

מודל לשימוש במעודדי נביטה המופקים מהפונדקאי לשיפור הדברת גופי קיימא פטרייתיים תוך צמצום השימוש בכימיקלים

Host-derived germination inducers of fungal conidia as an approach for reducing the use of chemical fungicides

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

אמנון ליכטר, תקן; המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף, מינהל המחקר החקלאי – בית דגן; ריכוז המחקר, ופיטופתולוגיה vtlicht@agri.gov.il

דני אשל, תקן; המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף, מינהל המחקר החקלאי – בית דגן; בידוד וזיהוי מרכיבים פעילים מהרקמה הצמחית וניסויי הדברה בבטטה.

פאולה טפר-במנולקר, תקן; המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף, מינהל המחקר החקלאי – בית דגן; פיתוח תהליכי כרומוטוגרפיה.

שמואל כרמלי, בית הספר לכימיה אוניברסיטת תל אביב; בידוד וקביעת מבנה של חומרי טבע.

Amnon Lichter, Department of Postharvest Science, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250.

Email: vtlicht@agri.gov.il

Dani Eshel, Department of Postharvest Science, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. Email:

dani@volcani.agri.gov.il

Paula Teper-Bemmolker, Department of Postharvest Science, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. Email: paula@volcani.agri.gov.il

Shmuel Carmeli, Department of Postharvest Science, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250.

Email: carmeli@post.tau.ac.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

*

	תוכן עניינים
2	תקציר
2	מבוא
5	מטרות המחקר
5	פירוט עיקרי הניסויים
16	דיון
17	סיכום עם שאלות מנחות
18	ביבליוגרפיה

1. תקציר

הצגת האתגר המחקרי: פטריות פתוגניות משתמשות בגופי-קיימא רדומים כמנגנון הישרדות, על גבי האיבר הצמחי, בשל עמידותם הגבוהה יותר לפעולות הדברה. עם היווצרות תנאי סביבה מתאימים כגון פצע ברקמה, נובטים גופי הקיימא חודרים לרקמה הצמחית ויוצרים ריקבון אופייני.

מטרות המחקר: לפתח מודל חדשני להדברת גופי קיימא פתוגניים רדומים, בו מופעל משרן להתעוררות, תפיחה וואו נביטה אפופטוטית של גופי הקיימא לפני פעולת ההדברה.

שיטות העבודה: שימוש בנבגי הפטרייה ריזופוס, הגורמת לריקבונות מימיים בבטטה, לפיתוח מבחן ביולוגי. אפיון כושר החישה של נבגי הריזופוס לסביבה, טרום נביטתם. בחינת היחלשותם של הנבגים בעקבות השראת נביטתם. התמקדות בתהליך תפיחת הנבג ובהקשר זה בפעולתם של חלבוני תעלות מים (אקווה-פורינים) המעוגנים בממברנת הנבג, ומאפשרים את חדירת הנוזלים לתוכו.

תוצאות עיקריות: קבוצת החומרים המשרה נביטה בודדה ונמצאה כמכילה תערובת חומצות אורגניות, חומצות אמינו וגלוקוז. אופטימום תפיחה ונביטה נמצא ב- pH 4.5 כשגלוקוז לבדו גרם לתפיחת הנבגים רק במדיום חומצי (pH 4.7). שילוב הפרקציה המכילה חומצות עם פרקציית הגלוקוז גרמו לתפיחה וצמיחה של נחשון נביטה, כבר לאחר 24 שעות הדגרה. נבגים שטופלו במשרן הנביטה (SPAF) והושרו למשך 5 דקות בתמיסת כספית, עוכבה תפיחתם והם אף לא נבטו. ממצאים אלו העלו את ההשערה שהשראת הנביטה מתווכת על ידי תעלות מים - אקוואפורינים. זוהו שני גנים המקודדים לתעלות מים בריזופוס ונמצא ביטוי דיפרנציאלי של שני הגנים במהלך תפיחה ונביטה של נבגי ריזופוס. נבנה עץ פילוגנטי, הכולל את שני הגנים שנמצאו בריזופוס, שהצביע על "מרחק" גדול יחסית מפטריות פתוגניות אחרות. אופיינה פעילותם של חלבונים האקוואפורין מריזופוס במערכת מודל של פרוטופלסים של ארבידופסיס וכן זוהה מיקומם הממברנלי בנבגים. באמצעות מוטציה נקודתית באחד החלבונים הוכחה חשיבותם של שני שיירי היסטידין חיצוניים בחלבון בחיטת חומציות הסביבה.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: להשתמש באקוואפורינים שנחקרו כחלבוני מטרה, בגישת הדברה עתידית של ריזופוס, החותרת לבקר את התנפחות הנבג ונביטתו בשילוב עם אמצעי הדברה אחרים.

2. מבוא

2.1. **הצורך בהדברה יזידותית ומשולבת לאחר קטיף-** מרווח הזמן הקצר לעיתים שבין שלב האחסון לאחר קטיף לבין הגעת המוצר לשולחנו של הצרכן מקשה על הרישוי והשימוש של כימיקלים רבים להדברת מחלות אחסון.

קיימת גם דרישה ציבורית רחבה, בעיקר בשוקי היצוא לצמצום השימוש באותם כימיקלים מורשים. מכאן הפניה הטבעית של המגדלים והמאחסנים לחיפוש אחר פתרונות יזידותיים לסביבה לצמצום הפחת הנגרם על ידי מחלות אחסון.

טיפול בחום הינו דוגמא לטיפול יזידותי לאדם ולסביבה שנמצא כמדביר גורמי מחלה בתוצרת חקלאית לאחר קטיף [1-3]. אלא שבכדי להגיע לרמת יעילות גבוהה בהדברת הפתוגן, לעיתים יש להפעיל עוצמת חום או משך חימום הגורם לפגיעה ברקמה הצמחית [3, 4]. חיטוי בחימום עלול גם לגרום לשינוי דרמטי בהרכב האוכלוסייה המיקרוביאלית המאכלסת את שטח הפנים של הפריורק המטופל ולהביא להתפתחות פתוגנים משניים שאינם מהווים בדרך כלל בעיה חקלאית.

שילוב אמצעים הפועל דרך מספר מנגנוני פגיעה בפתוגן, מפחית גם את הסיכוי להתפתחות עמידות לגורמי ההדברה [5]. אלא שהדברה משולבת דורשת התאמה בין גורמי ההדברה, כך שיישום גורם אחד לא יפגע בפעולתו של הטיפול הבא אחריו.

2.2. תהליך הנביטה של נבגי הפתוגן: מהישרדות להתקפה - תהליך נביטת הנבג הוא השלב הראשון במחזור החיים של פטריות קורים. זהו תהליך התפתחותי בו חלה התנפחות של הנבג, עקב חדירת נוזלים מבוקרת ונוצר נחשון הנביטה אשר ממנו מתפתח תפטיר הפטרייה. תהליך זה מתחלק לארבעה שלבים עיקריים: א. שבירת תרדמה, ב. גידול איזוטרופי, ג. קביעת הפולאריות של התא, ו- ד. יצירת נחשון הנביטה [6, 7]. במיני פטריות רבים השלב הראשון עשוי להתרחש בתגובה לגורמים סביבתיים חמצן, קרינה או מים בלבד [8, 9]. מסוימים דרוש, בשלב זה, צירוף של מספר גורמים סביבתיים המבטאים סביבה מוגדרת ומתאימה לנביטה הכוללת בד"כ חומרי מזון. ישנם מיני פטריות אשר נבגיהן נובטים בנוכחות מים בלבד לעומתם, בפטריות פיטופתוגניות רבות, שבירת התרדמה של הנבג מושרית על ידי חומרים אשר מקורם בפונדקאי כגון חומרים נדיפים, חומרים המופרשים כנוזל על ידי הצמח [10], פלבנואידים, [11] שיערות עלים [12, 13] ומרקם הרקמה המאולחת [14]. בשלב השני, כניסת מים אל תוך הנבג מובילה לשינוי מורפולוגי המתבטא בהתנפחות הנבג ומלווה בעליה בפעילות המטבולית [6, 11, 15]. תהליך קביעת הפולאריות של התא בשלב השלישי אינו ברור לחלוטין, אולם קיימות מספר תיאוריות עיקריות. הראשונה גורסת כי כאשר הנבג מתפתח נקבע אזור על גבי הקורטקס אשר מגדיר את הפולאריות. על פי התיאוריה השנייה, קביעת הפולאריות נעשית בעקבות הפעלה של רצפטורים ממברנליים בתא בהתאם לסיגנאל חיצוני. השלישית על פי מנגנון אקראי פנימי של הנבג הפועל על פי היזון חוזר של תהליכים מטאבולים ספציפיים בתוך התא [16]. השלב הרביעי מתאפיין בשינוי מורפולוגי נוסף של יצירת נחשון הנביטה והתארכותו וכולל העברת חומרי בנייה מהתא אל הנחשון ההולך ונבנה [7]. הנביטה, התארכות נחשון ויצירת קור (hypha) הם תוצאה של לחץ הידרוסטטי פנימי, המוגבל לאזור האפיקלי בתוך הנחשון, הדוחק את דופן התא באזור האפיקאלי כלפי חוץ. כאשר הקור מגיע לאורך מסוים נוצרת הסתעפות אשר בה נוצר קור חדש. בדרך זו הפטרייה מנצלת את מקורות המזון ומגיעה למקורות מזון נוספים. במשך הזמן מקורות המזון מנוצלים, תהליך גדילת הפטרייה נפסק ומתחיל תהליך ההנבחה [17].

