

זיהוי בשיטות מולקולריות של חיידקי אגרובקטריום (*Rhizobium radiobacter*, CP58)

(מעודכן 2.8.20)

בחלק זה תשתמש באמצעים מולקולריים על מנת לזהות את החיידק אגרובקטריום, *Agrobacterium* (ריזוביום רדיובקטר, CP58) בגידולים שנוצרו בגזר. בשיטת PCR ניתן לשכפל במבחנה מקטעי גנים מהפלסמיד המכונה Ti-DNA הנמצא בחיידק אגרובקטריום. גנים מסוימים שמקודדים בפלסמיד מועברים לגנום הצמח וגורמים לשיבוש בבקרה על חלוקת תאים בצמח. כתוצאה מכך מתפתח עפץ הכתר (גידול ממאיר). פלסמיד זה הוא ייחודי לאגרובקטריום ואינו נמצא בחיידקים אחרים, דוגמת *E. coli*. בתהליך זה תגבירו (הכפלת מקטע מהגן מספר רב של פעמים) מקטעים משני גנים הנמצאים בפלסמיד Ti-DNA. קבלת מקטע DNA שהוא תוצר של ההכפלה ב PCR באורך מתאים מעידה על נוכחות החיידק שגורם לגידול. בניסוי זה תשתמשו בשיטת Colony PCR. על פי שיטה זו, אין צורך בהפקה מוקדמת של DNA מחיידקים אלא רק דגימה של החיידקים. בשלב הראשון בתהליך ה-PCR, מרתיחים את דגימת החיידקים במבחנה, כך שקרומי התאים שלהם נהרסים ותוכנם, כולל הפלסמיד Ti-DNA, עובר אל התמיסה במבחנה ומהווה תבנית DNA לתהליך ההכפלה ב-PCR.

מטרת הניסוי:

לפניכם שתי צלחות פטרי, המסומנות באותיות A ו-B עם מצע לגידול חיידקים, ועליהן מושבות חיידקים שנוצרו בזריעת בידוד. רק על אחת מהן גדלים חיידקי אגרובקטריום, ואילו על השנייה גדלים חיידקי *E. coli*. עליכם לזהות בשיטה מולקולרית, באיזו משתי הצלחות גדלים חיידקי אגרובקטריום.

הוראות עבודה להכנת תבנית ה-DNA:

1. לפניכם שש מבחנות PCR (0.2 מ"ל).
- סמן אחת מהמבחנות סימונים: A, A1, B, B1, C1, C2
- הוסיפו לכל מבחנה 10 מיקרוליטר מים מזוקקים מעוקרים, מתוך מבחנת האפנדורף (1.5 מ"ל) שעל שולחנכם המסומנת "מים מזוקקים".
2. באמצעות טיפ צהוב סטרילי המחובר למיקרופיטור, געו בעדינות באחת ממושבות החיידקים בצלחת A. השתדלו "לאסוף" את כל המושבה באמצעות קצה הטיפ.
3. הכניסו את קצה הטיפ למבחנה A, כך שקצה הטיפ יטבול במים שבתחתית המבחנה, ערבבו את הנוזל בעזרת הטיפ למשך מספר שניות.
- השליכו את הטיפ למיכל הפסולת המסומן "פסולת לעיקור".
4. חיזרו על סעיפים 2-3, אך הפעם הכניסו את החיידקים (שדגמתם מצלחת A באמצעות טיפ) אל מבחנה A1.
5. חיזרו על סעיפים 2-4, אך הפעם דיגמו חיידקים מצלחת B, אל מבחנות B ו-B1.
6. באמצעות טיפ סטרילי, געו קלות במים שבמבחנה C1, ובאמצעות טיפ סטרילי נוסף במים במבחנה C2. שימו לב: אין להוסיף חיידקים למבחנות אלה.
7. השאירו את המבחנות בכך המבחנות, בטמפרטורת החדר.

8. תכנתו את מכשיר ה-PCR (היעזרו במורים) לטמפרטורה קבועה של 95°C , למשך 10 דקות. בזמן ההמתנה תוכל לעבור לשלבים הבאים.
9. העבירו את המבחנות A, A1, B, B1, C1, C2 אל מכשיר ה-PCR והפעילו את התכנית.
10. בתום 10 דקות, העבירו את המבחנות A ו-B ממכשיר ה-PCR לאמבט קרח.

