

# מחלות וירוס, וירואידים וספירופלסמה בהדרים

מ. בר-יוסף, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי

בזה — התחלה של סדרת מאמרים, הדנים במחלות הדרים המועברות עם הרכב; כולל וירוסים, וירואידים וספירופלסמות. המאמר הראשון המובא בזה דן בהיבטים כלליים על מחלות אלה, והמאמרים הבאים ידונו בבעיות יחודיות. רשימת ספרות כוללת תובא בסוף הסדרה.

הפצה אחרים. כל אלה מכונים וקטורים, ויידונו במאמר זה כמכלול אחד.

נגיפים נבדלים זה מזה במידה רבה בשיעורי העברתם מעץ האם לזרע ולשתיל. בנגיפים מסוימים המצויים בעצי הדר, כגון מחולל טריסטזה וכן מחוללי מחלות אחרים המוגבלים בצניורות השיפה כגון מחולל העלעלת ומחולל ה-Greening, כנראה אין אפשרות העברה על-ידי הזרע. מכיון שאין מעבר ישיר של צניורות השיפה בין רקמות צמח האם לבין עובר הזרע. שיעור ההעברה של נגיפים אחרים לנבט — מועט. בדרך-כלל חלקי אחוז אחד, ורק במקרים נדירים דווח על העברה לזרעים בשיעורים גדולים. בשלב זה אין הוכחה להעברה של תקבין מחלות הדרים שמחוללים וירואידים — על-ידי זרעים; אך שאלה זו לא נחקרה די הצורך. חרקים מוצצים, בכללם כנימות עלה, ציקדות וכנימות עש, עלולים להעביר נגיפים מסוימים. חשוב להבהיר, שבדרך-כלל קיימת יחודיות בנידון זה, ונגיף מסוים יעבור על-ידי חרק מוצץ מסוים; ואילו במקרים אחרים, כנימות עלה שונות יעבירו אותו נגיף. כך לגבי נגיף הטריסטזה; הוא מועבר בייעילות רבה — לפחות על-ידי שני מיני כנימות עלה (ראה להלן), וייתכן שגם על-ידי כנימות נוספות.

תהליך ההעברה של נגיף צמחי מפונדקאי נגוע לצמח בריא כולל את השלבים הבאים: ראשית כול — שלב של רכישת נגיף על-ידי אכילה מן הצמח הנגוע, ובהמשך — שלב ההדבקה. בין שלבים אלה על החרק המפיץ לעבור, עם בהליכה או במעוף, מהפונדקאי הנגוע אל הצמח הבריא. נגיפים שונים המועברים על-ידי כנימות עלה נבדלים זה מזה מבחינת פרקי-הזמן הדורשים לרכישת הנגיף והזמן הדרוש להדבקה.

קבוצה גדולה של נגיפים מאופיינת ברכישה והדבקה מהירות (ותך שניות). בקבוצה זו אין הנגיף מתמיד בחרק, ובחלוף זמן של שעות ואפילו לאחר פרקי-זמן קצרים יותר מאבד החרק המפיץ את יכולתו לגנוע צמחים חדשים. הפצה מעין זו נקראת העברה חולפת, וראוי לציין כי סגולה זו מאפיינת את הנגיף ולא את החרק המפיץ. בקבוצה אחרת של נגיפים תחול העברה רק בחלוף פרקי-זמן של מספר שעות או אפילו ימים. תקופה זו נחשבת תקופת דגירה. בחלק קטן מהנגיפים ובספירופלסמה כגון העלעלת מתרבה מחולל המחלה בגוף החרק המעביר, ואילו במקרים אחרים אין הוא מתרבה בגוף החרק — אך דרוש זמן ה"דגירה" לצורך הגעתו אל בלוטות הרוק של החרק המפיץ.

בקבוצה שלישית של נגיפים, זמן הרכישה המזערי הוא 5 דקות; אך בדרך-כלל תתקבל העברה טובה יותר ככל שיתארך משך הרכישה עד כדי 4 — 24 שעות. לאחר מכן הם יכולים לשאת את הנגיף במשך יום עד שלושה ימים, וההדבקה תארך דקות עד שעות. חלק קטן מנגיפי ההדרים מועברים באופן מכני, על-ידי מגע או מריחה של רקמה נגועה בבריאה. כלי עבודה, ובייחוד סכין ההרכבה, המזמרה והמקטפה, עלולים לשמש אמצעי להפצת הוירואידים מצמח חים נגועים לצמחים בריאים. חלק מהנגיפים התוקפים עצי פרי וגפן מועברים על-ידי נמטודות חפשיות, ונגיפים מסוימים התוקפים גידולי

