

דף פותח

דו"ח לתכנית מחקר מספר 20-01-0200

שנת המחקר: 2 מתוך 2 שנים

פיתוח פלטפורמה סינתטית לחקר אינטראקציית פתוגן-פני שטח עלה – שימוש בפטריה בוטריטיס (עובש אפור) והחיידיק קסנטומונס על עלי עגבניה כמודל

Developing a synthetic platform for studying pathogen - leaf surface interaction; proof of concept using *Botrytis* and *Xanthomonas* 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
שאול בורדמן המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים

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

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

Saul Burdman, Department of Plant Pathology and Microbiology, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, P.O.Box 12, Rehovot 76100, Israel. E-mail: saul.burdman@mail.huji.ac.il

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: 1.9.21

גוף דו"ח המחקר
תוכן עניינים:

<u>מספר עמוד</u>	<u>נושא</u>
1	תקציר
2	מבוא
4	מטרות המחקר
4	ניסויים ותוצאות המחקר
16	דיון
19	ביבליוגרפיה

רשימת איורים

איורים וטבלאות

מספר עמוד

5	איור 1 – השוואה בין תעתיקים חיוביים מאותה תבנית שלילית
5	איור 2 – השוואה בין מבנה תעתיק למבנה עלה עגבנייה
6	איור 3 – פיזור נבגי בוטריטיס על פני עלה ותעתיק
8	איור 4 – פיזור נבגי בוטריטיס על פני משטחים סינתטיים
9	איור 5 – שטיפת נבגי בוטריטיס מתעתיק עגבניה
10	איור 6 – יעילות שטיפת נבגי בוטריטיס כתלות במבנה
10	איור 7 – שינוי בהידרופוביות משטחים
11	איור 8 – יעילות שטיפת נבגי בוטריטיס מתת מבנים
13	איור 9 – שינוי באחוז הנביטה עם הזמן על משטחים שונים
14	איור 10 – שינוי במיקרו מבנה בהזנה חנקנית
15	איור 11 – שינוי ברגישות לקסנטומונס בהזנה חנקנית
16	איור 12 – פיזור קסנטומונס על פני עלה ותעתיק
16	איור 13 – תעתיק של פיוניות פתוחות וסגורות
8	טבלה 1 – פיזור נבגי בוטריטיס על פני תעתיק סינתטי
14	טבלה 2 – שינוי באורך הנבט עם הזמן על משטחים שונים

תקציר

פני השטח של הצמח מהווים את שער הכניסה לצמח. 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 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 המערכת על מנת לבדוק את השפעת מבנה פני שטח עלה עגבנייה על האינטראקציה שלו עם פתוגנים שונים, ביניהם הפטרייה בוטריטיס הגורמת לעובש אפור והחיידק קסנטומונס הגורם למחלת הגרב החיידקי.

במחקר זה, ביססנו בתחילה את 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.

מבנה העלה הוא דינמי ומשתנה בהתאם לתנאי הסביבה. רצינו שהמערכת שלנו תכיל גם את אופציית השינוי. מכיוון שהמערכת שלנו אינה דינמית בינתיים, בדקנו ומצאנו שינויים במבנה פני שטח העלה כתלות בהזנה החנקנית אשר גורמת לשינוי בצפיפות הפיוניות ובאורך הטריכומות. בנוסף, גם הצלחנו לצפות בשינויים ידועים של פתיחת וסגירת הפיוניות במהלך שעות היום. הצלחנו להוכיח את יכולתנו להעתיק שינויים אלה אל המערכת הסינתטית שלנו. משמעות הדבר היא שבהמשך נוכל לבחון את תגובת הפתוגנים למבנה תוך שימוש במבנים טבעיים משתנים וכך לקבל מושג טוב יותר על התנהגותם הדינמית של הפתוגנים עם השינוי בתנאי הסביבה וכתוצאה מכך במיקרו המבנה של פני שטח העלה.

בשלב הבא רצינו להראות את היכולת שלנו לפזר את הפתוגנים על גבי המשטח הסינתטי ולבחון את פיזורם הפסיבי וכיצד הוא מושפע ממבנה פני השטח. לשם כך, פיזרנו את נבגי הפטרייה והחיידקים גם על העלה וגם על תעתיק של העלה. מצאנו כי פיזור הפתוגנים אינו רנדומלי על פני השטח וכי לשני הפתוגנים יש העדפה לאיזורים הבין-תאיים. בנוסף מצאנו כי לטריכומות תפקיד מבני חשוב באינטראקציה בין העלה לשני הפתוגנים. בחיידק מצאנו נוכחות משמעותית על הטריכומות גם בעלה וגם בתעתיק, כאשר ראינו כי בהזנה חנקנית הטריכומות מתקצרות והעגבניה נעשית עמידה יותר לחיידק. ניתן לומר כי יתכן וקיצור הטריכומות תורם להגנה של העלה מפני החיידק שכן במקרה זה יהיו פחות חיידקים על פני אותו מבנה אשר מושך אותם ויתכן כי גם פרמטר זה מעודד הגנה כלשהי מפני הפתוגן. בבוטריטיס מצאנו כי הנבגים נשטפים בקלות רבה יותר מהטריכומה, אם כי מצאנו שיכולת זו תלויה גם בתכונות נוספות של פני השטח, כנראה הידרופוביות.

על מנת לבחון התנהגות דינמית של הנבגים וכיצד היא מושפעת מפני השטח, פיזרנו את נבגי הפטרייה גם על שני משטחים סינתטיים העשויים מאותו החומר (PDMS). האחד, משטח חלק והשני משטח בעל מבנה פני השטח של העלה. בדקנו 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 תהליך הנביטה קורה יותר על פני משטח בעל מבנה מאשר על פני משטח שאין לו מבנה כלומר, יש השפעה חזקה למבנה פני השטח על התנהגות הנבגים גם כאשר מנטרלים לחלוטין כל אלמנט אחר.

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. אנחנו הראינו את יתרונה העיקרי של התשתית שלנו בבחינת פני שטח העלה (היכולת לחזור על אותו המבנה בדיוק פעם אחר פעם). בנוסף, הראינו את היתכנות המערכת על ידי בדיקה של פיזור של נבגי בוטריטיס וחיידקי קסנטומונס על פני המשטחים. הראינו חזרתיות בין המערכת הסינתטית לזו הטבעית, אשר היא אינה מושלמת אך השוואה בין שתי המערכות מאפשרת להגיע לתובנות חדשות. כמו כן, ראינו גם תהליך דינמי - נביטה של נבגי בוטריטיס על פני המשטחים הסינתטיים וכיצד התהליך הביולוגי הזה מושפע ממבנה. הראינו השפעה של המבנה על פיזור החיידקים והנבגים כמו גם על התנהגות הנבגים (נביטתם). אנו רואים בפלטפורמה זו כבעלת פוטנציאל להבנה כיצד הרכיב המבני משפיע על האינטראקציה של צמח העגבנייה עם פתוגנים שונים.

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]. דוגמא נוספת היא חיידק הקסנטומונס, הגורם למחלת הגרב החיידקי בעגבנייה [14]. המחלה נפוצה במקומות רבים בעולם, ומשגשגת בתנאי לחות גבוהה בשילוב עם טמפרטורות גבוהות [15]. קסנטומונס מגיע לכל חלקי הצמח העל אדמתיים וגורם לנגעים נקרוטיים על העלים, הגבעולים והפירות והתוצאה היא איכות ירודה והפחתה משמעותית ביבול [16]. הבקרה על המחלה מתבססת כיום בעיקר על סניטציה ושימוש בזרעים נקיים מגורם המחלה [17] ויישום תכשירים מבוססי נחושת, שעקב השימוש המאסיבי בהם, פותחה עמידות כנגדם [18].

במחקר זה מטרנו היא להרחיב ולבסס את השימוש בפלטפורמה הסינתטית ולהראות את הרלוונטיות של הפלטפורמה לחקר האינטראקציה בין צמח ופתוגן, בעיקר בהקשר המבני. נעשה זאת עבור עלה העגבנייה, בשילוב עם פטריית הבוטריטיס וחיידק הקסנטומונס כמייצגי פתוגנים מרכזיים של עגבנייה אשר לא ידוע כיצד מבנה פני השטח משפיע על התפתחותם ותהליך ההדבקה. מטרתנו 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, נרצה להראות שינויים במבנה העלה תחת תנאים שונים ואת שיחזורם

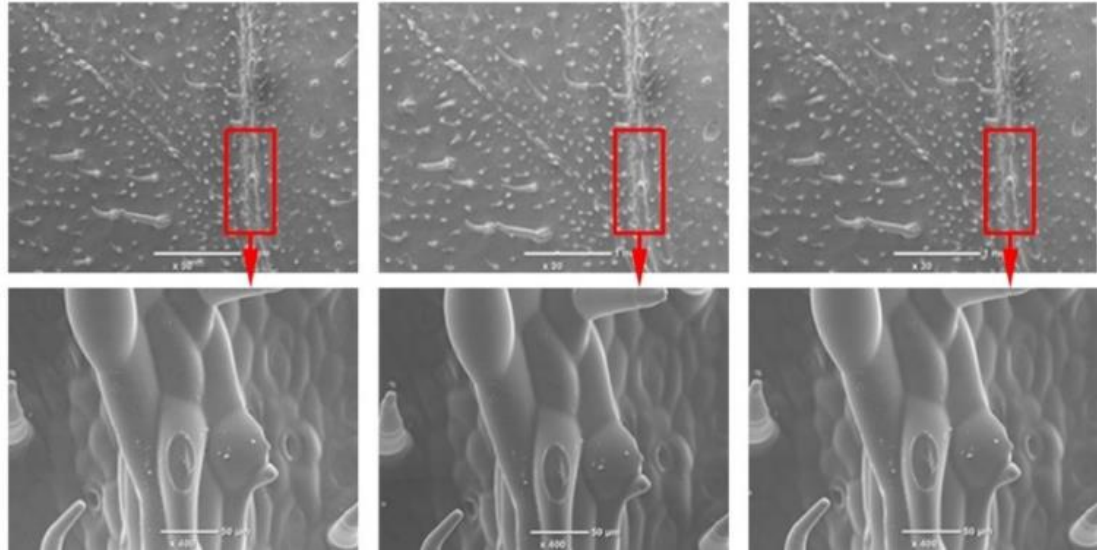
במערכת הסינתטית. בנוסף, נרצה להראות את פיזורם הפסיבי של הפטרייה והחיידק על פני משטח העלה והמשטח הסינתטי.

