

Jiří Pozděna, Milan Čech, Ctibor Blatný:

Studie o antigenních vlastnostech viru kadeřavosti chmele.

(Z Biologického ústavu ČSAV, oddělení fytopathologie v Praze-Dejvicích)

Chmel je již po staletí v našich krajinách množěn vegetativně. Při tomto způsobu množení dochází nutně ve velké míře k rozšíření virových chorob, tím spíše, že chmel je pěstován stále v téže oblasti a po mnoho let na přibližně stejných stanovištích. Při obnově chmelnic a při šlechtění je nutné, aby byly pěstovány jen rostliny zcela zdravé. Proto jsme se pokusili o serologickou diagnostiku i rostlin zdánlivě zdravých, neboť symptomatika virových chorob chmele je obtížná. Naše chmelnice jsou prakticky nyní nejvíce ohroženy dvěma virovými chorobami a to nakažlivou neplodností a kadeřavostí. Kadeřavost, třebaže dnes je — díky zrušení těžce kadeřavých chmelnic — zdánlivě na ústupu, svojí latentní a pololatenční formou (která také jen občas se zřetelně projeví) zůstává i nadále skrytým a hrožícím nebezpečím pro naše chmelnice, neméně než nakažlivá neplodnost.

Svou práci jsme zaměřili na virus kadeřavosti chmele. Ve světové literatuře je jediná zmínka o serologii virových chorob chmele v Ryžkově knize „Fytopatogenní virusy“. Virové ochuravění chmele nazývané autorkou K. S. Rachlisovou chlorosa chmele, možno podle Ryžkova nejspíše přiřadit ke kadeřavosti. K. S. Rachlisové se podařilo serologicky zjistit i latentní formy tohoto ochuravění. (Jde o rukopisné sdělení, cit. v knize V. L. Ryžkova [1946].) Naše kadeřavost chmele nemůže být symptomatologicky identifikována s jiným virovým onemocněním chmele. Je však nepochybně velmi příbuzná, druhově zajisté totožná, kmenově však pravděpodobně odlišná s *Humulus virus* I (Smith 1937), působícím anglickou nemoc chmele nettle-head. Naše kadeřavost je však totožná s kadeřavostí chmele pěstovaného na polském a sovětském území (kurčavost).

Práce v roce 1952

V červenci 1952 jsme předběžně zjišťovali, zda virus kadeřavosti chmele má antigenní vlastnosti. K imunisaci jsme použili vždy čerstvé šťávy získané z chmelných rostlin silně postižených kadeřavostí z Pnětluk. Štáva byla odstředěním vyčištěna. Pigmenty a chlorofyl odstraněny vytřepáním s chloroformem. Bílkoviny pak byly sráženy síranem amonným. Po dialýse takto získaný antigen vstříkovan králíkům. Imunisace provedena na 4 králících během 14 dnů, ježto se jednalo jen o předběžný pokus. První den vstříknuto 1,5 ccm antigenu, třetí den 2,5 ccm, 7. den 3 ccm, 8. a 9. den po 3,5 ccm, 13. a 14. den po 4 ccm antigenu každému pokusnému zvířeti. Za 5 dní po skončení imunisace byli králíci vykrváčeni. Získaná sera zřetelně reagovala se šťavou z chmelů nemocných kadeřavostí, zatím co se šťavou z rostlin zdravých nereagovala vůbec. Bylo užito kapkové metody a precipitace pozorována v mikroskopu za použití temného pole (zvětšení 60krát). Tím jsme dokázali, že kadeřavost

chmele má antigenní vlastnosti. Rovněž bylo potvrzeno, že kadeřavost chmele je virovým onemocněním. Na základě této předběžné studie mohli jsme teprve přikročit k zevrubnému studiu antigenních vlastností kadeřavosti chmele a k možnostem využití těchto vlastností v praxi.

Práce v roce 1953

V dalších pokusech jsme se zabývali možnostmi mechanického přenosu kadeřavosti chmele. Podle pokusů vykonaných v minulých letech ve Výzkumném ústavu chmelařském v Žatci nepodařilo se dosud mechanickým způsobem (vetřením šťávy z nemocné rostliny do pletiva rostliny zdravé, poraněné předtím jemným karborundovým práškem) toto ochuravění přenést (Blažina, ústní sdělení). V r. 1953 jsme se pokusili mechanicky infikovat kadeřavostí 5 semenáčů chmele v Praze-Dejvicích. Nepoužili jsme však šťávy z nemocné rostliny přímo, nýbrž infekce jsme provedli vyčištěným preparátem. Získali jsme jej purifikací a krystalisací virové bílkoviny z chmelů nemocných kadeřavostí metodou podle Goroďské (1950). Nemocné rozmělněné listy byly dvakrát extrahovány 0,5 M fosfátovým pufrům (pH 7,2). Extrakt byl sfiltrován a do 100 ml filtrátu přidán 1 ml 0,2% roztok akridinového přípravku Rivanolu. Po 24 hod. se roztok nad usazeninou dekantoval a sediment se přenesl do dialyzační blány a dialysoval 14 dní. Poté se roztok z blány odfiltroval od nerozpustných sraženin a virová bílkovina se z průzračného, ambrově zbarveného roztoku vysrážela opatrným přidáváním síranu amonného. Stáním za aseptických podmínek byl získán preparát krystalického charakteru, kterým byly provedeny mechanické infekce. Infekce provedeny metodou Rawlinson-Tompkinsonovou. Do karborundem poraněného pokožkového pletiva habituálně zdravých semenáčů byla vetřena část virového preparátu a zakápnuta vodou. Očkováno koncem října 1953 na 1. listě třetího patra. Příznaky ochuravění chmele kadeřavostí se i při roubování podle většího počtu literárních zpráv projevují z počátku jen lehce, při čemž symptomy mohou být i nezřetelné. Inkubační doba od infekce do projevení příznaků pak kolísá od několika měsíců do několika let.

