Biochemiczne wskaźniki stopnia odporności chmielu na *Verticillium albo-atrum* i *Fusarium sambucinum*

JAN PIOTROWSKI¹ i MARIAN MILCZAK²

¹Instytut Chemii i Technologii Rolnej Akademii Rolniczej

²Instytut Hodowli Roślin i Nasiennictwa Akademii Rolniczej

(Przyjęto dn. 26.04.1980)

J. Piotrowski¹, M. Milczak² (¹*Institute of Chemistry and Food Technology*, ²*Institute of Plant Breeding and Seed Production, Agricultural Academy, Akademicka 15, 20-934 Lublin, Poland*) *Acta Agrobotanica* 34(2): 277-284, 1982.

*Biochemical indices of hop resistance to *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium sambucinum**

Abstract

The contents of total phenolic compounds, chlorogenic acid and peroxidase activity as well as monophenols to polyphenols ratio were studied in the suckers of the hops as indices of resistance to *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium sambucinum*. The suckers of hop taken in the early spring from the healthy and infected plots were used in the experiments. As a research material were included cv. 'Northern Brewer' — a wilt tolerant variety, two wild susceptible varieties — cv. 'Lubelski' and cv. 'Brewers Gold', four breeding clones and one male plant.

It was found that cv. 'Northern Brewer' contains more total phenolic compounds, monophenols and chlorogenic acid, and in particular considerably higher peroxidase activity as compared to cv. 'Lubelski'. Taking into consideration the contents of these compounds, in the majority of cases, the new breeding clones were similar to the mother variety 'Northern Brewer'. It seems reasonable to assume, that the new clones should be more wilt tolerant than varieties and populations cultivated in our country.

WSTĘP

Uprawa chmielu w Polsce jest poważnie zagrożona przez inwazję chorób grzybowych glebowego pochodzenia, głównie przez *Verticillium albo-atrum* i *Fusarium sambucinum*.

Jedyną skuteczną metodą przeciwdziałania temu kompleksowi chorób jest wyhodowanie i wprowadzenie do uprawy odmian tolerancyjnych na występujące u nas rasy tych patogenów.

Wykorzystując ogólnobiologiczną dodatnią współzależność stwierdzoną u wielu gatunków roślin między zawartością związków fenolowych a stopniem odporności na szereg chorób grzybowych (Rubin i Archowska, 1971; Bhaskaron i Muthusamy, 1974; Hunter, 1974) podjęto temat określony w tytule. Badania Kremheller (1974) wskazywały jednoznacznie na różnice w zawartości o-dwuhydroksy-fenoli u odmian chmielu tolerancyjnych i wrażliwych na uwiąd, powodowany przez *Verticillium albo-atrum*.

Badań tego typu w Polsce dotychczas nie prowadzono. Wiadomo jedynie, że nasza czołowa odmiana — 'Lubelski' (78% areалу uprawy) jest w niektórych rejonach masowo niszczona przez uwiąd. Wydaje się więc interesujące przebadanie obok tej odmiany szeregu innych form hodowlanych (odmian zagranicznych i klonów krajowych). Cel praktyczny — to wyłonienie materiału wyjściowego do szybkiego rozmnażania i planowego krzyżowania.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły kłącza roślin chmielu pobierane 13.04. 1979 r. z plantacji zainfekowanej przez *Verticillium albo-atrum* i *Fusarium sambucinum* (testowanie polowe, rośliny 1-roczone) oraz z plantacji, na której dotychczas nie wystąpiły objawy tej choroby. Badaniami objęto: odmianę 'Northern Brewer' (NB) znaną z tolerancji na występujące u nas biotypy *Verticillium* i *Fusarium*, dwie dość wrażliwe odmiany — 'Lubelski' (Lub) i 'Brewers Gold' (BG) oraz cztery klony hodowlane, o których praktycznie wiemy niewiele, gdyż są dopiero w trakcie testowania na polu prowokacyjnym. Uwzględniono ponadto formę męską (M) wykorzystywaną do krzyżowań. Klony oznaczone symbolami K-1., ... K-4 stanowią potomstwo F₂ kombinacji: 'Northern Brewer' × forma miejscowa (oznaczona symbolem M).

Określono następujące biochemiczne cechy: zawartość fenoli ogólnych, monofenoli, polifenoli, kwasu chlorogenowego i aktywność peroksydazy.

Związki fenolowe i aktywność peroksydazy określano w soku, który otrzymany był przez wyciskanie go ze świeżych oczyszczonych kłączy. Ogólną zawartość fenoli oraz monofenoli oznaczano za pomocą odczynnika Folin-Ciocalteu w obecności węglanu sodowego (Folin i Ciocalteu, 1927). Adsorpcję mierzono w spektrofotometrze SP-6-500 UV przy długości fali 725 nm. Zawartość fenoli ogólnych i monofenoli odczytywano z krzywej wzorcowej wykreślonej dla kwasu chlorogenowego.

Oddzielenie monofenoli od polifenoli przeprowadzono przepuszczając próbkę przez kolumnę wypełnioną poliklarem AT. Jak podaje Jerumanis (1969), poliklar AT całkowicie adsorbuje polifenole z roztworu

fenoli ogólnych; w przesączu pozostają więc tylko monofenole.

Działanie peroksydazy oceniano spektrofotometrycznie wg metody podanej przez Bergmeyer (1970).

Zawartość kwasu chlorogenowego określano metodą Habermanna (1967).

WYNIKI I DYSKUSJA

Porównanie poziomu badanych cech u ocenianych genotypów (rys. 1-4) wskazuje na występowanie większych lub mniejszych różnic (zależnie od cechy i środowiska) między testowanymi formami hodowlanymi. Interesująco przedstawia się także wpływ siedliska na bezwzględne wartości cech.

Rys. 1. Aktywność peroksydazy (jednostki/cm³ soku)

Fig. 1. Peroxidase activity (Units/cm³ of sap)

Na ogół w warunkach prowokacyjnych poziom analizowanych związków chemicznych wzrastał w obrębie każdego genotypu, z tym, że tempo wytwarzania kształtowało się różnie u badanych odmian i klonów.

Najbardziej widoczne różnice zarysowały się w przypadku aktywności peroksydazy (rys. 1) i stosunku mono- do polifenoli (rys. 2). Przyjmując za kryterium podziału form żeńskich aktywność peroksydazy w warunkach nieinfekcyjnych, można badany materiał podzielić umownie na 3 grupy (rys. 1): a) o wysokiej aktywności (>1 jednostki oksydazy/cm³), do której obok tolerancyjnej odmiany 'Northern Brewer' wchodzi kłony (K-1, K-3, K-4), b) o niskiej aktywności ($<0,75$ jednostek oksydazy/cm³), w której to grupie znajdują się wrażliwe na uwiąd odmiany 'Brewers Gold' i 'Lubelski', oraz c) pośredniej reprezentowanej przez jeden klon

Rys. 2. Stosunek monofenoli do polifenoli

Fig. 2. Monophenols to polyphenols ratio

Rys. 3. Zawartość fenoli ogólnych (mg/cm³ soku)

Fig. 3. The contents of total phenolic compound (mg/cm³ of sap)

(K-2). W warunkach infekcyjnych różnice między genotypami były zdecydowanie mniejsze. Porównanie obu podatnych na uwięd odmiann zdaje się wskazywać na nieco sprawniejszy mechanizm obrony u odmiany 'Brewres Gold' niż u 'Lubelskiego'.

Rys. 4. Zawartość kwasu chlorogenowego (μ mol/g świeżej masy kłączy)

Fig. 4. The contents of chlorogenic acid (μ mol/g of suckers fresh matter)

Przy klasyfikacji odmian chmielu pod względem polowej odporności na uwiąd 'Brewers Gold' zaliczany jest w RFN (Rintelen, 1974) do grupy nieco mniej podatnych niż najwrażliwsza odmiana 'Hallertau mfr' (odpowiednik 'Lubelskiego').

Jakkolwiek podejmowano wiele badań w zakresie fizjologii patogenezu uwiadu w chmielu (za Rintelenem, 1974) to jednak wiele zagadnień — chociażby sprawa toksyn — jest jeszcze słabo wyjaśnionych. Sprawa jest o tyle złożona, że w warunkach polowych mamy do czynienia i z różną wirulencją ras w obrębie gatunku patogena i z różnymi patogenami (*Verticillium albo-atrum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium culmorum*) i wreszcie z niebagatelnym wpływem warunków siedliskowych (pH, zasobność w makro- i mikroelementy, stosunki wodno-powietrzne gleby, temperatura itd.).

Jedno wydaje się być bezsporne, że w mechanizmie obronnym rośliny istotną rolę odgrywa poziom związków fenolowych w tkankach, tempo wytwarzania tych związków w warunkach infekcji (stopień „aromatyzacji” tkanek) oraz aktywność enzymów utleniających fenole.

Jak podaje Rubin i Arcichowska (1971), produkty utleniania fenoli charakteryzują się wysoką i różnorodną aktywnością biologiczną. Panuje na ogół zgodny pogląd, że spośród związków fenolowych większą toksycznością w stosunku do patogenów wyróżniają się monofenole. Monofenole są aktywatorami, a polifenole inhibitorami oksydazy IAA (Tomaszewski i Thimann, 1966) — auksyny odgrywają-

cej bardzo ważną rolę w rozwoju wielu chorób grzybowych (Pilet, 1960; Sequeira, 1963).

Auksyna ta hamuje syntezę lignin, uaktywnia w roślinie hemicelulazy i pektynazy (Armstrong, 1966), co może stymulować rozwój patogenów. Zdaniem niektórych autorów (Giebel, 1976) zachodzi duża współzależność między stopniem odporności roślin na choroby grzybowe, a stosunkiem mono- do polifenoli w soku komórkowym roślin zdrowych. Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach (rys. 2) zdają się potwierdzać tę zasadę biologiczną.

I tak, u tolerancyjnej odmiany 'Northern Brewer' wskaźnik ten w warunkach nieinfekcyjnych wynosił 6,4, podczas gdy u obu odmian podatnych ('Lubelski', 'Brewers Gold') kształtował się na poziomie 3,5-3,7.

Klony żeńskie zajmowały pozycję pośrednią, z tym, że dwa z nich (K-2 i K-3) miały ten wskaźnik wyraźnie korzystniejszy (5,2-5,3). Dość interesująco, a zarazem zagadkowo, przedstawia się stosunek mono- do polifenoli u osobnika męskiego (8,2). Chociaż daleko idących wniosków z tego pojedynczego przypadku wyciągnąć nie można, to jednak inspirowało to podjęcie badań w zakresie zmienności tej cechy w obrębie form męskich. Tak wysoki wskaźnik u osobnika męskiego ukształtował się z uwagi na wyjątkowo niski poziom polifenoli (ok. 60% poziomu NB).

Przy masowym testowaniu materiałów hodowlanych szczególnie cenne są te związki chemiczne, których oznaczenie jest proste, a współzależność poziomu ze stopniem tolerancji na określoną chorobę wyraźna.

W niniejszych badaniach zwrócono więc uwagę na poziom fenoli ogólnych (rys. 3) i kwasu chlorogenowego (rys. 4). Kwas chlorogenowy okazał się cechą bardziej różnicującą oceniany materiał roślinny.

I tak odporna w naszych warunkach odmiana 'Northern Brewer' dystansowała wyraźnie (1,8 μ mola/g świeżej masy kłaczy) odmiany podatne ('Lubelski' — 1,2, 'Brewers Gold' — 1,25).

Klony żeńskie znajdowały się bądź to na poziomie odmiany odpornej (K-1), bądź nieco słabiej, ale zdecydowanie korzystniej od wyjątkowo wrażliwej odmiany 'Lubelski'.

Przedstawione wyniki zdają się potwierdzać ugruntowaną w literaturze opinię, że wyższe stężenie związków fenolowych, a w szczególności kwasu chlorogenowego, są przyczyną większej odporności roślin na niektóre choroby grzybowe (Patil i in., 1964; Rubin i Arcichowska, 1971; Salisbury i Ross, 1975).

Zaletą kwasu chlorogenowego jako wskaźnika odporności roślin jest jego stosunkowo łatwa wykrywalność.

Wydaje się więc, że może być traktowany jako godna polecenia cecha biochemiczna przy testowaniu chmielu w hodowli odpornościowej przeciwko chorobom uwiądowym.

WNIOSKI

Uzyskane w niniejszych badaniach wyniki upoważniają do następujących wniosków:

1) Wszystkie cztery stosowane testy biochemiczne wskazują na występowanie różnic między badanymi genotypami chmielu, zarówno w siedlisku gdzie uwiąd nie występował, jak i w warunkach typowo prowokacyjnych.

2) Największe różnice wśród badanych cech biochemicznych zarysowały się w następującej kolejności malejącej: aktywność peroksydazy, stosunek mono- do polifenoli, zawartość kwasu chlorogenowego i poziom fenoli ogólnych w soku komórkowym.