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 שני פתוגנים בולטים המייצגים קבוצות טקסונומיות ואסטרטגיות הדבקה שונות (בוטריטיס וקסנטומונס), תוך בדיקת תצורות שונות של העלה כפועל יוצא של תנאי הסביבה (דישון חנקני ושעת היום) על טיב האינטראקציה עם הפתוגנים האמורים.

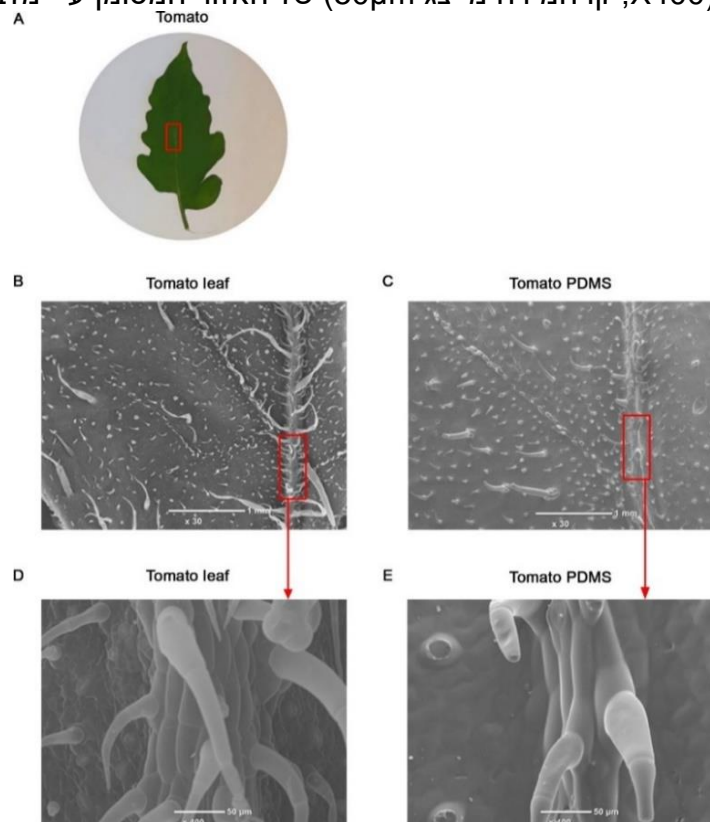
פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

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 מזן M82, מצמחים 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 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 טיפלו 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 (5-8 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.



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.

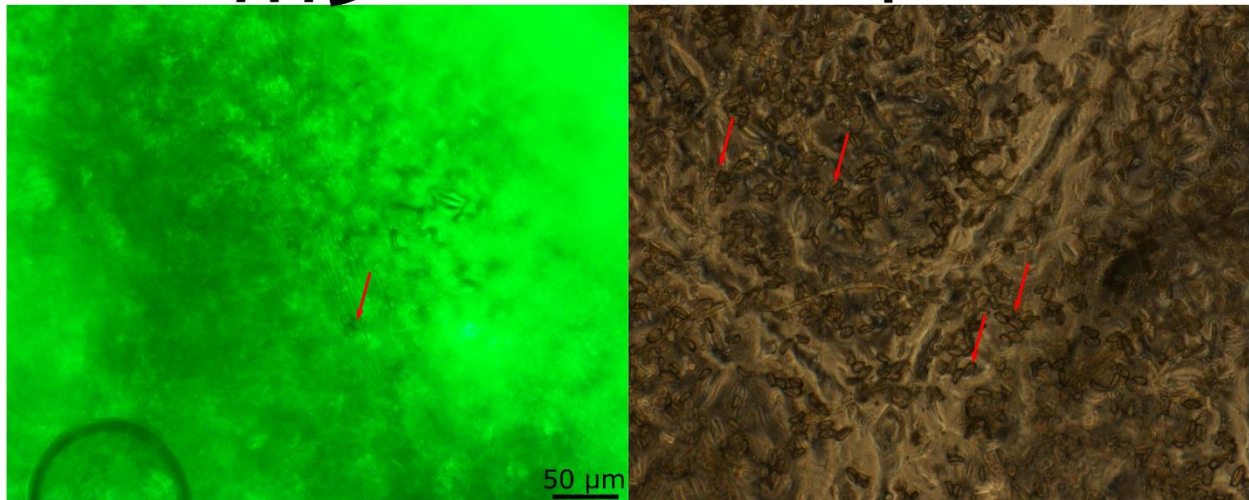
איור 2: השוואה בין מבנה תעתיק למבנה עלה עגבנייה: A עלה העגבנייה (M82), ממנו הוכן ההעתק מ PDMS. המלבן האדום על גבי העלה מציין את החלק אשר נלקח לצילום תחת מיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM), הן של ההעתק והן של העלה. תמונות B,C מייצגות את חלקו של המלבן האדום מהעלה, בהגדלה של X30 (קו המידה שווה ל 1mm). תמונה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



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. בהמשך פיזרנו ספורות של בוטריטיס (10 מיקרוליטר של תמיסת ספורות בריכוז של 10^6 ספורות למ"ל) גם על עלה עגבנייה וגם על תעתיק של העלה (עלעל רביעי של עלה שלישי). ייבשנו מעט את הטיפה שפוזרה על המשטח ומייד לאחר מכן צפינו בפיזור הספורות במיקרוסקופ אור פשוט (איור 3). גילינו כי קשה מאד, בצורה כזו לצפות בספורות, בוודאי שבשילוב עם מיקרו מבנה פני השטח, על פני העלה. ניתן לראות כי רואים ספורות מעטות מאד על פני העלה בשעה שקל לראות כמות גדולה של ספורות, על גבי התעתיק. למעשה אנו רואים כי התעתיק יכול לסייע לנו בצפייה איכותית יותר בבוטריטיס (בעיקר בהקשר לפני השטח) גם באמצעים פשוטים כמיקרוסקופ אור מעבדתי.

עלה רפליקה



איור 3: פיזור נבגי בוטריטיס על עלה ותעתיק: צילום במיקרוסקופ אור מעבדתי פשוט של נבגי בוטריטיס על פני עלה עגבנייה (מימין) ועל פני תעתיק (משמאל). ניתן לראות כי בעוד שבתעתיק הנבגים נצפים בקלות (מסומנים בחיצים אדומים) בשילוב עם האלמנטים המבניים, בעלה, קשה לראות את הנבגים (מסומנים בחץ אדום) וקשה גם לראות את האלמנטים המבניים.

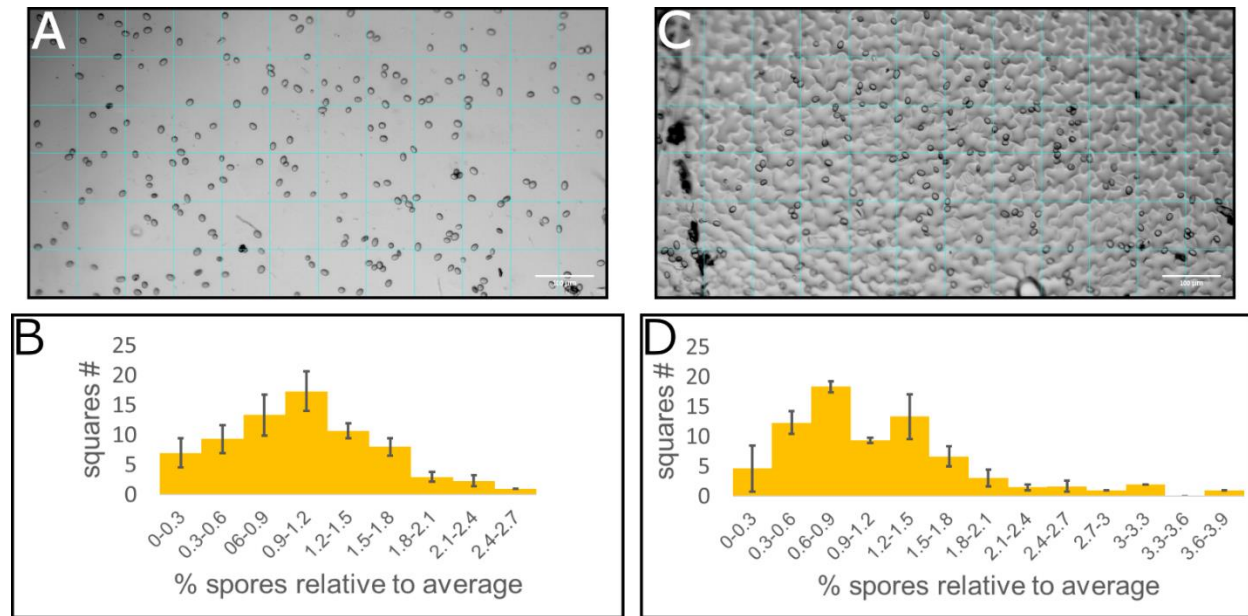
בשלב הבא בדקנו את פיזור נבגי הבוטריטיס על פני התעתיק הסינתטי במיקרוסקופ איכותי יותר. פיזרנו את הנבגים גם על התעתיק וגם על משטח חלק העשוי מ PDMS על מנת להשוות ביניהם. המטרה הייתה לבדוק האם ישנו פיזור רנדומלי לחלוטין או שמא יש העדפה של הנבגים למיקום כלשהו על פני השטח של העלה. על מנת לבדוק זאת, חילקנו את תמונות המיקרוסקופ המתארות את פיזור הנבגים על פני השטח ל 72 ריבועים קטנים בעלי שטח זהה של $82\mu\text{m} \times 82\mu\text{m}$ (כפי שמתואר באיור A 4 ו-C). בכל ריבוע ספרנו את מספר הנבגים וביצענו מיצוע של מספר הנבגים לריבוע. לאחר מכן, ספרנו את מספר הריבועים בהם

