

## Einfluss der Bitterstoffe des Hopfens auf das Wirtswahlverhalten von *Phorodon humuli* (SCHRANK), Homoptera, Aphididae

**Oleg Kryvynets, Frank Walker & Claus P. W. Zebitz**  
**Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim**

**Abstract:** Influence of bitter principles in hops on the host selection behaviour of *Phorodon humuli* (SCHRANK), Homoptera, Aphididae.

Understanding the host – parasite relationship between hops *Humulus lupulus* L. and hop aphid *Phorodon humuli* (SCHRANK) is crucially important for the selection of aphid-resistant varieties. The influence of bitter principles of hops on aphids is not quite clear yet. In this context the effects of humulones and lupulones in hops on the host selection behaviour of aphids during feeding was examined by means of the EPG technique. The bitter acid content was determined by HPLC.

The organs of hop plants relevant for colonization by aphids (leaves, cones) differ significantly in their content of bitter substances. The leaves contained considerably more lupulone than humulone, whereas in the cones more humulone than lupulone was detected. The bitter substance content depended on the age of the examined tissue which in turn has consequences for the attractivity of the tissue for aphids. The individual behavioural patterns during host selection and feeding by the aphids are affected by alpha and beta acids. The amount of time the stylet is located outside the phloem increases noticeably with growing lupulone contents. The relevance of bitter substances for a particular behavioural pattern during host selection (time until 1<sup>st</sup> probing, duration of the 1<sup>st</sup> probing, frequency of probing, time outside phloem, duration of active sucking, etc.) is demonstrated and discussed on the basis of quantitative relations.

**Key Words:** bitter acid, extraction, HPLC, *Humulus lupulus*, *Phorodon humuli*, EPG

Dipl.-Agrarwiss. O. Kryvynets, Dr. F. Walker, Prof. Dr. C.P.W. Zebitz,  
Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim, 70593 Stuttgart, Deutschland.  
E-mail: kryvynetz@uni-hohenheim.de, walkerfk@uni-hohenheim.de, zebitz@uni-hohenheim.de

Erkenntnisse über das Wirt-Parasit-Verhältnis zwischen Hopfen *Humulus lupulus* L. und Hopfenblattlaus *Phorodon humuli* (SCHRANK) sind von entscheidender Bedeutung für die Selektion blattlausresistenter Sorten. Die Besiedelung des Wirts durch Blattläuse wird durch in den Pflanzen befindliche Substanzen erheblich beeinflusst (NAULT & STYER 1972; LEATH & al. 1974; KLINGAUF & al. 1978; KENDALL & al. 1980; SINGH 1980; POWELL & al. 1999; CAMPO & al. 2003). Die in dieser Hinsicht wichtigsten Bestandteile des Hopfens sind die Bittersäuren, welche für den Parasit die Funktion von Signalstoffen haben können. In frischem Hopfen liegen sie überwiegend in Form der alpha-Bittersäuren (Humulon, co-Humulon, ad-Humulon) und der beta-Bittersäuren (Lupulon, co-Lupulon, ad-Lupulon) vor (BACKLEH 2001). Die Gehalte an Bitterstoffen im Pflanzengewebe des Hopfens schwanken stark im Lauf der Vegetationsperiode. Da ein Insekt sich an quantitative wie auch qualitative Unterschiede im Nährstoffangebot anzupassen vermag, sollten sich Änderungen im Wirtswahlverhalten bei der Nahrungsaufnahme von Blattläusen durch die saisonbedingten Stoffwechselschwankungen der Pflanzen ergeben. Um diese Veränderungen im Verhalten der Aphiden zu erfassen, war es notwendig, die Verhaltensbeobachtungen im Verlauf der Vegetationsperiode mehrfach zu wiederholen. Die Methode der Wahl zur Untersuchung quantitativer Unterschiede im Verhalten bei der Nahrungsaufnahme von Aphiden ist der Electrical Penetration Graph (EPG) (MCLEAN & KINSEY 1964; SPILLER 1988; PRADO & TJALLINGH 1994; CALATAYUD & al. 2001; TJALLINGH 1978, 1988, 2006). In der vorliegenden Studie wurde diese Methode mit gleichzeitigen HPLC - Analysen der Bittersäurezusammensetzung des Gewebes relevanter Organe (Blätter und Zapfen) von Hopfen im Verlauf der Vegetationsperiode kombiniert.