## 1) היבטים כלליים

נגיפים נמנים עם מחוללי המחלות החשובים ביותר בהדרים. מחלות נגיפיות כגון טריסטזה ומחלות אחרות כגון greening, המופצות באמצעות רכב או חרקים, גורמות נזקים כבדים, ויש להן השפעה רבה על צירופי הזנים והכנות שאפשר לגדל באזור מסוים. נגיפים נבדלים ממחוללי מחלות אחרים כגון חידקים ופטיות — בתכונות הבאות:

- בדרך כלל, הם קטנים מכדי יכולת ההפרדה של מיקרוסקופ אור.
- הם מתרבים בתוך התאים החיים, והתרבותם תלויה במנגנונים הקיימים של התא.
- הרכבם הכימי של הנגיפים פשוט בדרך-כלל. ברוב הנגיפים הצמחיים, החומר התורשתי מורכב מסוג יחיד של חומצות גרעין מסוג RNA. רק בקבוצה קטנה של נגיפי צמחים החומר התורשתי הוא DNA. החומר התורשתי עטוף במעטפת חלבונית או במעטפת קרומית.

נגיפים שונים נבדלים במידה רבה בגדלם. הצורה הבסיסית של חלקיקי הנגיף פשוטה, והיא בעלת מבנה כדורי או גלילי או חוטי. רוב הנגיפים הכדוריים הם בעלי קוטר של 23 — 50 ננומטר (ננומטר — מיליונית המילימטר); ואילו הנגיפים האחרים, אלה שהם בעלי מבנה גלילי או חוטי, הם באורך של 200 עד 2000 ננומטר. יודגש כי אורך חלקיקי הנגיף — בדרך-כלל קבוע, ומשמש כמאפיין פיסיקלי יחודי של הנגיפים השונים.

וירואידים הם מחוללי המחלות הפשוטים ביותר, המוכרים כיום. הם בנויים ממולקולה RNA חד-גרילית מעגלית באורך 246 — 375 בסיסים בלבד. בניגוד לנגיפים, המטען התורשתי בוירואידים אינו עטוף במעטפת חלבונית, והמטען התורשתי קטן עד כדי פחות מ-10% מזה של הנגיפים הקטנים ביותר, המוכרים כיום.

ספירופלסמה שונים מנגיפים; הם נמנים עם קבוצת מיקרואורגניזמים הנכללים בסדרת Mollicutes. בדומה לחידקים ולמיקרואורגניזמים מורכבים אחרים, ניתן לגדל ספירופלסמה על מצע מזון; אך בניגוד לחידקים, ספירופלסמת ההדר *Spirplasma citri* חסרת דופן ועטיפתה קרומית בלבד. עקב מגבלה זו מתקיימות ספירופלסמות ומתרבות בטבע — רק בסביבות אוסמוטיות יציבות, כגון בצניורות השיפה של הצמחים או בהמולימפה (דם) של חרקים.

### כיצד נדבקים צמחים בנגיפים, בוירואידים ובספירופלסמה?

נגיפי צמחים אינם מצויים במנגנון עצמאי לחידה לתוך התא הצמחי. ההעברה הפשוטה והחשובה ביותר של נגיפי הדרים היא באמצעות רכב נגוע או כנה נגועה. ההרכבה משמשת גשר למעבר הנגיפים מרקמה נגועה לבריאה. חשוב לציין, שגם כאשר הרוכב והכנה קשורים זה עם זה כשבוע בלבד — קיים חשש, שבחלק מהשתילים יעברו הנגיפים מהרקמה הנגועה לבריאה. מכאן ברור, שגם במקרים שבהם לא הצליחה ההרכבה, מסיבה כל שהיא, והרוכב לא נקלט — יתכן שהכנה כבר נדבקה בנגיף שנכח ברוכב הראשון. וירואידים וספירופלסמות, וכן חידקים מסוימים, מופצים בדרך דומה לזו שבה מופצים נגיפים, אם על-ידי רכב או באמצעות גורמי

ירקות וגידולי שדה מופצים על-ידי פטריות בעלות חי-נבגים. בשלב זה לא דווח על הדבקה טבעית של הדורים על-ידי גורמים שבקרקע. אף כי הנגיף Tobacco Necrosis Virus (TNV) שנמצא במקרים מסוימים כמדביק הדורים — ידוע בגידולים אחרים כמועבר על-ידי פטריית קרקע.

