

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 לבדוד את הגורם הזה כאשר נבדקים פני השטח הטבעיים שכן הוא נטמע בכל שאר הגורמים המשפיעים על האינטראקציה. ולכן, על מנת לבדוד את הגורם הפיסיקלי בלבד יש לבנות מערכת המבודדת גורם זה מכל שאר הגורמים. ניסיונות לבידוד מעין זה נעשו בעבר על ידי שימוש ביומימטיקה. 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 המערכת על מנת לבדוק את השפעת מבנה פני שטח עלה עגבנייה על האינטראקציה שלו עם פתוגנים שונים, ביניהם הפטרייה בוטריטיס הגורמת לעובש אפור.

בשנה הראשונה של המחקר התמקדנו בהיתכנות הפרוייקט. בתחילה בביסוס שיטת ההעתקה של פני שטח העלה של העגבנייה בשיטת ליתוגרפיה רכה (soft lithography) בפולימר המסחרי והידוע בספרות לצרכים אלו: polydimethyl siloxane (PDMS). 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. אחד היתרונות הגדולים של שיטה זו היא האפשרות לחזור על אותו המבנה בדיוק מספר בלתי מוגבל של פעמים על ידי שימוש חוזר בתבנית השלילית. בשלב הראשון הראינו כי דבר זה אכן אפשרי במערכת. ביצענו שלוש חזרות של העתקה חיובית מאותה התבנית השלילית וראינו, בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני, כי אכן מתקבל אותו המבנה בדיוק בהעתקות החיוביות.

בשלב הבא רצינו להראות את היכולת שלנו לגדל את הפטרייה על גבי המשטח הסינתטי כמו גם את היכולת של הפטרייה "לחוש" את המשטח ולהיות מושפעת ממבנה פני השטח. כמובן שהיה עלינו להראות גם את היכולת שלנו לעקוב אחר הדברים באופן דינמי. לשם כך, פיזרנו את נבגי הפטרייה על שני משטחים סינתטיים העשויים מאותו החומר (PDMS). האחד, משטח חלק והשני משטח בעל מבנה פני השטח של העלה. בדקנו גם את פיזור הנבגים על פני השטח וגם את נביטת הנבגים על המשטחים השונים. מכיוון ששני המשטחים היו עשויים מאותו החומר בדיוק וההבדל היחיד ביניהם היה מבנה פני השטח, למעשה בודדנו את הפקטור המבני מכל האחרים בהשפעה על התנהגות הנבגים. מצאנו כי מבנה פני השטח

משפיע מאד על פיזור הנבגים אשר נוטים להגיע לאזור הבין תאי באופן אשר אינו פרופורציוני לשיטחו של אזור זה. בנוסף מצאנו כי תהליך הנביטה קורה יותר והנבט הוא בעל התפלגות אורך שונה על פני משטח בעל מבנה מאשר על פני משטח שאין לו מבנה אך אנחנו עדין בוחנים את המשמעות הסטטיסטית של התופעה.

רצינו להרחיב את הפלטפורמה שלנו לחומרים נוספים ולהראות בצורה נוספת כי הפטרייה מושפעת מפני השטח. לשם כך ביצענו העתק של מבנה העלה לצלחת אגר מלאה בנויטריאנטים והשווינו את תגובת מושבת הבוטריטיס בצלחת זו לצלחת אשר עליה לא מופיע כל מבנה. ראינו כי התפשטות המושבה שונה מאד בין שני סוגי הצלחת. בעוד שבצלחת חלקה המושבה התפשטה בעיגול כפי שנהוג לראות בדרך כלל, על המשטח המובנה המושבה התפשטה לאורך ה"עורקים" של העלה – האזורים בהם נמצא כל המזון במערכת הטבעית. אך במערכת הסינתטית שלנו, לא הייתה הגבלה של מזון, ולכן התפשטות זו נבעה אך ורק מהמבנה.

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, ובחינתה עם פתוגנים שונים של עגבנייה. בשנה זו התקדמנו על ידי וידוא יתרונה העיקרי של התשתית בבחינת פני שטח העלה (היכולת לחזור על אותו המבנה בדיוק פעם אחר פעם) והרחבת התשתית לחומרים נוספים. בנוסף, הראינו את היתכנות המערכת על ידי בדיקה של פיזור ונביטה של נבגי בוטריטיס על פני המשטחים, כמו גם הוכחה של השפעת המבנה על התנהגות הנבגים והמושבה כולה. אנו רואים בפלטפורמה זו כבעלת פוטנציאל להבנה כיצד הרכיב המבני משפיע על האינטראקציה של צמח העגבנייה עם פתוגנים שונים וספציפית עם פטריית הבוטריטיס.

