

„Transgenní“ metabolom chmelu, některé aspekty jeho přípravy a perspektivy využití

„Transgenic“ Metabolome of Hop, Some Aspects of its Development and Prospects of Utilization

JAROSLAV MATOUŠEK

Biologické centrum AV ČR v.v.i., Ústav molekulární biologie rostlin, Oddělení molekulární genetiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice / Biology centre ASCR v.v.i. Institute of Plant Molecular Biology, Department of Molecular Genetics, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

e-mail: jmat@umbr.cas.cz

Matoušek, J.: „Transgenní“ metabolom chmelu, některé aspekty jeho přípravy a perspektivy využití. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 1, s. 13–19.

Chmel, který je pěstován hlavně pro kvasný průmysl jako zdroj cenných sekundárních metabolitů lupulinu dodávajících pivu charakteristickou hořkost a aroma, produkuje metabolom obsahující látky s protinádorovou, antiangiogenní i estrogení aktivitou, kam patří zejména prenylflavonoidy jako xanthohumol. Získat odrůdy s vyšším obsahem xanthohumolu proto patří k současnému úsilí šlechtitelů. Předpokládá se, že hladinu těchto látek, která se pohybuje u nejlepších šlechtitelských materiálů v intervalu 1–2%, by pomohl zvýšit „transgenní metabolom“ s využitím biotechnologie pomocí nově identifikovaných lupulin-specifických genů i transkripčních faktorů z rodin Myb, bZip, WD40 a bHLH a WRKY, které se podílejí na jejich regulacích. V současnosti byl na základě našich studií zjištěn komplexní charakter regulace biosyntetické dráhy prenylflavonoidů s účastí tzv. ternárních i binárních komplexů, pozitivních regulátorů i supresoru transkripce. Tyto poznatky umožní cílené transformace chmelu pro přípravu transgenního metabolomu i s perspektivou indukce metabolicky aktivních transgenních pletiv v tkáňových kulturách. Faktická využitelnost transgenního metabolomu chmelu půjde ruku v ruce s poznatky základního výzkumu o metabolických drahách lupulinu, které budou postupně zahrnovat nejen produkci polyfenolů, ale i hořkých a aromatických látek i s uvědoměním si nových praktických výhod GMO ve společnosti.

Matoušek, J.: „Transgenic“ metabolome of hop, some aspects of its development and prospects of utilization. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 1, p. 13–19.

Hop, which is mainly cultivated for the brewing industry, as a source of flavor-active secondary metabolites providing desired bitterness and aroma to beer, produces the metabolome containing compounds beneficial for human health. These are mainly prenylflavonoids as Xanthohumol, with anticancerogenic, antiangiogenic and estrogenic activities. It is the recent effort of breeders to gain new hop cultivars with higher level of Xanthohumol. It is expected that the level of these compounds which reaches just 1–2% in the best breeding materials, could be enhanced in “transgenic metabolome” introduced by the biotechnology with the use of newly identified lupulin-specific genes and transcription factors (TF) from Myb, bZip, WD40 and bHLH families that participate in their regulations. At present, we found complex character of regulation of prenylflavonoid bio-synthetic pathway including an involvement of so-called ternary and binary TF complexes, positive regulators, as well as transcription suppressor. This knowledge enables targeted hop transformation for the preparation of transgenic metabolome and makes realistic the perspective to induce metabolically active transgenic tissue cultures of hop. An effective usefulness of transgenic metabolome of hop will depend on their findings of basic research in the metabolic pathways of lupulin and social awareness with a new practical benefit of GMO, that will include successively not only production of polyphenols, but also bitter acids and aromatic compounds.

Matoušek, J.: „Transgene“ Hopfenmetabolom einige Aspekte seiner Vorbereitung und Perspektive seiner Anwendung. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 1, S. 13–19.

Der Hopfen, der hauptsächlich für die Gärungsindustrie als die Quelle von wertvollen sekundären Metaboliten des Lupulins, die dem Bier eine charakteristische Bitternis und Aroma geben, angebaut wird, produziert auch Metabolom, das die Anticancerogene-, Antiangiogene- und Estrogenstoffe (in diese Gruppe auch Prenylflavonoide gehören) produziert. Zur zeitgenössischen Bemühung der Hopfenbauer deswegen gehören die Hopfensorten mit einem erhöhten Gehalt an Xanthohumolon zu pflanzen. Es gibt eine Hypothese, dass der Gehalt an diesen Stoffen, der bei den besten Zuchthopfen im Bereich 1–2% liegt, konnte unter Verwendung der Biotechnologie durch neuidentifizierten Lupulin-spezifischen Gens und transkriptione Gens aus den an ihrer Regulationen teilnehmenden Familien Myb, bZip, WD40, bHLH und WRKY erhöht werden. Zurzeit auf Grund unserer Studien wurde ein komplexer Charakter der Regulation von der biosynthetischen Prenylflavanoidenbahn mit der Teilnahme der sogenannten Ternary- und Binary Komplexe, positiven Regulatoren und auch des Transkriptionssuppressors festgestellt. Diese Ergebnisse ermöglichen eine zur Vorbereitung des transgennenen Metaboloms mit einer Perspektive der Induktion des metabolisch aktiven Gewebeflechtwerks in den Gewebekulturen gezielte Hopfentransformation. Die tatsächliche Verwendbarkeit des transgennenen Hopfenmetaboloms wird Hand in Hand mit den Grundforschungsergebnissen über metabolische Bahnen des Lupulins, die schrittweise nicht nur Polyphenols- aber als auch Bitterstoffenproduktion und Produktion von aromatischen Stoffen einschließen werden und mit Bewusstsein der neuen praktischen GMO Vorteile in der Gesellschaft fortgesetzt.

Klíčová slova: český chmel, lupulin, regulační faktory, transgenose, protirakovinné látky, biotechnologie

Keywords: Czech hop, lupulin, regulatory factors, transgenesis, anticancerogenic compounds, biotechnology

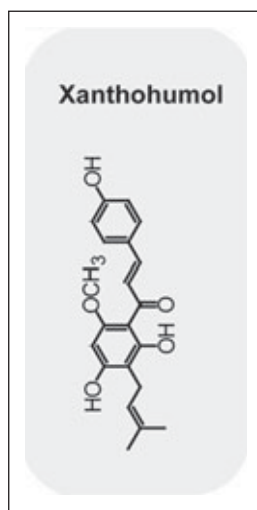
1 NOVÉ POZNATKY MOLEKULÁRNÍ GENETIKY A GENETICKÝ POTENCIÁL PRO VYUŽITÍ CHMELU

Chmel (*Humulus lupulus* L.) je pěstován hlavně pro kvasný průmysl jako zdroj cenných sekundárních metabolitů lupulinu dodávajících pivu charakteristickou hořkost a aroma. V minulých článcích nazvaných „Ozdravné pivo“ (Matoušek, 2001) a „Ozdravné“ látky a mole-

