

שיפור הניצולת האנרגטית ועמידות לעקות מטבוליות וסביבתיות בחיות משק (עופות, בקר, צאן ודגים) על בסיס שונות גנטית ומיטוכונדראלית

Improvement of the energy yield and the resistance to metabolic and environmental stresses in farm animals (poultry, ruminants and fish) based on genomic and mitochondrial polymorphism

ע"י

סרוסי איל, אלישע גוטוויין, מירי עינת, אבנר כנעני, מכון בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי
אן סעדה-רײך, המחלקה לגנטיקה ומחלות מטבוליות, המרכז הרפואי הדסה עין-כרם

Eyal Seroussi (seroussi@agri.huji.ac.il), Elisha Gootwine (gootwine@agri.gov.il), Miri Einat, (einat@agri.huji.ac.il), Avner Cnaani (avnerc@agri.gov.il), ARO, Institute of Animal Science, P.O.B. 6, Bet-Dagan, 50250.

Ann Saada-Reisch (annsr@hadassah.org.il), Department of Genetics and Metabolic Diseases, Hadassah Medical Center, POB 12000, Jerusalem.

תקציר:

הצגת הבעיה: עיקר צרכי האנרגיה של חיות משק בישראל מסופק ע"י גרעינים מיובאים. צמצום יבוא זה הוא בעל חשיבות לאומית לחקלאות ישראל. **מטרות המחקר:** זיהוי גנים ומנגנונים המעורבים בבקרה על מאזן האנרגיה המטבולית בחיות משק במטרה ליעל את גידולם. **שיטות העבודה:** רתימת כלים גנומיים חדשניים לאיתור פולימורפיזם גנטי. במעלי גירה: שבבי-דנ"א מבוססי סמנים גנטיים של שינוי בבסיס בודד לקביעת גנוטיפים בקנ"מ גנומי נרחב. בתרנגולת ובאמנון: ריצוף עמוק. **תוצאות:** מעלי גירה- הוגדל מדגם השבבים ל-1496 בפרוי-הזרעה ול-202 בכבש. בוצע ריצוף עמוק של הגנומים של כבש אווסי, של נפל כבשה מזן אסף, של תרנגולת מטילה מצטיינת ושל אמנון ירדן נקבה. בוצע ריצוף עמוק של 8 ספריות רנ"א שליה של המעי הקדמי והאחורי באמנון היאור ומוזמביק ובתרנגולת של 8 ספריות רנ"א שליה של פטמים ומטילות כולל רקמת שומן, היפוטלמוס, היפופיזה וכבד. **מסקנות:** שבבי-הדנ"א סיפקו מידע הניתן לישום בשני מישורים: תיקון רשומות היוחסין החיוניות לתוכנית ההשבחה בספר-העדר; והצבעה על האתרים הגנומיים החשובים להשבחה מונחית סמנים גנטיים. פותחו שיטות לקביעת ערך הפרטים לתוכנית ההשבחה על בסיס נתונים גנומיים. נבחנה השפעת גנים חשובים לחקלאי בכרומוזומים 1 (*POUIF1*), 6 (*CSN3*, *CSN2*) ו-18 (*PCDC5*) בבקר; מיטוכונדריה, 1, 3, ו-8 בכבש. ריצוף העמוק של נפל כבשה אפשר סריקה מהירה של גנים מועמדים וזוהו בהם מוטציות. הקשר הסטיסטי בין שרידות עוברים והמוטציות האמורות נבחן במדגם רחב. מריצוף הטרנסקריפטום של אמנון ושל התרנגולת התקבל מידע רב ואיכותי על הגנים המשתתפים בבקרת מאזן האנרגיה בתגובה למליחות או לגדילה והשמנה, בהתאמה. בשני מיני בעלי החי האלה מתקדם אימות התוצאות על בסיס rtPCR לקראת פרסומם. לסכום, מיזם יעודי זה יצר בסיס נתונים רחב לגנומים של חיות משק עיקריות בישראל, בכללן: בקר ההולשטיין-הישראלי; כבש האוסי והאסף; תרנגולת הקוב והלוהמן; ואמנון היאור והירדן. נתונים אלה אפשרו זיהוי מסלולים מטבוליים שקשורים לשיפור הניצולת האנרגטית ועמידות לעקות מטבוליות וסביבתיות ומהווים בסיס לשפור מדדי היצור המושפעים ממסלולים אלה בעתיד.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

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

תתימת החוקר _____ תאריך: 15/3/14

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

Reviewed Journals:

