

איבחון וירוסים בצמחים – אפילו בהעדר סימני מחלה, בעזרת טכניקות ביוכימיות

1. איכון חומצת גרעין RNA דו-גדילית, רב-מולקולרית, בעצי אבוקדו בארץ

מאת מ. בר-יוסף, מירה מוסקוביץ, המחלקה לוירולוגיה
יעקב פנקס, המחלקה לפיטופתולוגיה
אריה רוזנר, המחלקה לוירולוגיה
מינהל המחקר החקלאי*

המאמר דן במשמעותם החקלאית של וירוסים סמויים, ובדרכים לגילויים המהיר. השימוש בטכניקות הזיהוי הביוכימי איפשר גילוי של מחלות ויראליות סמויות באבוקדו, שלגביהן יהיה צורך לפתח שיטות של מניעה או של ניקוי חומר הריכוז.

מבוא

במחקר שנערך בזמן האחרון בריווארסייד, קליפורניה, במטרה לאבחן את מחולל מחלת הפסים השחורים (Black streak) בעצי אבוקדו, התברר כי מיצויי עלים מעצי אבוקדו מכילים יחידות חומצות גרעין דו-גדיליות (double stranded) מסוג RNA — Ribonuc-leic acid. בשלב זה חסרים נתונים מדויקים על אודות מקורן של יחידות אלה; אך ההנחה המקובלת היא, כי מדובר ביחידות השיכי פול (רפליקציה) של מספר וירוסים סמויים, שלא היו מזוהים בעבר בעצי אבוקדו. במאמר זה נסקור בקצרה את משמעות הימצאות RNA דו-גדילי במיצוי צמחי באבוקדו, ונמסור תוצאות הקדמות המראות כי יחידות דומות נמצאות גם בקרב עצי אבוקדו הגדלים בארץ.

רקע תיאורטי

וירוסים רבים, התוקפים צמחים, מורכבים מ-2 יחידות: מעטפת חלבונית וסליל של חומצת גרעין מסוג RNA. המידע התורשתי המיוחד לכל וירוס ווירוס (תחום פונדקאים, אופי הסימפטומים, צורת ההפצה הטבעית באמצעות וקטורים ועוד) מוטבע בסידור הבסיסים המרכיבים את חומצת הגרעין, ואילו המעטפת החלבונית —

* פירסום של מינהל המחקר החקלאי, סדרה ה' 1983, מס' 1290.

תפקידה העיקרי הוא להגן על חומצת הגרעין מפני אנזימים תאיים המפרקים חומצות גרעין (RNA) חד-גדיליות חשופות. חלקיקי הווירוס העטופים במעטפת החלבון נמצאים למעשה במצב מנוחה (Resting stage); ואילו בשלב הריכוזי (הרפליקציה) חלקיקי הווירוס מתערטלים תחילה ממעטפתם החלבונית, ועל-פני סליל ה-RNA החד-גדילי הולך ומשועתק סליל אחר בעל רצף בסיסים משלים. דוגמה: על-פני סליל RNA ויראלי (סימונו +) בעל רצף AUGC (נוצר סליל אחר (סימונו -) בעל רצף UAGC. הסליל המשלים משמש תבנית, שעל פניה נוצרים מאוחר יותר סלילי RNA ויראליים, שבהיעטפם ביחידות החלבון הוויראלי יהיו את חלקיקי הווירוס החדשים. בתנאים מסוימים, שני הסלילים — הוויראלי והמשלים — נקשרים זה לזה בקשרי מימן, ונוצר RNA דו-גדילי. השונה במספר תכונות מה-RNA החד-גדילי. דוגמה: AUGC UAGC

ורגדילי אינו מתפרק בריכוזי מלח גדולים על-ידי האנזים המפרק RNA חד-גדילי, וכן הוא בעל קצב נדידה שונה בשדה חשמלי מ-RNA חד-גדילי, והוא גם בעל תכונות אנטיגניות שונות מאלה של RNA חד-גדילי.

