

הקמת תשתית גנומית לייסוד תכנית טיפוח לדג דקר המכמורת (*Epinephelus aeneus*)

Establishing genomic resources for initiation of a breeding program for the white grouper (*Epinephelus aeneus*)

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

המחלקה לעופות ומדגה, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי	גדעון חולתא
גנטיקה, המחלקה למעלי גירה, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי	מיכה רון
גנטיקה, המחלקה למעלי גירה, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי	אנדרי שיראק
המכון לחקלאות ימית (מלח"י), חקר ימים ואגמים לישראל	סרגיי גורשקוב

Gideon Hulata Dept. of Poultry and Aquaculture, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization, PO Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: vlaqua@volcani.agri.gov.il

Micha Ron Animal Genetics, Dept. of Ruminant Science, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization, PO Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: micha@agri.huji.ac.il

Andrey Shirak Animal Genetics, Dept. of Ruminant Science, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization, PO Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: shiraka@volcani.agri.gov.il

Sergei Gorshkov National Center for Mariculture, PO Box 1212, Elat 88112. E-mail: gorshkov_s@ocean.org.il

יוני 2013

תמוז תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא מחק את המיותר *

*** חתימת החוקר**

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. Lior Dor, Andrey Shirak, Sergei Gorshkov, Micha Ron, Gideon Hulata. Development of genetic markers for the white grouper (*Epinephelus aeneus*) *Aquaculture, In Press, Corrected Proof, Available online 26 February 2013*

עמוד	תוכן עניינים:
2	תקציר
3	מבוא
	פירוט עיקרי הניסויים
3	שיטות
3	תוצאות
5	דיון ומסקנות
6	פירוט פרסומים מדעיים
6	ביבליוגרפיה
7	טופס סיכום עם שאלות מנחות

תקציר:

מטרות המחקר היו: א) בדיקת מתאם בין קרבה של מיני דקר שונים לדקר המכמורת לבין יעילות הפיתוח של סמנים מיקרוסטליטיים שפותחו על בסיס רצפי דנ"א ידועים של מיני דקר קרובים, ב) אפיון השוואתי של להקת הורים של מלח"י (במקור במכמורת) לעומת זן הבר, ג) חקר צורת הרבייה של דקר המכמורת בתנאי השבי, ד) בדיקת ירידה ברמת הפולימורפיזם במהלך הדורות.

סמנים מיקרוסטליטיים מרצפי DNA של מינים קרובים נמצאו מתאימים לשימוש בדקר המכמורת. נבחנו 233 וכ- 62% מתוכם נמצאו פולימורפיים. נמצאה אחידות גנטית גבוהה במין בלהקת הרבייה ובדגי הבר. נצפתה ירידה של כ- 40% בממוצע מספר האללים לסמן בין אוכלוסיית הבר לדור שני בשביה. לצורך שיוך הורים לצאצאים נבחרו שמונה סמנים. בדיקת הורות לצאצאי הטלות מהעונה הראשונה העלתה כי הרבייה אינה מונוגמית; נמצאו הטלות בהן השתתפו יותר מזכר אחד ויותר מנקבה אחת; עד כה נמצא זוג הורים דומיננטי בכל הטלה שנבדקה אשר אחראי להעברת החומר הגנטי לרב הצאצאים באותה הטלה. על בסיס הסמנים הטרוולוגיים הפולימורפיים נקבעה אוכלוסיית מיפוי סופית. בוצע ריצוף באמצעות חומר גנטי של צאצא יחיד ועל בסיס המקטעים הארוכים ביותר פותחו סמנים ספציפיים למין. אוכלוסיית המיפוי נבחנה עד כה באמצעות 87 סמנים פולימורפיים, הטרוולוגיים וספציפיים, אשר יחד עם סמנים נוספים יהוו בסיס לפיתוח מפת תאחיזה ראשונית לדקר המכמורת.

