

דף פותח

דו"ח לתכנית מחקר מספר 20-01-0144

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

יצירת פני שטח סינתטיים של עלה ופרי עגבנייה כפלטפורמה לחקר השפעת פני השטח על האינטראקציה עם הסביבה

Developing a synthetic platform to study the influence of surface microstructure on leaf and fruit interaction with the environment

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מאיה קליימן ירקות וגידולי שדה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Maya Kleiman, Vegetables and Field Crops, ARO, Beit Dagan Research Center, P.O.B. 15159 Rishon LeZiyyon 7505101. E-mail: mayaki@volcani.agri.gov.il

תקציר

פני השטח של הצמח מהווים את שער הכניסה לצמח. כל אינטראקציה בין הצמח לסביבתו עוברת דרך פני השטח של הצמח. על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו משפיעים גורמים רבים ביניהם גורמים כימיים ומולקולריים. גורם נוסף שמשפיע על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו וזכה לתשומת לב פחותה הוא הגורם הפיסיקלי הנגרם כתוצאה מהטופוגרפיה של פני השטח. קשה מאד לבודד את הגורם הזה כאשר נבדקים פני השטח הטבעיים שכן הוא נטמע בכל שאר הגורמים המשפיעים על האינטראקציה. ולכן, על מנת לבודד את הגורם הפיסיקלי בלבד יש לבנות מערכת המבודדת גורם זה מכל שאר הגורמים. ניסיונות לבידוד מעין זה נעשו בעבר על ידי שימוש בביומימטיקה. ביומימטיקה היא השימוש בכימיה ובהנדסת חומרים על מנת לחקות מערכות ביולוגיות. בשיטה זו בוצעו בעבר העתקות של מבנה פני השטח של עלה לצורך בידוד תכונת סופר ההידרופוביות של פני השטח כמו גם לצורך הבנת תפקיד המבנה באינטראקציה של פני שטח העלה עם גורמים ביוטיים, בעיקר חיידקים. במחקר זה הצענו לפתח את שיטת העתק העלה לחומרים נוספים ולהוספת המערכת הוסקולרית כמו גם הרחבת השיטה לפני השטח של הפרי. כל זאת בצמח המודל – עגבנייה.

במחקר זה התמקדנו בהרחבת שיטת ההעתקה של העלה בליתוגרפיה רכה (soft lithography) לחומרים אחרים מהחומר הנפוץ בו נהוג להשתמש בשיטה זו – polydimethyl siloxane (PDMS). כמו כן, בדקנו את החומרים הללו בהשוואה ל PDMS בתכונות פני השטח שלהם. בנוסף, פעלנו ליצירת העתקה דו צדדית – אשר היא בעלת מבנה משני צידי הפילם, כאשר צד אחד מחקה את המערכת הוסקולרית ומאפשר הזרמה של נוזלים בו. שיטת ההעתקה פועלת בשני שלבים. בשלב הראשון מייצרים את ההעתק השלילי – תמונת הראי של פני השטח של העלה על ידי יצירת תבנית של העלה. יצירת התבנית נעשית על ידי שפיכת הפולימר הנוזלי על פני שטח העלה, מיצוק הפולימר והסרת העלה. הצעד השני, יצירת ההעתק החיובי, נעשה על ידי חזרה על השלב הראשון כאשר התבנית נעשית לפי ההעתק השלילי. אנו בחרנו להשתמש בשני חומרים סיליקוניים מסחריים על בסיס פוליוניל, בעלי קשיות וגמישות שונה. כל שלושת החומרים הסיליקוניים אמורים לדמות את תכונות פני השטח של העלה. בנוסף, השתמשנו בנגזרות של צלולוז – אתיל צלולוז וקרבווקסימתיל צלולוז אשר אמורים לדמות יותר את תכונות הרקמה הצמחית שכן צלולוז הינו הרכיב העיקרי ברקמה הצמחית.

בשיטות המקובלות היום של העתקת פני שטח העלה, מתקבל משטח אשר צידו האחד מחקה את פני שטח העלה בעוד שצידו השני חלק. יחד עם זאת, חיקוי המערכת הוסקולרית של העלה נעשתה בשיטות סינתטיות לצורך שימוש בה להזרמה מבוקרת במכשיר המדמה מכשיר מיקרופלואידי. כאשר מחקים את פני שטח העלה בשיטות המקובלות אנו מקבלים "גבעות" באיזור של המערכת הוסקולרית ולא מערכת אשר ניתן להזרים בה נוזל. על מנת לקבל מערכת זרימה יש להשתמש בתבנית השלילית של חיקוי פני העלה – המשטח הראשון שיוצא מהעלה ונמצא במגע ישיר איתו. במחקר זה פעלנו ליצירת העתקה דו צדדית אשר דרכה נוכל לקבל את שני הדברים יחד – גם חיקוי של מבנה פני שטח העלה וגם מערכת וסקולרית הזזה לזו של העלה דרכה ניתן להזרים נוזל. הכנו רפליקות אשר מצידן האחד מחקות את פני השטח של העלה ואילו צידן השני אינו חלק אלא הוא מהווה חיקוי של התעתיק השלילי אשר מאפשר הזרמה של נוזל בתוך המערכת הוסקולרית. מערכת שכזו יכולה להוות פלטפורמה לחקר הזרימה בתעלות הוסקולריות וקישורן לפני השטח ולשם כך בנינו אותה במהלך מחקר זה.

בנוסף, מכיוון שהרחבנו את מגוון החומרים מהם ניתן לייצר את הרפליקה, בחנו גם את תכונות המשטח של החומרים הללו כלומר, בדקנו את ההידרופוביות שלהם. לצורך בדיקה זו השתמשנו במכשיר למדידת זווית של טיפת מים המונחת על פני השטח. ככל שזווית זו גדולה יותר, כך טיפת המים "נמנעת" יותר מהמשטח דבר המרמז על משטח הידרופובי יותר. בנוסף, בחנו גם את התכונות המכניות של המשטחים שיצרנו בניסוי מתיחה מאמץ בו אנו מפעילים כוח מתיחה על המשטחים ובוחנים את נקודת השבירה שלהם. המטרה כאן היא לייצר משטח אשר דומה כמה שיותר לעלה ולכן אנו בוחנים גם את תכונות פני השטח וגם את התכונות המכניות של המשטחים הסינתטיים.

את הפלטפורמה של העלה רצינו להעתיק גם לחיקוי פני השטח של הפרי. עשינו זאת על ידי עטיפת הפרי בפולימר PDMS והקשתו. לאחר מכן, עקב צורתו של הפרי, חתכנו את הפרי העטוף במרכז על מנת להשיג את ההעתק השלילי. על בסיס ההעתק השלילי הזה יצרנו את ההעתק החיובי, מכל החומרים השונים בהם השתמשנו ליצירת הפלטפורמה הסינתטית של העלה. הצלחנו לראות החלק מהחומרים את מיקרו המבנים האופייניים לקליפת פרי העגבנייה. גם לחיקוי פני השטח של הפרי מהחומרים השונים ביצענו את בדיקות החומרים - הידרופוביות פני השטח ומאמץ המתיחה שכן תכונות אלה יכולות להשתנות עם השינוי במבנה.

לסיכום, מטרת העל של המחקר כולו היא לפתח תשתית סינתטית להפרדת השפעת מיקרו מבנה פני השטח מכל שאר הגורמים המשפיעים על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו. במחקר זה התקדמנו על ידי הרחבת התשתית לחומרים נוספים אשר מייצגים בצורה טובה יותר את הרכב הרקמה הצמחית ובחינת תכונות החומרים הללו בהקשר המבני. בנוסף, ביצענו שילוב של חיקוי מבנה פני השטח עם המערכת הוסקולרית ליצירת פלטפורמה אשר תסייע בעתיד בהזרמת נוזלים בשילוב עם מבנה פני השטח ובכך לחקור תכונות דיפוזיביות ולהעמיק את ההבנה במיקום הצטברות נוטריאנטים על פני שטח העלה. כמו כן הרחבנו את הפלטפורמה לאיבר חשוב נוסף של הצמח - הפרי.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. דר' גיא מחרז, מנהל המחקר החקלאי
2. דר' ילנה פוברנוב, מנהל המחקר החקלאי
3. פרופ' מיטל רכס, האוניברסיטה העברית בירושלים

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא (מחק את המיותר)

*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)

חתימת החוקר  תאריך: 1.12.20

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

בשלב זה עדין אין פרסומים שנבעו מהמחקר.

גוף דו"ח המחקר

תוכן עניינים:

<u>מספר עמוד</u>	<u>נושא</u>
1	מבוא
1	מטרות המחקר
2	ניסויים ותוצאות המחקר
15	דיון

רשימת איורים

<u>מספר עמוד</u>	<u>איור</u>
3	איור 1 –הכנת רפליקה דו צדדית
4	איור 2 – תמונות מצלמה של רפליקות עלה מחומרים שונים
5	איור 3 – תמונות בינקולר של רפליקות עלה מחומרים שונים
6	איור 4 – תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני של רפליקות עלה מחומרים שונים
7	איור 5 – הזרמת נוזלים ברפליקות מחומרים שונים
9	איור 6 – השוואת הידרופוביות פני השטח של העלה
11	איור 7 – השוואת תכונות מכניות של העלה
12	איור 8 – תמונות מצלמה של רפליקות פרי מחומרים שונים
13	איור 9 – תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני של רפליקות פרי מחומרים שונים
14	איור 10 – השוואת הידרופוביות פני השטח של הפרי
15	איור 11 – השוואת תכונות מכניות של הפרי

מבוא

ישנם גורמים רבים המשפיעים על האינטראקציה בין הצמח וסביבתו. באינטראקציה, בעיקר באינטראקציה ביוטית של הצמח עם הסביבה מופעלים סיגנלים רבים, משני הצדדים. בעוד שהסיגנלים הכימיים והמולקולריים זכו למחקר רב לאורך השנים [1], ישנו סיגנל אשר נחקר משמעותית פחות לאורך השנים. זהו הסיגנל הפיסיקלי, המבני. המיקרו טופוגרפיה עצמה היא בעלת השפעה רבה על כל אינטראקציה בין הצמח לסביבתו. ביוטית ואביוטית. חקר הסיגנל הפיסיקלי, המבני, על פני שטח הצמח עצמו הוא כמעט בלתי אפשרי שכן כל שאר הסיגנלים הכימיים והמולקולריים ימסכו את הסיגנל המבני. לכן, יש צורך בהפרדה בין הסיגנל הפיסיקלי לשאר הסיגנלים. הפרדה זו ניתנת להשגה בשיטה של ביומימטיקה – שימוש בכימיה והנדסת חומרים לצורך חיקוי מערכות ביולוגיות [2].