דף פותח

דו"ח לתכנית מחקר מספר 20-01-0133

שנת המחקר: _____1_____ מתוך _____1_____ שנים

פיתוח פלטפורמה סינתטית לחקר אינטראקציית פתוגן-פני שטח עלה – שימוש בפטריות בוטריטיס (עובש אפור) ואואידיפסיס (קמחונית) והחיידיק קלויבקטר משיגנסיס על עלי עגבנייה כמודל
Developing a synthetic platform for studying pathogen - leaf surface interaction;
proof of concept using *Botrytis*, *Oidiopsis* and *Clavibacter michiganensis* on
tomato leaves

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

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

יגאל אלעד פתולוגיה של צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

עומר פרנקל פתולוגיה של צמחים וחקר עשבים, 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: mayakl@volcani.agri.gov.il

Yigal Elad, Plant Protection, Plant Pathology and Weed Research, ARO, Beit Dagan Research Center, P.O.B 15159 Rishon LeZiyyon 7505101. E-mail: elady@volcani.agri.gov.il

Omer Frenkel, Plant Protection, Plant Pathology and Weed Research, ARO, Beit Dagan Research Center, P.O.B 15159 Rishon LeZiyyon 7505101. E-mail: omerf@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 זכה לתשומת לב פחותה הוא הגורם הפיסיקלי הנגרם כתוצאה מהטופוגרפיה של פני השטח. קשה מאד לבדוד את הגורם הזה כאשר נבדקים פני השטח הטבעיים שכן הוא נטמע בכל שאר הגורמים המשפיעים על האינטראקציה.

ולכן, על מנת לבדוד 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 המערכת על מנת לבדוק את השפעת מבנה פני שטח עלה עגבנייה על האינטראקציה שלו עם פתוגנים שונים, ביניהם הפטרייה בוטריטיס הגורמת לעובש אפור.

בשנה הראשונה של המחקר התמקדנו בהיתכנות הפרוייקט. בתחילה בביסוס שיטת ההעתקה של פני שטח העלה של העגבנייה בשיטת ליתוגרפיה רכה (soft lithography) בפולימר המסחרי והידוע בספרות לצרכים אלו: polydimethyl siloxane (PDMS). 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. אחד היתרונות הגדולים של שיטה זו היא האפשרות לחזור על אותו המבנה בדיוק מספר בלתי מוגבל של פעמים על ידי שימוש חוזר בתבנית השלילית. בשלב הראשון הראינו כי דבר זה אכן אפשרי במערכת. ביצענו שלוש חזרות של העתקה חיובית מאותה התבנית השלילית וראינו, בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני, כי אכן מתקבל אותו המבנה בדיוק בהעתקות החיוביות.

בשלב הבא רצינו להראות את היכולת שלנו לגדל את הפטרייה על גבי המשטח הסינתטי כמו גם את היכולת של הפטרייה "לחוש" את המשטח ולהיות מושפעת ממבנה פני השטח. כמובן שהיה עלינו להראות גם את היכולת שלנו לעקוב אחר הדברים באופן דינמי. לשם כך, פיזרנו את נבגי הפטרייה על שני משטחים סינתטיים העשויים מאותו החומר (PDMS). האחד, משטח חלק והשני משטח בעל מבנה פני השטח של העלה. בדקנו גם את פיזור הנבגים על פני השטח וגם את נביטת הנבגים על המשטחים השונים. מכיוון ששני המשטחים היו עשויים מאותו החומר בדיוק וההבדל היחיד ביניהם היה מבנה פני השטח, למעשה בודדנו את הפקטור המבני מכל האחרים בהשפעה על התנהגות הנבגים. מצאנו כי מבנה פני השטח משפיע מאד על פיזור הנבגים אשר נוטים להגיע לאזור הבין תאי באופן אשר אינו פרופורציוני לשיטחו של אזור זה. בנוסף מצאנו כי תהליך הנביטה קורה יותר והנבט הוא בעל התפלגות אורך שונה על פני משטח בעל מבנה מאשר על פני משטח שאין לו מבנה אך אנחנו עדין בוחנים את המשמעות הסטטיסטית של התופעה.

רצינו להרחיב את הפלטפורמה שלנו לחומרים נוספים ולהראות בצורה נוספת כי הפטרייה מושפעת מפני השטח. לשם כך ביצענו העתק של מבנה העלה לצלחת אגר מלאה בנויטריאנטים והשוונו את תגובת מושבת הבוטריטיס בצלחת זו לצלחת אשר עליה לא מופיע כל מבנה. ראינו כי התפשטות המושבה שונה

מאד בין שני סוגי הצלחת. בעוד שבצלחת חלקה המושבה התפשטה בעיגול כפי שנהוג לראות בדרך כלל, על המשטח המובנה המושבה התפשטה לאורך ה"עורקים" של העלה – האזורים בהם נמצא כל המזון במערכת הטבעית. אך במערכת הסינתטית שלנו, לא הייתה הגבלה של מזון, ולכן התפשטות זו נבעה אך ורק מהמבנה.

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, ובחינתה עם פתוגנים שונים של עגבנייה. בשנה זו התקדמנו על ידי וידוא יתרונה העיקרי של התשתית בבחינת פני שטח העלה (היכולת לחזור על אותו המבנה בדיוק פעם אחר פעם) והרחבת התשתית לחומרים נוספים. בנוסף, הראינו את היתכנות המערכת על ידי בדיקה של פיזור ונביטה של נבגי בוטריטיס על פני המשטחים, כמו גם הוכחה של השפעת המבנה על התנהגות הנבגים והמושבה כולה. אנו רואים בפלטפורמה זו כבעלת פוטנציאל להבנה כיצד הרכיב המבני משפיע על האינטראקציה של צמח העגבנייה עם פתוגנים שונים וספציפית עם פטריית הבוטריטיס.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. דר' אריה הראל, מנהל המחקר החקלאי
2. פרופ' עמיר שרון, אוניברסיטת תל אביב
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: 25.12.18