מבוא:

העדר מידע על מבנה האוכלוסייה ואופן הרבייה בשבייה מהווה פער ידע המקשה על תכנון ביות דקר המכמורת וטיפוחו בהמשך. בהתאם לכך הצבנו לעצמנו במחקר זה ארבע מטרות: (א) בדיקת מתאם בין קרבה אבולוציונית של מיני דקר שונים לדקר המכמורת לבין יעילות הפיתוח של סמנים מיקרוסטליטיים הטרולוגיים, (ב) אפיון השוואתי של להקת הורים של מלח"י (במקור במכמורת) לעומת זן הבר, (ג) חקר צורת הרבייה של דקר המכמורת בתנאי השבי, (ד) בדיקת ירידה ברמת הפולימורפיזם במהלך הדורות. במהלך השנתיים הראשונות טופלו ברמה זו או אחרת כל ארבע המטרות, כפי שמפורט בהמשך.

פירוט עיקרי הניסויים:

שיטות:

(א) סמני דנ"א מיקרוסטליטיים נבחרו בתור כלי משותף להשגת כל ארבעת המטרות, וכמו כן להשגת מטרה חמישית (שלא נכללה ביעדי המחקר במקור) - בניית מפת תאחיזה של סמנים בדקר המכמורת. הסמנים פותחו ע"י אנליזה של מאגר רצפי דנ"א NCBI, בו הופקדו רצפים של מינים שונים של דקרים המכילים רצפים חזרתיים מסוג $(CA)_n$ המתאימים לפיתוח סמנים מיקרוסטליטיים. ראוי לציין כי עד למחקר זה לא היה בנמצא אף סמן לדקר המכמורת. בדרך זאת פיתחנו 233 סמנים מיקרוסטליטיים שמקורם משמונה מיני דקר שונים ויעילות פיתוחם חושבה לכל מין בנפרד. רצפי הגן המיטוכונדריאלי COI של המינים ושל דקר המכמורת עברו אנליזה לצורך קביעת מרחק אבולוציוני של *E. aeneus* מיתר המינים. נבדק מתאם בין קרבה אבולוציונית של המין לדקר המכמורת לבין אחוזי הצלחה של פיתוח סמנים מיקרוסטליטיים הטרולוגיים. נקבע גם רצף של COI מיטוכונדריאלי בדגי מלח"י ושל דגי זן בר שנאספו לאורך חופי ישראל (מכמורת, יפו ואשדוד) לצורך זיהוי תת מינים ואוכלוסיות שונות.

(ב) בדיקה של 233 סמנים לצורך קביעת יעילות פיתוחם והשוואת מספר אללים ב-12 ההורים של להקת הרבייה של מלח"י וכן ב-12 פרטים של זן בר שנלקחו משני מקומות איסוף שונים (מכמורת ואשדוד). לכל אחד מהסמנים נקבע מספר אללים. סמנים בעלי מספר אללים גבוה (4 ומעלה) במדגם של להקת רבייה של מלח"י נבחרו לבדיקות נוספות לצורך בדיקת התאמתם לקביעת הורות.

(ג) 24 צאצאים מכל אחת משלוש הטלות של להקת הרבייה נבחנו עם שמונה סמנים נבחרים. על פי הבחינה זוהו ההורים שלהם. בוצעו אנליזות לגבי: צורת רבייה בדקר המכמורת, מדגם צאצאים וסמנים הנדרשים לקביעת הורות. הוגדרו עקרונות לפיתוח מבחן מסחרי לקביעת הורות.

(ד) שמונת הסמנים הנבחרים לבדיקת ההורות נבחנו ב-16 ההורים של להקת הרבייה של העונה השנייה ו-24 צאצאים מכל אחת משתי הטלות של להקת רבייה זו נבחנו עם שמונת הסמנים.