- Glick G., Shirak A., Uliel S., Zeron Y., Ezra E., Seroussi E., Ron M. and Weller J.I. (2012) Signatures of contemporary selection in the Israeli Holstein dairy cattle. *Anim. Genet.* **43** Suppl 1:45-55.
- Reicher, S., Seroussi, E., Weller, J.I., Rosov, A. and Gootwine, E. (2012) Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock. *J. Anim. Sci.* **90**:2084-91.
- Seroussi, E., Glick, G., Shirak, A., Ezra, E., Zeron, Y., Ron, M. and Weller, J.I. (2013) Maternity validation using sire-only BovineSNP50 BeadChip data. *Anim. Genet.* **44**:754-757.
- Gertler, A., Shinder, D., Yosefi, S., Shpilman, M., Rosenblum, C.I., Ruzal, M., Seroussi, E., and Friedman-Einat, M. (2013) Pegylated leptin antagonist with strong orexigenic activity in mice is not effective in chickens. *J. Exper. Biol.* **217**: 180-184.
- Weller, J.I., Glick, G., Shirak, A., Ezra, E., Seroussi, E., Shemesh, M., Zeron, Y., and Ron, M. (2013) Predictive ability of selected subsets of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a moderately sized dairy cattle population. *Animal* **8**: 208-216.

Articles of symposia proceedings and meeting abstracts:

1. Seroussi U., Seroussi E. (2013) Applying machine learning to the prediction of breeding values using single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a small-sized dairy cattle population. The 15th Israeli Bioinformatics Symposium, Beer-Shiva, Israel.
2. Seroussi, E., Shirak A., Ron M. (2013) Inferring the genotype of kappa casein of the Israeli dairy bull population using genomics. The 25th Ruminant Science Conference, Jerusalem, Israel.
3. Cnaani A., Ronkin D., Seroussi E. (2013)
Comparative transcriptome analysis of *Oreochromis mossambicus* and *O. niloticus* to fresh or salt water. Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, Valencia, Spain.
4. Ronkin D., Cnaani A., Seroussi E. (2013) A comparative transcriptome analysis of differential salinity adaptation between two tilapiine species, Mozambique and Nile tilapia.
5. Lam, A., Rosov, A., Shirak, A., Seroussi, E., and Gootwine, E. (2013). Genetic variation in Afec-Assaf ewes differing in their lamb survival rate at birth. ASAS meeting 2013, Abstract #: W206.
6. Gootwine, E., Rosov, A., Abu Siam, M., Seroussi, E. (2013). Increasing prolificacy of Awassi and Assaf breeds by introgression of the FecB (Booroola) mutation: achievements and challenges. Proceeding of the 20th Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics (AAABG) conference, Napier, New Zealand Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet. **20**:78-81.

עמודים	תוכן
3	1. מבוא
3	2. מטרות המחקר
4-19	3. פירוט עיקרי הניסויים ודיון
4-7	3.1 בקר לחלב
8-11	3.2 כבש
13-17	3.3 תרנגולת
17-19	3.4 אמנון
20	4. רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים.
20-21	5. ביבליוגרפיה.
22	סיכום עם שאלות מנחות

1. מבוא

עיקר צרכי האנרגיה של חיות משק בישראל (עופות, מעלי גירה, דגים) בא מצריכת מגרעינים אשר רובם מיובאים לארץ. צמצום יבוא זה, שהיקפו מוערך במעל ממליארד דולר לשנה, הוא בעל חשיבות לאומית לחקלאות ישראל. כתוצאה מדרישות הייצור המוגבר במערכת הגידול האינטנסיביות המקובלות בחקלאות בעלי החיים בישראל, נחשפים בעה"ח לעקות מטבוליות וסביבתיות הפוגעות בייצור ובבריאות בעה"ח, ואף עלולות להביא לתמותה. התמודדות עם עקות אלו תבוא בין השאר ע"י ייעול השימוש באנרגיה בגוף בעה"ח בתהליכי הגדילה והרבייה. כך לדוגמא, שיפור העמידות לעקת חום אשר היא מטרה בעלת חשיבות רבה בענף הלול, קשורה לשיפור נצילות המזון והאצת הגדילה. מאזן אנרגיה שלילי בסוף הריון ותחילת תחלובה במעלי גירה, גורם לרעלות הריון וקדחת חלב. בנוסף, השקעת אנרגיה מטבולית בתהליכי אוסמורגולציה מהווה גורם מפתח ביעילות גידול דגים, המשקיעים אנרגיה רבה בשמירה על מאזן המלחים בדם. השבחה גנטית של גזעים היוותה גורם מרכזי בשיפור נצילות המזון ושיפור התמודדות עם עקות. הנחת העבודה הנוכחית היא כי כלים גנומיים שפותחו בשנים האחרונות יאפשרו לאתר ולרתום את הגנים הקשורים בעמידות לעקות השונות לתועלת החקלאי. הדבר יעשה בדרך של פיתוח סמנים גנטיים שישמשו בסלקציה. סמנים אלה הם בבחינת נכס אינטלקטואלי, שניתן להגן עליו בפטנט. גילוי המנגנונים הקשורים לשיפור נצילות המזון יוביל כמו כן לשיפורים ממשקיים אשר ישפרו את נצילות המזון במשק החי.