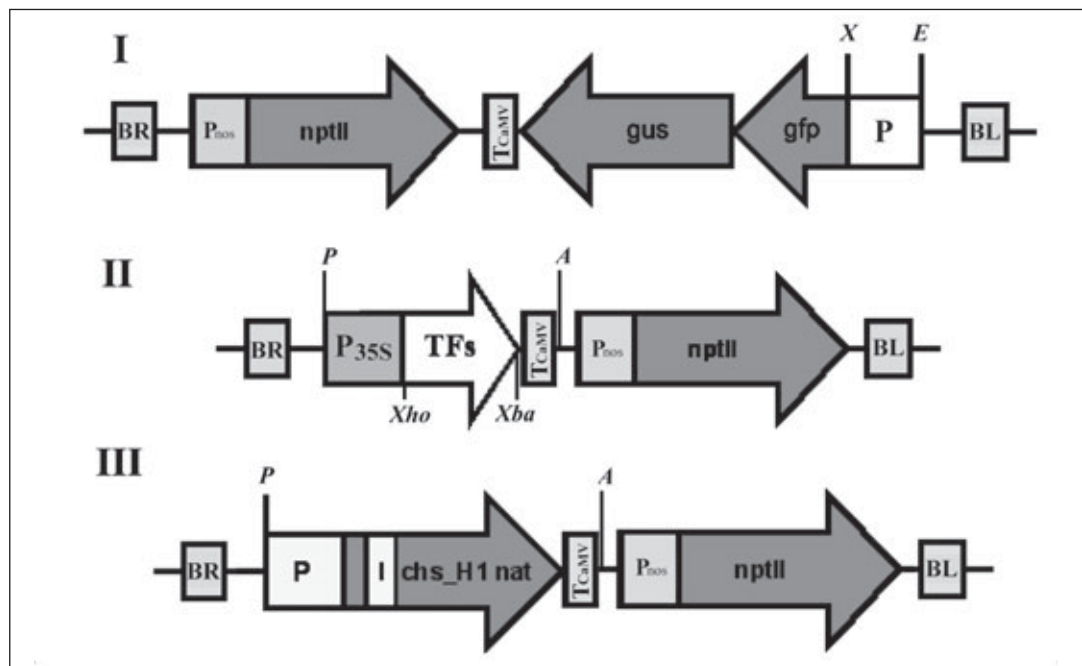
1 RECENT KNOWLEDGE FROM THE FIELD OF MOLECULAR GENETICS AND GENETIC POTENTIAL FOR HOP UTILIZATION

Hop (*Humulus lupulus* L.) plants are mainly cultivated for the brewing industry as a source of valuable secondary metabolites endowing the beer with characteristic bitterness and aroma. Our earlier reviews entitled “Medicinal beer”/“Ozdravné pivo” (Matoušek, 2001)

Obr. 1 Současným cílem šlechtitelů chmelu je získat odrůdy s vysokým obsahem xanthohumolu, jehož struktura je uvedena na obrázku / Fig. 1 The present aim of hop breeders is to gain cultivars with the high content of Xanthohumol having the structure presented on the figure



Obr. 2 Schéma expresních kazet vektorů používaných pro analýzy transientní exprese (I), vektorů pro transformaci chmelu transkripčními faktory (varianta bez GFP) (II) a vektoru pro expresi genu pro chalkonsyntázu *chs_H1* (III). Kódující sekvence jsou označeny zkratkami genů či TF (sequence pro transkripční faktor). Promotory jsou označeny P; I, intron; BR a BL, pravá a levá hranice T-DNA. NptII, gen pro neomycin fosfotransferázu, rezistence ke kanamycinu. Promotor genu pro nopalín syntázu je označen Pnos; terminátor z CaMV, TCaMV. Restrikční místa XbaI (X), EcoRI (E), Ascl (A), a PacI (P) byla použita pro konstrukci vektorů / Fig. 2 Schematic diagram of the expression cassettes within T-DNA parts of transient expression vectors (I), vectors for hop transformation with transcription factors (variant without GFP) (II) and vector for *chs_H1* (III) expression (III). Coding sequences are in dark gray and designated by gene abbreviations or by TF (transcription factor sequence). Promoters are marked by P; intron is marked by I; BR and BL, right and left T-DNA borders, respectively. NptII designates the neomycin phosphotransferase gene of resistance to kanamycin. This gene is driven by the nopalín synthase promoter (Pnos). Terminators of CaMV (TCaMV) are shown. Restriction sites XbaI (X), EcoRI (E), Ascl (A), and PacI (P) were used for the vector construction



kulární analýza chmelových genů (Matoušek, 2006) jsme se zabývali některými aspekty kodeterminace potenciálně ozdravných látek (např. Zanolí and Zavatti, 2008, Magalhaes et al., 2009, Van Cleemput, 2009, Bolca et al., 2009, 2010), které jsou součástí spektra metabolitů (metabolomu) chmelu. Možnost přípravy těchto metabolitů s protinádorovou a antiangiogenní aktivitou, kam patří zejména prenylflavonoidy, se stala již nedílnou součástí pozornosti šlechtitelů chmelu na celém světě. Například o snaze získat odrůdy s vysokým obsahem xanthohumolu (obr. 1) svědčí úsilí našich i zahraničních šlechtitelů, kteří prezentovali své výsledky na nedávné konferenci I.H.G.C., jež proběhla v Lublinu, v Polsku 19.–23. června 2011. V současné době se hladiny xanthohumolu u výchozích šlechtitelských materiálů, o kterých se uvažuje z hlediska farmakologického využití, většinou pohybují kolem jednoho procenta a ty nejlepší v intervalu 1–2% (např. Lutz et al., 2011, Nesvadba et al., 2011). Isoxanthohumol, jehož přeměna na fytoestrogenní 8-prenylarinenin (hopein) působením bakterií *Eubacterium limosum* lidské střevní mikroflóry byla doložena v několika studiích (Possemiers et al., 2005, 2011), je nadále středem zájmu jako medikament zmírňující symptomy menopauzy (např. Heyerick et al., 2006, Erkkola et al., 2010). I když hopein i některé jiné chmelové medikamenty jsou již uvedeny na trh v souvislosti s farmaceutickým využitím chmelu (viz např. předchozí článek – Matoušek, 2006), při jeho současném produkčním potenciálu jsou však hladiny uvedených látek poměrně nízké.

V souvislosti s novými možnostmi pokračujícího výzkumu v oblasti molekulární genetiky nastává etapa analýzy nových materiálů, jež budou připraveny na bázi geneticky modifikovaného chmelu pro produkci „transgenního metabolomu“. Tato nová etapa výzkumu je mimo jiné umožněna díky odhalení některých chmelových genů v návaznosti na pokračující výzkum genetické determinace lupulinu. K původně námi identifikované rodině tzv. pravé chalkonsyntázy *chs_H1* (Matoušek et al., 2002 a,b, 2006, 1) a dříve valerophenonsyntázy (Okada and Ito, 2001) přibýly další geny jako například gen pro O-metyltransferázu 1 (Nagel et al., 2008) a prenyltransferázu (Tsurumaru et al., 2010) kodeterminující biochemickou dráhu prenylflavonoidů. V posledních letech jsme se ve spolupráci s Chmelářským

and „Medicinal“ compounds and molecular analysis of hop genes (Matoušek, 2006) dealt with some aspects of genetic co-determination of potentially medical compounds (see e.g. Zanolí and Zavatti, 2008, Magalhaes et al., 2009, Van Cleemput, 2009, Bolca et al., 2009, 2010), that compose spectrum of metabolites (metabolome) of hop. The possibility to prepare these metabolites, mainly prenylflavonoids, having anti-cancerogenic and anti-angiogenic activity became in focus of hop breeders worldwide. For instance, the common effort to get hop cultivars with high Xanthohumol levels (Fig. 1) presented by hop breeders on recent I.H.G.C. meeting that took place in Lublin, Poland, June 19-23 this year. At present the Xanthohumol levels are close to one percent in the original breeding materials considering for pharmacological use and the levels in the best genotypes are ranging between 1-2% (e.g. Lutz et al., 2011; Nesvadba et al., 2011). Isoxanthohumol whose conversion to phytoestrogenic 8-prenylarinenin (hopein) facilitated by the human intestinal microflora (*Eubacterium limosum*) described in several studies (Possemiers et al., 2005, 2011) continued to be of great interest as the medicament facilitating menopausal symptoms (e.g. Heyerick et al., 2006; Erkkola et al., 2010). Although hopein and some other hop medicaments has been in connection to the medicinal use of hop introduced to the market (see e.g. previous review – Matoušek, 2006), the levels of these compounds are rather low at the recent production capacity of hop.