תהליך הנביטה של נבג כרוך במעבר מפעילות מטבולית נמוכה מאוד לפעילות מואצת המנצלת "חלון זמן" בו קיים פונדקאי רגיש. מעבר זה כרוך במספר גורמים: בשלות של מנגנון רגולציה פנימי ליציאה מתרדמה, זמינות חומרי מזון בתוך הנבג או בסביבתו הקרובה ותנאי סביבה מתאימים [18]. בחלק מהמחקרים המוקדמים שנעשו בפטריות מהסוג ריזופוס, נביטה הוגדרה כהתארכות של נחשון הנביטה עד לכדי מחצית מקוטר הנבג, ללא מדידה

של היכולת ליצור מושבה [19]. בעוד שבמחקרים מאוחרים יותר אובחנה חוסר היכולת של חלק מהנבגים הנובטים ליצור מושבות על גבי מצע מזון [18].

2.3. **החלשה או הרעבה של נבגים** - כשנבגי הפתוגן נחשפים למנה תת-קטלנית של גורם הדברה רק חלק מאוכלוסייתו נקטלת [20, 21]. נבגים מוחלשים בדרך כלל נובטים בתזמון אחר (מוקדם או מאוחר ביחס ללא מטופלים), הינם בעלי חיוניות פחותה וכושר יצירת מחלה נמוך [20-22]. אותם מרכיבים באוכלוסיית הפתוגן ששרדו הם נפגעי עקה ומוחלשים ופגיעים יותר לטיפולים ביוטים או אביוטים המיושמים לאחר הטיפול המחליש [22-24]. כך לדוגמא, אחוז הנביטה של נבגים של *Fusarium oxysporum* או קשיונות של *Sclerotium rolfii* שהוחלשו באמצעות חום, היה נמוך יותר והם אוכלסו במידה רבה יותר במיקרואורגניזמים של הקרקע [25, 26]. חשיפה מכוונת של קשיונות מוחלשים של *S. rolfii* למיקרואורגניזמים של הקרקע הביאה להדברתם, דבר המעיד על יכולתם של גורמים ביולוגים לפגוע בפתוגן מוחלש [20]. טיפול חום, המיושם ראשון, הראה אפקט מוגבר של "החלשה" של פטריות פתוגניות שמקורן בקרקע, דבר שאפשר יישום עוקב של מינון מופחת של חומר ההדברה וקבלת יעילות הדברה גבוהה [20]. חלק מהקשיונות המוחלשים נבטו מוקדם, באופן בו צמח קור ארוך ודק אך לא התפתחה ממנו מושבה או מחלה (אשל וחובריו, לא פורסם).

בהחלשה הבאה לידי ביטוי בשינוי מורפולוגי ובחוסר יכולת ליצור מושבה חיונית ואינפקטיבית, עשויים להיות מעורבים תהליכי מוות תאי מתוכנת (תהליכים אפופטוטיים) [27]. הסמנים הביוכימיים להתרחשות תהליך מסוג זה הם עליה בצורני חמצן פעילים (ROS) ודגם שבירה אופייני של ה-DNA (laddering). ידועים מספר גורמי עקה המובילים לתהליך זה בשמרים ופטריות חוטיות, לדוגמא, קרינת UV [28], חימום [29] ולחץ אוסמוטי הנגרם על ידי ריכוז חיצוני גבוה של גלוקוז או סורביטול [30]. בהקשר הנוכחי יש עניין מיוחד במטבוליטים אשר מחסור בהם או מתן שלהם בריכוז נמוך ללא מרכיבי מזון אחרים מוביל לאפופטוסיס [27]. כך לדוגמא, הרעבת שמרים לחומצות האמינו ליזין או היסטידין הובילה למוות תאים אפופטוטי [31]. דוגמאות נוספות הם חשיפה למינונים נמוכים של גלוקוז [32] חומצות [33, 34] ויסודות מיקרו [35].

2.4. **ריקבון מימי בבטטה, מודל לשימוש במשרן נביטה להדברת גורם המחלה** - "גיורגיה גיט" הינו זן הבטטה המוביל בארץ, בשל יכול גבוה וטעם מועדף, אך זן זה סובל מרגישות גבוהה לריקבונות מימיים במהלך האחסון. הגורם העיקרי להתפרצות ריקבונות מסוג זה בבטטה היא הפטרייה ריזופוס (*Rhizopus spp.*), החודרת בעיקר דרך פצעים וגורמת לריקבון מימי של כלל האשרוש תוך ימים ספורים [36]. ריזופוס היא פטרייה נקרוטרופית בעלת תפוצה כלל עולמית ומחוללת מחלה בעיקר בתוצרת חקלאית קטופה. נבגי הפטרייה, המאפשרים ריבוי א-מיני, נישאים באוויר, מזהמים משטחים או נישאים במי השטיפה בתהליך הטיפול בתוצרת החקלאית [37]. ריקבון מימי הנגרם על ידי ריזופוס גורם לפחת הרב ביותר באחסון בטטה. ריזופוס גורם גם לפחת ניכר בעגבנייה, תות שדה, אפרסקים וענבים שלא עברו קירור מהיר. **השילוב של תפוצת נבגים גבוהה והעדר אמצעי הדברה יעילים לריזופוס מצדיק את הבחירה בפתוגן זה לשמש כמודל בפיתוח גישת הדברה חדשה** שבחנו במסגרת מחקר זה. השערת המחקר היא כי השלב הקריטי להדברת המחלה באמצעי הדברה כימיים, פיזיקליים ואף ביולוגיים, הוא שלב התנפחות הנבג וואו הצצת נחשון הנביטה, לפני התבססות קורי הפטרייה ברקמה. מכאן שקיים הגיון "לפיתוי" מבוקר של גופי קיימא פתוגניים לתפוח ולנבוט טרם זמנם בתנאים בהם הרקמה הצמחית עמידה לפטרייה. במידה ותוך כדי הנביטה המבוקרת משלבים עקות או חומרים אנטי פטרייתיים, ניתן להניח כי כך יתאפשר להדביר אותם במינונים נמוכים יותר או באמצעים שאינם מזיקים לאדם ולסביבה.

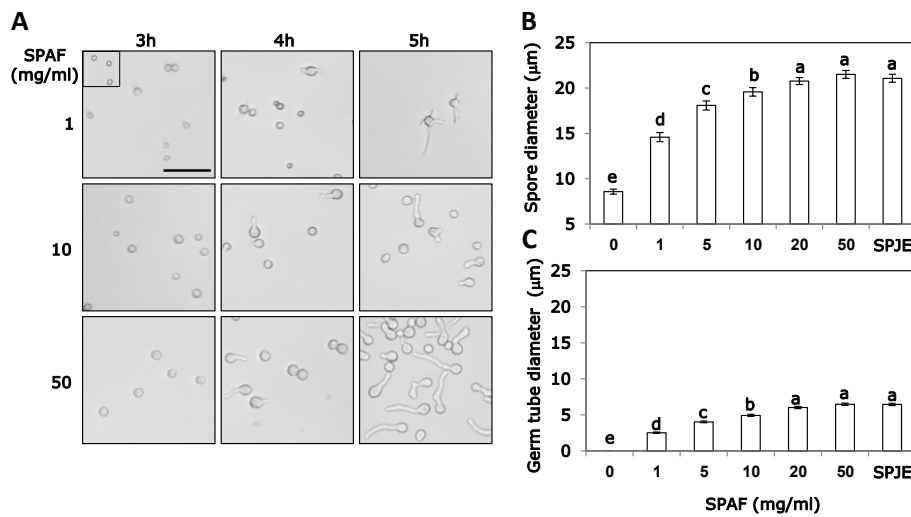
3. מטרות המחקר

- מטרת המחקר** לפתח מודל חדשני להדברת גופי קיימא פתוגניים, בו מופעל משרן לתפיחה ונביטה אפופטוטית מוקדמת של נבגים (sweet potato active fraction; SPAF) לפני פעולת ההדברה, זאת על ידי:
- (א) בידוד וזיהוי משרן הנביטה המוקדמת המופק מבטטה, תוך שימוש בנבגי הפטרייה ריזופוס למבחן הביולוגי (ב) אפיון חישת הסביבה של נבגי ריזופוס, טרם נביטתם.
- (ג) השוואה היסטולוגית ופיזיולוגית של פעולת משרן הנביטה מבטטה ("מחליש") למעודדי נביטה "נורמאלית" של נבגי ריזופוס.
- (ד) בחינת המודל בהדברת ריזופוס תוך שילוב עם אמצעי הדברה ידידותיים.
- (ה) בחינת ספציפיות מעודד הנביטה לפטריית הריזופוס.