תוכנית המחקר כוללת אפיון הגנום הגרעיני במינים השונים בעזרת שבבים המאחרים שונות מסוג SNP, וכן חשיפת שונות במספר העתקים (CNV) של אזורים כרומוזומליים שונים. אפיון הגנום המיטוכונדריאלי יתבצע ע"י קביעת רצף. אנליזה סטטיסטית של תאחיזת יכולת העמידות של בעלי החיים השונים לסמנים תתבצע ע"י בחינת חוסר שווי משקל באוכלוסייה. אנליזה ביואינפורמטית תאתר קשר בין הרצפים הגנומיים ויעילותם האנרגטית של המינים השונים. ממצאים ברמת יעילות המיטוכונדריון יאומתו בבדיקת ניצולת אנרגטית במבחנה. אנו מצפים כי המחקר יוביל לזיהוי גנים המעורבים בבקרה על מאזן האנרגיה המטבולית בחיות משק. זיהוי זה ייתן בידנו כלים גנטיים וממשקיים להשפיע על מדדים אלה. הקטנת האנרגיה הדרושה לקיום ולו באחוזים בודדים, תביא לחיסכון בהזנה בהיקף של עשרות מיליוני שקלים.

2. מטרת המחקר

רתימת כלים גנומיים חדשניים לאיתור פולימורפיזם גנטי בחיות משק בעלות דרגות שונות של יעילות אנרגטית ויכולות שונות להתמודד עם עקות מטבוליות. יישום המידע יבוצע על ידי סלקציה גנומית כמודגם בבקר או על ידי ניצול גילוי המנגנונים הגנטיים הקשורים לבקרת הנצילות האנרגטית, לפיתוח טיפולים תזונתיים וממשקיים ליעול הייצור, להקלה בתגובה לעקות החום וכפועל יוצא, להפחתת יבוא הגרעינים. הגילויים האמורים יאפשרו יצירת נכסים אינטלקטואלים שניתן להגן עליהם בפטנטים שיישמו על חברות בארץ ובהו"ל.

3.1 בקר לחלב

3.1.1 קביעת גנוטיפים ואנליזה של מבנה האוכלוסייה של פרי הזרעה- נקבעו גנוטיפים ל-1496 עגלי פרי-הזרעה באמצעות שבב דנ"א של חברת אילומינה BovineSNP50 המאפשר לקבוע בו-זמנית את הגנוטיפ של פרט ב-54,001 אתרים המפוזרים בגנום. המדגם כולל את רוב פרי-הזרעה ששמשו בישראל לדורותיהם. קשרי המשפחה במדגם מהווים גורם חשוב בחישובים הסטטיסטיים שקושרים בין האתרים הגנומיים ותכונות היבול, וחשובים לאימות זהות הדגימות. בעבר נערך מאמץ לאימות אבהות באוכלוסיית הפרים בעזרת נתוני השבב (Weller et al., 2010), פעולה שהניבה ניפוי השגיאות בקו האבהי. האנליזה הנוכחית של התפלגות הגנוטיפים מראה כי ניתן בצורה מובהקת לאתר פרטים שרשומותיהם אינן נכונות גם בקו האימהי, למרות שהאימהות לא נדגמו וזאת על ידי השוואה לאב האם. הרשומות של 24 פרים תוקנו לצורכי האנליזה במחקר זה. הומלץ למנהל ספר העדר לבחון תיקון הרשומות אחר אימות שהטעות לא נובעת מהחלפת דוגמאות דנ"א ברמת המעבדה. התוצאות והשיטה סוכמו במאמר (Seroussi et al., 2013). בנוסף נבחנו שתי שיטות לקביעת הערכות גנומיות, על בסיס נתוני השבבים שתוארו, באוכלוסיית הפרים המצומצמת בישראל, בעזרת מדגם מבורר של סמנים ובעזרת אלגוריתמים של למידה ממוכנת. התוצאות והשיטה של שמוש במדגם סמנים מבורר סוכמו במאמר (Weller et al., 2013). התוצאות והשיטה של שמוש בלמידת מכונה מסוכמות בתקציר כינוס (Seroussi & Seroussi 2013), והפוסטר שנגיש בקישורית <http://cowry.agri.huji.ac.il/SeroussiBio15thPoster.pdf>.