בזמן האחרון פותחו שיטות מעבדתיות חדשות, המאפשרות בידוד ואיכון של RNA דו-גדילי מרקמה צמחית. כצפוי, חלקיקים אלה הם בעלי משקל מולקולרי כפול מזה של RNA ויראלי. כך, למשך, במיצוי RNA דו-גדילי מרקמת צמח המודבק בוורוס המזוי איקה של הטבק (משקל RNA של הווירוס 2×10^6 דלטון) נמצאו יחידות RNA דו-גדיליות של 4×10^6 דלטון (1); ואילו מרקמה נגועה בוורוס המזואיקה של המלפפון אפשר היה להפיק את כל היחידות הדו-גדיליות המתאימות. כמו כן התברר, כי בתנאים מסוימים אפשר לאבחן ברקמה נגועה גם יחידות RNA דו-גדיליות קטנות יותר מכפולת ה-RNA הוויראלי, וההנחה המקובלת כיום היא כי אלה יחידות תת-גנומיות הנוצרות מחלקים מסוימים של ה-RNA הוויראלי ונושאות מידע ספציפי לתכונות מסוימות של הווירוס דוגמה: ברקמת צמחים מודבקים בוורוס המזואיקה של הטבק נמצאה תת-יחידה קטנה, המקדדת באופן ספציפי את תתי-יחידות החלבון המעטפתי.

חמרים ושיטות

נדגמו עלים מבוגרים מעצי אבוקדו בגיל שנה וחצי עד כ-20 שנה, ממטעים ברחובות בבית-דגן, בכפר הירוק, בעכו ובסער העלים רוסקו באוויר נחלי, וה-RNA הדו-גדילי הופק מהעלים בנוכחות חומצה פרה-אמינו-סליצילית.

תכשיר ה-RNA הופרד באלקטרופורזה בג'לים של אקריל-אמיד, ואופן על-ידי חשיפת הג'ל הספוג באתריום-ברומיד לאור על-סגול. התקביץ חומצת גרעין/אתריום הוא בעל פלואורסנציה חזקה, וניתן לאיכון ולצילום בנוכחות פילטר מתאים.



טבלה 1. פירוט ממצאי הסקר ההקדמי לאיכון תפוצת RNA דו-גדילי בקרב עצי אבוקדו בארץ.

הזן	בית-דגן		הכפר הירוק		עכו		סער		רחובות	
	עצים	RNA	עצים	RNA	עצים	RNA	עצים	RNA	עצים	RNA
פוארטה	12	(3)	3	(3)	3	(3)	2	(?1)	1	(3)
האס	2	(2)	24	(2)	2	(2)			1	(?0)
נאבאל	2	(0)								
ריד	2	(0)								
אטינגר	2	(0)								

¹ המספר בסוגריים מציין את סוגי RNA שנמצאו: (0) נקי; (1) קבוצה א'; (2) קבוצה ב'; (3) קבוצה א' וב'.

² כולל 2 עצים בעלי סימפטומים דומים ל-Black Streak.

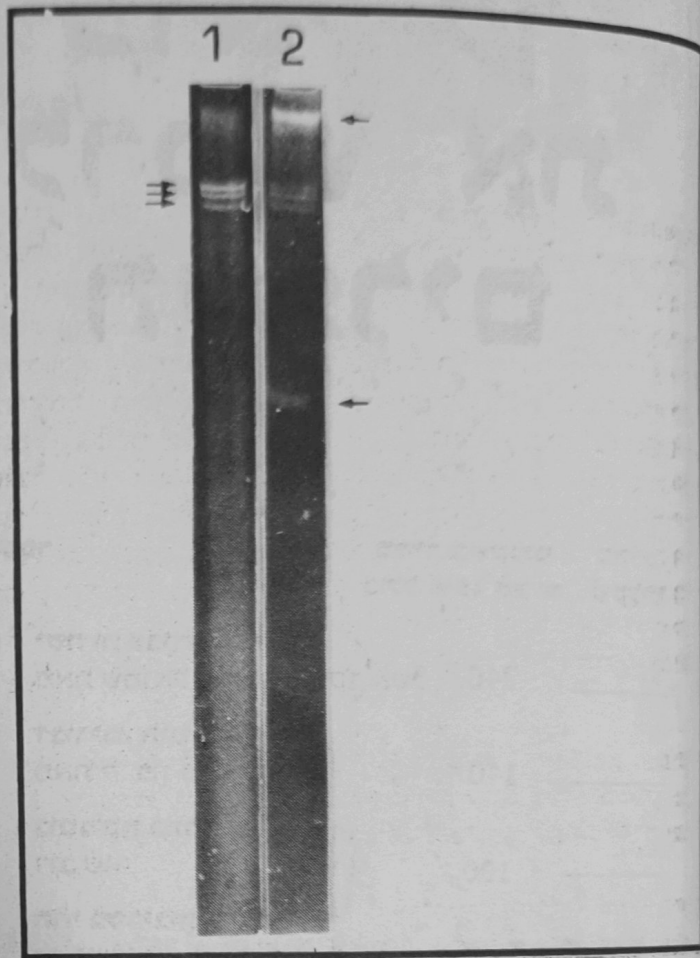
בחינת תכולת ה-RNA הדו-גדילי בעלוות שני העצים היחידים בארץ שהם בעלי סימפטומים הדומים למתואר לגבי מחלת הפסים השחורים הידועה בקליפורניה — לא הראתה, עד כה, הבדלים בתכולת ה-RNA הדו-גדילי בין עצים אלה לעצים אחרים במטע זה או במטעים אחרים.

