

1.2 שם המחקר - הקמת תשתית גנומית לייסוד תכנית טיפוח לדג דקר המכמורת

2.2 פרטי החוקרים ותפקידם במחקר

גדעון חולתא, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי – (vlaqua@volcani.agri.gov.il)

ריכוז המחקר, גנטיקה של דגים

מיכה רון, אנדרי שיראק, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי (ממ"ח)

גנומיקה – פיתוח סמנים, אנליזות מעבדתיות וחישוביות

סרגיי גורשקוב, המכון לחקלאות ימית (מלח"י), חקר ימים ואגמים לישראל

גנטיקה של דגים, אחזקה, ריבוי והכלאת האוכלוסיות

3. תקציר מדעי של תוכנית המחקר

דקר המכמורת המוכר בארץ בשם העממי "לוקוס" הינו דג מאכל טעים, איכותי וחשוב בארצות אגן הים התיכון ובעל מחירי שוק גבוהים. גידול הדקרים בעולם מתבסס בדרך כלל (להוציא את סין וטיוואן) על לכידת דגיגים צעירים בבר ופיטומם במתקני חקלאות ימית שונים, דבר הפוגע בסביבה וגורם להספקה לא סדירה של דגים לצרכן. לא ידוע על חקלאות מים בקנה מידה מסחרי של דג זה בארצות הים התיכון. דג הדקר נמצא בשלבי מו"פ שונים במלח"י במהלך השנים האחרונות; קיימות מספר להקות רבייה שמקורן בטבע או צאצאי דגים מהטבע. במהלך עונת 2008 התקבלו כ- 50 מליון ביצים (55% אחוזי הפרייה) ו- 11,500 דגיגים (0.042%). הקמת תשתית גנומית תאפשר אפיון השונות הגנטית באוכלוסייה, ליווי והכוונה של תהליך הביות, ממשק חומר רבייה לבקרה של קרבה גנטית למניעת עליה בשארות, וייסוד תכנית טיפוח לקצב גדילה. התשתית הגנטית לדגי דקר בעולם נמצאת בשלבים ראשונים של פיתוח, ואינה קיימת כלל לדקר המכמורת. כ- 320 רצפים של סמנים מיקרוסטליטים פותחו בכשמונה מיני דקר ומופקדים ב-NCBI, אף לא אחד מהם בדקר המכמורת. בסמנים אלה נעשה שימוש לחקר השונות הגנטית באוכלוסיות של דקרים אחרים ולפיתוח כלי עזר בממשק להקות רבייה. העדויות מצביעות על שונות גנטית רבה ורמה גבוהה בשיעור ההטרוזיגוטיות בסמנים מיקרוסטליטים באוכלוסיות הבר המשמשות כמקור לתהליך הביות (ראה למשל Rivera et al., 2003; Antoro et al., 2005).

תוכנית המחקר תכלול מספר נושאים. א. הרחבת המגוון הגנטי ע"י דיגום אוכלוסיות נוספות של דקר המכמורת, הבאתן למלח"י ואקלומן. ב. איסוף דגימות סנפיר מכל הדגים בלהקת הרבייה והפקת DNA. ג. אפיון שונות גנטית וקרבה משפחתית בעזרת סמים גנטיים. ד. התחלת מבחני ביצועים של אוכלוסיות דקר המכמורת ומכלואים ביניהן.

4. מבוא ותיאור הבעיה

1.4 מבוא: דקר המכמורת (*Epinephelus aeneus*; Perciformes, Serranidae) המוכר בארץ בשם העממי "לוקוס" הינו דג מאכל טעים, איכותי וחשוב בארצות אגן הים התיכון ובעל מחירי שוק גבוהים. הדג הינו הרמפרודיט המשנה את הזוויג במהלך חייו, אותם הוא מתחיל כנקבה ובהמשך הופך לזכר. ניתן לאמוד את הפרודוקטיביות של נקבת דג הדקר, בסדר גודל של 500-600 אלף ביצים לק"ג גוף לעונה. גידול הדקרים בעולם קיים כיום רק במזרח אסיה (סין, הונג קונג, סינגפור, תאילנד, טיוואן, פיליפינים) ושם מתבסס בעיקר על לכידת דגיגים צעירים בבר ופיטומם במתקני חקלאות ימית שונים, דבר הפוגע בסביבה וגורם להספקה לא סדירה של דגים לצרכן. בסין וטיוואן