4. פירוט עיקרי הניסויים

4.1. בידוד ואפיון התגובות למשרן הנביטה המוקדמת מרקמת אשרוש בטטה - במחקר זה פותחה שיטה הדירה לאילוח מלאכותי של אשרושי בטטה בנבגי ריזופוס והוכח שהפטרייה היא הגורם לריקבונות המימיים, ונבגיה נובטים ויוצרים מחלה רק בסמיכות להיווצרות פצע מעיכה. מהריקבון המימי בזן המסחרי של הבטטה בודדו וזוהו במעבדתנו שני מינים עיקריים של ריזופוס: *Rhizopus delemar* ו-*R. stolonifer* (תוצאות אנליזת ITS אינן מוצגות). במחקר מקדים מצאנו כי מוהל תאי ציפת הבטטה מעודד נביטת נבגי ריזופוס (משני המינים) *in vitro*. בהמשך ביצענו הפרדה ראשונית ואפיון ספקטראלי של מרכיב מסיס המופיע במוהל הציפה הגורם לנביטה מוקדמת של נבגי *R. delemar*. נמצא שמרכיב זה בעל משקל מולקולארי נמוך, אינו טעון ומאוד פולאריהידרופילי. כמו כן המרכיב הפעיל נמצא עמיד להרתחה ממושכת (התוצאות אינן מוצגות). משרן הנביטה המוקדמת, שבודד חלקית, גרם ל- 95-100% מהנבגים לנבוט גם במים מזוקקים סטריליים (סביבה בה הנבגים אינם נובטים כלל) תוך שעות ספורות; הנביטה לא הייתה אופיינית לנבגי ריזופוס שכן הנבגים לא עברו תהליך של תפיחה טרם נביטתם והם התאפיינו בנחשון נביטה ארוך ודק ללא הסתעפויות. כמו כן הנבגים שהושרו לנביטה מוקדמת נמצאו פגומים ביכולת ליצור מושבות במצע מזון עשיר. כיוון שאילוח בפטריית הריזופוס מתקיים רק בעקבות פציעה של הקליפה, הפקנו את הפרקציה הגורמת להשראת נביטת נבגי ריזופוס, מפרנכימה של בטטה מהזן גוריגיה ג'ט. בידוד הפרקציה הפעילה בוצע באמצעות פרוצדורת ההפקה שפותחה במחקר המקדים וכללה הומוגניזציה של רקמת הציפה של בטטה, מיצוי בסדרת סולבנטים והפרדה בקולונת C18 (שניידר וחובריו, 2011). לאחר כל שלב בוצע מבחן נביטת נבגי ריזופוס לבחירת הפרקציה הפעילה. הפרקציה שלא ניתן היה להפרידה ללא איבוד הפעילות כונתה sweet potato active fraction (SPAF) ויובשה בליאופיליזר לאבקה. הפרקציה הפעילה SPAF שימשה לבחינת התגובות של הנבגים בהשוואה למיצוי הלא מנוקה sweet potato juice (SPJE) extract בניסויים המתוארים באיורים 1-6 וטבלה 1. בהמשך המחקר זוהו המרכיבים הפעילים של SPAF (איור 7) ובעקבותם בוצעו ניסויים שהוכיחו את תפקיד מרכיבי ה-SPAF.

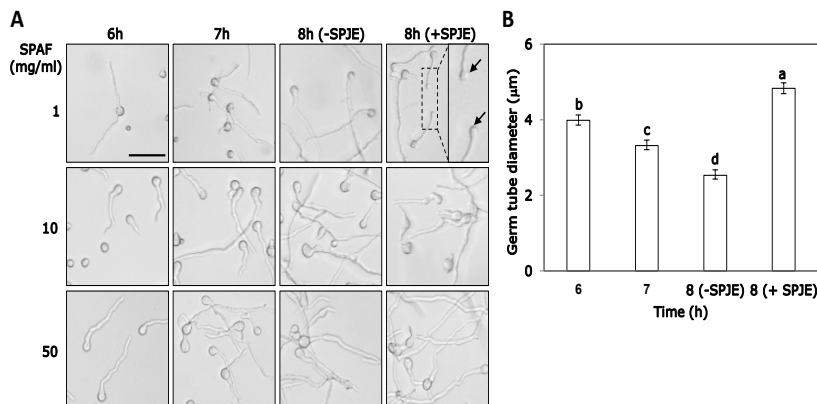
4.2 השפעת SPAF על נביטת נבגי *R. delemar* - בשלב זה בחנו האם שימוש בפרקציה המעודדת נביטה, במינון נמוך מאוד, יכול להשרות הרעבה של נבגי הפתוגן, מיד לאחר נביטתם. הדגרה של הנבגים בריכוזים עולים של SPAF הגדילה את מידת התנפחות הנבגים ואחוז הנביטה (איור 1). הנביטה המהירה ביותר התרחשה בריכוזים של 20 מ"ג/מ"ל של SPAF ולא נמצאה השפעה מוגברת של העלאת הריכוז מעבר לזה או שימוש במוהל תאי בטטה שאינו מופרד. שימוש במינונים נמוכים יורדים של 10, 5, ו-1 מ"ג/מ"ל הביא לנביטה של 94.3, 97.3 ו-72.9% מהנבגים בהתאמה עם ירידה במידת ההתנפחות של הנבג טרום נביטה ויצירת נחשון נביטה דק מאוד ובעל חיוניות פחותה (טבלה 2). לא התרחשה התנפחות של הנבגים ואו נביטה במים סטריליים ששימשו כהיקש. ההתפתחות הלא נורמלית של נבג בתנאי ההרעבה נמצאה כהפיכה. הוספת מיץ בטטה לנבג הנובט, 7 שעות לאחר האינקובציה ב- SPAF, הפסיקה את התכווצות נחשון הנביטה (כבר לאחר שעה מההוספה) והביאה להתנפחות מחודשת בקצה הקור המתפתח (איור 2).



איור 1: תגובה של נבגי

הפטרייה *R. delemar* להדגרה בריכוזים שונים של פרקציה מעודדת נביטה (SPAF) בהשוואה למוהל תאי בטטה (SPJE), A, מיקרוגרף זמני אינקובציה שונים (החלונית מדגימה הדגרה במים; קנה המידה מייצג 100 מיקרומטר), B, קוטר הנבגים אחרי 5 שעות

הדגרה. C, קוטר נחשון הנביטה אחרי 8 שעות הדגרה. הערכים מייצגים ממוצע \pm SE (n=100). אותיות שונות מעל העמודות מבטאות הבדל מובהק ($P > 0.05$).



איור 2: תגובת נבגי *R. delemar*

להרעבה והתאוששות מחודשת בעזרת מוהל תאי בטטה (SPJE), A, תגובת נבגים לריכוזים שונים של פרקציה מעודדת נביטה (SPAF); 1, 10 ו-50 מ"ג/מ"ל

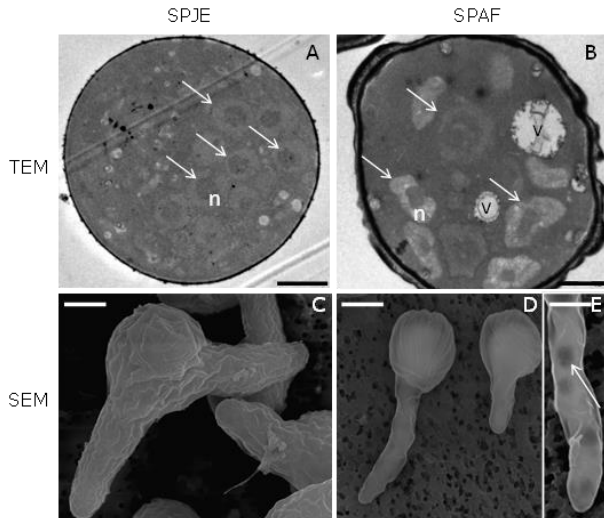
אחרי 6-8 שעות הדגרה. החיצים מורים על קצות קורים מתנפחים. סרגל המידה = 100 מיקרומטר. B, התאוששות הקור, ממצב של התכווצות, בעקבות הוספת SPJE (8+SPJE). הערכים מבטאים ממוצע \pm SE (n=100). אותיות שונות מעל העמודות מבטאות הבדל מובהק ($P > 0.05$).

טבלה 1: אחוז נביטה של נבגי *R. delemar* במהלך אינקובציה בפרקציה מעודדת נביטה (SPAF) או מוהל תאי בטטה (SPJE).