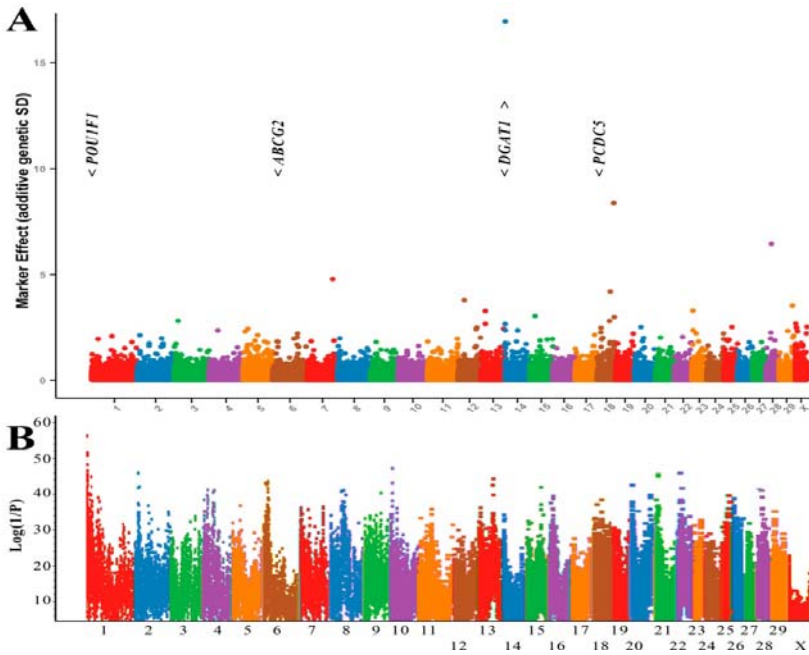
3.1.2 השפעת גנום הבקר לחלב בישראל על תכונות יצור- בשלושת העשורים האחרונים, צפוי שהברירה הנמרצת של בקר לחלב בישראל הטביעה את חותמה בגנום. בהתבסס על נתוני השבב הגנומי, השתמשנו בשתי גישות ניסיוניות לאבחון האתרים הגנומיים שהושפעו: 1- מבחן לאורך ההפלוטיפ האחיד (haploblock). 2- אנליזה ישירה של תדירות ההפלוטיפים לפי שנת לידת הפר. האנליזות שולבו בבחינת אסוציאציה של ההפלוטיפים עם עשר תכונות יכול (איור 2). המבחן הראשון הראה שכ-15% מ-3288 ההפלוטיפים שעלו במובהקות בשכיחות ($p < 0.05$) היו בקורלציה מובהקת עם אפקט ההתמרה של ההפלוטיפ ועוצמת הסלקציה לתכונות השונות. 30 חתימות סלקציה שאותרו בשתי הגישות זוהו על 17 מתוך 29 האוטוזומים. הגישה הנסיונית השניה שימשה גם להערכה של עוצמת הסלקציה של התכונות השונות. הקורלציה בין עוצמות הסלקציה לתכונות הנבדקות שנגזרו מהניסויים בתדירות ההפלוטיפים באוכלוסיית הפרים לבין אלה של הפרות היתה 0.93, ולכן שינויים תדירות ההפלוטיפים באוכלוסיית הפרים משקפים את הנטייה הגנטית בפרות ויכולים לשמש לאיתור חתימות סלקציה באזורים גנומיים המשפיעים על תנובת פרות חלב. התוצאות סוכמו במאמר שפורסם (Glick et al., 2012).

3.1.3 השפעת גנום הבקר לחלב בישראל על התמורה לחקלאי, ניתוח של הפלוטיפים בגישת החלון הנע- שיטות קיימות לניתוח סטטיסטי של הקשר בין תכונות יכול לסמנים גנטיים בדר"כ מתבססות על קירוב סטטיסטי המניח שאין קשר בין הפרטים ובין הסמנים. בנוסף קיימת בעיה של ריבוי השוואות הדורשת העלאת סף המובהקות הנדרש בכדי להגדיר קיום קשר משמעותי בין סמן לתכונה. ניתוח של הקשר בין התמורה לחקלאי, על בסיס המדגם העדכני שבידנו, באלגוריתם מחמיר (EMMAX), שמתקן למבנה האוכלוסייה בעזרת מטריצת הקרבה, מצביע על מצב בו למעשה התכונה האמורה היא תולדה של מספר רב של גנים ללא השפעה מכריעה של גנים עקריים (תוצאה לא מוצגת). מצב דומה נצפה באוכלוסיית הפרי ההזרעה מן הולשטיין האמריקאים שהניתוח הסטטיסטי עבורם מפורסם באופן שותף באתר אינטרנט (Cole et al., 2012) (איור 1A). לעומת זאת, אנליזה של הפלוטיפים באזורים שונים של 7-16 סמנים העידה אל אפשרות לאתר גניים עקריים לתמורה לחקלאי. ההשפעה המובהקת ביותר שאותרה נמצאה באיזור הצנטרומרי של אוטוזום 1. ההשפעה אף עולה במובהקות על ההשפעות של הגנים החשובים *DGATI* ו-*ABCG2*, שהם הגנים הכמותיים החשובים ביותר שאותרו בבקר לחלב (Cohen-Zinder et al., 2005). באיזור המקביל באנליזה של אוכלוסיית הבקר בארה"ב לא ניכרת כל השפעה. משום שהאוכלוסייה הישראלית עושה שימוש נרחב בפריים המיובאים מארה"ב, אין זה סביר כי ההבדל נובע מהשונות באוכלוסיית.