היה מספר דומה של נבגים ביחס לממוצע לפי קפיצות של 30% (כלומר – 0-30% מהממוצע, 30-60% מהממוצע, 60-90% מהממוצע וכו') ויצרנו גרף המתאר את התפלגות הנבגים על פני המשטח במשטח חלק ובתעתיק (איור 4 B ו D). חשוב לציין כי בשני המשטחים נבדק מספר דומה של נבגים – כ 200. כמו כן, בוצעו 3 חזרות עבור כל אחד מסוגי המשטחים. בדקנו את ההתפלגות במבחן שפירו-וילק ומצאנו כי אף אחת מהתפלגויות פיזור הנבגים על המשטח איננה נורמלית, אם כי ניתן לראות כי במשטח חלק ההתפלגות נראית קרובה יותר לנורמלית מאשר בתעתיק (בהשוואה של איור 4B ל 4D). דבר זה גם מאושר על ידי הצידוד והגבנונית (צידוד של 0.51 ו 1.02 וגבנונית של -0.02 ו 1.51 להתפלגות הנבגים עבור משטח חלק ותעתיק, בהתאמה). בעוד שההתפלגות על המשטח החלק קרובה להתפלגות נורמלית ונראה שהסיבה שהיא אינה נורמלית היא הזנב הארוך יחסית של ריבועים עם מספר ספורות גדול מהממוצע, ההתפלגות על התעתיק אינה דומה כלל להתפלגות נורמלית, כאשר מספר הריבועים עם מספר ספורות ממוצע דווקא קטן מאלה אשר בהם מעט יותר או מעט פחות מהממוצע. בנוסף, הזנב של ההתפלגות על פני התעתיק גדול הרבה יותר מזה של ההתפלגות על המשטח החלק. הזנב הארוך בהתפלגות מראה את הנטייה של הספורות להיות במקבצים. ברור שנטייה זו מועצמת על פני התעתיק ביחס למשטח החלק. כאשר כימתנו 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. יתכן שהעדפה זו לאזור הבין תאי היא זו שמעצימה את הנטייה להתקבצות ולכן את הגדלת הזנב בהתפלגות הנבגים על פני התעתיק ביחס למשטח חלק.

בשלב הבא רצינו להבין קצת יותר את השפעת המבנה על תהליך ההיצמדות של נבגי הבוטריטיס אל פני השטח. לצורך כך, הנחנו טיפה של מיקרוליטר אחד של נבגי בוטריטיס בריכוז של 10^5 על פני חתיכה בגודל 1-3 מ² של המשטח הרלוונטי והנחנו לה להתייבש במנדף ביולוגי. צילמנו תמונה של המשטח במיקרוסקופ כתמונת ה"לפני". בשלב זה הכנסנו את המשטח לאפנדורף מלא במים מזוקקים פעמיים ושיקשקנו ב 28°C במהירות של 1500 RPM למשך 5 דקות. הוצאנו את המשטח והשארנו אותו לייבוש במנדף ביולוגי. לאחר מכן, צילמנו שוב במיקרוסקופ על מנת לקבל את תמונת ה"אחרי". דוגמא לתמונת "לפני" ו"אחרי" על תעתיק של עלה עגבניה, נמצאת באיור 5. ניתן לראות את הנבגים שנשארו באותו המקום על פני השטח (מסומנים בעיגול כחול בתמונה) לעומת הנבגים הרבים שנשטפו מפני השערה המסומנת גם היא בעיגול כחול.

לצורך הבנה של תפקיד המבנה בשטיפה של הנבגים, השוונו שטיפה של נבגי בוטריטיס מעלה עגבניה, תעתיק של עלה עגבניה אשר עשוי מהפולימר PDMS ותעתיק של עלה עגבניה מהפולימר PDMS לאחר שעבר טיפול (אקטיבציה) אשר הפך את פני השטח שלו להידרופיליים יותר. על מנת להשוות בין השטיפות הגדרנו את יעילות השטיפה כמספר הנבגים אשר נספרו לפני השטיפה מחולקים במספר הנבגים אשר

נספרו אחרי השטיפה. בשלב זה בדקנו את יעילות השטיפה מהמשטחים השונים (העגבנייה ושני התעתיקים) והשוונו למשטחים חלקים – האחד מ PDMS והשני מ PDMS מאוקטב. הסטטיסטיקה בוצעה על ידי השוואה בין זוגות ב t-test כאשר אלפא הותאם באמצעות תיקון בנפרוני. התוצאות מתוארות באיור 6. ניתן לראות כי ישנו הבדל סיגניפיקנטי ביעילות השטיפה בין העגבנייה לכל אחד מהתעתיקים שלה, בעוד שלא היה הבדל סיגניפיקנטי ביעילות השטיפה בין המשטחים השונים, ללא קשר למבנה שלהם או להאם עברו או לא עברו אקטיבציה.



איור 4: 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 10^6 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 4, 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 המשטח	
11.3	80	מרכז התא
79.8	11	איזור בין-תאי
4.6	2	פיוניות
4.3	7	אחר

על מנת לבדוק איזה פרמטר כן משפיע על יעילות השטיפה בדקנו את ההידרופוביות המשטחים השונים. 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. 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 בין 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 מ PDMS ומ PDMS מאוקטב, כמו גם את זוויות המגע בתעתיקים. בנוסף, מדדנו את זווית המגע כאשר המשטח הנבחן היה העלה עצמו, לשם השוואה. כל המדידות שנעשו מוצגות באיור 7 למטה. תוצאות המדידות מסוכמות בגרף באיור 7. הסטטיסטיקה בוצעה על ידי השוואה בין זוגות לפי מבחן t-test של וולץ' כאשר אלפא מותאם באמצעות תיקון בנפרי. מצאנו כי שני המשטחים העשויים מ PDMS הם הידרופוביים, שני המשטחים העשויים מ PDMS מאוקטב הם הידרופיליים ועלה העגבניה עצמו הוא ניטרלי. בנוסף, המבנה יצר משטח הידרופובי יותר גם ב PDMS וגם ב PDMS המאוקטב. אבל בכל מקרה, רמת ההידרופוביות לבדה לא יכולה להסביר את ההבדלים היעילות השטיפה של נבגי הבוטריטיס מהמשטחים השונים.

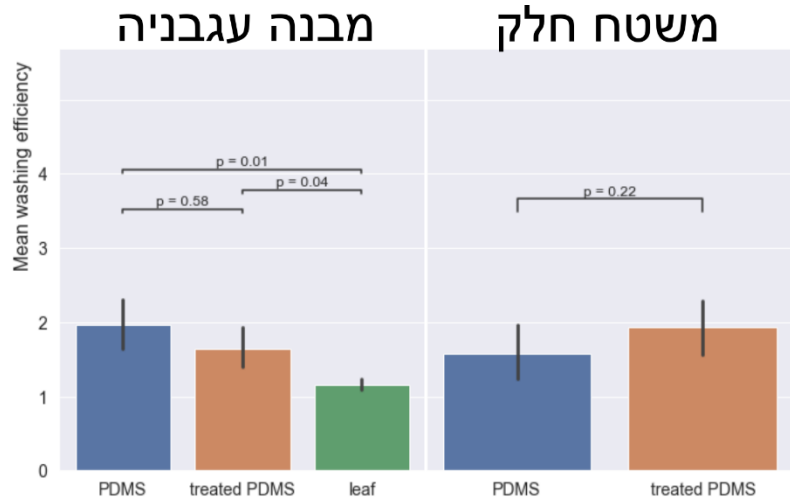
איור 5: שטיפת נבגי
בוטריטיס מרפליקת
עגבניה. תמונת לפני
שטיפה (ימין) ואחרי שטיפה
(שמאל) של נבגי בוטריטיס
שהונחו על תעתיק עגבניה
ונשטפו. מסומנים בעיגול
הקטן שלושה נבגים
שנשארו במקומם לאחר
השטיפה. בעיגול הגדול
מסומנת השערה, ממנה
ירדו נבגים רבים בשטיפה.