SPAF (mg/ml) \ Time (h)	1	5	10	20	SPJE
4	17.5 \pm 1.2 d	24.3 \pm 1.3 c	34.6 \pm 1.5 b	54.7 \pm 3.1 a	57.1 \pm 0.7 a
5	37.9 \pm 3.9 c	54.6 \pm 0.9 b	79.9 \pm 2.2 a	82.6 \pm 0.5 a	81.1 \pm 0.7 a
6	54.1 \pm 2.1 e	73.6 \pm 1.4 d	83.5 \pm 1.8 c	98.0 \pm 0.4 b	97.5 \pm 1.0 a
7	70.7 \pm 2.3 d	84.2 \pm 0.5 c	90.6 \pm 0.4 b	98.8 \pm 0.5 a	98.7 \pm 0.9 a
8	72.9 \pm 0.6 c	94.3 \pm 1.9 b	97.3 \pm 0.5 b	98.3 \pm 1.6 ab	99.2 \pm 0.3 a

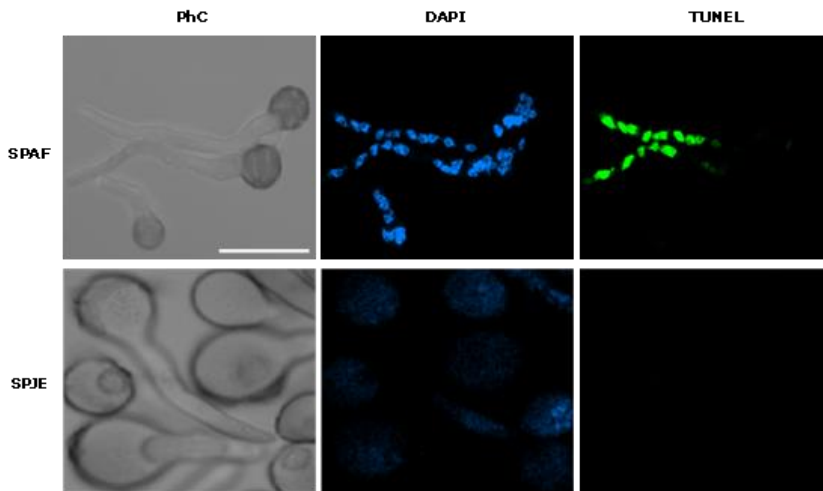
Means (\pm SE) followed by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

4.3 סימפטומים של עקה הנגרמים על ידי מינון נמוך של SPAF - חתכים היסטולוגיים שנעשו בנבג המתנפח, בעקבות הדגרתו במינון נמוך של SPAF, אופיינו במיקרוסקופ אלקטרוניים חודר כבעלי מבנה פנימי שונה מנבגים לא מטופלים. השוני בא לידי ביטוי במבנה לא סימטרי של הגרעין ויצירת וקואולות גדולות, שתי תופעות שלא הופיעו בהדגרה במוהל תאי בטטה. בהסתכלות חיצונית, במיקרוסקופ סורק, ההדגרה ב- SPAF גרמה להיעלמות המבנה הגבשושי המאפיין את שטח הפנים של הנבג ולהופעת כתמים עגולים וכהים בנחשון הנביטה (איור 3).



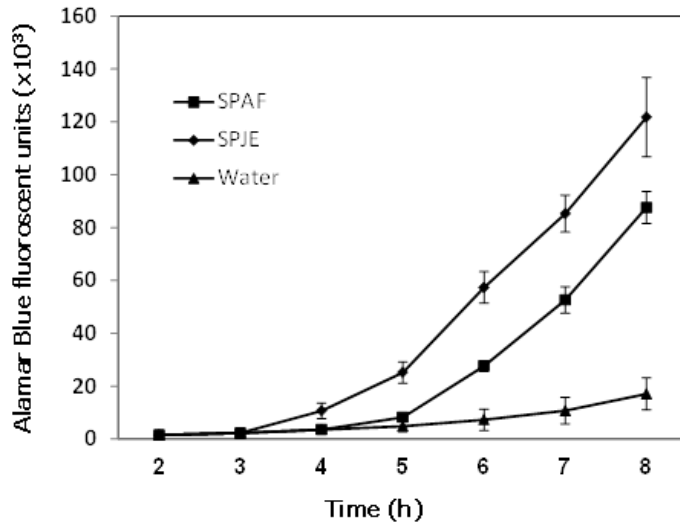
איור 3: השפעת מוהל תאי בטטה (SPJE) לעומת פרקציה מעודדת נביטה (SPAF) על נבגי *R. delemar*. A ו-C, B ו-D, E ו-B; הדגרה של נבגים ב-SPJE, הדגרה ב-1 מ"גמלי SPAF. הנבגים קובעו לאחר 4 שעות הדגרה. TEM = מיקרוסקופ חודר, SEM = מיקרוסקופ סורק, n = גרעין, v = ואקואולה. סרגל המידה = 4 מיקרומטר ב-A ו-B, 10 מיקרומטר ב-C ו-D, 5 מיקרומטר ב-E. החיצים מצביעים על גרעינים ב-A ו-B, ווקואולה ב-E.

אחת מהשערות המחקר הייתה כי SPAF משרה נביטה אפופטוטית. על מנת לבחון השערה זו הנבגים שופלו במינון נמוך של SPAF ונבדקו בריאקציית TUNEL שנועדה לזהות שבירה של ה-DNA בנבגים המטופלים. ואכן נבגים שטופלו ב-SPAF היו חיוביים לריאקציה דבר המרמז על השראת הרעבה ותהליך תמותה מתוכנת שלא הופיע בהדגרה במוהל תאי בטטה (איור 4).



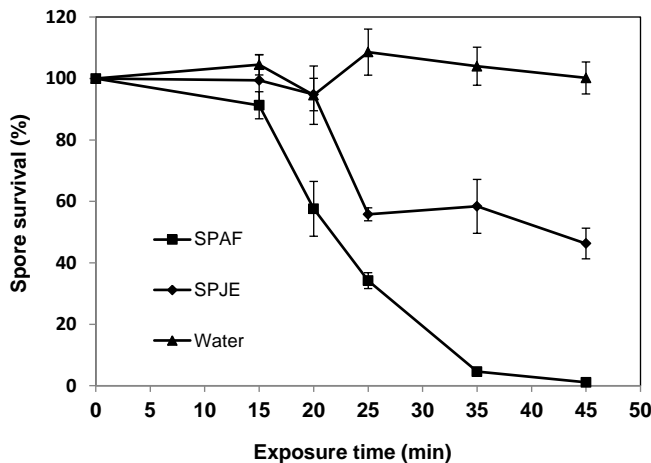
איור 4: אינדוקציה לשבירת DNA בנבגי *R. delemar* לאחר הדגרה ב-1 מ"גמלי של פרקציה מעודדת נביטה (SPAF) בהשוואה למוהל תאי בטטה (SPJE). הנבגים קובעו לאחר 4 שעות אינקובציה ונצבעו ב-DAPI או TUNEL.

בכדי לבחון האם הנביטה הלא נורמאלית המושרית על ידי מינונים נמוכים של SPAF מבטאת גם החלשה פיזיולוגית של הנבג, נמדדה הפעילות המטבולית של הנבגים תוך שימוש בצבען alamar blue. שיטה זו מודדת את מצב הרדוקס (redox) של התאים על ידי מדידת מידת החימצון של alamar blue בזמן נשימת הנבגים. בשיטה זאת נמצא שכבר לאחר שעותיים הייתה ירידה בפעילות המטבולית של נבגים שטופלו במינון נמוך של SPAF בהשוואה ל-SPJE. ההבדל בפעילות המטבולית נמשך גם לאחר 6 שעות של הדגרה בתמיסות השונות (איור 5).



איור 5: השפעת פרקציה מעודדת נביטה שבודדה מבטטה (SPAF) על פעילות מטבולית של נבגי *R. delemar*. נבגי הפטריה הודגרו ב-1 מ"גמלי SPAF, מוהל תאי בטטה (SPJE) או מים. הערכים מבטאים ממוצע \pm SE (n=3).

4.4. רגישות נבגים לעקת חום לאחר הדגרה ב-SPAF. יישום של טיפול חום מתון, 42 מ"צ במשך עד 45 דקות, נבחר כגורם עקה שאינו קוטל נבגים המונבטים במוהל תאי בטטה. חימום של נבגים שטופלו ב-SPAF גרם לירידה ביכולתם ליצור מושבות על גבי מצע עשיר, ירידה שהלכה והתגברה ככל שהוארך משך החימום בתחום שבין 15-45 דקות (איור 6). בעוד שלאחר 45 דקות חימום נבגים שטופלו ב-SPAF איבדו לחלוטין את יכולתם ליצור מושבות, הרי שנבגים שהודגרו במוהל תאי בטטה או מים שרדו ברמה של 46 ו-100 אחוזים, בהתאמה. תוצאות הניסויים שבוצעו אכן הצביעו על היתכנות של גישת הדברה הגורסת שהשראת נביטה של גופי קיימא פטרייתיים, במקרה זה נבגי ריזופוס, מגבירה את רגישותם להרעבה ולטיפול חום.