Během roku 1953, kdy byly infekce provedeny, nevykazovaly infikované rostliny žádných příznaků. Teprve v r. 1954 se počaly na 3 rostlinách objevovat typické příznaky kadeřavosti, jedna rostlina byla bez příznaků a u jedné byly příznaky slabé. Počátkem září 1954 byla ze všech infikovaných rostlin vytlačena šťáva a provedeny s ní serologické precipitační zkoušky (o přípravě sera viz další stať). Šťáva z rostlin, projevujících charakteristické příznaky, typicky reagovala se serem proti kadeřavosti chmele. Příznaky, které se na těchto rostlinách projevovaly, byly pro kadeřavost charakteristické a to: mohutné větvení a značná délka plodonosných pazochů, zesvětlení pletiva mezi žilkami druhého řádu (typ t. zv. skelné kadeřavosti), až lodičkovitá ohnutí okrajů listů dovnitř a později nekrotické odumírání pletiva mezi žilkami druhého řádu, z počátku ve skvrnách, později splývající v pruhy; světlejší barva listů a neuzavírání hlávek byly rovněž charakteristickým příznakem přítomnosti kadeřavosti v rostlině, tak jako větší citlivost rostlin vůči nikotin obsahujícímu postřiku proti mšicím a odolnost proti peronospoře. Šťáva z rostliny, jejíž příznaky byly velmi slabé, vykazovala střední precipitaci a šťáva z rostliny neprojevující příznaky nereagovala vůbec. Tím byl podán serologický důkaz toho, že virová kadeřavost chmele za určitých podmínek je mechanicky přenosná a že takto přenesená kadeřavost se dá serologicky dokázat.

Příprava antigenu.

Z předcházejících pokusů o mechanický přenos viru kadeřavosti chmele lze tedy soudit, že přímý přenos šťávou je bezpochyby znemožněn některou součástí rostlinné šťávy, způsobující inaktivaci nebo denaturaci listových bílkovin. Jistou obdobu lze nalézt v pracích Balda, Samuela (1934), Besta, Samuela (1936) o bronzovitosti rajčat (*Lycopersicum virus 3*). Tito autoři a později Best (1939) při téže virové chorobě, dále Fulton (1949) při studiu pruhovitosti tabáku (*Nicotiana virus 8*), Einsworth, Ogilvie (1939) a Hougas (1951) zjistili, že šťáva připravená buď v bezkyslíkové atmosféře anebo s přidavkem různých redukčních činidel (kyselý siřičitan sodný, siřník sodný, cystein, glutathion, thioglykolát sodný, kyselina askorbová, atd.) podržuje téměř celou svou původní infektivitu. Inaktivace nebo denaturace virových bílkovin in vitro způsobují podle Thunga a Wanta (1951), Bawdena a Kleczkowského (1945), Hirtha (1951), Cornueta, Gendrona, Limassetta, Martina (1953) hlavně taniny nebo i oxydační enzymatické systémy. Lze tedy říci, že při volbě metody přípravy antigenů je nutné brát v úvahu nejen citlivost dané virové bílkoviny vůči jednotlivým operacím při preparaci, ale i povahu hostitelské rostliny, jak co do fáze ontogenetického vývoje, tak co do složení jejích šťáv. Kvalitativní zkouška s okyseleným roztokem chloridu železitého potvrdila známou skutečnost, že šťáva chmele obsahuje značné množství tříslovin. Proto jsme se v našem případě pokusili použít antidenaturační extrakce popsané Cornuetem a spol. (1953), kteří ji použili při izolaci mosaikového viru jiřin (*Dahlia virus 1*). Rozemílali listy za přidavku roztoku nikotinsulfátu (10 %) s NaHSO_3 (0,3 %) a KCN (0,3 %). Podle zmíněných autorů se nikotinsulfátem denaturují taniny, kyselý siřičitan udržuje redukční prostředí ve šťávě a kyanid (o jehož účinku se blíže nezmiňují) pravděpodobně má blokovat oxydační enzymatické systémy a katalytický účinek stopových prvků. Postup přípravy surové šťávy jsme pozměnili v tom, že jsme při rozemílání chmelových listů použili 0,5 M fosfátového ústoje o pH 7,2 obsahujícího 2 % $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 0,3 % KCN, a to proto, aby bylo možno dokonaleji extrahovat listové bílkoviny spolu s tříslovinami. Třísloviny jsme denaturovali teprve v surové šťávě buď přidavkem nikotinsulfátu nebo kofeinu (Hirth, Rybak, 1949). Takto připravená šťáva byla po odstředění téměř čirá, barvy sytě hnědé. Dalším zpracováním, t. j. srážením síranem amonným a okyselením na pH 4,7 jsme se snažili odstranit co nejvíce normálních bílkovinných složek rostlinné šťávy.

Pracovní postup :

Během celé preparace jsme se snažili udržet teplotu preparátů pod 10 °C. Nemocné rostliny byly vybrány na chmelnici č. 52 v Pnětlukách, v Žatecké oblasti. Čerstvé listy z rostlin napadených kadeřavostí (nebo listy, jež byly uloženy v uzavřeném papírovém pytli přes noc při 0 °C) jsme rozemleli na masovém mlýnku za neustálého přidávání ochlazeného roztoku 0,5 M fosfátového ústoje o pH 7,2 s 2 % $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (na 1 kg listů asi 500 ml roztoku). Drť jsme při mletí namačkávali do podložené nádoby, aby se vypudily hrubé vzduchové bubliny. Po rozemletí jsme vylišovali šťávu v hydraulickém lisu, koláč napojili 400 ml výše uvedeného ústojného roztoku a znovu vylišovali. Vzniklo tak

celkem asi 1 100—1 200 ml šťávy. K surové šťávě jsme přidali 10 ml 10% roztoku nikotinsulfátu nebo 100 ml 1% roztoku hydrochloridu kofeinu a kalná, olivově zelená šťáva byla zmrazena přes noc na -10 až -15°C . Po roztání jsme šťávu odstředili (15 min. při 3 000 . g), odstranili zelenou sraženinu a k oddělené čiré kapalině, sytě hnědé barvy, jsme přidali 350 g síranu amonného na 1 l. Vzniklou sraženinu jsme odstředili (20 min. při 3 000 . g) a převrstvující roztok se odlil a odložil. Sraženinu jsme extrahovali čtyřikrát destilovanou vodou tak, že objem spojených extraktů činil asi 250 ml. Síranové srážení jsme opakovali až již převrstvující roztok byl jen nahnědlý (obvyčejně stačilo trojí srážení). Po posledním srážení byla sraženina přenesena s malým množstvím vody do dialysačního sáčku a dialysována 12 hod. proti tekoucí vodě. Obsah dialysačního sáčku byl pak odstředěn, zbylá sraženina extrahována vodou a extrakt přidán k odlité převrstvující kapalině. V tomto roztoku jsme upravili pH na 4,7 přikapáváním 1 g kyseliny solné za intensivního míchání a po 20. min. jsme vzniklou sraženinu odstředili (10 min. při 3 000 . g) a odstranili. Ve zbývajícím roztoku jsme přidavkem práškovitého Na_2HPO_4 upravili pH na 7 a opakovali jsme síranové srážení a extrakci. Při druhém okyselení na pH 4,7 vzniklo již jen malé množství sraženiny. Po jejím opětném odstředění a odstranění jsme kapalinu zneutralisovali Na_2HPO_4 a síranovým přesrážením a dialysou jsme bílkoviny zkoncentrovali z 50 ml na objem 25 ml. Ambrově hnědá kapalina, obsahující v průměru 0,6 % sušiny, byla dále dialysována 12 hod. proti fyziologickému roztoku, přefiltrována jenským bakteriálním filtrem G5 na 3 a vpravena sterilně do ampulek, které byly uskladněny v lednici při -20°C . Nedoporučujeme filtrovat konečný produkt přes Seitzův bakteriální filtr, neboť kapalina snadno pění a dochází tak k denaturaci.

Z p ů s o b i m u n i s a c e, p ř í p r a v a a u c h o v á n í s e r a.

V srpnu 1954 byly takto připraveným antigenem imunisováni králíci. Pokus proveden celkem na 3 zvířatech. Králíci byli velcí, dobře živení. Po celou dobu imunisace byli v dobrém zdravotním stavu, úbytky na váze pozorovány nebyly. Imunisace prováděna intraperitoneálně tak, že bylo sice vstříkováno menší množství antigenu než je obvyklé, ale v častějších intervalech. Z počátku bylo vstříkováno 3 ml antigenu každému zvířeti a dávka postupně zvyšována až na 5 ml. Intervaly mezi jednotlivými injekcemi byly 3—5 dnů. Prvního dne vstříknuto 3 ml antigenu, 5. a 9. dne od počátku imunisace vstříknuto 3,5 ml, 14. dne 5 ml, 17. dne byla pokusně odebrána krev k předběžným precipitačním zkouškám. (Z každého zvířete asi 5 ml krve. Odebraná krev nebyla nahrazena fyziologickým roztokem.) Precipitace byly slabé, proto 18. dne pokračováno v imunisaci a vstříknuto 5 ml antigenu, podobně jako 21. a 24. dne. Tím byla imunisace skončena a za týden po skončení byli králíci vykrváčeni. Poslední den před krvácením nebyli krmeni.

Krev ponechána v thermostatu 2 hod. (při teplotě 37°C) načež přenesena do lednice (teplota $+3^{\circ}\text{C}$) a chována při teplotě do druhého dne. Potom krevní koláč oddělen a serum odstředěno (1 600 . g po dobu 15 min.). Část odstředěného sera byla konzervována mrazovou sublimací (pro práci v příštím roce) a část byla vpravena do ampulek o maximálním objemu 3 ml. Ampulky uloženy v lednici při teplotě -10°C , takže sera byla uchovávána ve zmrzlém stavu. Před precipitací byla pozvolna rozehrívána v thermostatu až na teplotu 30°C . K precipitaci užito vždy serum pouze z jedné ampulky. Rozehráté serum

bylo užíváno ihned k precipitacím. Nikdy nebylo znovu zmražováno a zbytek byl odstraněn. Tento způsob uchování sera v malém množství se nám velmi osvědčil, neboť není třeba při něm užívat různých konzervačních látek a sera si zachovala po dlouhou dobu své precipitační vlastnosti.

Precipitační zkoušky se sery proti kadeřavosti chmele v r. 1954

Sera získaná v r. 1954 byla podrobena precipitačním zkouškám se šťávami zdravých i nemocných chmelů různé provenience. Užito šťáv z chmele pocházejícího z Pnětluk na Žatecku, nemocného kadeřavostí. Tento materiál pocházel z téže chmelnice, ze které byl odebírán chmel k přípravě antigenů. Kromě toho byly pro kontrolu precipitovány šťávy z chmelů pěstovaných v Praze-Dejvicích a to jak ze starších rostlin, tak mladých semenáčů. Chmele byly odebrány ve stejný den a uloženy do rána v lednici. Druhý den z nich vylišována šťáva a odstředěna. K takto vyčištěné šťávě přidán fyziologický roztok jako elektrolyt v poměru 1 : 1. Precipitace prováděna na podložním mikroskopickém sklíčku kapkovou metodou; ke kapce zkoušené šťávy přidána kapka sera, promícháno skleněnou tyčinkou a po 10—15 min. pozorováno v mikroskopu v temném poli při zvětšení 60krát (okulár 6, objektiv 10.) Pro kontrolu pozorována před precipitací i po precipitaci samotná sera a samotné šťávy, aby byla zaručena správnost diagnózy.

Šťávy ani sera nebylo třeba vysycovat, neboť antigen užitý k imunisaci obsahoval pouze virové bílkoviny. Přehled precipitací je patrný z tabulky.

Zkoušená šťáva	Serum proti kadeřavosti chmele č.		
	362	532	509
chmele (♀) onemocnělého kadeřavostí z Pnětluk	+++	+++	+++
zdravého chmele kl. 31 (♀), rostlina č. 1 z Karlovky (Praha-Dejvice)	—	—	—
zdravého chmele kl. 31 (♀), rostlina č. 2 z Prahy-Dejvic	—	—	—
semenáče (♂) z r. 1953 rostlina č. 1 z Prahy-Dejvic	—	—	—
semenáče (♂) z r. 1953 rostlina č. 2 z Prahy-Dejvic	+	+	+
zdravého chmele kl. 72 (♀) rostlina č. 3 z Prahy-Dejvic	—	—	—

Bylo znovu dokázáno, že kadeřavost chmele má antigenní vlastnosti. Velmi slabou precipitaci u šťávy ze semenáče z r. 1953 rostl. č. 2 z Prahy-Dejvic lze snad vysvětlit tím, že rostlina je slabě napadena buď kadeřavostí nebo i některým jiným virem, který reaguje se serem proti kadeřavosti, jak ukážeme dále.

Sera proti kadeřavosti byla dále precipitována se šťávami z chmelů napadených jinými virosami. Za tím účelem byly dovezeny z Výzkumného ústavu chmelařského v Žatci rostliny chmele napadené různými virovými chorobami. Vedle kadeřavosti nejnebezpečnější virové onemocnění je nakažlivá neplodnost chmele. Projevuje se asymetrickými zprohýbanými listy, jejichž laloky se překrývají. Řapík virových listů je kratší, silný, zakřivený, takže listy „kryjí révu“. Žilky jsou zakřivené, pazochy zasychají, květ se tvoří jen v horních částech révy. Hlávky mají nepravidelný tvar, špatně se na koncích uzavírají a bývají na lupulin chudší.

Dále byla dovezena rostlina onemocnělá virovou mosaikou. Rostliny touto chorobou onemocnělé dávají podstatně menší výnos, často bývají zakrslé, hlávky jsou podřadné jakosti a rostliny předčasně hynou.

K serologickému vyšetření určené chmele nemocné nakažlivou neplodností byly touto chorobou napadeny v různé intenzitě. Od prvních objevujících se příznaků (označeno jako „síla 1“) až po nejtěžší příznaky (označeno jako „síla 5“). Pro kontrolu byly vzaty též chmele zdravé. Precipitace provedeny následující den dvěma sery. Šťávy ani sera nebyly vysycovány, pouze byl ke šťávě přidán fyziologický roztok jako elektrolyt. Precipitováno opět kapkovou metodou za použití temného pole. Kontroly samotných ser a samotných šťáv před precipitací byly negativní. Výsledek je patrný z tabulky.

Zkoušená šťáva	Serum proti kadeřavosti chmele č.	
	509	532
chmele napadeného nakažlivou neplodností ze Žatce — síla 1	—	—
chmele napadeného nakažlivou neplodností ze Žatce — síla 2	—	—
chmele napadeného nakažlivou neplodností ze Žatce — síla 3	—	—
chmele napadeného nakažlivou neplodností ze Žatce — síla 4	—	—
chmele napadeného nakažlivou neplodností ze Žatce — síla 5	—	—
chmele onemocnělého kadeřavostí přenesené semenem — původ Žatec	+++	++
chmele kl. 72 ze Žatce napadeného mosaikou	+++	++
chmele kl. 126 ze Žatce, zdravý	+	—
ze zdravého semenáče chmele ze Žatce	—	—

Těmito precipitačními zkouškami bylo dokázáno, že serum proti kadeřavosti chmele nereaguje se šťávou z chmelů, napadených nakažlivou neplodností v jakémkoli stupni infekce. Podle toho virus deformace listů, který je podle Blattného základní složkou působící nakažlivou neplodnost, bude vyžadovat

vlastního diagnostického sera a proto lze tento virus považovati za virus vzdálený od viru kadeřavosti chmele.

Positivní reakce u štáv z chmelů onemocnělých kadeřavostí ze Žatce znovu potvrzují serologický důkaz kadeřavosti. Zároveň byla tím pozitivně jako správná ověřena práce Ing. Kříže z Výzkumného ústavu chmelařského v Žatci o přenosu kadeřavosti chmele semenem.

Serum proti kadeřavosti chmele při precipitačních zkouškách reaguje však pozitivně se štávou z chmele onemocnělého mosaikou. Podle našich pokusů nemůžeme dosud říci, zda virus mosaiky chmele je identický s virem kadeřavosti, nebo zda jde o jiný kmen nebo virus úzce příbuzný.

V další práci jsme se zabývali bezpečným zjištěním kadeřavosti u rostlin latentně nemocných. Tato otázka má prvořadý význam zejména pro šlechtitele. Včasným rozpoznáním kadeřavosti vyloučí se ihned nemocní jedinci, se kterými by se jinak pracovalo ještě několik let.

K pokusům jsme použili semenáčů ze Žatce. Rostliny vznikly pohlavním křížením jednak jedinců nemocných kadeřavostí a nakažlivou neplodností navzájem mezi sebou, jednak křížením s jedinci zdravými. Projevovaly buď různé příznaky onemocnění nebo byly i bez příznaků. Kromě toho jsme použili rostliny, u nichž nakažlivá neplodnost byla přenesena semenem s projevem typických příznaků nakažlivé neplodnosti a rostlin pocházejících z pokusů Ing. Kříže o přenosu kadeřavosti chmele půdou. Rostliny, u nichž byl proveden přenos kadeřavosti chmele půdou — při čemž semenáče chmele rostly v půdě odebrané od kadeřavých rostlin prvním rokem — nevykazovaly žádné příznaky ani habituálně (ústní sdělení Ing. Kříže). Tím ovšem nechceme říci, že by k projevení příznaků ochuravění nemohlo dojít v pozdějších letech, už též proto, že nové poznatky o adsorbovaných virech činí možnost nákazy rostlin viry z půdy přistupnější než se dříve za to mělo. Štáva k precipitacím připravena jako v předešlých pokusech. Precipitace pozorovány v 60násobném zvětšení za použití temného pole. Výsledky vysvítají z tabulky.

Zkoušená štáva :	Serum proti kadeřavosti chmele
Semenáče chmele, vzniklého křížením jedince nemocného kadeřavostí (♀) s jedincem onemocnělým nakažlivou neplodností (♂). Semenáče projevuje příznaky nakažlivé neplodnosti	—
Semenáče vzniklého křížením zdravého jedince (♂) s jedincem onemocnělým kadeřavostí (♀). Rostliny neprojevují žádných příznaků onemocnění	+
Semenáče vzniklého křížením jedince onemocnělého kadeřavostí (♀) s jedincem onemocnělým nakažlivou neplodností (♂). Rostlina neprojevuje žádné příznaky onemocnění	+++
Semenáče vzniklého křížením zdravého jedince (♀) s jedincem onemocnělým nakažlivou neplodností (♂). Rostlina neprojevuje žádných příznaků onemocnění	—
Rostliny z pokusu Ing. Kříže o přenos kadeřavosti chmele půdou. Neprojevuje žádných příznaků onemocnění	—
Rostliny s typickými příznaky nakažlivé neplodnosti. Choroba přenesena semenem	—

Kontrola samotných šťáv a ser byla před precipitací i po ní negativní.

Těmito pokusy byla znovu dokázána nebezpečnost virové kadeřavosti. Virus kadeřavosti se nalézá i v rostlinách, které neprojevují dosud příznaky kadeřavosti. Považujeme za možné, že to byl právě virus kadeřavosti, latentně obsažený v rostlinách nemocných mosaikou, který způsobil pozitivní precipitaci při serologickém zkoumání šťávy mosaikou ochuravělé rostliny chmele. Serologicky lze podle těchto prací zjistit i latentní ochuravění kadeřavostí. Tím se potvrzuje práce Rachlisové a našemu šlechtění a množení chmele se dává další účinný prostředek k zajištění dobrého zdravotního stavu elitního sadbového materiálu.

Pokusy Ing. Kříže, že v prvním roce styku chmelového semenáče s půdou odebranou od kadeřavostí nemocných rostlin rostliny semenáče chmele neochuravějí, jsou naší prací potvrzeny.

Diskuse

Chmel (*Humulus lupulus*) je napadán řadou virových chorob, které značně ohrožují úspěšné pěstování této hospodářsky významné rostliny. Mezi nejnebezpečnější virové ochuravění patří kadeřavost chmele, projevující se slabším vzrůstem a při silném napadení i předčasným uhynutím. Těžce ochuravělé rostliny ztrácejí schopnost vinutí. Pazochy jsou z počátku dlouhé, řídko osazeny osýpkou. U těžkých případů a při pokročilém ochuravění jsou pazochy zakrslé, bez květu. List bývá znetvořen, lodičkovitě dovnitř prohnut, mnohdy i žlutavě zbarven. Pletivo mezi žilkami druhého řádu zesvětluje a nekrotisuje. Žilkatina je bělavá a vystouplá na rubu z plochy čepele. Množství květů je vždy menší než u zdravých rostlin. Hlávky bývají menší, špatně se uzavírají a jsou chudší na lupulin. Celkový výnos z nemocných keřů je malý a hlávky jsou podřadné jakosti.

V naší práci jsme se snažili serologickou metodou přispět k bližšímu poznání této choroby a k odhalení rostlin, které jsou kadeřavostí napadeny, aniž by z počátku projevovaly příznaky. To se nám podařilo serologickou precipitační metodou. Virus kadeřavosti chmele má antigenní vlastnosti. Předběžně jsme tento fakt zjistili v r. 1952 a znovu v r. 1954. Serum proti kadeřavosti chmele nereaguje se šťávami ze zdravých rostlin, ať pocházejí odkudkoliv a ať jsou jakkoliv staré. Popsané imunisační pokusy z r. 1952, při nichž serum reagovalo jen se šťávou nemocných rostlin a pozitivní pokusy o mechanický přenos kadeřavosti vyčištěným preparátem v r. 1953 je možné objasnit takto: Primárním faktorem, jenž asi nejvíce ztěžuje experimentální práci s virem kadeřavosti chmele, je vysoký obsah tříslovin a i ostatních látek přítomných ve vakuolární šťávě. Krátce po destrukci rostlinných buněk při mletí, kdy vakuolární šťáva přijde ve styk s ostatními složkami buněk, dochází téměř k úplné denaturaci rozpustných normálních rostlinných bílkovin, jež jsou velmi citlivé vůči fyzikálním a chemickým vlivům. Při odstředění tyto denaturované bílkoviny se odstraní z roztoku spolu s chloroplasty a buněčnými stěnami. Virová bílkovina je poněkud odolnější vůči ostatním složkám surové šťávy, takže po určitou dobu je ve šťávě přítomna ve vratně inaktivovaném stavu (ač vlivem pomaleji probíhajících enzymatických pochodů dojde postupně i k její destrukci) a tedy je schopná pro vstříknutí vyvolat tvorbu specifických protilátek v krvi králíků a po oddělení inhibitorů může po mechanickém vtření do zdravé chmelové rostliny způsobit její onemocnění. Rozkladných reakcí

se — ať již přímo nebo nepřímo — mohou účastnit též oxydativní enzymy, jak se zmiňuje o nich Cornuet a spol. (1953). Tento destrukční účinek konečně vplývá z Oparinovy theorie o dvojí funkci enzymů. Zatím co v neporušených buňkách je enzymatická synthésa a štěpení vyvážena, v rozmělněné tkáni a z ní získané šťávě dochází k posunutí této rovnováhy ve směru enzymatického štěpení a tedy i k destrukci bílkovinných složek nepreparované šťávy. Proto jsme přistoupili v r. 1954 k takovému preparativnímu postupu, jenž by alespoň zpomalil výše uvedené destruktivní vlivy. Za určitých předpokladů lze tedy i kadeřavost chmele přenést mechanicky. Tato mechanicky přenesená kadeřavost dá se dokázat serologicky.

Serum proti kadeřavosti chmele nereaguje se šťávami rostlin postižených jinou nebezpečnou virosou — nakažlivou neplodností. Tím bylo dokázáno, že virus nakažlivé neplodnosti je odlišným virem.

Serum proti kadeřavosti chmele reagovalo však se šťávou rostliny napadené mosaikou. To by nasvědčovalo tomu, že virus mosaiky chmele je příbuzný viru kadeřavosti, nebo že vyšetřovaná rostlina byla latentně ochuravělá též kadeřavostí.

Serologicky jako správné byly ověřeny práce o přenosu kadeřavosti semenem na potomstvo (B l a t t n ý, O s v a l d, 1954, K ř í ž, ústní sdělení). Pomocí serologické metody podařilo se odkrýt i latentní formy kadeřavosti u rostlin, které dosud neprojevovaly příznaky. U semenáčů vzniklých křížením jedinců, z nichž alespoň jeden byl napaden kadeřavostí, se může kadeřavost v některých případech přenést i na potomstvo. Bylo by třeba matečné rostliny podrobit serologickým testům, aby se zabránilo šíření kadeřavosti, tím spíše, že chmelnice se zakládají na dlouhou řadu let.

Souhrn

1. Virus kadeřavosti chmele má antigenní vlastnosti.
2. Popisuje se metoda čištění antigenu, založená na odstranění tříslovin pomocí nikotin-sulfátu nebo kofeinu a na opětovném srážení síranem amonným a dílčí denaturací při pH 4,7.
3. Serologicky je možné zjistit kadeřavost chmele precipitační kapkovou metodou u vegetativně množného chmele, habituálně i latentně nemocného.
4. Serologicky je možné určit kadeřavost chmele též u semenáčů chmele habituálně zdravých, ale ve skutečnosti nemocných.
5. Kadeřavost chmele lze přenést i mechanicky vetřením koncentrovaného vyčištěného virového preparátu do pletiva poraněného karborundem.
6. Serologicky nebyla zjištěna kadeřavost chmele u semenáčů, které během jednoho roku rostly v půdě, ve které předtím rostly kadeřavé chmelné rostliny.
7. Serum proti kadeřavosti chmele nereaguje se šťávou rostlin nemocných nakažlivou neplodností.
8. Včasným zjištěním latentních forem kadeřavosti chmele je možné dříve vyloučit selektovaný materiál, čímž se zbavíme šlechtitelského balastu.
9. Při negativních výběrech je nutno odstraňovat rostliny onemocnělé kadeřavostí ihned po objevení se prvních příznaků ochuravění, protože kadeřavost se může za určitých podmínek přenášet i mechanicky.
10. Z chmelnic napadených kadeřavostí chmele nelze brát materiál pro další množení a šlechtění.

- Ainsworth G. C., Ogilvie L.: Lettuce mosaic, *Ann. Appl. Biol.* 26 : 279—297, 1939.
- Bald J. G., Samuel G.: Some factors affecting the inactivation rate of the virus of tomato spotted wilt, *Ann. Appl. Biol.* 21 : 179—190, 1934.
- Bawden F. C., Kleczkowski A.: Protein precipitation and virus inactivation by extracts of strawberry plants, *J. Pomol.* 21 : 1—7, 1945.
- Best R. J.: The preservative effects of some reducing systems on the virus of tomato spotted wilt, *Austr. Jour. Exp. Biol. and Med. Sci.* 17 : 1 — 17, 1939, *C. A.* 33: 5887, 1939.
- Best R. J., Samuel G.: The effect of various chemical treatments on the activity of viruses of tomato spotted wilt and tobacco mosaic, *Ann. Appl. Biol.* 23 : 759—780, 1936.
- Blatný C.: Studie o kadeřavosti chmele. *Recueil de trav. des Inst. des Recherches Agron. de la Répub. Tchecoslovaque*, 56 : 44 str., 1930.
- Blatný C., Osvald V.: Jen zdravý a jakostní chmel, 366 str., Praha 1950.
- Blatný C., Osvald V.: Negativní výběry chmele, 51 str., Praha 1951.
- Blatný C., Osvald V.: Přenos viros chmele (*Humulus lupulus* L.) na potomstvo semenem, *Preslia* 26 : 1—26, 1954.
- Cornuet P., Gendron Y., Limasset P., Martin C.: Quelques observations sur l'extraction des virus des plantes, *Intern. Congr. Microbiol., Rep. Proc. 6th Congr. Roma* 1953, Vol. II., 161—162.
- Fulton R. W.: Virus concentration in plants acquiring tolerance to tobacco streak, *Phytopathology* 39 : 231—243, 1949.
- Gorodskaja O. S.: Novij metod očistki virusa tabačnoj mosaiky, *Biochimija* 15 : 507—508 1950.
- Hirth L.: Contribution à l'étude de l'inhibition du virus de la mosaïque du tabac par divers substances tanniques. Mode d'action de ces dernières, *Ann. Inst. Pasteur* 80 : 458—469, 1951.
- Hirth L., Rybak B.: Essais de culture in vitro de tissus de *Pelargonium zonale*. Nouvelle recherche sur les propriétés antimitotiques d'extraits aqueux de cettres plantes, *Rev. Gen. Bot.* 56 : 496—506, 1949.
- Hougas R. W.: Factor affecting sap transmission of the potato yellow-dwarf virus, *Phytopathology* 41 : 483—493, 1951.
- Jermoljev E., Hruška L.: Serologická metoda určování virových chorob u bramborů, Praha 1947.
- Ryžkov V. L.: Fytopatogennije virusy, Moskva 1946.
- Smith K. M.: A textbook of plant virus diseases, London 1937.
- Thung T. H., Want : Viren en locistoffen, *Tijdschr. plantenziekten* 57 : 172—174 (1951).