ביומימטיקה שימשה בעבר לחיקוי מבני של מערכות צמחיות, ספציפית העלה, דווקא על מנת לחקות תכונות פיסיקליות טהורות כגון הידרופוביות [3]–[6], זאת לצורך יצירת משטחים סופר הידרופוביים המסוגלים לניקוי עצמי. הסיגנל המבני נחקר מעט לאורך השנים בעיקר בהקשר של אינטראקציה בין פני שטח העלה ובין מיקרו אורגניזמים [7]–[9]. העבודות אשר חקרו זאת הכינו, לרוב, מערכים של מבנה אחד ספציפי על פני משטח סינתטי. ישנן שתי עבודות אשר בדקו את הסיגנל הפיסיקלי על פני העתקות סינתטיות של פני שטח העלה עצמו [10], [11].

במחקר זה מטרתנו היא להרחיב ולבסס את השימוש בפלטפורמה הסינתטית. נעשה זאת עבור העלה והפרי של העגבנייה. בעלה, שם ההעתקה הסינתטית מבוססת יחסית, נרחיב את ההעתקה לחומרים שונים ונוסיף את השפעת המערכת הוסקולרית. בפרי, נפתח פרוטוקול חדש להעתקת פני השטח ונבדוק כיצד המיקרו מבנה משפיע על תופעת הסדקים בפרי העגבנייה. מטרותינו לתקופת מחקר זו הן: להרחיב את יריעת החומרים מהם אנו מייצרים את ההעתק של העלה תוך כדי בדיקת התכונות של החומרים גם מבחינת תכונות מכניות וגם מבחינת תכונות פני השטח. בנוסף, מטרתנו היא לשלב את המערכת הוסקולרית של העלה בתוך מבנה פני השטח של העלה על מנת לבדוק השפעות של זרימה במערכת הוסקולרית.

מטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה

1. שכלול הפלטפורמה הקיימת לחיקוי סינתטי של פני שטח של עלה לחומרים חדשים שלא נבדקו עד היום ולשילוב עם המערכת הוסקולרית של העלה ויישומה על עלה של עגבנייה.
2. הרחבת הפלטפורמה לחיקוי סינתטי של פני שטח פרי העגבנייה ובחינתה במקרה הספציפי של סדקים (cracks) בפרי להפרדת השפעה של המיקרו מבנה מטיב החומר על יצירתם והתרחבותם.

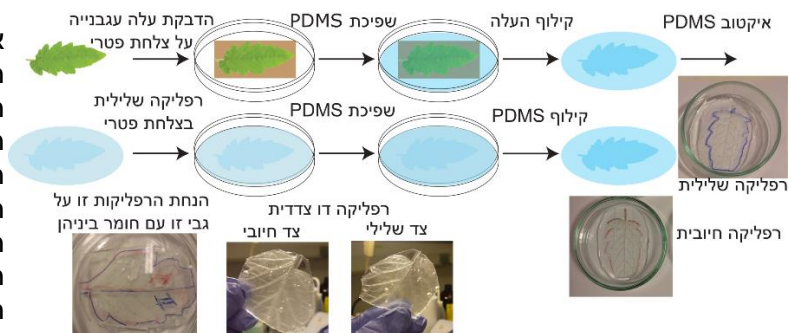
פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

בתחילת המחקר הייתה בידינו שיטה פשוטה וידועה בספרות של ליתוגרפיה רכה בעזרתה ניתן היה לחקות את מבנה פני השטח עלה – לייצר תבנית. מטרתו המרכזית של המחקר הייתה לפתח ולשכלל את השיטה הזו לחומרים שונים ולשילוב עם המערכת הוסקלורית תוך כדי איפיון החומרים השונים מהם נבנה המשטח הסינתטי. בנוסף, רצינו להעביר את הטכניקה למשטחים נוספים של הצמח וספציפית, לפני השטח של הפרי. ביצענו את המטרות הללו תוך שימוש במספר חומרים סינתטיים, חלקם נגזרות של צלולוז, תחת המחשבה כי חומרים אלו מדמים את החומר העיקרי ממנו מורכב העלה. חלק אחר של החומרים היה פולימרים מבוססי סיליקון אשר היו החומרים העיקריים בהם השתמשו בספרות בשיטה זו. השיטה ממנה התחלנו מתוארת באיור 1. כפי שנראה באיור, לצורך הכנת התבנית: לקחנו עלעל של העגבנייה (לאורך כל הניסויים השתמשנו בזן m82, בצמחים בני 2-3 שבועות), שטפנו במים מזוקקים, ייבשנו במטלית והדבקנו על צלחת פטרי. ערבבנו את חלק הבסיס בקיט המסחרי של הפולימר Poly dimethyl siloxane (PDMS) עם חלק הלינר ביחס משקלי של 1:10 (בסיס:לינר). הפעלנו ואקום במשך כחצי שעה ושפכנו 38.5 גר' של הפולימר הנוזלי על גבי העלעל. הפעלנו ואקום במשך שעתיים. את הפולימר הקשנו בטמפרטורת החדר לאורך הלילה. את העלה הסרנו מהשכבה הפולימרית בעדינות כך שלא נותרו חלקי עלה בתוך הפולימר. במידת הצורך, שטפנו את הפולימר בכלורופורם על מנת להסיר שאריות של עלה. במשטח הפולימרי טיפלנו באמצעות פלסמה בעזרת Laboratory Corona Treater במשך כחצי דקה. לאחר מכן הונח המשטח הפולימרי בתוך דסיקטור שבתוכו 100 מיקרוליטר של Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluoro-octyl)silane תחת ואקום למשך 3 שעות. משטח זה היווה את התבנית השלילית ונשמר במעבדתנו לאורך זמן. על בסיס התבנית השלילית יצרנו את התבנית החיובית. להכנת התבנית החיובית הכנו שוב את הפולימר כמתואר למעלה ושפכנו את הפולימר הנוזלי על התבנית השלילית. הפעלנו ואקום למשך שעה להוצאת בועיות האויר. השארנו את הפולימר להתקשות בטמפרטורת החדר לאורך הלילה. בסוף תהליך זה קיבלנו גם את התבנית החיובית בנפרד מהתבנית השלילית. פרוטוקול ההכנה של שתי התבניות, כמו גם תמונה של התבנית השלילית ושל התבנית החיובית מובאת באיור 1. חשוב לציין כי השתמשנו במגוון רב של חומרים על מנת להכין את התבנית השלילית. המטרה לכך הייתה למצוא את החומר שממנו ניתן לקבל את התבנית השלילית המוצלחת והמדויקת ביותר. השתמשנו בעיקר בפולימרים על בסיס סיליקון (אשר חלקם מתוארים בהמשך כחומרים מהם בנינו את הרפליקה החיובית) מכיוון שאלה הם החומרים הרלוונטיים לכך לפי הספרות. מצאנו כי החומר ממנו ניתן להכין את התבנית השלילית הטובה ביותר הוא PDMS ולכן זהו החומר היחיד בו השתמשנו לתבנית השלילית בהמשך המחקר.

בשלב הבא רצינו להשתמש בתבניות שיצרנו לצורך הכנה של רפליקה "דו צדדית" מהחומרים השונים. הרפליקה האמורה תהיה בעלת מיקרו מבנה פני שטח העלה בצידה האחד ובעלת המבנה ההופכי לזה

בצידה השני. כך, בצידה השני של הרפליקה, נקבל למעשה תעלות בצורת המבנה של המערכת הוסקולרית של העלה דרכן ניתן יהיה להזרים נוזלים. על מנת לבצע מטרה המשכנו עם התבנית החיובית והשלילית שבידינו. טיפלנו באמצעות פלסמה Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluoro- ו octyl)silane גם בתבנית החיובית, כפי שמתואר עבור התבנית השלילית. בהמשך, השתמשנו בתבנית השלילית ובתבנית החיובית על מנת לייצר את הרפליקה הדו צדדית. לאחר סימון הגבולות הברורים של כל אחת מהתבניות ובנוסף, חירורן במקומות ספציפיים על מנת לייצר התאמה מושלמת ביניהן, הנחנו אותן זו על גבי זו כאשר ביניהן חומר נבחר. החומר היה במצב נוזלי או פלסטי טרם התקשות (תלוי בטיב החומר) והודק לשני הצדדים (התבניות אשר כיסו אותו מלמטה ומלמעלה). בצורה זו בוצעה התקשות של החומר לקבלת רפליקה חיובית מהצד האחד של המשטח (זה שהיה צמוד לתבנית השלילית) ושלילית מהצד השני של המשטח (זה שהיה צמוד לתבנית החיובית). ניתן לראות את הצמדת שתי התבניות באיור 1. לאחר התקשות החומר שבמרכז, הופרדו שלושת המשטחים: התבנית החיובית והשלילית נשמרו לשימוש חוזר (באופן זה ניתן לקבל שוב ושוב את אותה הרפליקה הדו צדדית) ואילו הרפליקה הדו צדדית נלקחה לניסויים נוספים. ניתן לראות תמונות של שני הצדדים של הרפליקה הדו צדדית באיור 1.

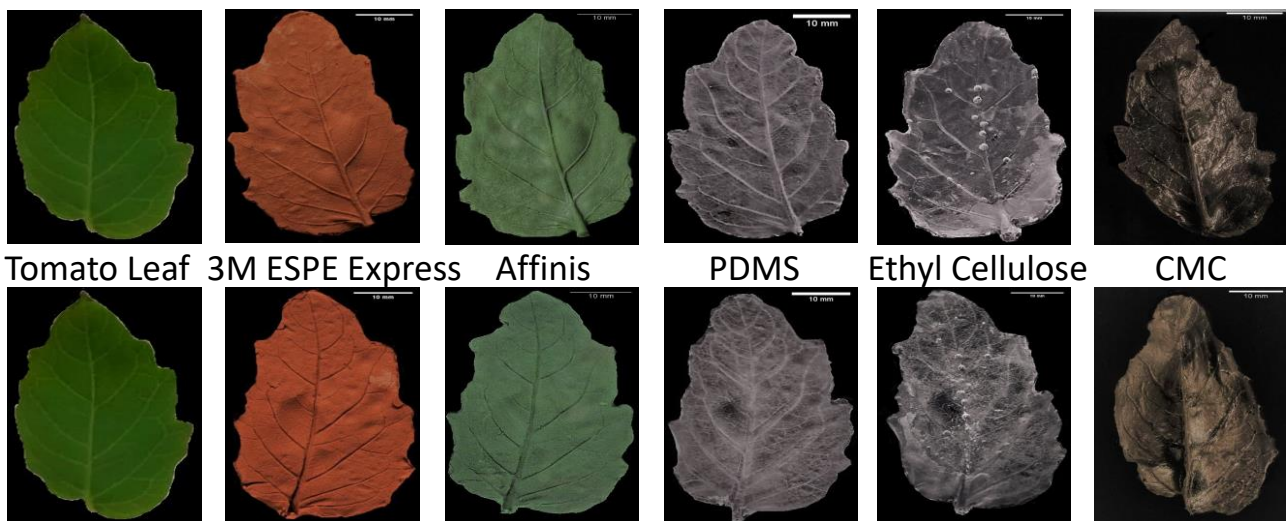
איור 1: הכנת רפליקה דו צדדית. הסכימה העליונה מתארת את תהליך הכנת הרפליקות (גם השלילית וגם החיובית) כאשר תמונות הרפליקה השלילית והחיובית מצורפות במקומות המתאימים. קווי המתאר של הרפליקה השלילית סומנו בכחול ואלה של החיובית, באדום. בהמשך הונחו שתי הרפליקות זו על גבי זו בהתאמה



מושלמת בהתאם לקווי המתאר עם חומר ביניהן (כפי שמתואר בתמונה השמאלית התחתונה). לאחר התקשות החומר שבמרכז, נוצרה הרפליקה הדו צדדית ותמונות של הצד החיובי והצד השלילי שלה מובאות בשורה התחתונה.