לידיעתכם: מטרת השלבים 8-9 היא להרוס את קרומי התאים של החיידקים, על מנת שתוכן הציטופלסמה, הכולל גם את הפלסמיד Ti-DNA, יתערבב עם הנוזל במבחנה, וכן על מנת להרוס אנזימים (כמו נוקלאזות) ורכיבי תא אחרים, אשר עלולים לעכב את תהליך ה-PCR.

הוראות עבודה להכנת ריאקציית ה-PCR:

בניסוי זה תגבירו את הגנים VirDC ו-VirDE המצויים בפלסמיד Ti-DNA. לגנים אלה תפקיד עיקרי ביכולת של החיידק להחדיר את הפלסמיד לתאי הצמח והם ייחודיים לחיידקי אגרובקטריום, חיידק האגרובקטריום הוא היצור הנחקר בניסוי זה. את מקטע הגן VirDC, אשר גודלו הצפוי הוא 224bp (זוגות נוקלאוטידים), תגבירו באמצעות הפריימרים (תחלים) P1 ו-P2. הסבר על תחלים – פריימרים תוכלו למצוא [בקישור הבא](#). את מקטע הגן VirDE, אשר גודלו הצפוי הוא 338bp (זוגות נוקלאוטידים) תגבירו באמצעות הפריימרים (תחלים) P1 ו-P3.

בשלב זה תוסיפו למבחנות הניסוי, A, A1, B, B1, C1, C2 (המכילות מים וחיידקים לאחר טיפול הרתחה) את כל המרכיבים החיוניים להגברת מקטעי ה-DNA במכשיר ה-PCR.

- בשלבים הבאים עליכם להקפיד שכל החומרים, וכן המבחנות שתכין, יהיו באמבט קרח.**
11. באמבט הקרח שלפניכם מצויים החומרים לתהליך ה-PCR. הוסיפו את החומרים בכמויות המתאימות, על פי הפירוט בטבלה הבאה:

מבחנה	מיקס TAQ (מיקרוליטר)	פריימר P1 (מיקרוליטר)	פריימר P2 (מיקרוליטר)	פריימר P3 (מיקרוליטר)
A	13	1	1	-
A1	13	1		1
B	13	1	1	
B1	13	1		1
C1	13	1	1	
C2	13	1		1

12. החליפו לטיפ חדש בכל דגימה של נוזל אל מבחנות ה-PCR.
13. סגרו את המבחנות, וסרכזו אותן למשך מספר שניות באמצעות הצנטריפוגה, על מנת לוודא כי כל התמיסות נמצאות בתחתית המבחנה (Short spin).
14. העבירו את כל המבחנות אל מכשיר ה-PCR.

15. מכשיר ה-PCR מתוכנת בהתאם הנחיות הבאות. התוכנית של הפרוטוקול הבא תקרא "AGRO VIRD".

תכנות מכשיר ה-PCR

מספר מחזורים	טמפרטורה (°C)	זמן
1	95	300 שניות
30	94	45 שניות
	60	45 שניות
	68	45 שניות
	68	180 שניות
1	68	כ- 76 דקות

16. בזמן ההמתנה לסיום התהליך, הכינו את הג'ל להפרדת DNA באלקטרופורזה.

ניסוי - הרצת תוצרי PCR בג'ל אלקטרופורזה

אלקטרופורזה בג'ל¹ (Gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד קטעי DNA שונים מתוך תערובת על פי מהירות התנועה של אותם רכיבים בשדה חשמלי. ההפרדה נעשית בתוך ג'ל אגרוז² שהוא חומר מוצק למחצה, היוצר מבנה מוצק דמוי מסננת בעלת חורים בגדלים שונים. הגורמים העיקריים המשפיעים על מהירות הנדידה של הרכיבים (מולקולות DNA) הם המטען החשמלי וגודלם, כלומר כמות הנוקלאוטידים במקטע. מולקולות ה-DNA טעונות באופן טבעי במטען חשמלי שלילי, לכן בהפעלת שדה חשמלי, הם ינדדו דרך ג'ל האגרוז מהקוטב השלילי אל הקוטב החיובי. מכיוון שג'ל האגרוז הוא רשת סבוכה של רב סוכר אגרוז המכילה חורים בגדלים שונים, מולקולות DNA קצרות (קטנות) ינועו דרכו במהירות גדולה יותר בהשוואה למולקולות DNA ארוכות יותר (גדולות). כתוצאה מכך, לאורך זמן ההרצה ייווצרו פסים בין מולקולות גדולות למולקולות קטנות, כלומר תיווצר הפרדה ביניהן. לפיכך, בתום הרצת הדגימה במכשיר האלקטרופורזה תוכלו לקבוע האם דגימת ה-DNA שהופקה והוגברה בשלבי הניסוי הקודמים מכילה DNA של החיידק ריזוביום רדיובקטר. קביעה זו תעשה באמצעות זיהוי של הגנים על-ידי מדידת אורך מולקולות DNA של התוצרים.