שיטת האנליזה בה השתמשנו אינה מתקנת למבנה האוכלוסייה והקרבה בין הפרטים, שהשפעתן מתעצמת מאוד כשמשתמשים בהפלוטיפים, ויתכן, על כן, שהאפקט האמור אינו אמיתי. הוכחה לאמיתות אפשרית של התצפית שלנו ניתנת על ידי הפרסום שדווח על חשיבות מוטציה בגן *POU1F1* לתכונות יצור בבקר לחלב (Huang et al., 2008). גן זה מהווה מסטר רגולטור של ההיפופיזה, ונמצא בעמדת מפתח להשפעה על מנגנוני הבקרה על מאזן האנרגיה בגוף. בשנה הבאה נבחן את הקשר בין המוטציה האמורה וההפלוטיפים המזוהים באיזור זה של אוטוזום 1. לבדיקה זאת חשיבות רבה, התאמה תעיד שלשיטת האנליזה בעזרת הפלוטיפים (איור 1B) עדיפות על האנליזה הרווחת (איור 1A), ומוצדק לחקור את שאר האתרים עבורם נקבעה סבירות נמוכה לקשר מקרי עם תכונות יכול. זאת בנוסף לגישתנו עד כה שהעדיפה את אתרים המעטים הנתמכים על ידי שתי השיטות כגון האתר בכרומוזום 18.

3.1.4 אתר גנומי המשפיע על התמורה לחקלאי באוטוזום 18 - באתרים כרומוזומאליים משפיעים נערכה בדיקה ביואינפורמטית לאיתור גנים קשורים למאזן האנרגיה (בכללם 837 חלבונים האורתולוגים לפרוטאום המיטוכונדריון של אדם ועכבר). ראוי לציון אתר גנומי באוטוזום 18 המשפיע על התמורה לחקלאי (איור 1 ו-2) ושואר בעבר כמכיל שונות במספר ההעתקים (CNVR#456 (Seroussi et al. 2010). באתר שני גנים בעלי זיקה למיטוכונדריה 5 programmed cell death 5 (*PCDC5*) ו-peroxisomal/mitochondrial *nudix hydrolas*. הגן *PCDC5* תועד בעבר (Clarkson et al., 2004) כפעיל באינבולוציה של בלוטת החלב. הגן פועל במסלול של מות תאי מתוכנן ואחראי להעברת הסיגנל למיטוכונדריה שממנה מתחיל ההליך האפופטוטי. משום שריבוי העתקים של CNVR#456 משויך בצורה מובהקת בירידה בחמ"מ, אנו נבדוק את ההשערה שריבוי בהעתקים של גן זה מזרז את מוות התאים והאינבולוציה של הבלוטה. ריצוף איזור סביב האקסון השני של הגן הדגים כי בגן שונות גנטית נרחבת בכללה השמטה של עשרה בסיסים (תוצאות לא מוצגות). השתמשנו בהשמטה זאת כסמן גנטי לאיתור פרים המתפצלים לשונות ולאייפון הגן במבנה של בית אב על בסיס המשפחות שתיארנו בעבר (Weller et al., 2003). נבחנו עד כה 264 בנות הפר מפי 2278, שהוא הטרוזיגוט לסמן האמור. ניתוח סטיסטי הראה

כי קיים הבדל מובהק (>0.05) בין התמורה לחקלאי של קבוצות הבנות ההומוזיגוטיות לשני האללים בסמן.

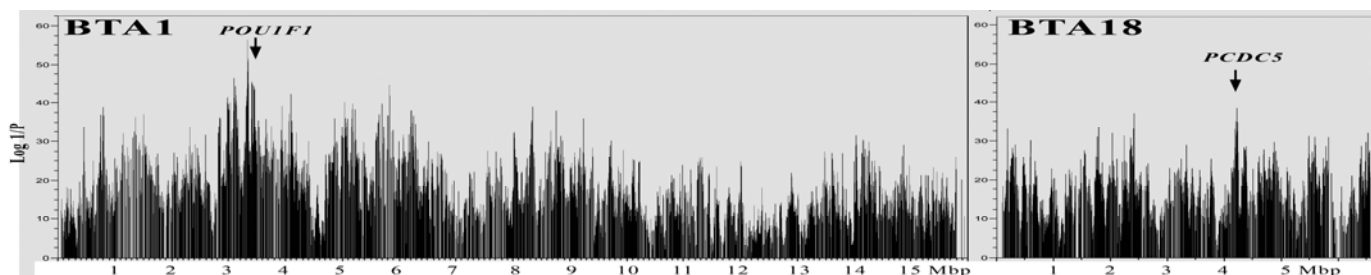


איור 1. השפעת סמנים גנטיים על התמורה לחקלאי באוכלוסיות פרי-ההזרעה מן הולשטיין.

The distribution of marker effects for Net Merit for the USA Holstein sire population (A, Cole et al., 2012, run 1212) was compared with the effects of marker haplotypes calculated for 1394 Israeli bulls (B). Both the marker and haplotype effects were estimated based on the BovineSNP50 beadchip using Illumina technology. Haplotype effects were calculated with PLINK using the sliding window option. Window width was of 10 SNPs. Relative position in the genome and chromosome numbers is indicated by the X axes which were aligned to the same scale and chromosomal effects were colored following the color code. The size of the effects (Y axes) is given in % of additive-genetic standard deviation for the USA analysis and in the value of the negative of the logarithm of the probability for association by chance for the Israeli cattle. The positions of the effects of important genes are pointed to by arrows on upper panel.