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
2	מטרות המחקר
2	ניסויים ותוצאות המחקר
7	דיון

רשימת איורים

מספר עמוד

איורים וטבלאות

3	איור 1 – השוואה בין תעתיקים חיוביים מאותה תבנית שלילית
4	איור 2 – השוואה בין מבנה תעתיק למבנה עלה עגבנייה
5	איור 3 – פיזור נבגי בוטריטיס על פני משטח סינתטי
6	איור 4 – שינוי באחוז הנביטה עם הזמן על משטחים שונים
7	איור 5 – אורך הנבט עם הזמן במשטחים שונים
7	איור 6 – התפשטות בוטריטיס על פני משטח אגר
5	טבלה 1 – פיזור נבגי בוטריטיס על פני תעתיק סינתטי
6	טבלה 2 – אחוז הנבגים הנובטים על משטחים סינתטיים
7	טבלה 3 – התפלגות אורכי הנבט על המשטחים השונים

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 [6]–[3]. 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 [9]–[7]. 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 [11], [10].

פתוגנים של צמחים גורמים לנזק רב לגידולים חקלאיים עם פוטנציאל לפגיעה לכל היבול, דוגמא אחת לכך היא פטריית הבוטריטיס ופגיעתה בעגבנייה [12]. למרות אסטרטגיות הדבקה שונות של פתוגנים שונים, ברור שהאינטראקציה הראשונית של הפתוגן עם הצמח מתרחשת על פני שטח אברי הצמח השונים. במקרה של הפטרייה הפתוגנית בוטריטיס והמארח – העגבנייה, נבגי הפטרייה נוחתים על ותוקפים את עלי העגבנייה. האינטראקציה הראשונית, מתרחשת, כמובן, על פני השטח. מרקם פני השטח יכול להשפיע על רמת ההידבקות של מיקרואורגניזמים אל המשטח ושחרורם ממנו ועל אופי הגידול על פניו. כמו כן, צורת פני השטח יכולה להשפיע על סיכויי החדירה של הפתוגן אל תוך הצמח [13].

במחקר זה מטרתנו היא להרחיב ולבסס את השימוש בפלטפורמה הסינתטית ולהראות את הרלוונטיות של הפלטפורמה לחקר האינטראקציה בין צמח ופתוגן, בעיקר בהקשר המבני. לתקופת מחקר זו, נעשה זאת עבור עלה העגבנייה, בשילוב עם פטריית הבוטריטיס כמייצגת פתוגן מרכזי של עגבנייה אשר לא ידוע כיצד מבנה פני השטח משפיע על התפתחותה ותהליך ההדבקה. מטרותינו לתקופת מחקר זו הן: לבסס היטב את העתקת העלה כפי שמופיעה בספרות ולהוכיח כי זוהי אכן שיטה שמאפשרת לשחזר את אותו המבנה פעם אחר פעם. כמו כן, להראות את האפשרות לפיזור ונביטת הבוטריטיס על פני המשטח הסינתטי ואת הרלוונטיות של מבנה פני השטח על תהליכים אלו.

מטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה

1. בניית פלטפורמה כללית לחקר השפעת פני השטח של עלה על האינטראקציה פתוגן-עלה.
2. בחינת הפלטפורמה במקרה הספציפי של עלה עגבנייה עם שלושה פתוגנים בולטים המיציגים קבוצות טקסונומיות ואסטרטגיות הדבקה שונות (בוטריטיס, אואידיופסיס וקלויבקטר), תוך בדיקת תצורות שונות של העלה כפועל יוצא של תנאי הסביבה (דישון חנקני ושעת היום) על טיב האינטראקציה עם הפתוגנים האמורים.

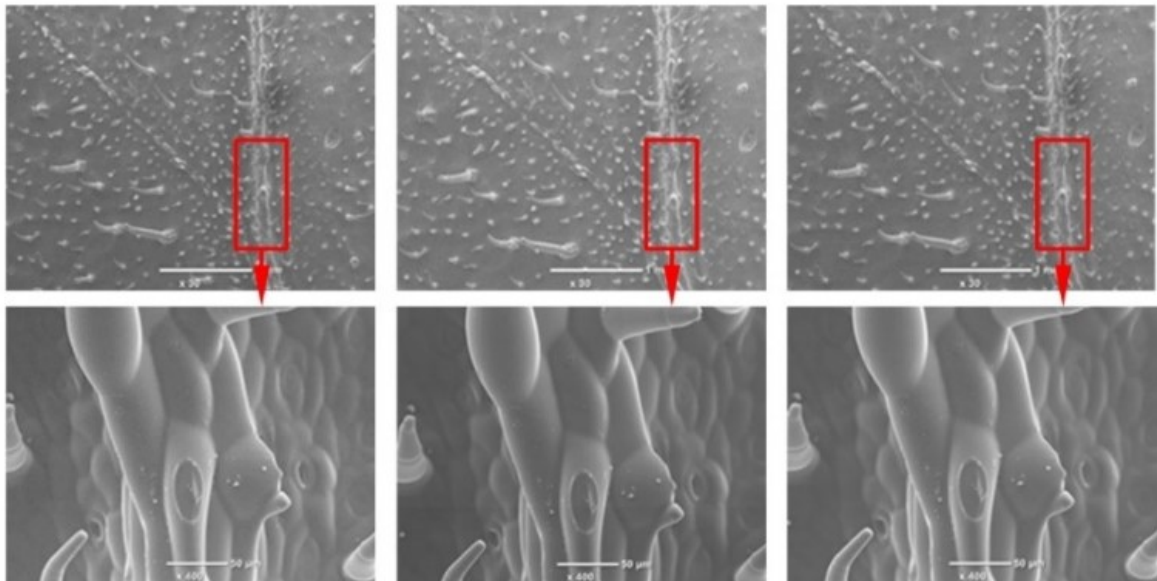
המחקר המקורי שהוגש, עבורו נכתבו המטרות, היה מיועד לשלוש שנים. המימון התקבל לשנה אחת בלבד מתוך צורך להוכיח התכנות. בתקופת השנה הזו התמקדנו במערכת של הבוטריטיס ובהוכחה שהמערכת הסינתטית יכולה לספק מערכת מודל טובה על מנת לחקור את השפעת המבנה על האינטראקציה בין העלה והפטרייה.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