חלק חשוב מהמחקר היה הרחבת השיטה לחומרים נוספים. לצורך זה בדקנו היתכנות של הכנת הרפליקות הדו צדדיות ממגוון חומרים אחרים בנוסף ל PDMS שכבר ידוע בספרות. החומרים האחרים שנבדקו היו סיליקונים מסחריים אחרים, ספציפית, פולימרים סיליקוניים המשמשים בתעשיית רפואת השיניים. חומרים אלה משמשים כחומר תבנית בתחום רפואת השיניים והם, מעצם תפקידם, בעלי יכולת חיקוי מבנים. בנוסף, נבדקו גם נגזרות של צלולוז. זאת מכיוון שצלולוז הינו החומר העיקרי ממנו עשויה הרקמה הצמחית אך מכיוון שזהו חומר שקשה מאד לעבוד איתו, שכן הוא יוצר קריסטלים, בחרנו לעבוד עם נגזרות שונות של צלולוז. בדקנו שני חומרים מסחריים: 3M ESPE Express ו Affinis. שני החומרים הם פולימרים על בסיס פוליוויניל. החומר הראשון, 3M ESPE Express הוא חומר בעל

גמישות מועטה יחסית אשר אמור להוות חומר קשה יותר. החומר השני, Affinis, הינו רך הרבה יותר וגם גמיש יותר. לשני החומרים מרקם של פלסטלינה (לפני ההתקשות) אך ניתן להרגיש בקלות את הגמישות הגבוהה יותר של ה Affinis. למעשה, ESPE Express הינו פיתוח מוקדם יחסית של חומר בשימוש תעשית רפואת השיניים ואילו Affinis הוא חומר מתקדם וחדש יותר בתעשייה. תמונות של הרפליקה הדו צדדית אשר יצרנו מחומרים אלה מופיעות באיור 2. את החומרים האלה השווינו לחומר הבסיס איתו עבדנו – PDMS, אשר גם הוא פולימר סיליקוני אם כי זהו אלסטומר אשר נמצא מצב צבירה נוזלי וצמיג ביותר לפני התקשותו. גם התמונה עבור הרפליקה הדו צדדית של PDMS נמצאת באיור 2. בנוסף, כאמור, בדקנו שתי נגזרות של צלולוז. הראשונה: אתיל צלולוז והשנייה: קרבוקסימתיל צלולוז (CMC).

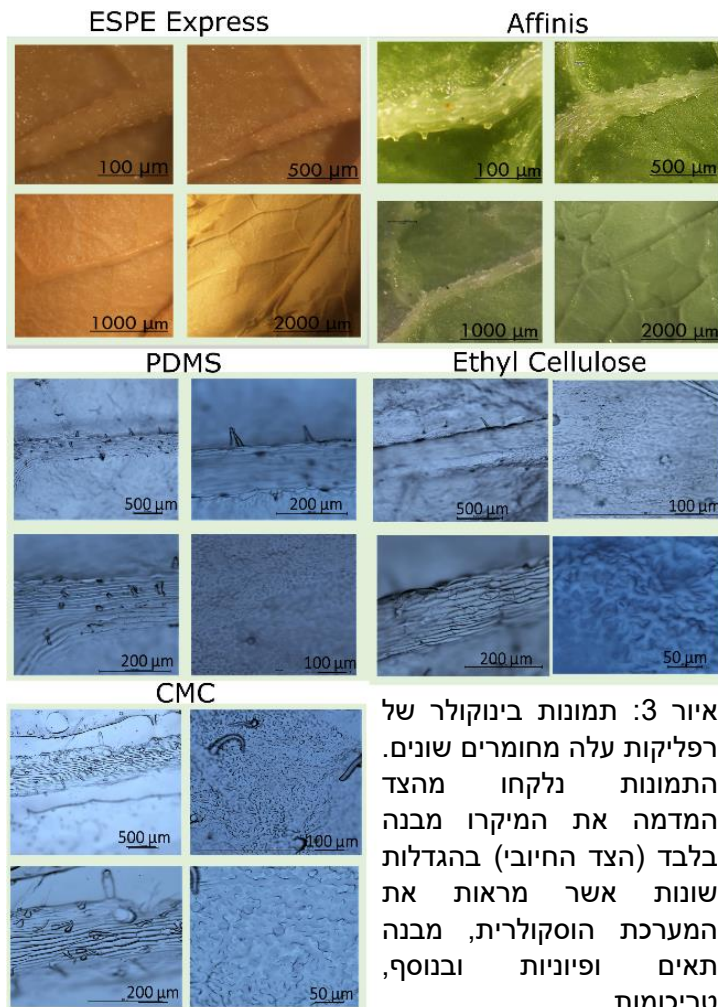


איור 2: תמונות מצלמה של רפליקות עלה מחומרים שונים. תמונות מצלמה של הרפליקות הדו צדדיות מהחומרים השונים. בשורה העליונה צולם הצד של התבנית החיובית בה מוצג מיקרו מבנה פני השטח של העלה. בשורה התחתונה צולם הצד השני של הרפליקה הדו צדדית אשר מכיל, למעשה, את תעלות המערכת הוסקולרית. בכל מקרה, שני הצילומים שייכים לאותה הרפליקה אשר צולמה משני צדדיה.

את תמיסת האתיל צלולוז הכנו על ידי המסה של אבקת הפולימר (עם אחוז נגזרות של 48% וצמיגות של 22 cps) באתנול ביחס של גר' אבקה ב 6 מ"ל של ממס. בנוסף הוספנו מרכך: Diethyl phthalate ב 40% יחס משקלי לפולימר. מטרת הוספת המרכך הייתה ליצור רפליקה פחות קשיחה. ללא הוספת המרכך הרפליקה שנוצרה מהאתיל צלולוז הייתה שבירה ביותר. התמיסה הזו עורבבה במשך לילה בטמפרטורת החדר ולאחר מכן הוכנסה למקרר ונשמרה שם. מצאנו כי השהות במקרר עוזרת להיפטר מבועות האוויר אשר היוו בעיה קשה בשלב ראשוני. את תמיסת ה CMC הכנו על ידי המסה של גר' אחד של אבקת CMC בצמיגות בינונית בתוך 40 מ"ל של מים. גם תמיסה זו עורבבה במשך לילה בטמפרטורת החדר ונשמרה לאחר מכן במקרר. הכנת פילם מתמיסות אלה מתבסס על התאדות הממס ולכן לא ניתן היה להכין את הרפליקות הדו צדדיות בצורה דומה להכנת הרפליקות האחרות, על ידי הכנסת התמיסה בין התבנית השלילית לחיובית, שכן הדבר מנע אידוי של התמיסה. אי לכך, במקרה זה,

הוכן הצד החיובי (על ידי הצמדה לתבנית השלילית) בנפרד מהצד השלילי (על ידי הצמדה לתבנית החיובית) ולאחר מכן שני הצדדים "הודבקו" יחד על ידי הוספה של שכבה דקה של התמיסה ביניהם. גם התמונות של הרפליקות הדו צדדיות משתי נגזרות הצלולוז מופיעות באיור 2.

את הרפליקות הדו צדדיות הללו בחנו גם תחת בינקולר על מנת לבדוק את ההצלחה בחיקוי מיקרו מבנה פני שטח העלה. מצאנו כי ה PDMS מחקה בצורה מוצלחת למדי את מיקרו מבנה פני העלה, תוך שיחזור מבנה התאים, הפיוניות, הטריכומות (אם כי רובן שבורות) וכמובן המערכת הוסקולרית, שני הסיליקונים האחרים לא צלחו בחיקוי המבנים העדינים של פני העלה אך השיגו חיקוי מוצלח של המערכת הוסקולרית אשר מידותיה גדולות יותר. שני הצלולוזים הראו יכולת חיקוי מוצלחת ביותר. הם הצליחו לחקות גם את המבנים העדינים של התאים והפיוניות וגם הראו הצלחה גבוהה יותר (אם כי עדין מוגבלת) של חיקוי הטריכומות. תמונות הבינקולר מופיעות באיור 3.

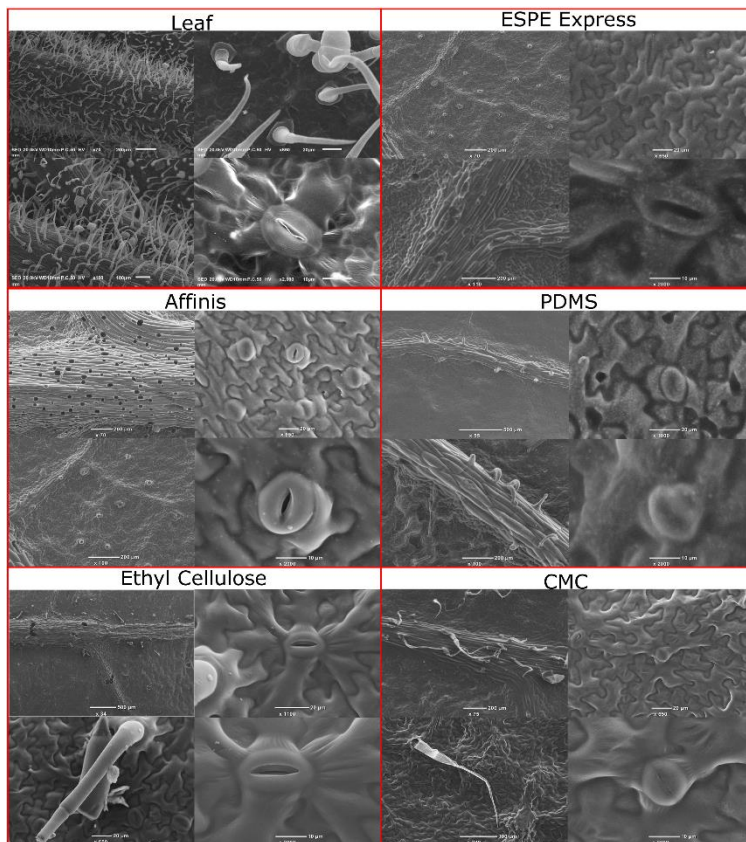


איור 3: תמונות בינקולר של רפליקות עלה מחומרים שונים. התמונות נלקחו מהצד המדמה את המיקרו מבנה בלבד (הצד החיובי) בהגדלות שונות אשר מראות את המערכת הוסקולרית, מבנה תאים ופיוניות ובנוסף, טריכומות.

