

ישיבה תיכונית חספין

חספין, רמת הגולן

12920

**קביעת המצב התזונתי של פטריות שק מסדרת Pezizales על ידי סקר אקולוגי
וגונומי של הפטריה והסביבה בה היא נמצאת**

(השיטה האופטימלית להפקת DNA של פטריות שק מסדרת Pezizales)

תחום הדעת: ביולוגיה

מגיש: אבנר בר-יוסף

מקום מגורים: הושעיה

תעודת זהות: 325836666

טלפון התלמיד: 057311951

כתובת דוא"ל תלמיד: avnerby12@gmail.com

הנחיה:

עזרא אורלובסקי, PhD

מקום עבודה: מכון מיגל, קריית שמונה

דניאל מובשוביץ, MSc.

מקום עבודה: גליליון

תוכן עניינים

3	1. תקציר
4	2. סקירת ספרות
4	2.1 צורות ההזנה של פטריות
6	2.2 אפיון צורת הזנתם של מינים שונים בסדרת Pezizales
7	2.3 מיני פטריות הפזיזלס בארץ ישראל- תפוצתם וצורת הזנתם המשוערת
8	2.4 דרכי ההזנה של פטריה מניתוח הרקמות שלה וגורמי הסביבה שלה
9	2.5 זיהוי בין מינים של אורגניזמים בעזרת שיטות מולקולריות
12	3. שיטות וחומרים
12	3.1 המסה ראשונית של הדגימות ע"י בופר
12	3.2 בידוד DNA ראשוני ואיתור DNA
14	3.3 ניקוי הדגימות ואיתור DNA בעזרת ג'ל זרמים חשמליים
15	3.4 המסה של הדגימות ע"י בופר CTAB או של ערכת Zymo להפקת DNA
17	3.5 המסה של הדגימות ע"י בופר CTAB או של ערכת Zymo להפקת DNA
21	4. תוצאות
21	4.1 הפקת דנ"א בעזרת בידיים בתמיסות בופר הפקה שונות
22	4.2 הרצת הדוגמאות בג'ל אגרז
22	4.3 השוואת פרמטרים שונים והשוואתם לקבלת תוצאה יותר איכותית
23	4.4 הרצת תוצרי PCR של ההפקות השונות בג'ל אגרז
25	5. דיון ומסקנות
29	6. רשימת מקורות

1. תקציר

מיקוריזה הינה דרך הזנה בה הפטרייה בסימביוזה עם אורגניזם צומח וכתשעים אחוז מהפטריות משתמשות במיקוריזה. בתהליך הפטרייה מחוברות אל שורשים של צמחי קרקע ואף גדלה לתוך קליפת הצמח, בעודה יוצרת קורים מסועפים. במהלך קשר זה, הפטרייה סופגת מהצמח הפונדקאי פחמן, בעוד הצמח סופג מינרלים (כמו חנקן ובעיקר זרחן) ומים שהפטרייה יודעת "לחצוב" מהקרקע. מלבד מיקוריזה, לפטרייה שיטת הזנה ע"י פרוק אורגניזמים מתים הנקראת ספרוב. בשנים האחרונות ישנם מאמצים לאפיון וזיהוי מינים של פטריות שונות בשיטות מולקולריות כלומר לאחר הפקת ה DNA שלהן. השיטות הקיימות הינן ארוכות ובמהלכם ישנו איבוד רב של ה-DNA. חוקרים מנסים כל הזמן למצוא שיטות יותר יעילות ומהירות להפקה טובה של דנ"א ממקורות אורגנים, כדי לאפשר המשך של עבודה מולקולרית רחבה עם מה שהופק.

מטרת המחקר שערכנו הייתה מציאת השיטה היעילה ביותר להפקת DNA מפטריות על מנת לזהות ולקבוע את שיטת ההזנה של פטריות מזן Pezizales.

במחקר שערכנו השתמשנו בקיטים מסחריים או בופרים שהכנו, להפקת DNA ובשיטות המשלבות שבירה כימית (המסה של דופן התא) ומכאניות (כדורי זכוכית בגדלים שונים ומכשיר שקשוק) של תאי הפטרייה. בשלב הבא בשיטות מולקולריות של הגברת מקטעי ה DNA במכשיר PCR להפקת ואפיון ה DNA של הפטריות.

במחקר מצאנו שכדי לקבל תוצאה טובה ואיכותית של DNA במכשיר PCR המאפשרת לאפיון את האורגניזם ואת הזן, צריך לבצע את כל שלבי הניקוי המשלב גם בופר וגם בידיים (כדורי זכוכית).

עבור כל הזנים שנבדקו, התוצאות הכי טובות התקבלו בשימוש בבופר lysis מסחרי ושימוש בבידיים (כדורי זכוכית זעירים) של חברת ZYMO RESEARCH מתוך ה DNA KIT ZYMOBIO MICS.

תוספת חיונית לפרוטוקול הייתה שלב ניקוי סופי של התוצר ב DNA miniprep kit.

לסיכום, במחקר שלנו יצרנו פרוטוקול חדש ויעיל להפקה איכותית של DNA מפטריות. פרוטוקול זה יכול לאפשר עבודה מולקולרית וביואינפורמטית נרחבת שתאפשר אפיון זנים ותתי זנים שונים בכל העולם. זיהוי זה יכול לאפשר התקדמות המחקר וההבנה של ההתאמה בין שיטות ההזנה לתתי הזנים ב פטריות שק מסדרת Pezizales.

2. סקירת ספרות

2.1 צורות ההזנה של פטריות

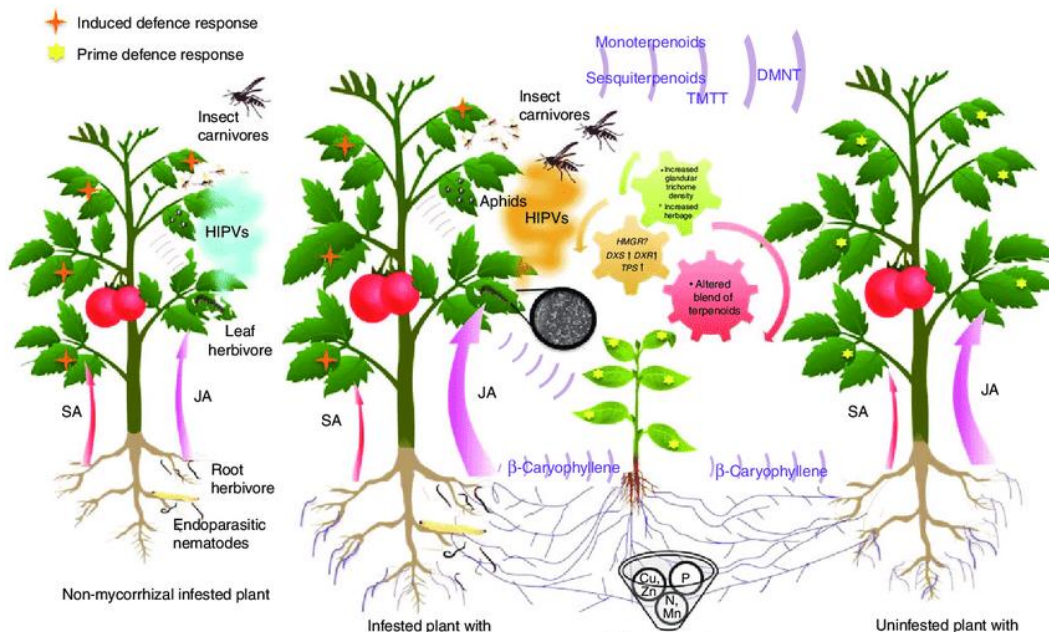
בפטריות בכלל ובסדרת הפזיזלס (Pezizales) בפרט, ישנם שני סוגים של דרך הזנה- ספרוב (Saprophyte) ומיקוריזה (Mycorrhiza).

פטריות ספרוביות ניזונות מפירוק וספיגה של החומרים הדרושים להן מאורגניזמים מתים כגון צמחים וחומרים אורגנים, הנמצאים בתהליך התפרקות (עלי שלכת לדוגמא) ואף של פגרים (Saprophyte, n.d). קיומם של פטריות אלו, עוזר לפרק חומרים אורגנים והוא חשוב, לדוגמא ביצירת קומפוסט משאריות של תצרוכת אורגנית. מיקוריזה לעומת זאת, הינה דרך הזנה בה הפטרייה בסימביוזה עם אורגניזם צומח.

בתהליך המיקוריזה, הפטריות מחוברות אל שורשים של צמחי קרקע בסימביוזה. הפטרייה גדלה לתוך קליפת הצמח, בעודה יוצרת קורים מסועפים. במהלך קשר זה, הפטרייה סופגת מהצמח הפונדקאי פחמימות, בעוד הצמח סופג מינרלים (בעיקר זרחן) ומים מתפטיר הפטרייה. הצמחים מסנתזים לעצמם קולטני זרחן כדי לקלוט את הזרחן מהפטרייה. כתוצאה מהאינטראקציה עם הצמח רואים שינויים מבניים (במבנה הציטופלסמה בעיקר), שינויים ברמות ציטוקינים המופרשים ושינויים בביטוי של גנים בפטריות הללו. (Walter, & Strack, Fester, Hause Schlieman, 2003)

יותר מתשעים אחוז מהפטריות משתמשות במיקוריזה. בדרך כלל פטרייה תשתמש רק בשיטת הזנה אחת, אבל ישנם מקרים של שילוב (Bahadur& Batool et al., 2019).