איור 2. השפעת הפלוטיפים באוטוזומים 1 ו-18 על התמורה לחקלאי באוכלוסיית פרי-ההזרעה בישראל.

The effects of marker haplotypes calculated for 1394 Israeli bulls were estimated based on the BovineSNP50 beadchip using PLINK with the sliding window option. Window width was of 10 SNPs. Relative position in the chromosome is indicated by the X axis. The size of the effects (Y axis) is given in the value of the negative of the logarithm of the probability for association by chance. The positions of the effects of important genes are pointed to by arrows.



3.1.5 אתרים גנומיים לגנים לקזאין בטא וקפא-

טבלה 1. הפלוטיפים נפוצים באיזור הגן קפא-קזאין ממוספרים וממויינים לפי תדירות (F).

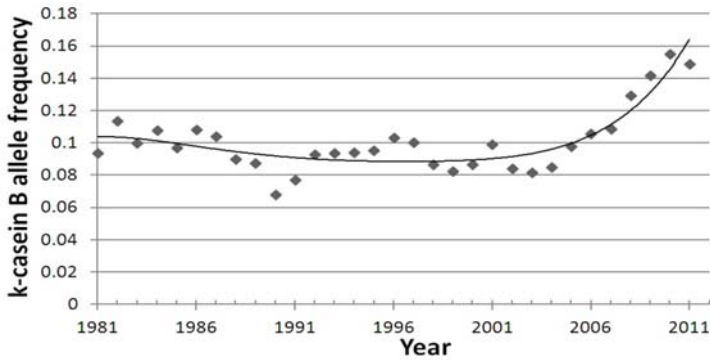
#	HAPLOTYPE	F	BETA	STAT	P
1	22221212222	0.23	-0.22	9.08	3.20E-03
2	11212222122	0.09	1.05	105	5.60E-18
3	11211222122	0.06	-0.26	3.02	8.50E-02
4	22212222222	0.05	-0.02	0.02	8.80E-01
5	21222222222	0.05	0.35	0.7	4.00E-01
6	12112222212	0.03	-0.08	0.07	7.90E-01
7	11121122222	0.03	0.79	16.3	9.90E-05
8	22112221212	0.03	0.90	3.44	6.60E-02
9	22112222212	0.03	-0.27	1.58	2.10E-01
10	12222222212	0.03	-0.01	0	9.50E-01
11	12212222122	0.03	-0.27	2.08	1.50E-01
12	21221221222	0.02	0.11	0.22	6.40E-01
13	22221222122	0.02	-0.29	0.3	5.80E-01
14	22222222222	0.02	-0.34	2.2	1.40E-01
15	11121222212	0.02	-0.32	1.53	2.20E-01
16	21212222121	0.02	-0.26	0.55	4.60E-01
17	12212122222	0.02	-0.33	0.6	4.40E-01
18	22222222212	0.01	-0.33	1.06	3.10E-01
19	11221221212	0.01	-0.29	0.61	4.40E-01
20	12112122222	0.01	-2.29	0.3	5.80E-01
21	22221221212	0.01	0.81	1.87	1.70E-01
22	22222222121	0.01	1.94	14	2.90E-04

בגן לקפא קזאין, אלל B חשוב לחקלאים המעוניינים בשיפור יכולת גיבון החלב (Ron et al., 1994). האנליזה לזיהוי נשאים של אלל B בקפא-קזאין התבססה על תוצאות של 1770 שבבי דנ"א BovineSNP50, שכללו 375 עתודות והשאר פרים ועגלים. מתוך הפרים ל-116 פרטים נקבע בעבר הגנוטיפ לגן קפא-קזאין (Ron et al., 1994). בנוסף פר חו"ל יחיד (ג'סטס, גנוטיפ BB) נלקח בחשבון על בסיס נתוני חברות הזרעה זרות. ניתוח סטטיסטי לזיהוי ההפלוטיפים הקשורים לנשאות של אלל B נעשה בעזרת תוכנת PLINK בעזרת האפשרות של חלון נע (sliding window) ובהנחה שאין קשר בין הפרטים. שני האללים בכל אתר SNP קודדו על ידי הספרות 1 ו-2. נשיאת אללים A ו-B קודדה כתכונה כמותית, כאשר הערכים של האללים A ו-B היו 1 ו-2, בהתאמה, כך שלהומוזיגוט לאלל התדיר A ערך 2, להטרוזיגוט 3 ולהומוזיגוט לאלל הנדיר B ערך 4. נבחנו חלונות בטווח של 7-14 סמנים סמוכים. הסבירות הגבוהה ביותר לקשר שאינו מקרי אותרה בכרומוזום 6, בחלון של 11 סמנים, בין עמדות 87,600,892 ל-88,421,804 זוגות בסיסים ($p=4.8 \times 10^{-6}$). חלון זה אכן מתרכז על הגן CSN3 לפי הגרסה הגנומית בבקר (UMD3.1) עליה מבוסס השבב. בחלון האמור, 3 הפלוטיפים (2, 7 ו-22), טבלה 1,

