שימוש בכנות להגנת זני פלפל רגישים מפני Pepper mild mottle virus (PMMV).

חוקרים שותפים:

י. אנטיגנוס ע. לכמן מ. פרלסמן – המח' למחלות צמחים, היח' לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי.
חנה יחזקאל – מו"פ דרום.
א. קורן – משתלות חישתיל.

<u>תקציר:</u>

1. **הצגת הבעיה** : חלק מזני האיכות של פלפל, חסרי עמידות כנגד Pepper mild mottle virus (PMMV) ועל כן קיים צורך למצוא פיתרונות שיאפשרו גידול זנים כאלו בקרקעות המאולחות במידבק ויראלי.

2. **מטרות המחקר :** מחקר יישומי האמור להוביל למציאת כנות פלפל בעלות עמידות מירבית ל-PMMV, אשר ימנעו הדבקה ממידבק הנמצא בקרקע או על פני הזרעים ויהיו בעלות מתאם רצוי עם הרוכב, באופן שתושג הגנה מפני הוירוס ולא תיפגע איכות הפרי וכמותו.

3. **שיטות ומהלך העבודה** : הרכבת השילובים השונים של כנות ורוכבים נעשתה במשתלות חישתיל, הדבקת שרשי הכנות נעשתה ע"י טבילתן במידבק ויראלי נקי בעל ריכוז ידוע. הדבקת הצמחים והתפשטות הוירוס לחלקי הצמח המורכב נבדקה בעזרת ELISA עם אנטיסרום ספציפי לוירוס ובעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני.

4. **תוצאות עיקריות :**
קוי פלפל איזוגניים בלתי מורכבים הנושאים את הגן L^4 לעמידות כנגד PMMV במצב הומוזיגוטי והטרוזיגוטי הודבקו דרך מערכת השורשים עם מידבק של PMMV. נבחנה יכולתו של הוירוס לעבור ממערכת השורש אל הנוף בטמפ' של 25^0C בהשוואה לטמפ' של 35^0C. נמצא כי בשתי הטמפרטורות מצליח הוירוס לשבור את העמידות ההומוזיגוטית וההטרוזיגוטית, לעבור אל הנוף ולהתרבות בו ללא יצירת תגובה נקרוטית בעלים כפי שקורה כאשר גנוטיפים אלו מודבקים מכנית על העלים. בניסוי שדה שנערך בתנאי חממה מסחרית אובחנה התמוטטות צמחי פלפל בהם הורכב זן רגיש על כנות פלפל הנושאות עמידות הטרוזיגוטית והומוזיגוטית.

5. **מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות :**
אנו מניחים כי יכולת השבירה של העמידות מותנית בכמות המידבק אליו נחשפת מערכת השורשים וברמת הפציעה שלה. כמות המידבק הגבוהה בה השתמשנו בניסוי וגם הפציעה האגרסיבית של מערכת השורשים לפני הדבקה אינם מיצגים את המצב השכיח בשטח. אנו מעריכים כי ברמות מידבק "טבעיות" ניתן יהיה להגן על הרוכב הרגיש מפני הדבקה מהקרקע. השערה זו מבוססת על הצלחתנו להגן על רוכב של הזן רמירו הרגיש לוירוס בשטח מסחרי שהקרקע בו אולחה כתוצאה ממספר מחזורי גידול של צמחים נגועים (ראה דו"ח שנה א'). כדי לאמת נקודה זו יישתל הניסוי בעונה הקרובה במבנה שבו נדבקו כל השילובים והקרקע בו מאולחת ברמה המיצגת מצב טבעי.