(ה) נמצא כי הפרטים שנאספו בבר ושימשו לביות הדקר הלבן, כלומר הורי להקות הרבייה דומים במספר האללים לסמנים הגנטיים בפרטים האחרים אשר נאספו בבר בתקופות אחרות ולכן יוגדרו גם הם כחלק מ"אוכלוסיית הבר". נקבעה הירידה במספר אללים שבלהקת הרבייה לעומת אוכלוסיית הבר.

(ו) בוצעה הפקת חומר גנטי ל-210 צאצאים כאשר על 80 ההפקות המוצלחות ביותר מתוכם בוצעה בדיקת הורות באמצעות 34 סמנים ונבחרו 48 פרטים אשר נקבעו כאוכלוסיית המיפוי.

ח) הוחלט לבצע מהלך של ריצוף באמצעות אחד הפרטים ולפתח לפתח סמנים נוספים לתהליך מיפוי על בסיס תוצאות הריצוף.

תוצאות:

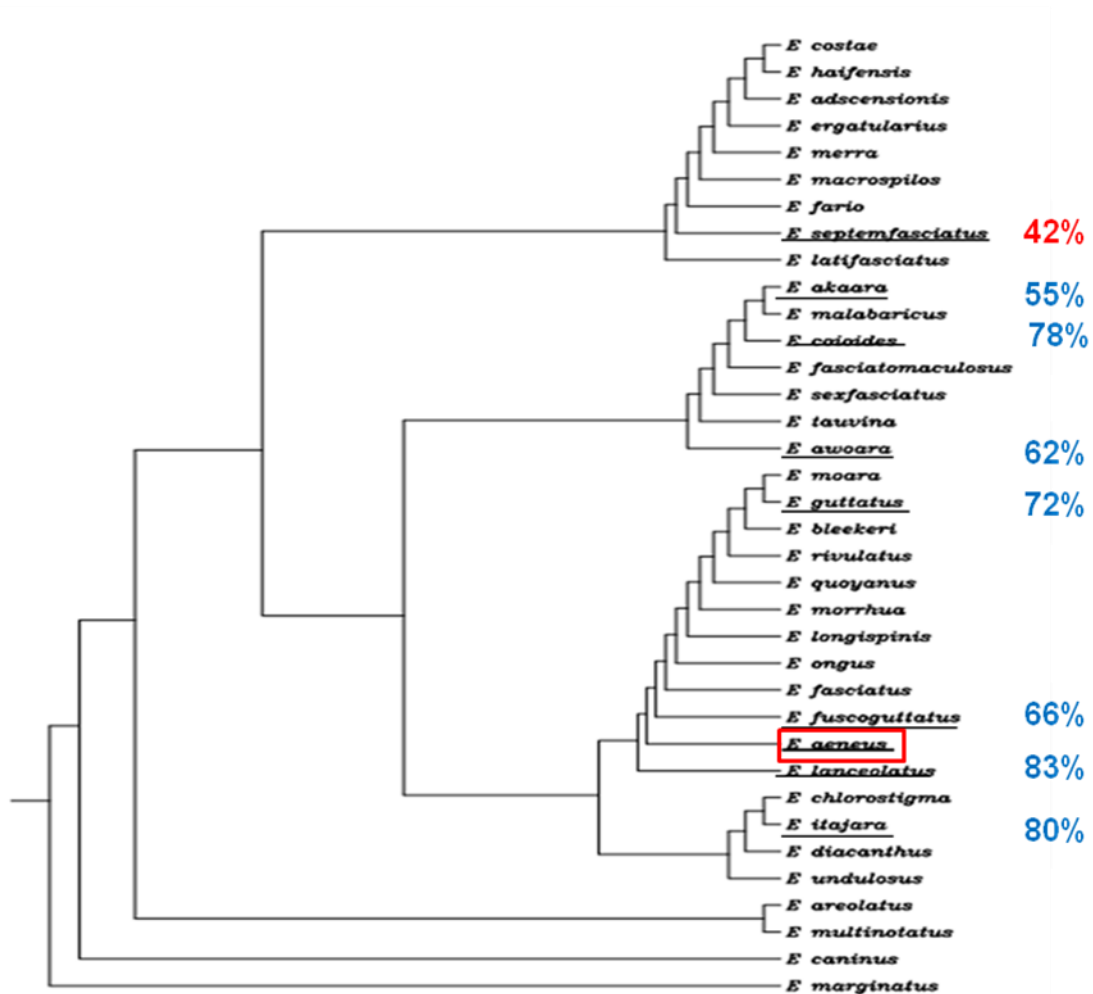
א) במלח"י מוחזקות ארבע קבוצות רבייה, כולן ממקור משותף של אותה הטלה. שתי קבוצות הן דגי F_1 בני חמש שנים פלוס. הקבוצה במיכל D2 (16 דגים) היא בעונה הטבעית ואילו ב-D5 (12 דגים) היא בעונה המוסטת ב-6 חודשים. שתי קבוצות נוספות של דגי F_1 בני שנתיים פלוס שהתקבלו ממעגן מיכאל (D1 ו-D3; 12 דגים בכל מיכל). שלוש הקבוצות הבוגרות והמניבות הן תוצרי הטלה במלח"י ב-2005 אשר הועברו לגידול בערדג וחזרו למלח"י. מכל דגי הרבייה, פרט לדגים בקבוצה במיכל D5 שחלתה ולא הטילה, וכן מדגי בר נלקחו דגימות דם להפקת DNA. כמו כן נדגמו דגיגים מוקדמים מהטלות שונות להפקת DNA.