ישנו ריבוי בשבי של מספר מיני דקרים, אולם המערכות הן אקסטנסיביות ואינן מתאימות לתנאים הקיימים בארצות הים התיכון. לא ידוע על חקלאות מים בקנה מידה מסחרי של מין דקר כלשהו בארצות הים התיכון. הדקר המכמורת נמצא בשלבי מו"פ שונים במלח"י מזה כמה שנים. במלח"י קיימות היום מספר להקות רבייה שמקורן בטבע או צאצאי דגים מהטבע. במהלך עונת 2008 התקבלו כ- 50 מליון ביצים (55% אחוזי הפריה) ו- 11,500 דגיגים. אחד מצווארי הבקבוק החשובים שיש להתמודד איתם הוא ללא ספק שיפור השרידה, וזאת ע"י שיפור ממשק שלבי האימון. תוצאות הגידול הראשוניות שהתקבלו באילת מצביעות על קצבי גדילה מהירים וצריכה נמוכה של תשומות לגידול (Lupatsch and Kissil, 2005) ובכך יכולים להציע יתרון למגדל הישראלי ביחס לארצות מתחרות באזורנו. תכונות אלו מצביעות על דקר המכמורת כבעל פוטנציאל כלכלי גבוה שגידולו בחקלאות מים עדיין מוגבל בעולם.

הסוג *Epinephelus* כולל למעלה כ-70 מינים מאופיינים בעזרת ברקוד COI DNA (COI) ותפוצתו משתרעת בחגורה הטרופית/סוב-טרופית סביב כדור הארץ (<http://www.boldsystems.org/views/taxbrowser.php?taxid=5958>). התשתית הגנטית לדגי דקר בעולם נמצאת בשלבים ראשוניים של פיתוח, ואינה קיימת כלל לדקר המכמורת. ברקוד גנטי המבוסס על רצף של הגן המיטוכונדריאלי COI נקבע ל-68 מינים של דקר ומאפשר הבחנה ברורה ביניהם (Magio et al., 2005; Ward et al., 2005), אך דקר המכמורת אינו ביניהם. לאחרונה השתמשנו באנליזה של רצף גן זה לזיהוי מיני האמנוניים הקיימים בארץ (Shirak et al., 2009) ומדגם של כ-30 מיני דגים מהים התיכון (שיראק, רון וחולתא, טרם פורסם). במחקר זה גילינו הבדלים משמעותיים ברצף של COI במספר מינים המצביעים על קיומם של תת מינים שאינם נבדלים באופן מורפולוגי. הממצא חשוב לבחירה ראשונית של חומר גנטי לפיתוח קווים מסחריים. בהמשך בכוונתנו להוסיף גם את מיני הדקרים שנמצאים בחופי ישראל לאנליזה של רצף COI. כ-210 רצפים של סמנים מיקרוסטליטים פותחו ב-11 מיני דקר ומופקדים ב- GenBank (נכון ל-27/8/2009), אך אף לא אחד מהם בדקר המכמורת. מניסיונו באמנוניים (Palti et al., 2002; Cnaani and Hulata, 2008) קימת סבירות גבוהה כי חלקם יהיו רלבנטיים גם לדקר המכמורת. בסמנים אלה נעשה שימוש לחקר השונות הגנטית באוכלוסיות של דקרים אחרים (Rivera et al., 2003; Antoro et al., 2005) ולפיתוח כלי עזר בממשק להקות רבייה (Lo and Yue, 2007). העדויות מצביעות על שונות גנטית רבה ורמה גבוהה בשיעור ההטרוזיגוטיות בסמנים מיקרוסטליטים באוכלוסיות הבר המשמשות כמקור לתהליך הביוות. הקמת תשתית גנומית לדקר המכמורת תאפשר אפיון השונות הגנטית באוכלוסיות שלו, בחירה ראשונית של חומר גנטי בעל פוטנציאל גבוה, ליווי והכוונה של תהליך הביוות, שיוך צאצאים להורים לממשק חומר רבייה שימנע עליה בשארות, וייסוד תכנית טיפוח לקצב גדילה.

