pela preparação da suspensão de bactérias, obtida pela colocação em 20mL de meio LB (V-Reis, Lisboa), de uma colónia da estirpe LBA 4404, com o plasmídeo pROKArMV, isolada em meio sólido. Nos ensaios de transformação com pré-cultura, o material vegetal foi previamente cortado 26h ou 48h antes e colocado a incubar a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, em meio de regeneração. Na transformação propriamente dita, o material foi mergulhado numa solução de sacarose 0,3% e bactérias (OD=0,6), sendo a solução diluída para um valor final de 0,2. Nestes ensaios, utilizaram-se explantes provenientes de entrenós. Após a imersão, cuja duração variou entre 10 e 12 minutos, os entrenós foram secos em papel de filtro estéril e colocados em meio fresco de regeneração com antibióticos

Seleção do material após transformação

Após 48 a 72 horas de co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura idêntico ao utilizado durante a co-cultura, ao qual foi adicionado 250mg/L de carbenicilina(carb) e 250mg/L de cefotaxima (cef). Parte do material foi transferido para meio com 25mg/L de canamicina (can.), para além dos antibióticos de eliminação das bactérias. Três semanas depois, o material foi novamente transferido para meio de seleção suplementado com 50mg/L de can. Os meristemas regenerados foram transferidos para meio de micropropagação contendo antibióticos de seleção (50mg/L de can).

Transformação genética por bombardeamento de partículas

Após dois dias de pré-cultura, no escuro, os explantes foram transferidos para a luz (condições descritas anteriormente), e transformados por bombardeamento de partículas. Depois do bombardeamento as condições de cultura foram semelhantes às condições de co-cultura com *A. tumefaciens* (meio de regeneração contendo 25mg/L de can. como

antibiótico de seleção. Três semanas depois o material foi transferido para meio fresco de regeneração contendo 50mg/L de can.). Os entrenós de plantas, mantidas durante 2 meses em cultura, utilizados como explantes, foram seccionados e colocados em meio de indução 48h antes do bombardeamento.

O aparelho utilizado para os bombardeamentos foi o PDS-1000/ He delivery system (BioRad Laboratories, Hércules, U.S.A.). Um volume de 6 μ L da suspensão de partículas de ouro e DNA foi pipetado e colocado na superfície dos “macrocarriers”. Após secagem dos “macrocarriers” na bancada de fluxo laminar, estes foram colocados a 6mM do ecrã de paragem e as amostras foram colocadas a 6, 9 e 12cm. Os explantes foram bombardeados a 1300, 1500 e 2000 Psi (Tabela 2). Após a transformação, o material foi colocado em meio de regeneração com uma pressão seletiva de 25mg/L de can., sendo esta concentração aumentada para 50mg/L, na subcultura seguinte

Determinação da expressão transiente

A atividade da β -glucuronidase foi detetada no material vegetal transformado por bombardeamento, ou *A. tumefaciens* recorrendo ao método histoquímico descrito por Jefferson [9].

Análise molecular das plantas

Extração de DNA das plantas

Folhas e meristemas apicais de plântulas jovens foram utilizados para a extração de DNA. Para a análise do DNA por PCR o processo foi feito 1Mês após a transformação. A extração de DNA foi efetuada de acordo com o protocolo descrito no anexo 2 adaptado a partir de Yang e King e modificado de Doyle e Doyle [10].

Análise do DNA por PCR

O DNA genómico das plantas foi usado para a amplificação por polimerase em cadeia dos genes presentes nos plasmídeos. Foram amplificados os genes *uid A* e o *npt II*, seguida da determinação do gene de interesse, codificante da proteína da cápside viral do ArMV. análise por PCR para o gene *npt II* foi feita com os seguintes “primers”: 5’-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTGG-3’ e o 5’-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTAA-3’. O programa utilizado foi o seguinte: 95°C, 5 minutos para a abertura inicial das cadeias; 94°C, 1 Minuto; 65°C, 1 Minuto; 72°C, 1 Minuto; 30 ciclos, no final um passo de elongação de 10 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas. A análise