ב) באנליזה של מאגרי דנ"א זוהו כ-2,100 רצפים של מינים שונים של דקר. 233 רצפים מכילים רצפים חזרתיים המתאימים לפיתוח סמנים מיקרוסטליטיים וכן שייכים למיני דגים אשר להם פורסמו מעל 6 רצפים מתאימים. סמנים פותחו על בסיס רצפי דנ"א של שמונה מינים של דקר (*E. guttatus*, *E. awoara*), הנפוצים בעיקר במזרח הרחוק ובמרכז אמריקה. קבענו רצף של COI מיטוכונדריאלי בדגי מלח"י ושל דגי זן בר שנאספו לאורך חופי ישראל (מכמורת, יפו ואשדוד). בקרב הפרטים של אוכלוסיית הבר ואוכלוסיית ההורים (*E. aeneus*) לא נמצאה שונות ברצף הגן המשמש לצורך זיהוי תת מינים ואוכלוסיות שונות (COI). אנליזה של רצפי COI של דקר המכמורת ושמונת המינים ע"י בניית עץ פילוגנטי מראה כי כולם מהווים מקור טוב לפיתוח כמות מספקת של סמנים מיקרוסטליטיים יעילים לדקר המכמורת.

ג) מתוך 233 סמנים מיקרוסטליטיים שנבדקו 147 (63.1%) עבדו בצורה תקינה והיו פולימורפיים בזן הבר. 144 מתוכם (97.9%) היו גם פולימורפיים בלהקת ההורים של מלח"י. בסמנים אלו נמצאו 6.2 ו-3.7 אללים במוצע בזן הבר ובלהקת הרבייה של מלח"י, בהתאמה. מתוכם נבחרו שמונה סמנים שעבדו בטווח רחב של ריכוזי דנ"א, נמצאו מתאימים להרכבת מבחן לקביעת הורות והופעלו לחוד.