בתקופת המחקר האמורה, המטרה הראשונית הייתה ייצוב הפרוטוקול להכנת משטח המחקר את מיקרו מבנה פני השטח של העלה מהפולימר השקוף, הזול, הזמין מסחרית והביוקומפטבילי polydimethylsiloxane (PDMS). על מנת לבצע מטרה זו שכללנו את הפרוטוקול הקיים אצלנו ליצירת התעתיק. על פי הפרוטוקול הקיים, 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 עם חלק הלינקר ביחס משקלי של 1:10 (בסיס:לינקר). הפעלנו ואקום במשך כחצי שעה ושפכנו 38.5 גר' של הפולימר הנוזלי על גבי העלעל. הפעלנו ואקום במשך שעות. 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 בכמות קטנה (8-5 גר', תלוי בגודל העלה) כך שהפולימר הנוזלי יכסה את האזור בו היה העלה אך לא מעבר לכך. הפעלנו ואקום למשך שעה ואז הנחנו זכוכית מיקרוסקופ מעל הפולימר הנוזלי על מנת לגרום ליישור של התבנית לנוחות התבוננות במיקרוסקופ. דבר זה גם יצר תעתיק שעוביו דומה לעובי העלה. השארנו את הפולימר להתקשות בטמפרטורת החדר לאורך הלילה. מאותה התבנית יצרנו 3 פעמים באופן המתואר את התבנית החיובית (תעתיק) של העלה ובדקנו במיקרוסקופ אלקטרוני

סורק (SEM) כי אכן 3 התעתיקים אשר נוצרו מאותה התבנית השלילית זהים זה לזה. דאגנו לסמן, במהלך התהליך את האזור הספציפי בו נצפה במיקרוסקופ האלקטרוני. זאת על מנת לאשש את החזרתיות של המבנה בתעתיקים שונים מתוך אותה התבנית השלילית. התוצאה מתוארת באיור 1.

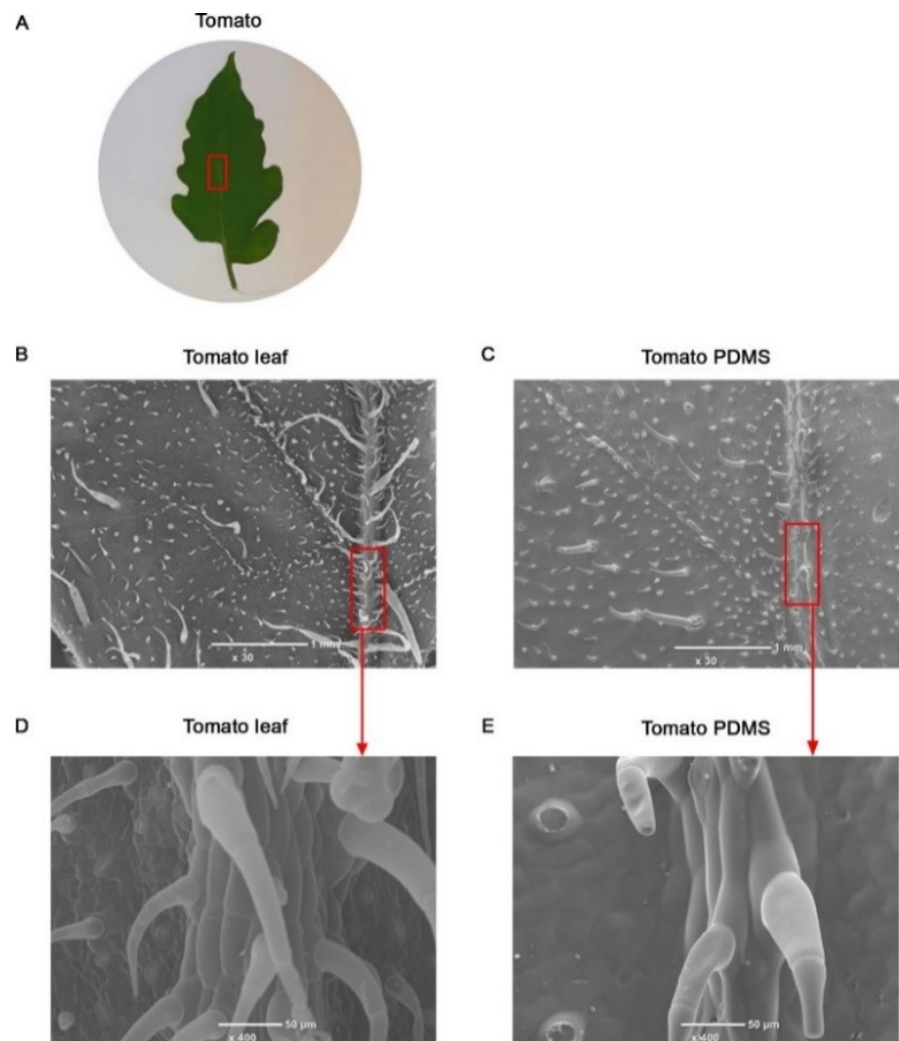
בנוסף לכך נעשתה השוואה בין תעתיק עלה העגבנייה לבין עלה עגבנייה דומה לו (העלעל המקביל בצמח). במקרה זה היה קשה יותר למצוא את אותו האזור בדיוק (מה גם שמדובר בשני עלעלים שונים) ולכן הזהות אינה מושלמת (איור 2). עם זאת, ניתן בהחלט לראות כי כל האלמנטים המבניים הרלוונטיים (תאים, פיוניות ושערות) נוכחים בצורה דומה גם בעלה וגם בתעתיק. כמו כן, ניתן לראות כי השערות בתעתיק אינן שבורות. אומנם זוהי איננה תופעה כללית וניתן לראות שערות שבורות בתעתיקים שהכנו אבל הן מעטות. זוהי תוצאה של וידוא הוצאת כל חלקי העלה מהפולימר לפני הכנת התעתיק החיובי.