גופן מודגש) זוהו במובהקות ($p < 0.001$) עם אלל B משום שהם בעלי ערך גבוה (BETA) המתקרב או עובר את הערך הכמותי שהוגדר כהפרש בין האללים (1). קביעת ההפלוטיפים על ידי תוכנת PLINK היא תחזית סטטיסטית שניתן לאמתה על ידי בחינת קשרי משפחה. אימות זה בוצע בעזרת התוכנה LSPH (Baruch et al., 2006) לקביעת הפלוטיפים המבוססת על חוקי התורשה המנדלית תחת הנחה שאירועי הרקומבינציה בחלון צר זה נדירים. מעקב אחר ההורשה המנדלית אימת נכונות של כ-90% מההפלוטיפים שנקבעו על ידי PLINK ואפשר הערכה מדויקת יותר של תדירות אלל B באוכלוסייה ע"פ יחס שלושות ההפלוטיפים האמורים לאחריהם. זאת תחת הנחה שההפלוטיפים המשוחזרים בכל פר שנולד מייצגים שכיחותם בשנת הלידה וחמש השנים שקדמו לה (איור 3). התוצאות שהתקבלו

מעידות שלאחרונה הוכפלה תדירות האלל B המיטיב, תופעה שעולה בקנה אחד עם הנטייה של החקלאים להעדיף את השימוש בבני הפר ג'סטס שתופסים כיום את ראש לוח הפרים.

איור 3. הערכת תדירות אלל B בגן קפא-קזאין לפי אנליזה של הפלוטיפים של פרי הזרעה.

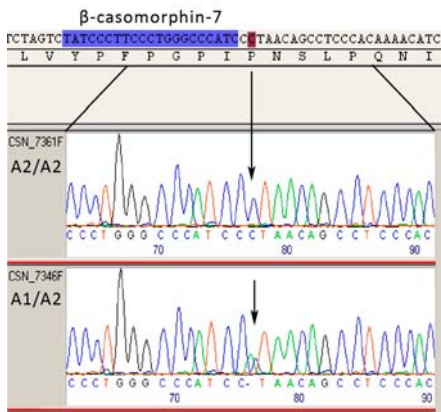


הנתונים הגנומיים שהצטברו במהלך הפרוייקט מאפשרים גם זיהוי האלל החשוב לחלב בריאותי הגן בטא קזאין. תהליך העיכול של בטא-קזאין A1 בחלב רגיל משחרר פפטיד בין 7 חומצות אמיניות שעשוי לגרום לשינויים במערכת החיסון ולסוכרת מסוג סוכרת נעורים בעכברים. חלב A2 מכיל חלבון מסוג בטא-קזאין הנושא חומצה אמינית פרולין במקום היסטידין בעמדה 67. שינוי זה מונע שחרור של הפפטיד האמור. בנוסף נקשר בטא-קזאין A1 עם מחלת לב כלילית ונצפתה נוכחות מוגברת של משקעים שומניים

בעורקי לב בארנבים שהואכלו ב-A1 לעומת A2. דנ"א שהופק מזרמת פרי הזרעה מלאכותית מזן הולשטיין שנולדו בישראל (גוליית 3099, בלדה 7134, אבידן 7220, הבל 7346, קלרין 7361) הוגבר בעזרת תחלים שתוחמים את האיזור בכרומוזום 6 של אקסון 7 של הגן בטא-קזאין (איור 2). התקבלו תוצרים בעלי אורך פולימורפי (744 ו-745 בסיסים). קביעת רצף הבסיסים בתוצרים נעשתה ברצף קפילארי בעזרת התחל הקידמי (איור 2). אלל A2 המתאפיין בחילוף הבסיסים A ל-C, ויצירת קודון לחומצה האמינית פרולין (CCT), שמעכבת את החיתוך הפרוטאוליטי ושחרור β -casomorphin-7. כפי שמוצג באיור 4, האלל A1 מופיע בפר הבל מתאפיין בתוספת שיא תואם לנוקלאוטיד A (ירוק). שאר הפרים שנבדקו היו הומוזיגוטים לאלל A2, דבר שיתכן ומעיד על שכיחות גבוהה של האלל A2 באוכלוסיית הבקר בישראל. סקר נתוני פרים מחוץ לארץ הצביע על כך שהזירמה שיובאה במסגרת תכנית ההשבה כללה פר חשוב ההומוזיגוט לאלל A2 (פר 5647 לוי, איור 5). הפר פקסטון 5621 הומוזיגוט אף הוא לאלל A2. פר זה הוא בן של הפר המפורסם ג'סטס 5303 דבר המעיד שגם האב נושא את האלל. מכיוון שהפרים הראשיים בלוח הפרים הם בנים של ג'סטס, סביר להניח שהאלל A2 יופיע בשכיחות גבוהה באוכלוסייה בארץ. בהתאם המלצתנו להנהלת הענף היא לערוך סקר מפורט ובדיקת התכנות למעבר כולל ליצור של חלב A2, משום שחלב זה יתרון שיווקי ומיתוג של חלב בריאות.