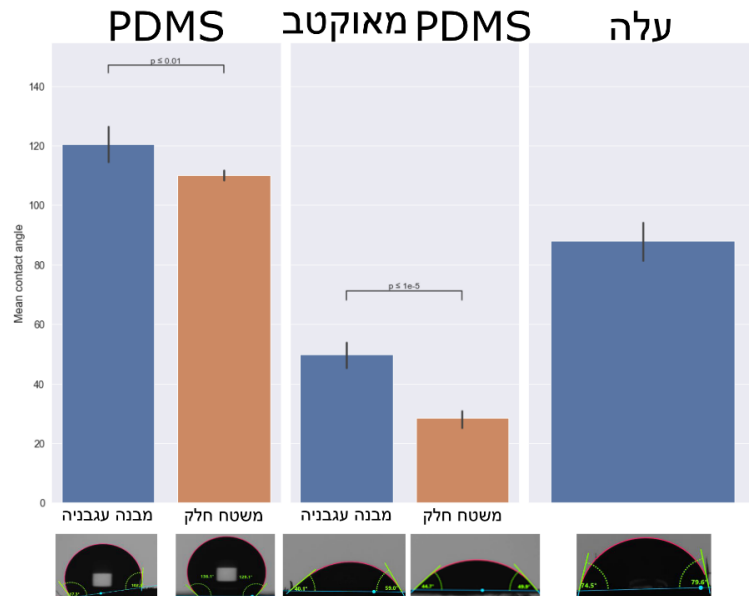
ראינו כי משטח העגבניה הסינתטי, העשוי מ PDMS או מ PDMS מאוקטב, היה בעל יעילות שטיפה גדולה יותר מזו של משטח העלה הטבעי. בנוסף, שמנו לב כי בשטיפה הייתה ירידה גדולה מאד של נבגים דווקא מהטריכומות, במשטח העשוי מ PDMS. אי לכך, הנחנו כי משהו במבנה הטריכומות גורם להיצמדות חלשה יותר של נבגים. על מנת לוודא את העניין, חילקנו את התעתיקים מ PDMS ומ PDMS מאוקטב לשני תתי מבנים - טריכומות (שערות) וכל השאר. ספרנו את הנבגים על השערות בלבד לפני ואחרי השטיפה וביצענו פעולה דומה עבור כל שאר המשטח אשר לא מכיל שערות. לא יכולנו לעשות זאת על העלה הטבעי שכן, כפי שראינו, היה קשה מאד לראות את הנבגים על משטח העלה הטבעי ובוודאי שלהפריד בין נבגים אשר נמצאים על תתי מבנים שונים. כאשר בדקנו את יעילות השטיפה בכל אחד מתתי המבנים, מצאנו כי באופן מובהק, השטיפה של הנבגים מהשערות בתעתיק העגבניה העשוי PDMS היתה יעילה פי 2 מתת המבנה האחר ומשני תתי המבנים בתעתיק העשוי מ PDMS מאוקטב. כך שלשערות

העגבניה, לפחות במצבן ההידרופובי ולא ההידרופילי, יש תרומה חשובה להיצמדות נבגי הבוטריטיס לפני השטח או, במקרה זה, לרמה הנמוכה יותר של היצמדות (שטיפה קלה יותר של הנבגים). במדידת רמת ההידרופוביות לא ניתן, כמובן, להפריד בין השערות לשאר המשטח כך שלא ברור מהי רמת ההידרופוביות של שערות העגבניה עצמן. יחד עם זאת, אנו רואים כי ממשטח עלה העגבניה שטיפת הנבגים הייתה יעילה פחות מאשר בתעתיק ולכן סביר ששם השערות אינן תורמות משמעותית, כמו בתעתיק, לשטיפת הנבגים. יתכן שזוהי תוצאה של מצב ההידרופוביות. במקרה זה, קשה לומר שהתעתיק מחקה את מה שקורה בעגבניה עצמה, אך הוא מסייע לנו להבין אילו גורמים הם רלוונטיים יותר ואלו פחות במה שקורה בעגבניה עצמה (לדוגמה כאן, משערות העגבניה במשטח הטבעי נשטפים הנבגים ביעילות מופחתת, נראה מכיוון שהן לא הידרופוביות מספיק).

איור 6: יעילות שטיפת נבגי בוטריטיס כתלות במבנה. יעילות השטיפה של נבגי בוטריטיס מפני משטחים שונים. משטחים של PDMS ו PDMS מאוקטב כמו גם תעתיקים של עגבניה מ PDMS ו PDMS מאוקטב נבדקו ליעילות השטיפה של נבגי בוטריטיס מהם. השטיפה מהמשטחים הסינתטיים הייתה יעילה יותר מהשטיפה מהמשטח הטבעי (עלה) ללא קשר לתכונות החומר או המבנה.



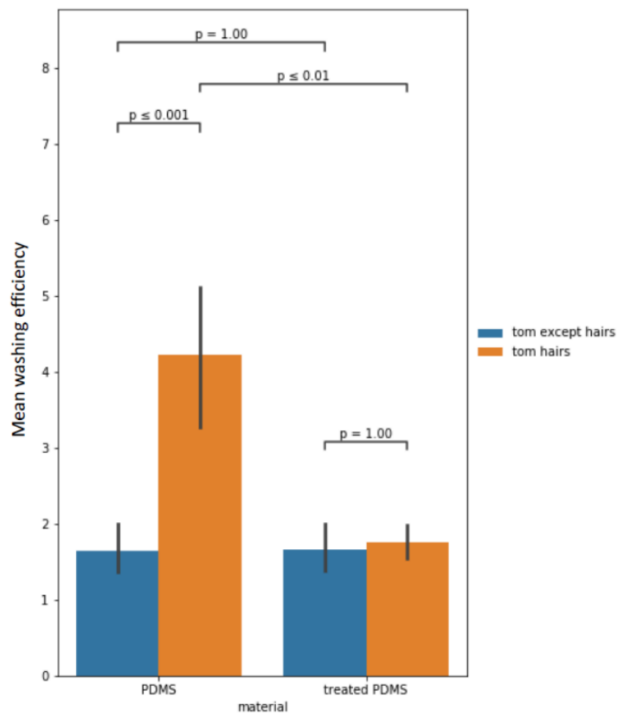
איור 7: שינוי בהידרופוביות משטחים. זווית המגע של טיפת מים על פני המשטח נבדקה על 5 משטחים שונים (מימין לשמאל): עלה עגבניה, משטח חלק העשוי מ PDMS מאוקטב, תעתיק עגבניה מ PDMS מאוקטב, משטח חלק עשוי PDMS ותעתיק עגבניה מ PDMS. תמונות מייצגות של הטיפה על פני המשטחים השונים מופיעות בשורה למטה. תוצאות זוויות המגע מופיעות בגרף. שני משטחי ה PDMS הם הידרופוביים (זווית של מעל 90°), ה PDMS המאוקטב הידרופילי והעלה ניטרלי. בכל מקרה, מיקרו מבנה, מעלה את ההידרופוביות פני השטח.



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 המשטח החלק והמשטח בעל מבנה העלה,

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. תמונת אופיינית עם הזמן מופיעות באיור 9A. מצאנו כי אחוזי הנבגים שנבטו היו גבוהים יותר על המשטח בעל המבנה מאשר על המשטח החלק והשונות הייתה סיגניפיקנטית כפי שמצאנו לאחר נירמול לגודל האוכלוסיה וביצוע מבחן בינומיאלי (איור 9B). בנוסף, מדדנו גם את השינוי באורך הנבט הממוצע עם הזמן על פני שני סוגי המשטחים. ראינו כי השונות באורך הנבט הייתה גבוהה מאד, על שני המשטחים. נראה כי אורך הנבט על פני התעתיק מעט קצר יותר מאשר על פני המשטח החלק וכי ההבדל גדל עם הזמן, אם כי בשונות כה גדולה לא ניתן לומר זאת באופן החלטי (טבלה 2). יחד עם זאת, אנו ראינו בוידאו כי הנבט על פני התעתיק, משנה כיוונו כתוצאה מהיתקלות במבנים על פני השטח. שינוי זה של כיוון לווה בהתנפחות קלה של הנבט ועצירה. שינויי כיוון אלה קרו גם על המשטח החלק אך היה נראה כי היו פחותים במספרם מאלו שקרו על התעתיק. זאת מכיוון שנראה היה כי המבנים השונים הם אלו שעודדו את שינויי הכיוון הללו. יחד עם זאת, מדובר במסקנה איכותית בלבד מהצפייה בסרטונים. לא כימתנו את שינויי הכיוון הללו על שני המשטחים ואנו מציעים זאת רק כהסבר אפשרי לאורך הנבט המעט קצר יותר שנצפה על פני התעתיק.