ד) בהטלות של דקר המכמורת נמצאו יותר מארבעה סוגים של גנוטיפים לכל אחד משמונת הסמנים הנבחרים. התוצאה מוכיחה שבהטלות אלה השתתפו יותר מזוג אחד של הורים. ברוב המקרים שלושה מהסמנים הנ"ל בלבד מאפשרים לזהות את ההורים של כל אחד מהצאצאים. אנליזה של שלוש הטלות ראשונות מצאה שבלהקת הרבייה של העונה הראשונה קיים זכר אחד דומיננטי שהשתתף בכל ההטלות. ביחד איתו השתתפו בכל אחת מההטלות נקבות שונות. בהטלה אחת נמצאה נקבה אחת שהשתתפה ובשתי ההטלות האחרות נמצאו שתי נקבות שהשתתפו אך רק אחת מהן היא הנקבה הדומיננטית אשר אחראית לרוב הצאצאים. בנוסף, באותן שתי הטלות נמצא זכר נוסף שהשתתף. זוג ההורים הדומיננטיים אחראי ל 69.2% מסך הצאצאים בכל מדגם שלושת ההטלות.

איור 1. מיקום דקר המכמורת (*Epinephelus aeneus*) בעץ פילוגנטי (לפי גן ברקוד COI) וסיכום יעילות הפיתוח של סמנים מיקרוסטליטים (באחוזים)



ה) על פי אנליזה של 144 סמנים נמצאה ירידה של כ-41% במגוון האללי בפרטים של להקת הרבייה (דור שני של דקר המכמורת במלח"י) לעומת אוכלוסיית הבר.

ו) מתוך ניתוח התוצאות של 48 הצאצאים שנבחרו כאוכלוסיית המיפוי נראה כי הורי אוכלוסיית המיפוי הם זוג ההורים הדומיננטי מהטלות העונה הראשונה.

ז) ריצוף על בסיס חומר גנטי של צאצא הניב 556710 הרכבי מקטעים (scaffolds) כאשר ה-scaffold הארוך ביותר שהורכב כלל 913988 בסיסים. הוחלט לאתר ולבדוק סמנים הטרולוגיים שפותחו בשלבי העבודה הקודמים וממוקמים באחד מתוך 200 ה-scaffolds הארוכים ביותר. למקטעים אשר לא הכילו סמנים הטרולוגיים הוחלט לפתח סמנים ספציפיים על בסיס הרצף. עד כה פותחו 119 סמנים ספציפיים ובוצעה בדיקה של 73 מתוכם על אוכלוסיית המיפוי. סה"כ נבדקו 114 סמנים באוכלוסיית המיפוי כאשר מתוכם 87 נמצאו פולימורפים.

דיון ומסקנות:

א) רמת הפולימורפיזם באוכלוסיית השביה היא גבוהה (97.9%) בהשוואה לזן הבר; לעומת זאת, נמצאה הפחתה במגוון האללים באוכלוסיית להקת הורים של דור שני במלח"י לעומת זן הבר (59%), נתון זה עשוי להתריע על בעיות אפשריות של ניוון שארותי.

ב) בשלב זה זוהו שמונה סמנים בעלי ארבעה או יותר אללים המתאימים להכנת מבחן מסחרי לקביעת הורות בדקר המכמורת. נעשה ניסיון להפעיל מספר סמנים בו זמנית על מנת לשפר את יעילות את המבחן.

ג) אנליזה של הגנוטיפים אפשרה לנו לקבוע שהרבייה בדקר המכמורת אינה מונוגמית בתנאי שבייה. זיהוי דומיננטיות של זכר ונקבות בלהקה מאפשר לנו להסיק מסקנות ולנסח המלצות לגבי ניהול של להקות לצורך רבייה והשבחה של הלהקה.

ד) אורך המפה הגנומית של דקרים היא כ-1000cM ובהערכה שנשתמש בכ-90 סמנים אינפורמטיביים תתקבל מפת תאחיזה ראשונית בצפיפות ממוצעת של סמן אחד לכל 11cM.

ה) לאחר שבוצע מהלך ריצוף, פיתוח סמנים ספציפיים ל-scaffolds הגדולים ביותר עשוי ליעל את רמת פיזור הסמנים לאורך מפת התאחיזה ולשפר את איכותה.