para o gene *uid A* foi feita com os “primers”: 5’-CCC GGC AAT AAC ATA CGG CGT-3’ e 5’-CCT GTA GAA ACC CCA ACC CGT-3’ e usado o seguinte programa: 94°C, 5 minutos para a abertura inicial das cadeias; 94 °C, 1Minuto, 60°C, 1Minuto; 72°C, 3 minutos; 30 ciclos e final o passo 10 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas. A visualização dos produtos de PCR foi feita por electroforese em géis de agarose (1,2%) em solução tampão TAE (40mM Tris, pH 7,8, 2mM EDTA) com Brometo de Etídio a 0,3 µg/mL. A determinação da concentração do DNA, foi feita por espectrofotometria de absorção molecular, a 260nm. O peso molecular foi determinado por comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

Resultados e Discussão

O meio utilizado na micropropagação foi o meio Adams modificado (15 g/L glucose com 0,75 mg/L IBA e 0,2 mg/L BA), para todas as cultivares, com crescimento igualmente rápido, nas diferentes cultivares e clone. Foi determinado qual o melhor meio e melhor explante, para a obtenção de organogénese. Foram testados vários meios base e várias combinações de fitorreguladores. Verificou-se que, para cada variedade, o meio com maior taxa de regeneração foi diferente. Assim, para a variedade BG o melhor meio foi o meio MS suplementado com 3 mg/L Zea e 0,025 mg/L de IAA, enquanto, para a variedade Er o meio testado, com taxa de regeneração mais elevada, foi o meio SH suplementado com 1,5 mg/L Zea e 0,025 mg/L IAA. Para o Clone Br, o meio selecionado para os ensaios posteriores de regeneração, foi o meio MS com 15 g/L de sacarose e 1,5 mg/L de Cinetina e 0,02 mg/L de IAA.

Na tabela 1 apresentam-se os meios testados para organogénese (ou regeneração de meristemas) com os resultados obtidos em cada meio e em cada cultivar estudada.

Transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

Os resultados obtidos na transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, apontam para uma frequência de regeneração, após transformação, mais baixa que a obtida, quer no controlo, quer quando foi utilizado o bombardeamento de partículas. A frequência de regeneração utilizando o *Agrobacterium tumefaciens* é ligeiramente inferior (cerca de 6%), à das plantas controlo (Fig. 2). Enquanto a frequência de regeneração dos explantes transformados por bombardeamento de partículas foi de 23%, 3% inferior aos valores atingidos nas plantas controlo. As plantas obtidas foram selecionadas para análise por PCR, para determinação da presença do gene *uid A*. Em 2%

do total de plantas obtidas, a pressão seletiva da can. só foi visível ao fim de duas passagens por meio com antibiótico (aproximadamente 4 meses). Só após 4 meses em meio de seleção (meio com antibiótico) com 50 mg/L de can., foi possível observar na planta sintomas de sensibilidade ao antibiótico: perda de clorofila e início de necrose que, acaba por levar à morte da planta, pelo que se optou por analisar as plantas por PCR, após 4 meses de cultura em meio seletivo (Fig. 3).

Se for utilizada uma quantidade de canamicina superior logo na fase inicial de regeneração, o material acaba por não regenerar, possivelmente por inibição das células envolventes que não resistem e morrem. Se a can for colocada no meio mais tarde, após a transformação (ex: 25 dias), a concentração de can. suportada, é mais elevada (50mg/L). Nesta fase, as células transformadas já se multiplicaram e iniciaram a regeneração dos meristemas, o que permite uma maior resistência à inibição provocada pela eventual morte das células circundantes não transformadas. No entanto, a aplicação de pressão selectiva aos transformantes, mais tarde no processo de regeneração, poderá dar origem a um maior número de quimeras. A possibilidade de aparecerem células que regeneram sem estarem transformadas, num meio de selecção, poderá estar relacionada com a inactivação da can. pelas células circundantes transformadas, durante o desenvolvimento meristemático [11]