איור 8: יעילות שטיפת נבגי בוטריטיס מתת מבנים. יעילות השטיפה של נבגי בוטריטיס נמדדה על פני שני תעתיקים של עגבניה, האחד עשוי מ PDMS (עמודות שמאליות) והשני מ PDMS מאוקטב (עמודות ימניות). נבחנו יעילות השטיפה של הנבגים מהשערות בלבד (עמודות כתומות) ומכל שאר המשטח ללא השערות (עמודות כחולות). מצאנו כי יעילות השטיפה מהשערות על פני התעתיק העשוי מ PDMS גבוהה פי 2 מיעילות השטיפה של כל אחת מהאופציות האחרות.

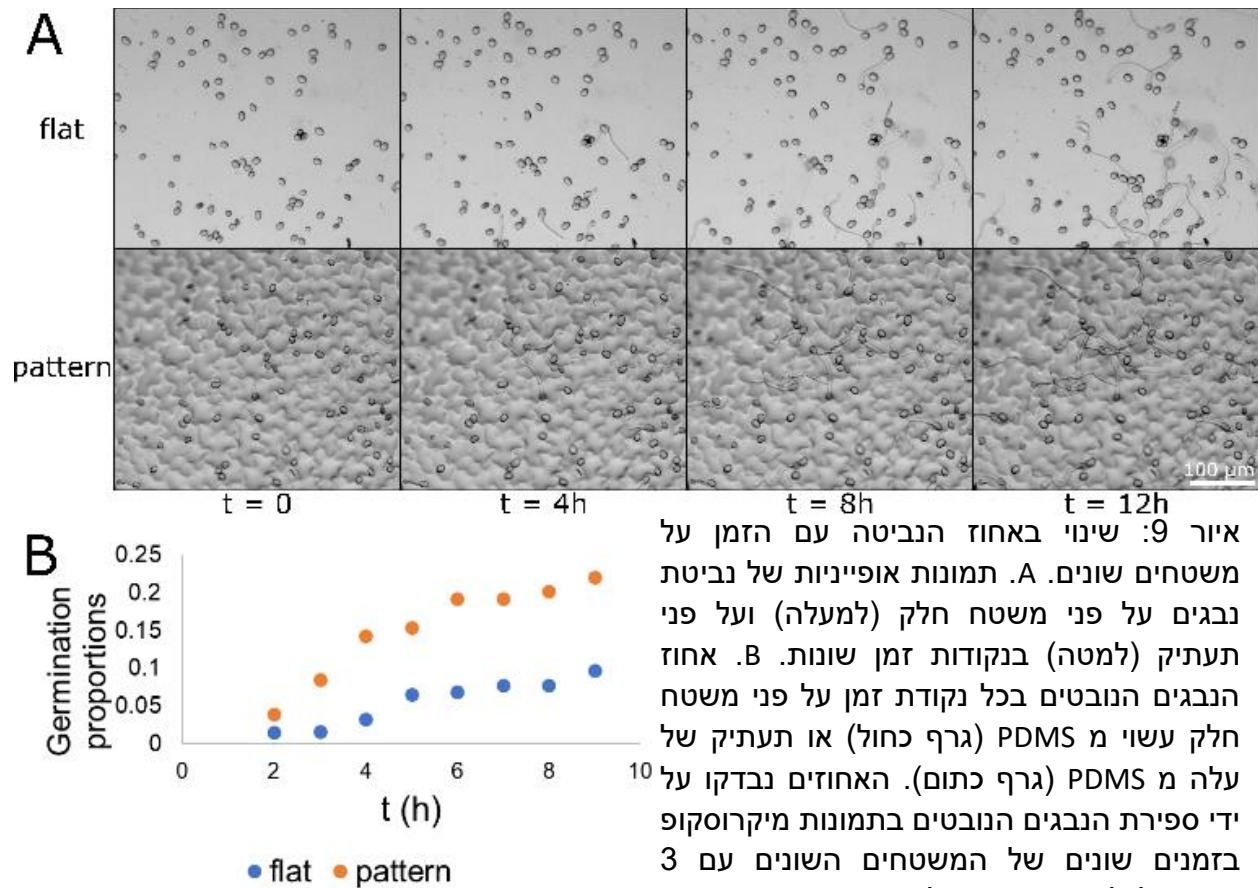


משימת המחקר הבאה הייתה בחינת מיקרו מבנה העלה תחת תנאים שונים ספציפית תנאי הזנת חנקן שונים. לבדיקת טיפולי חנקן שונים, נלקחו צמחי M82 בני שבועיים וטופלו ב-5 רמות שונות של חנקן: 0 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm ו-200 ppm. כאשר השינוי בכמות החנקן נבע גם משינוי בניטראט וגם משינוי באמוניום (ניטראט בכמות של פי 4 מהאמוניום). הטיפול בוצע על ידי השקייה בתמיסת החנקן כל

יומיים/שלושה למשך חודש לפחות. לכל טיפול נעשו 5 חזרות. כל שאר הנוטריאנטים היו זהים לכל הצמחים. תמונה מייצגת של צמח לאחר טיפול ב 0 ppm חנקן לעומת צמח לאחר טיפול ב 200 ppm חנקן ניתן לראות באיור 10A. הצמחים אשר קיבלו יותר חנקן היו גדולים וירוקים יותר. לאחר הטיפול, נדגמו עלים מכל צמח כאשר מכל צמח נלקח אותו העלעל. העלעלים נלקחו לצפייה במיקרוסקופ. בנוסף, העלעל הנגדי נלקח גם לצורך הכנת תעתיק אשר נצפה גם הוא במיקרוסקופ. תמונה המדגימה את פני השטח של התעתיק, כפי שנראו במיקרוסקופ, ניתן לראות באיור 10B. לאחר מכן, נספרו הפיוניות והטריכומות באותו השטח בעלעלים (ובתעתיקים) בכל הטיפולים, זאת מכיוון שישנם מקורות סיפורתיים הגורסים כי פרמטרים אלו משתנים עם השינוי ברמות החנקן [19]. בנוסף, נמדדו שטח תא אפידרמיס, גודל פיונית ואורך הטריכומות. הפרמטרים נבדקו תחילה בהזנה החנקתית הנמוכה ביותר (0) ובגבוהה ביותר (200) על מנת לבדוק האם נצפים שינויים שם. מכיוון שהשינויים שניצפו היו קלים, לא נבדקו שאר הטיפולים. נמצא כי גודל הפיוניות, שטח התאים ומספר הטריכומות לא השתנו באופן סיגניפיקנטי כתוצאה מטיפול החנקן. הפרמטרים היחידים בהם ראינו שינוי סיגניפיקנטי לפי student's t-test היו מספר הפיוניות הממוצע ליחידת שטח אשר גדל מ 25 ל 26 ליחידת שטח עם טיפולי החנקן כמו גם אורך השערות אשר התקצר עם הגדלת כמות ההזנה החנקתית. את שתי התופעות ראינו גם בעלים וגם בתעתיקים, אך יש לציין כי בתעתיקים אורך השערות היה מראש קצר יותר וזאת עקב העובדה שקיימת תופעה של שבירת שערות בעת הכנת התעתיק. גם השונות באורך השערות היתה גבוהה יותר בתעתיקים מכיוון שלא כל השערות נשברו. את הגרפים המתארים את השינויים הללו ניתן לראות באיור 10C.

רצינו לעבוד גם עם הפתוגן הנוסף שלנו – קסנטומונס. בשלב הראשון רצינו לבדוק כיצד הזנה חנקנית משנה את הרגישות של הצמח לחיידק. על מנת לבדוק זאת, ביצענו הדבקה של עלי העגבניה בקסנטומונס. היה חשוב לנו לבצע את ההדבקה ללא פגיעה של העלה או בהזרקה וזאת מכיוון שרצינו שהחיידקים יחדרו דרך פני השטח הטבעיים, מכיוון שזהו הדבר הנבדק במחקר זה – כיצד מבנה פני השטח משפיע על האינטראקציה של הצמח עם הפתוגן. מכיוון שכך, חיטאנו את העלים באקונומיקה (טבלנו את העלים בתמיסה של 0.7% סודיום היפוכלוריט למשך 15 דקות ואז ביצענו שתי טבילות של 10 דקות כל אחת במים מעוקרים פעמיים) ואז טבלנו אותם בתמיסת חיידקים בריכוז של 10^6 עם מגנזיום כלוריד. כל עלה נטבל למספר שניות. את העלים הנחנו לאחר ההדבקה על צלחת עם פילטר סטרילי ספוג במים לשמירה על הלחות. הצלחות נשמרו במשך שלושה ימים בטמ' של 27°C . לאחר שלושה ימים העלים נכתשו בעזרת מכתש עלים למשך 4 דקות ב 1200 rpm . בשלב זה תוצרי הכתישה נמהלו בעזרת מגנזיום כלוריד והועברו לצלחות נוטריאנטים לצורך זריעת בידוד על מנת שנמדוד כמה חיידקים התפתחו בזמן זה דבר אשר ייתן לנו אינדיקציה לגבי כמה חיידקים הצליחו לחדור אל תוך הצמח. יש לציין שבצורה זו אנו מודדים את כל החיידקים - אלה שחדרו לצמח ואלה שנשארו על פני השטח. אך שוב, מכיוון שמעניינת אותנו האינטראקציה עם פני השטח בלבד, תוצאות אלה מספקות לנו הצצה ראשונית להשפעת פני השטח על

פעילות החיידקים. התקשינו מאד להגיע בניסוי זה לחזרתיות של התוצאות מבחינה מספרית. על מנת לייצב את הפרוטוקול ניסינו תקופות שונות של הזנה חנקנית כך שההדבקה נעשתה לאחר זמנים שונים של הזנה חנקנית. בנוסף, ברור שיש גורמים רבים נוספים שמשפיעים על רגישות הצמח והחדירה העדינה שביצענו לחיידק, הפכה את ניסוי ההדבקה לפחות מדויק. יחד עם זאת, באופן קונסיסטנטי, צמחו פחות מושבות בהזנה הגבוהה בחנקן (200 ppm) מאשר בהזנה הנמוכה (0 ppm). היו אף מקרים בהם לא הצלחנו לגדל חיידקים מכתישת העלים שהיו שייכים לצמחים שהוזנו ב 200 ppm כאשר מהעלים שנכתשו מהצמחים שהוזנו ב 0 ppm התקבל גידול חיידקים. באיור 11 ניתן לראות צלחת מושבות שנזרעו מכתישת עלה שהוזן ב 0 ppm וכזו שנזרעה מכתישת עלה שהוזן ב 200 ppm. נראה כי מספר המושבות בשתי הצלחות דומה אך הצלחת שהוכנה מהעלים שהוזנו ב 200 ppm עברה מיהול אחד פחות כך שאם הרגישות הייתה דומה היינו אמורים לקבל בצלחת זו סדר גודל אחד יותר של מושבות.