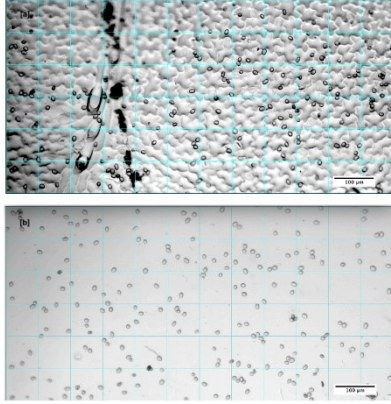
איור 1: השוואה בין תעתיקים חיוביים מאותה תבנית שלילית: צילום במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של תעתיקי PDMS של עלה עגבנייה. ניתן לראות 3 חזרות של דגמים שהוכנו מאותה תבנית שלילית. בחלק העליון ניתן לראות אזור מסוים בעלה בהגדלה X30 (קו המידה מייצג 1mm) ומתחת הגדלה גבוהה יותר (X400, קו המידה מייצג 50µm) של האזור המסומן ע"י מלבן אדום.

בשלב הבא בדקנו את פיזור נבגי הבוטריטיס על פני התעתיק הסינתטי. מכיוון שאנו מתעניינים בהשפעת מיקרו המבנה על פיזור זה, תוך ניטרול השפעות אחרות (כגון השפעות כימיות), פיזרנו את נבגי הבוטריטיס, על ידי הנחה של טיפה (5 מיקרוליטר) בריכוז של $5 \cdot 10^5$ נבגים למיליליטר במרכז משטח העשוי מ PDMS. עשינו זאת על פני שני משטחים: האחד, תעתיק של עלה עגבנייה (מצמח בן 3 שבועות, עלעל שלישי מעלה שני) והשני, משטח סינתטי חלק. פיזור הנבגים מתואר באיור 3. המטרה הייתה לבדוק

האם ישנו פיזור רנדומלי לחלוטין או שמא יש העדפה של הנבגים למיקום כלשהו על פני השטח של העלה. על מנת לבדוק זאת, חילקנו את תמונות המיקרוסקופ המתארות את פיזור הנבגים על פני השטח לריבועים קטנים בעלי שטח זהה (כפי שמתואר באיור 3), ובדקנו את התפלגות פיזור הנבגים על פני המשטח החלק. מצאנו כי ההתפלגות הינה נורמלית ואין העדפה לאזור מסוים. במקביל, בדקנו את השטח היחסי של חלקים שונים של פני שטח תעתיק העלה (מרכז תא, אזור בין תאי, פיונית ואחר) ואת כמות הנבגים על כל אחד מהחלקים הנ"ל. מצאנו כי קיימת כמות לא פרופורציונלית של נבגים באזורים הבין תאיים, דבר המראה על העדפה ברורה של מיקומם שם, כפי שמתואר בטבלה 1.



איור 2: השוואה בין מבנה תעתיק למבנה עלה עגבנייה: A עלה העגבנייה (M82), ממנו הוכן ההעתק מ PDMS. המלבן האדום על גבי העלה מצוין את החלק אשר נלקח לצילום תחת מיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM), הן של ההעתק והן של העלה. תמונות B,C מייצגות את חלקו של המלבן האדום מהעלה, בהגדלה של X30 (קו המידה שווה ל 1mm). תמונה B מייצגת את העלה האמיתי ואילו תמונה C את ההעתק שלו. המלבן שעל גבי התמונות מהמיקרוסקופ מצוין הגדלה של העורך מתמונות D,E (בהגדלה של X400, קו המידה שווה ל 50µm).