Transformação genética por bombardeamento de partículas

Os resultados para os diferentes ensaios de pressão e distância mostraram que, para este material (entrenós), a pressão em que foram obtidos resultados significativos foi a de 1500 psi à distância de 9 e 6cm, e 2000 psi à distância de 6cm (Tabela 3). O facto de haver uma expressão da proteína somente em algumas das plantas transformadas, não implica necessariamente que não exista uma possível resistência à infeção viral, uma vez que a resistência pode ser determinada ao nível da transcrição e presença do RNA da cápside [12]. A expressão da cápside viral em plantas transformadas por bombardeamento de partículas é inferior à expressão obtida para as plantas transformadas com *Agrobacterium tumefaciens*, o que pode estar associado aos locais de inserção e aos processos de silenciamento [13]. No caso das transformações por bombardeamento de partículas a integração será menos direccionada, o que poderá dar origem a maior numero de escapes, que não apresentariam qualquer expressão, quer do RNA, quer da proteína.

Análise molecular das plantas

Foram obtidas plantas putativamente transformadas de *Humulus lupulus*, quer após transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, quer após bombardeamento de partículas. A presença dos genes foi confirmada, por PCR, 2 meses após a transformação (tempo correspondente a uma subcultura). Findo este período, as plantas analisadas deixavam, com frequência, de apresentar, no gel dos produtos de PCR, a banda correspondente aos genes introduzidos. A regeneração e o desenvolvimento das plantas transformadas não foram alterados após a transformação. Parte das plantas analisadas foram posteriormente transferidas para vaso, sendo esta aclimação um processo em tudo semelhante ao efetuado para as plantas regeneradas, com uma percentagem de sucesso equivalente. Nos testes feitos a plantas transformadas com o gene da *cpArMV* obtiveram-se resultados semelhantes. Verificou-se que, tal como anteriormente, nem todas as plantas expressavam os dois genes da construção (*cpArMV* e *nptII*) de igual modo. As plantas em que o gene permaneceu integrado nos respetivos genomas, e foram transferidas para terra, foram analisadas por várias técnicas de análise molecular para além de PCR (Southern blotting, Northern blotting a expressão do gene da cápside viral foi testada por DAS-ELISA) (dados não apresentados), sendo os resultados dessas análises sido positivas num número reduzido. O gene *cpArMV* foi integrado nas plantas que sofreram transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, e nas que foram transformadas por bombardeamento de partículas. A percentagem de plantas que mantiveram o gene integrado ao fim de 6 meses, contudo, foi bastante baixo, não ultrapassando os 2 a 5%. Este resultado mostra que, ainda que num número reduzido de plantas, foi possível a incorporação estável do transgene. Outros trabalhos utilizando a transformação mediada pela estirpe de bactérias LBA 4404 de *A. tumefaciens*, e a construção 35SGUSINT, revelaram-se pouco conclusivos quanto à integração estável de genes no lúpulo [14]; [15]. O facto de haver uma expressão da proteína somente em algumas das plantas transformadas, não implica necessariamente que não exista uma possível resistência à infeção viral, uma vez que a resistência pode ser determinada ao nível da transcrição e presença do RNA da cápside [12]. Com o ensaio de Análise da manutenção do gene nas plantas transferidas para o campo foi possível verificar que, apesar de as plantas se encontrarem há mais de 2 anos em terra, o que significa que não estão sujeitas as pressões de meios de seleção, a expressão do transgene manteve-se (Fig.3). Estas plantas, sem pressão seletiva, permitem-nos considerar que o gene se mantém de facto estável,

permitindo um bom ponto de partida para estudos futuros de resistência a inoculações virais. A obtenção, ainda que de uma única planta transformada, permite que, utilizando métodos de micropropagação, se consiga um grande número de plantas com uma transformação estável e com boas possibilidades de serem resistentes ao ArMV.