2.4 תאור הבעיה: דקר המכמורת הינו הרמפרודיט פורה ביותר (בתהליך ההתבגרות מתפתח מין זה לנקבה אשר הופכת לאחר מספר שנים לזכר, לאחר הגיעה לגודל מסוים), אשר מציג התנהגות רבייתית חברתית הירארכית בה משתתפים מספר גדול של פרטים, אך מעטים מהם מטילים ביצים ומשחררים זרע. זאת אומרת שבתוך אוכלוסיה של דקר קיימת התמחות פרטים ל-"breeders" ו-"helpers" זכריים ונקביים, וקרוב לוודאי שלסוג ההתמחות מרכיב גנטי. מערכת רבייתית שכזו גורמת לשונות גבוהה בגודל הצאצאים וליעילות נמוכה של סלקציה. לכן אחת מהמטרות של מניעת שארות גבוהה היא שמירה על מגוון תפקידים רבייתיים. אנחנו מקווים שתוך כדי מעקב בסמנים מיקרוסטליטים ניתן יהיה גם לזהות אזורים גנומיים המעורבים בהתמחות רבייתית. מאידך בספרות קימות עדויות בודדות ממין אחר של דקר כי אפשריים תנאים גם להפריה בזוגות (Zabala et al., 1997). עם מערכת רבייתית שכזו אנו מצפים לקבל הבדלים גדולים בתרומה הגנטית של הנקבות והזכרים השונים שבלהקת הרבייה לצאצאים. התוצאה

המתקבלת במצבים מסוג זה היא גודל אוכלוסיה אפקטיבי קטן מאחר ורק חלק מהדגים משתתפים בהטלה ובהפרייה. צמצום בגודל האוכלוסיה מעלה הסיכון לעליה בשארות באוכלוסיות של דגים מבויתים (Tave, 1999). במרכז מחקר לחקלאות ימית (מלח"י) באילת מספר קבוצות של דגי דקר מכמורת בוגרים - קבוצות D1, D2, D3 ו-D5 (טבלה 1). להקות רבייה נוספות מוחזקות גם במכוני הרבייה של ערדג ושל מעגן מיכאל. בנוסף קיימות קבוצות של דגים צעירים (ילידי 9-2008) אשר תוכלנה לשמש בעתיד לרבייה, ואולם מספר ההורים שהשתתפו ביצירתם והקרבה הגנטית ביניהם אינה ידועה.

טבלה 1. פירוט להקות רבייה קימות של דקר המכמורת.

קבוצה	דור (מקור)	מועד הטלה	פוטופריודה	מספר	משקל גוף (ק"ג)
D1	G1 (NCM-Ardag)	אוגוסט-2005	NP	19	3.5-5
D2	G1 (NCM-Ardag)	אוגוסט-2005	NP	18	3.5-5
D5	G1 (NCM-Ardag)	אוגוסט-2005	SP	35	3.5-5
D3	Wild (MED 2007-2008)	לא ידוע	NP	7	2-5.5
קבוצה	דור (מקור)	מועד הטלה	פוטופריודה	מספר	משקל גוף (ג')
"רבייה"	G1 (Maagan Michael)	2008	NP	35	200-500
"פיילוט"	G1 (Maagan Michael)	2009	NP	~14000	10-15
"פיילוט"	G2 (NCM-Ardag)	2009	NP	~2000	10-15
"הזנה"	G2 (NCM-Ardag)	2009	NP	~3000	5-15

G1 = דור ראשון בשבייה (צאצאי דגי בר שכבר אינם בחיים); G2 = דור שני בשבייה (צאצאי G1); NP = פוטופריודה טבעית; SP = פוטופריודה מוסטת