בניסוי זה הגברתם את הגנים VirDC, מקטע בגודל 224 זוגות נוקלאוטידים, ו-VirDE, מקטע בגודל 338 זוגות נוקלאוטידים, המצויים בפלסמיד Ti-DNA. לגנים אלה תפקיד עיקרי ביכולת של החיידק להחדיר את הפלסמיד לתאי הצמח והם ייחודיים לחיידקי אגרובקטריום, כגון החיידק ריזוביום רדיובקטר.

¹ עתידיה, י., גנטיקה עמ' 328, מילון מונחים
² אגרוז הוא רב סוכר אותו מפיקים מאצות

את גודל המקטעים תשוו לגודל מקטעים בדגימת DNA הנקראת סולם (Ladder) – ובה מספר מקטעי DNA בגדלים ידועים מראש. מרחק "הנדידה" בגיל האגרוז של המקטע בהגברתם יהיה דומה למרחק הנדידה של אחד מן המקטעים בסולם וכך תוכלו לדעת האם קיבלתם את גודל המקטע המתאים.

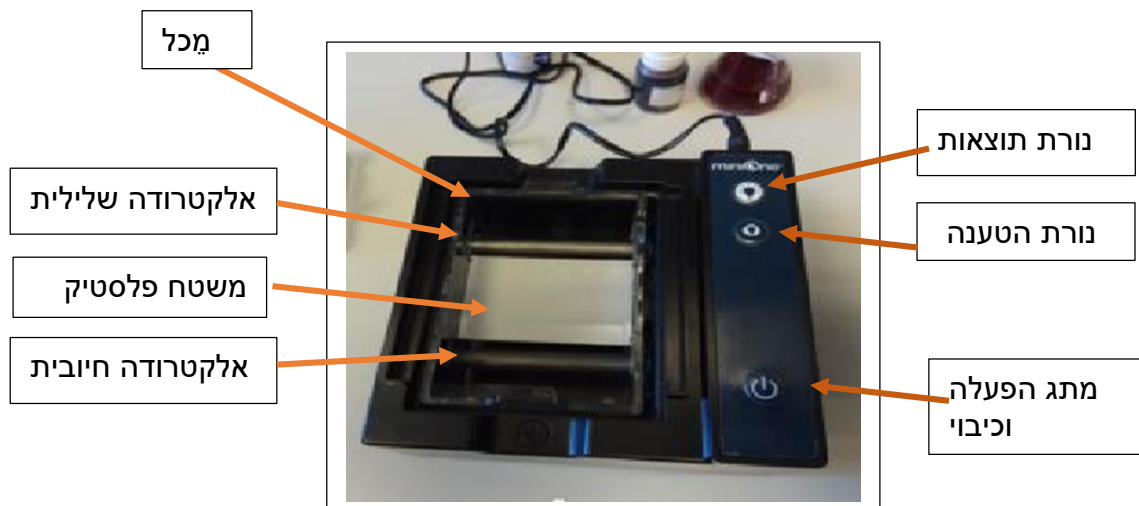
לידיעתכם:

דגימות ה-DNA צבועות בצבע נקשר ל-DNA בין הבסיסים A ו-T הצבע מאפשר לנו לזהות את מיקום ה-DNA בגיל מאחר ואת ה-DNA לא ניתן לראות בגיל. הצבע זורח באור ירקרק כאשר הוא מוקרן באור כחול וכך ניתן להבחין במקטעי ה-DNA.