מבוא ותאור הבעיה

וירוס הנימור המתון של הפלפל (Pepper mild mottle virus (PMMV, שייך לסוג *Tobamovirus* נימצא לראשונה באיטליה (Wetter, 1984) וכיום נפוץ בעולם כולו ומצטיין כמו וירוסים אחרים מקבוצה זו בתכונות של שרידות גבוהה, יכולת לעבור בזרעים ובמצע הגידול. קימים גזעים שונים של וירוס זה שעברו קו-אבולוציה עם הגידול בעקבות החדרת עמידות גנטית לזני הפלפל. רמת העמידות הגבוהה ביותר מוקנית ע"י הגן L^4. PMMV על מגוון גזעיו פוגע קשות בפרי הפלפל, גורם לו עיוותים, יוצר גבשושיות והופעת מוזאיקה על פני הפרי, תופעות הפוסלות אותו לשיווק. יכולתו של הוירוס לעבור בזרעים, בקרקע ובמגע מכני עם הנוף מאפשרים התפשטותו המהירה וגרימת נזקים בהיקף מאוד משמעותי. גזע הוירוס $p_{1,2,3}$ PMMV הנפוץ היום בישראל, מחייב שימוש בזנים עמידים הנושאים את הגן לעמידות L^4, אך מספרם של אלו מצומצם יחסית והם אינם מציעים מגוון מספיק רחב של איכויות הורטיקולטוריות, מצב המחייב מגדלים להשתמש בזנים רגישים (הזן רמירו או זנים דמויי רמירו למשל). תרבות הגידול של פלפל בישראל מבוססת על מונו קולטורה, המגבירה את הסיכוי להתפשטות מחלות הנישאות בקרקע ובכלל זה גם PMMV. בחלקות בהן מופיעה המחלה נוצר אילוח מסיבי של הקרקע כתוצאה מקיומן של שאריות שרשים ווירוס חפשי, מצב היוצר איום על הגידול הבא. חיטוי בפורמלין מצמצם במידת מה את כמות המידבק בקרקע אך חומר זה רעיל במיוחד וגם אינו קוטל ביעילות מספיקה וירוס הנישא בשאריות עלים ושרשים או נימצא בקרקע בנוכחות חומר אורגני. לאחרונה פיתחנו שיטת שתילה לתוך תווך חוצץ הנותנת הגנה טובה מפני הדבקה דרך הקרקע, אך אינה פותרת מצבים בהם מגיע המידבק באמצעות זרעים מאולחים אשר מקליפתם נישטף הוירוס אל בית השורשים של השתיל ומדביקו. מחקר זה מכוון לבחון שימוש בכנות הנושאות את הגן לעמידות L^4 כנגד הגזעים הנפוצים של PMMV ובאופן זה לחסום באופן יעיל את שני מסלול ההתפשטות העיקריים של הוירוס: מעבר בזרעים מאולחים ומעבר דרך הקרקע.

שיטות וחמרים

1. בחינת השפעת הטמפרטורה על העמידות של קוים איזוגניים הנושאים את הגן L^4 במינון שונה כנגד PMMV (ניסוי בפיטוטרון)

הקוים האיזוגניים הבאים התקבלו מדר' יוני אלקינד, הפקולטה לחקלאות ברחובות :

R6-750-b (L^4 L^+) , R6-751-b (L^4L^4) ,R6-759 (L^+L^+).

שלוש קבוצות צמחים בלתי מורכבים בגיל שבעה עלים אמיתיים, המייצגות את הגנוטיפים הנ"ל הודבקו דרך מערכות השורשים שלהן בתאריך 17-01-08. לצורך ההדבקה נחתך השליש התחתון של גוש השורשים בכל עציץ וחלקו התחתון של הגוש ניטבל בתמיסת מידבק מנוקה של PMMV בריכוז של 100µg/ml, אח"כ הוחזר הצמח לעציץ. כל אחת מהקבוצות חולקה לשתי תת קבוצות (4 צמחים בכ"א) שכ"א מהן שהתה בטמפרטורה שונה. תנאי הניסוי בפיטוטרון היו כדלקמן :

חדר 1: טמפרטורת יום (6:00-18:45) 25^0C, טמפרטורת לילה (18:45-6:00) 18^0C ו-65% לחות. השקייה פעמיים ביום (8:00, 16:00) למשך 5 דקות כל אחת, במים מדושנים המכילים 20cc/10L "שפר 1" (דשנים וחומרים כימיים, קרית אתא, ישראל).