## Material und Methoden

Die Gewinnung der Proben für die Analyse erfolgte anhand des Extraktionsverfahrens von CALLEMIEN & al. (2005). Dabei wurde mit dem frischen Pflanzenmaterial von Blättern und Zapfen des Hopfens gearbeitet. Für die Zwischenlagerung wurde das Material bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefroren. Die Proben für die HPLC-Bestimmung wurden nach ZHANG & al. (2004) vorbereitet. Anschließend wurde die HPLC-Analyse auf das Vorkommen von Bittersäuren durchgeführt. Dabei wurden Phosphatpuffer (1mM, pH 3,0) und 10% Acetonitril (ACN) in  $\text{H}_2\text{O}$  als Fließmittel eingesetzt. Als Säule wurde eine Phenomenex Synergi RP18 mit  $4\text{ }\mu\text{m}$  mittlerer Korngröße, 250 mm Länge und 4,6 mm innerem Durchmesser verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei 225 und 300 nm. Das Gradientenprogramm dauerte 32 Minuten bei einem Fluss von 0,75 ml/min. Nach jedem Programmdurchlauf wurde mit Acetonitril/Wasser 1:9 gespült. Die gefundenen Verbindungen wurden durch den Vergleich von Laufzeiten externer Standardlösungen aus bekannten Verbindungen identifiziert.

Die Beobachtung des Probiervhaltens der Blattläuse bei der Nahrungsaufnahme erfolgte mittels EPG-Technik (PRADO & TJALLINGH 1994; CALATAYUD & al. 2001; TJALLINGH 1978, 1988, 2006). Für die Untersuchungen wurden adulte Tiere von *Phorodon humuli* am Tag der letzten Häutung aus einer synchronisierten Dauerzucht des Institutes entnommen. Die Zuchtbedingungen waren:  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  Temperatur, 60-70 % RF und eine Photoperiode von 16:8 h (L:D). Die EPG-Aufnahmen wurden auf Blättern und Zapfen des Hopfens aus dem Freiland durchgeführt. Da Vorversuche keinen Unterschied zwischen den Ergebnissen von Messungen auf ganzen Pflanzen und auf einzelnen Pflanzenorganen ergeben hatten, wurden die EPG-Messungen auf abgeschnittenen Blättern und Zapfen vorgenommen. Diese wurden nach dem Abschneiden sofort in einem Wasserfläschchen ins EPG-Messlabor transportiert. Der Versuchsaufbau für die EPG-Aufnahme entspricht einem Stromkreis, in den das Blatt und die Blattläuse integriert sind. Das Blatt bzw. der Zapfen wurden über eine Kupferelektrode ( $\text{Ø } 1,5\text{ mm}$ ), die in einem Fläschchen mit Wasser positioniert war, mit dem Stromkreis verbunden. Die Verbindung der Aphide erfolgte über einen dünnen Goldfaden ( $\text{Ø } 20\text{ }\mu\text{m}$ ), der mit Leitsilber auf ihrem Abdomen festgeklebt wurde. Um die Messungen gegen äußere Felder abzuschirmen, wurden die Untersuchungen in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt. (JIANG & al. 1999). Die Dauer der EPG-Messung wurde auf Grund vorhergehender Versuche auf 2,5 Stunden je Variante festgesetzt.

Das Studium der Bittersäurezusammensetzung sowie des Wirtswahlverhaltens wurden gleichzeitig durchgeführt.

Die Resultate wurden mit einem t-Test bzw. dem Mann - Whitney U-Test auf Signifikanz ( $p < 0.05$ ) überprüft (Visual-XSel® 9.0/ DoE & Weibull). Die Ergebnisse wurden miteinander korreliert.