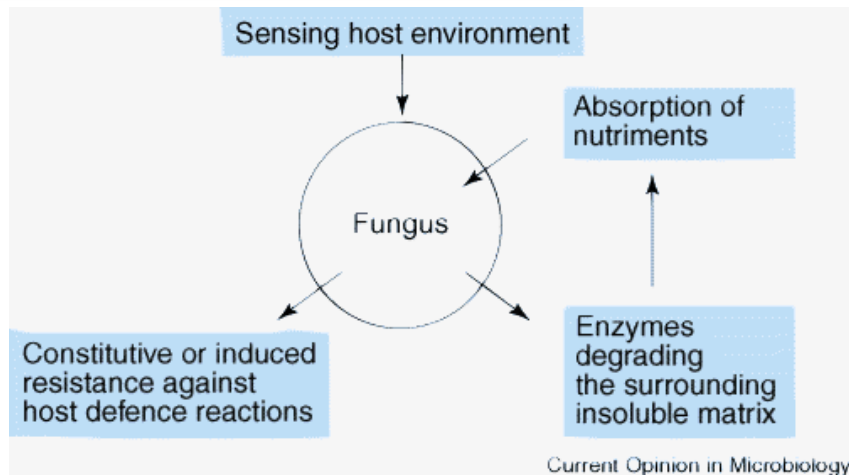
הסוג הנפוץ ביותר של מיקוריזה הינו *Arbuscular mycorrhizas* (AMs) פטריות הניזונות בצורה זו יקראו *Arbuscular mycorrhizal fungi* (AMF) פטריות אלו יוצרו סימביוזה עם 80% מצמחי היבשה הידועים לאדם. לתהליך זה השפעות עצומות על הצמחים מבחינת יכולות גדילה, ספיגת מים ומינרלים, והגנה מלחצים אביוטיים שונים (שינויי טמפרטורה, קרינה, לחות וכו'). במקרים רבים הסימביוזה עם הפטרייה בעצם "מצילה" את הצמח כאשר תנאי הסביבה הופכים לקשים, לדוגמא בתקופות של בצורת כשאין לצמח מספיק מים והזנה, הצמח סופג מינרלים (בעיקר זרחן) ומים, מתפטיר הפטרייה (Bahadur& Batool et al., 2019). יתרון נוסף שבא לידי ביטוי בסימביוזה עם הפטרייה הינו הגנה מחרקים, כפי שניתן לראות באיור 1



איור 1: תמונה המדגימה את ההגנה שפטוריות ביחסי מיקוריזה, יכולות לספק לצמח. משמאל, צמח ללא מיקוריזה חשוף להתקפות של חרקים ובעל תגובה הגנתית מוגבלת מחרקים. במרכז רואים שצמח יכול לגייס הגנה יותר טובה ואף לרכוש הגנה ממושכת מחרקים כמו שרואים מימין. (Kapoor & Sharma, Anand 2017)

עוד נמצא, שלאחר מגע ראשוני בין הפטרייה לצמח, רואים במיקוריזה שינויים גנטיים גם אצל הצמחים, לדוגמה שהצמח מתחיל לבטא ברמה יותר גבוהה הורמונים ממשפחת jasmonates וכך מצליח להגביר את רמת הסימביוזה ביניהם, מסמביוזה חלקית לסימביוזה מלאה. מכיוון שזהו תהליך שמאד טוב לשני הצדדים, הוא מאד נפוץ וכנראה עזר רבות להפצה של הצמחים והפטוריות בעולם (Hause et al., 2002).

שינויים אלו מאפשרים לתהליך המיקוריזה להיות יותר יעיל מבחינת הפטרייה והצמח, והיכולת שלהם לנצל את המשאבים הזמינים לסימביוזה. כמה מהתהליכים המתרחשים בדיאלוג הזה ידועים כמתווכים ע"י הורמונים של הצמחים. מחקרים הראו ששינויים בהורמונים של הצמחים מנעו את היווצרותה בשורשי שעורה. יש גם תפקיד לחומצה אסקורבית בהתכנות הסימביוזה הזו. בשורשים שהתרחשה בהם מיקוריזה מצאו רמות גבוהות של החומצה בעוד שהיא לא נמצאה בשורשים ללא מיקוריזה. התיווך בעקבות החישה מלפיכך מפעיל מנגנונים מגוונים כפי שינתן לראות באיור 2 (Tekaia, 2005) & (Latgé &).



איור 2: תרשים המתאר כיצד עובש חש את הסביבה וגיב ב"נביטה" תוך כדי הפרשת אנזימים. מתוך (Latgé. & Tekaia 2005)

אבל, לא כל הפטריות מועילות. ישנם פטריות ספרוביות כגון אספרגילוס שנמצאות בעיקר על צמחיה מתה, מחסני תבואה, וקומפוסט בצורה שאינה מזיקה. פטריות אלו עלולות להזיק לבני אדם אם יאכלו מזון הנגוע בהן, ביחוד בני אדם עם מערכת חיסון לקויה. (Paulusse, et al. 2017)

2.2 אפיון צורת הזנתם של מינים שונים בסדרת Pezizales

סדרת הפזיזלים היא סדרת פטריות שנמצאת בתוך תת-המערכת Pezizomycotina שבתוך המערכת Ascomycota אשר ידועות כפטריות הכיס, וכוללות בתוכה המון סוגים של פטריות. לפי מחקרים מסוימים, 1683 זנים המחולקים ל-16 משפחות רובן חיות באדמה, במגוון אינטראקציות של סימביוזה או של טפילות לצמחים. יש מגוון גדול של מבנים שבהם מופיעות הפטריות בסדרה זו, מבנים פתוחים וגם סגורים. הצורה הנופצה ביותר היא ascomatal, אך יש גם מינים סוגורים בצורה של truffles. (Kirk et al. 2008)

כעיקרון ישנו קשר בין מבנה הפטרייה לצורת ההזנה שלה. הפטריות במבנה הטובולרי (מבנה בצורה של צינור) יוצרים סימביוזה עם מגוון של צמחים. אבל התמונה יותר מורכבת, משום שבמבנה הזה ישנם מורפולוגיות שנראות מאד שונות, והשוני הזה יכול להתבטא בהבדלים מאד גדולים, בסוגי הסימביוזה שהם יוצרים והצמחים שאיתם הם יוצרים את הסימביוזה. צורת ההזנה יכולה להשתנות כתלות בסביבה ובמה היא עשירה או חסרה. מכיוון שהמינים מגוונים בבתי הגידול השונים, ישנו שוני מאד גדול בין האורגניזמים שהם ניזונים מהם (Ori, Hall, Gianchino, Iotti and Zambonelli, 2019). גורם נוסף שזוהה לאחרונה כמשפיע על אופי הסימביוזה וההזנה, הוא קיומם של טרנספורטרים מסוג ABC. מדובר בחלבונים שיכולים להגביר ולתווך את האינטראקציה בפטריות, להם יש השפעה על

היווצרות מיקוריזה. יותר מ-1300 גנים זוהו כמעורבים בביטוי שלהם ביצירת החלבונים של הטרנספורטרים האלו. ישנם הבדלים מאד גדולים בביטוי גנים אלו בתוך סדרה זו, הבדלים אלו יכולים להשפיע בצורה משמעותית על יצירת מיקוריזה, אפילו בין פרטים שונים במשפחה וגם בין משפחות (Kovalchuk et al. 2015).

לאורך ההיסטוריה, חוקרים נאבקו להבין את צורות ההזנה של הפטריות. בשל הניסיון להגדיר אותן, הגדרות הפטריות משתנות בבלי הפסקה עד היום וקשה להבין אם פטרייה היא צמח או משפחה משלה. לפעמים המראה מאד יכול להטעות, לפעמים הפטרייה משולבת בקליפת הצמח, ולפעמים יוצרת תפטירים שנכרכים סביב לאזור מסוים של השורש. ישנם גם צורות שחודרות לתא הצמח. לא תמיד ניתן להבחין בין הצורות השונות ולהבחין מתי יש סימביזה ומתי יש טפילות של הפטרייה. ישנם גם מחלוקות בין חוקרים האם בזני צמחים שונים, לדוגמא עצים שונים, מתרחשת סיביזה ואם כן מאיזה סוג. לדוגמא לפעמים הפטריות ממוקמות לא בשורשי העץ אלא בחלק אחר שלו. גם בעשבים מוצאים פטריות, אך לא ברור אילו יתרונות תזונתיים יש לכך כאשר אין חדירה שלהם לתאים (Ori, Hall, Gianchino, Iotti and Zambonelli, 2019).

סיבה נוספת לכך שישנה אי בהירות בקשר לצורת ההזנה של מספר זנים בתוך הסדרה, נובעת מהגדרות וקטלוג. זאת משום שמוסדות שונים מסביב לעולם (לרוב ההבדל נמצא בין מוסדות מסין ומוסדות מאירופה) משתמשים בצורות הגדרה שונות להגדרת ההזנה של מינים שונים. לדוגמא, המין "מורצ'לה" נחשב לפי חלק, כמין שניזון גם בצורת ספרוב וגם בסימביזה עם צמחים, ולפי חלק הוא מוגדר כספרוב בלבד. הבדלים אלו כנראה נובעים בעיקר מניתוח לא נכון של הגנטיקה של המינים (Ori, Hall, Gianchino, Iotti and Zambonelli, 2019).