חדר 2: טמפרטורת יום (6:00-18:45) 35^0C, טמפרטורת לילה (18:45-6:00) 26^0C ו-65% לחות השקייה שלוש פעמים ביום (8:00, 13:00, 18:00) למשך 7 דקות כל אחת, במים מדושנים המכילים 20cc/10L "שפר 1".

כשלושה שבועות לאחר ההדבקה נדגמו עלים מקודקוד הצמחים של כ"א מהגנוטיפים בשתי הטמפרטורות ונערכה אליזה כדי לבחון אפשרות של מעבר הוירוס ממערכת השורשים המודבקת אל חלקו העליון של הנוף.

2. ניסוי שדה לבחינת כשר ההגנה של כנות נושאות עמידות כנגד PMMV על רוכב רגיש לוירוס

הניסוי נערך בחוות הבשור. הרוכב הרגיש שניבחן בניסוי היה מהזן מזורקה (Rijk Zwaan) בעל הגנוטיפ L^+L^+ הידוע ברגישותו הגבוהה ל - PMMV . שתי הכנות הנושאות עמידות כנגד PMMV שנבחנו בניסוי היו M/1080 (קו הומוזיגוטי עמיד בעל גנוטיפ L^4L^4 התקבל מאילן פארן המח' לגנטיקה, מכון וולקני) והזן העמיד M\G [Blocky Red 6522-N] המשווק ע"י חב' גרין בעל הגנוטיפ $L^4\ L^+$.

במסגרת הניסוי נבחנו השילובים הבאים של כנה-רוכב : מזורקה על מזורקה, מזורקה בלתי מורכב, מזורקה על Blocky Red , מזורקה על M\1080. ההרכבות בוצעו במשתלות חישתיל.

הניסוי נערך בשתי מיני חממות בגודל של 250 מ"ר כ"א. בכל מבנה היו 6 ערוגות, ארבע מהן שימשו את הניסוי ושתיים שמשו כשוליים. במבנה אחד נבחנו הכנות הנ"ל לאחר שהודבקו דרך מערכת השורשים ע"י קיטומה וטבילתה במידבק ויראלי מנוקה (100µg/ml) לפני השתילה בקרקע. הדבקה חוזרת של הצמחים נערכה בחלקה המודבקת כשלושה שבועות לאחר ההדבקה (08-09-3), ע"י החדרת להב של סכין יפני לבית השורשים כדי לפוצעו והזרקת 10מ"ל תמיסת מידבק ויראלי בריכוז 300 µg/ml לאזור המטופל בסכין. במבנה שכן נבחנו אותם השילובים של רוכב/כנה ללא הדבקה במטרה לבחון את השפעת הכנה על התפתחות הרוכב, איכות היבול וכמותו.

הצבת הניסוי בכ"א מהחממות נעשתה עפ"י תכנית של ריבוע לטיני. כל אחד מהשילובים של רוכב/כנה הופיע בארבעה בלוקים ובארבע חזרות. כל חזרה כללה ערוגה באורך 4.5 מ' שהכילה 22 צמחים בשתי שורות השתולים במרווח של 40 ס"מ. תאריך השתילה היה ב-08-08-11. הצמחים הודלו בשיטה הספרדית. משטר הדישונים והגנת הצומח בחלקות הניסוי היה זהה למקובל בחלקות מסחריות.