### שיטות לזיהוי נגיפים

בניגוד למחלות שמחוללים אותן פטריות וחידקים מסוימים הניתנים לזיהוי ישיר לפי צורתם החיצונית, הרי שהזיהוי הראשוני של נגיפים תלוי בהופעת הסימפטומים, קרי שינויים חיצוניים בעץ הנגוע. שינויים אלה אינם בולטים תמיד, ולפעמים השוני החיצוני אינו יחודי וניתן לייחסו לגורמים אחרים, כגון הזנה לקויה, פגיעת חרקים או אי-התאמה פיסיולוגית בין הכנה לבין הרכב. לפני מספר שנים, האמצעי העיקרי לזיהוי הנגיף היה אמצעי הביולוגי. לצורך הזיהוי הביולוגי, הנקרא גם אינדקסנג, הסתייעו במיני הדורים שנמצאו רגילים ביותר לפגיעת נגיפים מסוימים. צמח המבליט סימפטומים יחודיים לאחר הדבקתו בנגיף — מכונה אינדיקטור, והסימפטומים של מחלות שונות יתבטאו במידה שונה — בהתאם לתנאי הגידול של האינדיקטור.

במקרים מסוימים יראה האינדיקטור סימפטומים שונים — כאשר יודבק בגזעים שונים של נגיף מסוים. לכן, כאשר מטרת האיבחון לאפיין את הגזע של הנגיף — נהוג להיעזר במספר אינדיקטורים. דוגמה, במקרה של נגיף טריסטזה: הדבקה על צמחי לימה חמוצה תתבטא בדרך-כלל בהתבהרות חלקית של עורקי העלים. סימפטומים מסוג זה אפייניים לכל גזעי הטריסטזה, וכאשר מעוניינים לאפיין ולהבדיל בין גזעים אלימים לבין בלתי אלימים — הכרחי לכלול שורה של אינדיקטורים נוספים, בכללם שתילי חושחש, לימון ואשכול-ליות, כדי לאפיין את מידת האלימות של הגזעים השונים לפונדקאים אלה.

בשנים האחרונות חלה התקדמות רבה בשיטות לאיבחון נגיפים, על-ידי מיקרוסקופ אלקטרוני ובשיטות סרולוגיות. כמוכן, השימוש בשיטות אלה מוגבל רק לנגיפים ידועים, שלגביהם הצטבר מידע רב. גם בקרב הנגיפים המאופיינים, הזיהוי במיקרוסקופ מוגבל לנגיפים בעלי מבנה מורפולוגי סגולי. כך, למשל, השימוש במיקרוסקופ אלקטרוני מאפשר זיהוי מהיר של נגיף הטריסטזה, מכיון שהחלקיק הוא בעל מבנה חוטי, השונה משל חלקיקים אחרים הנמצאים בתוך התא. מאידך גיסא, קשה לזהות נגיף כגון Crinckly leaf, מכיון שמבנהו הכדורי דומה לחלקיקים תאיים הקרויים רבחומים והנמצאים גם בצמח בריא.

לזיהוי נגיפים בשיטה הסרולוגית מזריקים תחילה את הנגיף המבודד לארנבת או לבעל-חיים אחר, כדי ליצור נוגדנים סגוליים נגד חלבון המעטפת של חלקיקי הווירוס. בבעל-החיים שבו הוזרק נגיף צמחי מסוים יופיעו כעבור מספר שבועות נוגדנים, המכירים באופן יחודי את הנגיף המוזרק. בערבוב נסיוב החיה עם רקמת צמחים המכילה את הנגיף — יתקשר הנוגדן הסגולי עם הנגיף ויגרום הצמחה (פרציפיטציה). רקמה בריאה או רקמה נגועה בנגיף אחר או בנגיפים אחרים תחסר את האנטיגן, החומר המעורר נוגדן. במקרה שלנו הנגיף הצמחי, וכתוצאה מכך לא תחול הצמחה. שיטות אלה רגישות למדי, ומאפשרות זיהוי כמויות קטנות של נגיף ברקמה הנגועה.

קיימות מספר שיטות לזיהוי סרולוגי. השיטה הפשוטה ביותר מבוססת על הפגשת הנוגדן עם הנגיף בצלחת המכילה אגר. בשיטה זו נעים הנוגדן והנגיף זה מול זה במצע האגר, ובמפגש בין הנוגדן לנגיף מופיע פס שקיעה אפייני. שיטה זו מהירה למדי. במקרים מסוימים התברר, שכמות הנגיף ברקמה הנגועה אינה מספיקה ליצירת פס שקיעה ברור.

שיטות אחרות שפותחו בשנים האחרונות לזיהוי נגיפים מבוססות על טכנולוגיה חדשה בתחום ההנדסה הגנטית. נמצא כי נגיפים סרטניים מסוימים מכילים אנזים, המסוגל לשעתק מולקולות RNA למולקולת DNA. ה-DNA המשוכפל יהיה בעל רצף בסיסים משלים לרצף הנגיף. כמשחררים את ה-DNA מרצף ה-RNA ששימש לשכפולו — ניתן להשתמש בו כאמצעי איבחון רגיש. מכיון שקטע DNA מעין זה מתקשר באופן סגולי רק לקטע DNA מקביל. גם בשיטה זו, זיהוי הקשר מתאפשר על-ידי תוספת סמן רדיואקטיבי ל-DNA המזהה. פיתוח נוסף של טכנולוגיה זו מאפשר כיום לסנתז גדיל נוסף של DNA, ועל-ידי כך מתקבל קטע DNA דו-גדילי, שאותו ניתן לשתול בתנאים מסוימים לתוך נגיף או פלסמיד הנישא בחידק. כאשר מבודדים מתוך החידקים את הפלסמידים הרקומביננטיים, המורכבים מ-DNA פלסמיד ומ-DNA ששוכפל על-גבי תבנית הנגיף — ניתן לסמן את הפלסמיד בסמן רדיואקטיבי, ולבדוק באמצעותו אם מיצוי חומצת הגרעין מצמח מסוים מכיל רצפים של RNA הנגיף. אם התמיסה מכילה את רצף ה-RNA האפייני לנגיף מסוים — קטע ה-RNA וקטע משלים מתוך DNA הרקומביננטי יעברו היברידיזציה (זיווג), ובעקבות כך ירוכז הסמן הרדיואקטיבי במקום האירוע. מאידך גיסא, אם לא נמצא RNA מתאים במדגם — אין ה-DNA נקשר, ולא יופיע כתם רדיואקטיבי.

שיטות אלה הותאמו בשלב זה לזיהוי מספר מועט של מחלות הדרים, בכלל טריסטזה, עלעלת ווירואידים מסוימים; ואילו לגבי רוב

מחלות ההדר האחרות עדיין אין אמצעי זיהוי ביוכימיים או סרולוגיים. שיטה ביוכימית אחרת לזיהוי נוכחות נגיפים מבוססת על בידוד ואיתור של RNA דו-גדילי המצוי בדרך-כלל ברקמה נגועה בנגיפים. נגיף ה-RNA משוכפלים כתאים תוך סינתזה של רצף משלים. שני הגדילים המשלימים ייצמדו זה לזה, והתברר כי הם בעלי תכונות שונות לחלוטין מאשר ל-RNA החד-גדילי. ה-RNA הדו-גדילי יציב ביותר, נוכחות קטעי RNA דו-גדיליים ברקמה יכולה לשמש אינדיקציה להדבקה בנגיפים. יתרון שיטה זו בכך, שהיא מתאימה לזיהוי נגיפים חדשים או סמויים. שיטה זו חשובה בייחוד לצורך בדיקת מדגמים בהסגר, העשויים לשאת נגיפים ומחלות חדשות שטרם ידוע כיצד לזהותם.

לאחרונה פותחו מספר שיטות המגבירות את רגישות הגילוי הסרולוגי פי אלף ויותר. שיטות אלה מבוססות על הצמדת תג רדיואקטיבי או תג אנזימטי לנוגדן. נוגדן מסוג זה ישמור על הסגוליות המיוחדת של זיהוי הנגיף, ואם הנוגדן יקשר לנגיף — יהיה אפשר לגלות זאת, אם באמצעי של זיהוי האיזור המקרין באמצעות פלטת צילום רגילה, או על-ידי תוספת של מצע יחודי לאנזים, המשנה את צבעו בעקבות הפעלת האנזים. באמצעות שיטות אלה, הקרויות Radio immuno assay (RIA) כשמדובר בתג רדיואקטיבי או Enzyme immuno assay (EIA) כאשר התג אנזימטי — ניתן לזהות כמויות מזעריות של נגיף או של ספירופלסמה. כמובן, השיטות הסרולוגיות ישימות רק במקרים שבהם ניתן לבודד את הנגיף וליצור נוגדנים סגוליים נגדו. ■