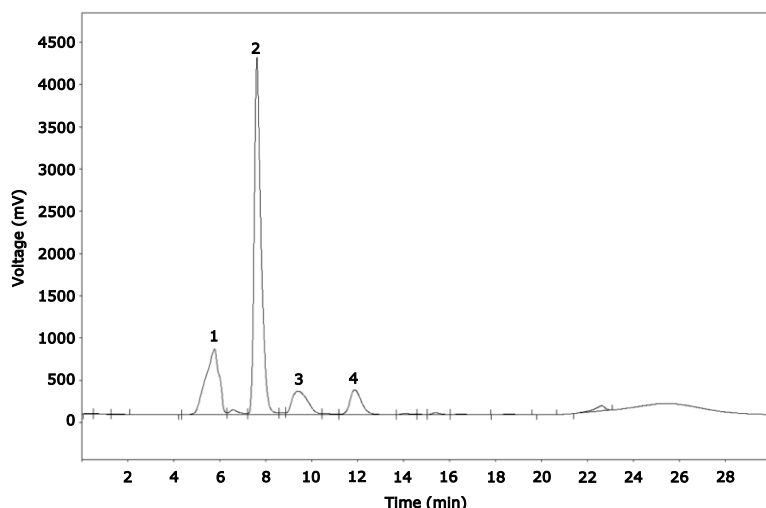


איור 6: אחוז הנבגים שיצרו מושבות, במצע אגר, לאחר טיפול חום (42 מ"צ למשכי חשיפה שונים) שקדמה לו הדגרה בפרקציה מעודדת נביטה (SPAF) לעומת הדגרה במוהל תאי בטטה (SPJE) או מים. הערכים מבטאים ממוצע \pm SE (n=3).

4.5 אפיון ההרכב הכימי של SPAF

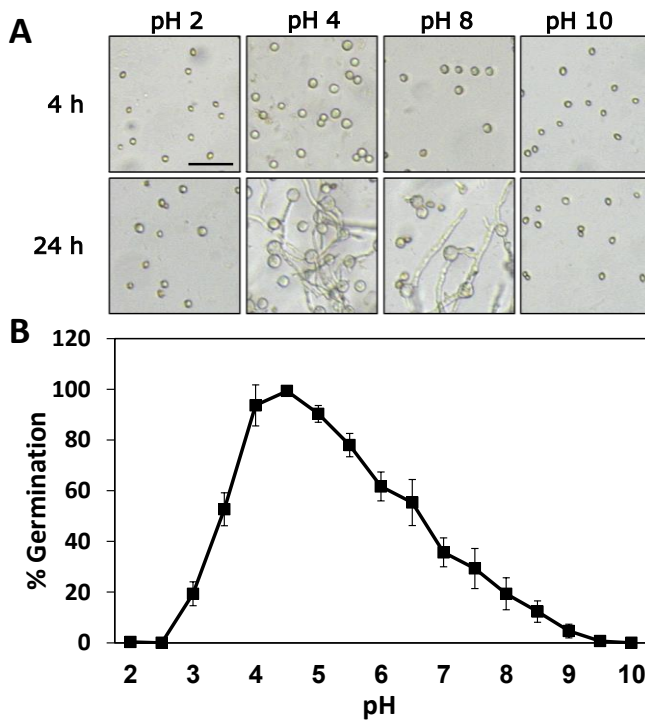
הפרדה של SPAF בקולונה אנליטית, של מחליף קטיונים, יצרה ארבעה פיקים עיקריים (איור 7). הפיקים שסומנו 2-4 זוהו באמצעות סטנדרטים כסוכרוז, גלוקוז ופרוקטוז בהתאמה על ידי שימוש בסטנדרטים (איור 7). פיק מס' 1 עבר אנליזה נוספת ב-GC-MS ונמצא כי הוא מכיל תערובת של חומצות אורגניות וחומצות אמינו ניסיון להשרות נביטה עם כל אחד מארבעת הפיקים לא צלח, רק שילוב של 2, 3 או 4 עם פיק 1, שמר

על פעילות הדוגמה. (טבלה 1). נוכחות של חומצות אורגניות במשרן הנביטה שהופק מאשרוש בטטה, העלתה תהיות באשר לתפקידן בהשראת תפיחה ונביטה של נבגי ריזופוס. לנוכחות חומצות אורגניות במוהל תאי בטטה (כפי שמתקבל במקרה של פציעה) יש ללא ספק תפקיד בקביעת מידת החומציות אליה נחשפים הנבגים, טרום ואחרי נביטתם. ואכן הדגרה של נבגי ריזופוס במשרן הנביטה, שהחומציות שלו הותאמה לערכים שונים, הצביעה על אופטימום תפיחה ונביטה ב- pH 4.5 (איור 8). במדיום חומצי יותר חלה ירידה דרמטית באחוז הנבגים הנובטים עד למניעה מוחלטת (ב- pH 2.5). במדיום בסיסי (pH 5.0-10.0) נצפתה ירידה הדרגתית באחוז הנבגים שנבטו: ב- pH 9.5 ומעלה הנבגים לא טפחו ולא נבטו כלל (איור 8).



איור 7: הפרדה כרומטוגרפית של הפרקציה המעודדת נביטה (SPAF) תוך שימוש במחליף קטיונים. ארבעה פיקים עיקריים נמצאו בשימוש בגלאי refractive index בזמני יציאה: 5.5, 7.8, 9.6 ו-11.8 דקות (פיקים 1-4 בהתאמה). פיק 1 זוהה כתערובת חומצות אורגניות וחומצות אמינו. פיקים 2-4 זוהו כסוכרוז גלוקוז ופרוקטוז.

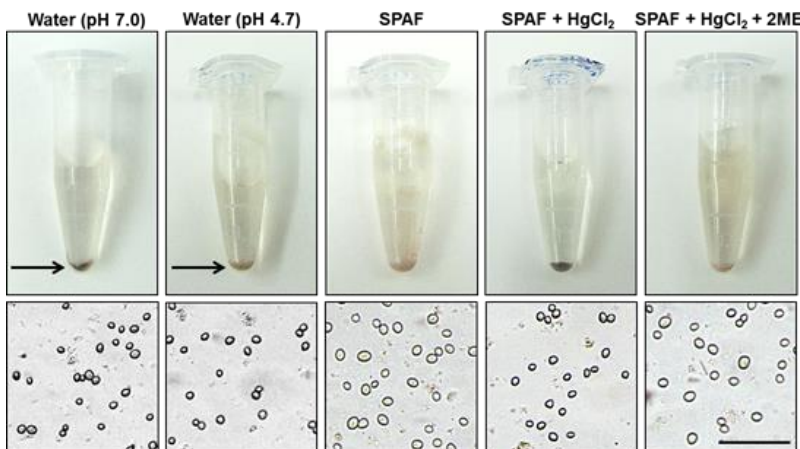
4.6 אפיון האינטראקציה בין גלוקוז לחומציות במשרן הנביטה- תמיסת ה-SPAF, כפי שהיא מבודדת מתוך מוהל תאי פרנכימת אשרוש בטטה, הינה חומצית (pH 4.7) וגורמת בשלב מוקדם ביותר לציפת הנבגים בנוזל, טרום תפיחתם. הרחפת הנבגים במים חומציים, גורמת לציפה דומה (איור 9) והעלתה את ההשערה שזהו השלב הראשוני ביציאת הנבג מתרדמה. כאמור מרכיבי ה-SPAF הופרדו לפרקציות שהכילו חומצות אמינו וחומצות אורגניות ולפרקציות נפרדות שהכילו גלוקוז, סוכרוז ופרוקטוז. ניסיון להשרות תפיחה ונביטה של נבגי הפטרייה על ידי כל אחד מהמרכיבים לא צלח [38]. גלוקוז לבדו גרם לתפיחת הנבגים רק במדיום חומצי (pH 4.7), ושילוב הפרקציה המכילה חומצות עם פרקציית הגלוקוז גרמו לתפיחה וצמיחה של נחשון נביטה, כבר לאחר 4 שעות הדגרה.



איור 8: השפעת חומציות המדיום על נביטת נבגי *R. delemar*, A, נבגים כפי שצולמו אחרי 4 ו-24 שעות אינקובציה במשרן הנביטה (SPAF) בתנאי pH שונים. B, אחוז הנבגים שנבטו בכל רמת pH.