תוצאות ודיון

<u>1. בחינת השפעת הטמפרטורה על העמידות בקוים האיזוגניים הנושאים אללים של הגן לעמידות (L) במינון שונה כנגד PMMV</u>

נבחנו שלושה גנוטיפים של צמחי פלפל אקזוגניים בלתי מורכבים הנושאים את האלל L^4 לעמידות כנגד גזע הוירוס P_{123} PMMV : א. הומוזיגוט דומיננטי עמיד (R6-751b) ב. הטרוזיגוט (R6-750-b)

עמיד ג. והומוזיגוט רצסיבי רגיש (R6-759) . הדבקת הצמחים התבצעה דרך מערכת השורשים. הצמחים הודבקו בגיל 7 עלים אמיתיים עם תכשיר וירוס מנוקה בריכוז 100 µg/ml. ההדבקה נערכה ע"י קיטום ציצת שרשי הצמחים וטבילת בתמיסת הוירוס המנוקה לפני שתילתם בקרקע.

הצמחים של שלושת הגנוטיפים חולקו לשתי קבוצות כשאחת הוחזקה בפיטוטרון בטמפרטורה של 25^0C ואילו השניה שהתה במתקן בטמפרטורה של35^0C (ראה שיטות וחומרים). כחודש לאחר ההדבקה נלקחו דגימות עלים מקודקודי הצמחים כדי לבחון את יכולת הוירוס לפלוש ממערכת השורשים אל הנוף.

טבלה 1 : עמידות כנגד PMMV של קוי פלפל איזוגניים הנושאים את האלל L^4 ומודבקים דרך מערכת השרשים .

35^0C					25^0C				
	ערכי אליזה*			נגיעות		ערכי אליזה*			נגיעות
הגנוטיפ	דוגמה א'	דוגמה ב'	ממוצע		הגנוטיפ	דוגמה א'	דוגמה ב'	ממוצע	
L^+L^+	1.445	1.690	**1.567**	**5/6**	L^+L^+	1.800	1.024	**1.412**	**6/6**
L^+L^+	0.770	0.649	**0.709**		L^+L^+	1.738	1.584	**1.661**	
L^+L^+	0.074	0.050	**0.006**		L^+L^+	0.156	0.161	**0.153**	
L^+L^+	0.172	0.109	**0.140**		L^+L^+	0.360	0.480	**0.420**	
L^+L^+	0.679	0.657	**0.668**		L^+L^+	1.785	1.886	**1.835**	
L^+L^+	1.099	1.009	**1.054**		L^+L^+	0.147	0.258	**0.202**	
L^4/L^4	0.067	0.030	**0.05**	**1/4**	L^4/L^4	0.570	0.612	**0.591**	**4/4**
L^4/L^4	0.152	0.148	**0.15**		L^4/L^4	0.131	0.597	**0.364**	
L^4/L^4	0.040	0.044	**0.04**		L^4/L^4	0.110	0.121	**0.115**	
L^4/L^4	0.001	0.206	**0.015**		L^4/L^4	0.107	0.119	**0.113**	
L^4/L^+	0.056	0.152	**0.104**	**3/5**	L^4/L^+	0.174	0.171	**0.172**	**5/5**
L^4/L^+	1.459	1.290	**1.375**		L^4/L^+	1.386	1.320	**1.353**	
L^4/L^+	0.074	0.110	**0.092**		L^4/L^+	1.706	1.600	**1.650**	
L^4/L^+	0.117	0.181	**0.149**		L^4/L^+	0.389	0.230	**0.309**	
L^4/L^+	-	-	-		L^4/L^+	0.541	0.410	**0.475**	
	0.030	0.042	**0.036**						

* רמת הרקע הבלתי ספציפי הממוצעת (שלוש דגימות) שהתקבלה בבדיקת מוהל מצמחים בריאים של היתה **OD_{405} 0.03**.

המסקנות הנובעות מהתוצאות המוצגות לעיל

1. כמצופה הרגישות להדבקה היתה גבוהה ביותר בצמחים ההומוזיגוטים הרצסיביים (L+L+) הרגישים לוירוס. צמחים אלו נדבקו בשתי הטמפרטורות וטיטר הוירוס בעלים היה גבוה כפי שהדבר בא לביטוי בערכי אליזה גבוהים.