In connection of new possibilities of ongoing research on the field of molecular genetics the phase of analysis of new materials prepared from genetically modified hops grown for production of „transgenic metabolome“ is coming on. This new stage of the research is among others enabled owing to the discovery of some hop genes to continuing analysis of genetic determination of lupulin. In addition to originally identified oligofamily of so-called „true“ chalcone synthase *chs_H1* in our experiments (Matoušek et al., 2002 a,b, 2006) and sooner valerophenonsynthase (Okada and Ito, 2001), another genes as O-methyltransferase 1 (Nagel et al., 2008) and prenyltransferase (Tsurumaru et al., 2010) genes co-determining prenylflavonoid pathway were isolated. In the last years, we collaborated with Hop insti-

institutem s.r.o v Žatci, zejména v rámci projektů Grantové agentury České republiky (GAČR 521/03/0072 a GAČR 521/08/0740), orientovali na funkční identifikaci regulačních genů pro metabolom chmelu (Matoušek et al., 2005, 2007, 2010) a v současné době je k dispozici již šest rostlinných transformačních vektorů (obr. 2, typ vektoru II) pro homologické chmelové transkripční faktory z rodiny Myb, tři z rodiny bZip, dva z rodin bHLH, jeden z rodiny WD40 a další vektory jsou připravovány. Kromě homologických genů, které mohou sloužit jako transgeny, jsou k dispozici heterologní geny zejména z druhu *Arabidopsis thaliana*, u nichž je vysoká pravděpodobnost, že mohou rovněž měnit metabolom po vnesení do chmelového genomu.

Poslední výzkumy s využitím transientní exprese (Matoušek, 2006) chmelových genů u druhů *Nicotiana benthamiana* a *Petunia hybrida* s použitím vektorů typu I (obr. 2) zároveň ukázaly, jak složité je přirozené genetické pozadí pro regulaci lupulinových genů. Bylo například zjištěno, že chalkonsyntáza *chs_H1* mající důležitou roli při syntéze xanthohumolu, je regulována nejen nezávislým způsobem, jako např. při regulaci heterologním faktorem *Pap1* (Matoušek et al., 2006), ale i složitějšími, tzv. binárními a ternárními komplexy regulačních faktorů sestávajících z komponent rodin Myb, bHLH a WDR. Existence těchto komplexů při regulaci biosyntézy rostlinných pigmentů, trichomů a průduchů byla prokázána i u několika dalších rostlinných druhů (např. Ramsay and Glower, 2005, Hirchi et al., 2011). U chmelu jsme dosud identifikovali dva chmelové ternární komplexy (obr. 3A) zcela specificky aktivující gen *chs_H1*. První komplex tvoří sestava faktorů *HMYB2/HWDR1/HbHLH2* a druhý sestava *s-HIMYB3/HWDR1/HbHLH2* (Matoušek et al., 2011), jak je znázorněno na obr. 3A. Navíc faktory *HbHLH2* a *HMYB3* mohou působit při regulaci i zcela samostatně a jak bylo pozorováno v naší předešlé práci (Matoušek et al., 2007), delší či kratší formy faktoru *HMYB3* mohou měnit i morfogenezi, celkový vzhled a vzrůst rostlin. Aktivace genů ternárními komplexy je enormně vysoká (obr. 4) a je na úrovni nebo i převyšuje úroveň aktivity promotoru 35S viru kvěťkové mo-

tute GmbH in Žatec in the frame of projects of Czech Science Foundation (GAČR 521/03/0072 a GAČR 521/08/0740) on functional identification of hop metabolome regulatory genes (Matoušek et al., 2005, 2007, 2010) and recently there are already six transformation plant vectors available (Fig. 2, the vector type II) bearing homologous hop transcription factors (TF) from Myb family, three from bZip TF family, two from bHLH family and one from WD40 family and other are in preparation. Besides the homological genes, which can serve as transgenes, there are heterological genes available from *Arabidopsis thaliana* with high chance to cause metabolome change after their introduction in hop genome.

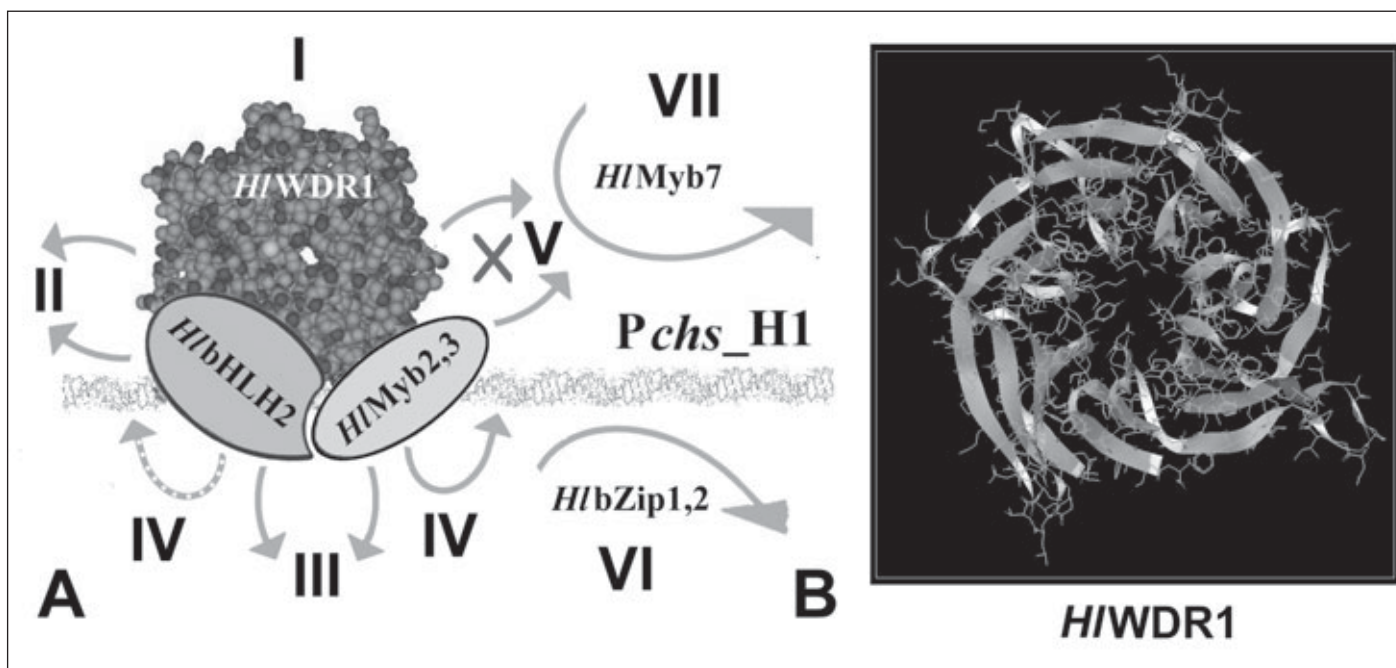
The recent analyses with the use of transient expression (see previous article [Matoušek, 2006]) of hop genes in *Nicotiana benthamiana* and *Petunia hybrida* using vectors of type I (Fig. 2) showed simultaneously how complex is the genetic background regulating lupulin genes. For instance, it has been found that chalcone synthase *chs_H1* having important role in Xanthohumol biosynthesis is regulated not only by the independent action as in the case of heterological *Pap1* TF (Matoušek et al., 2006) but also by the more complicated so-called binary and ternary complexes of regulatory factors composed by the components from Myb, bHLH and WDR families. The involvement of such complexes at regulation of biosynthesis of plant pigments, trichomes and lenticels was shown for several other plant species (e.g. Ramsay and Glower, 2005, Hirchi et al., 2011). In hop we identified up to date two ternary complexes (Fig. 3A) that activate with high specificity *chs_H1* gene. The first complex is created by the TF set of *HMYB2/HWDR1/HbHLH2* and the second one by *s-HMYB3/HWDR1/HbHLH2* TF set (Matoušek et al., 2011), as depicted in Fig. 3A. In addition, factors *HbHLH2* and *HMYB3* can act also quite independently and as observed in our earlier work (Matoušek et al., 2007), longer and shorter forms of *HIMyB3* TF can modify also plant morphogenesis, habits and plant growth. The gene activation by the ternary complexes is enormously strong (Fig. 4) being on

Obr. 3 Schéma regulačního modelu chmelového genu *chs_H1* prostřednictvím klonovaných chmelových faktorů, získané na základě funkčních analýz TF u heterologního systému *N. benthamiana*.

A: Základní schéma ternárního komplexu bylo přizpůsobeno z práce Baudry et al. (2004). (I) celkový ternární komplex sestávající z Myb, bHLH a WDR faktorů, působící především prostřednictvím boxu P-Myb; (II) binární kombinace bHLH a WDR; (III) kombinace Myb a bHLH; (IV) středně silné přímé působení faktoru *HbHLH2* a slabé přímé působení transkripčního faktoru *s-HIMyB3*; (V) Myb a WDR kombinace je nefunkční a označena křížkem (VI) stimulační efekt chmelových transkripčních faktorů bZip prostřednictvím G-boxů; (VII) inhibiční působení faktoru *HIMyB7*. **B:** 3-D model faktoru *HWDR1* ve schématu, který jsme získali s použitím programu SWISS-MODEL Workspace.

Fig. 3 Schematic diagram of *chs_H1* regulation model with combinations of cloned hop TFs as observed in heterologous system of *N. benthamiana*.

A: The basic scheme of ternary complex was accommodated from Baudry et al. (2004). (I) the whole ternary complexes consisting of Myb, bHLH and WDR TFs acting predominantly on P-Myb box; (II) bHLH and WDR binary combination; (III) Myb and bHLH combinations; (IV) direct moderate action of *HbHLH2* and weak action of *s-HIMyB3*; (V) Myb and WDR combinations designated by crossing are non functional; (VI) stimulatory effects of hop bZip factors on G-boxes, (VII) inhibitory effect of *HIMyB7*. **B:** 3-D model of *HWDR1* in the scheme we obtained using SWISS-MODEL Workspace.



zaiky, který se komerčně využívá pro silnou konstitutivní expresi transgenů (Benfey and Chua, 1990, Potenza et al., 2004). Z druhé strany je pozoruhodné, že metabolom lupulinových žlázek je striktně omezen v produkci anthokyanů. I když dochází k aktivaci lupulinových genů ternárními komplexy, k biosyntéze anthokyanů v tomto pletivu prakticky nedochází. Specifické chmelové komplexy nejsou ani schopny indukovat biosyntézu těchto pigmentů v listech petunie na rozdíl od regulačního faktoru *Pap1* z *Arabidopsis thaliana* (obr. 5A). Tento fakt nahrává předpokladu, že s použitím specifických chmelových transgenů bude možné v lupulinových žlázkách dosáhnout zvýšené produkce metabolomu (prenylflavonoidů) bez konverze chalkonů do pigmentů, anthokyanů a květních barviv.

Jak bylo zjištěno v naší současné práci, potenciál chmelového metabolomu je dále kodeterminován binárními komplexy *HMyb1/HWDR1* a *HMRKY1/HWDR1*, které aktivují gen pro O-metyl transferázu 1, dále přítomností minoritních pozitivních regulátorů typu bZip (obr. 3A; Matoušek et al., 2010) a negativních regulátorů jako je *HMyb7* (Matoušek et al., 2011), o kterém jsme zjistili, že vede ke snížení transkripce klonovaných chmelových transkripčních faktorů (obr. 3A). Složitá determinace metabolomu, která závisí od regulačních elementů strukturních i regulačních genů, je v souladu s faktem, že hladina Xanthohumolu se chová jako typický kvantitativní znak (Patzak et al., 2011), a tudíž dosahuje různé gradace v rámci přirozeného biochemického potenciálu pro produkci metabolomu u různých kultivarů a odrůd chmelu.

2 TRANSGENNÍ CHMEL A ZPŮSOBY JEHO PŘÍPRAVY PRO ZÍSKÁNÍ MODIFIKOVANÉHO METABOLOMU

V roce 2007 byly získány transgenní klony chmelu exprimující konstitutivně stilben syntázu z révy vinné (Schwekendiek et al., 2007) a bylo referováno o akumulaci resveratrolu a jeho derivátů v metabolomu chmelu. V současné době je dostupná první komplexně pojatá práce (Gatica-Arias et al., 2012) vzniklá ve spolupráci s našim pracovištěm, ukazující na účinnost indukce změn chmelového metabolomu pomocí transgenose a tzv. „Myb biotechnologie“ (Broun et al., 2006). Na obr. 5 C, D je pro porovnání prezentováno foto kontrolního a transgenního chmelu cv. Tetnang, nesoucího heterologní regulační faktor gen *AtMyb75* s triviálním názvem *Pap1*, který jsme izolovali z genomu *A. thaliana* (Matoušek et al., 2006). Na uvedeném obrázku lze pozorovat, že u transgenního chmelu při dosažení fáze maturity dochází k červenému zbarvení hlávek a k akumulaci různých metabolitů, zejména anthocyaninu, rutinu a isoquercetinu. Některé ze zjištěných metabolitů nejsou bez zajímavosti pro farmaceutiku a jsou tudíž předmětem dalšího studia (Gatica-Arias et al., 2012). Dekorativní charakter tohoto transgenního chmelu si přitom nic nezadá s okrasnými rostlinami. Je nepochybné, že vnesením regulačního faktoru dochází k „prolomení limitu“ pro metabolom chmelu, který byl dosud získáván klasickým šlechtěním. Díky transgenosi tak byly získány další možnosti pro produkci nových látek. Tento první názorný příklad transgenního metabolomu u chmelu by měl být v budoucnu následován cílenějšími změnami podle toho, jak bude postupovat analýza genetické determinace biochemických drah účastnících se v syntéze chmelového metabolomu. Transgenní pletiva chmelu lze v současnosti získat klasickým způsobem při použití transformace bakteriemi *A. tumefaciens* (Oriniaková et al., 1996) a regenerace na selekčním médiu (Horlemann et al., 2003, Schwekendiek et al., 2007) nebo s použitím biolistické metody (Batista et al., 2008), i když v obou případech je oproti některým jiným rostlinným druhům efektivita transformace stále nízká (Horlemann et al., 2003). V obou případech lze úspěšně využít klasické monocistronické transformační vektory, tj. zpravidla vektory obsahující v rámci vnášené T-DNA nezávisle uspořádaný transgen a jeden nebo více genů pro selekci regenerantů transgenních rostlin. Pro selekci se zpravidla využívá gen pro kanamycinovou rezistenci, popřípadě další markerové geny, jako například gen pro zeleně fosforeskující protein („green fluorescent protein“ [GFP]) (obr. 5B). Na základě tohoto GFP markeru, jak jsme prokázali, je i u chmelu možné pod UV-A světlem selektovat potenciální transgenní linie chmelu (obr. 5B, porovnej list 1 a 2).

Nové poznatky v oblasti molekulární biologie, zejména zjištění závislosti aktivace některých genů kodeterminujících metabolom lupulinových žlázek jako *chs_H1* na působení ternárních komplexů, mění tento koncept jednoduché transformace směrem k použití polycistronických vektorů, kde bude uspořádáno několik transgenů pod společnou regulační jednotkou s cílem dosáhnout jejich synchronizova-

the same level or is higher that activity of 35S promoter of *CaMV*, which is commercially used for high constitutive expression of transgenes (Benfey and Chua, 1990, Potenza et al., 2004). On the other hand, it is noteworthy that lupulin gland metabolome is strictly restricted in the anthocyanins production. Even if there is strong activation of lupulin genes by the ternary complexes, there is practically no biosynthesis of anthocyanins in this tissue. Unlike to regulatory factor *Pap1* from *Arabidopsis thaliana*, the specific hop complexes are unable to induce biosynthesis of these pigments in petunia leaves (Fig. 5A). This fact is in favor of the assumption that with the use of hop-specific homologous TF transgenes it will be possible to reach enhanced metabolome production (prenylflavonoids) without chalcone conversions to anthocyanin pigments and flower colors.

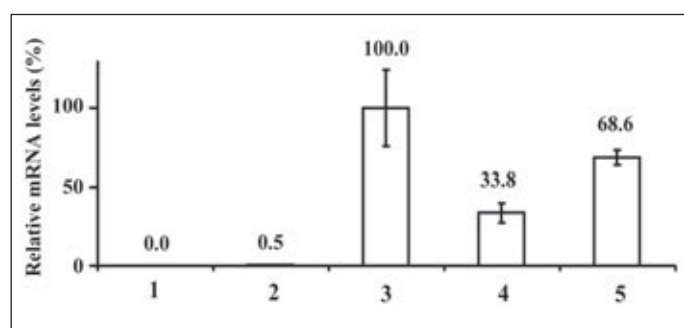
As found in our recent work, the hop metabolome capacity is further co-determined by the presence of binary complexes as *HMyb1/HWDR1* a *HMRKY1/HWDR1* that activate O-methyltransferase 1 gene, as well as by the involvement of minor positive regulators of bZip (Fig. 3A; Matoušek et al., 2010) and negative regulators (Matoušek et al., 2011) such as *HMyb7*, which is the transcription suppressor of cloned hop TFs (Fig. 3A). The complex determination of metabolome, which depends on regulatory elements of structural and regulatory genes is consistent with the Xanthohumol level that behaves as typical quantitative trait (Patzak et al., 2011) and therefore, there is different gradation in Xanthohumol levels within natural biochemical potential of the metabolome production in various hop cultivars.

2 TRANSGENIC HOP AND THE WAYS OF ITS PREPARATION TO GAIN MODIFIED METABOLOME

In 2007 hop transgenic lines expressing constitutively the stilbene synthase from grapevine were obtained (Schwekendiek et al., 2007) and it was referred about an accumulation of resveratrol and its derivatives in hop metabolome. At present, the first complex co-operative work (Gatica-Arias et al., 2012) is available showing efficient induction of changes of hop metabolome using transgenesis and so-called myb biotechnology (Brown et al., 2006). The photo in Fig. 5CD shows comparison of control and transgenic hop cv. Tetnang bearing heterologous TF, gene *AtMyb75* designated *Pap1*, which we isolated from *A. thaliana* genome (Matoušek et al., 2006). It's seen in Fig. 5CD that transgenic hop at the phase of maturation show red coloration of cones. It accumulates various metabolites like anthocyanins, rutin and isoquercetin. Some of metabolites found are of potential interest for pharmacology and, therefore, they be the subject of subsequent study (Gatica-Arias et al., 2012). The decorative character of this transgenic hop can compete with some ornamental plants. It is beyond any doubt that the bringing of the regulatory factor into hop genome caused the „breaking through“ the hop metabolome limit that was up to now obtained by the classical breeding. Owing to transgenesis new possibilities were opened for production of new compounds. This first illustrative example of transgenic metabolome in hop should be followed up with the targeted application of transgenesis in connection to the progress of our knowledge of biosynthesis pathways of hop metabolome. At present the transgenic hop tissues can be prepared either by a classical way using *A. tumefaciens*-mediated (Oriniaková et al., 1996) transformation and regeneration on selection media (Horlemann et al., 2003, Schwekendiek et al., 2007) or with the use of biolistic method (Batista et al., 2008), although in both cases the efficiency of hop transformation is still low in comparison with some other plant species (Horlemann et al., 2003). In both transformation methods it is possible to use classical monocistronic plant binary vectors i.e. as a rule the vectors having independently arranged transgene and one or more genes from selection of transgenic plant regenerants within the T-DNA. Usually the gene for resistance to kanamycin is used and possibly other marker genes like the gene for green fluorescent protein [GFP] (Fig. 5B). Based on this GFP marker gene it is possible to pre-select potential transgenic hop lines under the UV-A light as showed in our experiments (Fig. 5B, compare leaf 1 and 2).

New knowledge on the field of molecular biology, especially the finding of activation of some genes co-determining the metabolome of lupulin glands on the ternary complexes, like *chs_H1* gene changes this concept of simple transformation to polycistronic vector transformation. In polycistronic transformation vectors, several transgenes are arranged under the common regulatory unit with the aim to make their synchronized combinatorial expression. Though the preparation

Obr. 4 Analýza aktivace genu *chs_H1* komplexu chmelových transkripčních faktorů. Tři dny po koinfiltraci vektoru III a vektorů typu II nesoucích TF (Obr. 2) do listů *N. benthamiana* byla stanovena pomocí Real time RT PCR relativní hladina mRNA chalkonsyntázy *chs_H1*. Hladina mRNA byla normalizována proti elongačnímu faktoru 1 („house keeping gene“). 1, kontrola infiltrace bakterií LBA 4404; 2, gen *chs_H1*; 3, gen *chs_H1* plus kombinace TF *HIMyb2/HlbHLH2/HWDR1*; 4, gen *chs_H1* plus TF v kombinaci *s-HIMyb3/HlbHLH2/HWDR1*; 5, hladina mRNA genu *chs_H1* řízeného konstitutivním promotorem 35S CaMV. Statistika je uvedena při $\alpha = 0.05$ / Fig. 4 Analysis of activation of the *chs_H1* gene with hop TF complexes. Three days postinfiltration of *N. benthamiana* leaves with vector III a vectors II bearing hop TFs (Fig. 2), the relative levels of *chs_H1* mRNA were determined by RT qPCR and normalized against the elongation factor 1 housekeeping gene. 1, control infiltration of LBA 4404; 2, *chs_H1* gene; 3, *chs_H1* gene plus TF combination *HIMyb2/HlbHLH2/HWDR1*; 4, *chs_H1* gene plus TFs in combination *s-HIMyb3/HlbHLH2/HWDR1*; 5, mRNA levels of *chs_H1* driven by 35S CaMV. Bars represent the confidence intervals at level $\alpha = 0.05$

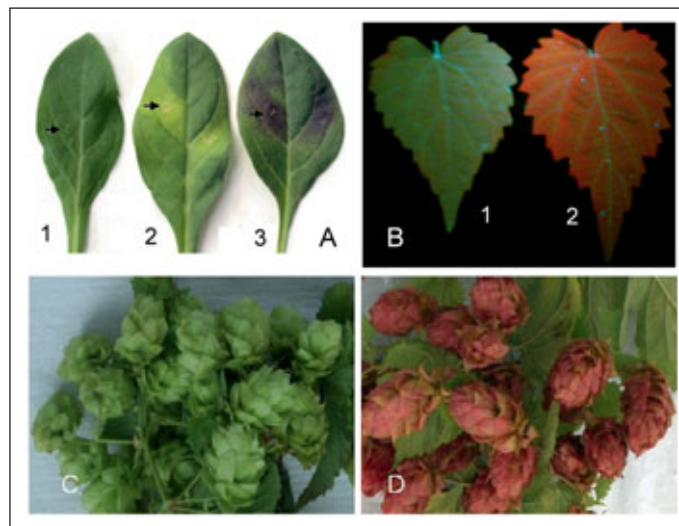


né a kombinované exprese. I když příprava takových vektorů (např. Weber et al., 2011) je stále spíše v počátcích, je to jedna z cest, jak dosáhnout kombinačního působení při transgenní regulaci. Výsledkem cílené kombinační regulace by pak mohla být mnohem efektivnější produkce transgenního metabolomu. Další možností, jak dosáhnout požadovaného působení genů, je klasická hybridizace transformantů nesoucích jednotlivé transgeny, tedy přístup, který by vyžadoval zvýšené technické, pěstitelské i časové nároky pro získání finálních hybridních materiálů využitelných ve šlechtění. Jiný koncept cílených modifikací metabolomu chmelu, který závisí na poměrně komplexních znalostech genetické determinace a regulace metabolických sítí u chmelu, v podstatě vyžaduje výběr tzv. uzlového regulačního faktoru („master transcription factor“ [Pattanaik et al., 2006]) jako transgenu pro aktivaci celé metabolické dráhy. Na rozdíl od heterologních transgenů z jiných rostlin, jakým je například v chmelu již zmíněný transgen *Pap1* z huseníčku (obr. 5, porovnej hlávky C a D), u homologních, tj. chmelových transgenů lze očekávat větší pravděpodobnost vyhasínání genové exprese („silencing“ [např. Matzke et al., 1994]), a proto jsou zde zvýšené nároky na získání a selekci většího množství prvotních transgenních linií. Indukce specifického silencingu by naopak mohla být žádoucí pro umlčení negativních regulatorů biosyntézy jako například genu *HIMyb7*.

O aplikacích transgenních materiálů u rostlin byla nedávno publikována monografie pod názvem Bílá kniha („White Book“ [Sehnal a Drobník eds., 2009]). Tento odborný materiál sumarizuje principy práce, zkušenosti a poznatky získané při práci s geneticky modifikovanými rostlinami na řadě pracovišť a bourá plané obavy a mýty pramenící z nepochopení některých faktů i skutečných rizik z této oblasti při praktických aplikacích. V souvislosti s budoucím využíváním transgenního metabolomu je vhodné uvést dvě důležité skutečnosti, a sice že chmel je dvoudomá rostlina, což bude usnadňovat jeho případné pěstování jako transgenního materiálu a dále, že již primární klasické zpracování metabolomu lupulinových žlázek vede k rozsáhlé degradaci nukleových kyselin v nich obsažených.

Obr.5 A Příklad vlivu chmelových transkripčních faktorů na produkci pigmentu u heterologního systému *Petunia hybrida*. Bakterie *A. tumefaciens* nesoucí vektor III (Obr. 2) byly koinfiltrovány do listů v kombinaci s faktory *s-HIMyb3* a *HlbHLH2* (žluté zbarvení [vzorek 2]) nebo s faktory *AtPAP1* a *HlbHLH2* (akumulace anthokyanů [vzorek 3]). Jako kontrola byly infiltrovány samotné bakterie (vzorek 1). B: Barevné rozlišení transformovaného českého chmelu Osvald 72 (zeleň zbarvení listů pod UV-A světlem [vzorek 1]) po integraci T-DNA nesoucí transgen *HlbHLH1* a marker GFP. Listy kontrolního chmelu mají pod UV-A sytě červené zbarvení díky fluorescenci chlorofylu (vzorek 2). C: hlávky kontrolního chmelu cv. Tetnang a D: chmelu transformovaného faktorem *Pap1* z práce Gatica et al. (2012).

Fig. 5 A: An example of influence of hop transcription factors on production of pigments in heterologous system of *Petunia hybrida*. Agrobacterium bearing vector III (Fig. 1) was co-infiltrated in leaves either in combination with *s-HIMyb3* and *HlbHLH2* (yellow spots, [sample 2]) or *AtPAP1* and *HlbHLH2* (anthocyanin production, [sample 3]). As a control the leaf was infiltrated with *A. tumefaciens* LBA 4404 without plant binary vectors (sample 1). B: The distinguishing under UV-A light the transgenic Osvald's 72 hop (green leaf colour [sample 1]). Hop is transformed with T-DNA bearing *HlbHLH1* transgene and GFP marker. The control hop leaves are deeply red owing to chlorophyll fluorescence (sample 2). C: control hop cones of cv. Tetnang and D: the red coloured cones of Tetnang hop transformed with *Pap1* transgene as published by Gatica et al. (2012).



of such vectors (e.g. Weber et al., 2011) is rather on the beginning, this is one of the ways how the combinatorial TF action could be achieved. As a result of targeted combinatorial regulation a much efficient production of transgenic metabolome could be obtained. Other possibility how to reach the desired gene action is the classical hybridization between individual hop transgenotes. This is the approach that would need more technical background, more need for hop growing and it would be time-consuming for final preparation of hybrid materials valuable for the breeding process.

Other concept of targeted modifications of hop metabolome depends on full understanding of genetic determination of regulation of metabolic network(s) in hop. It essentially requires the selection of „master transcription factor“ [Pattanaik et al., 2006]) as transgene for the activation of the whole metabolic pathway. Unlike heterologous transgenes i.e. genes originating from different plants like above mentioned *Pap1* from arabidopsis (Fig. 5, compare hop cones in panels C and D), for homologous hop transgenes one can expect higher probability of gene silencing (e.g. Matzke et al., 1994). Therefore, there be stronger requirements to produce more transgenic lines bearing homologous transgenes. On the contrary, induction of specific silencing could be valuable to achieve suppression of negative regulators of metabolome biosynthesis like *HIMyb7* gene.

The monograph entitled White Book (Sehnal a Drobník eds., 2009) dealing with practical use and handling transgenic materials has been published recently. In this book the principles of work, experience and knowledge obtained during work with genetically modified

3 PERSPEKTIVA INDUKCE „LUPULINOVÉHO“ METABOLOMU V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH

Kromě využití intaktních transgenních rostlin chmelu je zde teoretický předpoklad, že technologie využívající transkripční faktory umožní účinnou indukci lupulinového metabolomu nebo jeho části v tkáňových kulturách chmelu. Základní kultivační podmínky například pro tvorbu kalusů byly popsány v několika pracích rovněž v návaznosti na metody transformace chmelu (např. Rakouský and Matoušek, 1994; Batista et al., 1996; Horleman et al., 2003) a perspektivní je i využití suspenzních kultur chmelu poprvé odvozených již v roce 1984 (Robbins and Ratcliffe, 1984). Zároveň je obecným faktem, že ve standardních tkáňových kulturách je zpravidla biosyntéza sekundárních metabolitů buď nízká, nebo k ní nedochází vůbec. Například, jak vyplývá z poměrně komplexní analýzy transkriptomu i z rozboru části metabolomu u chmelových nodálních kultur (Fortes et al. 2008), nedochází zde za standardních podmínek kultivace k aktivaci komplexu strukturních genů ani regulačních faktorů, které by vedly k syntéze požadovaných chmelových/lupulinových metabolitů. Jiná situace by však mohla nastat, kdyby byly například kalusové kultury chmelu odvozeny přímo od pletiv transformovaných mono- nebo polycistronickými vektory nesoucími některé transkripční faktory lupulinu pod silnými nebo indukovatelnými promotory (Potenza et al., 2004). K produkci požadovaného „transgenního“ metabolomu by tak mohlo, podle koncepce metabolického inženýrství (např. Yu et al., 2000; Du et al., 2010), docházet za aseptických podmínek a při uzaveném nakládání s materiálem GMO.

Je nepochybné, že perspektiva využitelnosti transgenního metabolomu chmelu v budoucnu je v současné době spojena zejména se základním výzkumem biosyntézy lupulinu. Analýza transgenních pletiv chmelu je nezbytným nástrojem pro odhalení funkce aktivčních regulátorů i supresorů metabolických drah, a to nejen při regulaci biosyntézy polyfenolů, ale i hořkých a aromatických látek a jejich vzájemné provázanosti. Ve spojení s molekulárními markery chmelu (Patzak et al., 2007) tyto analýzy nepochybně povedou zároveň k posílení našich možností v oblasti klasické genetiky a šlechtění.

Poděkování

Spolupráce kolektivů oddělení molekulární genetiky BC v.v.i. AV ČR ÚMBR v Českých Budějovicích a oddělení biotechnologie Chmelářského institutu s.r.o. v Žatci je sponzorována v rámci projektu GAČR 521/08/0740, NAZV QH81052 a mezinárodním projektem FP7-REGPOT-2008-1 MOBITAG No.229518.

Literatura / References

- Batista, D., Fonseca, S., Serrazina, S., Figueiredo, A., Maria Salome' Pais, M. S., 2008: Efficient and stable transformation of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica by particle bombardment. *Plant. Cell Rep.* **27**: 1185–1196.
- Batista, D., Sousa, M. J., Pais, M. S. 1996: Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Branganca and var. Brewers's Gold. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **32**: 37–41.
- Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., Lepiniec, L., 2004: TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **39**: 366–380.
- Benfey, P. N., Chua, N. H., 1990: The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**: 959–966.

plants in number of laboratories and institutions have been summarized. This destroys empty misgivings and myths arising from misunderstanding of some facts and real risks from this area of practical applications. This situation can concern also transgenic metabolome of hop, whose actual utilization will be depending on social awareness with a new practical benefit of GMO. Also in the case of hop the standard legitimate requirements will guarantee the general „principle of precaution“ during manipulation with these new materials. It is appropriate to mention two important facts in the respect of practical use of transgenic hop metabolome: first, hop is the dioecious plant and this will facilitate its growing as transgenic material and secondly, already the primary classical treatment of lupulin gland metabolome leads to vast degradation of nucleic acids.

3 THE PROSPECTS OF INDUCTION OF „LUPULIN“ METABOLOME IN TISSUE CULTURES

Beside the use of intact transgenic plants of hop, there is theoretical assumption that TF technology enables efficient induction of lupulin metabolome or its part in hop tissue cultures. The basic cultivation conditions for instance for callus induction have been described in several papers also in connection to hop transformation methods (e.g., Rakouský and Matoušek, 1994; Batista et al., 1996; Horleman et al., 2003) and there is some view to use hop suspension cultures described already in 1984 (Robbins and Ratcliffe, 1984). At the same time in is the general fact that as a rule the biosynthesis of secondary metabolites is either very low or abolished in tissue cultures. For instance, as follows from relatively complex analysis of transcriptome and part of metabolome of hop nodal cultures (Fortes et al. 2008), under the standard conditions there is no significant activation of the complex of structural and regulatory genes that would lead to biosynthesis of required hop/lupulin metabolites. Quite different status could be true for instance for hop callus cultures derived directly from tissues transformed with mono- or polycistronic vectors bearing some lupulin-specific transcription factors under strong or inducible promoters (Potenza et al., 2004). Thus, according to the concept of metabolome engineering (e.g. Yu et al., 2000; Du et al., 2010) the desired metabolome production could be achieved under aseptic conditions i.e. using the contained GMO handling.

Its indubitable that the prospect of use of transgenic hop metabolome in the future is connected to the basic research of lupulin biosynthesis now. The analysis of hop transgenic tissues is necessary experimental tool to characterize function of activators as well as suppressors of metabolic pathways not only for regulation of polyphenols but also bitter acids and aromatic compounds within the network. In connection to molecular markers of hop (Patzak et al., 2007) these analyses will clearly improve our possibilities on the field of classical genetic and breeding.

Acknowledgements

The collaboration between Department of molecular genetics BC v.v.i. ASCR IPMB in České Budějovice and Biotechnology department of Hop institute GmbH Žatec is supported by the Czech Science Foundation GACR 521/08/0740, by the National Agency for Agricultural Research of the Ministry of Agriculture of CR project QH81052 and by the grant of an international co-operative project FP7-REGPOT-2008-1 MOBITAG No.229518.

- Bolca, S., Wyns, C., Possemiers, S., Depypere, H., De Keukeleire, D., Bracke, M., Verstraete, W., Heyerick, A., 2009: Cosupplementation of isoflavones, prenylflavonoids, and lignans alters human exposure to phytoestrogen-derived 17 beta-estradiol equivalents. *J. Nutr.* **139**: 2293–2300.
- Bolca, S., Li, J., Nikolic, D., Roche, N., Blondeel, P., Possemiers, S., De Keukeleire, D., Bracke, M., Heyerick, A., van Breemen, R. B., Depypere, H., 2010: Disposition of hop prenylflavonoids in human breast tissue. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**: 284–294.
- Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M. L., Leibman, M., 2006: Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochem. Rev.* **5**: 27–38.
- Du, H., Huang, Y., Tang, Y., 2010: Genetic and metab. engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1293–1312.

- Erkkola, R., Vervarcke, S., Vansteelandt, S., Rompotti, P., De Keukeleire, D., Heyerick, A., 2010: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Phytomedicine* **17**: 389–396.
- Fortes, A. M., Santos, F., Choi, Y. H., Silva, M. S., Figueiredo, A., Sousa, L., Pessoa, F., Santos, B. A., Sebastiana, M., Palme, K., Malhó, R., Verpoorte, R., Pais, M. S., 2008: Organogenic nodule development in hop (*Humulus lupulus* L.): Transcript and metabolic responses. *BMC Genomics* **9**: 445.
- Gatica-Arias, A., Stanke, M., Born, U., Aldinger, C., Höhnle, M., Farag, M., Matoušek, J., 2012: Wessjohann, L., Weber, G., Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/ MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Reports*, in press.
- Heyerick, A., Vervarcke, S., Depypere, H., Bracke, M., De Keukeleire, D., 2006: A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Maturitas* **54**: 164–175.
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., Lauvergeat, V., 2011: Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* **62**: 2465–2483.
- Horlemann, C., Schwegendiek, A., Höhnle, M., Weber, G., 2003: Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Rep.* **22**: 310–217.
- Lutz, A., Kneidl, J., Seefelder, S., Kammhuber, K., Seigner, E., 2011: Trends in hop breeding – new aroma and bitter qualities at the hop research center hüll Proceedings of the Scientific Commission in: Seigner, E. (ed), International Hop Growers Convention, s. 14, Lublin, Poland, 19–23 June, 2011
- Magalhaes, P. J., Carvalho, D. O., Cruz, J. M., Guido, L. F., Barros, A. A., 2009: Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat. Prod. Commun.* **4**: 591–610.
- Matoušek, J., 2001: „Ozdravné“ pivo [“Medicinal” beer]. *Kvasny Prum.* **47**: 330–332.
- Matoušek, J., Novák, P., Bříza, J., Patzak, J., Niedermeierová, H., 2002a: Cloning and characterisation of chs-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Sci.* **162**: 1007–1018.
- Matoušek, J., Novák, P., Patzak, J., Bříza, J., Krofta, K., 2002b: Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. *Rostlinná výroba* **48**: 7–14.
- Matoušek, J., Vrba, L., Novák, P., De Keukeleire, J., Škopek, J., Heyerick, A., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D., 2005: Cloning and molecular analysis of regulatory factor *Hlmyb1* in hop (*Humulus lupulus* L.) and the potential of hop to produce bioactive prenylated flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4793–4798.
- Matoušek, J., 2006: „Ozdravné“ látky a molekulární analýza chmelových genů [„Medicinal“ compounds and molecular analysis of hop genes]. *Kvasny Prum.* **52**: 38–40.
- Matoušek, J., Vrba, L., Škopek, J., Orctová, L., Pešina, K., Heyerick, A., Baulcombe, D., De Keukeleire, D., 2006: Sequence analysis of a „true“ chalcone synthase (*chs_H1*) oligofamily from hop (*Humulus lupulus* L.) and PAP1 activation of *chs_H1* in heterologous systems. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 7606–7615.
- Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Škopek, J., Maloukh, L., Heyerick, A., Fuss, Z., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D., 2007: *Hlmyb3*, a putative regulatory factor in hop (*Humulus lupulus* L.), shows diverse biological effects in heterologous transgenotes. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7767–7776.
- Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Stehlík, J., Füssy, Z., Krofta, K., Heyerick, A., Roldán-Ruiz, I., Maloukh, L., De Keukeleire, D., 2010: Cloning and molecular analysis of *HlbZip1* and *HlbZip2* transcription factors putatively involved in the regulation of the lupulin metabolome in hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **58**: 902–912.
- Matoušek, J., Patzak, J., Kocábek, T., Fuss, Z., Stehlík, J., Orctová, L., Durajsky, G., 2011: Functional analyses of lupulin gland-specific regulatory factors from WD40, bHLH and Myb families of hop (*Humulus lupulus* L.) show formation of crucial complexes activating *chs_H1* genes. Proceedings of the Scientific Commission in: Seigner, E. (ed), International Hop Growers Convention, s. 54–57, Lublin, Poland, 19–23 June, 2011.
- Matzke, A. J. M., Neuheuser, F., Park, Y. D., Ambros, P. F., Matzke, M. A., 1994: Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 219–229.
- Nagel, J., Culley, L. K., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P. D., Stevens, J. F., Page, J. E., 2008: EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-Methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell* **20**: 186–200.
- Nesvadba, V., Krofta, K., Polončíková, Z., 2011: New knowledge in czech hop breeding. Proceedings of the Scientific Commission in: Seigner, E. (ed), International Hop Growers Convention, s. 15–18, Lublin, Poland, 19–23 June, 2011.
- Okada, Y., Ito, K., 2001: Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 150–155.
- Oriniaková, P., Matoušek, J., 1996: Viroid infection of hop (*Humulus lupulus* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and conditions for hop transformation. *Rostlinná výroba* **42**: 233–239.
- Pattanaik, S., Xie, C. H., Kong, Q., Shen, K. A., Yuan, L., 2006: Directed evolution of plant basic helix–loop–helix transcription factors for the improvement of transactivational properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1759**: 308–318.
- Patzak, J., 2011: Molecular mapping of qtls for xanthohumol and dmxc contents in hop. Proceedings of the Scientific Commission in: Seigner, E. (ed), International Hop Growers Convention, s. 40–44, Lublin, Poland, 19–23 June, 2011.
- Patzak, J., Vrba, L., Matoušek, J., 2007: New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome* **50**: 15–25.
- Possemiers, S., Heyerick, A., Robbens, V., De Keukeleire, D., Verstraete, W., 2005: Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; Conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 6281–6288.
- Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., Heyerick, A., 2011: The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia* **82**: 53–66.
- Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C., 2004: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* **40**: 1–22.
- Rakouský, S., Matoušek, J., 1994: Direct organogenesis in hop – a prerequisite for an application of *A. tumefaciens*-mediated transformation. *Biol. Plant.* **36**: 191–200.
- Ramsay, N. A., Glover, B. J., 2005: MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci.* **10**: 63–70.
- Robbins, R. J., Ratcliffe, R. G., 1984: Intracellular distribution of phosphate in cultured *Humulus lupulus* cells growing at elevated exogenous phosphate concentrations. *Plant Cell Rep.* **3**: 234–236.
- Sehnal, F., Drobník, J., 2009: White Book, Genetically Modified Crops, EU Regulations and Research Experience from The Czech Republic, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., ISBN 978-80-86668-05-3.
- Schwegendiek, A., Spring, O., Heyerick, A., Pickel, B., Pitsch, N. T., Peschke, F., De Keukeleire, D., Weber, G., 2007: Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7002–7009.
- Tsurumaru, Y., Sasaki, K., Miyawaki, T., Momma, T., Umemoto, N., Yazaki, K., 2010: An aromatic prenyltransferase-like gene HIPT-1 preferentially expressed in lupulin glands of hop. *Plant Biotech.* **27**: 199–204.
- Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., Heyerick, A., 2009: Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *J. Nat. Prod.* **72**: 1220–1230.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., Marillonnet, S., 2011: A modular cloning system for standardized assembly of multi-gene constructs. *Plos One* **6**: 1–11.
- Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R. A., Fader, G. M., McGonigle, B., Odell, J. T., 2000: Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiology* **124**: 781–793.
- Zanoli, P., Zavatti, M., 2008: Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* **116**: 383–396.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 16. 8. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 3. 10. 2011