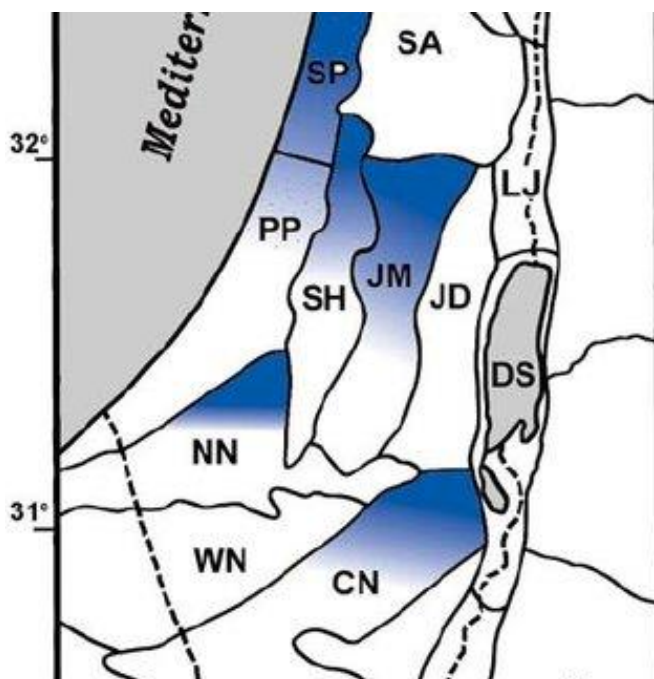
2.3 מיני פטריות הפזיזלס בארץ ישראל- תפוצתם וצורת הזנתם המשוערת

ישנם כ- 25 זנים משוערים מסדרת הפזיזלס בארץ ישראל והם:

P. alaskana, P. ammophila, P. badia, P. badiofusca, P. brunneoatra, P. cerea, P. cervina, P. echinospora, P. fimeti, P. fuliginea, P. howsei, P. lobulata, P. michelii, P. micropus, P. moseri, P. nivalis, P. proteana f. sparassoides, P. repanda, P. saniosa, P. sepiatra, P. succosa, P. succosella, P. tenacella, P. varia and P. vesiculosa. בנוסף, שני זנים: *P. lobulata* ו-*P. alaskana* שזוהו רק לאחרונה (Barseghyan & Solomon 2011).

בעוד שרובם גדלים בסביבות מיוערות, לדוגמא בקרקע של יערות, חלק מהמינים גדלים דווקא באזורים

מדבריים ודיונות או ליד נהרות ואגמים. חלקם אינם מסווגים דווקא לפי טופוגרפית הסביבה, אלא לפי מיקום הגידול הספציפי שלהם, כגון על עצים מתים, באזורים מוצלים או על צואה של בעלי חיים. בנוסף, אצל חלק מהפטיות נראה שלמצב האדמה שעליה גדלה הפטרייה יש חשיבות. חלקן זקוקות לאדמה שרופה, חלק לכזו העשירה במינרלים וחלק אפילו לאדמה חולית בתוך יער. יחד עם מיקום הגידול, מגיעה צורת ההזנה של הפטריות. נראה שרובן פועלות בצורה ספרובית שניזונה מהאדמה (מה שמסביר את הצורך בתנאי קרקע מותאמים), אבל חלקן הן קרבוטרופים (כלומר ניזונים בסביבה עשירה בפחמן) וחלקן אף ניזונות מספרוב- מעץ (פירוק תאים מתים של עצים בלבד). באיור מספר 3 ניתן לראות את תפוצת הזנים בישראל (Solomon & Barseghyan 2011).



איור 3: תפוצת זנים גנית של Peziza בישראל. האזורים הכחולים מייצגים ריכוז גבוה של פטריות Peziza. ניתן לראות שאזורים שונים הם בעלי נוכחות של זנים שונים (Solomon & Barseghyan, 2011).

2.4 דרכי ההזנה של פטריה מניתוח הרקמות שלה וגורמי הסביבה שלה

חלק משמעותי בחייו, או ליתר דיוק בהתפתחותו, של הצמח היא האדמה בו הוא גדל. בנוסף לעוד כמה גורמים, סוג האדמה מושפע/נקבע מכמות וסוגי המינרלים הנמצאים בו, בעיקר פחמן וחנקן. יותר ויותר מחקרים מראים שמינון הפחמן ו/או החנקן באדמה יכול להועיל או לפגוע בהתפתחותם של אורגניזמים

בעקבות דרך ההזנה שלהם. לדוגמא, מינון גבוה של חנקן אורגני יכול לתרום להתפתחותם של פטריות הניזונות מסימביוזה עם צמחים (מיקוריזה), כלומר שסביר שפטריות שנמצאו בסביבה מרובת חנקן אורגני יזונו במיקוריזה. בנוסף לכך, ניתן לראות כי לתפוצת חיידקים באזורים עשירים בפטריות, ישנה השפעה על ריכוז המינרלים באדמה. מכאן ניתן להסיק כי גם הימצאות חיידקים באדמה יכולה להשפיע על צורת ההזנה של הפטריות (לדוגמא בסביבה מסוימת בה יש חיידקים רבים אשר פולטים חנקן אורגני, יש סבירות גדולה יותר לגדילה של פטריות הניזונות ממיקוריזה מאשר מספרוב) (Lohberger et al., 2019).

בעוד שלא הכל מובן במערכת היחסים בין הפטרייה לצמח, חוקרים הראו הבדלים במטעים בין זנים שונים של עצים לבין שוני בפטריות בשורשים שלהם בהתאמה. בנוסף, בתהליך ההתבגרות של העץ ישנו לעיתים שינוי בהרכב הפטרייתי שבו (Dearnaley., 2007). יש הטוענים כי למינרלים השפעה כזו משום שפטריות בעלות דרך הזנה מסוימת מקבלות פחות מינרלים מסוימים, לכן הן גדלות בסביבה בעלת ריכוז גבוה של מינרלים אלו על מנת לאזן את החסר. חשוב לציין שריכוז המינרלים אינו קובע את צורת ההזנה של הפטרייה, אלא שפטריות שניזונות בדרך מסוימת יגדלו וישרדו יותר בזכות ריכוז המינרלים. בנוסף, הסברה המקובלת טוענת שיחסי האיזוטופים של פחמן (ואולי גם חנקן) בתוך הפטרייה יהיה מושפע מיחסי האיזוטופים במזון שלה. כך, יחס איזוטופים של ספרובים יהיה דומה ליחס בחומר אורגני מת, ובמיקוריזים היחס יהיה דומה ליחס בצמח חי (Roy, et al., 2009).

2.5. זיהוי בין מינים של אורגניזמים בעזרת שיטות מולקולריות

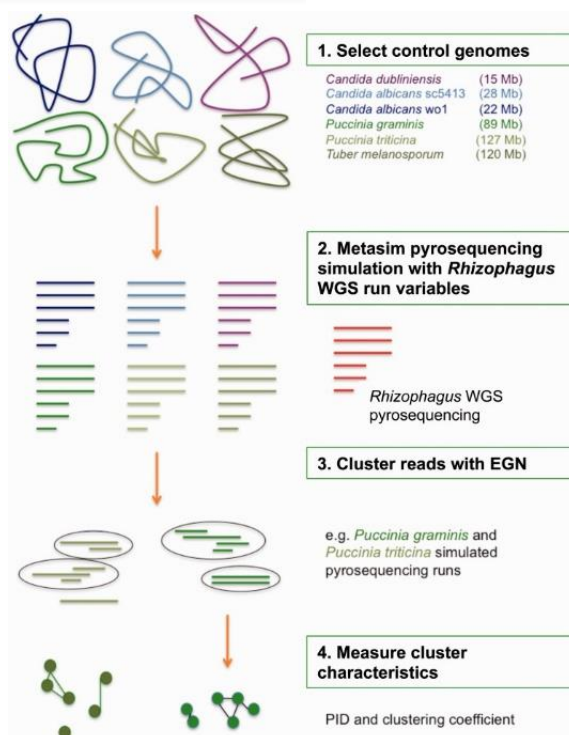
כאשר נתקלים במספר אורגניזמים שלא ניתן להבחין בניהם בעין, ישנן מספר שיטות לבבר כיצד הם שונים. אחת השיטות היא מולקולרית- בשיטה זאת, תחילה אוספים דגימות DNA מכל הדוגמאות המדוברות. לאחר מכן, מגבירים את הגנים האופייניים לאורגניזם המדובר על ידי "תגובת שרשרת פולימראז" (PCR). לבסוף, מרצפים אותם על ידי מכשיר ריצוף DNA. את התוצאות של הריצוף משווים לזנים שרצפי ה-DNA שלהם כבר ידועים, וכך מאבחנים לאיזה מין שייך הפרט שבדקנו. לפעמים מתגלה מין חדש שהתפתח ממוטציה אחת או מספר מוטציות שקרו במין מסוים (Karst, Albertsen, Nielsen 2016 & Kirkegaard, Dueholm). כדי להשתמש בשיטות מולקולריות, הדבר הראשון שצריך הוא להפיק DNA בצורה טובה ונקיה. אם הניקוי לא טוב אז השלבים הבאים של הסינתה כמו ראקציה ה-PCR לא יצליחו.