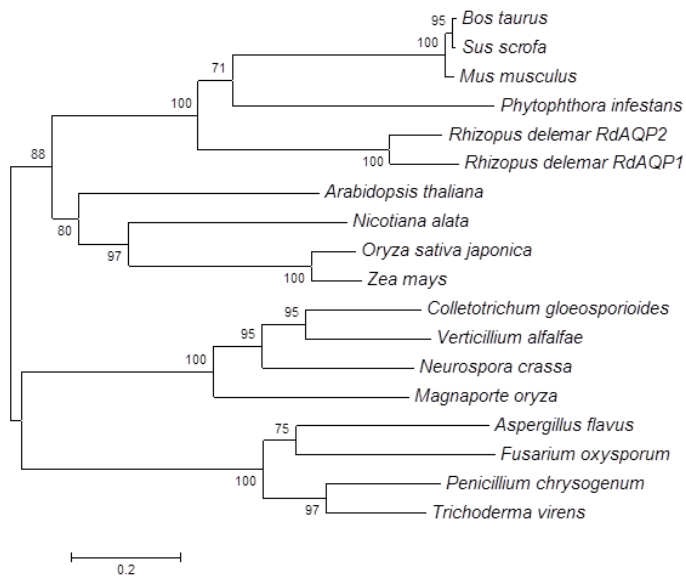
4.7 מעורבות חלבוני אקוהפורין בתהליך

תפיחת הנבג- ציפת הנבגים ב-SPAF טרם תפיחתם העלתה כאמור את ההשערה, שקיימת חדירה מבוקרת ומהירה של נוזלים אל הנבג. בעקבות ממצא זה הועלתה ההשערה כי תהליך התפיחה והציפה של הנבגים מתווך על ידי חלבוני תעלות מים (אקוהפורינים-Aquaporins). אחד המבחנים הביולוגיים, המקובלים כספציפיים, להוכחת מעורבותם של חלבוני אקוהפורין במעבר מים דרך ממברנת התא הוא הטיפול בכספית כלורית ($HgCl_2$). ואכן נבגים שטופלו במשרן הנביטה (SPAF) והושרו למשך 5 דקות בתמיסת $40\mu M HgCl_2$, עוכבה תפיחתם (איור 9) והם אף לא נבטו מאוחר יותר. טיפול עוקב ב- $5\mu M-\beta$ -Mercaptoethanol גרם לביטול השפעתה של הכספית, ולתפיחת הנבגים (איור 9), דבר המצביע על מעורבות של חלבוני אקוהפורין בחדירת המים לנבג.



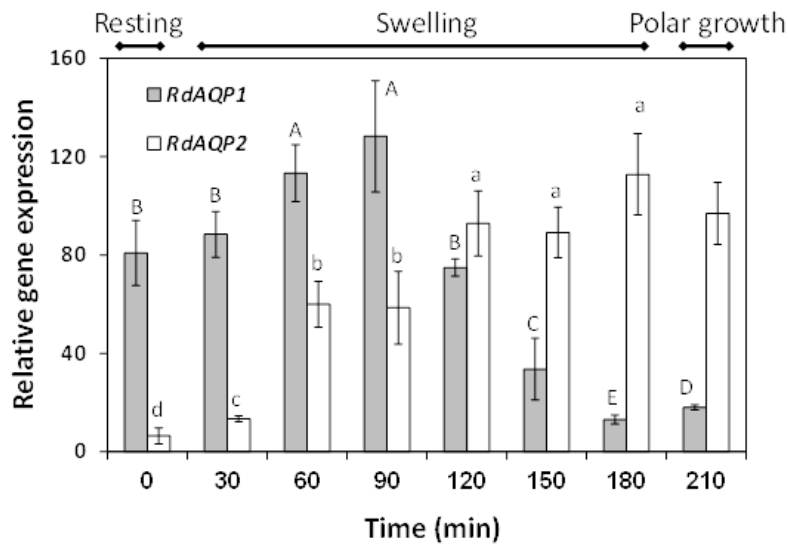
איור 9: השפעת הטיפול בכספית כלורית ($HgCl_2$) על תפיחת נבגי *R. delemar*. הטיפול בכספית היה במינון של 40 מיקרומולר למשך 5 דקות. השימוש בביתה מרקפתואתנול (2ME) נועד לבטל את השפעת הכספית. קנה המידה = 10 מיקרומטר.

4.8. **אפיון הגנים לאקוהפורין בריזופוס-** גנים המקודדים לאקוהפורינים ידועים במגוון פטריות פתוגניות. בניית עץ פילוגנטי, הכולל את שני הגנים שנמצאו בריזופוס, תוך שימוש בשיטת Neighbor-Joining, הצביעה על "מרחק" גדול יחסית מפטריות פתוגניות לצמחים אחרות (איור 10). אקוהפורינים של ריזופוס נמצאו קרובים יותר לאלו של יונקים, פיטופטורה ושמרים, לעומת חלבוני אקוהפורין של פטריות פתוגניות אחרות. בריזופוס זהו שני גנים בלבד לאקוהפורין, לעומת יותר 5-15 באורגניזמים אחרים. כמו כן, זהו בהם המוטיבים השמורים (NPA) שמהווים את תעלת המים האקטיבית בחלבון הממברנאלי.



איור 10: אנליזה פילוגנטית של חלבוני אקוהפורין מאורגניזמים שונים.

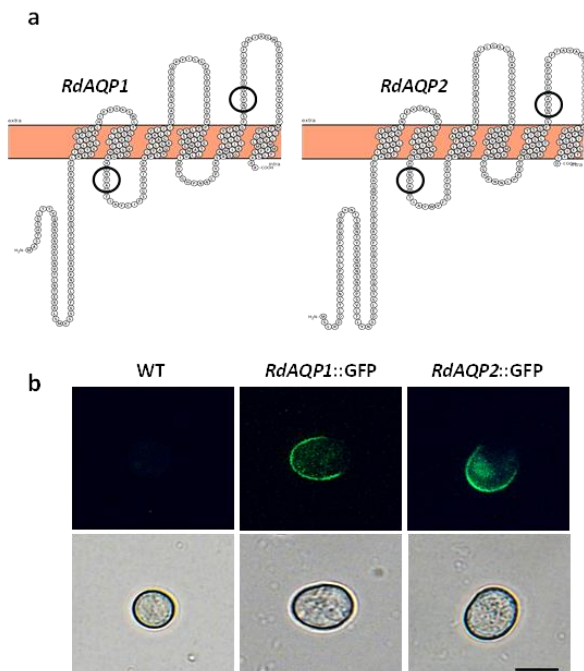
4.9. **ביטוי גנים לאקוהפורינים בנבגי ריזופוס במהלך תפיחתם ונביטתם-** נבגים נדגמו מידי חצי שעה, לאחר אינקובציה ב-SPAF, במשך עד 210 דקות. התפיחה נצפתה אחרי 60 דקות ואילו נחשון הנביטה נראה אחרי כ-150 דקות. הדוגמאות הוקפאו בחנקן נוזלי ושימשו להפקת RNA, וביצוע ריאקציית qPCR. הגן *RdAQ1* הראה ביטוי יחסי הולך ועולה ב-90 הדקות הראשונות, בהם התרחשה תפיחת הנבג, ואז ירד ביטוי דרמטית (איור 11). לעומתו, הגן *RdAQ2* שהראה ביטוי נמוך יחסית בשלבים הראשונים של התפיחה, אך ביטוי הלך ועלה עד לערך מקסימאלי אחרי כ-180 דקות, שלב צמיחת נחשון הנביטה (איור 11).



איור 11: ביטוי יחסי של גנים לאקוהפורינים (*RdAQP1* and *RdAQP2*) בנבגי *R. delemar* במהלך תפוחתם ונביטתם. הנבגים נאספו בשלושה שלבי גידול עיקריים: resting (זמן 0), swelling (30-180 דקות) ו-polar growth (210 דקות). בוצעה ריאקציה qPCR על cDNA שסונתז מ-RNA

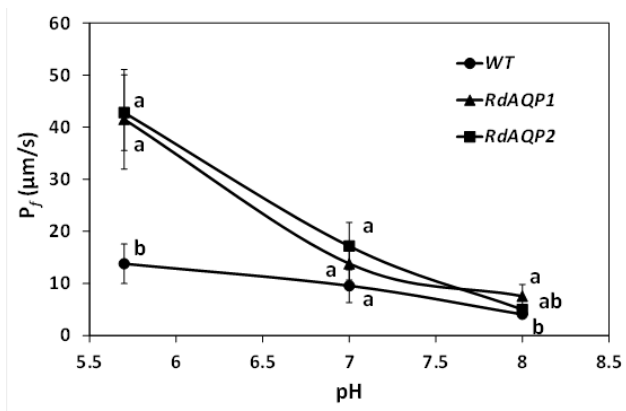
שהופק מהנבגים. *18S* rRNA מריזופוס שימש כגן יחוס. הבדל בין האותיות (upper or lowercase) מצביע על הבדל מובהק בין זמני אינקובציה בכל גן ($P < 0.05$).

4.10 חיזוי מבנה ומיקום בנבג של חלבוני *RdAQP1* ו-*RdAQP2* – חיזוי מבנה החלבונים באמצעות תוכנת TMHMM הצביע על מבנה אופייני של אקוהפורינים הכולל את האתר השמור NPA המהווה מרכיב של תעלת המים בממברנה. איחוי של הגנים המקודדים ל-GFP וטרנספורמציה לנבגי *R. delemar*, הראה מיקום של החלבונים בממברנת הנבג, כצפוי על פי תפקידם המוצע.



איור 12: מבנה ומיקום משוער של החלבונים *RdAQP1* ו-*RdAQP2*. מבנה טופולוגי משוער כפי שנחזה בשיטת TMHMM *Protter-visualize proteoforms* program (b) ביטוי של *RdAQP1::GFP* ו-*RdAQP2::GFP* בנבגי *R. delemar*. סרגל המידה = 10 מיקרומטר.

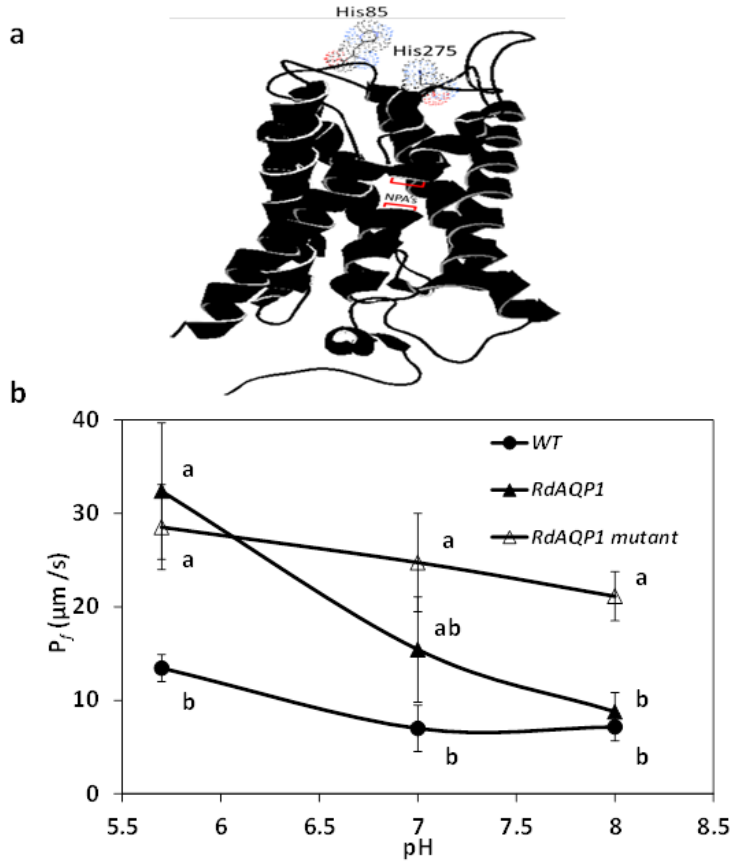
4.11 אנליזה פונקציונאלית של RdAQP1 ו-RdAQP2 – בכדי לקבוע האם חלבוני האקוהפורין שנמצאו אכן מתפקדים כתעלות מים כל אחד מהגנים בוטא תחת הפרוטוטור 35S בפרוטופלסטים של ארבידופסיס. נמדדה ההשפעה של החדרת הגנים לפרוטופלסט על קבוע תנועת המים (P_f) (מערכת מודל המופעלת במעבדתו של דר' מנחם מושליון). נמצא שערכי ה-Pf היו גבוהים יותר בפרוטופלסטים שלהם הוחדרו הגנים לאקוואפורינים (איור 13). תוצאות מובהקות אלו אישרו שחלבוני אלו מתפקדים כתעלות מים.



איור 13: השפעת ה-pH על עבירות מים ב-*R. thaliana*. השפעת ה-pH על עבירות מים ב-*R. thaliana* (AQP) *delemar aquaporins*. ערך מעבר המים (P_f) נקבע בפרוטופלסטים של *Arabidopsis thaliana* להם נעשתה טרנספורמציה של GFP::AQP. הערכים מבטאים ממוצע \pm SE. הבדל בין האותיות מצביע על הבדל מובהק ($n=15$). הבדל בין האותיות מצביע על הבדל מובהק בכל ערך pH ($P < 0.05$).

4.12 תפקיד שיירי ההיסטידין ב-RdAQP1

בחינת חומציות הסביבה - מחקרים קודמים הצביעו על חשיבות ההיסטידינים בסגירה ופתיחה של תעלות מים באקוהפורינים. עבודות אלו הציעו שפרוטונציה של ההיסטידינים משפיעה על מוליכות המים בתעלות החלבון [40, 41]. חיזוי מבנה תלת מימדי של RdAQP1 הצביע על שני שיירי היסטידין בעמדות 85 ו-275 הממוקמים חיצונית וחשופים לפרוטונציה אפשרית. יצירת מוטנט בו הוחלפו של שני שיירים אלו באלנין וטרנספורמציה שלו לפרוטופלסטים של ארבידופסיס גרמה להפחתה משמעותית של השפעת ה-pH על תנועת המים במוטנט. ניסוי זה חיזק את ההנחה ששיירי ההיסטידין 85 ו-275 מעורבים בחינת חומציות הסביבה על ידי החלבון RdAQP1.



איור 14: תפקידם של שיירי היסטידין (H) בחיבת pH. (a) מבנה תלת מימדי משוער של RdAQP1 המדגים את מיקומם של שיירי ה-H בחלבון His85 (b) ערכי P_f עבור RdAQP1, המוטנט בו הוחלפו שיירי ההיסטידין באלנין וטיפוס הבר (WT). אותיות שונות מבטאות הבדל מובהק בין ערכי pH בין הטרנספורמנטים השונים ($P < 0.05$).

5. דיון

בשימוש במשרני נביטה שנועדו לגרום לנבגי פטרייה לצאת ממצבם העמיד לצורך הדברה קלה יותר שלהם, יש סיכון מסוים, בכך שהפתוגן עלול להספיק לאכלס את הרקמה הצמחית בטרם הודבר. ההבחנה שנעשתה בין תהליך התפיחה לצמיחת נחשון הנביטה, פותחת פתח למניעת אילוח על ידי בקרת התנפחות הנבגים. חדירת מים לתא ידועה בד"כ כתהליך אקטיבי וספציפי, בו מעורבים חלבונים ממברנליים מהסוג אקוואפורינים. התנפחות נבגי ריזופוס רק בסביבה חומצית היה בה רמז למעורבותם של אקוואפורינים הידועים, באורגניזמים אחרים, כרגישים לחומציות הסביבה. ואכן במבחן הביולוגי שבוצע, תוך שימוש בכספית לעיכוב פעולת האקוואפורינים, נמנעה התנפחות הנבגים באופן שנמצא כהפיך עם שחרור הכספית. אפיון פילוגנטי של הגנים לאקוואפורין בריזופוס ומציאת ביטויים הדיפרנציאלי במהלך התנפחות הנבג ונביטתו, מחזקת את ההנחה שאכן מדובר בחלבוני מפתח בתהליך זה. בהמשך העבודה הוחדרו גנים אלו למערכות מודל קיימות והוכחה פעולתם כאקוואפורינים. כמו כן, מוטציות ספציפיות איפשרו זיהוי של חומצות אמינו החשודות בחיבת חומציות הסביבה.

3. סיכום עם שאלות מנחות

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה: לפתח מודל חדשני להדברת גופי קיימא פתוגניים, בו מופעל משרן תפיחה ונביטה אפופטוטית מוקדמת של נבגים לפני פעולת ההדברה, זאת על ידי: (א) בידוד וזיהוי משרן הנביטה המוקדמת המופק מבטטה, תוך שימוש בנבגי הפטרייה ריזופוס למבחן הביולוגי; (ב) אפיון חישת הסביבה של נבגי ריזופוס, טרם נביטתם; (ג) השוואה היסטולוגית ופיזיולוגית של פעולת משרן הנביטה מבטטה ("מחליש") למעודדי נביטה "נורמאלית" של נבגי ריזופוס; (ד) בחינת המודל בהדברת ריזופוס תוך שילוב עם אמצעי הדברה ידידותיים, ו-ה) בחינת ספציפיות מעודד הנביטה לפטריית הריזופוס.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות: הניסויים שבוצעו: אפיון תפקידה של חומציות הסביבה בהשראת תפיחה ונביטת הנבגים, אפיון האינטראקציה בין גלוקוז לחומציות במשרן הנביטה, בחינת מעורבות חלבוני אקוהפורין בתהליך תפיחת הנבג, אפיון המיקום הפילוגנטי של הגנים לאקוהפורין בריזופוס, אפיון ביטוי גנים לאקוהפורינים בנבגי ריזופוס במהלך תפיחתם ונביטתם ואפיון מרכיבי חישת חומציות הסביבה באקוהפורים שנחקר; <u>התוצאות:</u> הדגרה של נבגי ריזופוס במשרן הנביטה, שהחומציות שלו הותאמה לערכים שונים, הצביעה על אופטימום תפיחה ונביטה ב- pH 4.5. גלוקוז לבדו גרם לתפיחת הנבגים רק במדיום חומצי (pH 4.7), ושילוב הפרקציה המכילה חומצות עם פרקציית הגלוקוז גרמו לתפיחה וצמיחה של נחשון נביטה, כבר לאחר 4 שעות הדגרה. נבגים שטופלו במשרן הנביטה (SPAF) והושרו למשך 5 דקות בתמיסת $40\mu\text{M HgCl}_2$, עוכבה תפיחתם והם אף לא נבטו. בניית עץ פילוגנטי, הכולל את שני הגנים לאקוהפורין שנמצאו בריזופוס, הצביעה על "מרחק" גדול יחסית מפטריות פתוגניות לצמחים אחרות. הגן RdAQP1 הראה ביטוי יחסי הולך ועולה ב- 90 הדקות הראשונות, בהם התרחשה תפיחת הנבג, ואז ירד ביטוי דרמטית. לעומתו, הגן RdAQP2 הראה ביטוי נמוך יחסית בשלבים הראשונים של התפיחה, אך ביטוי הלך ועלה עד לערך מקסימאלי אחרי כ- 180 דקות התואם לשלב צמיחת נחשון הנביטה.</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? תוצאות המחקר אכן מצביעות על היתכנות של גישת הדברה הגורסת שהשראת נביטה של גופי קיימא פטרייתיים, במקרה זה נבגי ריזופוס, מגבירה את רגישותם להרעבה ולטיפול חום. על סמך אפיון פרקצית הבטטה שהשרתה נביטה נמצא כי מדובר בגורמים שאופיינו בעבר כמשרי נביטה בריזופוס, שילוב של סוכרים וחומציות. אופיינו המרכיבים הדרושים להשראת התפיחה והנביטה. אופיינה מעורבותם של חלבוני תעלות מים בתהליך התפיחה של הנבגים והוצע שהם אחראים על חישת חומציות הסביבה.</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?</p>
<p>ההתמקדות בתפקידם של האקוהפורינים בתהליך הראשוני של התנפחות הנבגים, שנראה כגורם חיוני ומקדים לתהליך הנביטה נבחרה על חשבון התרחבות לפטריות נוספות או גידולים נוספים. ביטויים, שצומד לביטוי GFP, בפטריה טרנסגנית, או במערכת מודל של תאי ארבידופסיס, הוכיח את תפקודם כמעבירי נוזלים אקטיביים. מטרות המחקר הושגו בכך שמיקדו את המחקר לכיוון של בקרת תפיחת נבגים כאמצעי הדברה חדשני.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p>
<p>Turgeman T., Kakongi N., Schneider A., Vinokur Y., Teper-Bamnolker P., Carmeli S., Levy M., Skory C. D., Lichter A., and Eshel D. (2014). Induction of <i>Rhizopus oryzae</i> germination under starvation using host metabolites increases spore susceptibility to heat stress. <i>Phytopathology</i> 104:240-247. Turgeman T., Shatil-Cohen A., Moshelion M., Skory C.D., Lichter A., Eshel D. (2015) The Role of Aquaporins in pH-Dependent Germination of <i>Rhizopus delemar</i> Spores. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> (submitted).</p>
<p>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות) ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>