איור 3: פיזור נבגי בוטריטיס על פני משטח סינתטי. תמונות מיקרוסקופ אור של פיזור נבגי בוטריטיס על פני משטח PDMS בעל מבנה של עלה עגבנייה (תעתיק, למעלה) ומשטח חלק העשוי מ PDMS (למטה). 5 מיקרוליטר של נבגי בוטריטיס בריכוז $5 \cdot 10^5$ בתמיסה על בסיס מים המכילה גלוקוז ופוספאט, הונחו במרכז משטחי PDMS חלקים או כאלה שמחקים מבנה של עלים (תעתיקים). תמונת המיקרוסקופ חולקה ל 72 ריבועים בעלי שטח זהה על מנת לבחון את התפלגות פיזור הנבגים על פני המשטחים השונים.

טבלה 1: פיזור נבגי בוטריטיס על פני תעתיק סינתטי. ניתוח פיזור הנבגים באיור 3, על ידי חישוב אחוז השטח הנתפס על ידי כל אחד ממבני העלה ובהתאמה, אחוז הנבגים אשר נמצאים במבנה זה. נראה כי יש העדפה ברורה לאיזור הבין תאי אשר תופס רק 11% מהשטח אך מכיל 79.8% מהנבגים.

אחוז הנבגים	אחוז מהשטח	
11.3	80	מרכז התא
79.8	11	איזור בין תאי
4.6	2	פינויות
4.3	7	אחר

בהמשך, רצינו לבדוק האם בנוסף לפיזור הנבגים המושפע מהמבנה, יש למבנה גם השפעה על תהליך הנביטה של הנבגים. לשם כך, עקבנו אחר תהליך הנביטה על משטח סינתטי העשוי מ PDMS. עשינו זאת על שני סוגים של משטחים – משטח חלק ומשטח בעל מבנה עלה, לאורך 12 שעות ב 3 חזרות לכל סוג משטח. בנקודות זמן שונות בחנו את אחוז הנבגים שהחלו נביטה על המשטחים השונים. הצילומים בוצעו על מיקרוסקופ ניקסון בעל שליטת טמפרטורה (הניסוי בוצע ב 25°C) עם מצלמת אנדור אשר צילמה את המשטחים מדי 15 דקות. מצאנו כי אחוזי הנבגים שנבטו היו גבוהים מעט יותר על המשטח בעל המבנה מאשר על המשטח החלק (כמתואר בטבלה 2), אך השונות בין הניסויים על פני אותו המשטח הייתה גדולה מדי מכדי להסיק זאת באופן חד משמעי (איור 4).

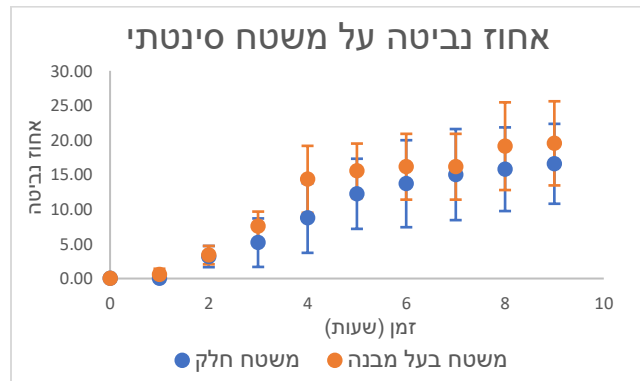
בנוסף למדידת אחוז הנבגים הנובטים על פני המשטחים השונים, מדדנו גם את אורכי הנבטים על פני המשטחים השונים לאורך הזמן. בדקנו זאת בשלוש נקודות זמן (לאחר 4 שעות, לאחר 8 שעות ולאחר 12 שעות), כפי שניתן לראות באיור 5. שוב מצאנו כי אין הבדל משמעותי באורכי הנבט, בגידול הנבגים על המשטחים השונים, כאשר מתבוננים בממוצע האורך (טבלה 3). אך ניתן לראות, לפי ערכי המינימום והמקסימום של האורכים (טבלה 3), כי התפלגויות האורכים שונות על שני סוגי המשטחים. בימים אלו אנו מחפשים את המבחן הסטטיסטי הנכון לבדוק דרכו את התוצאות. נראה גם כי יתכן בהחלט כי קצב צמיחת הנבט שונה בין שני סוגי המשטחים וכי ישנם זמני עצירה בצמיחה אשר משתנים בין טיפוס המשטחים השונים. אנו עדין עובדים על אנליזה סטטיסטית אשר תבחן את השינוי בהתפלגויות לאורך הזמן ותבדוק

האם יש שוני סטטיסטי משמעותי בין ההתנהגות הדינמית של הנביטה של הבוטריטיס בין משטחים בעלי אופי שונה. כלומר, האם מיקרו מבנה פני השטח משפיע על דינמיות הנביטה של נבגי הבוטריטיס.