בשנים האחרונות קיימים מסחריים שאפשר לקנות לצורך הפקת ה DNA , אבל הפקות אלו הרבה יותר יקרות ובנוסף פעמים רבות מאבדים יותר חומר בתהליך, מה שמחמיר את הבעיה בעיקר אם יש כמות מוגבלת של חומר שממנו מפיקים (Sajali et al.,2018).

אחד מהקשיים בהם נתקלו חוקרים שעסקו בשיטות מולקולריות הוא שלפעמים יש מופע של מספר גרעינים עם מידע גנטי מגוון באותה הפטרייה עצמה. סיבה נוספת לקושי באפיון גנטי היא שלפעמים קשה להפריד את המידע הגנטי שמפיקים ולהבין מה שייך לפטרייה ומה שייך לצמח איתו הם בסימביוזה (Marleau et al., 2011).

הקשר שלהם לבקטריות גם הוא לפעמים בלתי ניתן להפרדה. כאשר חוקרים מנסים לגדל את הפטריות בנפרד, כדי להפיק דגימות DNA נקיות , בהרבה מהזנים, ללא הצלחה. ריצוף מלא של כל הגנום (Whole genome sequencing) WGS אכן הצליח בחלק מהזנים אבל רק בזנים שחוקרים הצליחו לגדל *in vitro* בתנאי מעבדה. גם בתנאים אלו, כשמצליחים לבדוד את הפטרייה ולנסות למפות את השונות הגנטית, ישנם קשיים רבים, וכן בתוך אותה ציטופלסמה יכולים להיות מספר מאד גבוה של גרעינים. כאשר לא ברור כמה גדול טווח השונות הגנטית שלהם. חוקרים מנסים להתגבר על זה על ידי ריצוף של הרבה מקטעי DNA והשוואה לריצוף קיים של זני פטרייה מאותן משפחות כדי לנסות להבהיר אילו דגימות יש להם. (Hijri, 2015 & ,Boon, Halary, Bapteste)

בנוסף בשנים האחרונות ככל שנאסף עוד מידע גנטי, מתפתחות עוד שיטות של ביואינפורמטיקה מתקדמת בה משווים רצפים שמפיקים מאזורים ספציפיים בגנום לידע ממוחשב הקיים כבר WMS (Kang, J. E., Ciampi, A whole metagenome sequencing),. (Hijri, 2020) &



איור 4: תרשים גרפי של שלבי האפיון גנטי: בשיטות השוואה ביואינפורמטיות מריצים סימולציות השוואתיות לזיהוי דפוסים ורצפים גנטיים דומים (Boom et al, 2015).

3. שיטות וחמרים

3.1 המסה ראשונית של הדגימות ע"י בופר

א. מטרת השיטה: המסה ראשונית של חומר אורגני : מכיוון שיש לפטריות דופן תא עבה צריך קודם להמיס אותה .

ב. העיקרון: שימוש בחומרים המחלישים את דופן התא ומחוררים אך עדין לא פוגעים ב-DNS

ג. הכנת בופר ודגימות ראשוניות:

טבלה 1:

חומר	ריכוז רצוי	גרם ללטר	גרם ל100 מ"ל
SDS	0.25%	2.5	0.25
NaOH	N0.5	2	0.2
מים מזוקקים			100 מ"ל

נלקחו החומרים המתוארים בטבלה 1 במינון המתאים ל100 מ"ל ועורבו ביסודיות ב100 מ"ל מים מזוקקים. התוצר שימש כבופר לשמירה על תאי הפטריות. בשלב בו תערך השוואה בין בופרים שונים, יקרא בופר זה "SDS NaOH". הpH של הבופר הוא 13.

3.2 בידוד DNA ראשוני ואיתור DNA

א. מטרת השיטה: הריסה לחלוטין של דופן התא וריסוק הדוגמא על מנת שנוכל להפיק ולאתר את ה-DNA. המטרה היא לשבור את דופן התאים בעזרת Glass Beads על מנת לבודד את ה-DNA. למעשה תערך השוואה בין פרוטוקולים ובופרים שונים על מנת לראות אילו מהם הכי אפקטיביים בהפקת DNA.

ב. העיקרון: הוספת בכדורי זכוכית לדוגמא ואז שימוש במכשיר Mini Bead Beater ש"משקשק" בצורה חזקה את המבחנות עם כדורי הזכוכית בתוכם. השקשוק הזה של המבחנות גורם לכך שכדורי הזכוכית ישברו את התאים ואת הדוגמא לחתיכות קטנות. ג. השלבים:

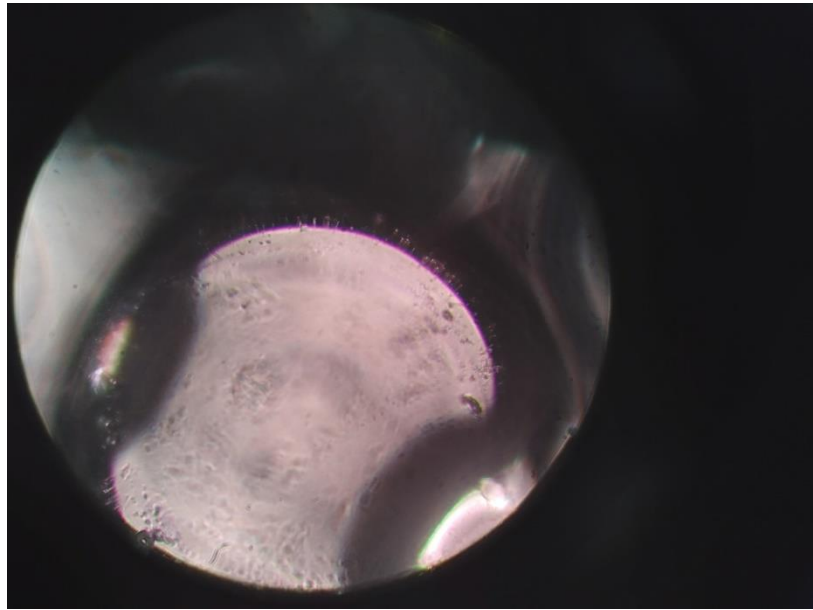
נלקחו Glass Beads של sigma (איור 6) בכמות של 0.25 מ"ל והוכנסו לתוך Vials של BIOLOGIX. הוכנו שמונה Vials. לשלושה הוכנסו דגימות מזן א של פטריות, לשלושה הוכנסו דגימות מזן ב, לאחד

Ecoli (בקרה חיובית- ידוע שממנו ניתן להפיק DNA) ולאחד שום תאים (בקרה שלילית). המטרה היא לשבור את דופן התאים בעזרת Glass Beads על מנת לבודד את ה-DNA.

טבלה 2: מספור הדגימות בVials ותיעוד כמות וזן הדגימה.

מספר (שם ה Vial)	משקל הדגימה שהוכנסה	זן
1	100 מ"ג	Helvella / 150
2	100 מ"ג	Helvella / 150
3	50 מ"ג	Helvella / 150
4	200 מ"ג	Morchella / 4
5	100 מ"ג	Morchella / 4
6	50 מ"ג	Morchella / 4
7	מושבה	Ecoli
8	-	Blank

לכל אחד מהזנים יש גם שם מספרי על שם הדוגמה המקורית. מעתה כאשר יוזכר Vial ספציפי הוא יוזכר כ V_x (x מייצג את מספר ה Vial).
לכל ה Vials הוכנס כמיליליטר של הבופר.

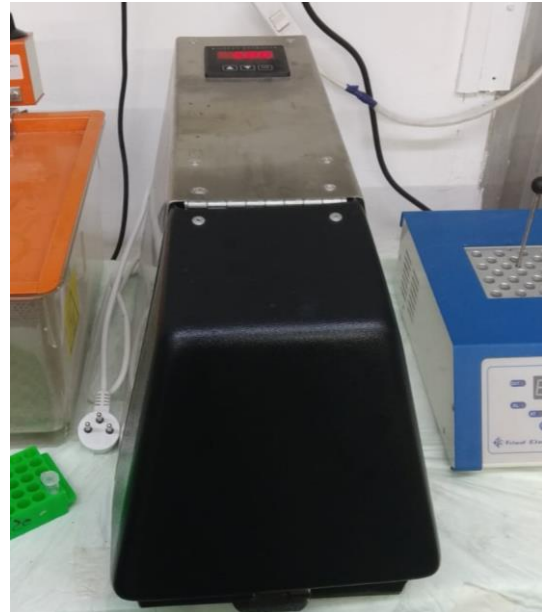


איור 5: תמונה דרך עדשת מיקרוסקופ של Glass Beads של Sigma. צולם במעבדת מיגל ע"י התלמיד אבנר בר-יוסף.

Vials הוכנסו ל Mini Bead Beater (איור 6) לחמש דקות על מנת שהניעור הממושך וה Glass Beads יחד ישברו את דופן הקרום. מייד לאחר מכן ה Vials הושרו בטמפרטורה של 95°C למשך עשר דקות בפלטת חימום על מנת לפרק את קרום התאים. לאחר מכן הם הוכנסו כולם ל spin-down לחצי דקה על מנת לקרקע את החומרים הגדולים ולהקל על עבודה עתידית.