Figuras e Quadros

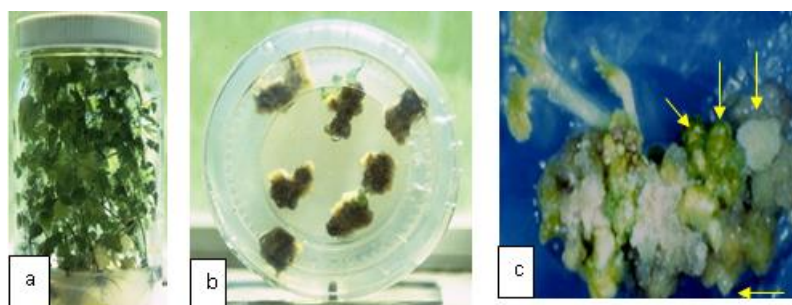


Figura 1: Do material já *in vitro* das diferentes cultivares e clone Bragança (a), foram retirados os pecíolos e entrenós e colocados em meios de indução de organogênese (regeneração de meristemas) (b), após a formação de algumas estruturas indiferenciadas (*calli*) surgem os meristemas a partir dos quais se desenvolvem novas plantas (c)

Tabela 1. Meios utilizados para a regeneração de meristemas e resultados obtidos para cada meio e cultivar.

Meio de Indução	Meio base	Zeatina (mg/L)	IAA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	% Regeneração (Bragança-Br)	% Regeneração (Eroica-Er)	% Regeneração (Brewers Gold-BG)
I1	MS	2,5	0.025		30	5,4	3,2
I2	MS	3	0.025		28	3	10,5
I3	MS		0.02	1.5	60	2,3	5,8
I4	MS	5	0.025		1,5	1,4	1,8
I5	MS	2	0.01		21	13	5,5
I6	MS		0.01	2	2,4	2	1,7
I7	MS		0.025	3	37	5,1	4
I8	MS	1,5	0.025		40	3,2	6,3
I6.1	SH	1,5	0.025		1,6	30	3,7
I7.1	SH		0.03	1.5	1,9	18	2,7

Tabela 2. Distâncias e pressões testadas nos explantes submetidos a transformação por bombardeamento de partículas

Pressão (psi)	Distância (cm)		
1300	6	9	12
1500	6	9	12
2000	6	9	12

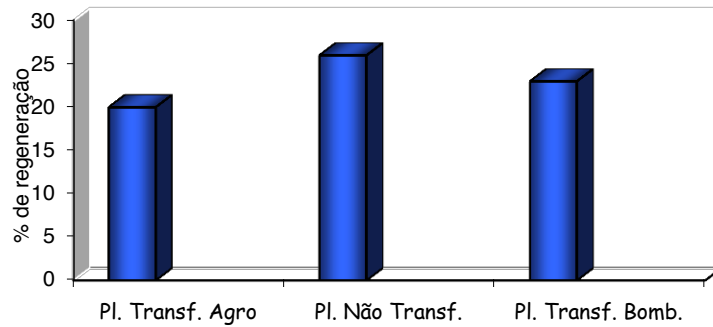


Figura 2. Percentagem de regeneração após transformação. Pl. Transf. Agro. – Plantas resultantes de transformação mediada por *Agrobacterium*; Pl Não Transf. – Plantas controlo, não transformadas; Pl. Transf. Bomb. – Plantas resultantes de transformação utilizando como método o bombardeamento de partículas.



Figura 3. a) Planta em meio de seleção com 50mg/L de can. após 4 meses de cultura. b) Explantes em caixas de Petri, com meios de seleção, no primeiro mês após transformação (setas - rebentos). c) Várias plantas transformadas, em tubo com meio de seleção, após 4 meses. As plantas são todas da mesma idade e duas delas apresentam clorose por sensibilidade ao antibiótico (setas).

Tabela 3. Expressão transiente em entrenós de lúpulo bombardeados com p35SGUSINT. Os resultados estão expressos em explantes com manchas azuis. Os dados foram testados com o programa ACTUS. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$. Entre parêntesis encontra-se a percentagem de frequência das manchas azuis nos explantes.