## Ergebnisse

Die Gehalte an Bittersäure im Blattgewebe des Hopfens zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den Beobachtungsterminen im Juni und im Juli 2006. Die Gehalte an Lupulon lagen im Juni im Bereich von  $132,05 - 287,28\text{ }\mu\text{g/g}$  FG und sind bis Mitte Juli um mehr als die Hälfte ( $58,01 - 128,25\text{ }\mu\text{g/g}$  FG) zurückgegangen (Abb. 1A). Humulone wurden nur im Juli in ganz geringer Menge ( $15,26 - 37,57\text{ }\mu\text{g/g}$  FG) gefunden. Die Gehalte von co- sowie n-ad-Lupulon wiesen zwischen den Beobachtungsterminen signifikante Unterschiede auf. Die Gesamtgehalte an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren im Juli waren nicht signifikant verschieden.

Das Zapfengewebe des Hopfens wies insgesamt sehr hohe Gehalte an Bittersäuren auf (Abb. 1B). So schwankten die Gehalte an Lupulon im Bereich von  $1744,48 - 3836,11\text{ }\mu\text{g/g}$  FG und unterschieden sich signifikant untereinander (co-, n-ad-, Gesamtgehalt). Die Humulone erreichten  $7345,09\text{ }\mu\text{g/g}$ . Dabei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen co- und n-ad-Derivaten sowie dem gesamten Humulon-Gehalt beobachtet. Insgesamt enthielten die Zapfen mehr Humulon als Lupulon.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die Bittersäuregehalte des Hopfens mit den EPG-Parametern korreliert. So unterscheiden sich z.B. die Korrelationen zwischen dem EPG-Parameter ‚Dauer des 1.Einstiches‘ und dem Gehalt an n-ad- bzw. co-Lupulon der Blätter nur geringfügig voneinander. Die Korrelationswerte liegen bei  $-0,507$  (n-ad-Lupulon) und  $-0,320$  (co-Lupulon) (Abb. 2A). Die Blattlaus führt hier längere Probestiche durch, wie es auf Wirtspflanzen der Fall ist (GEISSLER & al. 1981). Negative Korrelationen deuten in diesem Zusammenhang auf die Wirtseignung hin. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich unter den Korrelationen zwischen dem EPG-Parameter ‚Verweildauer im Phloem‘ und dem Gehalt an n-ad-Lupulon bzw. co-Lupulon (Abb. 2B). In Gegensatz dazu ist der Parameter ‚Zeit bis

1. Einstich' gleichermaßen stark mit der Höhe der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Säuregehalte im Zapfen korreliert (Abb. 3A). Gute Korrelationen der Substanzgehalte mit dem EPG-Parameter deuten auf sehr starke Beeinflussung des Verhaltens der Blattläuse hin. Je besser eine Pflanze als Wirt geeignet ist, um so schneller erfolgt der 1. Probestich (KLINGAUF 1971; NACKEN 1974; DJAFARIPOUR 1976; GEISLER & al. 1981). Die Tiere reagierten gleichsinnig auf n-ad- bzw. co-Derivate von Lupulon (Abb. 3B).

**Zusammenfassend** lässt sich sagen, dass einzelne

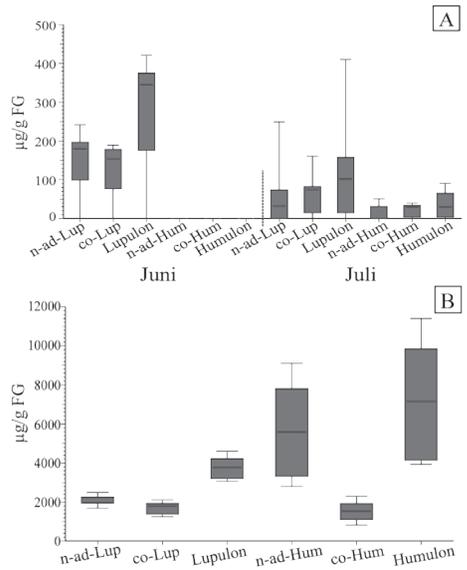


Abb.1: Gehalt der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren im Blattgewebe, Juni-Juli (A); im Zapfengewebe, August (B).

