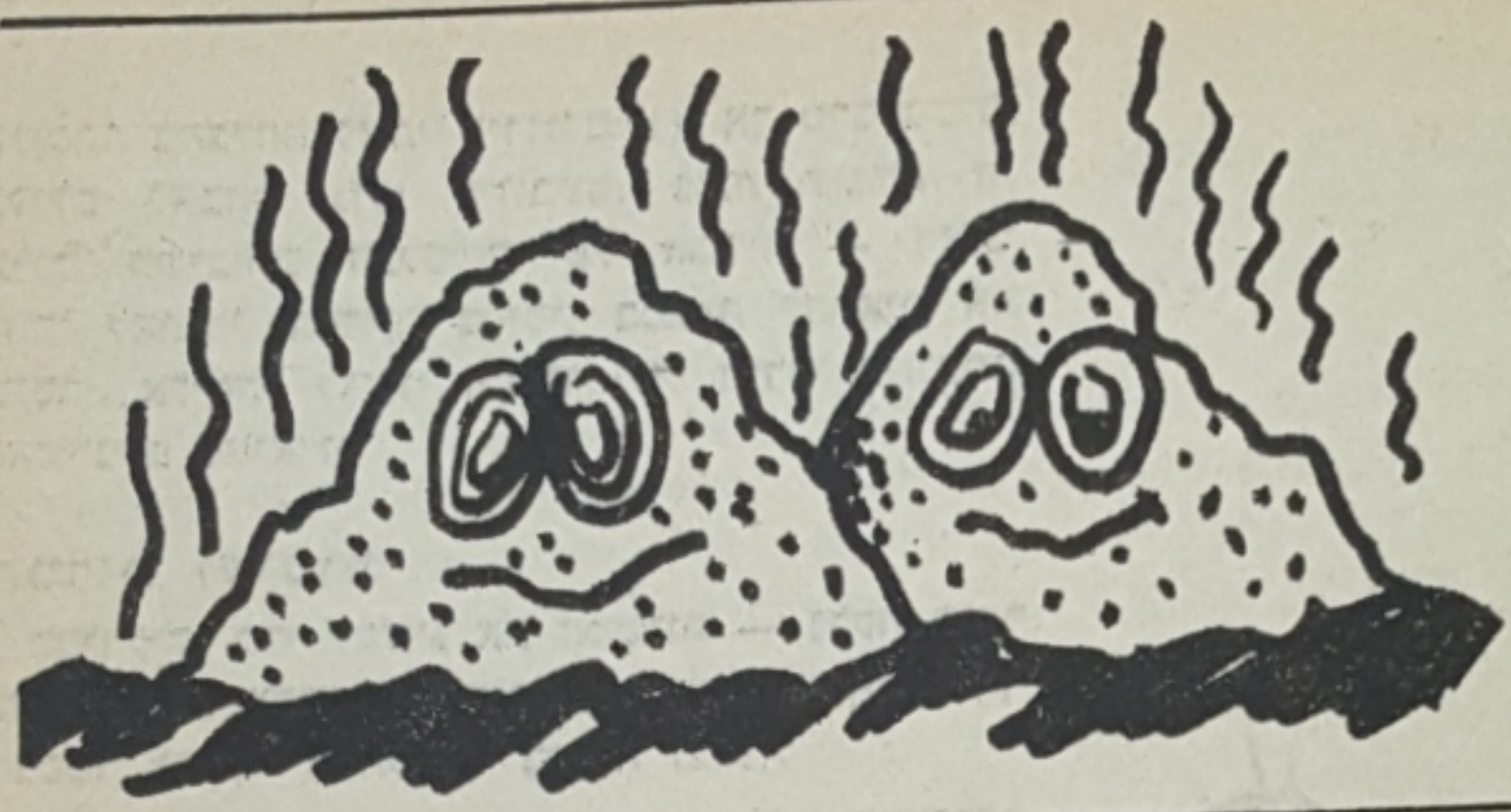
קרקע וזיהום



אבחון מהיר של גזעי חידקים אוגרי חנקן האפייניים לאגוזי־אדמה, באמצעות שיטת ELISA

מאת ד. **קישינבסקי, רינה לבל**, המחלקה לביקטור, מינהל המחקר החקלאי*

לזיהוים המהיר והמהימן של חידקי ריזוביום — חשיבות חקלאית רבה. בייחוד חיוני הדבר לאבחנה ולמיון של הגזעים שבהם משתמשים לביקטור הקטניות בכלל, ואגוזי־האדמה בפרט.

נוכח המגבלות המעשיות של השיטות הסרולוגיות הקיימות לזיהוי הגזעים — פותחה שיטה אחרת, הקרויה „אליסה"**. בעיקרה, זוהי כעין „בדיקת־בזק", לעומת קצב השיטות המקובלות. היא מצטיינת ברגישותה, ומתאימה לביצוע בדיקות המוניות, שיסייעו לקידומו של ביקטור אגוזי־האדמה ולהגדלת יבולם.

מבוא

לזיהוים המהיר והמהימן של חידקי ריזוביום חשיבות חקלאית רבה. בייחוד אמורים הדברים לגבי הגזעים, שבהם משתמשים לביקטור קטניות בכלל ואגוזי־האדמה בפרט.

לעתים משתלטים בקרב האוכלוסיה של חידקי הריזוביום גזעים שאינם מצטיינים ביעילותם הסימביוטית. במקרים כאלה חשוב להחדיר לתוך אוכלוסיות החידקים הקיימות באופן טבעי, באמצעות ביקטור — כמות נאותה של גזעים, המצטיינים בשתי תכונות יסוד: 1) כושר קיבוע של חנקן אטמוספירי; 2) כושר התחרות עם חידקי ריזוביום מקומיים על מידת ההדבקה של הצמח הפונדקאי. מניחים, שבין הגזעים השונים של ריזוביום קיימת התחרות נמרצת ומתמדת על אתרי הווצרות הפיקות במערכת השרשים. סביר להניח, שהתוצאה הסופית של ה־התחרות תלויה גם בכשרם של הגזעים המצויים באופן טבעי בריזוספירה.

קביעת כושר ההתחרות של חידקי הריזוביום מותנית בראש ובראשונה בזיהוים המהימן של הגזעים. ידוע, שחידקי הריזוביום מצטיינים בהטרוגניות רבה של המבנה האנטיגני שלהם. לכן ריכזו המיקרוביולוגים תשומת־לב רבה לפיתוח אמצעים סרולוגיים, שיסייעו בזיהוי החידקים הללו (10).

שלוש שיטות סרולוגיות מקובלות כיום לזיהוי גזעי ריזוביום: אחת — האגלוטינציה, בעיקר של אנטיגנים סומטיים הומולוגיים והטרולוגיים (7); אמונו־דיפוזיה כפולה בגל (8); אמונו־פלואורסצנציה (3). שיטות אלה מאפשרות לזהות גזעים שונים של חידקי ריזוביום, ולאמוד את כושר התחרותם.

עם זאת ראוי לציין, שהשיטות הנ"ל מוגבלות בכשרן. מגבלותיהן של שתי השיטות הראשונות הן: 1) רגישות בלתי מספקת לגילוי ולאומדן כמויות קטנות של חומר אנטיגני; 2) יוקר הביצוע, בשל הזמן הרב יחסית שמצריך האבחון. באשר לשיטה השלישית — חסרונה הוא בזה, שנזקקים לכמויות ניכרות של נוגדנים, לרבות מיכשור יקר — מיקרוסקופ פלורסצנטי.

נוכח המגבלות המעשיות של השיטות הסרולוגיות הנ"ל (6) — היה עניין רב לעבד שיטה פשוטה לביצוע, ומה שחשוב ביותר — בעלת רגישות רבה יותר. תכונה אחרונה זו עשויה לאפשר זיהוי חידקי ריזוביום ישירות בתוך הפיקה, ללא הטרחה של פעולות מקדימות הקשורות בבידוד חידקי ריזוביום ובגידולם. לאור עובדות אלה עלה הרעיון לבחון את יעילותה של שיטה סרולוגית חדישה „אליסה",

---

* מפרסומי מינהל המחקר החקלאי, סדרה ה' 1979, מס' 2212.

** ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay.

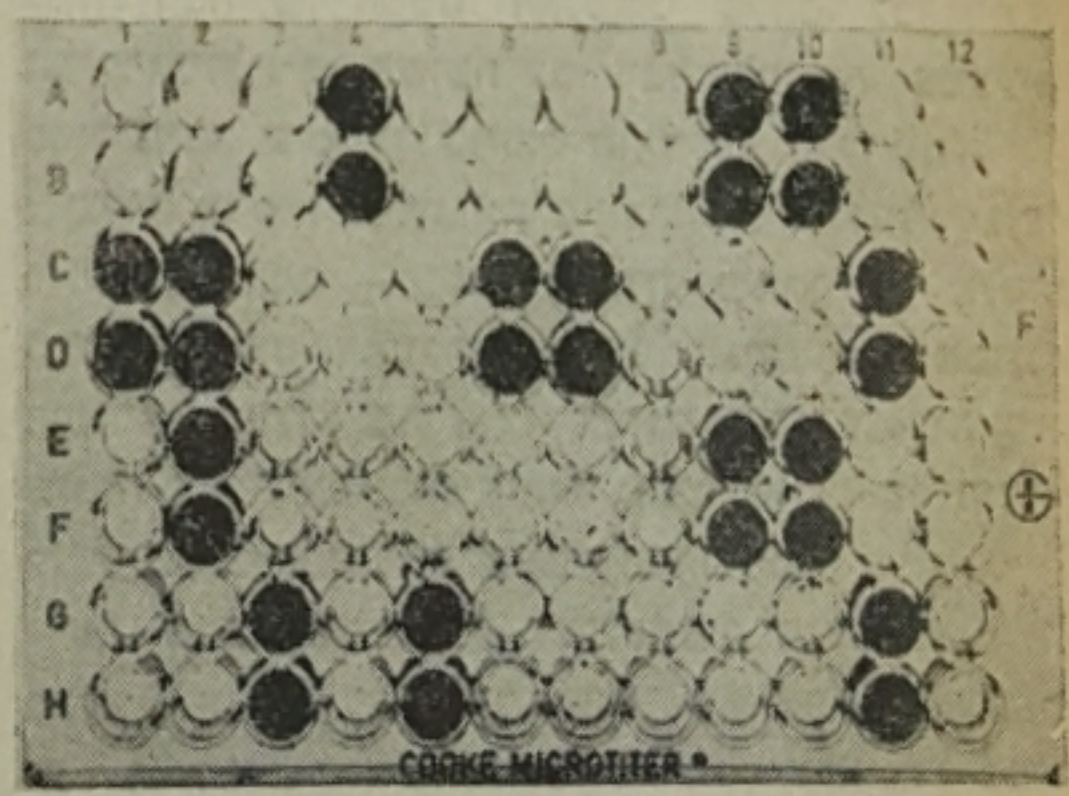
שנוסתה בהצלחה לזיהוי וירוסים (1), אך טרם נוסתה בעולם לאבחון גזעי ריזוביום. נוכח עובדה זו, ונוכח חשיבותם הכלכלית של אגא"ד — ראינו צורך להתחיל במחקר בסיסי, במגמה להתאים את שיטת „אליסה" לגילוי ולזיהוי של חידקי ריזוביום האפייניים לאגא"ד.

חמרים ושיטות

החידקים. כדי להשיג את המטרות — נלקח חומר של חידקים אפייניים לאגא"ד, מתוך האוסף המקיף הנשמר ונחקר במחלקה לביקטור (2, 9).

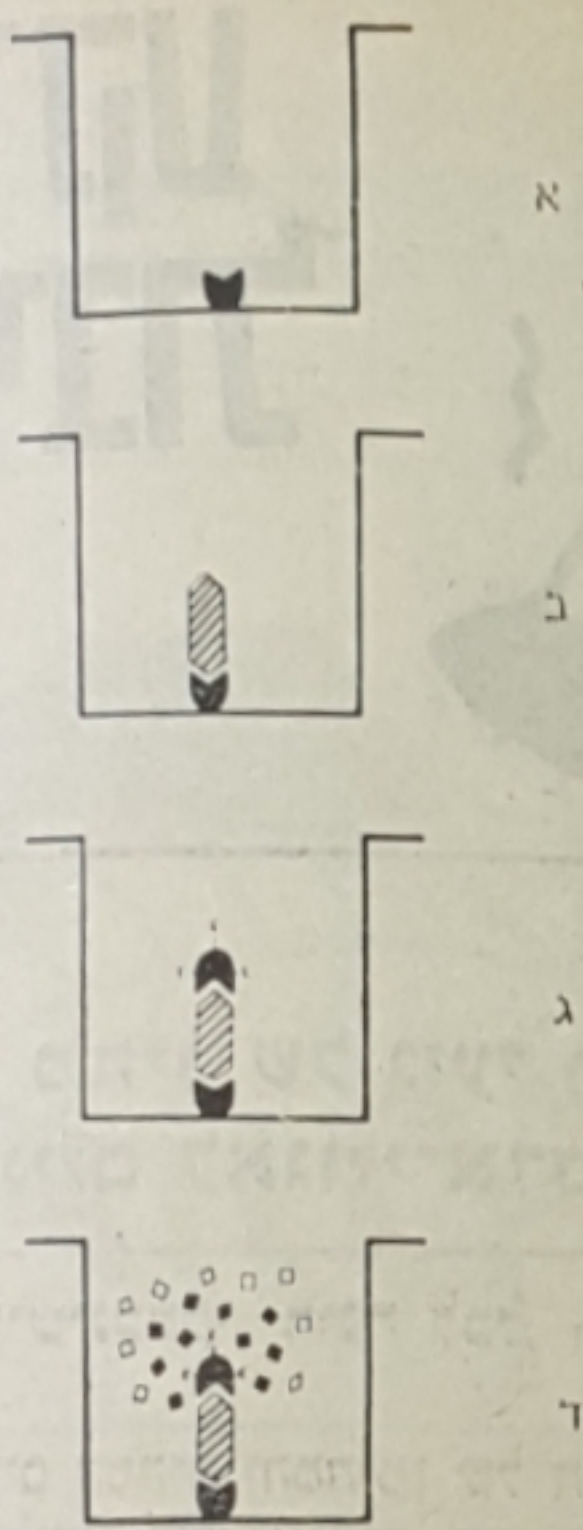
האנטיסרומים. הכנתם נעשתה בדרך המקובלת בסרולוגיה, באמצעות הזרקת תרחיף חידק הריזו־ביום הנבחן לתוך ארנבת שנבחרה למטרה זו, אחת לכל גזע של חידק. עם קבלת האנטיסרומים ממדגמי הדם ממספר חיות מוזרקות — הופרדו מהם הנוגד־נים, לבדיקת תכונותיהם הסרולוגיות האפייניות לגזע החידק, במגמה לקבוע את הטרוגניותם.

שיטת „אליסה". המבחן נעשה לפי אֶנגוואל ופרל־מן (5), עם שינויים של קלארק ואדמס (4). בשיטה זו נעשה זיהוי החידקים בעזרת תבניות מיוחדות במבנן, המצוידות ב־96 נקבים שווים בנפחם (ציור 1), שכל אחד מהם דיו לבצע את כל המהלכים הקשורים בזיהוי גזע החידק. תודות למספר הרב של הנקבים בתבנית — מתאפשר ביצוע בדיקות המוניות בו־זמנית.



ציור 1. דוגמה אפיינית של התבנית הסרולוגית (Dynatech M29) שבשימוש שיטת אליסה (הנק־בים הכהים מצביעים על תגובה חיובית, וחסרי צבע — על תגובה שלילית).

מהלך הבדיקה הוא כלהלן: לכל נקב בתבנית מטפטפים תמיסת גמה־גלובולין, המכילה נוגדנים האפייניים לחידק הנבחן, ומוסיפים בזה אחר זה שני רכיבים שונים באפיים. במקרה של תגובה חיובית — מתקשרים הרכיבים זה עם זה וכן עם הנוגדנים שנספחו בתחילת התהליך עם דפנות הנקב, ויוצרים „כריך" יציב (ציור 2). בשלב אחרון של



ציור 2. תיאור סכימטי של פעילות הבדיקה בנקב התבנית. א. הוספת נוגדנים של אנטיסרום, שפייה ושטיפה; ב. הוספת אנטיגן (החידק הנבחן), שפייה ושטיפה; ג. הוספת נוגדנים הקשורים עם האנזים אלקלין פוספטזה, התקנת „כריך", שפייה ושטיפה; ד. גילוי אנטיגנים באמצעות הסובסטרט P־Nitrophenyl phosphate (התהוות הצבע הצהוב).

הבדיקה מקבל המצע שבנקב גוון צהוב בולט — במקרה של תגובה חיובית. חשוב להטעים, כי ככל שמרובה מספר החידקים במדגם הנבחן — כן תגדל עצמת הצבע, במקרה הנדון; ולהיפך. מאידך גיסא, הבדיקה שתוארה היא גם כמותית, ומכיון שעצמת הצבע ניתנת למדידה באמצעות ספקטרו־פוטומטר בגל (A = 405 ננומטר) — יכולים ערכיה לשמש קנה־מידה לתגובתם הסרולוגית של גזעי הריזוביום השונים האפייניים לאגא"ד.

תוצאות

זיהוי גזעי הריזוביום בשיטות אגלוטינציה

כדי לעמוד על מידת הטרוגניותם של חידקי הריזו־ביום — נלקחו לבדיקה 8 גזעים, מתוך אוסף השמור במחלקה. תכונותיהם הסרולוגיות של החיד־קים נבחנו בשיטת אגלוטינציה, כלפי 3 אנטי־סרומים המכילים נוגדנים סגוליים לגזעים המסומנים הבאים: 5א/70, 3847A, 944C.

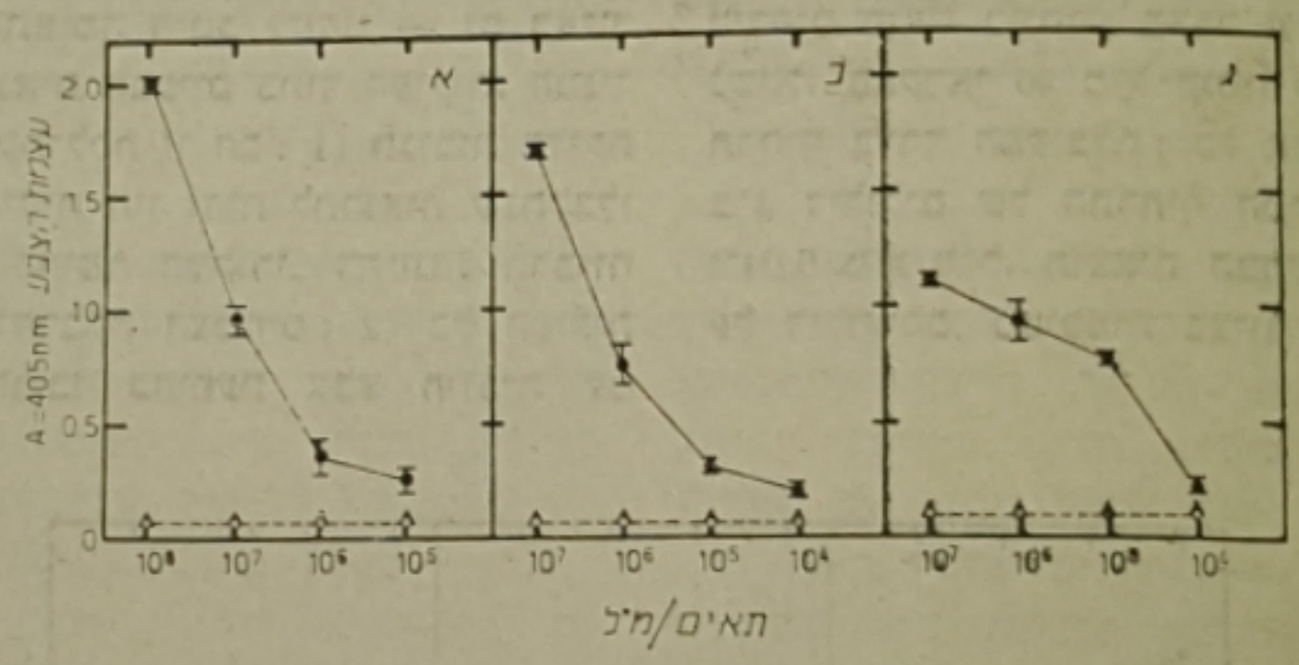
תוצאות הזיהוי הצביעו על מציאותן של 3 קבוצות אפייניות בתכונותיהן הסרולוגיות. הקבוצה הראשונה — מכילה את הגזעים 5א/70, 280A, 23/70 ו־

R283A, המגיבים עם אנטיסרום ספציפי לגזע 5א/70; הקבוצה השנייה — כוללת את הגזעים 3852A, 3847A ו־3844C, המגיבים עם האנטיסרום הספציפי לגזע 3847A, ורק גזע 944C מייצג את הקבוצה הסרולוגית השלישית.

לאחר שהוכח על־פי שיטות אגלוטינציה, כי חידקי הריזוביום שהועמדו למבחן כוללים הן גזעים זהים הן גזעים נבדלים במבנה האנטיגני שלהם — ניגשנו לזיהוים בשיטת „אליסה" חדישה. בהקשר זה נדונו שתי שאלות יסוד: א) זיהוי הגזעים, כשהם מצויים בתרבית נקייה; ב) זיהוי אותם גזעים — ישירות בתוך פיקות הצמחים שבוקטרו.

זיהוי גזעי הריזוביום בשיטת „אליסה" — בתרבית נקייה

בשלב הראשון נבדקו שלושה גזעים בלבד: 5א/70, 3847A ו־944C. כדי לקבוע את רגישותה של השיטה — נבחן כל גזע מהנ"ל ב־4 ריכוזים שונים, שנעו בין 10^4 או 10^5 עד 10^8 חידקים במ"ל אחד של תרבית. העקומים של ערכי הזיהוי, המבוססים על בדיקות עצמת הצבע בשיטה ספקטרו־פוטומטרית (A = 450 ננומטר) כפי שנתגלו בנקבים של התבניות — מובאים בציור 3.



ציור 3. ערכי בדיקת אליסה בריכוזים שונים של חידקי ריזוביום: א. אנטיסרום של גזע 5א/70 הנבחן לעומת הגזע 5א/70 (●——●), 944C (קו מקווקו בין משולשים ריקים) ו־3847A (○--○); ב. אנטיסרום של גזע 3847A הנבחן לעומת הגזע 3847A (●——●), 944C (קו מקווקו בין משולשים ריקים) ו־5א/70 (○--○); ג. אנטיסרום של גזע 944C הנבחן לעומת הגזע 944C (●——●), 5א/70 (קו מקווקו בין משולשים ריקים) ו־3847A (○--○).

העיון בערכים של ממצאי הזיהוי, ובמהלכם — מצביע על העובדות הבאות.

1. שיטת „אליסה" מתאימה לזיהוים של כל שלושת גזעי הריזוביום שנלקחו למבחן, בתנאי שהם נבדקים כלפי נוגדנים ספציפיים לגזע העומד לזיהוי;
2. ככל שמספר החידקים בתרבית הנבחנת רב יותר — גדולה יותר עצמת הצבע, בכל הגזעים שנבחנו;
3. השיטה מצטיינת ברגישות, ומאפשרת לזהות כל גזע בריכוז התרבית המועט ביותר — 10^4 או 10^5 חידקים במ"ל אחד. חשוב לציין, כי מנה קטנה כזאת אינה ניתנת להערכה באמצעות שיטות האגלוטינציה.

מימצאי זיהוים של 5 גזעים אחרים (23/70, R283A, 280A, 3852A ו־3844C) מורים, שהם ניתנים לזיהוי מהימן בשיטת אליסה, נוסף לשלושת הגזעים שזוהו קודם בתרבית. יתרה מזאת: תכונותיהן הסרולוגיות הקבילו יפה לאלה שנתגלו בשיטת האגלוטינציה.

זיהוי הגזעים בשיטה „אליסה" — ישירות בתוך הפיקות

תגובת הצמחים לגזעי הביקטור השונים בכלל, וזיהוים ישירות בפיקוח בפרט, באמצעות שיטת אליסה — נבחנו בסדרת הניסויים המתוארים להלן.

כדי להשיג את המטרות שהוצגו — נבחר סוג קרקע בעל מרקם קל, האפייני לגידול אגוזי־אדמה, שמטבעו הוא דל מאוד בחמרי מזון בכלל ובחנקן בפרט. לניסויים שימשו מכלי מתכת שווים בנפחם, שהכילו 3.5 ק"ג אדמה כל אחד. בכל מכל הוצנעו כמויות שוות של דשן זרחני ואשלגני: 5.2 גרמים סופרפוספט רגיל ו־0.52 גרם אשלגן גפרתי.

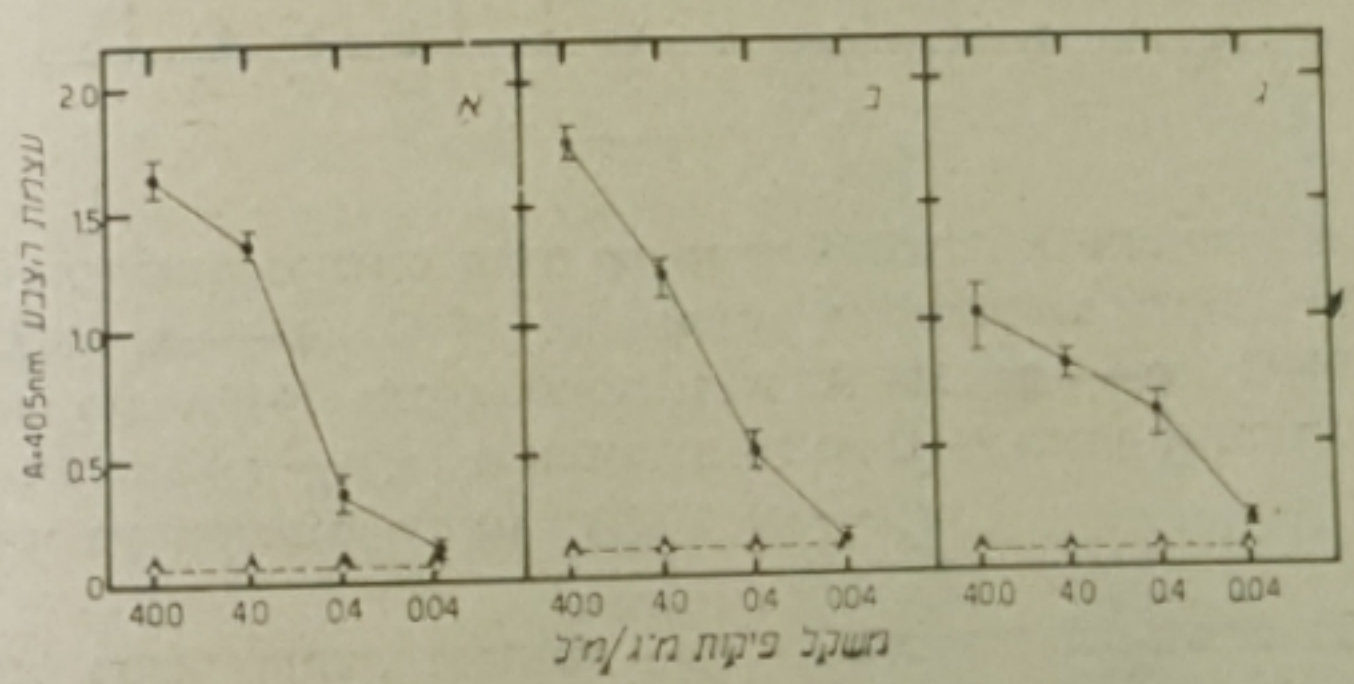
המכלים נזרעו בתחילת מרס, לאחר השקית הנבטה; בכל מכל נזרעו 7 זרעים מחוטאים של אגא"ד מהזן שולמית, הנפוץ בישראל, ולאחר ההצצה דוללו בהדרגה ל־3 צמחים שווים בהתפתחותם בכל מכל. ביקטור הקרקע במכלים נעשה מיד לאחר הזריעה, כאשר כמקור משמש תרחיף המכיל בכל טיפול מספר שווה של חידקי ריזוביום למכל: 3×10^9. כדי לשמור על רמת רטיבות אחידה בתחום 70% מקיבול־השדה — נשקלו המכלים מדי פעם והושקו בהתאם להפסדי המים שחלו בהם. לאחר ההצצה נערך מעקב שוטף אחר התפתחות הנוף וחזותו, והוסק שהמועד המתאים לדגימת פיקוח לזיהוי החידקים הוא 5 שבועות לאחר הביקטור.

כדי למנוע התערבותם של גזעי הריזוביום המקומיים במצע הגידול (האדמה הנבחנת) — עוקרו

המכלים על תכנם, ובהמשך נשמרו בתנאים אספטיים מקובלים. כל טיפול של ביקטור כלל גזע אחד בלבד. סדרה זו כללה בסך הכול 6 גזעי ריזוביום שנבחנו בנפרד: 5א/70, R283A, 280A, 944C, 3847A. כל גזע נבדק בשלוש חזרות. מכל טיפול נלקחו לבדיקה 45 פיקות; כל פיקה בנפרד עורבבה עם מ"ל אחד PBS* ונכתשה עד קבלת תרחיף הומוגני ככל האפשר; ממנו ניתן בכל נקב של תבנית 0.2 מ"ל תרחיף לביצוע בדיקת אליסה.

מעקב אחר מהלכי הבדיקה ותוצאותיה, בכל 6 המדגמים שהופקו ישירות מהפיקות, הוכיח בעליל כי שיטת אליסה מתאימה היטב לזיהוי — גם כאשר הגזעים מצויים בתנאים טבעיים בתוך הפיקות. המני־עים למסקנה מרחיקת־לכת זו הם: 1) תגובות בדיקת אליסה בתרחיף הפיקות היו זהות לתוצאות שנתקבלו במקביל מבדיקות החומר המקורי, דהיינו: תרביות הגזעים ששימשו להדבקת הצמחים; 2) כל הפיקות שגזעיהן נבדקו הגיבו בהופעת צבע חיובית עם אנטיסרום הומולוגי, ולא הגיבו עם אנטיסרומים של גזעים הנמנים עם קבוצות סרולוגיות אחרות; 3) מסתבר, שאף בפיקות זעירות שמשקלן נע בין 2 ל־8 מ"ג בלבד אפשר למדוד את עצמת הצבע בנקב של התבנית.

כדי לקבוע את גבול רגישותה של שיטת אליסה לזיהוי החידקים ישירות מתוך הפיקות — נערך ניסוי נפרד, כאשר חומר הפיקות לבחינה כלל שלושה גזעים הנמנים עם קבוצות סרולוגיות שונות (944C; 3847A; 5א/70), שכבר נבדקו קודם. הפעם נלקחו המדגמים באופן שונה, כדי להגיע לריכוז חידקים מועט ביותר: מצבר של פיקות בגודל שונה נשקלו באקראי 40 מ"ג חומר טרי מכל גזע, להכנת תרחיף בדרך המקובלת; כל אחת מהשקילות נבדקה ב־4 דילולים של התרחיף המקורי — 40, 4.0, 0.4 ו־0.04 מ"ג/מ"ל. תוצאות הבדיקות הנ"ל, בתרחיפים על דילוליהם, מסוכמות בציור 4.



ציור 4. ערכי בדיקת אליסה בריכוזים שונים של תרחיף הפיקות:

א. אנטיסרום של גזע 5א/70 הנבחן לעומת פיקות של גזע 5א/70 (●——●), 3847A (○——○) ו־944C (קו מקווקו בין משולשים שחורים).

ב. אנטיסרום של גזע 3847A הנבחן לעומת פיקות של גזע 3847A (●——●), 5א/70 (○--○) ו־944C (קו מקווקו בין משולשים שחורים).

ג. אנטיסרום של גזע 944C הנבחן לעומת פיקות של גזע 944C (●——●), 5א/70 (○——○) ו־3847A (קו מקווקו בין משולשים שחורים).

הערכים המסוכמים בציור 4 מאשרים את המסקנות הקודמות: עצמת הצבע המופיע בשיטת אליסה — הולכת ופוחתת במידה בולטת ככל שפוחתים החיד־קים בתרחיף. עובדה זו באה לידי ביטוי בכל שלושת הגזעים שעמדו למבחן. אולם, היא נכונה עד גבול מסוים. מסתבר, שבריכוז פחות מ־0.4 מ"ג/מ"ל — התגובה חלשה מדי, וגם אינה מובהקת מבחינה סטטיסטית.

לאור התוצאות החיוביות שהושגו בשיטת אליסה, לרבות פשטות השיטה — אין ספק שבעזרתה אפשר יהיה לבצע בעתיד בדיקות המוניות, בהתאם לנדרש בחקר הביקטור.

הבעת תודה

המחברים רואים חובה נעימה להודות לדוד לחובר, על עזרתו הרבה בכל מהלך עבודה זו; וכן לחיה נמס, על עזרתה בביצוע בדיקות סרולוגיות.

ספרות

1. בר־יוסף מ., מוסקוביץ מ., גרנס ס., גונגלבס ד., לובנשטיין ג. (1977). „השדה", נ"ח: 457—460.
2. לבל ר., שיפמן י., מחקרי המכון לגידולי שדה וגן, דו"ח תלת־שנתי 1974—1977.

* Phosphate-buffered saline = PBS

3. Bohlool, B.B. and Schmidt, E.Z. (1973). Soil Cci. Soc. Am. Proc. 37, 561—564.

4. Clark, M.F. and Adams A.N. (1977). Y. Gen Virol. 34, 475—483.

5. Engvall, E. and Perlmann, P. (1971). Immunochemistry 8, 871—874.

6. Kishinevsky, B. and Bar-Yoseph, M. (1978). Can. J. microbiol. 24, 1537—1543.

7. Koontz F.P. and Faber J.E. (1960). Soil Sci. 91, 228—232.

8. Ouchterlony, O. (1958). Progr. Allergy, 5, 1—78.

9. Schiffmann, J. and Alper, Y. (1968). Expl. Agric. 4: 219—226.

10. Vincent, Y.M. (1970). Manual for the Practical Study of the Root Nodule bacteria. Blackwel Scientific Publications, Oxford.