על מנת לראות את המבנים בצורה איכותית וטובה יותר, ביצענו גם מיקרוסקופיה אלקטרונית על הרפליקות השונות כמו גם על עלה עגבניה. את עלה העגבניה קיבענו באתנול והעברנו תהליך של CPD וציפוי לצורך הבחינה. הדוגמאות הסינתטיות היו צריכות לעבור הליך של ציפוי בלבד. תמונות המיקרוסקופיה האלקטרונית מוצגות באיור 4. ניתן לראות במיקרוסקופיה האלקטרונית כי למרות מה שנראה בבינקולר, החומרים הסיליקוניים דווקא צלחו את הליך החיקוי וניתן בהחלט לראות בהם מבנים של תאים ושל פיוניות. כנראה שלא ניתן היה לראות מבנים אלה בבינקולר מכיוון שהחומרים הללו, בניגוד ל PDMS ולחומרים הסיליקוניים, אינם שקופים וקשה יותר לראות את המבנה המדויק שלהם במיקרוסקופית אור. יחד

עם זאת, ניתן לראות כי בחומרים הסיליקוניים לא היה שום חיקוי של הטריכומות. ב Affinis נראה שיש חורים במערכת הוסקולרית במקומות בהם היו צריכות להיות טריכומות. יתכן ותופעה זו נובעת מכך

שבתבנית השלילית, ממנה הועתקה הרפליקה, היו חורים במקומות אלה וה Affinis לא הצליח לחדור לתוך החורים הללו ולכן החורים נשארו גם ברפליקה הזו. ב ESPE express לא רואים אפילו את החורים הללו. כנראה שהפולימר, במקרה זה, פשוט "השלים את החסר". כאן מדובר בחומר הרבה פחות עדין מ Affinis ולכן יתכן שהוא פשוט סגר את החורים בעצמו שכן הם היו קטנים מכדי שישנו משהו לצורת החומר. אם כך אנו רואים שכל החומרים חיקו בצורה יפה את מבנה התאים והפיוניות ובעיה האמיתית היא בטריכומות. ה PDMS חיקה את הטריכומות הגדולות שעל המערכת הוסקולרית אך כמעט כולן שבורות. אתיל צלולוז חיקה את מבנה הטריכומות בצורה יפה. CMC מקרה טריכומות אך הטריכומות במקרה זה משנות צורה ומשתטחות. זוהי כנראה תוצאה של אידיוי הממס אשר מייצרת שכבה דקה מאד של פולימר אשר במקרה זה גורמת לקריסה של מבנה הטריכומה. בכל מקרה, אף אחד מהחומרים לא הצליח לחקות את כמות ואיכות הטריכומות אשר נמצאת בעלה עגבניה אמיתי כפי שניתן מהשוואה לעלה באיור 4.

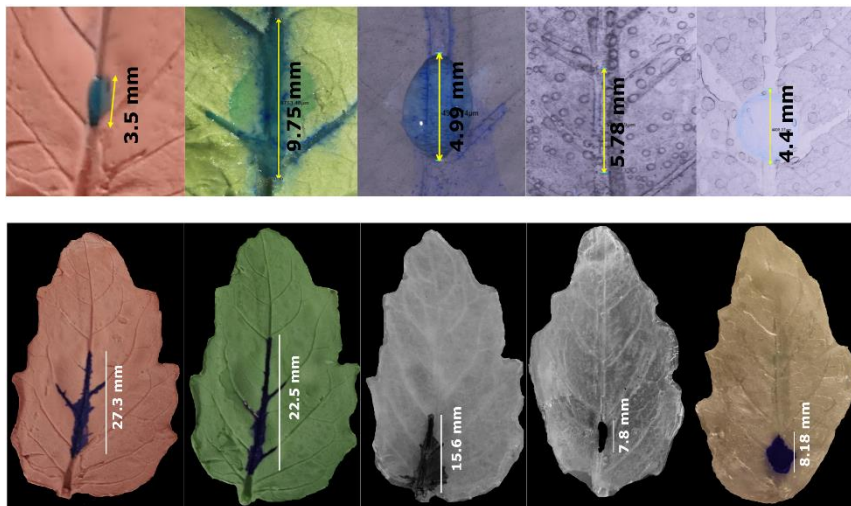


מטרת הכנת הרפליקה הדו צדדית הייתה, כאמור, על מנת לאפשר זרימה במערכת הוסקולרית של העלה כאשר בצד השני של הזרימה משולב מיקרו מבנה פני שטח העלה. על מנת לממש מטרה זו, בחנו את היכולת שלנו להזרים נוזלים במערכת הוסקולרית הסינתטית שיצרנו (למעשה, זוהי הרפליקה השלילית של העלה אשר בה המערכת הוסקולרית בנויה כך שתעלות המערכת הוסקולרית הן תעלות ולא גבעות). לצורך כך השתמשנו בטיפה של מים צבועים – בתוך בקבוקון של מים הוספנו מעט מאד דיו כחול לצביעת המים.

איור 4: תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני של רפליקות עלה מחומרים שונים ומעלה עגבניה. התמונות נלקחו מהצד המדמה את המיקרו מבנה (הצד החיובי) בהגדלות שונות אשר מראות את המערכת הוסקולרית, מבנה תאים ופיוניות ובנוסף, את מבנה הטריכומות, אם צלח.

לחזות בהתפשטות הטיפה בתוך המערכת הוסקולרית עם הזמן. מצאנו כי הטיפה מתפשטת באופן

מוגבל ביותר וכי יכולת ההתפשטות תלויה מאד בחומר ממנו מורכבת הרפליקה (איור 5 פאנל עליון). ההשערה שלנו הייתה כי זוהי תוצאה גם של הידרופוביות המערכת (כפי שנראה בהמשך) וגם של צמיגות וצפיפות המים אשר יכולים לנוע לאט יותר ובקושי רב יותר מאשר נוזלים אחרים. בעיה נוספת שנתקלנו בה במצב זה היא המסיסות של CMC במים. מכל החומרים בהם השתמשנו, CMC היה החומר היחיד אשר מסיס במים ואכן, טיפת המים אשר הנחנו המסה את האזור לחלוטין. תופעה נוספת אשר נתקלנו בה היא כי זמינות מערכת העורקים שונה בין חומר לחומר. למרות שההעתק נעשה על גבי עלים דומים מאד, נראה כי המערכת הוסקולרית עדין הייתה שונה בין ההעתקים מהחומרים השונים, אם מבחינת עומקה ואם מבחינת רוחבה. לא ראינו הבדלים אלה במיקרוסקופ אך הם בהחלט ניצפו כאשר התחלנו בהזרמת הנוזלים דרך המערכת הוסקולרית. אך, בסופו של דבר, יכולת ההתפשטות של המים בתוך המערכת הוסקולרית, כפי שהיא מתוארת על ידי המרחק שעברה טיפת המים (איור 5 למעלה) מושפעת, כנראה, בעיקר מהידרופוביות החומר.



על מנת לבדוק את העניין יותר לעומק, החלפנו את הנוזל באתנול. ניתן לראות את המרחק שעבר הצבע במקרה זה לאחר שעה בתמונה 5 בפנל התחתון. התפשטות הצבע במקרה זה היה למרחק משמעותית גדול יותר. הסיבה לכך היא כנראה בעיקר

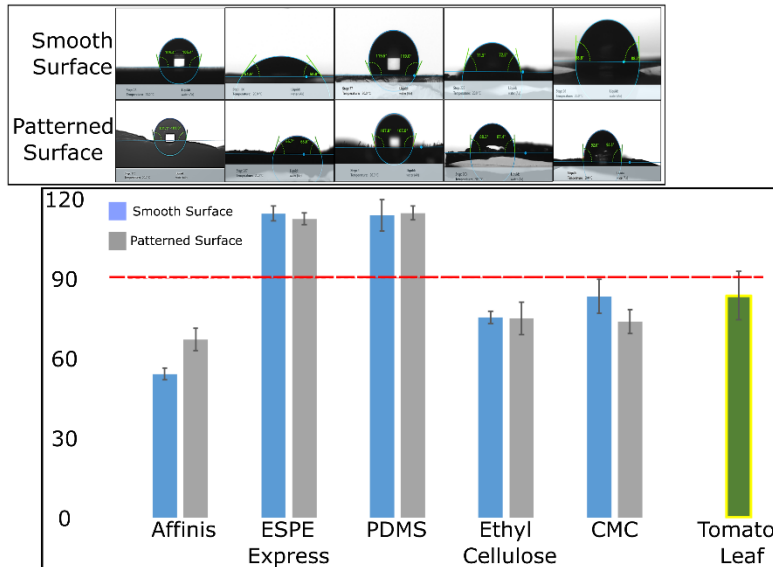
הצפיפות הנמוכה יותר של האתנול אשר מאפשרת לו לזרום בקלות רבה יותר. יחד עם זאת, עדין הזרימה בחומרים הסיליקוניים הייתה הרבה יותר טובה מאשר בחומרים על בסיס הצלולוז דבר אשר, שוב, ניתן

לייחס למבנה השונה של המערכת הוסקולרית אשר אין באפשרותנו להבחין בו בשיטות אופטיות אלא רק בעזרת ההזרמה. התפשטות הטיפה הייתה בתוך המערכת הוסקולרית בלבד ולא יצאה מגבולות המערכת מה שמראה את יכולתנו להזרים פרטנית בתוך המערכת הוסקולרית. חשוב לציין כי הזרמת הטיפה בצורה זו מוגבלת מכיוון שהטיפה מתייבשת לאחר זמן מה באויר הפתוח ומפסיקה לזרום. הדרך

לפתור זאת היא על ידי הזרמה קונסיסטנטית של נוזל לתוך המערכת. ניסינו לבצע זאת על ידי שימוש במשאבה פריסטלית אך לא הצלחנו למקם את בסיס ההזרמה במקום קבוע. בנוסף, המטרה המקורית שלנו הייתה להזרים את הנוזל דרך המערכת הוסקולרית כאשר המערכת הוסקולרית נמצאת בצד התחתון של הרפליקה הדו צדדית והצד העליון, החשוף, הוא זה המחקה את מיקרו מבנה פני השטח. זאת ניתן לעשות על ידי הדבקת הצד המייצג את המערכת הוסקולרית לזכוכית נושאת והזרמת הנוזל בעזרת משאבה פריסטלית לתוך בסיס המערכת הוסקולרית. ניסינו לבצע הדבקה והזרמה שכאלה ועד לרגע זה לא הצלחנו. יש צורך לאזן בין הדבקה מאסיבית מדי אשר יכולה לסתום את המערכת הוסקולרית ואינה מאפשרת זרימה בכלל לבין הדבקה חופשית מדי אשר גורמת לזליגת הנוזל המוזרם אל מחוץ למערכת הוסקולרית. אי לכך, אפיינו זרימה של נוזלים שונים ברפליקות השונות בתוך המערכת הוסקולרית והסקנו מכך על יכולת ההזרמה בחומרים השונים.