דיון

בעבודתנו נמצא כי עצי אבוקדו בארץ, בדומה לעצים בקליפורניה, מכילים חומצת גרעין מסוג RNA דו-גדילי בעלת משקל מול-קולרי רב. בזמן האחרון דווח בספרות, שאפשר למצוא RNA דו-גדילי ברקמה צמחית בריאה, אך RNA זה המתגלה ברקמה בריאה הוא בעל משקל מולקולרי מועט מאוד ומקורו, כנראה, בסינתזה של RNA על פני שני הגדילים של ה-DNA הצמחי. מולקולת ה-RNA הקטנה ביותר שאיתרנו בעבודה זו גדולה עשרת מונים מזו שדווח על מציאותה ברקמות צמחים פטורים מווירוס. לפי גודל יחידות ה-RNA שאופנו בידי חוקרים מקליפורניה וכידינו בעלי אבוקדו אפשר להניח, כי אלה הן יחידות הרפליקציה של שני וירוסים סמויים באבוקדו, שאיכונם נמנע בעבר בשל קשיים כמיצוי והדבקה של וירוסים מאבוקדו, בעיקר בגלל נוכחות פוליסכרידים ותרכובות כלתי מזהות אחרות, המפריעים למיצוי עלים או קליפות של אבוקדו.

עדיין אין בידינו מידע על אודות צורתם של חלקיקי הווירוס או שיוכם הטכסונומי. אולם לגבי יחידות מקבוצה א' יש סבירות מסוימת כי אלה חלקיקים של וירוס מוארך מקבוצת Potyvirus, שלהן יחידות RNA חד-גדילי במשקל כדי 3×10^6 דלטון (מחצית המשקל של יחידות ה-RNA הדו-גדילי הכבד בקבוצה א'). לגבי שאלת אלימותם וחשיבותם המעשית של וירוסים סמויים אלה — עדיין אין בידינו כל ידיעות, וכדי לברר זאת נצטרך להשוות, בתנאים מקבילים, בכל זן הזן — עצים פטורים מ-RNA דו-גדילי ועצים הנושאים חומצה זו. אפשרות אחרת היא, שאחת משתי הצורות או שתיהן קשורות עם וירוסים קריפטיים מסוג שעליו דווח בזמן האחרון בצמחי סלק וציפורן.

(המשך בעמוד הבא)



RNA דו-גדילי, המתגלים באלקטרופורזה בג'אלים של אקרילאמיד של מיצוי רקמת אבוקדו.

1 - RNA דו-גדילי מקבוצה ב' מעץ האס;

2 - RNA דו-גדילי מקבוצה א' וקבוצה ב' בעץ פוארטה.

תוצאות

התמונה מראה את מגוון ציורי יחידות ה-RNA הדו-גדילי שנמצאו עד כה בקרב עצי אבוקדו שנדגמו בשלב זה ב-5 מטעים בארץ. בולטת הופעת 2 קבוצות נפרדות של RNA דו-גדילי: קבוצה א' מכילה 2 יחידות, שהכבדה שביניהן (נדידה מוגבלת) בעל משקל מולקולרי משוער של 6×10^6 דלטון, והקלה — בעלת משקל כדי 0.5×10^6 דלטון. קבוצה ב' מכילה 3 יחידות בעלות משקלים מולקולריים כדי $2.1 \pm 0.3 \times 10^6$.