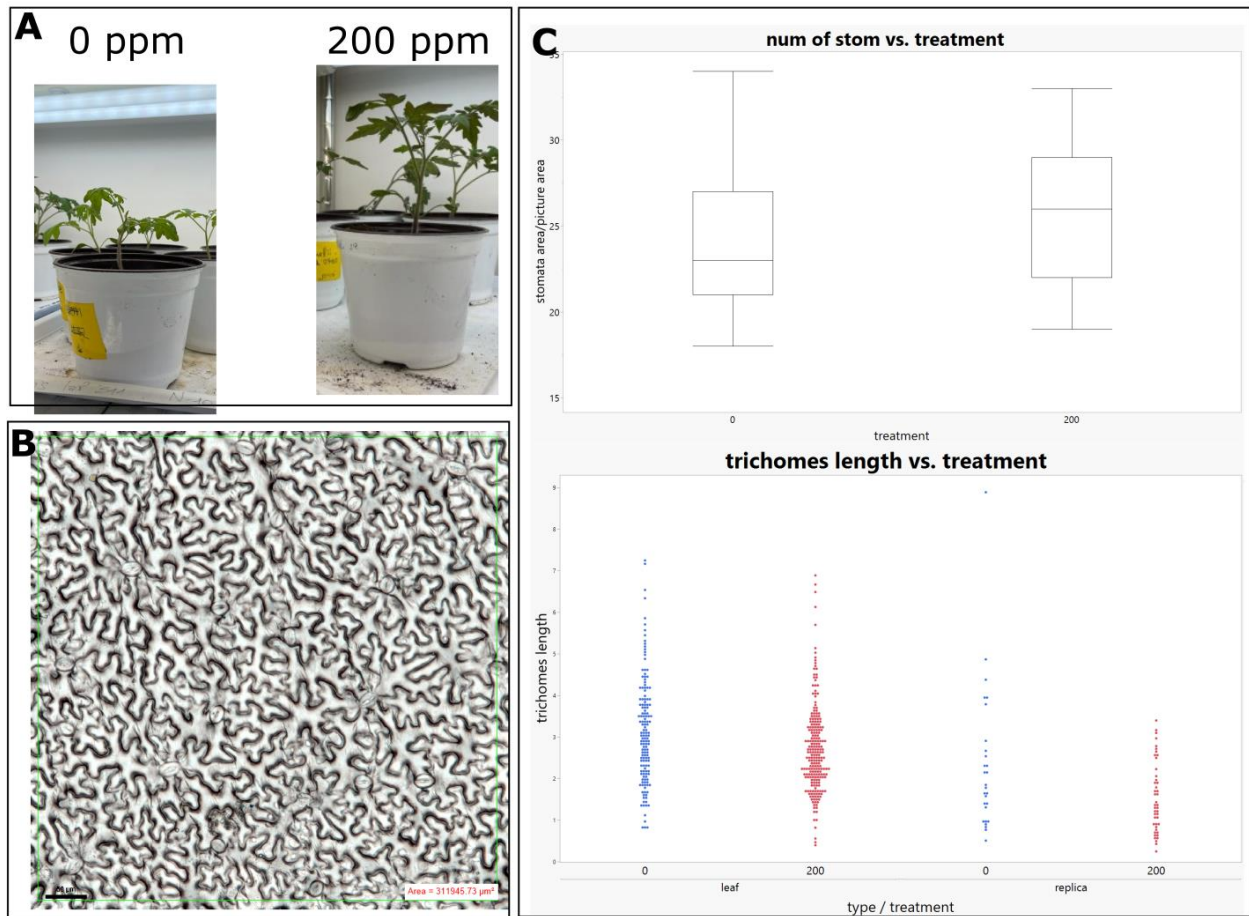
איור 9: שינוי באחוז הנביטה עם הזמן על משטחים שונים. A. תמונות אופייניות של נביטת נבגים על פני משטח חלק (למעלה) ועל פני תעתיק (למטה) בנקודות זמן שונות. B. אחוז הנבגים הנובטים בכל נקודת זמן על פני משטח חלק עשוי מ PDMS (גרף כחול) או תעתיק של עלה מ PDMS (גרף כתום). האחוזים נבדקו על ידי ספירת הנבגים הנובטים בתמונות מיקרוסקופ בזמנים שונים של המשטחים השונים עם 3 חזרות לכל משטח. ניתן לראות כי אחוז הנביטה בכל הזמנים גבוה יותר במשטח התעתיק באופן סיגניפיקנטי (בנקודת הזמן הראשונה $p=0.1147$, בכל שאר נקודות הזמן, $p<0.0025$).

על מנת להצליח לצפות בקסנטומונס על פני העלה והתעתיק, היינו צריכים לסמן אותו פלורסנטית (דבר אשר הוא מאתגר הרבה יותר עם הבוטריטיס אך בהחלט אפשרי עם קסנטומונס). פיזרנו 10 מיקרוליטר של תמיסת חיידקים בריכוז של 10^6 חיידקים למ"ל גם על פני העלה וגם על פני התעתיק. הטיפה יובשה

למשך זמן רב (כשעתיים) מהתעתיק ולזמן קצר יותר (כרבע שעה) מהעלה שכן העלה עדין יותר ומתייבש בקלות. לאחר מכן בוצעה טבילה עדינה במים על מנת להוריד קישור לא ספציפי ושוב יובשו התעתיק למשך כחצי שעה והעלה למשך כ-10 דקות. בשלב הזה, המשטחים נלקחו לצפיה במיקרוסקופ הקונפוקלי. ראינו כי פיזור החיידקים דומה בין העלה לתעתיק וכי יש העדפה לאיזורים הבין-תאיים ולטריכומות. עקב ההעדפה לטריכומות אשר הקשתה על הצפיה, צילמנו במיקרוסקופ הקונפוקלי בשני מישורים – מישור אחד בו ניתן לראות את פני השטח ללא השערות (תמונה לדוגמא ניתן לראות באיור 12A משמאל) ומישור שני בו נראות השערות בלבד (תמונה לדוגמא ניתן לראות באיור 12A מימין). כימתנו גם את כמות החיידקים ליחידת שטח גם במשטח ללא הטריכומות וגם בטריכומות בלבד ומצאנו העדפה קלה של החיידקים להיות על הטריכומות (איור 12B).

12h		8h		4h		זמן
תעתיק	חלק	תעתיק	חלק	תעתיק	חלק	
105.24	116.11	81.73	82.47	30.57	31.00	ממוצע
46.3	58.46	34.88	42.81	17.38	21.45	סטית תקן

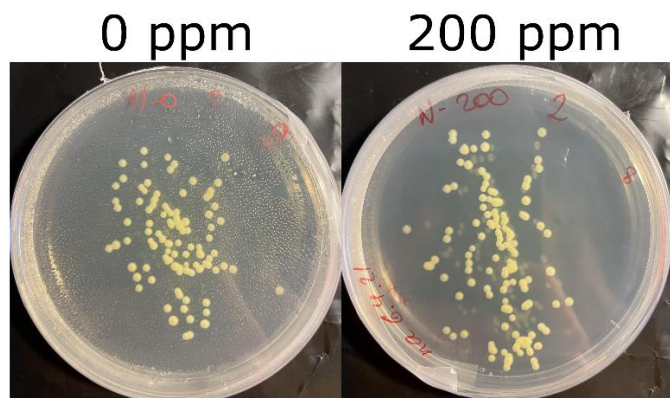
טבלה 2: שינוי באורך הנבט עם הזמן על משטחים שונים. ממוצע וסטית תקן של אורכי הנבט על פני משטח חלק או תעתיק עגבניה בזמנים של 4, 8 ו-12 שעות. נראה כי אורך הנבט הממוצע על פני התעתיק קצר מעט מזה של המשטח החלק אך השונות גדולה מכדי לקבוע בוודאות.