דגים אלה מהווים יחדיו את הבסיס הרבייתי של דקר המכמורת בארץ. עקב עדויות לגבי ההתנהגות הרבייתית שתוארו לעיל, החשש העיקרי הוא מירידה חדה בגודל הלהקה האפקטיבי, וכתוצאה מכך רמת שארות גבוהה בין הפרטים (Tave, 1999). אירוע בודד של להקת הורים קטנה מדי מספיק כדי לגרום לנזק גנטי מתמשך לאוכלוסייה כתוצאה מעליה בשארות. רמת שארות גבוהה היא אחת הבעיות הגדולות ביותר בניהול מדגרות שגורמת להקטנה משמעותית של קצבי גדילה, שיעורי חיוניות, פוריות ושרידה, להעלאת שכחות של דגים מעוותים ולפגיעה ביעילות של תכניות טיפוח עתידיות באמצעות סלקציה. תצפיות שנעשו במלח"י בשלבים מוקדמים של התפתחות עוברית בדקר המכמורת (Gorshkova et al., 2002) הצביעו על טווח רחב (35-79%) ברמת הופעת עיוותים הנובעים אולי משינויים כרומוזומליים (chromosomal aberrations) או מסיבות שטרם הובררו.

5. מטרת המחקר

מטרתנו היא הקמתה של תשתית גנטית (שאינה קימת למין זה גם מחוץ לישראל) לתוכנית טיפוח לדקר המכמורת ההולכת ונבנית בישראל. הדרך המתאימה ביותר לייסד את להקות הרבייה ולמנוע את התופעות השליליות המתוארות לעיל, ולקיצור דרך משמעותי של הטיפוח הגנטי הקלאסי, היא בעזרת אפיון כל דגי הרבייה בלהקה על ידי שימוש בסמנים גנטיים מולקולאריים. גישה זו יכולה למנוע שארות. מעבר לכך, פיתוח ויישום שיטה בה יש שימוש בסמנים מולקולאריים להערכת הקרבה בין ההורים הפוטנציאליים המתאימה לדקר המכמורת שברשותנו, יאפשרו לנו מאוחר יותר גם לקבוע באופן מדויק אומדני תורשתיות, ולבצע השוואות ביצועים של צאצאי האוכלוסיות השונות ומכלואים ביניהן.

השלבים הבאים בתהליך הביות המוצעים ע"י מלח"י והמכון לחקר בע"ח במינהל המחקר החקלאי (ממ"ח) הם:

א. המשך איסוף מדגמים של דקרי מכמורת (*E. aeneus*) מאוכלוסיות בר ואוכלוסיות מתורבתות מחופי הארץ ובמידת האפשר גם מאזורים אחרים באגן הים התיכון, להרחבת הבסיס הגנטי של להקת הרבייה (באחריות מלח"י); ב. אחזקה וריבוי להקת הרבייה (באחריות מלח"י); ג. זיהוי הדגים בלהקת הרבייה ובירור הקשרים המשפחתיים ביניהם לייצור הממשק (באחריות ממ"ח); ד. התחלת מבחני ביצועים של אוכלוסיות דקר המכמורת ומכלואים ביניהן (באחריות מלח"י).

הערכה כלכלית: עקב הביקוש הרב לדג הדקר, ישראל, כמו מדינות ים תיכוניות אחרות, ניסתה לפתח את הקלאות הדקר מאז תחילת שנות ה-90 ללא פריצת דרך משמעותית. אחת הסיבות לכך היתה הישרדות נמוכה של השלבים בלרוויים המוקדמים, מה שנפתר ע"י יישום שיטת המזוקוסם. הפוטנציאל הכלכלי של דג הדקר הוא גדול (ייצור של 1000 טון דקר בשנה משמעו במחירי השוק המקומי כ-20 מיליון דולר). בנוסף לכך שפיתוח הדקר מתאים לתנאי הגידול בישראל (הן בכלובים בים והן בבריכות מי-ים אינטנסיביות במים פנימיים מליחים, אף כי הנושא האחרון טרם נבדק וטרם הוכח כאפשרי) זהו צעד נכון והכרחי להתפתחות שלוחת גידול זו שלה פוטנציאל כלכלי גדול, שלא לדבר על אפשרויות ייצוא של דגים משובחים אלו.