שלבי העבודה:

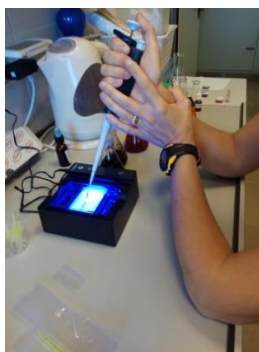
- וודאו שמשטח הפלסטיק התחתון המונח בתחתית המכל שבמכשיר האלקטרופורזה הוא בצבע שחור (כך תוכלו לצפות בתוצאות).
- הניחו את התבנית עם הגיל במקום המתאים במכשיר האלקטרופורזה (תמונה 1).
- א. העבירו באיטיות את הבופר TAE למכל המכשיר, עשו זאת כך:
 - העבירו את הבופר מהבקבוק למשורה.
 - באמצעות משורה מזגו את הבופר על פני תבנית הגיל בצד הקרוב לאלקטרודה החיובית עד שהגיל יהיה טבול בתמיסה ואת יתרת הבופר מזגו בצד הקרוב לאלקטרודה השלילית. כך הנוזל במכל יהיה גבוה רק במעט (1-2 מ"מ) מגובה הגיל שבתבנית.

תמונה 1: מכשיר הגיל אלקטרופורזה



שלב א: הטענת הבאריות בדגימות ה-DNA

קראו בעיון את סעיפים ג-ד, וודאו שההנחיות ברורות ורק אז התחילו בביצוע.



תמונה 2: אופן החזקת המיקרופיפטור

- ב. עליכם להעביר 5 μ L תמיסה ממבחנת אפנדורף המסומנת DNA LADDER לבארית המתאימה בג'ל.
- עשו זאת כך:
- היעזרו במיקרופיפטור בנפח 2-20 μ L (p20) וכוונו אותו לנפח של 5 μ L. חברו טיפ מתאים.
- הדליקו את נורת ההטענה (תמונה 1).
- את ההטענה עליכם לבצע כששני המרפקים שלכם נשענים על משטח העבודה (תמונה 3). תנוחה זו תייצב את המיקרופיפטור.
- שאבו תמיסה ממבחנת האפנדורף המסומנת - סולם DNA LADDER (טבלו רק את קצה הטיפ בתמיסת הצבען כדי שלא ייצמד נוזל נוסף לצדו החיצוני של הטיפ).
- החזיקו את המיקרופיפטור מעל לבארית "1" (הראשונה מצד שמאל).
- החדירו את הטיפ בעדינות לבארית ושחררו את התמיסה אל תוך הבארית.

תזכורת:

- יש להשתמש בטיפ חדש לכל העברה. לאחר העברה של כל תמיסה יש להחליף את הטיפ במיקרופיפטור.
- טיפ משומש יש להשליך לכלי הפסולת.

חזרו על הוראות סעיף ג עם תמיסה במבחנת PCR אך הפעם דגמו 10 μ L. כך עם כל מבחנות ה-PCR שהכנתם, אחת אחרי השניה. לא לשכוח להחליף טיפ ממדגימה לדגימה.

שימו לב: אם אין מספיק באריות בג'ל לכל הדגימות, יש לחלקן לשני ג'לים, כאשר כל ג'ל חייב להכיל דגימת סולם (DNA ladder).

טבלה 2: דוגמה לסדר שבו הדגימות ממבחנות ה-PCR נטענו בג'ל אגרו.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	בארית
DNA Ladder	A	A1	B	B1	C1	C2			הדגימה שהוטענה

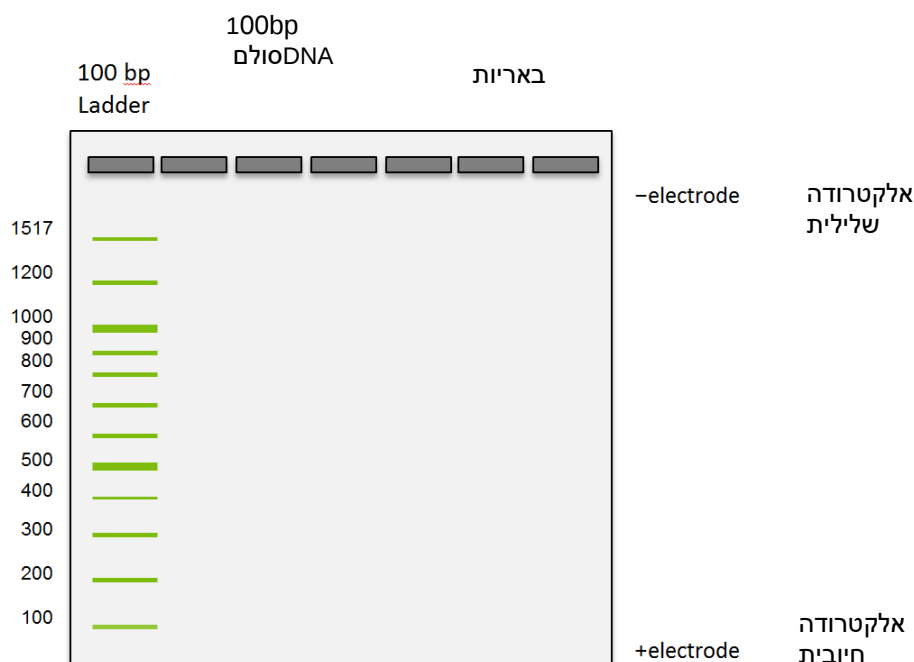
- בסיום ההטענה כבו את נורת ההטענה, כסו את מכשיר הג'ל במכסה הפלסטיק שצבעו כתום.

שלב ב- הרצת דגימות ה DNA בג'ל

- ג. לאחר שקבלתם אישור מהמורה הפעילו את מכשיר האלקטרופורזה באמצעות לחיצה על כפתור ההפעלה.
- חל איסור לפתוח את קופסת המכשיר כל עוד המכשיר פועל ועובר בו זרם חשמלי!
את נורת הצפייה בתוצאות (תמונה 1) אפשר להדליק רק לזמן קצר במהלך ההרצה.
- ד. לאחר שהמכשיר פעל במשך 5 דקות שימו לב שאתם מבחינים בהתקדמות ה- DNA בג'ל. אם אינכם רואים את התקדמות הדגימות בג'ל קראו למורה
- ה. המשכו להפעיל את מכשיר הג'ל אלקטרופורזה עד שדגימת הצבע שנעה מהר ביותר מגיעה למרחק של שני שלישי מקו סיום בקצה הג'ל. תהליך זה נמשך בערך 15 דקות.
- ו. **כבו את המכשיר ואל תסירו את המכסה הכתום.**
- ז. הדליקו את נורת התוצאות (תמונה 1) והסתכלו על הג'ל **מבעד** למכסה.
- **שימו לב** לנוכחות או להעדר **פסים (bands)** בכל אחד מהטורים.
- ח. הניחו את המצלמה של הטלפון הנייד על החלון שבחלקו העליון של המכסה הכתום וצלמו את התוצאות שהתקבלו בג'ל. על פי רוב, הפסים הנראים בצילום בולטים יותר בהשוואה למה שנראה בהסתכלות.
- ט. כבו את נורת התוצאות והסירו את המכסה כתום.
- הוציאו בזהירות את התבנית ובה הג'ל ממכל המכשיר (תמונה 1).
- בעזרת הלבורנט או המורה הפרידו בעדינות את הג'ל מהתבנית והשליכו את הג'ל לכלי הפסולת.
- י. ודאו כי התבנית השקופה בה היה הג'ל נמצאת על המגש.
- השליכו את המבחנות והכפפות לכלי הפסולת.
- יא. **קבלו מהלבורנט צמר גפן ספוג באלכוהול. נקו את משטח העבודה עליו עבדתם.**
רחצו ידיים במים וסבון.

דף איסוף נתונים

הוראות: אחרי שביצעתם את הניסוי על כל שלביו סמנו את התוצאות שהתקבלו בגיל.



הגודל הצפוי של הדגימות:

תוצר בגודל 224 bp מקורו בגן הוירולנטי VirDA

תוצר בגודל 338 bp מקורו בגן הוירולנטי VirDE

בביקורות השליליות כלומר, C1, C2 – לא אמור להתקבל תוצר כלשהו.

ענו על השאלות הבאות:

1. קבעו איזו צלחות פטרי, A או B הכילה חיידקי אגרובקטריום. נמקו את קביעתכם חיידקים אלה ישמשו אתכם להדבקה של שורש גזר, במטרה ליצור בו גידולים ממאירים.

2. הציעו הסבר לכל אחת מהתוצאות המתוארות בסעיפים א-ד:

- התקבל תוצר גם בביקורת השלילית.
- התקבל תוצר בביקורות החיוביות, אך לא בדגימות שלכם.
- לא התקבלו מקטעי DNA באף אחד מהמקרים, כולל לא בסולם הגדלים של ה-DNA.
- בדגימות שלכם התקבל תוצר נוסף על התוצרים הצפויים שגודלו שונה מהצפוי.

הדבקת פרוסות גזר הגינה בחיידקי (*Rhizobium radiobacter*, CP58)

כלים וחומרים:

1 גזר בינוני

סכין חיתוך ממתכת

2 צלחות פטרי מרופדות במגבת נייר לחה או באגר (לא מזין)

מים מזוקקים מעוקרים בנפח של 100 מ"ל – בבקבוק שטיפה.
70% אתנול בנפח של כ- 200 מ"ל לשטיפת הגזרים – בקערת שטיפה.
מקל סטרילי לזריעת חיידקים (חד פעמי או רב פעמי)
גזייה ליצירת תנאים סטריליים
נייר פאראפילם
מבחנה עם 500 μ L חיידקי אגרובקטריום במצע נוזלי NB (מהולים 1: 10000 מתרבית לילה)

שלבי הניסוי:

1. שטפו את הגזר היטב במים פושרים וסבון, ונגבו היטב אמצעות נייר מגבת.
2. השרו את הגזר השטוף למשך דקה אחת באתנול 70%.
- נגבו את הגזר באמצעות מגבת נייר נקייה.
3. באמצעות בקבוק השטיפה ובו מים מזוקקים, הרטיבו את נייר המגבת בכל אחת מצלחות הפרטי, באופן שהנייר יהיה ספוג היטב, אך ללא עודפי מים.
4. באמצעות סכין נקי (חובה לנגב את להב הסכין באתנול 70% ולשרוף למשך 5-10 שניות באש) חיתכו שש פרוסות עגולות (דסקיות) בעובי של כ- 0.5 סנטימטר מהגזר. השתדל שהפרוסות תהיינה שוות קוטר.
4. באמצעות מלקטת סטרילית (טבלו אותה לכמה שניות באלכוהול ויבשו באוויר), העבר 3 פרוסות גזר לכל אחת משתי צלחות הפטרי שברשותך, המרופדות מגבת נייר.
5. סיגרו את הצלחות וסמנו אחת מהן ב"הדבקה" ואת השנייה ב"ביקורת". רשמו את שמכם ואת התאריך על כל אחת מן הצלחות.

לידיעתך: אגרובקטריום חודר לרקמות צמחים רק דרך אזורים פצועים, כלומר, אזורים בהם נהרסו דפנות התאים והקרומים שלהם. חיתוך הפרוסות באמצעות סכין גרם לפציעת התאים בשטח הפנים החתוך, באופן שמאפשר את החדירה של חיידקים אגרובקטריום אל הרקמה.

6. הדביקו דסקית גזר מהצלחת המסומנת "הדבקה" באופן הבא:
 - א. טיבלו למשך 3 שניות מקל זריעה סטרילי בתרחיף החיידקים שבמבחנת האפנדורף שעל שולחןך.
 - ב. העבירו את קצה מחט הזריעה על פני אחת מפרוסות הגזר באחת מהצלחות בתנועת זיג זג - משך מספר שניות. העבירו את מקל הזריעה לפח הפסולת הביולוגית.
 - ג. חיזרו על פעולות א-ב גם עבור שתי פרוסות הגזר בנוספות בצלחת המסומנת "הדבקה".
 - חיזרו על סעיפים 5-ב-5 עם פרוסות הגזר בצלחת המסומנת "ביקורת". שימו לב: אין לטבול את מקל הזריעה בחיידקים במקרה זה.
 7. עטפו את שתי צלחות הפטרי באמצעות נייר פראפילם (על מנת לשמור על תנאי לחות) והדגירו את הצלחות למשך כשבועיים בטמפרטורה של 30°C לשלושה עד ארבעה שבועות בטמפרטורת החדר במקום מואר.
 8. אחת לשלושה ימים יש לבדוק את מידת הלחות בנייר הסופג בתחתית הצלחת, ולהוסיף מעט מים במידת הצורך.

לידיעתכם: לאחר ההדבקה והחדרת ה-DNA החיידקי לגנום הצמח חל שיבוש בבקרת ביטוי הגנים בתאים אלה, ונוצר הגידול הממאיר. במרבית המקרים, השיבוש בבקרת הגנים מביא ליצירת כלורופיל התאי שורש הגזר (שאינו נוצר בהם בתנאים טבעיים). החשיפה לאור מאפשרת את יצירת הכלורופיל ואת הגברת קצב ההתפתחות של הגידול.

הכנת מתקן מיקרוסקופי מרקמת גזר בריאה ומרקמת גידול וצפייה בחיידקי אגרובקטריום (*Rhizobium radiobacter*, CP58)

- הכינו מתקן מיקרוסקופי להשוואה בין תאי גידול לתאים של רקמה בריאה מגזר, באופן הבא:
1. טפטפו טיפת מים מזוקקים על גבי זכוכית נושאת.
 2. באמצעות סקלפל, גרדו מעט רקמה מאזור הגידול באחת מפרוסות הגזר הנגועות שעל שולחן.
 3. באמצעות מחט מתקן, הורידו מעט מהרקמה שגרדת לטיפת המים שעל גבי הזכוכית הנושאת.
 4. כסו באמצעות זכוכית מכסה, והתבוננו בתכשיר שהכנת במיקרוסקופ, תחילה בהגדלה קטנה ולאחר מכן בהגדלה בינונית.
 5. ציירו חלק רקמה המכיל 3-4 תאי גידול. סמן בציור את חלקי התא העיקריים הנראים לעין.
 6. חיזרו על סעיפים 1-6, אך הפעם עם רקמת גזר בריאה, מפרוסת גזר טרי שעל שולחן.
 7. סכמו את ההבדלים העיקריים בין רקמת גידול לרקמה בריאה, כפי שעולים מהתצפית שערכת.
- האם הבחנתם, במתקן שהוכן מגידול, בתאים קטנטנים הנעים במהירות סביב תאי רקמת הצמח? אילו הם תאים של חיידקי אגרובקטריום.**
8. על שולחנכם מבחנה ובה חיידקי אגרובקטריום שגודלו למשך 24 שעות במצע גידול נוזלי.
 9. באמצעות פיפטת פסטר, טפטפו טיפה אחת מהתרבית על זכוכית נושאת, וכסו מייד בזכוכית מכסה.
 10. התבוננו בהגדלה בינונית ובהגדלה גדולה. תארו את תצפיותיכם.
 11. הציעו דרך להוכיח, כי החיידקים בהם צפית בקרבת תאי הגידול הם **אכן חיידקים אגרובקטריום**.

זריעת בידוד מחיידקי אגרובקטריום שמקורם בגידול (*Rhizobium radiobacter*, CP58)

- בפעילות זו תבצעו זריעת בידוד של חיידקים שמקורם בגידול ממאיר בגזר. מושבות בודדות שיתקבלו מזריעה זו יוכלו לשמש להכנת תרבית לילה להדבקת גזרים נוספים, או לביצוע Colony PCR.
- חטאו היטב את שולחן העבודה על ידי ניגובו עם תמיסת אתנול 70%.
1. חטאו סקלפל או קצה סכין באמצעות ניגובו בנייר מגבת ספוג אלכוהול 70% ושריפה שלו למשך מספר שניות בלהבה.
 2. באמצעות הסקלפל, פיצעו מעט את אחד מהגידולים בפרוסת הגזר שעל שולחן.

3. געו עם מקל זריעה סטרילי למשך 3 שניות לפחות בגידול הפצוע, ומיד לאחר מכן העבירו את קצה המקל בתנועות זי-זג על פני צלחת פטרי המסומנת "אגרובקטריום מגזר" שבה מצע מזון מוצק – אגר מזין, NA.
4. ניתן לחזור על פעולה זו במספר אזורים בצלחת (לא חובה), היעזרו באיור:



5. סיגרו את צלחת הפטרי, רישמו עליה את שמכם ואת תאריך הביצוע.
6. הדגירו באינקובטור את הצלחת (הפוכה) למשך 24-48 שעות בטמפרטורה של 30°C . או בטמפרטורת החדר.