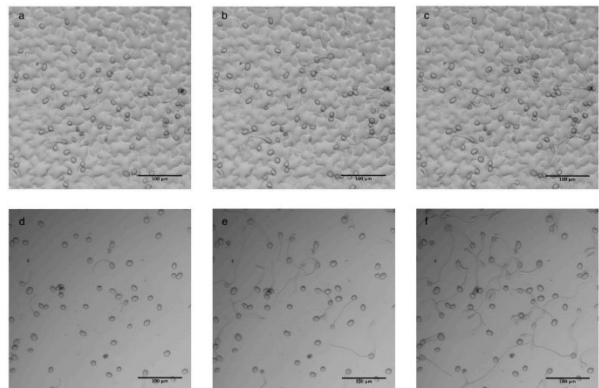
זמן	חלק 1	חלק 2	חלק 3	מבנה 1	מבנה 2	מבנה 3
0	0	0	0	0	0	0
שעה 1	0	0	0	0	0	0
שעה 2	4.84	3.53	1.14	2.47	2.41	5.26
שעה 3	9.68	4.71	1.14	6.17	6.02	10.53
שעה 4	14.52	9.41	2.27	9.88	12.05	21.05
שעה 5	19.35	9.41	7.95	13.58	12.05	21.05
שעה 6	22.58	9.41	9.09	13.58	12.05	22.81
שעה 7	24.19	11.76	9.09	13.58	12.05	22.81
שעה 8	24.19	12.94	10.23	14.81	14.46	28.07
שעה 9	24.19	15.29	10.23	16.05	14.46	28.07

טבלה 2: אחוז הנבגים הנובטים על משטחים סינתטיים. אחוז הנבגים אשר החלו בתהליך הנביטה מתוך כלל הנבגים בזמנים השונים בשלוש החזרות השונות בשני סוגי המשטחים (בעלי המבנה והחלקים).

איור 4: שינוי באחוז הנביטה עם הזמן על משטחים שונים. אחוז הנבגים הנובטים בכל נקודת זמן על פני משטח חלק עשוי מ PDMS (גרף כחול) או תעתיק של עלה מ PDMS (גרף כתום). האחוזים נבדקו על ידי ספירת הנבגים הנובטים בתמונות מיקרוסקופ בזמנים שונים של המשטחים השונים עם 3 חזרות לכל משטח. ניתן לראות כי אחוז הנביטה בכל הזמנים גבוה יותר במשטח התעתיק אך לא סיגניפיקנטית.



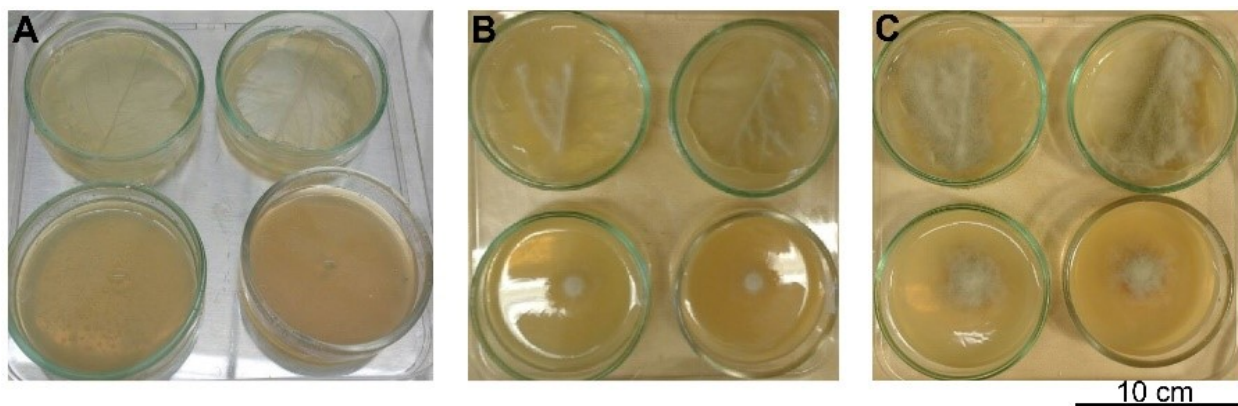
איור 5: אורך הנבט עם הזמן במשטחים שונים. תמונות מיקרוסקופ אור של נבגי בוטריטיס על משטח PDMS חלק (למטה) ומשטח PDMS המחקה מיקרו מבנה של עלה (למעלה) ב 4 נקודות זמן – לאחר 4 שעות (שמאל), 8 שעות (אמצע) ו 12 שעות (ימין). ניתן לראות כיצד אורך הנבט משתנה עם הזמן. אורכם של נבטים אלו נמדד והתוצאות מובאות בטבלה 3.



טבלה 3: התפלגות אורכי הנבט על המשטחים השונים. ממוצע האורכים של הנבט, כמו גם האורך המקסימלי והמינימלי בשלוש נקודות זמן שונות על שני משטחים שונים. ניתן לראות כי בעוד אורכי הנבט דומים בין שני המשטחים, התפלגות אורכי הנבט על פני המשטח בעל המבנה צרה יותר מזו של המשטח החלק.

מקסימום	מינימום	ממוצע		
76	2	31	חלק	4 שעות
66	5	31	מבנה	
175	16	83	חלק	8 שעות
147	12	82	מבנה	
234	20	115	חלק	12 שעות
250	31	105	מבנה	

לבסוף, רצינו לבדוק האם אנו יכולים לראות הבדל בהתפשטות מושבת בוטריטיס כפונקציה של שינוי המבנה. לשם כך, בנינו מערכת המורכבת מאגר, במקום PDMS בו השתמשנו עד כה. התבנית השלילית של העלה העשויה מ PDMS שומשה על מנת ליצור את תעתיק מבנה פני העלה על פני אגר. במרכז צלחות אגר חלקות או צלחות אגר המחקות את מבנה פני העלה זרענו בוטריטיס בריכוז 5×10^5 ובדקנו את התפשטות המושבה עם הזמן. מצאנו כי בעוד על פני הצלחת החלקה המושבה התפשטה במעגל, בצלחת בעלת המבנה, המושבה התפשטה לאורך מבנה העורקים. זאת למרות שהתכונות הכימיות של שני המשטחים היו זהות. דבר המרמז חישה פיסיקלית של מבנה פני השטח על ידי הבוטריטיס.