פירוט פרסומים מדעיים

- [1] פרסום בע"פ ביום עיון שנערך במשרד החקלאות ב- 16/3/2011:
ליאור דור, אנדריי שיראק, סרגיי גורשקוב, מיכה רון, גדעון חולתא - פיתוח תשתית גנומית לדקר המכמורת. הרצאה ביום דיווח על מחקרים בפרויקט ביות דג הדקר.
- [2] פרסום בע"פ סימפוזיון (GIA 2011 Int. Symp., Heraklion) בכרתים ב- 14-17/9/2011:
ליאור דור, אנדריי שיראק, סרגיי גורשקוב, מיכה רון, גדעון חולתא - פיתוח תשתית גנומית לדקר המכמורת.
- [3] פרסום בע"פ בכנס ה-12 ע"ש דני פופר באילת ב- 23/2/2012:
ליאור דור, אנדריי שיראק, סרגיי גורשקוב, מיכה רון, גדעון חולתא - פיתוח תשתית גנומית לדקר המכמורת.
- [4] Lior Dor, Andrey Shirak, Sergei Gorshkov, Micha Ron, Gideon Hulata. Development of genetic markers for the white grouper (*Epinephelus aeneus*). *Aquaculture, In Press, Corrected Proof, Available online 26 February 2013*

ביבליוגרפיה

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
א) בדיקת מתאם בין קרבה של מיני דקר שונים לדקר המכמורת לבין יעילות הפיתוח של סמנים מיקרוסטליטיים על בסיס רצפי דנ"א של המין, ב) אפיון השוואתי של להקת הורים של מלח"י (במקור במכמורת) לעומת זן הבר, ג) חקר צורת הרבייה של דקר המכמורת בתנאי השבי, ד) בדיקת ירידה ברמת הפולימורפיזם במהלך הדורות.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
סמנים מיקרוסטליטיים מרצפי DNA של מינים קרובים מתאימים לשימוש בדקר המכמורת. עד כה נבחנו 233 סמנים ו-62% מתוכם עבדו ונמצאו פולימורפיים. למספר סמנים ארבעה או יותר אללים, והם מתאימים לשיוך הורים לצאצאים. נמצאה אחידות גנטית גבוהה במין בלהקת הרבייה ובדגי בר. המגוון האללי ירד ב-43% מדור ראשון לדור שני בשביה. הרבייה אינה מונוגמית ומספר הורים משתתפים בכל הטלה; עד כה נמצא כי זוג הורים דומיננטי השתתף בכל ההטלות שנבדקו ובנוסף זכר ונקבה נוספים לקחו חלק בהטלות שונות. הוגדרה אוכלוסיית מיפוי הכוללת 48 פרטים עליהם נבחנו 87 סמנים פולימורפים.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
בשנה השלישית טופלו כל המטרות במידה כזו או אחרת. נחוץ להמשיך בפיתוח ובחינת סמנים, להגדיל מדגמים בכדי לאושש מסקנות ראשוניות מבטיחות ולהמשיך בפיתוח מפת התאחיזה. מוקדם לדבר על השלכות לגבי יישום.
בעיות שנתרו לפתרון ואו שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
אין צפויים שינויים; סבירות גבוהה כי המטרות יושגו בתקופה שנתרה למחקר תושג מטרה נוספת של בניית מפת תאחיזה לדקר המכמורת
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
הרצאה ביום דיווח על מחקרים בפרויקט ביות דג הדקר, משרד החקלאות, 16/3/2011
פרסום בע"פ סימפוזיון (GIA 2011 Int. Symp., Heraklion) בכרתים ב- 14-17/9/2011
פרסום בע"פ בכנס ה-12 ע"ש דני פופר באילת ב- 23/2/2012
פרסום באתר העיתון Aquaculture 26/2/2013 וכן במהלך פרסום בגרסה הכתובה
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
← רק בספריות
← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
← חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים