

**Anna Czubačka**

*Institut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Institut Badawczy  
w Puławach*

## GENETYCZNE PODSTAWY PRODUKCJI WYBRANYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH W CHMIELU\*

**Słowa kluczowe:** ekspresja genów, kwasy goryczkowe, fenylopropanoidy, związki fenolowe, stesy biotyczne i abiotyczne

### Wstęp

Chmiel (*Humulus lupulus* L.) jest gatunkiem uprawianym głównie na potrzeby przemysłu piwowarskiego. Znajduje także zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, ponieważ produkty drogeryjne zawierające ekstrakty z chmielu działają przeciwbakteryjnie i grzybobójczo, poprawiają elastyczność skóry i wzmacniają włosy. Chmiel jest wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym ze względu na właściwości uspakajające i nasenne, łagodzenie menopauzy i łagodne obniżanie ciśnienia krwi. Rośliny chmielu są bowiem bogatym źródłem metabolitów wykazujących działanie prozdrowotne, z których najwięcej jest produkowanych w owocostanach żeńskich zwanych szyszkami. Cenne związki powstają w gruczołach lupulinowych obecnych na listkach okwiatu i okrywy kwiatowej (1, 34).

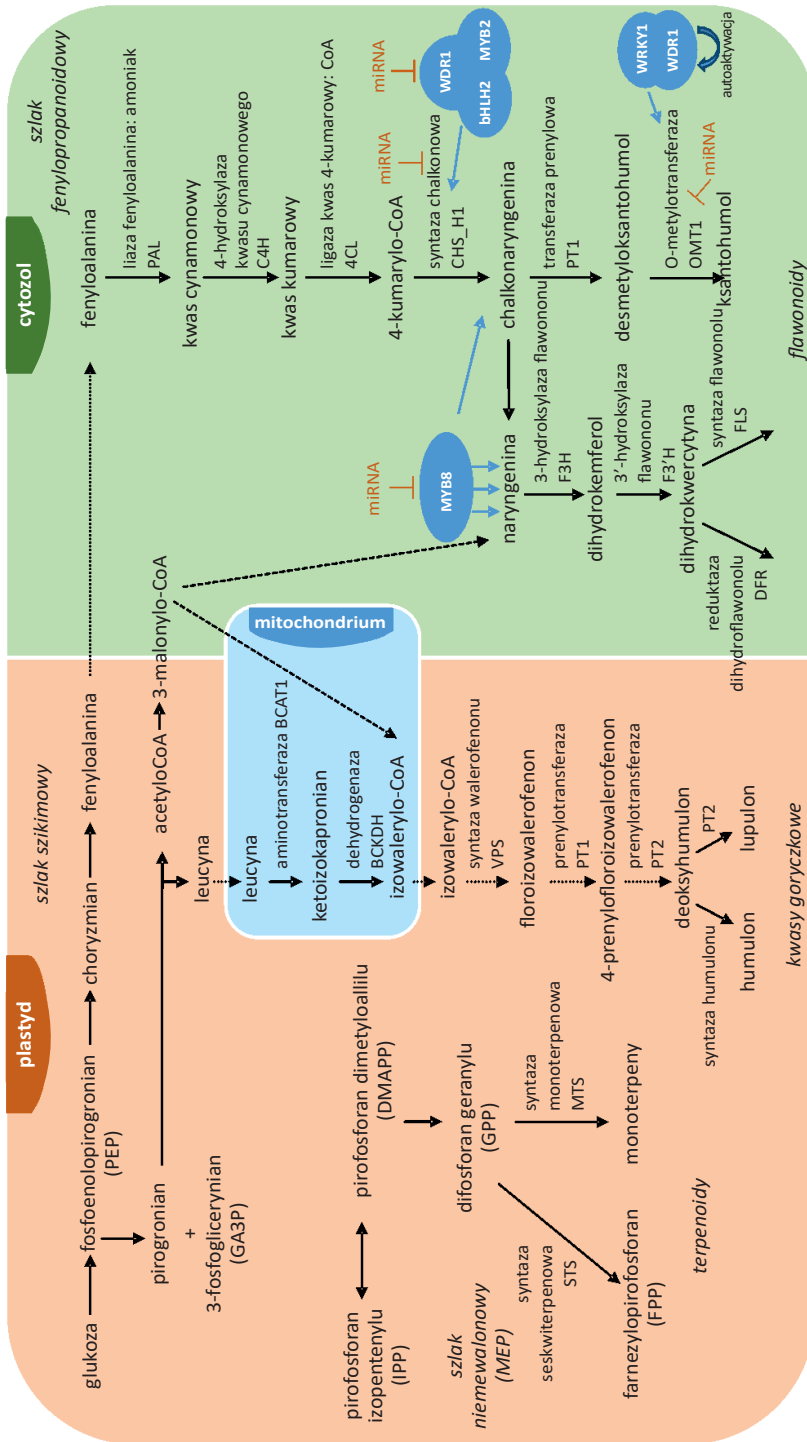
### Biosynteza metabolitów wtórnych chmielu

Metabolity wtórne to związki, które nie są bezpośrednio konieczne do wzrostu, rozwoju czy reprodukcji roślin, ale są zaangażowane w ich oddziaływanie ze środowiskiem (3). Główne metabolity wtórne chmielu należą do olejków eterycznych i kwasów goryczkowych, a także prenylowanych flawonoidów (12). Wspólnym prekursorem tych grup związków jest pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP) (rys. 1).

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

Kwasy goryczkowe są preadenylowanymi poliketydami, do których należą  $\alpha$ -kwasy oraz  $\beta$ -kwasy. W skład tych pierwszych wchodzi humulon, kohumulon i adhumulon, natomiast  $\beta$ -kwasy to lupulon, kolupulon i adlupulon (1, 9, 13). Pochodzą one z prekursorów pirogronianu tworzonych w szlaku prowadzącym do powstania aminokwasów rozgałęzionych (BCAA, ang. *branched-chain amino acids*). Ostatni etap tego szlaku jest katalizowany przez enzym BCAT2 (ang. *branched-chain amino transferase 2*). Następnie aminokwasy rozgałęzione (leucyna, izoleucyna, walina) są wykorzystane w szlaku prowadzącym do syntezy kwasów goryczkowych. Początkowo aminokwasy podlegają degradacji w mitochondrium przez enzymy BCAT1 (ang. *branched-chain amino transferase 1*) i BCKDH (ang. *branched-chain keto-acid dehydrogenase*), a następnie w cytozolu przekształcone do floroizowalerofenonu (PIVP) przez syntazę walerofenonu (VPS). Floroizowalerofenon może także powstawać równolegle w chloroplastach w wyniku szlaku fosforanu metyloerytrytolu (MEP) (9, 12). PIVP podlega prenylacji przez prenylotransferazy PT1/PT1L i PT2 do związków będących bezpośrednimi prekursorami kwasów goryczkowych, które powstają w chloroplastach. Ostatnim etapem syntezy  $\alpha$ -kwasów jest prawdopodobnie przemiana katalizowana przez hydrosylazę deoksyhumuloniu lub syntazę humuloniu (HS1 lub HS2) (9, 13, 29). Natomiast w końcowym etapie produkcji  $\beta$ -kwasów uczestniczy enzym PT-2 (9, 23, 27).

Głównym prenyloflawonoidem występującym w chmielu jest ksantohumol, czyli 2',4',4-trihydroksy-6-metoksy-3-(3-metylo-but-2-en-1-yl)chalkon (12). Stanowi on ponad 1% masy suszonych szyszek (34). Ksantohumol powstaje z fenyloalaniny (rys. 1). Aminokwas ten zostaje przekształcony do p-kumarylo-CoA, który w reakcji katalizowanej przez syntazę chalkonową i izomerazę chalkonową CHIL2 ulega przemianie do chalkonaryngeniny. Ta z kolei przy aktywności prenylotransferazy PT1L zostaje przekształcona do demetyloksantohumolu, który ulega metylacji do ksantohumolu przy udziale O-metylotransferazy OMT1 (3, 9, 12, 23, 27). Inne chmielowe prenyloflawonoidy to: desmetyloksantohumol, izokksantohumol (izomer ksantohumolu), dehydrocykloksantohumol, 8-prenyloaryngenina i 6-prenyloaryngenina (27, 34). Chalkonaryngenina może zostać przekształcona także do naryngeniny, która staje się prekursorem związków fenolowych, do których należą flawonole, flawan-3-ole, tanniny, lignany, kwasy fenolowe i stilbenoidy (27). Związki te występują w największej koncentracji w nasionach i listkach okwiatu (3).



Rys. 1. Schemat syntezy metabolitów wtórnych chmielu, takich jak: terpenoidy, kwasy goryczkowe, fenylopropanoidy, flawonoidy (23)

Chmiel jest także bogaty w olejki eteryczne, które powstają w gruczołach lupulinowych. Za charakterystyczny aromat roślin odpowiada kompozycja ponad 300 związków lotnych. Ich zawartość w chmielu wynosi od 0,03% do 3% (1). Każda odmiana charakteryzuje się nieco innym składem olejków. Także proporcje ich zawartości są zróżnicowane. Przeważnie 2 lub 3 związki są obecne w wysokim stężeniu i stanowią 20–70% całkowitej zawartości olejków. Zwykle w największych ilościach występują takie związki, jak:  $\beta$ -myrcen,  $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -kariofilen, tlenek kariofilenu i epoksyd II humulenu. Najważniejszym składnikiem olejku chmielowego jest monoterpenny myrcen (27, 34). Prekursory tych związków powstają w szlaku metabolicznym MEP, po czym podlegają przemianie do difosforanu geranylu (GPP), a następnie w reakcji katalizowanej przez syntazę monoterpenną (MTS1, MTS2) do  $\beta$ -myrcenu lub przez inną syntazę do farnezylopirofosforanu (FPP) (rys. 1). Następnie syntaza seskwiterpenowa I (STS1) prowadzi do powstania kariofilenu i humulenu (9).

### **Kluczowe geny warunkujące produkcję metabolitów wtórnych chmielu**

Chmiel jest rośliną diploidalną o liczbie chromosomów  $2n = 20$ , przy czym 9 par to chromosomy autosomalne, a dwa (X i Y) determinują płć (21). Wielkość genomu została określona jako 5,62 pg i około 2050 Mb, przy czym liczbę genów kodujących białka oszacowano na ponad 41 tysięcy (24). Poszczególne etapy szlaków metabolicznych są kontrolowane przez szereg genów kodujących enzymy i czynniki transkrypcyjne, czy też odpowiadających za ich aktywność. Aktywność genów może zależeć od odmiany (genotypu), organu i fazy rozwojowej rośliny.

W wyniku ewolucji, a także jako efekt selekcji prowadzonej w ramach hodowli, doszło do wykształcenia kilkunastu homologów tworzących rodzinę genu *CHS* (20). Jeden z nich – gen kodujący kluczowy enzym szlaku produkcji kwasów goryczkowych *VPS* w chmielu został po raz pierwszy opisany przez Okadę i Ito (26). Natomiast gen wykazujący względem niego homologię, kodujący enzym o aktywności syntazy chalkonowej został scharakteryzowany przez Matouška i in. (19, 20) i opisany jako *CHS\_HI*. Obecność dużej ilości mRNA powstałego na bazie genu *CHS\_HI* wykryto w dojrzewających szyszkach, niższą zawartość stwierdzono w kwiatach i wierzchołkach wzrostu, a najniższą w korzeniach i liściach. Homologi genu *CHS\_HI* – geny *CHS2*, *CHS3* i *CHS4* – zostały zmapowane jako tworzące wspólną grupę powiązań (5), po czym grupa ta została poszerzona o dwa kolejne geny – *VPS* i *CHS\_HI* (6). Enzym *VPS* posiada bowiem także aktywność syntazy chalkonowej, ale jest ona znacznie słabsza niż aktywność syntazy walerofenonu, co sprawia, że enzym ten pełni istotną rolę w produkcji kwasów goryczkowych, a tylko nieznaczną w szlaku prenylopropanoidowym (13).

Aktywność genu *VPS* jest wyższa w szyszkach niż w innych organach i rośnie wraz ze stopniem dojrzałości szyszek (4, 8). W szyszkach obserwowana jest także wyższa aktywność genów *BCAT2*, *CHS\_HI*, *HS1* i *HS2* (8, 23). Natomiast takie geny

jak *PTIL*, *PT2* i *BCAT* podlegają ekspresji niemal wyłącznie w szyszkach, przy czym ich ekspresję odnotowano nie tylko w gruczołach lupulinowych, ale także w tkance przylistków (23). Geny *PTIL*, *VPS*, *PT2* i *BCAT1* są od 100 do 170 razy bardziej aktywne w gruczołach lupulinowych niż w liściach (29). Jednocześnie nie obserwowano różnic w aktywności genów *VPS* i *PT2* pomiędzy odmianami goryczkowymi i aromatycznymi. Tymczasem geny kodujące syntazę humulonu *HS1* i *HS2* podlegały 5,8 razy silniej ekspresji w odmianach goryczkowych. Podobnie wyższą aktywność genów kodujących syntazę chalkonową zaobserwowano u odmian chmielu, które cechują się większą zawartością kwasów goryczkowych (25).

W szyszkach obserwuje się wyższą niż w liściach aktywność genów *MTS1* i *MTS2*, *OMT1*, *PT1* (24). Natomiast gen *GPPS* podlega wysokiej ekspresji zarówno w szyszkach, jak i liściach, co może wynikać z faktu, że izoprenoidy GPP i FPP są nie tylko produktami pośrednimi w szlaku powstawania kwasów goryczkowych, ale też prekursorami w innych szlakach metabolicznych zachodzących w komórkach. Cytozolowa ligaza koenzymu A (*CCL2*), która katalizuje tworzenie izowalerylo-CoA, w większej ilości jest produkowana w gruczołach lupulinowych szyszek niż w liściach. Z kolei geny kodujące inne ligazy CCL, tj. *CCL3*, *CCL4*, *CCL10*, *CCL12*, zaangażowane w metabolizm podstawowy roślin, podlegają podobnej ekspresji w liściach i szyszkach, niezależnie od fazy rozwojowej kwiatostanów żeńskich (36). Ponadto zaobserwowano, że geny zaangażowane w produkcję terpenoidów i prenylopropanoidów podlegają większej ekspresji w japońskiej odmianie uprawnej Shinshu Wase niż w dzikiej odmianie *Humulus lupulus* var. *cordifolius* (24), co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę, że jednym z głównych kierunków hodowli nowych odmian jest właśnie zwiększenie zawartości metabolitów wtórnych istotnych dla przemysłu.

### Geny regulatorowe syntezy metabolitów wtórnych

Poza genami kodującymi białka bezpośrednio zaangażowane w produkcję metabolitów wtórnych, istnieje cały szereg innych genów kodujących związki pełniące funkcje regulatorowe. Należą do nich czynniki transkrypcyjne TF (ang. *transcription factor*) z rodzin, np.: *bHLH*, *MYB*, *WDR* czy *WRKY* (18, 23). Transkrypt czynnika *MYB3* jako pojedynczy czynnik lub też w kompleksie utworzonym z czynnikiem *WDR1* wpływa aktywnie na gen *CHS4* (11, 17). Z kolei promotor genu *CHS\_H1* jest regulowany przez kompleksy transkrypcyjne, takie jak trójbiałkowy MBW (*MYB3/bHLH2/WDR1* lub *MYB2/bHLH2/WDR1*) lub dwubiałkowy (*bHLH2/WDR1*) (18, 23). Natomiast czynnik transkrypcyjny *MYB7* został opisany jako inhibitor kompleksu *MYB/bHLH/WDR1*. Gatica-Arias i in. (11) wykazali, że nadekspresja tego czynnika w transgenicznym roślina spowodowała zmniejszenie ekspresji genów kodujących syntazę chalkonową (*CHS\_H1*), izomerazę chalkonową (*CHI*), 3-hydroksylazę i 3'-hydroksylazę flawanonu (*F3H* i *F3'H*), syntazę flawanolu (*FLS*) oraz O-metylotransferazę (*OMT1*).

Zwiększenie zawartości prenyloflawonoidów i kwasów goryczkowych w transgenicznym chmielu z nadekspresją genów *WRKY1* i *WDR1* wskazuje na udział białek *WRKY1/WDR1* w stymulowaniu kompleksu MBW oraz enzymu *OMT1* (22). Oznaczenie poziomu ekspresji genów za pomocą metody real-time PCR wykazało znacznie wyższą aktywność *WRKY1* niż *WDR1*. Wynika to ze zdolności czynnika transkrypcyjnego *WRKY1* do aktywowania ekspresji kodującego go genu (17). Gen ten jest sterowany promotorem, który posiada miejsce wiązania białka będącego jego produktem i w ten sposób dochodzi do autoaktywacji genu *WRKY1*. Czynniki *WRKY1* i *WDR1*, łącznie lub niezależnie od siebie, wpływają aktywująco na geny *OMT1* i *PRT1*. Mogą też we współpracy z kompleksem MBW w sposób pośredni aktywować gen *CHS\_HI* (22). Ponadto *WRKY1* stymuluje ekspresję genu *MYB3* w gruczołach lupulinowych (17). W zależności od stanu fizjologicznego rośliny akumulacja transkrypty *WRKY1* ulega gwałtownym wahaniom, co jest możliwe dzięki potranskrypcyjnemu wyciszeniu, a jednocześnie zdolności do autoaktywacji genu.

Badania przeprowadzone na transgenicznym chmielu wykazującym nadekspresję genu *MYB8* wykazały, że powstający na jego bazie czynnik transkrypcyjny aktywuje ekspresję genu *CHS\_HI* oraz genów istotnych w biosyntezie flawonoidów, tj. *F3H*, *F'3H*, *FLS* (15). Jednocześnie *MYB8* wpływa hamująco na ekspresję genów *OMT1* i *PTI* zaangażowanych w końcowe etapy biosyntezy prenyloflawonoidów i kwasów goryczkowych. W ten sposób czynnik transkrypcyjny ma zdolność przekierowania produktu genu *CHS\_HI* w stronę syntezy flawonoli przy jednoczesnej redukcji syntezy desmetyloksantohumolu i ksantohumolu oraz kwasów goryczkowych. Ekspresja *MYB8* jest szczególnie duża w gruczołach lupulinowych. Jednak ma miejsce również w młodych liściach, co jest związane z obecnością gruczołów lupulinowych w ich wierzchołkowej części.

Transkrypty innych genów istotnych w regulacji produkcji prenyloflawonoidów, takie jak: *bHLH2*, *WDR1*, *WRKY1*, *MYB1*, *MYB2*, *MYB3*, *MYB7*, stwierdzono nie tylko w gruczołach lupulinowych, ale też w przylistkach i w liściach, przy czym w tych ostatnich występowały w znacznie mniejszych ilościach (11, 23). Według Patzaka i in. (29) geny czynników transkrypcyjnych *MYB7*, *MYB8*, *MYB78* i *WRKY1* w poszczególnych tkankach podlegają ekspresji na zbliżonym poziomie niezależnie od tego, czy materiał badawczy stanowią odmiany aromatyczne czy goryczkowe. Natomiast gen *MYB3* jest istotnie bardziej aktywny w liściach odmian aromatycznych niż goryczkowych, a gen *bHLH2* w gruczołach lupulinowych tychże odmian.

### Wpływ czynników stresowych na aktywność genów

Aktywność genów może ulegać zmianom w zależności od czynników zewnętrznych abiotycznych i biotycznych. Zmiany w produkcji metabolitów wtórnych stanowią często odpowiedź na zmieniające się warunki zewnętrzne. Związki te bowiem pełnią rolę ochronną, łagodząc niekorzystny wpływ stresów na rośliny.



Eriksen i in. (9) badali ekspresję genów zaangażowanych w szlaki metaboliczne prowadzące do syntezy metabolitów wtórnych w liściach chmielu w warunkach stresu termicznego i niedoboru wody. Zidentyfikowali 43 transkrypty genów kodujących białka biorące udział w syntezie kwasów goryczkowych. Wśród nich jest syntaza humulonu oraz enzymy najprawdopodobniej zaangażowane w szlakach metabolicznych degradacji BCAA, VPS i MEP. Wśród transkryptów, których poziom uległ obniżeniu na skutek stresu znalazły się dwa prawdopodobne transkrypty – *VPS* oraz syntazy chalkonowej.

Zmiany w ekspresji zaobserwowano również w przypadku genów zaangażowanych w biosyntezę, a także degradację aminokwasów rozgałęzionych oraz w szlakach prowadzących do powstania syntazy walerofenonu i syntazy humulonu oraz uczestniczących w szlaku niemewalonowym. Geny te w warunkach stresu podlegały niższej ekspresji (tab. 1) (9, 28).

Pod wpływem wysokiej temperatury (39°C przez 6 tygodni) w liściach chmielu doszło do obniżenia ekspresji czterech transkryptów syntazy chalkonowej oraz dwóch transkryptów syntazy walerofenonu w porównaniu z roślinami utrzymywanymi w warunkach kontrolnych, tj. w temperaturze 24°C (tab. 2) (9). Również niedobór wody spowodował obniżenie poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję tych dwóch enzymów, a także syntazy humulonu, przy czym odnotowano podwyższoną produkcję transkryptów syntazy seskwiterpenowej (tab. 3). Jednak największe zmiany w aktywności genów zaobserwowano w roślinach, które były poddane działaniu obu czynników stresowych jednocześnie. W warunkach wysokiej temperatury i suszy doszło do ograniczenia ekspresji genów syntaz: walerofenonu, chalkonowej, seskwiterpenowej i monoterpenowej, a także prenylotransferazy i aminotransferazy *BCAT2*.

Należy pamiętać, że materiałem badawczym w analizach Eriksena i in. (9) były liście chmielu, na których co prawda obecne są trychomy z gruczołami lupulinowymi, ale ich zagęszczenie jest niewielkie. Tymczasem główna produkcja kwasów goryczkowych i ksantohumolu odbywa się w gruczołach lupulinowych w szyszkach (27).

Poza czynnikami abiotycznymi na aktywność genów wpływ mogą mieć także czynniki biotyczne, w tym infekcje patogenami. Zakażenie wiroidem karłowatości chmielu HSVd (ang. *Hop stunt viroid*) wpłynęło redukująco na ekspresję genu kodującego syntazę chalkonową w liściach i ogonkach liściowych (tab. 2). Aktywność tego genu zmalała nawet 40-krotnie (10) w stosunku do roślin zdrowych. Ponadto w zainfekowanych roślinach zaobserwowano zmiany w aktywności genów kodujących białka wchodzące w skład potrójnego kompleksu regulującego transkrypcję genu *CHS\_H1*. Stwierdzono spadek aktywności genów odpowiedzialnych za produkcję białek bHLH1 i bHLH2, a jednocześnie zanotowano trzykrotny wzrost aktywności genu kodującego białko MYB3. Takie zaburzenie proporcji między czynnikami transkrypcyjnymi prowadzi do zakłóceń w aktywności promotora. Ponadto prawdopodobnie wiroid także w sposób bezpośredni wpływa na degradację mRNA powstałego na bazie genu *CHS\_H1*, nie pozwalając na utworzenie enzymu. W efekcie niska aktywność genu

*CHS\_H1* przekłada się na zmniejszenie produkcji metabolitów wtórnych, takich jak glikozydy flawonolowe czy kwasy fenolowe w porażonych roślinach.

Natomiast w przypadku infekcji wiroidem utajonym chmielu HLVd (ang. *Hop latent viroid*) w szyszkach zaobserwowano wzrost aktywności genu *CHS\_H1* w odmianie Saaz, podczas gdy w pozostałych badanych odmianach – Sládek, Premiant i Agnus – zmiany w ekspresji były niewielkie i nieistotne statystycznie (28). Wczesniejsze analizy biochemiczne prowadzone przez Jelinka i in. (14) wykazały w zainfekowanych roślinach odmiany Saaz podwyższoną zawartość takich związków polifenolowych, jak katechiny i epikatechiny. Proste związki fenolowe, kwasy fenolowe, flawanole i dihydrochalkony pełnią rolę ochronną w roślinach i wykazują właściwości antywirusowe.

Pistelli i in. (32) analizowali zawartość metabolitów wtórnych istotnych dla przemysłu piwowarskiego w szyszkach pięciu polskich odmian chmielu, porównując rośliny zdrowe i zainfekowane ApMV (ang. *Apple Mosaic Virus*), HpMV (ang. *Hop Mosaic Virus*) oraz HLVd. Uzyskane wyniki nie pozwoliły na stwierdzenie, że infekcja niekorzystnie wpływa na koncentrację metabolitów. Zaobserwowano wystąpienie niewielkich zmian w zawartości mono- i sekwiterpenów, przy czym zmiany w akumulacji tych związków były różne w różnych odmianach. Rośliny zdrowe należące do odmian Magnat, Marynka, Puławski i Sybilla miały więcej  $\alpha$ -kwasów niż ich chore odpowiedniki, ale już w odmianie Lubelski nie odnotowano różnic. Z kolei  $\beta$ -kwasy wystąpiły w większej ilości w zdrowych roślinach odmian: Sybilla, Lubelski, Puławski, a w odmianach Magnat i Marynka to właśnie szyszki zainfekowanych roślin były bogatsze w te związki. Natomiast Jelinek i in. (14) badali jedną odmianę – Saaz i w zainfekowanych roślinach obserwowali obniżenie poziomu  $\alpha$ - i  $\beta$ -kwasów. Badania Pethybridge i in. (31) wskazują, że infekcja wirusowa nie zawsze wiąże się z obniżeniem zawartości kwasów goryczkowych. Badali oni cztery odmiany chmielu zainfekowane wirusami HpMV, HpLV (ang. *Hop latent virus*), PNRSV (ang. *Prunus necrotic ringspot virus*) oraz podlegające infekcjom mieszanym. Przeważnie rośliny porażone więcej niż jednym wirusem produkowały mniej kwasów goryczkowych.

Pod wpływem infekcji wiroidem utajonym chmielu (HLVd) aktywność genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYB78 w odmianie Premiant spadła 6,5 raza (tab. 4) (28). Z kolei w odmianach Sládek i Premiant odnotowano spadek aktywności genów kodujących czynniki transkrypcyjne MYB3 (odpowiednio: 4,4 razy i 5,9 razy) oraz WRKY1 (odpowiednio: 1,9 razy i 2,7 razy) przy jednoczesnym braku zmian w aktywności genu *bHLH2* we wszystkich czterech badanych odmianach. Natomiast obserwowano zmiany w ekspresji innego czynnika transkrypcyjnego z grupy bHLH, a mianowicie bHLH4, którego aktywność wzrosła w odmianie Sládek (2,6 razy), a zmalała w odmianie Saaz (1,6 razy).

Z kolei infekcja chmielu patogenem grzybowym *Verticillium nonalfalfae* przyczyniła się do zmian w transkrypcji genu 4-hydroksylazy kwasu cynamonowego, która jest jednym z enzymów szlaku fenylopropanoidowego (tab. 2) (35). Zmiany nie były jednakowe w całej roślinie, ale zależały od organu. W korzeniach badacze odnoto-



wali spadek, a w łodygach wzrost aktywności genu. Co więcej, w odmianie podatnej Celeia zmiany były wyraźniejsze w korzeniach (2,5-krotny spadek aktywności genu w stosunku do roślin niezakażonych), a w odmianie odpornej Wye Target – w łodydze (2,5-krotny wzrost aktywności genu).

Analiza transkrypcyjna RNAseq przeprowadzona przez Progara i in. (33) wykazała, że zakażenie *V. nonalfalfae* wpływa na zmianę aktywności wielu genów chmielu. Spośród nich geny zaangażowane w produkcję metabolitów wtórnych stanowiły 6 i 7%, odpowiednio w korzeniach i pędach w przypadku odmiany odpornej, a 12% niezależnie od organu w przypadku odmiany podatnej. Ponadto w odmianie podatnej 3–4% genów, których ekspresja w pędach jest zmieniona, koduje białka uczestniczące w szlaku fenylopropanoidowym, podczas gdy w roślinach odpornych – 1%. Natomiast w korzeniach nie wykryto różnic w aktywności żadnego z genów tego szlaku. Większość zmian dotyczyła zmniejszenia poziomu ekspresji i miała miejsce częściej w pędach niż w korzeniach. Tylko około 2% genów o zmienionej ekspresji to te zaangażowane w szlak biosyntezy flawonoidów w pędach i korzeniach roślin podatnych i pędach roślin odpornych. Natomiast w korzeniach nie odnotowano modyfikacji w aktywności genów istotnych w syntezie flawonoidów.

Szeroką grupą metabolitów wtórnych chmielu są polifenole, które powstają w szlaku szikimowym (fenylopropanoidy), szlaku malonianowym (poliketydy) oraz w wyniku połączenia tych szlaków (flawonoidy) (rys. 1) (7). Berne i in. (2) badali, jakie zmiany pod wpływem infekcji *V. nonalfalfae* zachodzą w zawartości związków polifenolowych w roślinach należących do odmian Celeia i Wye Target. Zaobserwowali, że dochodzi do spadku zawartości polifenoli w korzeniach odmiany podatnej (1,1–3,7 razy) i w pędach odmiany odpornej (3,9–13 razy). Stwierdzili ponadto, że produkcja tej grupy związków jest zróżnicowana w poszczególnych częściach rośliny w zależności od jej fazy rozwojowej. Przed kwitnieniem polifenole są skoncentrowane głównie w korzeniach, gdzie jest ich 10-krotnie więcej niż w pędach. Natomiast ich ilość rośnie w części nadziemnej wraz z rozwojem, co powoduje, że pędy kwitnących roślin mają zawartość związków polifenolowych zbliżoną do korzeni lub nawet wyższą.

Polifenole przyczyniają się do niespecyficznego odporności roślin na stesy. Na przykład w wyniku uszkodzenia mechanicznego dochodzi do uwolnienia związków fenolowych, a następnie do ich utlenienia, które skutkuje polimeryzacją i wykrystalizowaniem powstałych związków w lignifikacji ścian komórkowych, co wzmacnia strukturę roślinne (2). Utlenione fenole powodują także indukcję kwasu indol-3-octowego (IAA), który stymuluje wytwarzanie tyloz będących wytworami komórek roślinnych sąsiadujących z ksylemem zasiedlonym przez patogeny. Odmiana Wye Target – odporna na werciliozę – charakteryzuje się stosunkowo wysoką zawartością związków fenolowych w porównaniu z innymi odmianami chmielu (2). W przypadku odmian podatnych dopiero infekcja patogenem grzybowym prowadzi do zwiększonej aktywności genów uczestniczących w szlaku fenylopropanoidowym (33). Jednak mimo wysokiej aktywności genów obserwuje się zmniejszoną zawartość związków

fenolowych w roślinach zainfekowanych grzybem. Może to być wynikiem działania mechanizmów obronnych patogenu polegających na zakłócaniu metabolizmu komórek gospodarza (2). Ponadto pod wpływem infekcji związki polifenolowe podlegają estryfikacji i są wykorzystywane do wzmożonej produkcji ligniny w celu wzmocnienia ścian komórkowych. W efekcie ich ekstrakcja staje się trudniejsza, przez co nie są w pełni izolowane z badanego materiału.

Tabela 1

Zmiany w aktywności genów kodujących enzymy zaangażowane w produkcję kwasów goryczkowych chmielu

Gen	Kodowany enzym	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
BCAT1	aminotransferaza	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
BCAT2	aminotransferaza	susza+wysoka temperatura	spadek	liście	9
VPS	syntaza walerofenonu	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
PT	prenylotransferaza	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
HS	syntaza humulonowa	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek*	liście	9

HLVd – wiroid utajony chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

Tabela 2

Zmiany w aktywności genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę związków polifenolowych w chmielu

Gen	Enzym	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
PAL	liaza fenyloalanina:amoniak	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
C4H	4-hydroksylaza kwasu cynamonowego	infekcja <i>Verticilium nonalfalfae</i>	spadek	korzenie	35
			wzrost	łodygi	
4CL2	ligaza kwas 4-kumarowy:CoA	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28
CHS_H1	syntaza chalkonowa	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
		infekcja HSVd	spadek	liście i ogonki liściowe	10
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
OMT1	O-metylotransferaza	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28

HLVd – wiroid utajony chmielu; HSVd – wiroid karłowatości chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

Tabela 3

Zmiany w aktywności genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę związków terpenowych w chmielu

Gen	Enzym	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
GPPS-SSU	syntaza difosforanu geranylu	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
FPPS	syntaza farnesylopirofosforanu	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
MTS	syntaza monoterpenowa	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
STS	syntaza seskwiterpenowa	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
TPS9	syntaza terpenu	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
NES	syntaza (E)-nerolidolu/linalolu	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28

HLVd – wiroid utajony chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

Tabela 4

Zmiany w aktywności genów kodujących czynniki transkrypcyjne w chmielu

Gen	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
MYB3	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
	infekcja HSVd	spadek	liście i ogonki liściowe	10
MYB8	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28
MYB78	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
bHLH2	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28
	infekcja HSVd	spadek	liście i ogonki liściowe	10
bHLH4	infekcja HLVd	spadek*/wzrost*	młode szyszki	28
WRKY1	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28

HLVd – wiroid utajony chmielu; HSVd – wiroid karłowatości chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

### Markery molekularne związane z biosyntezą metabolitów wtórnych

Uzyskanie odmian o wysokiej produkcji kwasów goryczkowych jest jednym z celów hodowli chmielu. Testowanie roślin na zawartość tych związków może zostać wykonane, kiedy rośliny osiągną dojrzałość i wykształcą szyszki, a więc najwcześniej dwa lata po wysadzeniu. Wówczas geny odpowiedzialne za biosyntezę

$\alpha$ - i  $\beta$ -kwasów stają się aktywne. Aby przeprowadzenie selekcji było możliwe we wcześniejszym etapie rozwoju roślin, opracowano markery molekularne związane z cechą wysokiej zawartości kwasów goryczkowych (16, 9). Cerenak i in. (9) opisali 13 rejonów QTL-i (ang. *quantitative trait loci*) związanych z wysoką produkcją  $\alpha$ -kwasów. Żaden z nich nie mapował z genami kodującymi syntazę chalkonową, co pozwala przypuszczać, że wykryte QTL-e są raczej powiązane z czynnikami regulatorowymi dla tych genów.

Zidentyfikowano także QTL-e powiązane z syntezą ksantohumolu i desmetyloksantohumolu (16, 30). W populacji nowozelandzkiej wykryto rejon QTL-i, które były powiązane z syntezą metabolitów wtórnych poprzez oddziaływanie na czynniki transkrypcyjne lub enzymy zaangażowane w późne etapy biosyntezy i modyfikację tych związków (21). Część z QTL-i ma wpływ na produkcję pojedynczych związków, inne na produkcję jednocześnie kwasów goryczkowych, olejków eterycznych oraz polifenoli, a jeszcze inne regulują różne cechy, w tym także te niezwiązane z powstawaniem metabolitów wtórnych.

### Podsumowanie

Chmiel jest bogatym źródłem metabolitów wtórnych, takich jak: polifenole, kwasy goryczkowe i terpenoidy. Związki te powstają w szlakach metabolicznych, których poszczególne etapy są kontrolowane przez liczne enzymy i czynniki transkrypcyjne. Aktywność kodujących je genów warunkuje poziom syntezy metabolitów. Ekspresja genów zależy od genotypu, organu oraz fazy rozwojowej roślin i może podlegać wahaniom pod wpływem działania czynników stresowych. Na potrzeby hodowli opracowano markery molekularne związane z produkcją związków bioaktywnych, a ich zastosowanie ułatwia selekcję pożądaných genotypów.

### Literatura

1. Agacka-Mołodoch M., Skomra U.: Chmiel jako źródło bioaktywnych metabolitów wtórnych dla przemysłu piwowarskiego i farmaceutycznego. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2012, **31(5)**: 39-50.
2. Berne S., Kovačević N., Kastelec D., Javornik B., Radišek S.: Hop Polyphenols in relation to verticillium wilt resistance and their antifungal activity. *Plants*, 2020, **9**, 1318, doi:10.3390/plants9101318.
3. Bocquet L., Sahpaz S., Hilbert J.L., Rambaud C., Rivière C.: *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 2018, **17**: 1047-1090, doi: 10.1007/s11101-018-9584-y.
4. Castro C.B., Whittock L.D., Whittock S.P., Leggett G., Koutoulis A.: DNA sequence and expression variation of hop (*Humulus lupulus*) valerophenone synthase (VPS), a key gene in bitter acid biosynthesis. *Annals of Botany*, 2008, **102**: 265-273, doi:10.1093/aob/mcn089.
5. Cerenak A., Satovic Z., Javornik B.: Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of OTLs for alpha-acid content. *Genome*, 2006, **49**: 485-494, doi: 10.1139/g06-007.

6. Cerenak A., Satovic Z., Jakse J., Luthar Z., Carovic-Stanko K., Javornik B.: Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus Lupulus* L.). *Euphytica*, 2009, **170**: 141-154, doi: 10.1007/s10681-009-9920-9.
7. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S.: Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **72**: 1-20, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
8. Clark S.M., Vaitheeswaran V., Ambrose S.J., Purves R.W., Page J.E.: Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC Plant Biology*, 2013, **13**, 12.
9. Eriksen R.L., Padgitt-Cobb L.K., Townsend M.S., Henning J.A.: Gene expression for secondary metabolite biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.) leaf lupulin glands exposed to heat and low-water. *Scientific Reports*, 2021, **11**, 5138, doi: 10.1038/s41598-021-84691-y.
10. Füssy Z., Patzak J., Stehlik J., Matoušek J.: Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 2013, **170**: 688-695, doi: 10.1016/j.jplph.2012.12.006.
11. Gatica-Arias A., Stanke M., Häntzschel K.R., Matoušek J., Weber G.: Over-expression of the transcription factor HIMYB3 in transgenic hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettnanger) modulates the expression of genes involved in the biosynthesis of flavonoids and phloroglucinols. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2013, **113**: 279-289, doi: 10.1007/s11240-012-0268-9.
12. Gołabczak J., Gendaszewska-Damach E.: Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu – aspekty biologiczne i technologiczne. *Biotechnologia*, 2010, **1(88)**: 82-96.
13. Hong K., Wang L., Johnpaul A., Lv C., Ma C.: Key Enzymes involved in the synthesis of hops phytochemical compounds: from structure, functions to applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**, 9373. doi: /10.3390/ijms22179373.
14. Jelínek L., Dolečková M., Karabín M., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: Influence of growing area, plant age, and virus infection on the contents of hop secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences*, 2012, **30(6)**: 541-547.
15. Kocábek T., Mishra A.K., Matoušek J., Patzak J., Lomnická A., Khare M.: The R2R3 transcription factor HIMYB8 and its role in flavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 2018, **269**: 32-46.
16. Koie K., Inaba A., Okada I., Kaneko T., Ito K.: Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.). *Acta Horti (ISHS)*, 2005, **668**: 59-66, doi: 10.17660/ActaHortic.2005.668.7.
17. Matoušek J., Kocábek T., Patzak J., Briza J., Siglova K., Mishra A.K., Duraisamy G.S., Tycova A., Ono E., Krofta K.: The “putative” role of transcription factors from H1WRKY family in the regulation of the final steps of prenylflavonoid and bitter acids biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology*, 2016, **92**: 263-277, doi: 10.1007/s11103-016-0510-7.
18. Matoušek J., Kocábek T., Patzak J., Füssy Z., Procházková J., Heyerick A.: Combinatorial analysis of lupulin gland transcription factors from R2R3Myb, bHLH and WDR families indicates a complex regulation of chs\_H1 genes essential for prenylflavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *BMC Plant Biology*, 2012, **12**, 27.
19. Matoušek J., Novak P., Patzak J., Bříza J., Krofta K.: Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. *Rostlinná Výroba*, 2002a, **48(1)**: 7-14.
20. Matoušek J., Novak P., Bříza J., Patzak J., Niedermeierová H.: Cloning and characterisation of *chs*-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 2002b, **162**: 1007-1018.

21. McAdam E.L., Freeman J.S., Whittock S.P., Buck E.J., Jakse J., Cerenak A., Javornik B., Kilian A., Wang C.H., Andersen D., Vaillancourt R.E., Carling J., Beatson R., Graham L., Graham D., Darby P., Koutoulis A.: Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. *BMC Genomics*, 2013, **14**, 360.
22. Mishra A.K., Duraisamy G.S., Khare M., Kocábek T., Jakse J., Bříza J., Patzak J., Sano T., Matoušek J.: Genome-wide transcriptome profiling of transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) constitutively overexpressing HIWRKY1 and HIWDR1 transcription factors. *BMC Genom.*, 2018, **19**, 739.
23. Mishra A.K., Kocábek T., Sukumari Nath V., Awasthi P., Shrestha A., Kumar Killi U., Jakse J., Patzak J., Krofta K., Matousek J.: Dissection of dynamic transcriptome landscape of leaf, bract, and lupulin gland in hop (*Humulus lupulus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**, 233, doi:10.3390/ijms21010233.
24. Natsume S., Takagi H., Shiraishi A., Murata J., Toyonaga H., Patzak J., Takagi M., Yaegashi H., Uemura A., Mitsuoka C., Yoshida K., Krofta K., Satake H., Terauchi R., Ono E.: The draft genome of hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. *Plant Cell Physiology*, 2015, **56**(3): 428-441, doi:10.1093/pcp/pcu169.
25. Novák P., Matoušek J., Bříza J.: Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulus lupulus*. *Biologia Plantarum*, 2003, **46**(3): 375-381.
26. Okada Y., Ito K.: Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, **65**(1): 150-155, doi: 10.1271/bbb.65.150.
27. Paguet S., Siah A., Lefèvre G., Sahpaz S., Rivière C.: Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. *Phytochemistry Reviews*, 2022, **21**: 667-708, doi: 10.1007/s11101-022-09813-4.
28. Patzak J., Henychová A., Krofta K., Svoboda P., Malířová I.: The influence of *Hop Latent Viroid* (HLVd) infection on gene expression and secondary metabolite contents in hop (*Humulus lupulus* L.) glandular trichomes. *Plants*, 2021, **10**(11), 2297, doi: 10.3390/plants10112297.
29. Patzak J., Henychová A., Matousek J.: Developmental regulation of lupulin gland-associated genes in aromatic and bitter hops (*Humulus lupulus* L.). *BMC Plant Biology*, 2021, **21**, 534, doi: 10.1186/s12870-021-03292-z.
30. Patzak J., Henychová A., Krofta K., Nesvadba V.: Study of molecular markers for xanthohumol and DMX contents in hop (*Humulus lupulus* L.) by QTLs mapping analysis. *Brewer Science*, 2012, **65**: 96-102.
31. Pethybridge S.J., Wilson C.R., Hay F.S., Leggett G.W., Sherrieff L.J.: Effect of viruses on agronomic and brewing characteristics of four hop cultivars in Australia. *Annals of Applied Biology*, 2002, **140**: 97-105.
32. Pistelli L., Ferri B., Cioni P.L., Koziara M., Agacka M., Skomra U.: Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five healthy and infected Polish cultivars. *Industrial Crops and Products*, 2018, **124**: 653-662, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.009.
33. Progar V., Jakše J., Štajner N., Radišek S., Javornik B., Berne S.: Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports* 2017, **36**: 1599-1613, doi: 10.1007/s00299-017-2177-1.
34. Przybyś M., Skomra U.: Hops as a source of biologically active compounds. *Polish Journal of Agronomy*, 2020, **43**: 83-102.
35. Svára A., Jakse J., Radišek S., Javornik B., Štajner N.: Temporal and spatial assessment of defence responses in resistant and susceptible hop cultivars during infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Journal of Plant Physiology*, 2019, **240**, 153008, doi: 10.1016/j.jplph.2019.153008.



- 
36. Xu H., Zhang F., Liu B., Huhman D.V., Sumner L.W., Dixon R.A., Wang G.: Characterization of the formation of branched short-chain fattyacid:CoAs for bitter acid biosynthesis in hop glandular trichomes. *Molecular Plant*, 2013, **6**: 1301-1317.
- 

Adres do korespondencji:

*dr Anna Czubacka*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 933*  
*e-mail: Anna.Czubacka@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR	ORCID
Anna Czubacka	0000-0003-1843-6745