בשלב הבא רצינו לבדוק את תכונות החומרים מהם הכנו את הרפליקות של העלה. על מנת לבדוק את תכונות פני השטח של החומרים השונים ואת התלות של תכונות אלה במיקרו המבנה שעל פני השטח, השתמשנו במכשיר המודד זוויות מגע (contact angle). מכשיר זה משחרר טיפה בגודל ידוע של נוזל נבחר על פני השטח. לאחר שחרור הטיפה נמדדת הזווית בין פני השטח לבין הטיפה מספר פעמים (איור 6). את הטיפה משחררים בשלושה מיקומים שונים על פני השטח, על מנת להעריך את ההידרופוביות של המשטח כולו ובסופו של דבר ניתנת, כתוצאה סופית, זווית המגע בי הטיפה לפני השטח. כאשר הנוזל ממנו עשויה הטיפה הוא מים, הדבר מעיד על הידרופוביות פני השטח של המשטח הנבדק. ככל שזווית זו גדולה יותר כך נחשב המשטח הידרופובי יותר, כאשר זווית של 90° מייצגת את ההפרדה בין משטחים הידרופיליים לבין משטחים הידרופוביים וזוויות מעל 150° מייצגות משטחים סופר הידרופוביים. הסיבה לכך היא שככל שהמשטח הידרופובי יותר כך שטח המגע בין הטיפה למשטח יהיה קטן יותר (עקב דחיה בין המשטח ההידרופובי לטיפת המים) דבר אשר ייצר זווית מגע גדולה יותר. מכיוון שהידרופוביות פני השטח הינה פונקציה של החומר ממנו עשוי המשטח ושל מיקרו מבנה המשטח אנו מדדנו את זוויות המגע של המשטח החלק העשוי מהחומר הנבדק (זאת ביצענו על ידי הכנת פילם מהמשטח בצורה זהה להכנת הרפליקה כאשר התבנית שלנו הייתה משטח חלק) כמו גם את זוויות המגע ברפליקות. בנוסף, מדדנו את זווית המגע כאשר המשטח הנבחן היה העלה עצמו, לשם השוואה. כל המדידות שנעשו, גם על המשטחים החלקים וגם על המשטחים בעלי המבנה מוצגות באיור 6. למעלה מוצגות תמונות מייצגות ממכשיר המדידה אשר מראות את הזוויות השונות בין המשטח לטיפה על פני המשטחים השונים. תוצאות המדידות מסוכמות באיור בגרף באיור 6. מצאנו כי המשטחים השונים שייצרנו שונים זה מזה ברמת ההידרופוביות שלהם, כאשר שנים מהם (EDPE ו PDMS) הם הידרופוביים וכל שאר המשטחים הם הידרופיליים. בנוסף, מצאנו כי שינוי מיקרו מבנה פני השטח לא משנה לרוב את תכונות הידרופוביות המשטח, פרט לשני המשטחים ההידרופיליים ביותר - Affinis ו

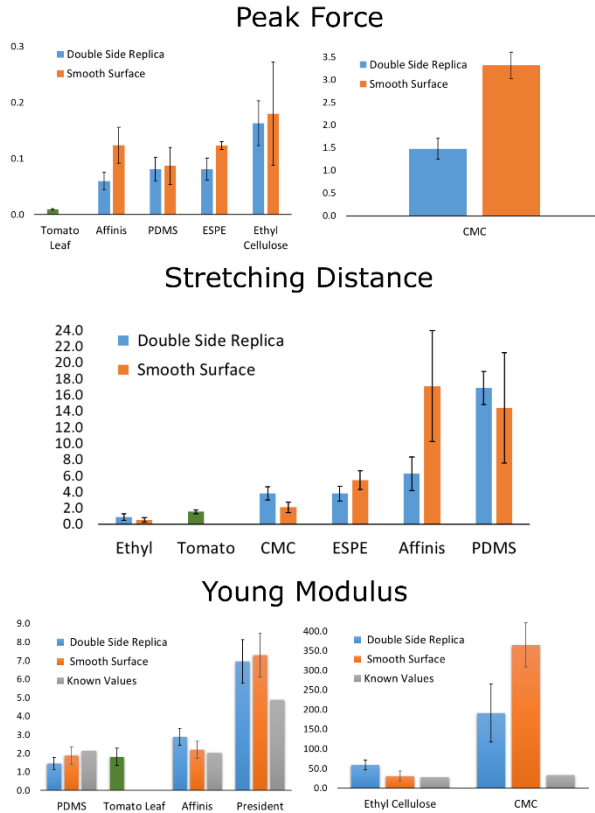
CMC בהם נצפה שינוי קטן אך בכל פעם לכיוון אחר. במקרה של Affinis המבנה הקטין את הידרופיליות המשטח ואילו במקרה של CMC המבנה הגדיל את הידרופיליות המשטח. בנוסף אנו רואים כי המשטחים בעלי ההידרופוביות הדומה ביותר לזו של עלה עגבניה הם דווקא המשטחים הצלולזיים וזאת למרות הציפוי של הקטיקולה אשר נוכח בעלה הטבעי ומתנהג בצורה שונה מצלולוז.



איור 6: השוואת הידרופוביות פני השטח של העלה. למעלה: תמונות מייצגות של הליך מדידת זווית המגע במשטחים חסרי ובעלי מבנה מהחומרים השונים. הטיפה מונחת על פני המשטח. עבור כל נקודה נמדדת הזווית (3 פעמים). למטה: גרף סיכום תוצאות מדידת הזווית בחמשת החומרים השונים ובעלה. הזווית נמדדה גם על משטחים חלקים (כחול) וגם על משטח הרפליקה (אפור). אנו רואים כי הוספת המבנה משנה את זווית המגע בחלק מהחומרים וכי החומרים הצלולזיים מדמים את ההידרופוביות העלה בצורה הטובה ביותר בעוד שפני השטח של החומרים PDMS ו ESPE הם הידרופוביים מדי ולא מדמים את הידרופוביות פני שטח העלה.

השלב הבא שבוצע הוא בחינת תכונות המשטחים שהוכנו מבחינת החוזק המכני שלהם. את המדידה ביצענו על ידי מבחן מתיחה. ביצענו זאת על ידי מכשיר אינסטרון אשר תופס את המשטח משני צדדיו ומותח אותו בקצב בו ניתן לשלוט תוך הפעלת כוח מדוד. המכשיר מודד, למעשה, מהו הכוח המקסימלי ליחידת שטח אותו ניתן להפעיל עד לקריעת המשטח - מדד לקשיות המשטח כמו גם את המרחק המקסימלי אותו אפשר למשוך עד הקריעה - מדד לאלסטיות המשטח. היחס בין הקשיות לאלסטיות נותן את קבוע יאנג של המשטח אשר מסמן תכונה אינטרינזית של המשטח. ביצענו את המדידות על משטחים מכל החומרים. גם משטחים חלקים וגם הרפליקות הדו-צדדיות וכמובן, על העלה עצמו. בהכנת המשטחים החלקים הכנו משטחים בעובי דומה ככל הניתן לעובי של הרפליקות הדו-צדדיות. חשוב לציין כי התוצאות אשר יוצאות מהמכשיר רלוונטיות לדוגמא הנבחנת עצמה. על מנת להסיק מסקנות כלליות בקשר לחומר בתצורתו הנוכחית יש לנרמל את התוצאות בשטח של הדוגמא הניצב לכיוון הכוח המופעל. מכיוון שרוחב הדוגמאות כולן, אותן חתכנו בצורת מלבן, היה זהה, שטח זה תלוי, למעשה בעובי הדוגמא עליו יש לנו הרבה פחות שליטה. הדוגמאות העשויות מנגזרות הצלולוז, לדוגמא, נוצרות על ידי התאדות הממס. אי לכך אנו מקבלים פילמים דקים מאד אשר על פניהם מבנה העלה. עובי הפילמים הסיליקוניים תלוי בכמות החומר אותה אנו שופכים על פני השטח. אנו חזרנו פעם אחר פעם על אותה כמות של חומר ובכל זאת העובי יכול להשתנות שכן החומר נמצא במצב נוזלי בתחילה ומתפרש על פני השטח באופן

שאינו לנו שליטה מלאה עליו. בנוסף, העובי של הפילמים מהחומרים הסיליקוניים היה תמיד גדול יותר מעובי הפילמים של נגזרות הצלולוז. אך מעבר לכל, חשוב לזכור כי מכיוון שהפילמים הנבדקים היו רפליקות של פני שטח העלה, הרי שהעובי שלהם השתנה לאורך הפילם. פני שטח העלה אינם ישרים, כמובן. אזור המערכת הוסקולרית משנה מאד את עובי הפילם ולאורך כל הרפליקה ישנם מיקרו גבעות ועמקים המייצגים את התאים והקישור ביניהם. מבנים אלה הם בדיוק מה שהביא אותנו לבצע את המחקר הזה. על מנת לנרמל את תוצאות מבחן המתיחה, מדדנו את עובי הרפליקה ב 7 מקומות שונים לאורך הרפליקה ולקחנו את הממוצע, אך חשוב לציין כי עובדה זו מכניסה רעש רב למערכת. מצאנו כי היינו צריכים להפעיל הכי מעט כוח על מנת לקרוע את עלה העגבניה. על כל שאר החומרים נאלצנו להפעיל כוח רב יותר כדי להביא לשבירתם כאשר כל הסיליקונים דרשו כוח גדול בערך פי 5 מהעגבניה בעוד שהאתיל צלולוז דרש כוח גדול פי 15 ואילו CMC דרש כוח גדול בשני סדרי גודל. זוהי תוצאה הגיונית שכן צלולוז ידוע כחומר חזק מאד. המפתיע הוא שדווקא עלה העגבניה היה השביר ביותר. כמובן שעלה העגבניה, בניגוד למערכת הסינתטית שלנו, מורכב מקומפוזיציה של חומרים אשר יכולים לשנות מאד את תכונות החומר העיקרי בקומפוזיציה שהוא צלולוז. בנוסף, כמובן שנגזרות הצלולוז אינן זהות בתכונותיהן לצלולוז. במדידת המרחק המקסימלי אליו ניתן למתוח את הפילם עד לקריעה מצאנו כי שתי נגזרות הצלולוז והעלה נמתחו למרחק הקצר ביותר בעוד שהחומרים הסיליקוניים נמתחו למרחקים גדולים יותר. מרחק המתיחה מעיד על האלסטיות של החומר ואכן חומרים על בסיס צלולוז הם פחות אלסטיים מחומרים סיליקוניים. בנתון זה ראינו דמיון רב בין עלה העגבניה לפילמים העשויים מנגזרות הצלולוז. הנתון הנגזר האחרון הוא קבוע יאנג. קבוע זה הוא היחס בין הקשיחות לאלסטיות של החומר. באופן מפתיע, החומר הדומה ביותר לעגבניה כאן היה דווקא ה PDMS. כאן נגזרות הצלולוז נתנו תוצאה שונה בסדרי גודל מעלה העגבניה. השווינו את התוצאות שקיבלנו גם לנתונים ספרותיים ידועים וברוב המקרים הייתה התאמה יפה. יוצא הדופן כאן היה CMC אשר קבוע היאנג אשר קיבלנו עבורו היה משמעותית גבוה יותר מזה הידוע בספרות. בספרות מצאנו מקור אחד אשר בדיק תכונות אלה עבור CMC אך שם השתמשו בקומפוזיציה של CMC עם סיבי ננו קרבון כמו גם הוספה של מרכז. כמובן שהתנאים המדויקים בהם מכינים את הפילם כמו גם הקומפוזיציה הספציפית של הפולימר (אורכו ודרגת ההחלפה של הנגזרת) משפיעים מאד על תכונות הפילם. כמו כן מעניין לציין שבחלק מהמקרים הייתה השפעה למבנה על תכונות הפילם. לדוגמא, ירידה בקשיות בפילם בעל המבנה לעומת הפילם החלק עבור CMC i Affinis, ESPE ועליה באלסטיות עבור פילם CMC בעל מבנה לעומת החלק.



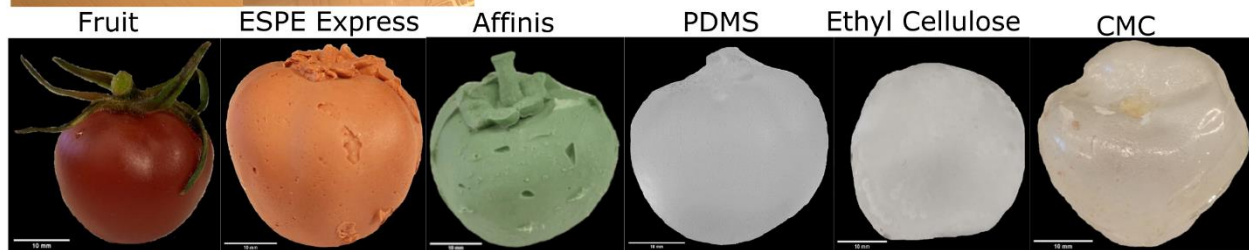
איור 7: השוואת תכונות מכניות של העלה. בדיקת החוזק המכני והאלסטיות של שלושת המשטחים הסיליקוניים ושני המשטחים העשויים מנגזרות הצלולוז עם ובלי מבנה והשוואתם לעלה. הבדיקה נעשתה על ידי שימוש במכשיר אינסטרון. הבדיקה מחזירה גרף של הכוח כפונקציה של הזמן כאשר נקודת הנפילה מסמנת את הכוח המקסימלי המופעל בעת קריעת המשטח. מכיוון שקצב המתיחה ידוע, הזמן מסמן את מרחק המתיחה. הגרף העליון מראה את הכוח (המנורמל) בפאסקל למ"מ בריבוע אשר הופעל על כל אחד מהמשטחים בעת קריעתם. נתון זה נותן אינפורמציה על חוזק המשטח. הגרף האמצעי הוא מרחק המתיחה במ"מ של כל אחד מהמשטחים בעת הקריעה. נתון זה מראה על אלסטיות המשטח. הגרף השלישי מתאר את קבוע יאנג אשר הוא היחס בין החוזק לאלסטיות ומהווה תכונה אינטרינזית של החומר אשר אינה תלויה בתנאי הניסוי. בגרף זה העמודה האפורה מתארת את הערכים הידועים בספרות עבור משטחים דומים. בכל שאר הגרפים העמודות הכתומות מתארות את המשטחים החלקים והעמודות הכחולות מתארות את הרפליקה הודו צדדית. העגבניה מסומנת בירוק.

מטרה נוספת של מחקר זה הייתה להעביר את הפלטפורמה המבוססת יחסית על עלה לחלקים אחרים של הצמח תחת ההנחה שמיקרו מבנה שטח הפנים משפיע על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו גם בחלקים אחרים של הצמח. לשם כך, פיתחנו פרוטוקול לחיקוי פני השטח של פרי העגבנייה. פירות עגבנייה מזן M82 נלקחו לאחר הבשלה. הפרי הונח בכוס אשר מולאה בפולימר הנוזלי PDMS לאחר שעבר תהליך הוצאת בועות בעזרת ואקום. גם הפרי המכוסה בפולימר הונח בואקום למשך שעתיים ולאחר מכן הוצא ונשמר להקשחה בטמפרטורת החדר לאורך לילה. את הפרי ועטיפתו הפולימרית חתכנו בדיוק במרכז, על מנת שנוכל לחבר את שני החצאים חזרה כפי שנראה באיור 8 למעלה. לאחר מכן הוצאנו את הפרי בשלמותו משני החצאים, לקבלת חלל ריק עם שטח פנים שמשקף את תמונת הראי של שטח הפנים של הפרי. בשטח פנים זה טיפלנו בעזרת פלסמה ו- $\text{Trichloro}(1\text{H},1\text{H},2\text{H},2\text{H}-\text{perfluoro-octyl})\text{silane}$ כפי שמתואר למעלה, על מנת למנוע הידבקות של השכבה הפולימרית השנייה להעתק השלילי. בשלב זה, מילאנו את החלל הריק באחד הפולימרים בהם השתמשנו (סט הפולימרים כאן היה זהה לסט בו השתמשנו עבור העלה). את שני החצאים ניתן היה לחבר לידי עיגול מושלם. חיבור לעיגול מושלם בוצע רק עם החומרים הסיליקוניים. נגזרות הצלולוז, אשר יוצרות פילם דק על ידי אידי הממס, הושמו רק על פני השטח. הפעלנו ואקום על המערכת הזו למשך שעתיים (עבור PDMS ונגזרות הצלולוז) ושוב הנחנו לפולימר הנוזלי להתמצק לאורך הלילה בטמפרטורת החדר (עבור PDMS) או

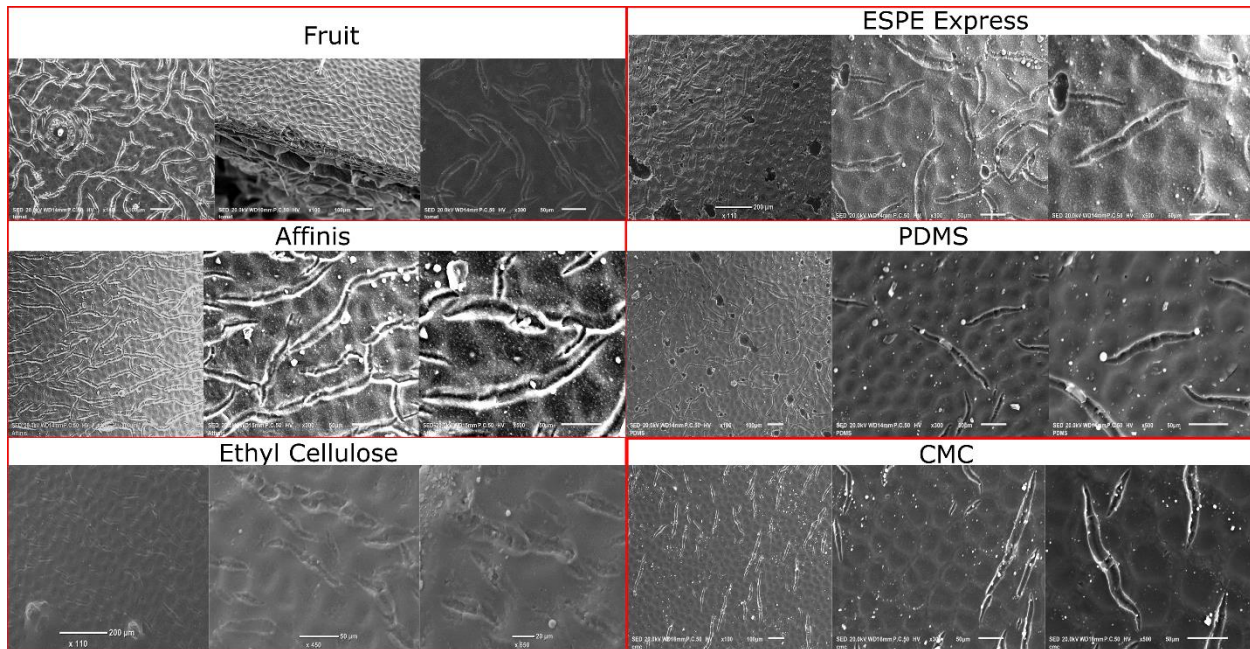
למס להתאדות עבור נגזרות הצלולוז (החומרים הסיליקוניים האחרים מתקשים בתוך דקות מרגע הערבוב) זאת תוך כדי חיבור שני החצאים לכדי עיגול שלם לקבלת התוצאה הסופית (כפי שנראה באיור 8 למעלה לפני הפרדה עבור PDMS). באיור 8 ניתן לראות בשורה התחתונה תמונות מייצגות של חיקויי פרי העגבניה מהחומרים השונים.



איור 8: תמונות מצלמה של רפליקות פרי מחומרים שונים. למעלה: משמאל - עגבניה עטופה ב PDMS חצויה במרכז על מנת לאפשר הפרדה של שני החצאים. מימין - שכבת PDMS חדשה בתוך העטפת. למטה: תמונות של רפליקת העגבניה מהחומרים השונים.



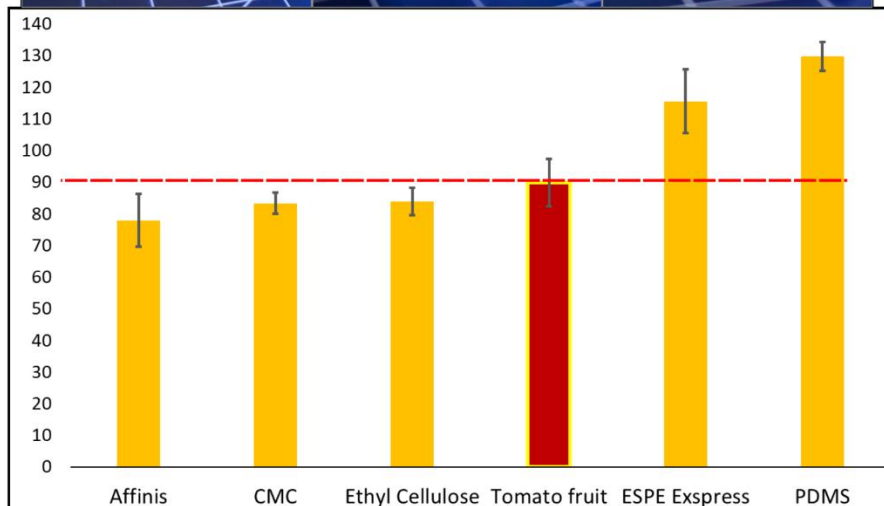
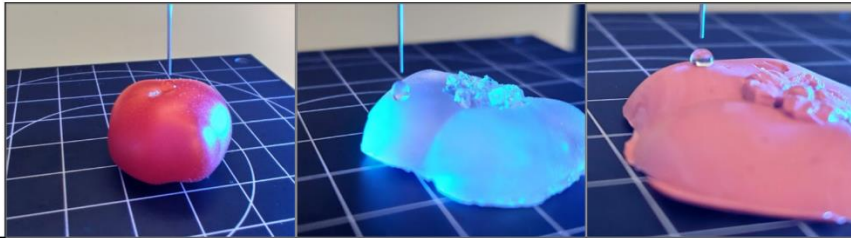
רצינו לבדוק את יכולת החיקוי של מיקרו המבנה של פני שטח העגבניה על ידי החומרים השונים שלנו. לצורך זה השתמשנו במיקרוסקופ אלקטרוני והתבוננו גם בפני השטח של פרי העגבניה עצמו וגם בכל תבניות שיצרנו מהחומרים השונים. התמונות, ברזולוציות שונות, מופיעות באיור 9. ניתן לראות כי בפני השטח של פרי העגבניה מופיעים מבני תאים. בנוסף לכך, מצאנו כי לאורך כל פני השטח מופיעים מיקרו סדקים וזאת למרות שלא השתמשנו בפרי הנוטה לסדקים. יש כאן, כנראה, תופעה כללית של מיקרו סדקים כאשר יתכן והסדקים הגדולים אשר מופיעים לעיתים בפירות העגבניה הם הרחבה של אותם מיקרו סדקים. אנו רואים כי הסדקים מופיעים ללא סדר או כיוונית מסויימים. התאים והסדקים היו שני המאפיינים המבניים העיקריים אשר ניצפו בשטח פרי העגבניה. הצלחנו לחקות, במידה כזו או אחרת של הצלחה, את מיקרו מבנה פני השטח של הפרי בעזרת כל החומרים שלנו. כמו בעלה, גם כאן התבנית השלילית עבור כל החומרים הוכנה מ PDMS. שני החומרים הסיליקוניים, מלבד PDMS, תפסו את צורת התאים אשר על פני שטח הפרי אבל לא בצורה טובה. את הסדקים אשר גודלם גדול יותר, לעומת זאת, הם חיקו היטב אך כך גם כל שאר החומרים. למעשה ההבדל באיכות התעתיק היה תלוי רק ביכולת החיקוי של התאים. גם אתיל צלולוז חיקה את מבנה התאים בצורה בינונית למדי. החיקוי הטוב ביותר והברור ביותר של התאים התקבל על ידי PDMS ו CMC. למעשה, ניתן להשתמש בכל החומרים על מנת לקבל חיקוי של פני השטח של הפרי אבל אם ישנה חשיבות גבוהה לחיקוי מדויק נשתמש ב PDMS או ב CMC, כאשר החומר הספציפי בו נשתמש תלוי בתכונות הרצויות הנוספות שכן, כפי שכבר ראינו, שני חומרים אלה שונים מאד זה מזה בשאר התכונות שלהם.



איור 9: תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני של רפליקות פרי מחומרים שונים. פני שטח של פרי עגבניה קובעו וצופו וניצפו במיקרוסקופ אלקטרוני. נראו תאים וסדקים על פני השטח. רפליקות של פני השטח מכל החומרים השונים צופו וניצפו במיקרוסקופ אלקטרוני בהגדלות שונות. כל החומרים חיקו היטב את הסדקים אך חומרים שונים חיקו באיכויות שונות את מבנה התאים.

בהמשך רצינו לבדוק את הידרופוביות פני השטח של פרי העגבניה ושל הרפליקות שלנו מהחומרים השונים. אומנם בחנו כבר את הידרופוביות פני השטח של החומרים השונים שהשתמשנו בהם אבל אנו יודעים שמיקרו מבנה פני השטח יכול להשפיע מאד על תכונה זו. תוצאות זווית המגע מופיעות באיור 10. באיור 10 למעלה ניתן לראות את הצורה שבה נעשית המדידה במקרה זה. מדידה זו שונה מעט מהמדידה שנעשתה על פני שטח העלה ורפליקות העלה מכיוון שהעגבניה איננה שטוחה ויש לה קימור עקב הכדוריות שלה. קימור זה יכול להשפיע על מדידת הזווית ולכן המדידה צריכה להיעשות בהירות תוך התחשבות בקימור טבעי זה. אנו רואים בגרף באיור 10 כי הידרופוביות פני שטח הפרי שונה מהידרופוביות פני שטח העלה. הפרי, כך נראה, מעט יותר הידרופובי מהעלה. זה הגיוני כי שכבת השעווה אשר מצפה את הפרי אכן משמעותית יותר מזו המצפה את העלה. יחד עם זאת חשוב לשים לב כי עדין הפרי איננו הידרופובי. המגמה של הידרופוביות המשטחים שקיבלנו זהה למגמה אשר נצפתה במשטחים המחקים את העלה. זה, כמובן, צפוי שכן ישנן תכונות בסיסיות של החומר אותן המבנה לא יכול לשנות. החומרים הסיליקוניים, פרט ל Affinis עדין הידרופוביים, Affinis הוא ההידרופילי ביותר ושתי נגזרות הצלולוז הידרופיליות אך פחות מ Affinis. יחד עם זאת, כדאי לשים לב לכך שהמבנה בהחלט השפיע על תכונה זו של פני השטח. לדוגמא, Affinis אשר עדין נשאר הידרופילי, נמצא עכשיו בזווית של כ 80 מעלות לעומת כ 60 מעלות במשטח חלק או משטח המדמה את פני השטח של העלה.

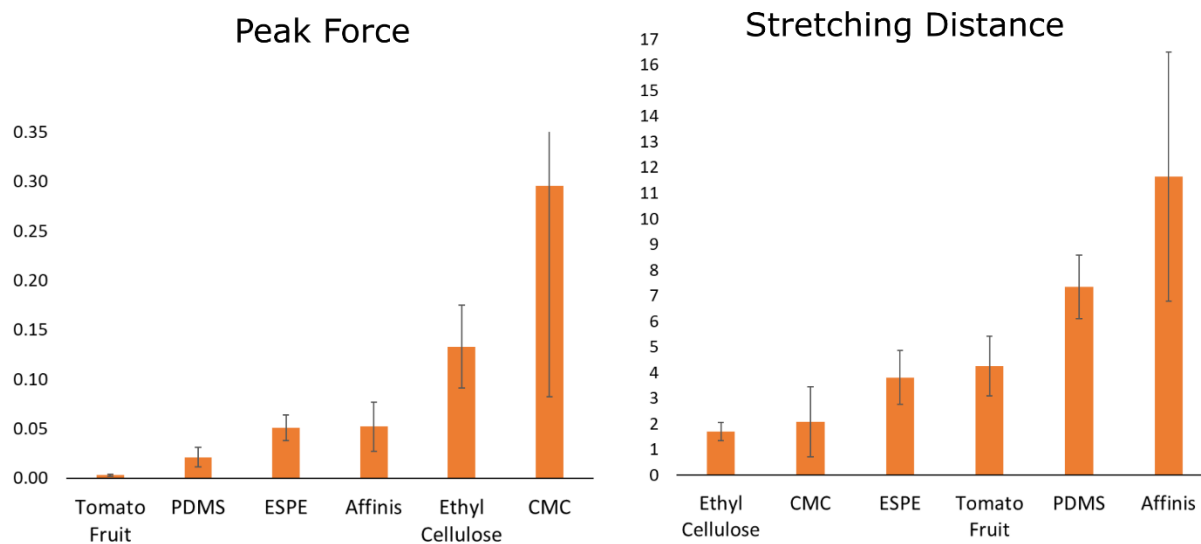
כלומר, המבנה בלבד של הפרי העלה את ההידרופוביות של המשטח. דבר דומה קרה עם PDMS אשר עלה מזווית של כ-120 מעלות לזווית של כ-130 מעלות. נראה כי מבנה פני השטח של הפרי מייצר איזושהי נטייה קלה להידרופוביות החומרים השונים. גם עובדה זו יכולה להסביר את ההידרופוביות הגבוהה יותר של הפרי לעומת העלה אשר יכולה להיות מוסברת גם דרך החומרים השונים על פני השטח וגם דרך המבנה.



אורך 10: השוואת הידרופוביות של פני שטח של פרי. למעלה: פרי עגבניה ושני משטחים המדמים את מבנה פני השטח של פרי העגבניה – PDMS במרכז ו ESPE מימין בניסוי זווית המגע. יש להניח את הטיפה באיזור ללא קימור או להתחשב בקימור כאשר מניחים את הטיפה באיזור קמור. למטה: גרף המתאר את זווית המגע בפני השטח של החומרים השונים. הפרי עצמו נמצא בערך ב-90 מעלות כלומר על הגבול בין הידרופיליות להידרופוביות. שוב, המשטחים מנגזרות הצלולוז הם הדומים ביותר מבחינה

בשלב האחרון רצינו לבצע מאמץ מתיחה גם על הרפליקות של פני השטח של הפרי. שוב מדדנו את הכוח המקסימלי המופעל בעת שבירת המשטח, כפי שרואים באיור 11. התוצאות אשר קיבלנו דומות לתוצאות שקיבלנו עבור המשטחים של העלה אך עדין שונות מעט. שוב קיבלנו כי המשטח הטבעי הוא החלש ביותר וצריך את הכוח הקטן ביותר על מנת להיקרע. כאן אנו רואים כי PDMS דווקא חלש יותר מ Affinis, בניגוד למה שראינו בחיקוי העלה. בנוסף, אומנם שתי נגזרות הצלולוז שוב מייצרות את המשטחים החזקים ביותר אולם הפעם לא בהפרש כל כך משמעותי כפי שהיה במקרה של המשטחים המחקים את העלה. אנו רואים, אם כך, כי מיקרו מבנה פני השטח השפיע על החוזק המכני של המשטח. בנוסף מדדנו שוב את המרחק הנדרש למתיחה עד שבירה, כפי שרואים באיור 11. שוב אנחנו רואים כי המשטחים הכי פחות אלסטיים הם אלה הנוצרים מנגזרות הצלולוז. אבל אנחנו רואים כי פני השטח של הפרי הטבעי עצמו אלסטיים יותר מהעלה, מה שמסתדר עם הגמישות היחסית של קליפת פרי עגבניה לעומת עלה. למעשה, האלסטיות של קליפת הפרי דומה כבר לאלסטיות של החומר הסיליקוני ESPE. אנו רואים כי המבנה של פני שטח הפרי השפיע גם על האלסטיות של שני החומרים הסיליקוניים

האחרים ובעיקר על PDMS אשר מראה מתיחה קטנה יותר מאשר במקרה של פני שטח העלה, כלומר מבנה פרי העגבניה הפך אותו דווקא לפחות אלסטי, בניגוד להתנהגות המערכת הטבעית אשר כנראה לא נובעת מאלמנטים מבניים בלבד.



איור 11: השוואת תכונות מכניות של פרי. מדידת כוח מקסימלי בזמן קריעה (שמאל) ומרחק מתיחה בזמן קריעה (ימין) עבור קליפת פרי עגבניה ומשטחים מחומרים שונים המחקים את מבנה פני השטח של העגבניה. המשטחים מנגזרות הצלולוז הם החזקים ביותר והכי פחות גמישים. המשטח העשוי מ ESPE מחקה בצורה הטובה ביותר את אלסטיות קליפת הפרי אך כל המשטחים חזקים יותר מקליפת הפרי.