3) Tolerancja na uwiąd — w warunkach Polski odmiana 'Northern Brewer' wyróżniała się w porównaniu z odmianami wrażliwymi ('Lubelski', 'Brewers Gold') wyższym poziomem wszystkich badanych cech biochemicznych.

4) Ocena jedyne go osobnika męskiego nie dała jednoznacznych wyników upoważniających do zaszeregowania go bądź to do grupy tolerancyjnej, bądź wrażliwych na uwiąd.

Problem wpływu płci na stopień tolerancji na uwiąd zasługuje na oddzielne badanie.

STRESZCZENIE

W kłączach chmielu badano zawartość fenoli ogólnych, monofenoli, polifenoli, kwasu chlorogenowego, a także określano aktywność peroksydazy. Związki te traktowano jako biochemiczne wskaźniki odporności roślin na *Verticillium albo-atrum* i *Fusarium sambucinum*. Materiał do badań pochodził z plantacji zdrowej oraz silnie zainfekowanej wymienionymi patogenami. Badaniami objęto: jedną odmianę tolerancyjną na uwiąd infekcyjny — 'Northern Brewer', dwie odmiany podatne — 'Lubelski' i 'Brewers Gold', cztery klony hodowlane — potomstwo 'Northern Brewer' × forma miejscowa i jedną roślinę męską miejscowego pochodzenia.

Stwierdzono, że odmiana 'Northern Brewer' wyróżniała się w porównaniu z odmianami wrażliwymi wyższym poziomem wszystkich badanych cech biochemicznych. Klony żeńskie plasowały się bądź to na poziomie matecznej odmiany odpornej (1), bądź nieco słabiej (3), ale zdecydowanie korzystniej od wrażliwej odmiany 'Lubelski' powszechnie uprawianej w kraju.

LITERATURA

- Armstrong D. I., 1966. Hypothesis concerning the mechanism of auxin action. Proc. Nat. Acad. Sci., USA. 56: 64-66.
- Bergmeyer H. U., 1970. Methoden der enzymatischen analyse. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.
- Bhaskaron R., Muthusamy M., 1974. Role of phenolics in *Verticillium wilt* of cotton. Madras Agr. J. 61: 160-164.
- Folin O., Ciocalteu V., 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. J. biol. Chem. 73: 627-650.
- Giebel I., 1976. Zawartość mono- i polifenoli oraz aktywność fosfatazy alkalicznej w liściach pszenicy jako wskaźnik odporności na mączniaka prawdziwego pszenicy (*Erysiphe graminis*. f.sp. *tritici*). Materiały z XVI sesji naukowej Instytutu Ochrony Roślin — Poznań, 107-114.
- Habermann H. M., 1967. Allagochrome II. Effects of light and substrate on allagochrome and chlorogenic acid levels of incubated sunflower leaf discs. Plant Physiol. 42: 1769-1779.
- Hunter R. E., 1974. Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*. Physiol. Plant Path. 4: 151-159.
- Jerumanis J., 1969. Dosage des polyphenols dans les houblons, extraits de houblons, orges et malts. Bull. Anc. Et. Brasserie, Louvain 65: 113-131.
- Kremheller H. T., 1974. *Verticillium* — Welke. Bodenkultur u. Pflanzenbau. 1/74: 18-26.
- Patil S. S., Rowelson R. L., Young R. A., 1964. Relation of chlorogenic acid and free phenols in potato roots to infection by *Verticillium albo-atrum*. Phytopath. 56: 531-535.
- Pilet P. E., 1960. Auxin content and auxin catabolism of the stems of *Euphorbia cyparissias* L. infected by *Uromyces pisi*. Phytopath. Z. 41: 75-90.
- Rintelen I., 1974. *Verticillium* — Welke des Hopfens. Pfl. Krankh. 5: 304-315.
- Rubin B., Arcichowska J., 1971. Biochemia i fizjologia odporności roślin. PWRL, Warszawa.
- Salisbury F. B., Ross C., 1975. Fizjologia roślin. PWRL, Warszawa.
- Sequeira L., 1963. Growth regulators in plants disease. Ann. Rev. Phytopath. 1: 5-30.
- Tomaszewski M., Thimann K. V., 1966. Interaction of phenolic acids metallic ions and chelating agents on auxin — induced growth. Plant Physiol. 41: 1442-1454.