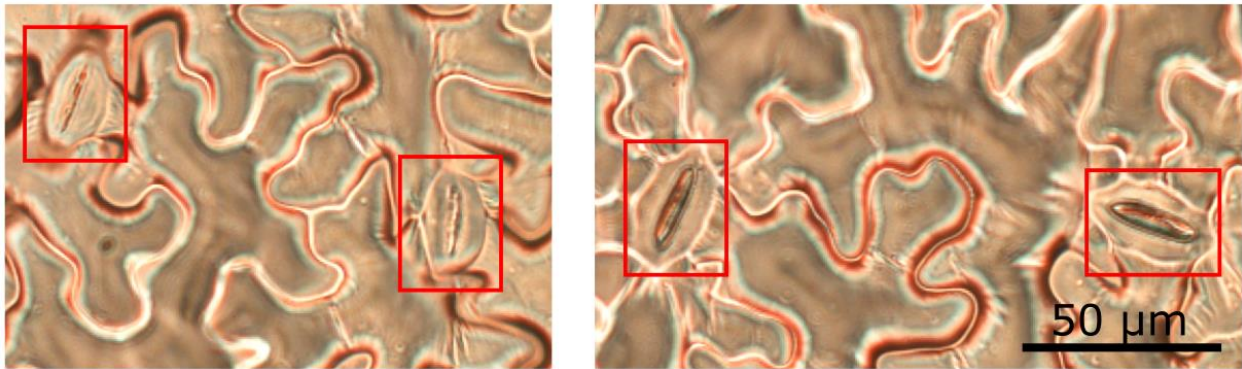
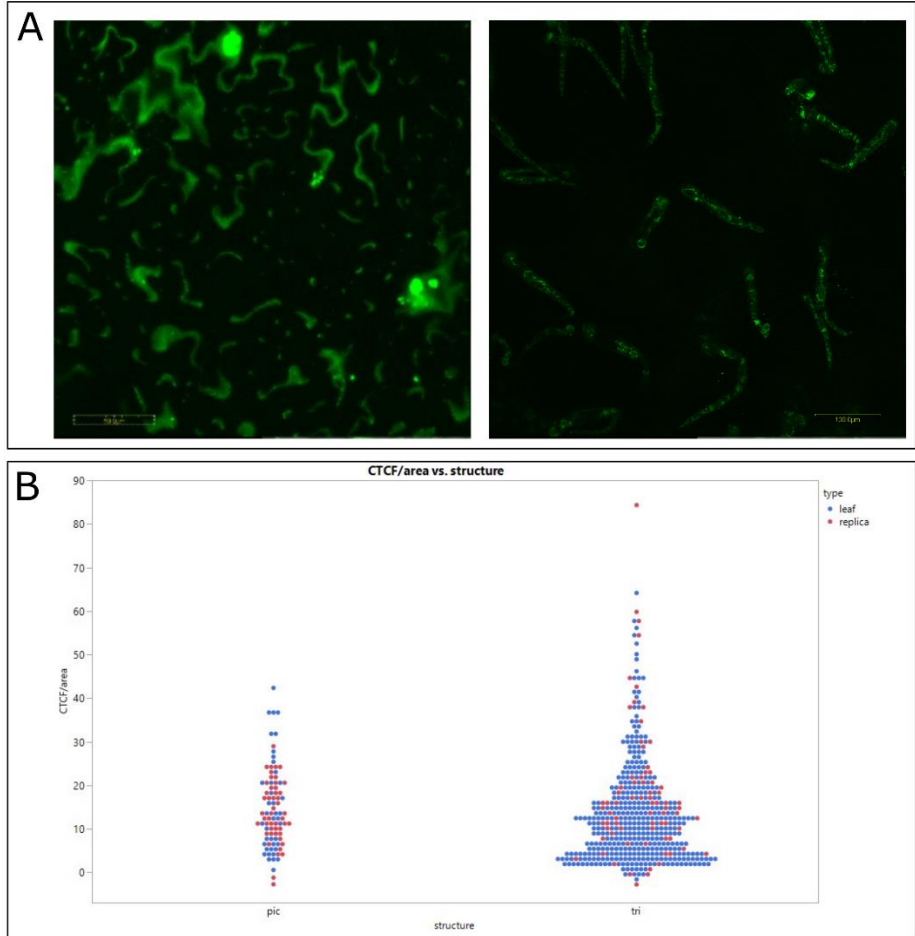
איור 10: שינוי במיקרו מבנה בהזנה חנקנית. צמחי M82 בני שבועיים קיבלו הזנת חנקן בריכוזים משתנים – 0 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm, 200 ppm למשך חודש לפחות. ההבדל במראה הצמח בין ההזנה ללא חנקן לבין זו עם הכמות הגבוהה ביותר מוצגת ב A. הצמח אשר קיבל יותר חנקן הוא גדול וירוק יותר. בסיום התהליך נדגם מכל צמח העלעל הרביעי מהעלה השלישי לצפייה במיקרוסקופ והעלעל המקביל לו נלקח לצורך יצירת תעתיק שגם הוא נצפה במיקרוסקופ. תמונה אופיינית של פני השטח של התעתיק כפי שנראתה במיקרוסקופ מוצגת ב B. הטריכומות והפיוניות נספרו בכל דוגמא ובנוסף נמדדו, שטח תאי האפידרמיס, שטח הפיוניות ואורך השערות. ההבדלים הסיגניפיקנטיים היחידים נמצאו בצפיפות הפיוניות ובאורך השערות. הגרפים הרלוונטיים מוצגים ב C.

שינוי מבני נוסף אשר היה רלוונטי עבורינו הוא השינוי במהלך היום בפתיחת וסגירת הפיוניות. על מנת לוודא שיש ביכולתנו לראות את השינוי ולחקות אותו, לקחנו שני עלעלים משני צמחים שונים (העלעל הרביעי מהעלה השלישי) בשתי שעות שונות של היום: 12 בצהריים ו 18:30 בערב. כל עלה הכנסנו מייד לאחר הקטיפה ל 50% אתנול ולאחר מכן, צפינו בו בבינקולר. בכל עלה ספרנו ב 4 אזורים את מספר הפיוניות הפתוחות ומספר הפיוניות הסגורות. לאחר הצפייה בבינקולר נלקח העלה לצורך ביצוע רפליקה. מטרתנו הייתה לראות הבדל מבני (ידוע) לאורך היום, כדי לוודא שיש ביכולתנו לצפות במצב הפתיחה/סגירה של הפיוניות גם לאחר ניתוק העלה. בנוסף, רצינו להראות את יכולתנו לחקות מבנה של פיונית סגורה ופיונית פתוחה גם כן. ספרנו כ 90 פיוניות עבור כל אחד מהתנאים (צהריים וערב) ומצאנו כי אחוז הפיוניות הסגורות בצהריים היה 63.5% ואילו אחוז הפיוניות הסגורות בערב היה 45%. כך שאנו בהחלט יכולים לראות הבדל בין שעות היום. הדבר חשוב מכיוון שהעלים נבדקו לאחר שנקטפו מן הצמח ולא הייתה לנו כל ודאות כי נצליח לשמר את הפיוניות במצבן הטבעי. עשינו זאת על ידי הכנסת העלים ל 50% אתנול מייד לאחר קטיפתם. בנוסף, יש ביכולתנו להכין רפליקה מאותו העלה בו צפינו לאחר השהיה ב 50% אתנול, דבר אשר לא היה ברור מראש. באיור 13 ניתן לראות שתי רפליקות: האחת של עלה שנלקח בערב ובו שתי פיוניות פתוחות והשנייה של עלה שנלקח בצהריים ובו שתי פיוניות סגורות. תמונות אלה מוכיחות את יכולתנו לא רק לצפות בשינויים לאורך היום אלא גם לשחזר אותם במערכת הסינתטית. במערכת שלנו, מצאנו כי הפיוניות כנראה לא משחקות תפקיד מבני באינטראקציה בין פני השטח לשני הפתוגנים שבדקנו אבל יחד עם זאת, בהחלט יתכן כי הן ישחקו תפקיד במערכות אחרות ולכן היה חשוב שנוכיח את יכולתנו להעתיק את הפיוניות למערכת שלנו בשתי תצורתן העיקריות – פתוחות וסגורות.

איור 11: שינוי ברגישות לקסנטומונס בהזנה חנקנית. זריעות בידוד של חיידקים שבודדו מעלים שהודבקו לאחר טיפול בהזנה ללא חנקן (שמאל) או בתוספת של 200 ppm של חנקן (ימין). מספר המושבות בשתי הצלחות נראה דומה אך המיהול של החיידקים בצלחת הימנית קטן בסדר גודל מזה של החיידקים בצלחת השמאלית כך שהצמחים שטופלו עם 200 ppm חנקן נראים רגישים פחות להדבקה בקסנטומונס בתנאים אלו.



איור 12: פיזור קסנטומונס על פני עלה ותעתיק. קסנטומונס המבטא GFP פוזר על פני עלה עגבנייה ותעתיק וצולם במיקרוסקופ קונפוקלי (A). הצילום נעשה בשני משטחים – ללא שערות (שמאל) ושערות בלבד (ימין). נצפתה העדפה לאיזורים הבין תאיים ולטריכומות. B. כימות ההעדפה לטריכומות: כמות פלורוסנציה ליחידת שטח גם בעלה (נקודות כחולות) וגם ברפליקה (נקודות אדומות) על כל המשטח ללא הטריכומות (pic – שמאל) ועל הטריכומות בלבד (tri – ימין).