2. למרות העמידות המוצהרת של הגנוטיפ ההטרוזיגוטי (L^4/L^+) וההומוזיגוטי (L^4/L^4) כנגד PMMV ניתן היה לשבור עמידות זו ע"י הדבקת הצמחים דרך מערכת השורשים. בד"כ טיטר הוירוס בצמחי הגנוטיפ ההומוזיגוטי היה הנמוך ביותר.

3. למרות חדירת הוירוס לנוף הצמחים העמידים הנושאים את האלל L^4 לא הופיעה בצמחים תגובה של יצירת local lesions נקרוטיים בדומה לתגובה המתקבלת כאשר עלי גנוטיפים עמידים מודבקים מכנית .

כדי לבחון האם ערכי האליזה החיוביים שהתקבלו בגנוטיפים ההומוזיגוטים וההטרוזיגוטים הנושאים את האלל L^4 מיצגים נוכחות וירוס אינפקטיבי ברקמה, נדגמו עלים קודקודיים של צמחים מגנוטיפים אלו. העלים רוסקו בבופר והודבקו על צמחי בוחן (*Nicotiana benthamiana* המשמש כצמח בוחן לוירוס).

טבלה 2 : בדיקה לנוכחות PMMV בקודקודי צמחים איזוגניים הומוזיגוטים והטרוזיגוטים הנושאים את האלל L^4 לעמידות כנגד PMMV ומודבקים דרך מערכת השרשים.

מס צמח	גנוטיפ	טמפרטורה	*ELISA	אינפקטיביות
8	L^4/L^4	35^0	**0.15**	+
10	L^4/L^4	35^0	**0.103**	-
11	L^4/L^+	35^0	**0.104**	+
12	L^4/L^+	35^0	**1.375**	+
15	L^4/L^+	35^0	**0.149**	-
17	L^4/L^4	25^0	**0.591**	+
18	L^4/L^4	25^0	**0.364**	-
19	L^4/L^4	25^0	**0.115**	+
20	L^4/L^4	25^0	**0.113**	-
21	L^4/L^+	25^0	**0.172**	+
23	L^4/L^+	25^0	**1.650**	+

*קריאת הרקע הבלתי ספציפי הממוצע היתה OD_{405} 0.07.

הנתונים המופיעים בטבלה 2 מעידים על נוכחות וירוס אינפקטיבי בקודקודי צמחים בעלי גנוטיפ הטרוזיגוטי והומוזיגוטי לאלל L^4, שהודבקו דרך מערכת השרשים.

כדי לוודא את זהות הוירוס נלקחה מכ"א מצמחי הפלפל הנ"ל דגימה של כשני גרם עלים ומהם הוכן תכשיר ויראלי מנוקה. התכשיר ניבדק ב-EM ובנוסף הוא הורץ על ג'ל של אקרילאמיד לזיהוי חלבון המעטפת הויראלי עפ"י גדלו והתגובה הסרולוגית שהוא נותן עם אנטיסרום ספציפי כנגד PMMV. נלקחו דגימות של 3 מיקרוליטר מכ"א מהתכשירים המנוקים ואלה הורצו על ג'ל של אקרילאמיד לזיהוי נוכחות של חלבון המעטפת הויראלי.