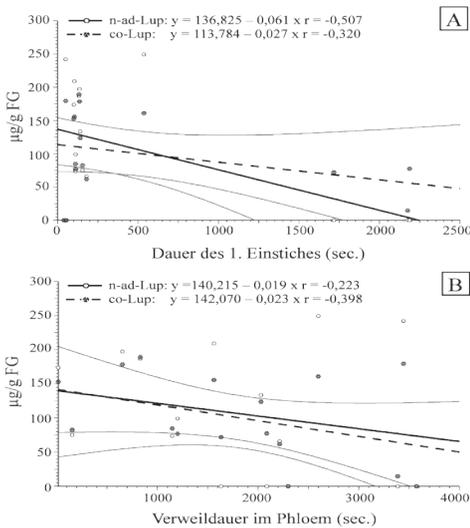


Abb.2: Korrelation zwischen den n-ad- und co-Lupulon-Gehalten von Hopfenblättern und dem EPG-Parameter 'Dauer des 1. Einstiches' (A); 'Verweildauer im Phloem' (B).

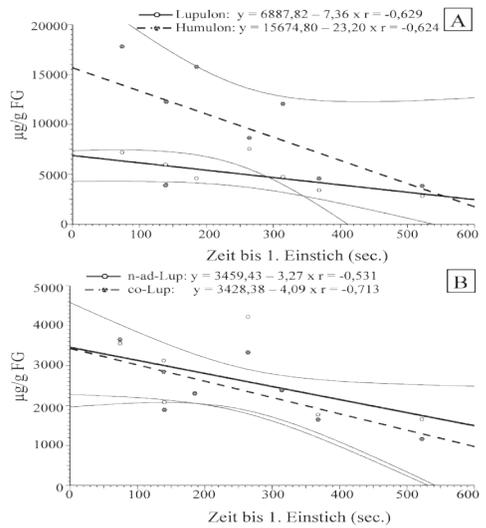


Abb.3: Korrelation zwischen dem EPG-Parameter, 'Zeit bis 1. Einstich' und den Gehalten von Hopfenzapfen an Humulon bzw. Lupulon (A); n-ad- bzw. co-Lupulon (B).

EPG-Parameter mit den Konzentrationen der Bitterstoffe korreliert waren und die Bitterstoffe das Wirtswahlverhalten von *Phorodon humuli* beeinflussen können.

*Phorodon humuli* kann offensichtlich zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren und darüber hinaus verschiedenen Seitenketten (R) differenzieren. Die schwache Korrelation der EPG-Parameter mit den Bitterstoffen legt den Einfluss weiterer Faktoren (z.B. Gewebehärte, primäre Inhaltsstoffe) auf das Wirtswahlverhalten nahe.

In begrenztem Umfang müssten sich die Bitterstoffe für ein Screening auf Resistenz gegen *Phorodon humuli* verwenden lassen.

**Literatur**

- CALATAYUD, P.A., SELIGMANN, C.D., POLANIA, M.A., BELLOTTI, A.C. (2001): Influence of parasitism by encyrtid parasitoids on the feeding behaviour of the cassava mealybug *Phenacoccus herreni*. – Entomol. Exp. Appl. **98**: 271-278.
- CALLEMIEN, D., JERKOVIC, V., ROZENBERG, R., COLLIN, S. (2005): Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: Optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. – J. Agric. Food Chem. **53**: 424-429.
- DEL CAMPO, M. L., VIA, S., CAILLAUD, C.M. (2003): Recognition of host-specific chemical stimulants in two sympatric host races of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. – Ecolog. Entomol. **28**: 405-412.
- DJAFARIPOUR, M. (1976): Wanderungs-, Probe- und Seitenwechsel – Verhalten bei der Wirtswahl von zwei Aphiden – Arten, *Acyrtosiphon pisum* (HARR.) und *Megoura vicia* (BUCKT.), und einer Coccide, *Saissetia oleae* (BERN.). – Diss. Univ. Bonn. 121 pp.
- GEISSLER, K., LEHMANN, W., KARL, E. (1981): Methoden zur Ermittlung des Resistenzverhaltens von Kulturpflanzen gegen Befall durch Blattläuse (Aphidina). – Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz **17**: 203-210.
- JIANG, Y.X., LEI, H., COLLAR, J.L., MARTIN, B., MUNIZ, M., FERERES, A. (1999): Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. – J. Econom. Entomol. **92**: 357-366.
- KENDALL, D.A., SMITH, B.D., HAZELL, S., MATHIAS, L., HAMMOCK, P., CHINN, N., MARCH, C., YOUNG, J., SMITH, T.A., BEST, G.R., MILES, D.M. (1980): Cereal aphids and spread of barley yellow dwarf virus (BYDV). – Long Ashton Rep.: 123-124.
- KLINGAU, F. (1971): Die Wirkung des Glukosids Phlorizin auf das Wirtswahlverhalten von *Rhopalosiphum insertum* WALK. und *Aphis pomi* DE GEER (Homoptera: Aphididae). – Z. Ang. Entomol. **68**: 41-55.
- KLINGAU, F., NOECKER-WENZEL, K., ROETTGER, U. (1978): Die Rolle peripherer Pflanzenwachse für den Befall durch phytophage Insekten. – Z. Pflanzenkrankh. und Pflanzenschutz **85**: 228-237.
- LEATH, K.T., BERRANG, B., MARCARIAN, V., HANSON, C.H. (1974): Biological activities of saponin components from Du Puits and Lahontan alfalfa. – Entomol. Exp. Appl. **17**: 410-424.
- MCLEAN, D.L., KINSEY, M. G. (1964): A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. – Nature, Lond. **202**: 1358-1359.
- NACKEN, B. (1974): Laboruntersuchungen über den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Wirtswahlverhalten der Schwarzen Bohnenblattlaus, *Aphis fabae* SCOP., unter besonderer Berücksichtigung geflügelter Tiere. – Diss. Univ. Bonn. 90 pp.
- NAULT, L.R., STYER, W.E. (1972): Effects of sinigrin on host selection by aphids. – Entomol. Exp. Appl. **15**: 423-427.
- POWELL, G., MANIAR, S.P., PICKETT, J.A., HARDIE, J. (1999): Aphid responses to non-host epicuticular lipids. – Entomol. Exp. Appl. **91**: 115-123.
- PRADO, E., TJALLINGII, W. F. (1994): Aphid activities during sieve element punctures. – Entomol. Exp. Appl. **72**: 157-165.
- SINGH, S.R. (1980): Environmental factors influencing the magnitude and expression of resistance. – in: MAXWELL, F.G. & P.R. JENNINGS: Breeding plants resistant to insects. – John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto: 87-113.
- SPILLER, N.J. (1988): Electronic recording of plant penetration by the cereal aphids *Rhopalosiphum padi* and *Metopolophium dirhodum* on resistant and susceptible wheat seedlings. – Ann. Appl. Biol. **112**: 471-478.
- TJALLINGII, W. F. (1978): Electronic recording of penetration behaviour by aphids. – Entomol. Exp. Appl. **24**: 721-730.
- TJALLINGII, W.F. (1988): Electrical recording of stylet penetration activities. – in: MINKS, A.K. & P. HARREWIJN: Aphids, their biology, natural enemies and control. – Elsevier, Amsterdam. Vol. B: 95-108.
- TJALLINGII, W. F. (2006): Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. – J. Exper. Botany **57**: 739-745.
- ZHANG, X., LIANG, X., XIAO, H., XU, Q. (2004): Direct characterization of bitter acids in a crude hop extract by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. – J. Am. Soc. Mass Spectrom. **15**: 180-187.