- .1 Afek, U., J. Orenstein, and E. Nuriel, *Steam treatment to prevent carrot decay during storage*. Crop Protection, 1999. **18**(10): p. 639-642.
- .2 Porat, R., et al., *Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment*. Postharvest Biol Technol, 2000. **18**(2): p. 151-157.
- .3 Gan-Mor, S., et al., *Adapted thermal imaging for the development of postharvest precision steam-disinfection technology for carrots* Postharvest Biol Technol, 2011. **59**(3): p. 265-271.
- .4 Hansen, J.D., S. Wang, and J. Tang, *A cumulated lethal time model to evaluate efficacy of heat treatments for codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) in cherries*. Postharvest Biol Technol, 2004. **33**(3): p. 309-317.
- .5 Janisiewicz, W.J. and L. Korsten, *Biological control of postharvest diseases of fruits*. Ann Rev Phytopathol, 2002. **40**(1): p. 411-441.
- .6 d'Enfert, C., *Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa**. Fungal Genetics Biol : (2)21 .1997 ,p. 163-172.
- .7 Wendland, J. and P. Philippsen, *Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii**. Genetics, 2001. **157**(2): p. 601-610.
- .8 Osharov, N. and G.S. May, *The molecular mechanisms of conidial germination*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **199**(2): p. 153-160.
- .9 Doehlemann, G., P. Berndt, and M. Hahn, *Different signalling pathways involving a G protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia*. Molecular Microbiology, 2006. **59**(3): p. 821-835.
- .10 Nelson, E.B., *Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots*, in *The Rhizosphere and Plant Growth.*, L. Keister and P.B. Cregan, Editors. 1991, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 197–209.
- .11 Bagga, S. and D. Straney, *Modulation of cAMP and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*)*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2000. **56**(2): p. 51-61.
- .12 Podila, G.K., L.M. Rogers, and P.E. Kolattukudy, *Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides**. Plant Physiology, 1993. **103**(1): p. 267-272.
- .13 Kolattukudy, P., et al., *Surface signaling in pathogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(10): p. 4080-4087.
- .14 Chaky, J., et al., *Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola**. Phytopathol, 2001. **91**(6): p. 558-564.
- .15 Warwar, V. and M.B. Dickman, *Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii**. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(1): p. 74-79.
- .16 Harris, S.D. and M. Momany, *Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm*. Fungal genetics and Biology, 2004. **41**(4): p. 391-400.
- .17 Gow, N.A.R. and G.M. Gadd, *Tip growth and polarity*, in *The Growing Fungus*, N.A.R. Gow and G.M. Gadd, Editors. 1995, Chapman and Hall 1st ed. p. 301-318.
- .18 Thanh, N., F. Rombouts, and M. Nout, *Effect of individual amino acids and glucose on activation and germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores in tempe starter* .J App Microbiol, 2005. **99**(5): p. 1204-1214.
- .19 Medwid, R.D. and D.W. Grant, *Germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores*. App Environ Microbiol, 1984. **48**(6): p. 1067-1071.
- .20 Eshel, D., et al., *Combined soil treatments and sequence of application in improving the control of soilborne pathogens*. Phytopathology, 2000. **90**(7): p. 751-757.

- .21 Eshel, D., et al., *Evaluation of soil fumigants on soilborne fungal pathogens in a controlled-environment system and in soil*. Crop Protection, 1999. **18**(7): p.437-443 .
- .22 Assaraf, M.P., C. Ginzburg, and J. Katan, *Weakening and delayed mortality of Fusarium oxysporum by heat treatment: Flow cytometry and growth studies*. Phytopathology, 2002. **92**: p. 956-963.
- .23 Fravel, D.R. and J.A. Lewis, *Effect of label and sublabel rates of metam sodium in combination with Trichoderma hamatum, T. harzianum, T. virens, T. viride on survival and growth of Rhizoctonia solani*. Phytoparasitica 2004. **32**(2): p. 111-118.
- .24 Freeman, S. and J. Katan, *Weakening effect on propagules of Fusarium by sublethal heating*. Phytopathology, 1988. **78**(12): p. 1656-1661.
- .25 Arora, D.K., A.K. Pandey, and A.K. Srivastva, *Effects of heat stress on loss of C, germination and pathogenicity from chlamydospores of Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*. Soil Biology and Biochemistry, 1996. **28**(3): p. 399-407.
- .26 Lifshitz, R., et al., *The effect of sublethal heating on sclerotia of Sclerotium rolfsii*. Can. J. Microbiol. , 1983 **29**(12): p. 1607-1610.
- .27 Sharon, A., et al., *Fungal apoptosis: function, genes and gene function*. FEMS microbiology reviews, 2009. **33**(5): p. 833-854.
- .28 del Carratore, R., et al., *Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in S. cerevisiae*. Mutat. Res., 2002. **513**(1-2): p. 183-191.
- .29 Shama, S., et al., *Heat stress-induced life span extension in yeast*. Exp. Cell Res., 1998. **245**(2): p. 379-388.
- .30 Silva, R.D., et al., *Hyperosmotic stress induces metacaspase and mitochondria dependent apoptosis in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol., 2005. **58**(3): p. 824-834.
- .31 Eisler, H., K.U. Fröhlich, and E. Heidenreich, *Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast*. Exp. Cell Res., 2004. **300**(2): p. 345-353.
- .32 Granot, D., A. Levine, and E. Dor Hefetz, *Sugar induced apoptosis in yeast cells*. FEMS Yeast Res., 2003. **4**(1): p. 7-13.
- .33 Du, L., et al., *Formic acid induces Yca1p independent apoptosis like cell death in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res., 2008. **8**(4): p. 531-539.
- .34 Phillips, A.J., J.D. Crowe, and M. Ramsdale, *Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus Candida albicans*. P. Natl. Acad. Sci. USA, 2006. **103**(3): p. 726.
- .35 Liang, Q. and B. Zhou, *Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways*. Mol. Biol. Cell, 2007. **18**(12): p. 4741-4749.
- .36 Clark, C.A., et al. *Research for improved management of sweetpotato pests and diseases: cultivar decline*. 2001. ISHS.
- .37 Schipper, M.A.A., *A revision of the genus Rhizopus. I. The Rhizopus stolonifer group and Rhizopus oryzae*. Stud Mycol, 1984. **25**: p. 1-19.
- .38 Turgeman, T., et al., *Induction of Rhizopus oryzae germination under starvation using host metabolites increases spore susceptibility to heat stress*. Phytopathology, 2013 :104 .p. 240-247.
- .39 Omasits, U., et al., *Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data*. Bioinformatics, 2013. **30**: p. 884-886.
- .40 Németh-Cahalan, K.L., K. Kalman, and J.E. Hall, *Molecular basis of pH and Ca²⁺ regulation of aquaporin water permeability*. J General Physiol, 2004. **123**(5): p. 573-580.
- .41 Fischer, M. and R. Kaldenhoff, *On the pH regulation of plant aquaporins*. J Biol Chem, 2008. **283**(49): p. 33889-33892.