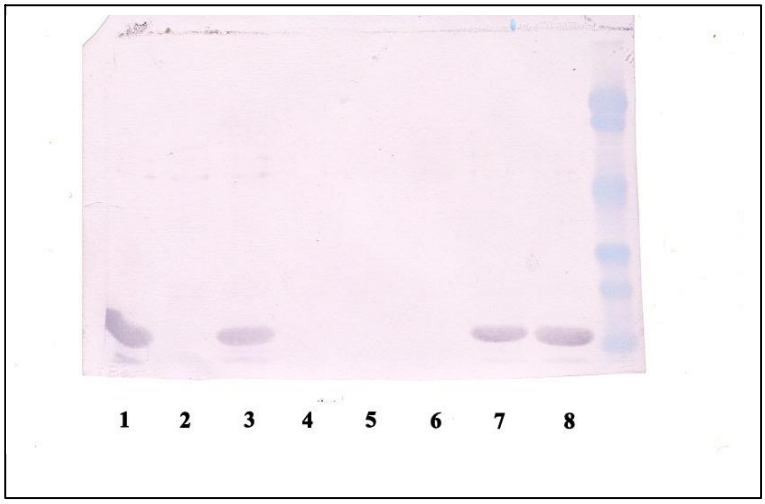
הופעת בנדים המיצגים את חלבון המעטפת של PMMV מצביעה על נוכחות חלקיקים ויראליים בחלק מהתכשירים המנוקים. לממברנה כנ"ל נערך Westren blot תוך שימוש באנטי סרום ספציפי ל-

PMMV. התוצאות המוצגות באיור 2 מאשרות כי אכן הבנדים המופיעים באיור 1 מיצגים את חלבון המעטפת של PMMV .

איור 1 : **זיהוי חלבון המעטפת הוויראלי של PMMV בתכשירי וירוס שהופקו מעלי צמחים הטרוזיגוטים והומוזיגוטים לאלל L4 שהודבקו בוירוס דרך מערכת השורשים. התכשירים הופרדו על ג'לים של אקרילאמיד.**

מקרא : **1**. L^{+}/L^{+} **2**. L^{4}/L^{4} **3**. L^{4}/L^{+} **4**. L^{4}/L^{4} **5**. L^{4}/L^{4} **6**. L^{4}/L^{4} **7**. L^{4}/L^{+} **8** . $L^{4}/L+$ **9**. חלבוני מרקר

איור 2 : זיהוי סרולוגי של חלבון המעטפת הוויראלי של PMMV בעזרת Western blot של תכשירי וירוס שהופקו מקוים איזוגניים הטרוזיגוטים והומוזיגוטים לאלל L^4 שהודבקו בוירוס דרך מערכת השורשים.



מקרא : כמו באיור 1 .

סידרת הניסויים המתוארת לעיל מוכיחה כי ניתן לשבור את העמידות ההומוזיגוטית וההטרוזיגוטית כנגד PMMV המוקנית לפלפל ע"י האלל L^4, ע"י הדבקה דרך מערכת השרשים. יתכן שרמת הביטוי של הגן

במערכת השורשים אינה מספיק גבוהה בהשוואה לביטוי בעלווה ולכן מנגנון העמידות כנגד מידבק הנמצא בקרקע בריכוז גבוה לא תמיד מצליח למנוע את התפשטות הוירוס.

בניסויים שערכנו בשנת המחקר הראשונה (ראה דו"ח שנה א') עם הקוים האיזוגניים בתנאי חממה (עציצים) וגם בתנאי בית רשת (דליים) גרמה ההדבקה דרך מערכת השורשים לשבירת העמידות של הגנוטיפ ההטרוזיגוטי אך בשני המקרים לא שברה ההדבקה מהקרקע את עמידות הגנוטיפ ההומוזיגוטי דומיננטי (L^4L^4). בניסויי הפיטוטרון של השנה הנוכחית בהם נבחנו גנוטיפים עמידים בלתי מורכבים, נמצא כי גם העמידות המוקנית ע"י הגנוטיפ L^4L^4 עשויה להישבר בתנאים של הדבקה מהקרקע.

בניסויים אלו התגלו חלקיקי וירוס בנוף של הגנוטיפים העמידים אך לא התפתחו local lesions על העלים כפי שקורה בהדבקה מכנית של נוף צמחים עמידים. יתכן שפציעת האפידרמיס בזמן הדבקה מכנית של הנוף נדרשת בתהליך המוביל ליצירת ה- local lesion ניראה כי במצב של הדבקה מהשורש פורץ הוירוס אל העלווה דרך מערכת ההובלה ואינו מפעיל את המנגנון המשרה תגובה היפרסנסיטיבית.