Pressão (psi)	Distância (cm)		
	6	9	12
1300	255 (56,3%)	208 (41,5%)	370 (73,8%)
1500	394** (98,5%)	295** (43,8%)	370 (64,8%)
2000	175** (43,8%)	323 (80,8%)	179 (44,8%)

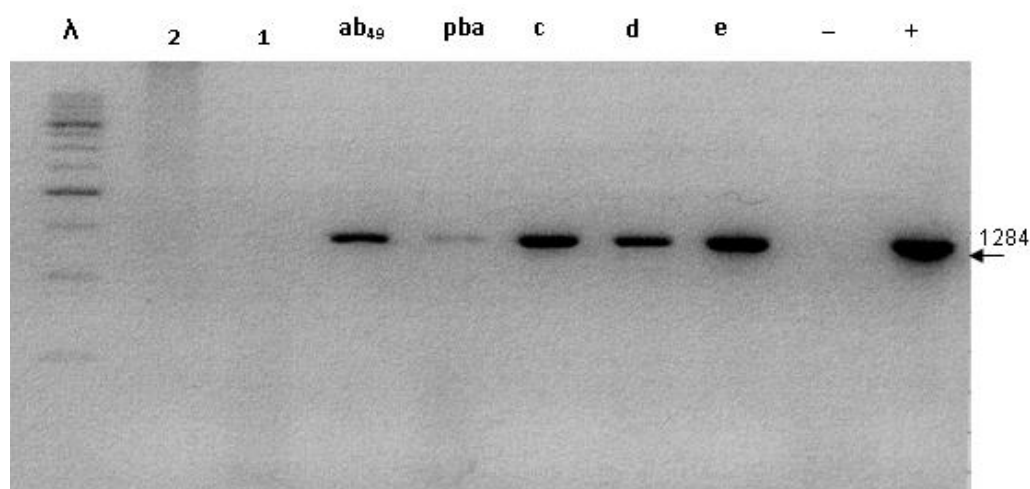


Figura 3. Produtos de PCR do gene da cápside viral do ArMV. As plantas ab_{49} , pba_1 e 2 foram plantas transformadas por bombardeamento de partículas. As plantas c, d, e, sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*. A planta 1 é uma planta controlo não transformada. Controlo positivo (+) fragmento do gene do plasmídeo isolado por PCR. Controlo negativo (-) mistura de reação sem DNA. λ (marcador molecular XIV).

Referências

- [1] Heale J. B., Legg T., Connell S. (1989). *Humulus lupulus* L. (Hop): In vitro culture; Attempted production of bittering components and novel disease resistance. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol.7, Medicinal and Aromatic Plants II, ed.by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [2] BH (2001). Beer & Health Dossiers – Hop Properties of the hop plant. www.bierengezondheid.be
- [3] Hiller Susan, Gingrich Gale A, Haunold Alfred (1996) Growing Hops - In the Home Garden. vol 19, nº5.
- [4] Benitez J.L., Magadan J.A. (1996). Aproximacion a la determinación del momento optimo de madurez del lúpulo. Cerveza y Malta, XXXIII (2), 130, 19:21.

- [5] Benitez J.L., Forster A., De Keukeleire D., Moir M., Sharpe F.R., Verhagen C.L., Westwood K.T. (2001). Hops and Hop Products, European Brewery Convention, Manual of Good Practice. Prepared for EBC Technology & Engineering Forum with the assistance of EU under the AIR programme. Produced at BRF International. pp 19:22
- [6] Adams, A. N. (1975). Elimination of viruses from hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. J. Hort. Sci., 50, 151:160.
- [7] Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473:497
- [8] Kubo S., Kagami Y., Nonaka K. (1975). Culture of stem tip of the hop and elimination of virus symptoms. Rep Res Lab Kirin Brewing, 18, 55:62
- [9] Jefferson R.A, (1987) Assaying chimeric genes in plants: the Gus fusion system. Plant Mol Biol Rep 5, 387:405..
- [10] Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19, 11:15.
- [11] Maximova S., Dandekar A., Guiltinan M. (1998). Investigation of *Agrobacterium* – mediated tgransformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Mol Biol 37, 549:559.
- [12] Guo Shan H., Cervera Maria T., Garcia Juan A. (1998). Plum Pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations. Gene, 206, 263:272.
- [13] Mlynárová L., Keizer C., Stiekema J., Nap J. (1996). Approaching the lower limits of transgene variability. The Plant Cell, 8, 1589:1599
- [14] Horlemann C., Schwekendiek A., Höhnle M., Weber G. (2003). Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 22, 210:217
- [15] Oriniakova P., Pavingerova D., Matousek J. (1999). Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. ROSTLINNA VYROBA, 45: (5) 219-227