6. תיאור מקיף של הפעלת המחקר

שנה ראשונה

א. הרחבת המגוון הגנטי ע"י דיגום אוכלוסיות נוספות של דקר המכמורת, הבאתן למלח"י ואקלומן. תפוצתו בטבע של מין זה בדרום מזרח הים התיכון ובמזרח האוקיינוס האטלנטי לאורך חופי מערב אפריקה עד אנגולה (FishBase 2009). כל הדגים שיאספו יסומנו בשבבים אלקטרוניים לצורך זיהויים בהמשך.

ב. מהלהקות הקיימות ומהחדשות שתגענה בהמשך יילקחו דגימות סנפיר מכל הדגים בלהקת הרבייה ויופק DNA בשיטות הנהוגות במעבדתנו (Zilberman et al., 2006). תיבדק התאמת רצף ברקוד (Shirak et al., 2009) של הדגים עם רצף מיטוכונדריאלי מלא של דקר המכמורת (NCBI, DQ197950), תאופיין שונות ברצף זה ובסמנים המיקרוסטליטיים שזוהו במיני דקר אחרים. במידה ויהיה צורך יותאמו סמנים אלו לדקר המכמורת. מניסיונו באמנונים (Palti et al., 2002; Cnaani et al., 2004) ומניסיון של קבוצות אחרות במינים שונים של דקרים (Zhu et al., 2005; Ramirez et al., 2006; Zhao et al., 2009a,b) קיימת מידה רבה של יכולת הכפלה צולבת (cross-amplification) של סמנים מיקרוסטליטיים שפותחו במין אחד למינים קרובים אחרים. יבוצע ריצוף של מקטעי גנים שמורים המכילים רצפים מיקרוסטליטיים בדגים אחרים במטרה להגדיל מספר הסמנים המיקרוסטליטיים לפחות עד 50 סמנים פולימורפיים מסוג זה המתפצלים בדקר המכמורת. תושלם קביעת רצף ברקוד למינים נוספים של דקר ולמינים קרובים אליו הנפוצים בים התיכון ובים האדום, ותבוצע אנליזה אבולוציונית.

שני היעדים לשנה הראשונה צפויים להיות מושגים ללא קושי.

שנה שנייה

א. הסמנים ישמשו ללימוד המבנה הגנטי של להקת הרבייה ויחסי הקרבה בין הדגים המיועדים לרבייה. יילקחו דגימות סנפירים מקבוצות צאצאים, יקבעו גנוטיפים ב-50 סמנים ובאמצעותם ישויכו הצאצאים למשפחות (זוגות הורים)

ותיערך אנליזה של התרומה היחסית של הורים שונים בהעמדת צאצאים בשיטות מקובלות כדוגמת אלו ששימשו את החוקרים במספר מחקרים שפורסמו בשנים האחרונות: (Castro et al., 2007; Vandeputte et al., 2009; Wang et al., 2009). בשל ממשק הרבייה של הדג, שבו קבוצת הורים (18, 19 ו-35 – ראה טבלה 1 לעיל) הכוללת זכרים ונקבות (ביחס כ-1:1) מאוכלסת במיכל הטלה משותף, הדרך היחידה לוודא כמה מההורים משתתפים בהטלות בפועל היא באמצעות שיוך צאצאים להורים בעזרת סמנים. בעתיד תאפשר שיטה זו זיהוי ההורים של משפחות מצטיינות בתכנית סלקציה לתכונות בהן יוחלט להתמקד.

ב. התחלת מבחני ביצועים של אוכלוסיות דקר המכמורת ומכלואים ביניהן (עם דגי רבייה שהגיעו לבגרות מינית). תבוצע הכלאת דיאלל המאפשרת קבלת פרמטרים גנטיים לתכונות המועמדות לטיפוח – קצב גדילה ושרידה (תורשתיות, הטרוזיס, השפעה אימהית). בחירת הדגים תיעשה תוך שימוש בסמנים שיפותחו להבטחת מרחק גנטי מרבי בין ההורים, ועל בסיס נתונים קודמים לגבי כושר הרבייה שלהם. היתרון של הכלאת דיאלל לעומת השוואת הורים וצאצאים הוא שבניסוי אחד מתבצעת השוואת ביצועים של מספר אוכלוסיות הורים וכל צירופי המכלואים ביניהם. מכלואים אלה ישמשו בהמשך כשלב ראשון ביצירת אוכלוסיה מעורבת בעלת בסיס גנטי רחב ככל האפשר לצורך טיפוח (ראה למשל Thanh et al., 2009; Holstmark et al., 2008; Maluwa and Gjerde, 2006). מבחן הביצועים יכול מדידה של קצבי גדילה, הישרדות ושיעור עיוותים בניסוי דו-שלבי – ביצים משלושה מטלים בכל צירוף תעורבבנה ולאחר הבקיעה יגודלו בתנאים המקובלים במלח"י עד למשקל של 10-15 גרם, בהתאם לפרוטוקולים המקובלים במלח"י. תבוצענה בדיקות ציטולוגיות בדגיגים מעוותים ונורמליים בנסיון לאפיין את התופעה. מאתיים דגיגים מכל קבוצה יסומנו בשבבים אלקטרוניים ויגודלו במיכל משותף למשקל של 300-400 גרם שהוא משקל השיווק במקובל בארץ. בשלב הסימון תילקח מכל דג דגימת סנפיר. הדגימות תישמרנה במבחנות אפנדורף בכוהל עד להפקת DNA, לצורך שיוך למשפחות ולאנליזה לקביעת ההורים שהשתתפו ביצירתן. תוצאות מבחן הגדילה ינותחו ויקבעו השפעות הקו, ואומדני תורשתיות, הטרוזיס ואון כלאיים בתכונות שצוינו לעיל. שני היעדים לשנה השנייה צפויים להיות מושגים ללא קושי.

שנה שלישית

א. השלמת מבחני הביצועים (קצב גדילה בשנה השנייה) וניתוח התוצאות - יקבעו השפעות הקו, ואומדני תורשתיות, הטרוזיס ואון כלאיים. דגי המכלוא שיבחנו יגודלו להורים וישמשו להמשך הכלאות לקבלת אוכלוסייה מעורבת כבסיס לסלקציה בעתיד.

ב. פרסום התוצאות ותכנון מהלכים ראשוניים בתכנית טיפוח לשיפור קצב הגדילה והשרידה.

7. תקציב המחקר

כה אדם ארעי – סטודנט במכון לחקר בע"ח לביצוע המחקר בנושא פיתוח סמנים וקביעת גנוטיפים בלהקת הרבייה. סטודנט/טכנאי במלח"י לביצוע המחקר בדגים עצמם. הוצאות לחומרים – אזילים למעבדה בביולוגיה מולקולארית, מזון וחומרים לאחזקה וריבוי הדגים.

לחוקרים אין מימון ממקורות אחרים לנושא זה או דומה לו.

החוקר הראשי (גדעון חולתא) ישהה בשבתון עד אמצע אוקטובר 2010. עד שובו ימלא את מקומו כחוקר ראשי מיכה רון.

9. רשימת ספרות

- Antoro, S., Na-Nakorn, U., Koedprang, W., 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. *Marine Biotech.*, 8(1), 17-26.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrias, D., Merino, P., Sanchez, L., Martinez, P., 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 272S1, S210-S216.
- Cnaani, A., Hulata, G., 2008. Genome mapping and molecular breeding: tilapias, in: Kocher, TD and Kole, C (Editors), *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals*. Springer Berlin Heidelberg, p. 101-116.
- Cnaani, A., Zilberman, N., Tinman, S., Hulata, G., Ron, M., 2004. Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F₂ tilapia hybrid. *Mol. Genet. Genom.*, 272, 162-172.
- Gorshkova, G.V., Protas, Y., Ben-Atia S., Gorshkov, S., 2002. Cytogenetic examination of early embryonic development in the white grouper *Epinephelus aeneus* (Pisces, Serranidae). *J. Appl. Ichthyol.* 18, 29-34.
- Holtmark, M., Sonesson, A.K., Gjerde, B., Klemetsdal, G., 2008. Number of contributing subpopulations and mating design in the base population when establishing a selective breeding program for fish. *Aquaculture* 258, 241-249.
- Lo, L.C., Yue, G.H., 2007. Microsatellites for broodstock management of the Tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Anim. Genet.*, 39, 84-92.
- Lupatsch, I., Kissil G., 2005. Feed formulations based on energy and protein demands in white grouper (*Epinephelus aeneus*). *Aquaculture* 248, 83-95.
- Maggio, T., Andaloro, F., Hemida, F., Arculeo, M., 2005. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Mycteroperca* genus. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.*, 321, 83– 92.
- Maluwa, A.O., Gjerde, B., 2006. Genetic evaluation of four strains of *Oreochromis shiranus* for harvest body weight in a diallel cross. *Aquaculture*, 259, 28-37.
- Palti, Y., Shirak, A., Cnaani, A., Hulata, G., Avtalion, R.R., Ron, M., 2002. Detection of genes with deleterious alleles in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, 223, 117-128.
- Ramírez, M.A., Patricia-Acevedo, J., Planas, S., Carlin, J.L., Funk, S.M., McMillan, W.O., 2006. New microsatellite resources for groupers (Serranidae). *Mol. Ecol. Notes*, 6(3), 813-817.
- Rivera, M.A.J., Graham, G.C., Roderick, G.K., 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian grouper *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses. *Marine Biotech.*, 5(2), 126-129.
- Shirak, A., Cohen-Zinder, M., Barroso, R.M., Seroussi, E., Ron, M., Hulata, G., 2009. DNA barcoding of Israeli indigenous and introduced cichlids. *The Israeli J. of Aquaculture - Bamidgeh*, 61, 83-88.
- Tave, D., 1999. Inbreeding and brood stock management. FAO Fisheries Technical Paper 392. Rome.
- Thanh, N.M., Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Vu, N.T., Barnes, A., Mather, P.B., 2008. Evaluation of growth performance in a diallel crosses of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture*, 287, 75-83.
- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chavanne, H., Cenadelli, S., Parati, K., Vidal, M.-O., Vergnet, A., Chatain, B., 2009. Response to domestication and selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in separate and mixed tanks. *Aquaculture*, 286 (1-2), 20-27.
- Wang, H.-P., Li, L., Wallat, G., Brown, B., Yao, H., Gao, Z., Tiu, L., O'Bryant, P., Rapp, D., MacDonald, R., 2009. Evaluation of relative growth performance and genotype by environment effects for cross-bred yellow perch families reared in communal ponds using DNA parentage analyses. *Aquacult. Res.*, 40, 1363-1373.
- Yin, S., Liao, J., Huang, H., Chen, G., Zhang, B., Yao, S., 2008. Genetic polymorphism of microsatellite DNA of natural and cultured populations of *Epinephelus malabaricus* in the sea close to Hainan, China. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.*, 14(2), 215-219.

- Zabala, M., Garcia-Rubies, A., Louisy, P., Sala, E., 1997. Spawning behavior of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. Mar. Barcelona*, 61(1), 65-77.
- Zeng, H., Ding, S., Wang, J., Su, Y., 2008. Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus* Bloch). *Mol. Ecol. Resour.*, 8(4), 805-807.
- Zhao, L., Shao, C., Liao, X., Ma, H., Zhu, X., Chen, S., 2009a. Twelve novel polymorphic microsatellite loci for the yellow grouper (*Epinephelus awoara*) and cross-species amplifications. *Conserv. Genet.*, in press, DOI 10.1007/s10592-008-9635-9
- Zhao, L., Shao, C., Liao, X., Chen, S., 2009b. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) and cross-species amplification. *Conserv. Genet*, in press. DOI 10.1007/s10592-008-9593-2.
- Zilberman, N., Reikhav, S., Hulata, G., Ron, M., 2006. High-throughput genomic DNA extraction protocol from tilapias fin tissue (Technical paper). *Aquaculture*, 255, 597-599.
- Zhu, Z.Y., Lo, L.C., Lin, G., Xu, Y.X., Yue, G.H., 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from red coral grouper (*Plectropomus maculatus*). *Mol. Ecol. Notes*, 5(3), 579-581.

10. רשימת פרסומים

רשימת הפרסומים של החוקרים (הרלוונטיים לנושא הנחקר).

גדעון חולתא / מיכה רון / אנדרי שיראק

- Palti, Y., **A. Shirak**, A. Cnaani, **G. Hulata**, R.R. Avtalion, and **M. Ron**, 2002. Detection of genes with deleterious alleles in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, **223**: 117-128.
- Lee, B.-Y., **G. Hulata** and T.D. Kocher (2004). Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*, **92**: 543-549.
- Hulata, G.**, A. Cnaani, T. Slossman, and G.A.E. Gall (2004). Fertility problems in the second generation of a four species tilapia cross. *The Israeli J. of Aquaculture - Bamidgeh*, **56**: 159-165.
- Lee, B.-Y., W.-J. Lee, J.T. Streeleman, K.L. Carleton, A. Howe, **G. Hulata**, A. Slettan, Y. Terai, and T.D. Kocher (2005). A second generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics*, **170**: 237-244.
- Zilberman*, N., S. Reikhav*, **G. Hulata**, and **M. Ron** (2006). High-throughput genomic DNA extraction protocol from tilapias fin tissue (Technical paper). *Aquaculture*, **255**: 597-599.
- Shirak, A.**, E. Seroussi, A. Cnaani, A.E. Howe, R. Domokhovsky, N. Zilberman*, T.D. Kocher, **G. Hulata**, and **M. Ron** (2006). *Amh* and *Dmrt2* genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within QTL regions for sex determination. *Genetics*, **174**: 1573-1581.
- Cnaani, A., B.-Y. Lee, N. Zilberman, C. Ozouf-Costaz, **G. Hulata**, **M. Ron**, A. D'Hont, J.-F. Baroiller, H. D'Cotta, D.J. Penman, E. Tomasino, J.-P. Coutanceau, E. Pepey, **A. Shirak**, and T.D. Kocher (2007). Genetics of sex determination in tilapiine species. *Sexual Development*, **2**: 43-54.
- Shirak, A.**, M. Golik, B.-Y. Lee, A.E. Howe, T.D. Kocher, **G. Hulata**, **M. Ron** and E. Seroussi (2008). Copy number variation of lipocalin family genes for Male-Specific Proteins in tilapia and its association with gender. *Heredity*, **101**: 405-415.
- Shirak, A.**, M. Cohen-Zinder, R.M. Barroso, E. Seroussi, **M. Ron**, and **G. Hulata** (2009). DNA barcoding of Israeli indigenous and introduced cichlids. *The Israeli J. of Aquaculture - Bamidgeh*, **61**(2): 83-88.

סרגיי גורשקוב

- Gorshkov S.** 2008. Fish genetics in Israeli mariculture. Proceedings of International Symp. "On genetics, selection and hybridization in fish". Sankt-Petersburg.
- Gorshkov S.** 2006. Practical genetics in Israeli mariculture. *Isr. J. Aquaculture-Bamidgeh*, 58(4): 238-250.
- Mylonas C.C., Anezaki L., Divanach P., Zanuy S., Piferrer F., Ron B., Peduel A., Ben-Atia I., **Gorshkov S.** and Tandler A. 2005. Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on

growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. Journal of Fish Biology, 67: 652-668.

- Gorshkov S.**, Gorshkova G., Meiri I. and Gordin H. (2004). Culture performance of different strains and crosses of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared under controlled conditions at Eilat, Israel. J. Applied Ichthyology, 20(3): 194-203.
- Gorshkov S.**, Meiri I., Rosenfeld H., Ben-Atia S., Lutzki S., Peduel A., Ron B., Skvortzov A., Gorshkova G., Tandler A. (2003) Parental effects on sex ratios in progeny of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Isr. J. Aquaculture-Bamidgeh, 55(4): 265-273.
- Gorshkova G., Y. Protas, S. Ben-Atia and **Gorshkov, S.** (2002). Cytogenetic examination of early embryonic development in the white Grouper *Epinephelus aeneus* (Pisces, Serranidae). J. Applied Ichthyology, 18: 29-34.