דין

במהלך מחקר זה פיתחנו שיטה ידועה בספרות ליצירת תעתיק של מבנה עלה עגבנייה המחקה בצורה טובה את מיקרו המבנה של העלה ומסוגלת לשחזר את אותו המבנה מספר בלתי מוגבל של פעמים. שיטה זו הייתה ידועה בספרות זה מכבר ושימשה בעיקר לצורך חיקוי מיקרו המבנה של העלה על מנת לשחזר תכונות פיסיקליות של העלה כגון הידרופוביות. במחקר זה הרחבנו את השיטה המוכרת בספרות לעלי עגבנייה על ידי הרחבת תחום החומרים איתם ניתן לבצע את ההעתק לתחום חדש של חומרים. החומרים בהם השתמשנו חלקם חומרים דומים וחלקם שונים בתכלית מ PDMS המוכר מאד בספרות. PDMS הוא אלסטומר סיליקוני אשר יש לו יתרונות רבים: גמישות, שקיפות, ביוקומפטיביליות ובנוסף הוא זול יחסית וזמין מסחרית. שניים מהחומרים בהם השתמשנו הם פולימרים מבוססי סיליקון אשר הנחנו כי יהיו דומים יחסית בתכונותיהם ל PDMS. סוג אחר של חומרים בהם השתמשנו הם נגזרות של צלולוז (מבוססי פחמן) אשר יוצרים משטחים שאינם גמישים (אם כי ניתן להגמישם מעט על ידי השימוש במרככים). גם הם מייצרים משטחים אשר הינם ביוקומפטיביים ושקופים. אנו גילינו כי יש ביכולתם לחקות את פני שטח העלה ברזולוציה אשר לא נופלת ואף עולה על זו של הפולימר PDMS. השימוש בחומרים אחרים מלבד PDMS ובעיקר חומרים אשר אינם דומים ל PDMS בתכונות של גמישות

וקשיות הוא חשוב מאד לצורך המחקרי של המערכת הזו. אנו מתעניינים באפקטים הפיסיקליים שיש לפני השטח של הצמח על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו. אפקטים פיסיקליים אלה קשורים למיקרו מבנה פני השטח אותו אנו מעוניינים לחקות אבל קשורים גם לטיב החומר ממנו עשויים פני השטח. ולכן, גיוון של מרחב החומרים וספציפית שימוש בחומרים המדמים את המערכת הביולוגית בה אנחנו מתעניינים הוא קריטי.

בדקנו את המשטחים שנוצרו מבחינת תכונות הידרופוביות פני השטח כמו גם החוזק המכני של המשטחים. נראה כי דווקא החומרים דמויי הצלולוז מחקים בצורה טובה יותר את תכונות פני השטח של העלה וזאת למרות השעווה המכסה את פני שטח העלה. אנו ציפינו כי פני שטח העלה יהיו הידרופוביים יחסית בגלל השעווה המצפה אותם וגילינו להפתעתנו כי לא כך הדבר. פני השטח הם דווקא ניטרליים לכיוון ההידרופיליים. הפולימר הנוסף על בסיס הסיליקון, Affinis, היה המשטח ההידרופילי ביותר שקיבלנו. זאת מכיוון שזהו חומר אשר הוא פיתוח מאוחר בתחום רפואת השיניים ומכיוון שמדובר בחומרים אשר עוברים אינטראקציה עם פנים הפה, המטרה היא לפתח חומרים כמה שיותר הידרופיליים וזאת למרות שפולי ויניל, עליו מבוסס החומר, הוא ביסודו הידרופובי. שני הסיליקונים האחרים התגלו, כצפוי בחומרים הידרופוביים בעלי פני שטח אשר אינם תואמים את פני השטח של העלה מבחינה זו.

בדקנו גם את כל החומרים הללו מבחינת התכונות המכניות שלהם. מצאנו שונות גדולה של התכונות המכניות בין החומרים השונים וראינו כי, לצערנו, אף אחד מהחומרים שלו לא מצליח לחקות היטב את התכונות המכניות של העלה. נגזרות אלה נבחנו בעיקר בשל ההנחה כי יצליחו לחקות היטב את התכונות המכניות של העלה. יחד עם זאת, התוצאות הללו פותחות דלת לאפשרויות חדשות של שילוב בין חומרים כמו גם היכולת לבדוד תכונות ספציפיות של חומר אשר יכולות להשפיע על האינטראקציה של העלה עם סביבתו. לדוגמא, CMC הוא חומר אשר הוא בעל אלסטיות דומה לזו של העלה, הידרופוביות פני שטח דומה גם כן אך הוא חזק הרבה יותר מהעלה. כך נוכל לשנות תכונה אחת בלבד מהעלה ולבדוק כיצד התכונה הספציפית הזו משפיעה על התנהגויות שונות של מיקרו אורגניזמים החיים על פני העלה. נוכל גם, במחקר עתידי לצפות את שכבת המשטח העשוי CMC בחומר דמוי PDMS ובכך לשנות שוב תכונה נוספת – הידרופוביות פני המשטח ולראות כיצד היא משפיעה על התנהגות הסביבה.

בנוסף לכך, יצרנו במחקר זה רפליקות דו צדדיות מהחומרים השונים אשר מחקות מצידן האחד את מיקרומבנה פני שטח העלה ומצידן השני את המערכת הוסקולרית כמערכת בה ניתן להזרים נוזלים. הצלחנו להזרים במערכת מים ואתמול כאשר התפשטות האתנול הייתה מרשימה הרבה יותר אך גם המים וגם האתנול התפשטו במערכת הוסקולרית ובתוכה בלבד. מצאנו גם שהחומר עצמו משפיע על יכולת הזרימה של הנוזל גם עקב מבנה המערכת הוסקולרית השונה (למרות שהשתמשנו באותו עלה או עלה דומה עבור כל הרפליקות) וגם, כנראה, פשוט עקב תכונות החומר. המטרה של יצירת רפליקה דו

צדדית שכזו היא תוספת של פרמטר נוסף למערכת הסינתטית שלנו – זרימה. זהו פרמטר מרכזי במערכות ביולוגיות וספציפית בנושא של אינטראקציות ביוטיות עם פני השטח נקשר למיקום האורגניזם הביוטי על פני השטח עקב קירבה למקור המזון אשר זורם במערכת הוסקולרית. מערכת סינתטית כשלנו תוכל לבחון את דפוסי הדיפוזיה מתוך המערכת הוסקולרית והגעתם לפני שטח אשר מחקים את מבנה פני השטח הטבעיים של העלה. המערכת אותה אנו בונים היא מערכת כללית אשר יכולה לענות על שאלות מחקריות ספציפיות, בעיקר בנושא השפעת פני שטח העלה על האינטראקציה שלו עם סביבתו, על ידי התאמתה לאינטראקציה הרלוונטית אותה מעוניינים ללמוד.

הרחבנו את הפלטפורמה הסינתטית לאיבר נוסף וחשוב מאד בצמח – הפרי. הצלחנו לחקות את מיקרו מבנה פני השטח של הפרי בעזרת חומרים שונים. זהו אתגר חשוב שכן הפרי, בניגוד לעלה, אינו משטח ישר אלא קמור והחיקוי שלו בעזרת ליתוגרפיה רכה כלל לא היה מובן מאליו. חומרים שונים חיקו את מיקרו המבנה באיכויות שונות וזה נותן לנו את האפשרות לבחור את חומר הפלטפורמה שלנו בהתאם למידת הדיוק הרצויה. בנוסף בחנו גם במערכת זו את ההידרופוביות פני השטח ואת התכונות המכניות של המשטחים. ראינו כי גם ההידרופוביות וגם התכונות המכניות נקבעות משילוב של החומר עצמו ושל מיקרו המבנה. מיקרו מבנה פני השטח שינה את רמת ההידרופוביות ואת התכונות המכניות של חלק מהחומרים. המבנה השפיע על חלק מהחומרים יותר מאשר על אחרים ולעיתים בכיוונויות שונה. קשה לדעת מראש מה יעשה מבנה מסוים לחומר ספציפי מבחינת תכונות המשטח שיווצרו בסוף. יחד עם זאת, הרחבת מאגר החומרים מאפשרת לנו לבדוק כל מקרה לגופו ולשלב חומרים באופן אשר ישרת את המטרות הספציפיות שלנו בהקשר לתכונה אותה אנו מעוניינים לבדוק. פיתוח הפלטפורמה הסינתטית למערכת נוספת בצמח (הפרי) ולמגוון רחב של חומרים פותחת אפשרויות מחקר של משטחים שונים של הצמח תוך כדי מתן דגש על תכונות מסוימות של המשטח ושילובים של תכונות שונות. המערכת שפיתחנו נמצאת במצב בו ניתן להתאים אותה לשאלה הספציפית שנשאלת בנוגע להשפעת מבנה פני השטח על האינטראקציה של הצמח וסביבתו.

- [1] A. Biere and A. Govere, "Plant-Mediated Systemic Interactions Between Pathogens, Parasitic Nematodes, and Herbivores Above- and Belowground.," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 54, pp. 499–527, 2016.
- [2] B. Bhushan, "Biomimetics: lessons from nature--an overview," *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 367, no. 1893, pp. 1445–86, 2009.
- [3] A. J. Schulte, K. Koch, M. Spaeth, and W. Barthlott, "Biomimetic replicas: Transfer of complex architectures with different optical properties from plant surfaces onto technical materials," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 1848–1854, 2009.
- [4] K. Koch, A. Schulte, A. Fischer, S. Gorb, and W. Barthlott, "A fast, precise and low-cost replication technique for nano- and high-aspect-ratio structures of biological and artificial surfaces," *Bioinspir. Biomim.*, vol. 3, no. 4, p. 046002, 2008.
- [5] B. Bhushan, Y. C. Jung, and K. Koch, "Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion.," *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 367, no. 1894, pp. 1631–1672, 2009.
- [6] K. Koch and W. Barthlott, "Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials.," *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 367, no. 1893, pp. 1487–509, 2009.
- [7] N. Dasgupta, S. Ranjan, D. Mundekkad, C. Ramalingam, R. Shanker, and A. Kumar, "Nanotechnology in agro-food : From field to plate," *Frin*, vol. 69, pp. 381–400, 2015.
- [8] B. Sirinutsomboon, M. J. Delwiche, and G. M. Young, "Attachment of *Escherichia coli* on plant surface structures built by microfabrication," *Biosyst. Eng.*, vol. 108, no. 3, pp. 244–252, 2011.
- [9] H. K. Doan and J. H. J. Leveau, "Artificial Surfaces in Phyllosphere Microbiology," *Phytopathology*, vol. 105, no. 8, pp. 1036–1042, 2015.
- [10] M. W. Szyndler, K. F. Haynes, M. F. Potter, R. M. Corn, and C. Loudon, "Entrapment of bed bugs by leaf trichomes inspires microfabrication of biomimetic surfaces," *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 83, p. 20130174, 2013.
- [11] B. Zhang *et al.*, "Fabrication of Biomimetically Patterned Surfaces and Their Application to Probing Plant – Bacteria Interactions," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, pp. 12467–12478, 2014.