איור 6: התפשטות בוטריטיס על פני משטח אגר. תמונות מצלמה של 2 צלחות אגר חלקות ו 2 צלחות בעלות מבנה של פני השטח של עלה עגבניה. במרכז כל הצלחות טופטפו 10 מיקרוליטרים של בוטריטיס בריכוז 5×10^5 . התמונות נלקחו מיד אחרי הטפטוף (A), 3 ימים לאחריו (B) ו 5 ימים לאחריו (C).

דיון

בשנה ראשונה של מחקר זה פיתחנו שיטה ידועה בספרות ליצירת תעתיק של מבנה עלה עגבניה המחקר 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. בשנה זו הוכחנו כי ניתן, בעזרת שיטה זו, לחזור על אותו מיקרו מבנה של עלה פעם אחר פעם ובכך לשחזר בדיוק את אותם התנאים שוב ושוב. דבר זה לא הוכח בספרות בעבר למרות שזוהי תוצאה מתבקשת של הטכניקה. עבור השימוש הרלוונטי מבחינתנו לשיטה זו – חקר השפעת המבנה על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו – אבחנו זו הינה קריטית.

השתמשנו בפלטפורמה זו על מנת לבחון את השפעת מיקרו המבנה של פני השטח במקרה הספציפי של עלה עגבנייה והפטרייה הפתוגנית – בוטריטיס. השתמשנו בפלטפורמה על מנת לבדוק כיצד מבנה פני השטח של עלה העגבנייה משפיע על פיזור, אחוז נביטה, אורך הנבט והתפשטות המושבה של נבגי הפטרייה. מצאנו כי יש בהחלט השפעה של המבנה על התנהגות הפטרייה. בעוד שבאחוז הנביטה ובאורך הנבט מצאנו שוני אשר משמעותו הסטטיסטית לא ברורה בין משטח חלק לבין משטח בעל מבנה, בפיזור הנבגים ובהתפשטות המושבה מצאנו הבדל מובהק בין משטחים חלקים לבין משטחים אשר הם בעלי מבנה המחקה את פני השטח של עלה העגבנייה.

הייחוד בפלטפורמה זו היא שיש באפשרותנו להשוות בין שני משטחים שונים שההבדל היחיד ביניהם הוא המבנה. זאת מכיוון שהמערכת הסינתטית שלנו זהה בכל מרכיב אחר. ניתן להבין את המשמעות של זה מניסוי התפשטות המושבה על פני צלחת אגר שביצענו. בניסוי זה ראינו העדפה ברורה של התפשטות המושבה על פני המבנים המדמים עורקים בצלחת בעלת מבנה פני העלה. העדפה של מיקרואורגניזמים ביוטיים לאזור זה על פני העלה הודגמה בעבר ויוחסה לקרבה למקורות מזון (מכיוון שבעורקי עלה זורמים סוכרים) [14], [15]. המערכת שלנו עשירה במקורות מזון בכל מקום בפיזור אחיד. השוני היחיד בין צלחת חלקה לבין צלחת בעלת מבנה הוא המבנה עצמו. אי לכך, ברור שהבחירה של התפשטות המושבה בצורה זו אינה קשורה לסיגנל כימי או מולקולרי כמזון אלא לסיגנל מבני בלבד. רק מערכת כשלנו אשר מנטרלת את הסיגנלים האחרים יכולה לחשוף את הסיגנל הפיסיקלי הנסתר.

מכיוון שיש ביכולתנו להשוות בין מבנים שונים תוך נטרול כל ההשפעות האחרות, אנו יכולים להסתכל על תנאים המשנים את ההדבקה בפתוגן (כגון תזונה חנקתית) ותנאים המשנים את מבנה העלה (כגון מהלך היום בו נפתחות ונסגרות הפיוניות) ולבחון כיצד רק האלמנט המבני משפיע על התפתחות הפטרייה ועל תהליך ההדבקה. כתוצאה מכך אנו יכולים לחשוף דרכי התגוננות חדשות מפני הפתוגנים אשר נובעות אך ורק מהסיגנל המבני המשודר לפתוגן מפני השטח של הצמח. אלה הם בדיוק הדברים אשר יש בכוננתנו להמשיך ולבצע בהמשך המחקר.

- [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.
- [12] א. טוקר, "מדריך מצולם לפגעים בעגבניה בישראל, 2003 and ע. שדה.
- [13] K. Mendgen, M. Hahn, and H. Deising, "Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi.," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 34, pp. 367–86, 1996.
- [14] G. Pugh and N. Buckley, "The leaf surface as a substrate for colonization by fungi," in *Ecology of leaf surface micro-organisms*, 1971, pp. 431–445.
- [15] R. W. Paul, D. L. Kuhn, J. L. Plafkin, J. Cairns, and J. G. Croxdale, "Evaluation of Natural and Artificial Substrate Colonization by Scanning Electron Microscopy," *Trans. Amer. Micros. Soc.*, vol. 96, no. 4, pp. 506–519, 1977.