מכל Vial נלקחו כ-200 מיקרוליטר נוזלי הועברו לכלים אחרים. כלים אלו נלקחו דגימות ל Nano drop על מנת לאתר ולספור DNA בדגימות. הוכנסו כשני מיקרוליטר מכל דגימה.

יתרון של Nano drop- מהיר. חיסרון- הוא קולט עוד דברים חוץ מ-DNA. הוא עובד בעיקר על דוגמאות שעברו ניקוי. לכן אנחנו נשתמש בעוד שיטת איתור DNA.



איור 6: תמונה של דגם של מכשיר Mini Bead Beater מחברת BioSpec products. דגם זה עולה על 607EUR. המכשיר משמש להכנת DNA מצינוריות זכוכיתיות. המכשיר הוא של חברת BioSpec products.

3.3. ניקוי הדגימות ואיתור DNA בעזרת ג'ל זרמים חשמליים

- א. המטרה: לנסות לראות את ה-DNA בג'ל אגרוז לשם ערכת כמות DNA שמופקת.
- ב. השיטה: הכנת ג'ל אגרוז 1% והרצת הדוגמאות בתוכו.
- ג. ביצוע: נשקלו 0.8 ג' של אגרוז לתוך 80 מ"ל בופר TAE עם TAE והתערובת הוכנסה למיקרוגל להמסה למשך דקה וחצי. לאחר שהנוזל התקרר טיפה אבל לא נקרש (כ-2 דקות) טיפות Ethidium Bomerid הוספו לנוזל.

מהדגימות נקלחה כחצי מההכמות על מנת להעביר ניקוי שיקל על האיתור DNA בהמשך. הדגימות הוכנסו לצנטריפוגה לסרכוז 2 דקות ב-3000 RPM ונוקו ע"י שימוש בערכת DNAMiniPrep של Zymo Research. כל אחד מה-Vial קיבל מספר טיפות של לונדיבופר (londy buffer) על מנת להקל על איתור ה-DNA בהמשך.

טבלה 3: סידור הדוגמאות בחריצים בג'ל.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	נתיב
סולם	1	2	3	4	5	6	7	8	-	דוגמא
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	נתיב
סולם	1	2	3	4	5	6	7	8	-	דוגמא

ב"סולם" הכוונה ל Ladder Marker, כלומר שמשמשים ב"סולם" שנוצר בג'ל על מנת לקבוע את המצב אצל האחרים. המודגשים בכחול הם מהדוגמאות הנקיות והמודגשים בירוק הם מהגולמיות. הדוגמאות הוכנסו לחריצים מוכנים מראש בג'ל בסדר המתואר בטבלה 4. הג'ל הוכנס למים במכשיר בשם Power Pack של Bio-Rad שהכניס זרם בעוצמה של 100-120 וולט למים (ולכן גם לג'ל ולדוגמאות שבו). בג'ל של DNA יש מטען שלילי הוא אמור להתקדם עם כיוון הזרם אל הצד בעל המטען החיובי, וכך למעשה ניתן להבחין בין DNA באיכות טובה לבין באיכות לא טובה. בג'ל ש DNA באיכות טובה גדול יותר הוא יזוז פחות עד בכלל, כך שכלל שה DNA זז פחות עם הזרם כך הוא יותר גדול ויותר טוב. בנוסף, הודות ללונדיבור DNA זהר תחת אור אולטרה-סגול כך שניתן לראות את ה DNA ואת רמת פיזורו.

3.4 המסה של הדגימות ע"י בופר CTAB או של ערכת Zymo להפקת DNA

א. המטרה: שימוש בבופר/ערכה יותר איכותיים לקבל ניקוי ראשוני יותר טוב של ה DNA. הדוגמאות הללו הוכנו על מנת לערוך השוואה בין סוגי הבופר ולגלות איזה הכי יעיל בתהליך הפקת ה DNA. בנוסף, מכיוון שחלק מהדגימות עברו תהליך ניקוי שונה מעט יהיה ניתן גם להסיק אילו שלבים בתהליך המקובל זניחים ואלו קריטיים על מנת להפיק DNA.

ב. השיטה: ניקוי זנים שונים בשיטות שונות והשוואה ביניהם ע"י שימוש בחומרים המחלישים את דופן התא ומחוררים אך עדין לא פוגעים ב DNA השלבים:

הכנת הדגימות: ארבעה Vials ישומו על מנת להפיק DNA בבופר בשם CTAB ושלושה ישומו להפקה בבופר של ערכת Zymo להפקת DNA. בכל שלישיה Vial אחד יוקדש לזן Helvella, אחד לזן Morchella, אחד ל Ecoli (בקרה חיובית) ואחד נקי (בקרה שלילית).

טבלה 4: מספור דגימות בהתאם לבופר.

סוג	CTAB	Zymo
Morchella	9	13
Helvella	10	14
Ecoli	11	15
Black	12	16

חשוב לציין שהVials שקיבלו בופר Zymo, וV9 וV10 קיבלו Glass Beads של Zymo על מנת לבחון את ההשערה שהם עובדים יותר טוב בכתישה.

כתישת הדוגמאות:

הדוגמאות הוכנסו לMini Bead Beater (איור 6) לאחר שהוכנסו אליהם Glass Beads, חלק של Sigma וחלק של Zymo. מכיוון שהכתישה לא הייתה מספיקה, הוכנסו הVials לצנטריפוגה. V13 וV14 עברו כתישה פעמיים מכיוון שהיו מאד סמיכים ורצינו לוודא שאכן הצלחנו לפרק את הדוגמא בצורה מיטבית.

ניקוי הדגימות :

בבופר של ערכת Zymo להפקת DNA:

דגימות 9-16 כולן עברו למסננים עם Vial מחובר. 400 מ"ל של הדגימות עברו דרך המסננים ואז עברו צנטריפוגה במהירות של 8,000 g לדקה. נוספו לVials דרך המסנן 1,000 מ"ל של ZymoBBIOMICS DNA Binding Buffer. 800 מ"ל מהתערובת הועברו לVial אחר דרך מסנן ZymoSpin IICR Column ועברו צנטריפוגה של 10,000 g בדקה והשאריות הושלכו. 800 מ"ל מהתערובת הועברו לVial אחר דרך מסנן ZymoSpin IICR Column ועברו צנטריפוגה של 10,000 g בדקה והשאריות הושלכו. המסננים עברו לVials והועבר דרכם 400 מ"ל של ZymoBBIOMICS DNA Wash Buffer1 והVials עברו צנטריפוגה של 10,000 g בדקה. השאריות הושלכו. נוספו 200 מ"ל של ZymoBBIOMICS DNA Wash Buffer2 דרך המסננים, הVials עברו צנטריפוגה של 10,000 g בדקה וחוממו בפלטת חימום בטמפרטורה של 95°C במשך שלוש דקות. נוספו 200 מ"ל של ZymoBBIOMICS DNA Wash Buffer2 דרך המסננים, הVials עברו צנטריפוגה של 10,000 g בדקה וחוממו בפלטת חימום בטמפרטורה של 95°C במשך שלוש דקות.

3.5 המסה של הדגימות ע"י בופר CTAB או של ערכת Zymo להפקת DNA

- א. המטרה: להגביר את מקטעי הDNA שהופקו במכשיר כדי לקבל כמות גדולה יותר של DNA לשימוש.
- ב. השיטה: כעת הדגימות כמתואר בטבלה 8 יעברו תהליך PCR, כלומר Polymerase Chain Reaction, על מנת להגביר (לשכפל) את הDNA, מה שיקל את איתורו בנודרופ וג'ל.
- ג. השלבים:
הכנה לPCR:

1,2,4,5 1Vials נלקחו והוכנס אליהם Glass Beads של Zymo תוספת של בופר SDS NaOH על מנת לבחון את יעילות הבופר כאשר משתמשים בBeads יעילים יותר. נבחר מספר רב של Vials על מנת לקל מגוון רחב יותר של תוצאות. הדגימות כולן הוכנסו לחמש דקות ל Mini Bead Beater (איור 7), אחר כך לספין דאון ועברו ניקוי נוסף.

הוכנו עוד שתי Vials שהוכנסו בהם חיידק Ecoli. לאחד הוכנס בופר של CTAB ולאחד בופר SDS NaOH.

טבלה 5: דגימות לPCR.

שם דוגמא	זן	בופר
2	Morchella	SDS NaOH
5	Helvella	SDS NaOH
9	Morchella	CTAB
10	Helvella	CTAB
13	Morchella	Zymo
14	Helvella	Zymo
15	Ecoli	Zymo
17	Ecoli	SDS NaOH
18	Ecoli	CTAB

הכנת ה"תערובת" לPCR :

לצורך הרצת הדוגמאות במכשיר שעושה Polymerase Chain Reaction השתמשנו ב Redy Mix של חברת Thermo : ובנוסף בפרימרים: 2 פרימרים לפטריות- ITS1F ו- ITS4.

פריימר אחד לחיידקים- Universal 16S rRNA for Bacteria.

תוצרי ה PCR הורצו בג'ל אגרוז 1% (כמתואר בשיטה 3)

טבלה 6: הצבת את הPCR.

	per reaction	for 18 reactions	for 22 reactions	
material	volume	16S	ITS	
ready mix	10	180	220	
P1	0.5	9	11	
P2	0.5	9	11	
DNA	2	36	44	
H2O	7	126	154	
total	20	360	440	
number of reactions				
ITS (mushrooms)				
Treatment	Buffer	no. samples		samples
Lysis only	SDS- NaOH	3		Mushroom 4, Mushroom 150, Blank
	CTAB	3		
	Zymo	3		
Clean	SDS- NaOH	2		
	CTAB	2		
	Zymo	2		
Total		15		
total + 10%		17		
16S (Bacteria)				
Treatment	Buffer	no. samples		
Lysis only	SDS- NaOH	4		Mushroom 4, Mushroom 150, E coli, Blank
	CTAB	4		

	Zymo	4		
Clean	SDS- NaOH	3		
	CTAB	3		
	Zymo	3		
Total		21		
total + 10%		24		

4. תוצאות

4.1 הפקת דנ"א בעזרת בידיים בתמיסות בופר הפקה שונות

הפקנו דוגמאות שונות ומדדנו במכשיר ננו דרופ את ריכוז ה-DNA שהופק ואת מידת הניקיון שלו (260/280). בטבלה 7 מופיעים הזנים השונים ומשקל ההתחלתי של כל דוגמא.

בשלב ראשון עשינו "הפקה גולמית" של DNA כלומר המסה ראשונית של הדוגמא עם בופר בלבד. לאחר הפקה גולמית טווח הריכוז היה בין 71.1 לבין 600 ng/mL. בשורה 4 ניתן לראות שישנה משמעות למשקל ההתחלתי בזן *Morchella* כאשר את הריכוז הגבוהה מקבלים בדוגמא הכי כבדה (200 mg). המדד של 260/280 נותן לנו אינדיקטציה על רמת הניקוי של *Morchellan*. כל הדוגמאות שלנו לאחר ההפקה הגולמית (עמודה 5) היו מתחת 1.8. מדד של מתחת 1.8 נחשב כמזהם בגורמים כמו חלבונים או חומרים נוספים מהבופר שסופגים בטווח של 280. אחד החומרים הוא פנול שיכול לשבש את הקריאה. נראה שמה שמתפרש בהפקה הגולמית כריכוז הוא בעצם זיהום. לכן חייבים לבצע ניקוי נוסף בקולונות כדי לפנות מהדוגמא חלבונים וחומרים.

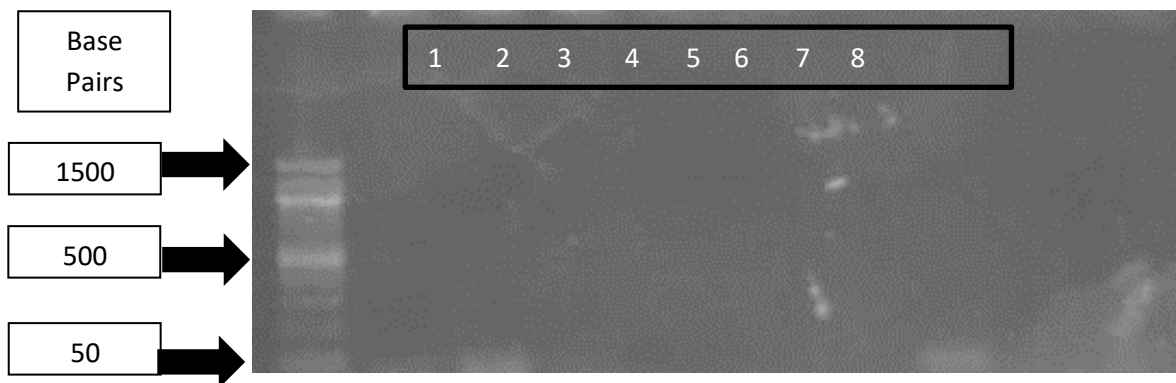
הריכוז שקיבלנו לאחר הניקוי נע בין 0.02-1.53, ריכוז נמוך מאד. זה מעיד על כך שבעצם הריכוז לאחר ההפקה הגולמית היא באמת ברובו זיהום ולא DNA.

טבלה 7. ריכוז DNA הדוגמאות לאחר הפקה וניקוי

דוגמא	מקור	משקל	Ng/ml DNA (לאחר הפקה גולמית)	260/280	לאחר ניקוי עם קולונה (קיט מסחרי) Ng/ml DNA	לאחר ניקוי: יחס 260/280
1	<i>Helvella</i>	mg 100	228.1	1.40	0.7	-3
2	<i>Helvella</i>	mg 100	236.5	30	2.5	0.9
3	<i>Helvella</i>	mg 50	353.8	1.29	1.9	-
4	<i>Morchella</i>	mg 200	600	1.18	1.9	-
5	<i>Morchella</i>	mg 100	392.5	1.2	1.9	1.06
6	<i>Morchella</i>	mg 50	197.2	1.23	0.2	0.3
7	<i>E.coli</i>	One colony	71.1	1.52	0.02	-
8	Blank	0	9	2	-0.4	-

4.2 הרצת הדוגמאות בג'ל אגרוז

את הדוגמאות של ה-DNA שהפקנו בשלב הקודם הרצנו בג'ל אגרוז



איור 7: צילום של גל שהורצו בו דוגמאות ה-DNA. בבארית הראשונה הרצנו סולם גבהים של DNA ואז הורצו 8 הדוגמאות של DNA שהופק לפי טבלה 7.

בניסוי זה לא נצפתה ריצה של DNA בג'ל כפי שניתן לראות באיור 7

4.3 השוואת פרמטרים שונים והשוואתם לקבלת תוצאה יותר איכותית

ביצענו ניסוי נוסף בו השונו 3 פרמטרים שונים: בופרים שונים, כדורי זכוכית – Zymo של beads ושימוש בקיטים מסחריים DNA miniprep kit תוצרת חברת Zymo (Irvine, California). החלטנו לבדוק את התוצרים בראקצית PCR כדי להגביר את הכמות שהתקבלה וכדי לראות אם נוכל להגביר את הקטע הרלוונטי ולזהות את המין של הפטרייה. כל נדע האם את המקטע שהתקבל נוכל להגביר בקלות ללא שימוש בקיטים מסחריים או שצריך את הקיט. מצורפת טבלה מסכמת בה מופיע האורגניזם שממנו לקחנו את הבדיקה, שם הבופר שהשתמשנו והאם השתמשנו בתהליך הניקוי בקיט מסחרי.

עבודה זו מסוכמת בטבלה 8:

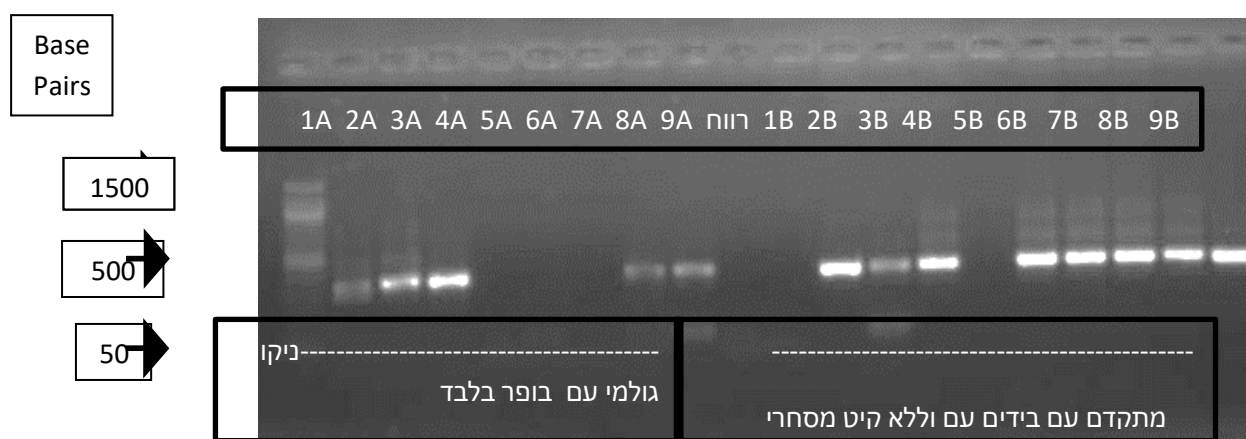
Usage of Zymo DNA miniprep kit	סוג Beads	בופר	מקור	דוגמא
-	Sigma (5 mm)	SDSNaOH	<i>Helvella</i>	1
-	Sigma (5 mm)	SDSNaOH	<i>Morchella</i>	2
-	Zymo (4.5 mm)	CTAB	<i>Morchella</i>	3

+	Zymo (4.5 mm)	CTAB	<i>Helvella</i>	4
+	Zymo (4.5 mm)	Zymo lysis	<i>Morchella</i>	5
+	Zymo (4.5 mm)	Zymo lysis	<i>Helvella</i>	6
-	Zymo (4.5 mm)	Zymo lysis	<i>E.coli</i>	7
+	Zymo (4.5 mm)	SDSNaOH	<i>E.coli</i>	8
+	Zymo (4.5 mm)	CTAB	<i>E.coli</i>	9

4.4 הרצת תוצרי PCR של ההפקות השונות בג'ל אגרוז

מכל דוגמא מהטבלה הנ"ל הרצנו מ2 שלבים:

1. הגולמי לאחר השימוש בבופר בלבד (A). 2. לאחר הניקוי עם הבידים ועם (או ללא) הקיט המסחרי (B).



איור 8: הדוגמאות שעברו בראקצית PCR לאחר הרצת על גבי ג'ל אגרוז דוגמאות A9-A1 הינם דוגמאות ללא שלב של הפקה עם בידיים רק ע"י בופר. דוגמאות B9-B1 הינם לאחר ניקוי מתקדם עם בידיים ולעיתים עם שימוש בקיט מסחרי Zymo DNA miniprep kit. מדוגמאות A1-9A של ניקוי גולמי נראה שאפשר להפיק DNA במידה שתספיק לגביר אותו בראקצית PCR, במידה מסוימת גם ללא שימוש בבידיים ובקיט מסחרי.

בזן *Helvella* שימוש בבופר SDSNaOH בלבד כן נתן בנד דק בג'ל (A1) בעוד שבזן *Morchella* דווקא בופר CTAB נתן את הבנד היותר חזק (A3). בשני הזנים הללו שימוש ב Zymo lysis בלבד ללא הבידיים לא נתן מספיק DNA לראקציה כי לא נצפה בג'ל שום בנד (A6, A5). יתכן שבופר זה אינו חזק מספיק לפרק את דופן התא של הפטריה העשויה כיטין.

בחידק *E. coli* הבופר הזה לבדו דווקא כן נתן בנד (אומנם חלש) בג'ל (7A) אולי מכיוון שדופן התא של החידק עשויה פפטידוגליקן. בנד יותר חזק נצפה בשימוש ב-SDSNaOH (8A) אך כלל לא בשימוש בופר CTAB (9A).

למרות האמור לעלי נראה שכדי לקבל תוצאה טובה ואיכותית ב-PCR צריך לבצע את כל שלבי הניקוי גם בופר וגם בידיים. זאת מכיוון שכל הדוגמאות ב-B היו הרבה יותר חזקות כנראה עקב ניקוי טוב וכמות מספקת של DNA שנוצר.

כלומר עוצמת הבנדים ב-B מעידה שהשימוש בבידים כנראה אפשר הפקה יותר טובה ונקייה של DNA, מה שאפשר הגברה טובה יותר של המקטע מכיוון שהבנדים הכי חזקים שלהם נצפו בדוגמאות B.

ברגע שעוברים לשימוש בבידים אין הבדל משמעותי בין הבופרים השונים וגם אין שמעות לשימוש בקיט המסחרי כיון שלא נראה שיש הבדל בעוצמת הבנד בין B,7,8 B,9.

בשני זני הפטריה הבנדים הכי חזקים התקבלו עם בופר Zymo lysis השילוב שלו עם שימוש בבידים של Zymo וניקוי ב-DNA miniprep kit (6B,7B) נתן את התוצאות הכי טובות.

5. דיון

מטרת המחקר שערכנו הייתה מציאת שיטה יעילה להפקת DNA מפטריות עבור זיהוי מולקולארי ב-PCR. הצלחת הניסוי ישפיע על שיטת העיבוד של דוגמאות סביבתיות של פטריות מסדרת Pezizales שנאספו מרחבי הארץ על מנת לזהות ולקבוע את שיטת ההזנה של הפטריות. ההיפותזה שלנו הייתה שניתן ליעל את השיטה להפקת DNA מפטריות וליצור פרוטוקול חדש ויעיל להפקה איכותית של DNA מפטריות. פרוטוקול זה יסייע בזיהוי וקביעת שיטת ההזנה של פטריות מזן Pezizales. בסדרת Pezizales יש כ-1683 זנים המחולקים ל-16 משפחות רובן חיות באדמה, במגוון אינטראקציות של סימביוזה או של טפילות לצמחים ומגוון גדול של מבנים שבהם מופיעות הפטריות בסדרה זו של (Kirk et al. 2008).

פעמים רבות נמצאה התאמה בין תת זנים לבין צורת ההזנה וחוקרים כל הזמן שואפים לאפיון נכון של הזנים ולמציאת התאמתם לשיטת הזנה. בשנים האחרונות עם התפתחות הביולוגיה המולקולרית והצטברות המידע הגנומי בכלל ושל פטריות בפרט יותר ויותר חוקרים פונים לשיטות אלו לאפיון של הפטריות. (Karst et al, 2016)

כדי להשתמש בשיטות מולקולריות, הדבר הראשון שצריך הוא להפיק DNA בצורה טובה ונקיה. אם הניקוי לא טוב אז השלבים הבאים של השימוש בו בראקציה ה-PCR לא יצליחו. דופן הפטריות עשויה כיטין שהוא רב סוכר ותורם לנוקשות של הדופן וליצרת התפטיר. לכן ישנם מספר שלבים בהפקה: ראשית לאחר שאוספים את הדוגמא משתמשים בשיטות שונות כמו בעזרת מכשיר Tissue-lyser כדי לפרק את דופן התא ולהוציא את ה-DNA לתמיסת הבופר (Doyle, J. J., & Doyle, J. L. 1987).

חוקרים מנסים כל הזמן למצוא שיטות יותר יעילות ומהירות להפקה טובה של DNA ממקורות אורגנים, כדי לאפשר המשך של עבודה מולקולרית רחבה עם מה שהופק. בשנים האחרונות קיימים קיטים מסחריים שאפשר לקנות לצורך הפקת ה-DNA, אבל הפקות אלו לעיתים יותר יקרות ובנוסף פעמים רבות מאבדים חומר בתהליך, מה שמחמיר את הבעיה בעיקר אם יש כמות מוגבלת של חומר שממנו מפיקים כלומר יש לנו מלכתחילה דגימה קטנה / מוגבלת מהטבע. (Sajali et al., 2018)

ישנם מספר עקרונות המנחים ביצירת פרוטוקול של הפקת DNA. השאיפה שהפרוטוקול יהיה פשוט, בטיחותי, יעיל כמה שניתן מבחינת העלות והזמן שהוא דורש. חשוב שהתוצר יהיה באיכות ובכמות מספקת כך שניתן לעשות אנליזות מולקולריות בהמשך התהליך. הפרמטרים הכי חשובים לבחון את התוצר של התהליך הם: ריכוז/כמות שמקבלים, רמת הניקוי, אחידות ואמינות הדוגמא המתקבלת (Birth, 2008 & Keer).

לפטריות Pezizales יש דופן תא כמו לצמחים (העשוי מציטין לעומת תאית), אך בעוד הדופן של הצמחים עשויה תאית בפטריות הדופן עשויה ציטין. עם זאת בכדי לשבור את דופן התא ולהוציא את ה-DNA כדאי לבחון שיטות שמתאימות לצמחים.

אבל לאכזבתנו, כפי שניתן לראות בטבלה 7 ובאיור 7 שימוש בשיטות בסיסיות של פרוק דופן תא כמו של צמחים הניבו כמות קטנה מידי של DNA.

לאחר שלא קיבלנו את התוצאות המקוות, החלטנו לבדוק מספר פרמטרים שונים שכנראה משפיעים על התוצאות. לאחר מחשבה והתייעצות החלטנו על 3 פרמטרים שונים:

הפרמטר הראשון - הבופר המשמש להמסה ראשונית של החומר: בנוסף לבופר SDS NaOH החלטנו לנסות בופר CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide)

זהו בופר יותר חומצי מ NaOH ולכן שיברת דופן התא העשוי ציטין יכולה להיות יותר יעילה.

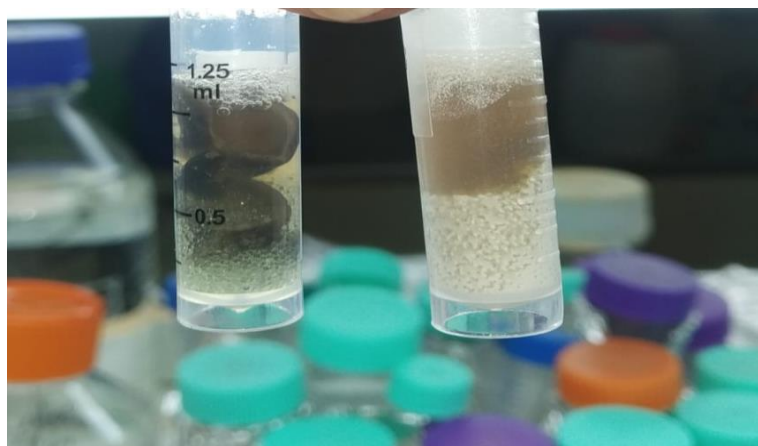
השימוש בבופר CTAB הוא הפרוטוקול המוביל בהפקות מאורגניזמים עם דופן (בעיקר צמחים) ומשתמשים לעיתים גם בהפקת DNA של פטריות. (Bruns & Gardes, 1993).

יש עבודות שהראו שבפטריות מקבלים בשימוש בבופר זה ריכוזים יותר גבוהים.

(Osmunsdon et al, 2013)

ננסה גם שימוש בבופר מסחרי אשר משמש גם להפקות: Zymo lysis.

הפרמטר השני שבדקנו הוא הבידים/ כדורי הזכוכית - glass beads : החלטנו לבדוק סוג נוסף של glass beads של חברת ZYMO RESEARCH. הבידים האלו יותר קטנים וחדים מאלו של חברת Sigma ולכן יתכן שיעבדו יותר טוב כי יצליחו לפרק את הדוגמא לחתיכות יותר קטנות.



איור 9: השוואה בין התוצאות לאחר שימוש בגלס בידס מסוג חדש. צד שמאל- תוצאות עם Sigma beads. צד ימין- תוצאות עם Zymo beads.

הדבר הנוסף שהחלטנו לנסות לבדוק הוא שימוש בקיט DNA miniprep kit . החלטנו לראות אם שימוש בקיט הניקוי של חברת ZYMO RESEARCH משפר או פוגע בתוצאות ואולי כדאי לוותר עליו כי מאבדים יותר מידי מהדוגמא בתהליך הניקוי. מצד שני יש חוקרים שחושבים שזה חשוב כי מקבלים DNA הרבה יותר נקי ומאפשר ראקצית PCR טובה.

(Zhang, S & Cahalan, D.M. (2007).

ראקצית PCR מאפשרת להגביר מקטעי ובכך לאפשר אפיון יותר טוב ומדויק של זן הפטריה. (Nielsen & Karst, Albertsen, Kirkegaard, Dueholm 2016).

כפי שניתן לראות באיור 8 כדי לקבל תוצאה טובה ואיכותית ב-PCR צריך לבצע את כל שלבי הניקוי גם בופר וגם בידיים הדוגמאות ב-B היו הרבה יותר חזקות כנראה עקב ניקוי טוב וכמות מספקת של DNA שנוצר. המסקנה שלנו היא ששימוש בבופר ליזיס ממס בלבד ללא שלב של שבירה ע"י כדורי זכוכית הוא כמעט באופן גורף לא יעיל. כל הדוגמאות A 1-8 כמעט ללא יוצא מן הכלל לא הצליחו לתת תוצר של מקטע DNA ב-PCR. לעיתים נוצר בנד מאד חלש אשר מעיד על כמות DNA מאד קטנה שנוצרה.

דגימות של שני זני הפטריה: *Morchellai Helvella* שרק עברו עיכול עם בופר, שראו בנד חלש של DNA היו אלה שדווקא נחשפו לבופר שאנו הכנו במעבדה SDSNaOH או CTAB ולא הבופרים המסחרים (1-3A).

עם זאת לא נמליץ להשתמש בשיטה זו מכיוון שלרוב לא נצפה בנד בכלל או מאד חלש אחרי ההפקה כזו והגברת ה-pcr. תוצאות B 1-9 כלומר עוצמת הבנדים ב-B מעידה שהשימוש בבידיים כנראה אפשר הפקה יותר טובה ונקייה של DNA, מה שאפשר הגברה טובה יותר של המקטע מכיוון שהבנדים הכי חזקים שלהם נצפו בדוגמאות B.

עבור החיידק *E.coli* ברגע שמתמשים בבידיים בנוסף על בופר אין צורך גם בקיט מסחרי ואין יתרון לבופר מסחרי. הדבר הגיוני מכיוון שפירוק דופן התא שלו קלה יותר היא דקה ובנוסף אין לו גרעין תא.

עבור שני זני הפטריה *Morchellai Helvella* השילוב של שימוש בבופר Zymo lysis, שימוש בבידיים של ZYMO RESEARCH וניקוי ב-DNA miniprep kit יחד עם חימום ההפקה למשך 2 דקות ב-60°C, נתן את התוצאות הכי טובות (6B,7B). מכיוון שדופן הפטריה עשויה כטיין דרוש תהליך ארוך בו דופן התא מחוררת בעדינות על ידי הבופר ואז בעזרת הבידיים היא נשברת לגמרי.

התוצר שמתקבל הינו מאד מלוכלך ומלא בחתיכות מהממברנה ומהתא כך שדרוש ניקוי בקיט מסחרי להפריד את כל הלכלוך מה DNA על מנת שתתקבל תוצאה שניתן יהיה להשתמש ולהגביר גם.

הקיט במחסרי הוא בעל מספר שלבים המשלבים שימוש בקולונות ומפרידים את ה-DNA מכל חומרי התא שאינם כאלו.

במחקר מצאנו שכדי לקבל תוצאה טובה ואיכותית של DNA במכשיר PCR המאפשרת לאפין את האורגניזם ואת הזן, צריך לבצע את כל שלבי הניקוי המשלב גם בופר וגם בידיים (כדורי זכוכית).

עבור כל זני הפטריה שנבדקות התוצאות הכי טובות התקבלו בשימוש בבופר lysis מסחרי ושימוש בבידיים (כדורי זכוכית זעירים) של חברת ZYMO RESEARCH מתוך ה-DNA ZYMOBIOMICS KIT

תוספת חיונית לפרוטוקול הייתה שלב ניקוי סופי של התוצר ב-DNA miniprep kit הניקוי הוביל להגברה יותר טובה של ה-DNA ע"י PCR. כפי שרואים את הבנדים החזקים בג'ל האגרוז (איור 8 תוצאות 6B,7B). כדי להגיע לתוצאות מיטביות עשינו 2 סבבי אילוציה בקיט זה במקום אחד.

חשוב לציין שגם כאשר לא השתמשנו בבופר וקיט מסחרי, אלא רק עשינו הפקה גולמית, הצלחנו לקבל שכפול DNA בראקצית PCR (איור 8 תוצאות A1,A3). אך הבנדים שהתקבלו היו מאד חלשים כנראה כיוון שהופק פחות DNA והוא היה פחות נקי כך שראקצית ה-pcr הצליחה להגביר ולתת הרבה פחות תוצר. יתכן שעבודה נוספת בשיפור שלב הניקוי בלבד יכולה לתת מענה כאשר מתחילים עם כמות מאד גדולה של דגימות ולא נדרשת רמת ניקוי גבוהה.

לסיכום במחקר שלנו תיאמנו פרוטוקול קיים להפקה איכותית של DNA מפטריות על ידי תוספת ביד-ביטינג ועמודת נקיון. פרוטוקול זה יכול לאפשר עבודה מולקולרית וביואינפורמטית נרחבת שתאפשר אפיון זנים ותתי זנים שונים בכל העולם. זיהוי זה יכול לאפשר התקדמות המחקר וההבנה של ההתאמה בין שיטות ההזנה לתתי הזנים ב פטריות שק מסדרת Pezizales.

6. רשימת מקורות:

Bahadur, A., Batool, A., Nasir, F., Jiang, S., Mingsen, Q., Zhang, Q., ... & Feng, H. (2019). Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4199.

Barseghyan, G. S., & Solomon, P. (2011). The genus *Peziza* Dill. ex Fr. (Pezizales, Ascomycota) in Israel. *Ascomycete Org*, 2(4), 39-50. page 1.

Boon, E., Halary, S., Baptiste, E., & Hijri, M. (2015). Studying genome heterogeneity within the arbuscular mycorrhizal fungal cytoplasm. *Genome Biology and Evolution*, 7(2), 505-521

Dearnaley, J. D. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475-486..

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.

Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., & Strack, D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*, 130(3), 1213-1220.

Kang, J. E., Ciampi, A., & Hijri, M. (2020). SeSaMe PS Function: Functional Analysis of the Whole Metagenome Sequencing Data of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*.

Karst, S. M., Albertsen, M., Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., & Nielsen, P. H. (2016). Molecular methods. *Experimental Methods in Wastewater Treatment*, 285-323... page 13.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). Dictionary of the Fungi Wallingford. *UK: CABI*, 335.

Keer, J. T., & Birch, L. (Eds.). (2008). *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach*. Royal Society of Chemistry. Chapter 4: "DNA Extration".

Kovalchuk, A., Kohler, A., Martin, F., & Asiegbu, F. O. (2015). Diversity and evolution of ABC proteins in mycorrhiza-forming fungi. *BMC evolutionary biology*, 15(1), 1-19.

Marleau, J., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 1-11

Lohberger, A., Spangenberg, J. E., Ventura, Y., Bindschedler, S., Verrecchia, E. P., Bshary, R., & Junier, P. (2019). Effect of organic carbon and nitrogen on the interactions of morchella spp. and bacteria dispersing on their mycelium. *Frontiers in microbiology*, 10, 124.

Ori, F., Hall, I., Gianchino, C., Iotti, M., & Zambonelli, A. (2019). Truffles and Morels: Two Different Evolutionary Strategies of Fungal-Plant Interactions in the Pezizales. In *Plant Microbe Interface* (pp. 69-93). Springer, Cham. mainly from page 13

Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., ... & Lievens, B. (2017). Ecology of aspergillois: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial biotechnology*, 10(2), 296-322..

Roy, M., Watthana, S., Stier, A., Richard, F., Vessabutr, S., & Selosse, M. A. (2009). Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC biology*, 7(1), 1-17.

Sajali, N., Wong, S. C., Hanapi, U. K., Abu Bakar@ Jamaluddin, S., Tasrip, N. A., & Mohd Desa, M. N. (2018). The challenges of DNA extraction in different assorted food matrices: A review. *Journal of food science*, 83(10), 2409-2414.

Saprophyte. (n.d.) English dictionary. taken in 14.12.2020 from - <https://www.dictionary.com/browse/saprophyte>

Sharma, E., Anand, G., & Kapoor, R. (2017). Terpenoids in plant and arbuscular mycorrhiza-reinforced defence against herbivorous insects. *Annals of Botany*, 119(5), 791-801.

Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., & Walter, M. H. (2003). Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of chemical ecology*, 29(9), 1955-1979. page 2.

Tekaia, F., & Latgé, J. P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 385-392.

Zhang, S and Cahalan, D.M. (2007). Purifying Plasmid DNA from Bacterial Colonies Using the Qiagen Miniprep Kit. *Journal of visualized Experiments*