

## Zjišťování autenticity českých odrůd chmele pomocí chemických a molekulárně-genetických analýz

### Investigation of Czech Hop Varieties Authenticity by Means of Chemical and Genetic Analyses

KAREL KROFTA, JOSEF PATZAK

Chmelářský institut s. r. o., Žatec, Kadaňská 2525, 438 46 Žatec / Hop Research Institute Co. Ltd., Saaz, Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, Czech Republic

e-mail: k.krofta@telecom.cz

**Krofta, K. – Patzak, J.: Zjišťování autenticity českých odrůd chmele pomocí chemických a molekulárně-genetických analýz.** Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 296–304.

Autenticita stávajícího souboru 11 registrovaných českých odrůd chmele byla provedena na základě analýz alfa a beta kyselin, chmelových silic a prenylovaných flavonoidů. Rozlišení odrůd bylo provedeno na základě zastoupení kohumulonu, obsahu vybraných alifatických esterů a terpenických uhlovodíků farnesenu a selinenů ve chmelových slících a obsahu xanthohumolu a DMX a poměru alfa kyseliny/xanthohumol. Pomocí těchto deskriptorů bylo sestaveno identifikační schéma. Molekulárně-genetické analýzy sušených hlávek ukázaly, že identifikace odrůd z tohoto materiálu je možná. Spolehlivost identifikace chmelových odrůd obecně závisí na stáří vzorků a na způsobu zpracování hlávkového chmele na výrobky. V případě chmelových extraktů je analýza DNA nepoužitelná, u chmelových granulí je omezená, protože procesní podmínky buď DNA odstraňují, nebo destruuji. Modelové pokusy falsifikace Žateckého poloraného červeňáku pomocí chemických a genetických analýz shodně prokázaly, že míra průkaznosti je zhruba od hranice 10 % hm. příměsi. Nedávno odhalený reálný případ falsifikace Žateckého poloraného červeňáku prokázal, že podíl cizí příměsi činil 50 až 70 % hm.

**Krofta, K. – Patzak, J.: Investigation of Czech hop varieties authenticity by means of chemical and genetic analyses.** Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 296–304.

Authenticity of the current file of eleven Czech hop varieties was elaborated on the basis of analyses of alpha acids, beta acids, hop oils and prenylated flavonoids. Varietal discrimination was based on cohumulone ratio, contents of selected aliphatic esters and sesquiterpenes farnesene and selinenes in hop oils and content of xanthohumol, desmethylxanthohumol and xanthohumol/alpha acids ratio. Identification scheme was constructed with the help of these descriptors. Analyses of dried hops by molecular-genetic methods proved that identification of hop varieties is feasible from this material. Reliability of hop varieties identification generally depends on age of samples and on the way of raw hops processing to hop products. DNA analyses are not practicable in hop extracts and are limited in hop pellets due to DNA fractionation or destruction under processing conditions. Model tests of Saaz aroma variety adulteration with the help of chemical and genome analyses identically showed that the lowest level of conclusiveness is at about of 10 % admixture. Recently discovered real incident of Saaz hops adulteration showed that proportion of unknown variety was in the interval of 50–70 %.

**Krofta, K. – Patzak, J.: Die Ermittlung der Authentizität von tschechischen Hopfensorten durch chemische und molekular-genetischen Analysen.** Kvasny Prum. 57, Nr. 7–8, S. 296–304.

Auf Grund der durchgeführten Alpha - und Betasäuren -, Hopfensilizium- und Prenylflavonoidanalysen wurde die Authentizität der bestehenden Datei von elf registrierten tschechischen Hopfensorten durchgeführt. Die Hopfensortenunterscheidung wurde auf Grund der Vertretung des Kohumulons, des Gehalts an ausgesuchten alifatischen Ester und des Gehalts an terpenischen Ester und terpenischen Farnesen- und Selinenkohlenwasserstoff im Hopfensilizium und des Gehalts an Xanthohumolon, DMX und des Verhältnisses Alphasäuren/Xanthohumolon wurde die Auflösung getan. Durch diese Deskriptoren wurde ein Identifikationsschema zusammengefaßt. Die molekular-genetische Analyse der trockenen Hopfendolden hat gezeigt, daß eine Hopfensortenidentifikation aus diesen Unterlagen möglich ist. Die Zuverlässigkeit der Hopfensortenidentifikation hängt allgemein von dem Musteralter und dem Hopfendoldenverarbeitungsverfahren auf finale Erzeugnisse ab. Im Falle der Hopfenextrakte ist die DNA Analyse nicht anwendbar, für die Hopfengranula ist diese Methode schon begrenzt, weil die Prozessbedingungen die DNA entweder beseitigen oder zerstören. Die Modellversuche der Falsifikation der Hopfensorte Žatecký poloraný červeňák (Saazer halbfrühen Rothopfen) durch chemische und genetische Analysen haben identisch gezeigt, daß die Beweiskraft vom Wert etwa 10% gew. der Beimischung anfängt. Vor kurzem entdeckter realer Fall der Falsifikation der Hopfensorte Žatecký poloraný červeňák hat gezeigt, das Anteil der Beimischung der fremden Hopfensorte im Bereich 50% bis zu 70 % gew. lag.

**Klíčová slova:** alfa a beta kyseliny, kohumulon, chmelové silice, farnesen, DNA, SSR molekulární markery, odrůdová čistota, falsifikace chmele

**Keywords:** alpha and beta acids, cohumulone, hop oils, farnesene, DNA, SSR molecular markers, varietal purity, hops adulteration

## 1 ÚVOD

Historie zaznamenává mnoho případů falsifikace potravin a zemědělských produktů (víno, med, destiláty, ovocné džusy, olivový olej, tabák, káva, sýry, koření, čaj aj.). Nekvalitnější, a tudíž i nejdražší produkty byly v historii, a bohužel i nadále jsou, upravovány přidávkem lacinějších druhů, náhražek, aditiv apod. a jsou falešně vydávány za zboží prvotřídní kvality. V případě chmele je za nejkvalitnější surovinu všeobecně považován Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), tradiční česká odrůda chmele. V druhé polovině 20. století bylo vyšlechtěno a zavedeno do komerčního pěstování několik desítek nových odrůd chmele. Trend rychlé obměny pěstovaných odrůd chmele, který pružně reaguje na potřeby pivovarského průmyslu, trvá i v současné době. S tím současně vyvstala potřeba identifikace

## 1 INTRODUCTION

History keeps score of a lot of food and agriculture products falsification incidents (vine, honey, fruit juices, olive oil, tobacco, coffee, cheeses, spicy, tea and others). The best quality and therefore the most expensive products have been and unfortunately still are treated with the addition of cheaper ones, surrogates, additives and subsequently declared as best quality commodity. In the case of hops Saaz aroma variety, traditional Czech hop variety, is generally considered as best one in the world. In the second half of the 20<sup>th</sup> century many new hop varieties were bred and introduced into commercial cultivation. The trend of the fast change of cultivated hop varieties which flexibly conforms to the needs of brewing industry, still continues. Such situation required need of identification and mutual discrimination of various hop genotypes. From the beginning hop varieties were eval-

a vzájemného rozlišení různých chmelů. Odrůdy chmele se nejprve hodnotily na základě morfologických znaků nejen hlávek, ale i celé révy. Pokroky v analytické chemii obsahových látek chmele umožnily přesně analyzovat obsah a složení některých složek chmelových pryskyřic, silic a polyfenolů [1, 2]. Chemotaxonomie vychází z toho, že obsah a složení sekundárních metabolitů chmele jsou v některých parametrech odrůdově charakteristické a jsou jen v malé míře ovlivněny péstebními podmínkami, povětrnostními a jinými vlivy. V případě chmelových pryskyřic je takovým parametrem zastoupení jednotlivých analogů humulonů a lupulonů v alfa a beta kyselinách. Zatímco obsah adhumulonů se ve všech odrůdách pohybuje v úzkém rozmezí 15 až 20 % rel., zastoupení kohumulonu se pohybuje v rozmezí mnohem širším od 15 do 50 % rel. [3,4]. Samotný obsah alfa a beta kyselin podléhá značným meziročníkovým změnám, stejně jako jejich poměr, což je nutno při posuzování odrůd zohlednit [5]. Další cenné informace o identitě odrůdy poskytuje složení chmelových silic. Počet identifikačních znaků je mnohem větší, protože ve chmelových silicích bylo dosud identifikováno několik set látek různého chemického složení [6]. Přítomnost či absence některých složek silic, jejich obsahy a vzájemné poměry jsou silně odrůdově podmíněny [7,8]. Uniformitu složení silice nezávislou na některých vlivech prostředí (stáří rostlin, abnormální hnojení, virové infekce, meziročníkové vlivy počasí) prokázali Likens a Nickerson [9]. V porovnání s chmelovými pryskyřicemi se složení silic, vzhledem k těkavosti některých složek, mění rychleji například při sušení a zpracování na chmelové výrobky, ale ne natolik, aby to znemožnilo identifikovat odrůdu i po zpracování chmele na granule či extrakty [10]. Přes velký počet složek silic pouze několik z nich poskytuje vhodnou informaci o identitě odrůdy, přičemž nejvíce zastoupené složky nemusí hrát v tomto ohledu nejdůležitější roli. V několika studiích se autorům podařilo na základě složení chmelových silic a pryskyřic vzájemně rozlišit několik desítek různých odrůd chmele [11–15]. U odrůd, které jsou geneticky příbuzné, jako jsou např. Fuggle, Savinski Golding nebo Tettang a Žatecký poloraný červeňák, ani analýza chmelových pryskyřic a silic nemusí vést k jednoznačnému rozlišení. Analýza polyfenolů se k identifikaci odrůd používá poměrně zřídka. Chmelové polyfenoly představují velmi široké spektrum látek od jednoduchých fenolových kyselin až po kondenzované flavonoidní formy. Řada z nich se vyskytuje ve formě glykosidů. Van Sumere et al. [16] vypracovali metodu separace několika desítek polyfenolových složek chmele kapalinovou chromatografií a prokázali značné odrůdové rozdíly v zastoupení některých složek, především glykosidů kaempferolu a quercetinu. Frakci nízkomolekulárních polyfenolů použil k rozlišení vybraných odrůd chmele Jelínek [17].

V posledních letech bylo vyvinuto několik metod identifikace chmelových odrůd na základě analýzy DNA. Na rozdíl od chemotaxonomických analýz nejsou genetické metody ovlivněny stářím rostlin ani různými vlivy prostředí. DNA lze izolovat z libovolných částí rostlin. Jsou proto aplikovatelné již u mladých rostlin, a to nejen k identifikaci odrůdy, ale také např. k určení pohlaví v juvenilním stadiu růstu. Nejpoužívanější molekulárně biologické metody využívají amplifikaci DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Metodu RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), která je založena na reakci oligonukleotidových primerů s denaturovanou DNA, použil např. Patzak et al. [18] k odlišení Žateckého poloraného červeňáku a českých hybridních odrůd Bor, Sládek a Premiant. Úspěšnost metody k identifikaci odrůd chmele byla potvrzena i v práci Murakamiho [19]. Další metoda amplifikace délkového polymorfismu restričních fragmentů AFLP má, vzhledem k vysoké míře polymorfismu, mnohem větší rozlišovací schopnost. Patzakovi [20] se touto metodou podařilo rozlišit Osvaldovy klony 31, 72, 114. Nejspolehlivějším postupem pro molekulárně genetickou charakterizaci genotypů chmele a hodnocení jejich variability a biodiversity je metoda SSR (jednoduché sekvenční repetice). Mnoho SSR markerů bylo již pro chmel specifikováno [21–23]. V našich předešlých pracích jsme připravili účinný SSR markerovací systém pro genotypizaci českých odrůd chmele [24]. Ověřili jsme a zavedli tyto markery pro identifikaci genotypů chmele a kontrolu odrůdové čistoty [25].

V ČR je v současné době registrováno 11 odrůd chmele: Žatecký poloraný červeňák, Sládek, Bor, Premiant, Agnus, Harmonie, Vital, Rubin, Kazbek, Bohemie a Žatecký pozdní. Předložená práce informujeme o použití molekulárních markerů pro kontrolu autenticity českých chmelů. Průkaznost falsifikace českých chmelů je provedena na základě chemických i genetických analýz. Pomocí chemických analýz vybraných sekundárních metabolitů je prezentováno identifikační schéma všech českých odrůd chmele. Falsifikace českých chmelů je dokumentována na reálném případě falšování Žateckého červeňáku z nedávné doby.

uated according to morphological traits of bine and cones. Advances in analytical chemistry of hop secondary metabolites enabled precisely analyse contents and composition of some hop resins, hop oils and polyphenols components [1,2]. Chemotaxonomy of hop cultivars comes out of the fact, that composition of secondary metabolites is in some parameters varietal characteristic and only slightly affected by growing and environmental conditions. Cohumulone and lupulone ratio in alpha and beta acids are such parameters. While adhumulone ratio moves in relatively narrow interval of 15–20 % rel. in all hop varieties, cohumulone ratio is found in the broad interval of 15–50 % rel. [3,4]. Content of alpha and beta acids undergoes significant year-to-year changes as well as alpha/beta acids ratio [5].

Composition of hop oils provides many other valuable information. The number of identification attributes is much higher because several hundred compounds of various chemical composition has been found [6]. The presence or absence of some hop oils components and their mutual ratios are significantly varietal dependent [7,8]. Uniformity of hop oils composition independent on some environmental effects (age of hop plants, abnormal manuring, virus infection) declared [9]. In comparison with hop resins composition of hop oils changes much faster for example in the course of drying and processing to hop products. In spite of this identification of hop varieties in hop pellets and hop extracts is feasible [10]. In spite of great number of hop oil components only a few of them provide suitable information about variety identity. Most abundant components don't have to be the most important ones. Several tens of various hop varieties were successfully discriminated on the basis of hop resins and hop oils composition [11–15]. For genetically related varieties such as Fuggle, Savinski Golding or Saaz and Tettang analysis of hop resins and hop oils don't have to lead to their unambiguous discrimination.

Analysis of polyphenols is rarely used for hop varieties identification. Hop polyphenols represent wide spectrum of components from simple phenol acids to condense flavonoid species. Many of them are found in the form of glycosides. Van Sumere et al. [16] elaborated separation method of a great number of polyphenols components with the help of liquid chromatography. He found out significant varietal differences in the proportion of some components such as kaempferol and quercetin glycosides. Jelínek [17] used low molecular polyphenols fraction to the discrimination of selected file of hop cultivars.

In the course of the last two decades several methods for identification of hop varieties on the basis of DNA analysis were developed. On the contrary of chemical ones genetic analyses are not effected by age of hop plants and other environmental influences. DNA can be isolated from any part of hop plant. Therefore genetic methods are applicable in young plants not only to variety identification but to the determination of sex in juvenile stage of growth as well. Most of genetic methods utilize amplification DNA by means of polymerase chain reaction (PCR). Patzak [18] used RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method to the discrimination of Saaz aroma variety from Czech hybrid cultivars Bor, Sládek and Premiant. Success of this procedure to the hop varieties identification was confirmed by Murakami [19]. Another method AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) has much higher discrimination ability. Osvald's clones 31, 72, 114 were successfully distinguished by Patzak [20] with the help of this method. The SSR (Simple Sequence Repeat) method is the most reliable one for the molecular genetic characterization of hop genotypes and the evaluation of their variability and biodiversity. The many of SSR markers have been characterized in hop [21–23]. In our previous works, we prepared the efficient SSR marker system for genotyping of Czech hop cultivars [24]. We proved and implemented these markers for identifying of hop genotypes and control of cultivar purity [25].

Eleven hop varieties is currently registered in the Czech Republic: Saaz, Saaz Late, Sládek, Bor, Premiant, Agnus, Harmonie, Vital, Rubin, Kazbek, Bohemie. In the current study, we report about utilisation of molecular markers for the control of Czech hops authenticity. Conclusiveness of Saaz aroma variety adulteration is elaborated on the basis of chemical and genetic analyses as well. Identification diagram of all Czech hop cultivars based on chemotaxonomy analyses of secondary metabolites is presented. Falsification of Saaz aroma variety is documented on actual incident which was recently discovered.

## 2 MATERIAL AND METHODS

Samples of dried raw hops and hop pellets from three crop harvests at least were used for identification of 11 Czech hop varieties. Varieties registered recently were analysed under their breeding codes (Vital

## 2 MATERIÁL A METODY

K identifikaci 11 českých odrůd chmele byly použity vzorky sušených hlávek a granulí z minimálně 3 sklizní. Odrůdy, které byly registrovány v posledních letech, byly analyzovány ještě pod svým šlechtitelským označením (Vital – 4715, Kazbek – 4353, Bohemie – 4837, Žatecký pozdní – 4237, Rubín – 4527). Vzorky pocházely ze všech pěstitelských oblastí ČR. U nových odrůd registrovaných po roce 2007 byly vzorkovány šlechtitelské porosty Chmelařského institutu v Žatci a registrační pokusy ÚKZÚZ.

Obsah a složení alfa a beta kyselin byly stanoveny kapalinovou chromatografií dle metody EBC 7.7. Simultánně byl určen i obsah prenylovaných flavonoidů xanthohumolu a desmethylxanthohumolu [26]. Chmelové silice byly z matrice izolovány destilační metodou a analyzovány plynovou chromatografií. V případě malého množství vzorku se k izolaci silic použila metoda SPME [27]. Míra průkaznosti falsifikace Žateckého poloraného červeňáku byla zkoumána na odrůdách Sládek a Žatecký pozdní v granulované formě. Žatecký červeňák, jako nejvyšší odrůda chmele, je falsifikací reálně nejvíce ohrožena. Obě odrůdy byly vybrány s ohledem na obsah farnesenu ve chmelových silicích. Odrůda Sládek farnesen obsahuje jen ve velmi malém množství (méně 1 % rel.), v odrůdě Žatecký pozdní je obsah farnesenu srovnatelný se ŽPČ (cca 15 % rel.). Podíl příměsí v Žateckém červeňáku činil 5, 10, 20 a 30 % hm. Pro každou směs byly provedeny analýzy alfa a beta kyselin a chmelových silic v 10 opakováních. Z výsledných hodnot byly stanoveny průměrné hodnoty a intervaly spolehlivosti vybraných analytů. Míra průkaznosti falsifikace byla určena pro takový podíl příměsí, při kterém se intervaly spolehlivosti čistého ŽPČ a směsného vzorku u minimálně 2 složek přestaly překrývat. Statistické hodnocení experimentálních dat bylo provedeno pomocí programu QC.Expert 2.5 (TriloByte Pardubice).

DNA byla izolována z mladých listů a sušených hlávek českých odrůd chmele a šlechtitelských linií podle Patzaka [28]. Pro molekulární analýzy byla použita SSR metoda [21, 22, 23], STS a EST-SSR [29, 30] markerovací systémy. Typická PCR reakce (Taq PCR master mix kit, Qiagen, Hilden, FRG) probíhala za následujících amplifikačních podmínek: 2 min při 94 °C, 35 cyklů (30 s při 94 °C; 60 s při 54 °C, 90 s při 72 °C); 10 min při 72 °C. PCR byla prováděna v TGradient termocyklu (Biometra, Goettingen, FRG). Amplifikované produkty byly rozlišeny vertikální elektroforézou v 5% denaturačním (8M močovina) polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem [28]. U produktů byla zaznamenána jejich prevalence nebo absence v jednotlivých vzorcích na základě molekulárních velikostí podle 20 bp DNA Markeru (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Chemotaxonomie odrůd

V tab. 1 jsou uvedeny výsledky stanovení hořkých kyselin a prenylflavonoidů v odrůdě Sládek ve vybraných vzorcích hlávek ze sklizní 2008–2010. Výsledky ukazují, že nejstabilnějšími parametry, které analýza poskytuje, jsou zastoupení kohumulonu a kolupulonu, které se pohybují v relativně úzkém rozmezí 25 až 29 % rel., resp. 47–50 % rel. Absolutní obsahy alfa kyselin, které se pohybují v širokém intervalu 4 až 12 % hm., jsou velmi závislé na stáří porostů a pěstební lokalitě. Na obr. 1 jsou znázorněna typická rozmezí poměru kohumulonu pro všech 11 českých odrůd. Pro identifikaci lze tento ukazatel použít pro odrůdy Agnus a Kazbek (> 30 % rel.) a Harmonie (< 20 % rel.). Všechny ostatní intervaly se překrývají v hodnotách od 20 do

– 4715, Kazbek – 4353, Bohemie – 4837, Žatecký pozdní – 4237, Rubín – 4527). Samples originated from all growing regions in the Czech Republic. Varieties registered after 2007 were sampled in breeding plots and state varietal tests (UKZUZ).

Content and composition of alpha and beta acids were determined by liquid chromatography according to EBC 7.7 method. Contents of prenylated flavonoids xanthohumol and desmethyl-xanthohumol were analysed simultaneously [26]. Hop oils were isolated by steam distillation and analysed by gas chromatography. If low amount of sample was available SPME procedure was used for hop oil isolation [27].

Conclusiveness level of Saaz hops falsification was studied on Sladek and Saaz Late cultivars in the form of hop pellets. Saaz aroma variety as the top quality hops is the most jeopardised by adulteration. Both varieties were selected on the basis of farnesene contents in hop oils. Content of farnesene in Sladek is under 1 %, Saaz Late contains comparable amount of farnesene to Saaz (cca 15 % rel.). Model portion of admixture in Saaz was 5, 10, 20 a 30 % w. Analyses of alpha acids, beta acids and hop oils were done for each mixture in 10 repetitions. Mean values and confidence intervals for selected analytes were counted from analytical results. Level of falsification detection was fixed for such portion of admixture when confidence intervals for pure Saaz and mixed sample ceased to overlap for minimum 2 analytes. Statistical evaluation of experimental data was done with the help of QC.Expert 2.5 (TriloByte Pardubice) statistical software.

DNA was isolated from the young leaves and dried cones of Czech hop cultivars and breeding lines according to Patzak [28]. For molecular analyses, we used SSR [21–23], STS and EST-SSR [29, 30] marker systems. In a typical PCR reaction (Taq PCR master mix kit, Qiagen, Hilden, FRG) we used the following amplification conditions: 2 min at 94 °C, 35 cycles/ (30 s at 94 °C; 60 s at 54 °C, 90 s at 72 °C); 10 min at 72 °C. PCR was performed on TGradient thermocycler (Biometra, Goettingen, FRG). Amplification products were resolved via 5% denaturing (8M urea) polyacrylamide gel vertical electrophoresis and visualized by silver-staining [28]. The products were scored for the presence or absence in each sample, based on size measured with 20 bp DNA Marker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

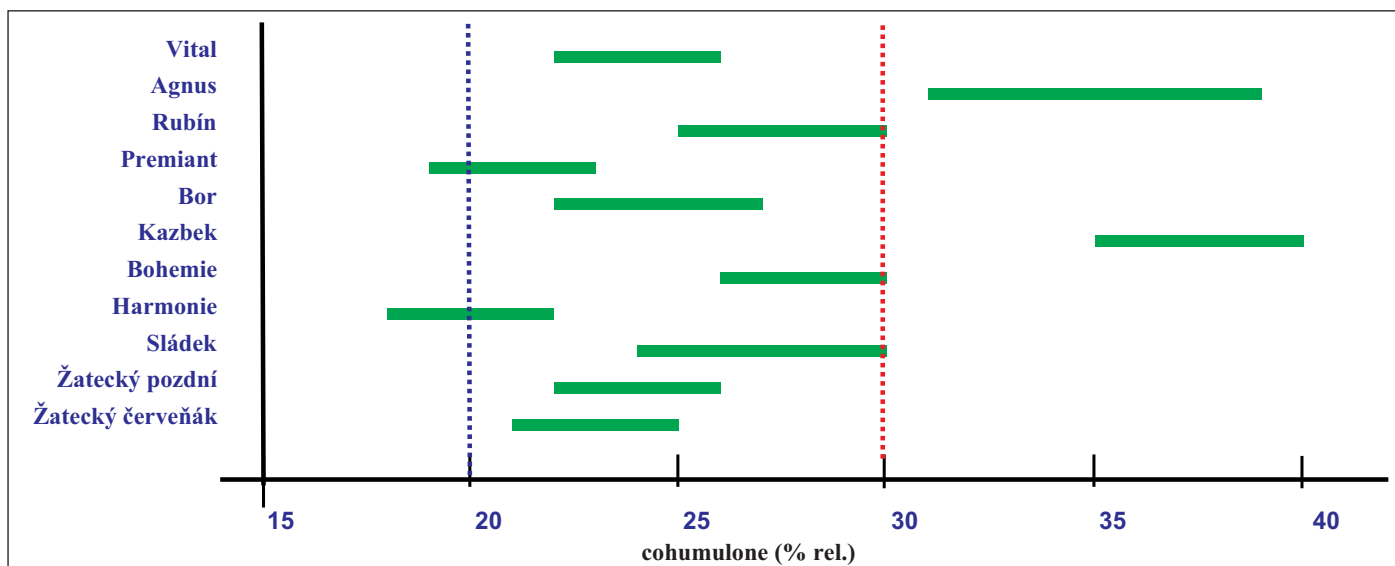
## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Chemotaxonomy of hop varieties

Bitter acid analyses results in selected samples of Sladek hops from 2008–2010 crop harvests are summarized in Tab. 1. Cohumulone and colupulone ratio move in the relatively narrow intervals of 25 až 29 % rel. and 47–50 % rel. respectively. Both are the most invariable parameters. Absolute contents of alpha acids in the range of 4 až 12 % w. are significantly dependent on the age of hop plants and growing locality. Typical intervals of cohumulone ratio for all Czech hop varieties are shown on the Fig. 1. Cohumulone ratio is applicable only for Agnus, Kazbek (> 30 % rel.) and Harmonie (< 20 % rel.) identification. Intervals of all other cultivars overlap in the range of 20–30 % rel. and therefore they can not be used for variety verification. Hop oils components isobutylisobutyrate, 2–methylbutylisobutyrate, 3–methylbutylisobutyrate, farnesene, alpha-selinene, beta-selinene are very convenient for varieties discrimination. It is given by bipolar, i.e. zero or negligible and above average occurrence, in hop oils of many cultivars. Some varieties contain exceptionally high amount of special component which substantially facilitates their identification.

Tab. 1 Obsah a složení alfa a beta kyselin, X, DMX v odrůdě Sládek (2008–2010) / Content and composition of alpha acids, beta acids, X, DMX in Sladek hops (2008–2010)

alfa kys. / alpha ac.	beta kys./ac. (% hm.)	poměr alfa/beta alpha vs. beta	kohumulon (% rel.)	kolupulon (% rel.)	X (% hm.)	10 <sup>2</sup> .X/alfa	DMX (% hm.)
4.15	5.36	0.77	29.2	49.0	0.58	14.0	0.12
4.26	5.20	0.82	27.5	49.0	0.62	14.6	0.06
5.88	6.48	0.91	26.8	49.9	0.61	10.4	0.16
6.41	6.38	1.01	25.9	48.2	0.61	9.5	0.13
7.24	7.51	0.96	25.6	49.1	0.73	10.1	0.15
9.91	5.05	1.96	24.8	47.1	0.88	8.9	0.14
11.72	6.09	1.94	25.3	47.7	0.88	7.5	0.21



Obr. 1 Podíl kohumulonu v alfa kyselinách českých odrůd chmele / Fig. 1. Cohumulone ratio in alpha acids of Czech hop varieties

30 % rel., a jsou tudíž pro identifikaci nepoužitelné. Ze složek chmelových silic lze k určení kultivarů vhodně využít především tyto látky: isobutylisobutyrate, 2+3-methylbutylisobutyrate, farnesen, alfa + beta selineny. Je to dáno tím, že se v odrůdách nevyskytují vůbec nebo jen ve velmi malém množství, nebo naopak jsou zastoupeny nadprůměrně. Kromě toho některé odrůdy obsahují mimořádně vysoké množství určité složky, která ji tímto s vysokou pravděpodobností identifikuje. Jako příklad lze uvést odrůdu Kazbek, která v silicích obsahuje více než 1 % terpenického uhlovodíku  $\alpha$ -kopaenu, což je min. čtyřikrát více než ostatní české i zahraniční odrůdy. Interval obsahů výše uvedených složek chmelových silic v českých odrůdách jsou uvedeny v tab. 2. V tab. 3 jsou sumarizovány typické intervaly obsahů

For example Kazbek cultivar contains more than 1% of sesquiterpene  $\alpha$ -copaene that is four times more in comparison to the other Czech and foreign hop varieties. Contents of hop oils components mentioned above in Czech hop varieties are shown in Tab. 2. Contents of prenylflavonoids and ratio parameter xanthohumol/alpha acids are summarized in Tab. 3. High amounts of xanthohumol in Vital and Agnus varieties and high content of DMX in Vital are applicable varietal traits. Summary of discrimination attributes of Czech hop secondary metabolites and their levels are shown in Tab. 4. Identification diagram of all Czech hop varieties is shown on Fig. 2. With the help of cohumulone ratio Agnus, Kazbek and Harmonie cultivars can be distinguished from the others as well as Vital variety due to extraordinary

Tab. 2 Typické intervaly (% rel.) zastoupení vybraných složek chmelových silic v českých chmelech / Typical intervals (% rel.) of hop oil components in Czech hop varieties

Odrůda / Variety	IBIB*	2+3-MeBuIB**	$\beta$ -farnesen	selineny / selinenes	$\alpha$ -copaene
Žatecký červeňák / SAAZ	< 0.01	0.01 – 0.04	13 – 20	< 2.0	0.18 – 0.24
Žatecký pozdní / SAAZ late	0.05 – 0.07	0.14 – 0.17	15 – 21	< 2.0	0.16 – 0.20
Sládek	0.09 – 0.11	0.37 – 0.56	< 1.0	< 2.0	0.30 – 0.35
Harmonie	0.10 – 0.14	0.35 – 0.50	< 1.0	11 – 15	0.20 – 0.33
Bohemie	0.13 – 0.18	0.40 – 0.55	1 – 4	9 – 12	0.22 – 0.27
Kazbek	0.16 – 0.26	0.85 – 1.22	< 1.0	< 3.0	1.20 – 1.35
Bor	0.12 – 0.15	0.45 – 0.55	< 1.0	< 2.0	0.25 – 0.35
Premiant	0.11 – 0.15	0.41 – 0.51	1 – 3	< 2.0	0.23 – 0.34
Rubín	0.25 – 0.35	0.65 – 1.29	< 1.0	13 – 20	0.25 – 0.35
Agnus	0.16 – 0.20	0.70 – 1.25	< 1.0	< 2.0	0.25 – 0.39
Vital	0.10 – 0.16	0.76 – 1.19	1 – 5	10 – 20	0.08 – 0.12

\* isobutylisobutyrate

\*\* 2-methylbutylisobutyrate + 3-methylbutylisobutyrate

Tab. 3 Obsah xanthohumolu a DMX v českých odrůdách chmele / Content of xanthohumol and DMX in Czech hop cultivars

Odrůda / Variety	Xanthohumol (% hm.)	Alfa kyseliny / Alpha acids (% hm.)	X/alfa.10 <sup>2</sup>	DMX (% hm.)
Žatecký červeňák / SAAZ	0.30 – 0.50	2.5 – 5.0	8 – 12	0.05 – 0.12
Žatecký pozdní / SAAZ late	0.30 – 0.50	3.5 – 6.0	8 – 10	0.07 – 0.12
Sládek	0.50 – 0.80	4.5 – 8.0	8 – 14	0.10 – 0.20
Harmonie	0.40 – 0.70	5.0 – 8.0	7 – 9	0.10 – 0.15
Bohemie	0.50 – 0.80	5.0 – 8.0	8 – 10	0.10 – 0.20
Kazbek	0.30 – 0.45	5.0 – 8.0	5 – 7	0.10 – 0.20
Bor	0.40 – 0.60	6.0 – 9.0	5 – 7	0.08 – 0.16
Premiant	0.30 – 0.50	7.0 – 10.0	4 – 6	0.07 – 0.15
Rubín	0.45 – 0.75	9.0 – 12.0	5 – 6	0.05 – 0.10
Agnus	0.70 – 1.00	9.0 – 12.0	7 – 8	0.10 – 0.20
Vital	0.70 – 1.00	12.0 – 16.0	6 – 7	0.25 – 0.40

Tab. 4 Rozlišovací znaky složení sekundárních metabolitů chmelových odrůd / *Distinguish attributes of hop varieties secondary metabolites composition*

Znak / Attribute	Odrůdy / Varieties
<b>Kohumulon</b>	
< 20 % rel.	Harmonie
> 30 % rel.	Kazbek, Agnus
<b>Farnesen</b>	
< 1 % rel.	Sládek, Harmonie, Rubín, Kazbek, Agnus, Bor
1 – 5 % rel.	Premiant, Bohemie, Vital
> 10 % rel.	Žatecký poloraný červeňák, Žatecký pozdní
<b>Selineny / Selinenes</b>	
< 2 % rel.	Žatecký poloraný červeňák, Žatecký pozdní, Bor, Premiant, Agnus Kazbek, Sládek
> 10 % rel.	Harmonie, Rubín, Vital, Bohemie
<b>Xanthohumul (X), DMX</b>	
> 0,70 % hm.	Agnus, Vital
DMX > 0,25 %	Vital
X/alfa.10 <sup>2</sup> > 8	Sládek, Žatecký červeňák, Žatecký pozdní, Bohemie

prenylflavonoidů a poměrový parametr obsahu xanthohumolu vs. alfa kyseliny. Z těchto údajů jsou nejvýznamnější vysoké obsahy xanthohumolu v odrůdách Vital a Agnus a mimořádně vysoký obsah DMX v odrůdě Vital. Přehled a úroveň rozlišovacích znaků ve složení sekundárních metabolitů českých odrůd chmele jsou uvedeny v tab. 4.

Na obr. 2 je znázorněno identifikační schéma všech 11 českých odrůd chmele. Pomocí běžné analýzy hořkých kyselin lze, na základě zastoupení kohumulonu, odlišit od ostatních odrůdy Agnus, Kazbek, Harmonie. Díky vysokému obsahu DMX je možno indikovat i odrůdu Vital. Klíčovým identifikačním parametrem je obsah  $\beta$ -farnesenu, jenž je posuzován na třech úrovních. Vysoký obsah kolem 15 % rel. je charakteristický pro Žatecký poloraný červeňák a odrůdu Žatecký pozdní. Hybridní původ odrůdy Žatecký pozdní potvrzuje přítomnost některých esterů ve chmelových silicích (isobutylisobutyrate, isobutylpropanoate, 2-methylbutylisobutyrate), které Žatecký červeňák prakticky neobsahuje. Odrůdy Bor, Sládek, Harmonie a Rubín obsahují méně než 1 % farnesenu. Střední obsah farnesenu v rozmezí 1 až 5 % rel. je typický pro odrůdy Premiant, Vital a Bohemie. Další identifikační krok je založen na rozdílném obsahu alfa a beta selinenů ve chmelových silicích. Pomocí tohoto ukazatele lze rozlišit dvojice odrůd Bor, Sládek (< 2 % selinenů) a Harmonie, Rubín (> 10 % selinenů). K další identifikaci výše uvedených dvojic odrůd lze použít rozdílný poměr alfa/beta kyselin ( $2,0 < \alpha/\beta > 2,0$ ), vysoký obsah *cis*-ocimenu v silicích (Bor), nízký poměr kohumulonu (Harmonie), popř. poměr xanthohumul/alfa kyseliny (Sládek). Obdobným způsobem lze rozlišit odrůdy Premiant, Vital a Bohemie. Zatímco Vital a Bohemie obsahují více než 10 % rel. selinenů, Premiant méně než 2 % rel. Další diskriminace mezi odrůdami Vital a Bohemie je snadná díky výrazně rozdílnému obsahu dalšího seskviterpenu  $\alpha$ -humulenu. Uvedené schéma je pouze jedním z příkladů. Podobné schéma může v prvním kroku například vycházet z diskriminace na základě obsahu  $\beta$ -farnesenu. Při registraci dalších odrůd lze uvedené schéma vhodně doplnit. Může se ovšem také stát, že nebude vyhovovat. V tomto případě jsou v záloze další potenciální identifikační parametry získané z analýzy nízkomolekulárních polyfenolů a především analýzy genomu.

### 3.2 Identifikace odrůd na základě analýzy DNA

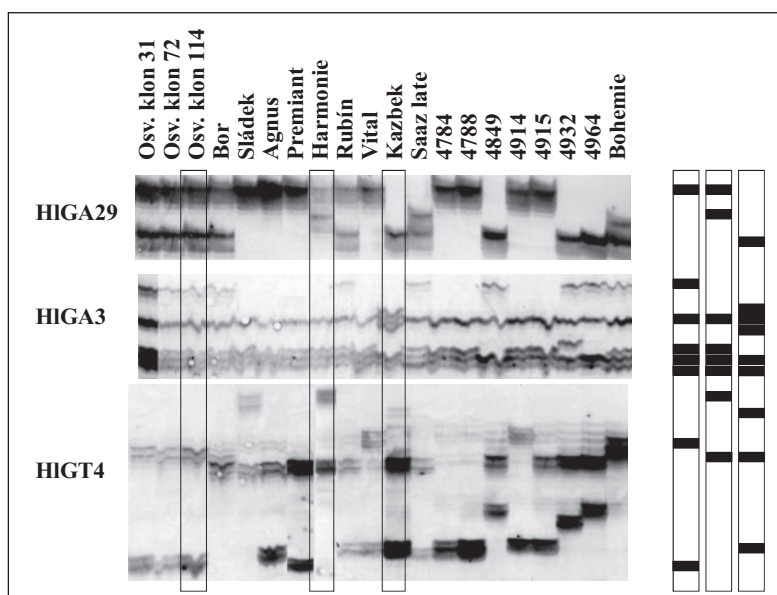
V nedávné době bylo zavedeno použití molekulárních metod do šlechtění chmele a do systému identifikace a determinace odrůd chmele. Ověřili jsme využití SSR markerového systému pro úspěšnou a kompletní identifikaci a determinaci českých povolených odrůd chmele. Tři nebo čtyři SSR primerové kombinace jsou nutné pro jejich účinnou a přesnou determinaci (obr. 3). Je známo, že je možné

high DMX content. Farnesene content is the key identification parameter. Its amount is found at three levels. High content of farnesene at the level of 15 % rel. is typical for Saaz and Saaz Late cultivars. Hybrid origin of Saaz Late confirms the occurrence of some esters in hop oils (isobutylisobutyrate, isobutylpropanoate, 2-methylbutylisobutyrate) which are negligibly contained in Saaz variety. Varieties Bor, Sládek, Harmonie and Rubín contain less than 1 % of farnesene. Medium content of farnesene in the interval of 1–5% rel. is typical for Premiant, Vital and Bohemie varieties. Further identification step is based on different content of alpha and beta selinenes. With the help of this indicator varieties Bor, Sládek (< 2 % selinenes) and Harmonie, Rubín (> 10 % selinenes) can be distinguished. For final discrimination of these varieties different ratio alpha/beta acids ( $2,0 < \alpha/\beta > 2,0$ ), high amount of *cis*-ocimene in hop oils (Bor), low cohumulone ratio (Harmonie) and xanthohumul/alpha acids ratio (Sládek) can be used. Similarly Vital, Premiant and Bohemie cultivars is possible to separate. While Vital and Bohemie contain more than 10 % rel. of selinenes, Premiant less than 2 % rel. Further discrimination between Vital and Bohemie cultivars is easy due to different content of  $\alpha$ -humulene. Presented diagram in only one of several possible models. Similar one can proceed from the discrimination based on the content of  $\beta$ -farnesene. New registered varieties can be supplied to the diagram. In the case of high similarity of cultivars other potential identification parameters obtained from low molecular polyphenols and genome analyses can be used.

### 3.2 Identification of hop varieties on the basis of DNA analysis

Recently, the use of molecular methods has been introduced to hop breeding and management for identification and determination of hop cultivars. We proved that utilization of SSR marker system successfully and completely identified and determined Czech registered cultivars. Three or four SSR primer combinations are necessary for their effective and accurate determination (Fig. 3). It is known that it is possible to isolate DNA from dried hop cones for molecular analyses [19,31,32,33]. We also successfully isolated DNA from dried hop cones of all Czech released cultivars and used for SSR molecular analyses. Our marker system was suitable for the control of authenticity and purity of Czech hop cultivars. Therefore, molecular methods are very sensitive, we tested them for the detection of contamination in mixture DNA samples. In our experiments, we proved that it is successfully possible to detect about 5% genotype contamination in mixture DNA hop cones samples (Fig. 4). Our results are in correspondence with previous published detection limit, which varied from 5 % to 15 % [19,31].

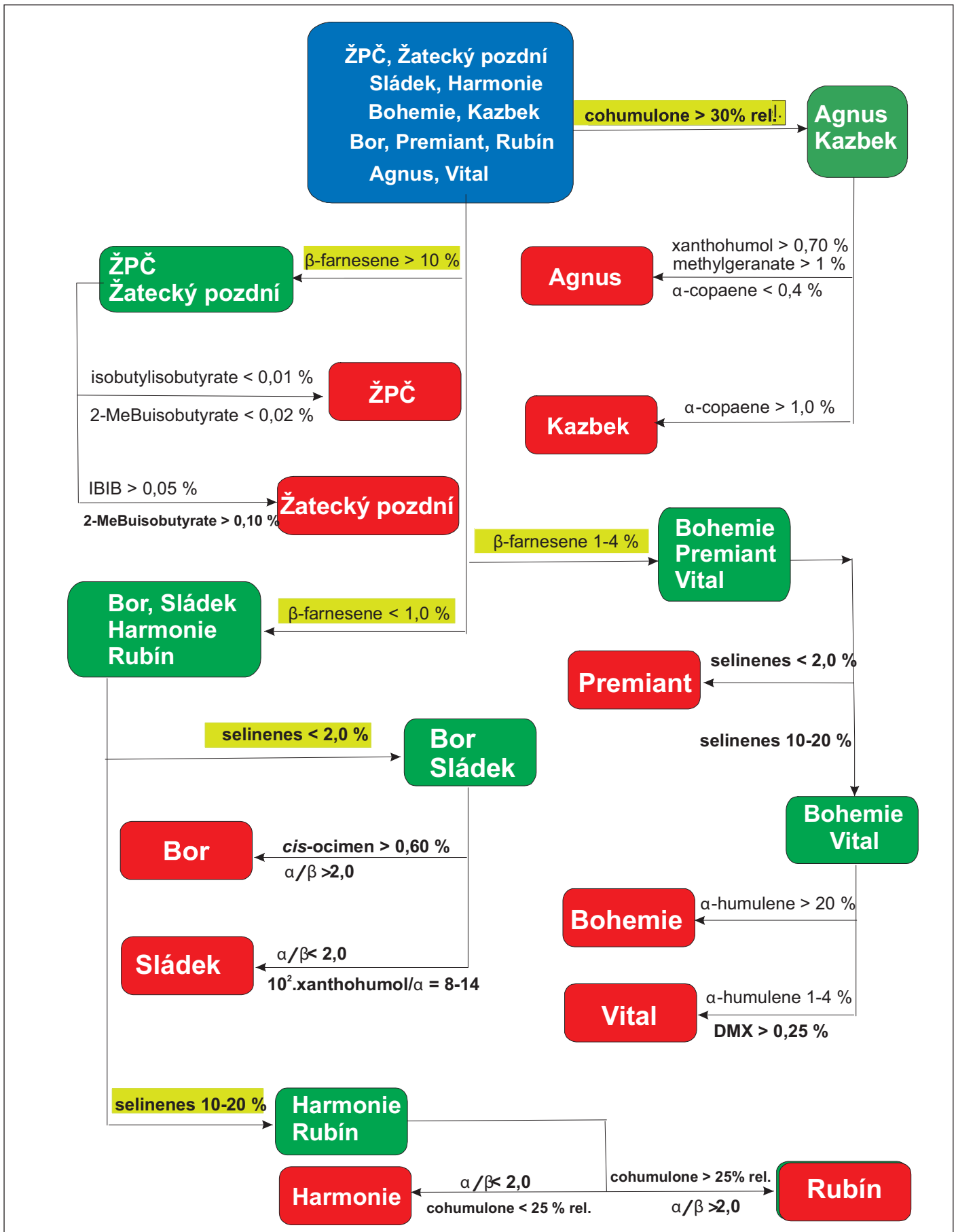
Examination of varietal purity of hop is performed in the course of the whole production cycle starting from rootstock preparation.



Obr. 3 Analýza amplifikovaných produktů SSR reakcí tří primerových kombinací pro různé české genotypy chmele v 5% polyakrylamidovém denaturačním gelu. 1 – Bohemie, 5 – Saaz late / Fig. 3 Analysis of amplified products in SSR reaction of different Czech hop genotypes with three primer combinations in 5% polyacrylamide denaturing gel. 1 – Bohemie, 5 – Saaz late

izolovat DNA i ze sušených hlávek pro molekulární analýzy [19,31,32,33]. I my jsme úspěšně izolovali DNA ze sušených hlávek chmele všech českých povolených odrůd pro SSR molekulární analýzy. Markerovací systém byl použitelný pro kontrolu autenticity a od-

Chemotaxonomy methods are used in raw hops and hop products. Genetic analyses are feasible from any part of the hop plant, best from young leaves. Reliability of hop cultivars identification depends on the age of samples and on the way of processing of raw hops to



Obr. 2 Identifikační schéma českých odrůd chmele / Fig. 2 Identification diagram of Czech hop varieties

Tab. 5 Složení vybraných parametrů sekundárních metabolitů v čistých odrůdách ŽPČ, Sládek a směsných vzorcích / Composition of selected parameters of secondary metabolites in pure varieties Saaz, Sladek and mixtures

			ŽPČ/SAAZ	SLADEK	ŽPČ/SAAZ + SLADEK (příměs) / (mixture)		
			100 %	100 %	5%	10%	20%
Pryskvičky / resins	alfa kyseliny / <i>alpha-acids</i> (% hm.)	průměr / mean 95% int. spolehlivosti	2.85 2.81–2.89	7.54 7.37–7.70	3.11 3.07–3.15	3.46 3.40–3.52	3.95 3.89–4.02
	beta kyseliny (% hm.)	průměr / mean 95% int. spolehlivosti	5.56 5.51–5.61	5.92 5.79–6.05	5.61 5.54–5.67	5.65 5.56–5.74	5.70 5.63–5.77
	poměr a/b kohumulon		0.51 23.5	1.27 28.8	0.55 23.8	0.61 24.6	0.65 25.5
Silice / <i>hop oils</i>	hmotnost silic (%hm.)	průměr / mean 95% int. spolehlivosti	0.44 0.42–0.47	1.37 1.35–1.39	0.48 0.46–0.49	0.53 0.51–0.55	0.59 0.55–0.63
	IBIB* (% rel.)	průměr / mean 95% int. spolehlivosti	0.01 –	0.15 0.15–0.17	0.02 –	0.03 –	0.05 –
	2-MeBuIB** (% rel.)	průměr / mean 95% int. spolehlivosti	0.03 0.02–0.04	0.73 0.63–0.83	0.11 0.09–0.13	0.18 0.17–0.20	0.28 0.23–0.33
	farnesen (% rel.)	průměr / mean 95% int. spolehlivosti	13.41 12.9–13.9	0.78 0.77–0.80	10.2 9.78–10.59	9.45 9.09–9.81	8.02 7.26–8.78

\* IBIB = isobutylisobutyrate

\*\* 2-MeBuIB = 2-methylbutylisobutyrate

růdové čistoty českých odrůd chmele. Protože jsou molekulární metody velice citlivé, otestovali jsme je pro detekci kontaminací ve směsných DNA vzorcích. V našich experimentech jsem ověřili, že je možné úspěšně detekovat 5 až 10 % příměsi jiné odrůdy ve směsném DNA vzorku chmelových hlávek (obr. 4). Naše výsledky byly ve shodě s dříve publikovanými výsledky, kde se detekční limit pohyboval od 5 % do 15 % [19,31].

Prověřování odrůdové čistoty chmele se provádí v průběhu celého výrobního cyklu počínaje přípravou sadbového materiálu a konče kontrolou vysazených porostů. Chemotaxonomické metody se uplatňují ve chmelových hlávkách a chmelových výrobcích, metody založené na analýze genomu lze provádět z libovolné části rostliny, nejlépe z mladých zelených listů. Spolehlivost identifikace chmelových odrůd obecně závisí na stáří vzorků a na způsobu zpracování hlávkového chmele na výrobky. Jak pro chemotaxonomické analýzy, tak analýzy DNA obecně platí, že stárnutím vzorků se míra průkaznosti snižuje. Větší míra průkaznosti je u čerstvých sušených hlávek v porovnání s granulovaným chmelem. Při zpracování se obsah i složení řady sekundárních metabolitů více či méně mění, dochází k degradaci DNA. Je známo, že např.  $\beta$ -farnesen je relativně nestabilní a v porovnání s ostatními seskviterpeny se jeho obsah snižuje [14]. V případě chmelových extraktů je analýza DNA nepoužitelná, protože procesní podmínky DNA odstraňují nebo destrukují.

### 3.3 Falsifikace Žateckého poloraného červeňáku

Výsledky chemických analýz modelové falsifikace Žateckého poloraného červeňáku odrůdou Sládek jsou uvedeny v tabulce 5. Obsah alfa kyselin v čistých odrůdách činil 2,85 % hm. (ŽPČ) a 7,54 % (Sládek). Výsledky ukázaly, že již při 5% příměsi se obsah alfa kyselin ve směsném vzorku zvýšil na 3,11 % hm. s intervalem spolehlivosti 3,07

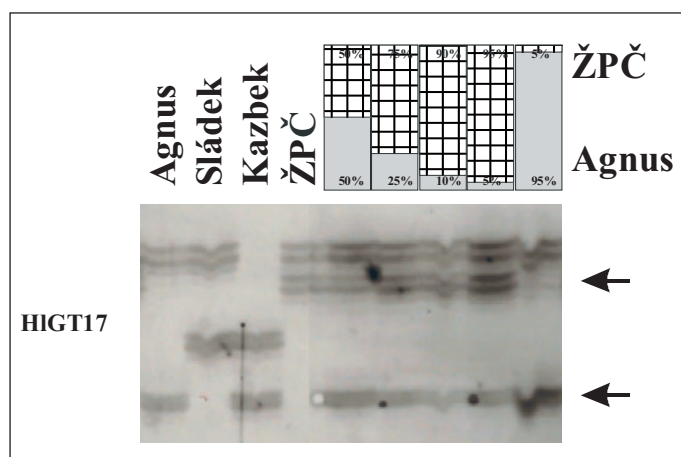
Tab.6: Vybrané chemotaxonomické parametry falšovaného Žateckého poloraného červeňáku / Selected chemotaxonomy parameters of adulterated Saaz aroma variety

Složka / Substance	Žatecký červeňák 100% / SAAZ 100%	Falsifikovaný ŽPČ / Adulterated SAAZ
kohumulon (% rel.)	22 – 25	29.2
kolupulon (% rel.)	39 – 43	49.2
isobutylisobutyrate (% rel.)	≤ 0.01	0.17
2-methylbutylpropanoát (% rel.)	< 0.01	0.05
2-methylbutylisobutyrate (% rel.)	0.02	1.38
trans- $\alpha$ -bergamoten (% rel.)	0.80 – 1.00	0.35
$\beta$ -farnesen (% rel.)	13 – 17	3.3
$\alpha$ -selinen + $\beta$ -selinen (% rel.)	< 2.0	23.5

hop products. Generally holds that conclusiveness of chemotaxonomy and genome analyses descends with the age of hop samples. Analyses results obtained from raw hops are more reliable compared to hop pellets ones. In the course of hop processing content and composition of some secondary metabolites change, DNA degrades. For example  $\beta$ -farnesene is more volatile compared to other sesquiterpenes and its content decreases more rapidly in the course of hop ageing [14]. Genome analyses are not feasible from hop extracts because DNA is removed or destroyed under processing conditions.

### 3.3 Adulteration of Saaz aroma variety

The chemical analyse results of the model adulteration of Saaz aroma hops by Sladek cultivar are summarized in Tab. 5. Content of alpha acids in pure varieties was 2.85 % w. (Saaz) and 7.54 % (Sladek). Content of alpha acids in mixed sample increased to 3.11 % w. with confidence interval of 3.07 až 3.15 % at the level of 5% w of admixture. It is out of interval for pure Saaz variety (2.81–2.89 % w). Spacing of beta acids confidence intervals was achieved even at the level of 20 % of Sladek share. It is caused by relatively small difference of beta acids in pure samples (5.56 vs. 5.92 %). From practical point of view this result is worthless, because values for mixed samples are still in interval typical for pure Saaz hops and do not arouse any suspicion for possible adulteration. The same holds true for cohumulone ratio in spite of increasing trend in higher percentage of admixture. Portion of foreign variety was revealed owing to the hop oil analysis. The presence of some aliphatic esters (isobutylisobutyrate,



Obr. 4 Analýza amplifikovaných produktů SSR reakce pro jednotlivé a směsné vzorky chmelových hlávek v 5% polyakrylamidovém denaturačním gelu / Fig. 4 Analysis of amplified products in SSR reaction of individual and mixture hop cone samples in 5% polyacrylamide denaturing gel.

až 3,15 %, což je mimo interval pro čistý ŽPČ (2,81–2,89 % hm.). Pro beta kyseliny bylo dosaženo rozestupu intervalů spolehlivosti až při 20% podílu odrůdy Sládek ve směsi. Je dáno relativně malým rozdílem beta kyselin v čistých vzorcích (5,56 vs. 5,92 %). Z praktického hlediska je toto zjištění však bezcenné, protože výsledné hodnoty obsahů hořkých kyselin se stále pohybují v intervalech typických pro čistý Žatecký červeňák a nevyvolávají žádné podezření na možnou falsifikaci. Stejný závěr platí i pro zastoupení kohumulonu, přestože má se zvyšujícím se podílem příměsi stoupající trend. Analýza chmelových silic směsných vzorků odhalila příměs díky identifikaci několika esterů (isobutylisobutyrate, 2+3-methylbutylisobutyrate), které čistý ŽPČ prakticky neobsahuje. Oddělení intervalů spolehlivosti bylo dosaženo již při podílu 5 % příměsi. Podobné výsledky byly zjištěny i v případě modelové falsifikace Žateckého červeňáku odrůdou Žatecký pozdní. Falsifikaci prokázala až analýza chmelových silic na úrovni 10% přídavku příměsi.

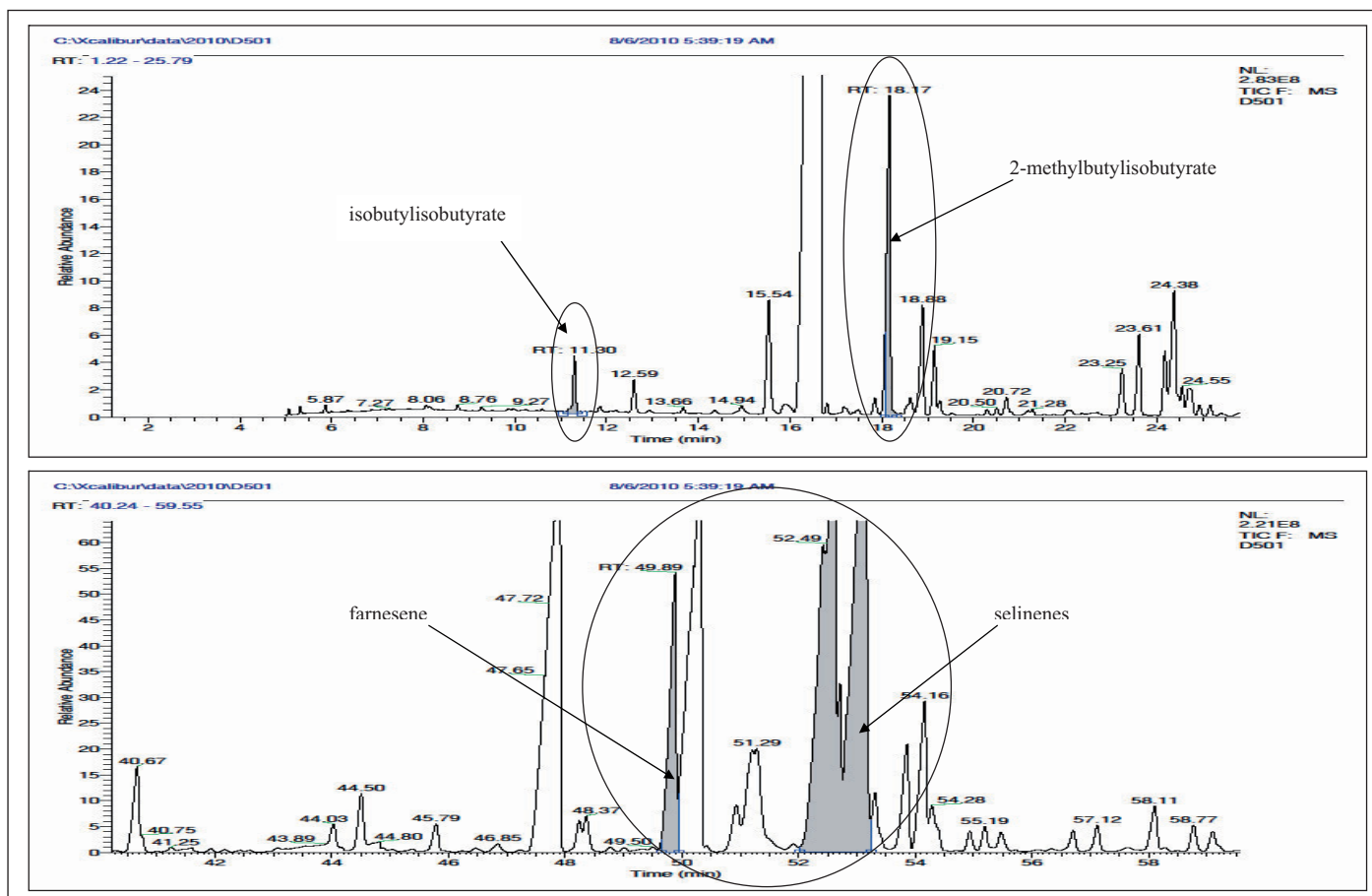
Příklad reálné falsifikace Žateckého poloraného červeňáku v granulované formě dokumentují výsledky analýz hořkých kyselin a chmelových silic v tab. 6 a obr. 5. Jednalo se o dodávku tradiční české odrůdy do nejmenovaného ruského pivovaru. Minimálně osm chemotaxonomických atributů složení hořkých kyselin a silic potvrzuje jednoznačnou falsifikaci. Na základě obsahu seskviterpenických uhlovodíků  $\beta$ -farnesenu a bergamotenu lze podíl příměsi odhadovat na 50 až 70 %. K určení identity přimíchané odrůdy není k dispozici dostatečně široká databáze analytických dat. Na základě vysokého obsahu selinenů (23,5 % rel.) ve falšovaném vzorku však lze jako příměs vyloučit všechny české hybridní odrůdy Sládek, Premiant, Agnus, které jsou pěstovány v provozním měřítku. Ani jedna z nich neobsahuje více než 2 % rel. selinenů. Je tedy zřejmé, že Žatecký červeňák byl falsifikován chmelem dovezeným ze zahraničí. Celý případ není právně uzavřen a je stále v šetření. V každém případě se jedná o nebezpečný precedens, který může výrazně poškodit renomé celého českého chmelařství, zejména v současném období ostrého konkurenčního prostředí a přebytku komodity na světových trzích. V neposlední řadě je v ohrožení i evropská ochranná známka „Žatecký chmel“, kterou tato odrůda získala v roce 2007 jako první na světě.

3-methylbutylisobutyrate, 2-methylbutylisobutyrate) is typical for hybrid varieties. Saaz aroma hop is free of them. Separation of confidence intervals was achieved at the level of 5 % of admixture. Similar results were obtained if Saaz Late cultivar was used for falsification. Separation of confidence intervals was achieved at the level of 10 % of admixture.

Results of hop bitter acids and hop oil analyses shown in Tab. 6 and Fig. 5 document adulteration of Saaz aroma variety in the form of pellets. It related to the delivery of traditional Czech hop variety to a brewery in Russia. At least eight chemotaxonomy parameters of hop resins and hop oil composition confirm unambiguous falsification. The portion of unknown variety is estimated to 50–70 % w. on the basis of sesquiterpenes farnesene and bergamotene contents. There is insufficiently large database of analytical data available for foreign variety identity verification. On the basis of high content of selinenes (23.5 % rel.) in falsified sample, all Czech hybrid varieties cultivated in the large scale can be eliminated. All of them contain less than 2 % rel. selinenes. It follows, that hop used for adulteration had to be imported. The whole incident is still in investigation. In any case, it is a dangerous precedent that can damage the whole Czech hop industry reputation especially in the current period of sharp competitive milieu and surplus of the commodity on world markets. Protected Designation of Origin “Saaz hops”, that variety obtained in 2007 as the first one of its kind is jeopardised as well.

#### 4 CONCLUSIONS

Identification scheme of eleven Czech hop cultivars was successfully compiled on the basis of chemotaxonomy analyses of hop resins, hop oils and prenylflavonoids. Analyses of dried hops by molecular-genetic methods proved that identification of hop varieties is feasible from this material. Reliability of hop varieties identification generally depends on age of samples and on the way of raw hops processing to hop products. DNA analyses are not practicable in hop extracts and are limited in hop pellets due to DNA fractionation or destruction



Obr. 5 Výřezy chromatogramu chmelových silic metodou GC/MS falsifikovaného Žateckého poloraného červeňáku / Fig. 5 Chromatogram sections of hop oils analysis by GC/MS method of adulterated Saaz aroma variety



#### 4 ZÁVĚR

Na základě chemotaxonomických analýz chmelových pryskyřic, silic a prenylovaných flavonoidů se podařilo sestavit identifikační schéma 11 registrovaných českých odrůd chmele. Molekulárně-genetické analýzy sušených hlávek ukázaly, že identifikace odrůd z těchto matic je možná. Spolehlivost identifikace chmelových odrůd obecně závisí na stáří vzorků a na způsobu zpracování hlávkového chmele na výrobky. V případě chmelových extraktů je analýza DNA nepoužitelná a u chmelových granulí omezená. Modelové pokusy falsifikace Žateckého poloraného červeňáku pomocí chemických a genetických analýz shodně prokázaly, že míra průkaznosti je zhruba od hranice 10 % hm. příměsí. Tuto hodnotu však nelze paušalizovat.

#### Poděkování

Děkujeme Aleně Henychové, Haně Liškové a Světlaně Vrabcové za vynikající technickou pomoc při chemických a genetických analýzách. Tato práce byla podporována Národní agenturou pro zemědělský výzkum při MZe ČR v rámci projektu QH81052.

#### LITERATURA / REFERENCES

1. De Keukeleire, D. et al.: Novel methodology for unambiguous identification of hop varieties. Proceedings of the 23th Convention The Institute of Brewing, Asia Pacific Section, Sydney, Australia, 1994, 129–132.
2. De Cooman, L., Everaert, E., De Keukeleire, D.: Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. *Phytochem. Analysis*, **9**, 1998, 145–150.
3. Nickerson, G. B., Williams, P. A.: Varietal differences in the proportions of cohumulone, adhumulone and humulone in hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **44**, 1986, 91–94.
4. Wackerbauer, K., Balzer, U.: Varietal determination of German hops and hop products by HPLC analysis of humulones and lupulones. Possibilities and limitations. *Monatsschr. Brauwiss.* **6**, 1988, 252–255.
5. Krofta, K.: Obsah a složení chmelových pryskyřic žateckých chmelů z pohledu jejich pivovarské hodnoty. Disertační práce. VŠCHT v Praze, 2002.
6. Roberts, M. T., Dufour, J. P., Lewis, A. C.: Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *J. Sep. Sci.* **27**, 2004, 473–478.
7. Eyres, G., Dufour, J. P.: Hop essential oils, chemical composition and odor characteristics. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, London, 2009. ISBN: 978-0-12-373891-2. 239–254.
8. Kralj, D. et al.: Variability of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Inst. Brew.* **97**, 1991, 197–206.
9. Likens, S. T., Nickerson, G. B.: Identification of hop varieties by gas chromatographic analysis of their essential oils, constancy of oil composition under various environmental influences. *J. Agric. Food Chem.* **15**, 1967, 525–530.
10. Peacock, V. E., McCarty, P.: Varietal identification of hops and hop pellets. *MBA Technical Quarterly*, **29**, 1992, 81–85.
11. Narziss, L., Miedaner, H., Gresser, A.: Comparison of the hop oil spectrum of different varieties of hops. *Brauwelt*, 1986 (1), 17–22.
12. Katsiotis, S. T. et al.: Comparative study of the essential oils from hops of various *Humulus lupulus* L. cultivars. *Flavour Fragrance J.* **4**, 1984, 187–191.
13. Kenny, S. T.: Identification of U.S. grown hop cultivars by hop acids and essential oil analysis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **48**, 1990, 3–8.
14. Kroupa, F.: Objektivní charakteristika chmelového aroma českých chmelů a chmelových výrobků. Disertační práce. VŠCHT v Praze, 2007.
15. Shellie, R. A. et al.: Varietal characterisation of hop (*Humulus lupulus* L.) by GC-MS analysis of hop cone extracts. *J. Sep. Sci.* **32**, 2009, 3720–3725.
16. Van Sumere, C. F. et al.: Biochemical identification of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars, hop pellets and barley (*Hordeum vulgare* L.) by means of RP-HPLC flavonoid fingerprints. *Cerevisia*, **14**, 1989, 147–156.
17. Jelínek, L.: Využití stanovení obsahu jednotlivých polyfenolů pro určení odrůdy chmele. Diplomová práce. VŠCHT v Praze, 2009.
18. Patzak, J.: Characterization of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by molecular methods. *Rostl. výroba*, **48**, 2002, 343–350.
19. Murakami, A.: The practical application of PCR for the verification of hop variety. *MBA Technical Quarterly*, **35**, 1998, 185–188.
20. Patzak, J.: Assessment of somaclonal variability in hop in vitro meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica*, **131**, 2003, 343–350.
21. Hadonou, A. M., Walden, R., Darby, P.: Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Ecol. Notes* **4**, 2004, 280.
22. Jakse, J., Bandelj, D., Javornik, B.: Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Ecol. Notes* **2**, 2002, 544.
23. Stajner, N., Jakse, J., Kozjak, P., Javornik, B.: The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Sci.* **168**, 2005, 213–221.
24. Patzak, J.: Využití moderních molekulárních metod u chmele. Chmelařská ročenka 2011. VUPS, Praha, 2011, 126.
25. Nesvadba V., Brynda M., Patzak J., Krofta K.: Metodika pro udržení odrůdové čistoty chmelových porostů. Metodika pro praxi 5/08 Žatec, Chmelařský institut, 2008, ISBN 978-80-86836-87-4.
26. Krofta, K.: Hodnocení kvality chmele. Metodika pro praxi 4/08. Chmelařský institut Žatec, 2008, ISBN 978-80-86836-84-3.
27. Krofta, K., Čepička, J.: Stanovení chmelových silic metodou SPME. *Kvasný průmysl*, **46**, 2000, 235–241.
28. Patzak, J.: Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* **121**, 2001, 9–18.
29. Patzak, J., Vrba, L., Matousek, J. (2007): New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome* **50**, 2007, 15–25.
30. Patzak, J., Matoušek, J.: Development and evaluation of expressed sequence tag-derived microsatellite (EST-SSR) markers for genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.). *Biologia Plantarum* **55**, 2011, in press.
31. Araki, S., Tsuchiya, Y., Masachika, T., Tamaki, T., Shinotsuka, K.: Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **56**, 1998, 93–98.
32. Townsend, M. S., Henning, J. A., Moore, D. L.: AFLP analysis of DNA dried hop cones. *Crop Sci.* **40**, 2000, 1383–1386.
33. Fleischer, R., Horlemann, C., Schwekendiek, A., Kling, C., Weber, G.: AFLP fingerprinting in hop: analysis of the genetic variability of the Tetnang variety. *Genet. Resour. Crop Evol.* **51**, 2004, 211–220.