2. ניסוי שדה לבחינת כשר ההגנה של כנות נושאות עמידות כנגד PMMV על רוכב רגיש לוירוס

הניסוי נערך במתכונת המתוארת בשיטות וחומרים. בבדיקה שנערכה כחודש לאחר ההדבקה החוזרת התגלתה התמוטטות כללית של השילובים הכוללים רוכב רגיש מורכב על כ"א משתי הכנות העמידות (1080, 6522) (טבלה 3, איור 3B, 3C) . ההתמוטטות כללה הופעה של נקרוזה בגבעול הכנה (איור 3C) והתנוונות מערכת השורשים (איור 3D). לא נמצאה התמוטטות של צמחים מורכבים בהם הורכב הזן הרגיש מזורקה על מזורקה או במקרה של צמחי מזורקה בלתי מורכבים (איור 3A). כל הצמחים בשני הטיפולים האחרונים נדבקו סיסטמית והראו סימני מוזאיקה אפיניים ל-PMMV. בבית הגידול בו גדלו שילובי רוכב /כנה ללא הדבקה בוירוס, היתה התפתחות הצמחים נורמלית ולא התגלו תופעות של התמוטטות.

טבלה 3 : שעור ההתמוטטות של צמחי פלפל מורכבים הכוללים שילוב של רוכב רגיש על כנות עמידות ורגישות ל-PMMV לאחר הדבקה של מערכת השורשים.

השילוב	שעור ההתמוטטות				סה"כ	% התמוטטות
	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4		
מזורקה\מזורקה	0/22	0/22	0/22	0/22	0	0
מזורקה	0/22	0/22	0/22	0/22	0	0
מזורקה\1080	11/22	15/22	21/22	19/22	66	75
מזורקה\6522	3/22	12/22	19/22	22/22	56	64

עלים שנדגמו מקודקודי הרוכבים של צמחים שהתמוטטו רוסקו בבופר והודבקו מכנית לצמחי בוחן (*Nicotiana glutinosa*). בכל המקרים היו תוצאות ההדבקה חיוביות דהיינו הוכחה נוכחות וירוס אינפקטיבי ברוכבים הנבדקים. בבדיקות נוספות הופקו תכשירים ויראליים מנוקים מהעלים הנדגמים ונוכחות ויריונים של PMMV שנמצאו בתכשירים אלו מוצגת באיור 4. תוצאות הניסוי מדגימות באופן ברור כי הדבקה דרך מערכת השורשים של גנוטיפים עמידים של פלפל הנושאים את האלל L^4 באופן

הומוזיגוטי או הטרוזיגוטי גורמת לשבירת העמידות כנגד PMMV. אנו מניחים כי יכולת השבירה של העמידות מותנית בעיקר בכמות המידבק אליו נחשפת מערכת השורשים וברמת הפציעה של מערכת השורשים הקובעת את מספר מוקדי החדירה. ככל שקטנה כמות המידבק ורמת הפציעה של רקמת השורש כן קטן הסיכוי לשבירת העמידות. בניגוד לתוצאות השנה הראשונה התברר כי הדבקת מערכת השורשים יכולה לגרום לשבירת העמידות גם בכנה בעלת גנוטיפ עמיד הומוזיגוטי דומיננטי (L^4L^4). אנו מעריכים כי שבירת העמידות בניסוי נבעה מחשיפת מערכת השורשים למנות מידבק גבוהות במיוחד מצב שלא מתקיים בתנאים רגילים בשטח. התמוטטות הצמחים בשילובים של רוכב רגיש על כנה עמידה מוסברת בחדירת הוירוס אל הפלואם של השורש ותנועה לכיוון הרוכב הרגיש תוך כדי התרבות ברמה נמוכה. ברוכב הרגיש שבו אין שום עכבות להתרבות הוירוס מתרחשת סינתזה מוגברת של הוירוס (איור 4) וחלקיקי הוירוס הנוצרים חוזרים עם זרם המוטמעים אל הכנה. היווצרות טיטר גבוה של וירוס בכנה העמידה יוצר תגובה היפרסנסיטיבית חזקה והנקרוזה הנוצרת כתוצאה מכך במערכת ההובלה גורמת להתמוטטות הצמח (איור 3D, איור 3B) . קיומו של מנגנון משוער זה נתמך בעובדה שלא ניתן היה לזהות היווצרות נקרוזות בצמחים בלתי מורכבים בעלי גנוטיפ L^4L^4 או $L^4\ L^+$ שבהם הצליח הוירוס להתפשט סיסטמית אל הנוף (ראה סעיף 1 בפרק תוצאות ודיון).

אנו מעריכים כי ברמות מידבק "טבעיות" ניתן יהיה להגן על הרוכב הרגיש מפני הדבקה מהקרקע. השערה זו מבוססת על הצלחתנו להגן על רוכב של הזן רמירו הרגיש לוירוס בשטח מסחרי שהקרקע בו אולחה כתוצאה ממספר מחזורי גידול של צמחים נגועים (ראה דו"ח שנה א'). כדי לבחון נושא זה יישתל הניסוי בעונה הקרובה במבנה שבו נדבקו כל השילובים והקרקע בו מאולחת ברמה המיצגת מצבים "טבעיים".

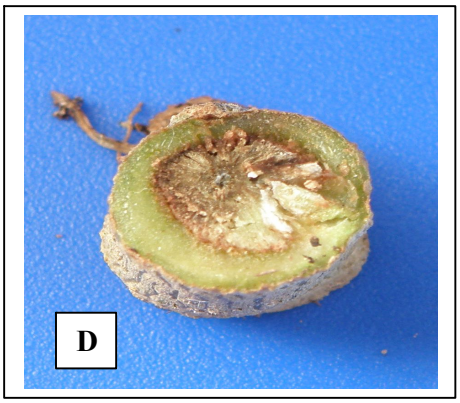
איור 3 :

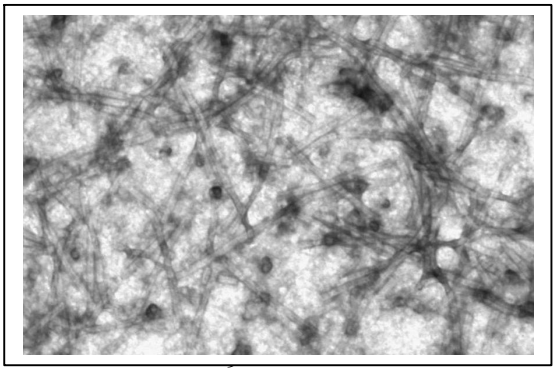
התמוטטות צמחי פלפל מורכבים בשילוב של רוכב רגיש על כנה בעלת עמידות הומוזיגוטית לאחר הדבקה מלאכותית מהקרקע

הדבקה סיסטמית דרך מערכת השורשים של צמחי פלפל מורכבים בשילוב של רוכב רגיש וכנה רגישה ללא התמוטטות

התמוטטות צמחי פלפל מורכבים בשילוב של רוכב רגיש על כנה בעלת עמידות הטרוזיגוטית לאחר הדבקה מלאכותית מהקרקע

תגובה נקרוטית בגבעול כנה בעלת עמידות כנגד PMMV המובילה להתמוטטות הצמח



התנוונות מערכת השרשים של כנות בעלות עמידות ל-PMMV שהודבקו באופן מלאכותי דרך מערכת השורשים

איור 4 : חלקיקי PMMV שהופקו מעלי רוכב מורכב על כנה עמידה ל- PMMV שהודבקה דרך מערכת השורשים.