איור 13: תעתיק של פיוניות פתוחות וסגורות: צילום במיקרוסקופ אור של תעתיק של עלה אשר נקטף בצהרי היום (שמאל) ועלה שנקטף בשעות הערב (ימין). בשני העלים רואים בבירור שתי פיוניות (מסומנות במלבנים אדומים) כאשר בתעתיק העלה שנלקח בשעות הצהרים שתי הפיוניות סגורות ואילו בתעתיק של העלה שנלקח בשעות הערב הן פתוחות.

דין

במחקר זה פיתחנו שיטה ליצירת תעתיק של מבנה עלה עגבנייה לחיקוי מיקרו המבנה של העלה והראנו יכולת לשחזר את אותו המבנה מספר בלתי מוגבל של פעמים. שיטה זו הייתה ידועה בספרות זה מכבר ושימשה בעיקר לצורך חיקוי מיקרו המבנה של העלה לצורך חיקוי תכונות פיסיקליות כגון הידרופוביות [6].

במחקר זה הוכחנו כי ניתן, בעזרת שיטה זו, לחזור על אותו מיקרו מבנה של עלה פעם אחר פעם ובכך לשחזר את אותם התנאים שוב ושוב. דבר זה לא הוכח בספרות בעבר. עבור השימוש הרלוונטי מבחינתנו – חקר השפעת המבנה על האינטראקציה של הצמח עם סביבתו – אבחנו זו הינה קריטית. בנוסף הראינו את יכולתנו לשחזר שינויים מבניים טבעיים הנגרמים כתוצאה מתזונה שונה או עקב שעות היום השונות. שינוי מבני כתוצאה מהזנה חנקנית שונה היה ידוע בספרות [19] אך מעולם לא נחקר בהקשר הזה של השפעתו על פתוגנים.

השתמשנו בפלטפורמה זו על מנת לבחון את השפעת מיקרו המבנה של פני השטח במקרה הספציפי של עלה עגבנייה ושני פתוגנים ידועים שלה. השתמשנו בפלטפורמה על מנת לבדוק כיצד מבנה פני השטח של עלה העגבנייה משפיע על פיזור שני הפתוגנים ועל אחוז הנביטה של הבוטריטיס. מצאנו כי יש בהחלט השפעה של המבנה על פיזור שני הפתוגנים והתנהגות הנבגים. ראינו בשני הפתוגנים העדפה להימצאות באזור הבין-תאי – תוצאה שנראתה בעבר על ידי שימוש במשטחים סינתטיים עבור החיידק *e.coli* [11]. בנוסף, עבור הבוטריטיס, מצאנו כי פיזורו על פני השטח מושפע בהחלט מהמבנה שכן התפלגות הפיזור על פני השטח שונה בין משטח חלק לבין תעתיק המחקקה את פני השטח של העגבנייה. דבר נוסף שראינו בנבגי הבוטריטיס הוא כי אחוז הנביטה תלוי במבנה המשטח. אחוז נביטה גבוה יותר נצפה במשטח בעל מבנה מאשר במשטח חלק כאשר שני המשטחים היו זהים לחלוטין בכל פרמטר אחר שכן הם היו עשויים מאותו החומר בדיוק. אומנם יכולת חישה כזו של מבנה משטח נצפתה בעבר בפטריות אחרות [20] אך לא בבוטריטיס.

מעבר לכך מצאנו תלות מבנית ביכולת ההיצמדות של הנבגים לפני השטח ולמעשה מצאנו כי השטיפה של הנבגים מפני השטח היא היעילה ביותר מהמבנים המחקקים שערות אך רק כאשר אלה היו עשויים מחומר הידרופובי. איננו מבינים את המנגנון הגורם לשטיפה קלה יותר זו, אך ללא ספק יש כאן השפעה מבנית, אם כי ראינו גם, בעזרת המערכת שלנו, כי השפעה זו אינה מבנית בלבד ויש פקטורים אחרים שמשפיעים על השטיפה. ראינו זאת מכיוון שבמשטח ההידרופילי אותה התופעה של שטיפת הנבגים מהשערות לא חזרה על עצמה. תופעה זו שהתגלתה כאן לראשונה יכולה להוות בסיס ליצירת משטחים דוחי נבגים או משטחים מהם נבגים נשטפים בקלות, בדומה למשטחים דומים אשר כבר קיימים עבור שטיפה קלה או דחייה של חיידקים [21]–[23].

גם בחיידק הקסנטומונס שבדקנו מצאנו כי יש העדפה מבנית להימצאות באיזורים הבין תאיים ובטריכומות. העדפה שחזרה על עצמה בתעתיק הסינתטי ובכך הוכיחה עצמה כהעדפה מבנית. מעניין לציין שהעדפה זו לא השתנתה כאשר העלה נלקח מצמחים אשר גודלו תחת תנאי הזנה חנקתית שונים, דבר אשר מחזק עוד יותר את ההעדפה המבנית. כאשר הצמחים גודלו בתנאי הזנה חנקתית שונים מצאנו גם כי יש שינוי ברגישות הצמח לחיידק, כפי שידוע כי קורה עם פתוגנים של צמחים לעיתים קרובות [24].

בנוסף לכך, מצאנו כתוצאה מההזנה החנקתית שינויים מבניים קלים בפני השטח של העלה, בעיקר קיצור של הטריכומות עם העליה בכמות החנקן. מעניין לחשוב כי יתכן ודווקא קיצור זה של הטריכומות מביא איתו היצמדות פחותה של החיידקים אל פני השטח של העלה עקב ההעדפה שלהם להיצמדות לטריכומות וזו בתורה מביאה פגיעה קטנה יותר מהחיידק כאשר כניסתו תלויה בשטח הפנים בלבד ונעשית ללא פגיעה או חדירה ישירות למערכת הוסקולרית. סביר מאד כי מנגנון הפגיעה של החיידק מסובך יותר ממה שהוצע כאן אך בהחלט יתכן כי גם האלמנט המבני, אשר מעולם לא נבדק בהקשר זה, משחק כאן תפקיד והמערכת שלנו היא המערכת המושלמת לבחון זאת דרכה.

בשתי המערכות שבדקנו (החיידק והפטרייה) מצאנו כי הטריכומות הן בעלות תפקיד קריטי באינטראקציה בין פני השטח לפתוגן מתוך האלמנט המבני שלהן. אם ביכולת השטיפה הגבוהה יותר של נבגי בוטריטיס ואם בהעדפה של חיידקי קסנטומונס וכתוצאה מכך, אולי, תיווך עמידות קלה. דווקא הפיוניות לא נמצאו כבעלות משמעות מבנית באינטראקציות אלו, אך אנו לא פוסלים הימצאות משמעות מבנית לפיוניות במערכות עתידיות. אי לכך חשוב היה לנו לוודא כי יש ביכולתנו לשעתק את הפיוניות למערכת הסינתטית שלנו בשני המצבים העיקריים שלהם – פתוחות וסגורות וכך עשינו. יתכן כי בהמשך ננסה להפוך את המערכת הסינתטית עצמה לדינמית ונבנה פתיחה וסגירה דינמית של "פיוניות" בתוך המערכת הסינתטית עצמה.

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 הפתוגן 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 בכוונתנו להמשיך ולבצע בעתיד.

- [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, no. 15, pp. 12467–12478, 2014.
- [12] א. טוקר, "מדריך מצולם לפגעים בעגבניה בישראל, 2003 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] J. B. Jones, G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad, "Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 27, no. 6, pp. 755–762, 2004.
- [15] F. J. Louws *et al.*, "Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato Using a Plant Activator," *Am. Phytopathol. Soc.*, vol. 85, no. 26, pp. 481–488, 2017.
- [16] P. A. Abbasi, N. Soltani, D. A. Cuppels, and G. Lazarovits, "Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate," *Plant Dis.*, vol. 86, no. 11, pp. 1232–1236, 2002.
- [17] H. Bouzar *et al.*, "Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries," *Phytopathology*, vol. 89, no. 4, pp. 328–335, 1999.
- [18] Y. Y. Liao *et al.*, "Advanced Copper Composites Against Copper-Tolerant Xanthomonas perforans and Tomato Bacterial Spot," *Am. Phytopathol. Soc. Soc.*, no. 2013, pp. 196–205, 2018.
- [19] L. Qinglin, M. Hanping, D. Xiaoya, Z. Jing, and Z. Zhiyu, "The effects of nitrogen on micro - structure of tomato leaf," in *Montreal, Quebec Canada July 13--July 16, 2014*, 2014, p. 1.
- [20] M. C. Almeida and A. C. Brand, "Thigmo Responses: The Fungal Sense of Touch," *Microbiol. Spectr.*, vol. 5, no. 2, 2017.
- [21] N. P. Gule, N. M. Begum, and B. Klumperman, "Advances in biofouling mitigation: A review," *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 6, pp. 535–555, 2016.
- [22] K. K. Chung, J. F. Schumacher, E. M. Sampson, R. A. Burne, P. J. Antonelli, and A. B. Brennan, "Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*," *Biointerphases*, vol. 2, no. 2, pp. 89–94, 2007.
- [23] A. Bhattacharjee, M. Khan, M. Kleiman, and A. I. Hochbaum, "Effects of Growth Surface

- Topography on Bacterial Signaling in Coculture Biofilms,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 22, pp. 18531–18539, 2017.
- [24] D. Huber and R. Watson, “Nitrogen form and plant disease,” *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 12, no. 1, pp. 139–165, 1974.