И. Поздена, М. Чех, Цт. Блатный :

Изучение антигенных свойств вируса курчавости хмеля

З а к л ю ч е н и е

- 1) Вирус курчавости хмеля обладает антигенными свойствами.
- 2) Описан метод очистки антигена, основанной на отстранении дубильных веществ при помощи никотинсульфата или кофеина и на повторном осаждении сернокислым аммонием и установлением раствора на pH 4,7.
- 3) Серологически можно установить курчавость преципитационным методом и у вегетативно размножаемого хмеля, габитусно и латентно больных.
- 4) Серологически можно установить курчавость и у сеянцев хмеля габитусно здоровых, но фактически больных.

5) Курчавость можно при определенных условиях перенести и механически.

6) Серологически не была установлена зараза курчавости в первом году выращивания сеянцев на почве, так называемой, зачумленной курчавостью.

7) Серум против курчавости хмеля не реагирует вместе с соком растений, заболевших заразным бесплодием.

8) Своевременным обнаружением латентных форм курчавости можно заранее исключить селекционный материал, благодаря чему сэкономится лишняя работа в следующих годах.

9) На практике необходимо производить негативный отбор сейчас же, как только появятся признаки, так как курчавость хмеля переносится при определенных условиях и механически.

10) Из хмельников сильно зараженных курчавостью нельзя брать материал для дальнейшего размножения и селекции.

J. Pozděna, M. Čech, C. Blatný:

Studie über die antigenen Eigenschaften des Hopfenkräusel-Virus.

Zusammenfassung

1. Virus der Hopfenkräuselerkrankung besitzt antigenen Eigenschaften.

2. Es wird die Methode der Reinigung des Antigens beschrieben; sie stützt sich auf die Beseitigung der Tanninstoffe mit Hilfe Nikotinsulfats oder Koffeins, auf die wiederholte Sedimentation mittels Ammoniumsulfat und teilweise Denaturierung bei pH 4,7.

3. Die Kräuselerkrankung des Hopfens ist bei den vegetativ vermehrten, habituell und latent kranken Pflanzen serologisch durch Präzipitation bei Verwendung der Tropfen-Methode feststellbar.

4. Serologisch lässt sich die Kräuselerkrankung des Hopfens auch bei den habituell gesunden, in Wirklichkeit jedoch latent kranken Hopfensämlingen feststellen.

5. Die Kräuselerkrankung des Hopfens lässt sich mechanisch übertragen auf die Weise, dass konzentriertes, purifiziertes Viruspräparat in das Blattgewebe junger Sämlinge mit Karborundumpulver eingerieben wird.

6. Der serologische Nachweis des Kräuselerkrankungsvirus war negativ bei den Hopfensämlingen, welche im Laufe eines Jahres im Boden wuchsen, in welchem vorher kräuselerkrankte Hopfenpflanzen vegetierten.

7. Serum gegen Kräuselerkrankung des Hopfens reagierte nicht mit dem Saft der an infektiöser Sterilität kranken Hopfenpflanzen.

8. Durch zeitige Entdeckung der latenten Formen der Kräuselerkrankung lässt sich früher das selektierte Material von dieser Krankheit bereinigen; dadurch können kranke Pflanzen schon zeitig ausgeschaltet werden.

9. Es ist nötig, bei den negativen Auslesen die kräuselerkrankten Pflanzen sofort nach dem Erscheinen erster Symptome zu beseitigen, weil die Krankheit unter bestimmten Bedingungen auch mechanisch übertragen werden kann.

10. Den Hopfengärten, in welchen die Kräuselerkrankung auftritt, darf das Material weder zur Selektion noch zur Vermehrung entnommen werden.

(Aus der Biologischen Anstalt — phytopathologische Abteilung — der ČSAV.)