טבלה 1 מפרטת את תוצאות הסקר לפי זנים או מקומות הדגימה. תפוצת RNA דו-גדילי במדגמים שנבחנו. מסקר הקדמי זה מתברר, שרוב עצי הזן האס מכילים יחידות RNA מקבוצה ב', ורוב עצי פוארטה בארץ מכילים יחידות RNA של שתי הקבוצות. בזנים נאבאל, ריד ואטינגר שנדגמו בחוות בית-דגן לא נמצאו עד כה יחידות RNA דו-גדיליות.

איבחון וירוסים בצמחים – אפילו בהעדר סימני מחלה, בעזרת טכניקות ביוכימיות

(המשך מעמוד קודם)

כדאי לך לרכוש את הספרים

מחיר בשקלים סה"כ,
כולל 15% מע"מ שקלים

הספר

- ☐ יסודות עבודת האדמה
מאת שמואל הורביץ ויעקב אשל 240.-
- ☐ דבורים, חושיהן ולשונן
מאת ק. פון פריש 140.-
- ☐ בוטניקה כוורנית
דוב שור 100.-
- ☐ החי בסביבות ים-המלח
לב פישלזון 140.-

☐ מחרשת מגרופיות
אלכסנדר אפרת

אזל

רצ"ב שיק ע"ס

לכבוד
"השדה"
ת"ד 40044
תל-אביב, 61400

אבקש לשלוח לי את הספרים המסומנים

שם

כתובת

מספר טלפון

כאמור, המחקר בתחום זה באבוקדו עדיין בראשיתו, וחשוב להתמיד בו כדי לברר אם חלקיקים אלה מחוללים מחלות סמויות באבוקדו, ואם אמנם כן – כיצד אפשר יהיה, בעתיד, לשחרר את מקורות הרכב והכנות מגורמים אלה.

עתה, כאשר הסקר בראשיתו, עדיין אין בידינו מידע מספק בדבר מידת התפוצה של הגורמים הנ"ל, וייתכן כי בזנים מסוימים כגון האס ופוארטה רוב העצים, אם לא כולם, נושאים RNA דו-גדילי (וירוסים סמויים).

בגידולים אחרים, כגון תפוחי-אדמה וציפורן, נמצאו בעבר וירוסים סמויים; כגון וירוס X של תפוא"ד ווירוס הנימור בציפורן. נזקיהם של אלה התבררו רק לאחר שנמצאו דרכים לנקות את חומר הריבוי (1) ולהשוות צמחים פטורים מווירוס לצמחים שהיו כביכול בריאים אך למעשה הכילו את הווירוסים הנ"ל.

סיכום

בסקר הקדמי לאיכון וירוסים סמויים, שנערך בקרב עצי אבוקדו בארץ, מצאנו כי העצים מהזנים פוארטה והאס מכילים יחידות חומצת גרעין RNA דו-גדילי בעלות משקל מולקולרי הנע בין 6.10^6 ל- 0.5 דלטון. לפי נדידתן של יחידות RNA בשדה חשמלי נראה כי בארץ, בדומה לקליפורניה (Ramon et al, 1981), עצים רבים מהזן פוארטה מכילים שתי קבוצות של יחידות RNA: קבוצה א' (2 יחידות) במשקל $0.5; 6 \times 10^6$; קבוצה ב' (3 יחידות) במשקל ממוצע $2.1 \pm 0.3 \times 10^6$. רוב העצים מהזן האס מכילים חלקיקים מקבוצה ב' בלבד. עדיין אין מידע לגבי מידת הנזק לעצים, הכרוכה בהימצאות חלקיקים אלה.

ספרות

1. אלפר מרים, לובנשטיין ג. (1979): לשאלת הכנת חומר ריבוי פטור מווירוסים. "השדה" ס': 2265 – 2266.
2. Bar-Joseph, M., Rosner, A., Moscovitz, M. and R. Hull (1983). J. Virol. Methods. In press.
3. Jordan, R.L., Dodds, J.A. and Oh, H.D. (1983). Phytopathology 72, In press.
4. Lisa, V., Boccardo, G. and Milne, R.G. (1981). Virology 115, 410.
5. Kassanis, B., Russel, G.E. and White, R.F. (1978). Phytopathol. 2. 91, 76.