ליצור של חלב A2, משום שחלב זה יתרון שיווקי ומיתוג של חלב בריאות.

איור 4. איתור אלל A2 של בטא-קזאין בפר הזרעה ישראלי.



דנ"א גנומי של פרי הזרעה ישראליים הוגבר ורופץ בעזרת התחלים: CSN2int6F TCTCCACGGGTAAGCCTAGA;TGGACTCAAAGATTTGTTTTCTCT העליון של האיזור מוצג רצף הבסיסים של הקטע באקסון 7 של בטא-קזאין שמקודד לפפטיד בן 7 חומצות אמיניות (β -casomorphin-7, כחול). חילוף הנוקלאוטיד C ל-A מאפיין את אלל A2 (חום-אדמדם, חיצים). רצף החומצות האמיניות מופיע בקוד אותיות מתחת לרצף הבסיסים של האקסון. כרומוטגרמות הריצוף עבור פר הומוזיגוט לאלל A1 ופר הטרזיגוט נשא של אלל A2 מוצגות (הלריו 7361, הבל 7346, בהתאמה).

איור 5. אלל A2 של בטא-קזאין שכיח בזירמה מיובאת.
נסקרו נתונים של פרים שזרמתם מיובאת מחברות הזרעה מחו"ל לצורך תכנית ההשבה בישראל. מוצגים נתוני הפר לוי מס. ספר עדר ישראלי 5647. הפר הומוזיגוט לאלל A2 של בטא-קזאין (הנתון מוקף באדום, צד עליון מימין).

3.2.1 אפיון שונות גנטית בין הפלוטיפים מיטוכונדריאליים בגנים המקדדים לחלבונים ול-tRNA- למיטוכונדריה תפקיד מרכזי בגוף בייצור ATP ובבקרת המטבוליזם. חקר השונות ברצפי הדנ"א בגן הציטוכרום (CytB) ובאתר הבקרה של המיטוכונדריה (D-Loop) הביא לזיהוי חמש קבוצות הפלוטיפים בצאן: HA, HB, HC, HD, HE. הכללת ריצפי הדנ"א המיטוכונדריאלי שהתקבלו במעבדתנו בבסיס נתונים אחד יחד עם רצפים ידועים מהספרות הביאה לזיהוי 245 אתרים פולימורפיים ב-10 מתוך 13 גנים מיטוכונדריאליים המקדדים לחלבונים. אפיון הפולימורפיזם הראה כי ב-26 אתרים מתוך כלל ה-245 אתרים, השונות במבנה הדנ"א מביא לשינוי בזהות החומצה האמינית. כמו כן, נמצא פולימורפיזם בשמונה מתוך עשרים ושניים הגנים המקדדים לרנ"א שליה (tRNA). פולימורפיזם במיטוכונדריה האדם באתרים המקבילים לחלק מהאתרים הפולימורפיים בצאן שאתרנו קשור להופעת מחלות מטבוליות שונות.

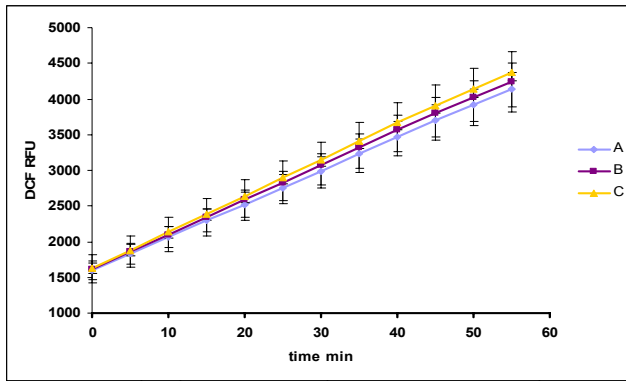
3.2.2 בחינת הקשר בין זהות ההפלוטיפ וביטוי תכונות ייצור ורבייה בצאן- תוך אפיון בתי-אם בעדר אפק-אספ אשר במרכז וולקני וקביעת סוג המיטוכונדריה לפרטים מייצגים מכל בית-אם, נקבע סוג הגנום המיטוכונדריאלי של 1,126 כבשים נוכחות וכבשים שיצאו מהעדר. נמצא, כי כבשי אפק אספ משתייכות לקבוצות המיטוכונדריאליות HA, HB, HC, כאשר התדירויות של קבוצות ההפלוטיפ השונות היו: (0.43, 0.43, 0.14), בהתאמה. בניתוח נתוני וולדנות של 4,993 המלטות של כבשים אלה, וכן נתוני משקל גוף וקצב גדילה של 1,286 טלאים בני הכבשים שנבחנו, לא נמצא קשר בין סוג המיטוכונדריה ובין אורך חיי הכבשה בעדר, שרידות הטלאים בהמלטה (כתכונה אימהית) וכן משקל לידה וקצב גדילה עד חמישה חודשים של טלאים. לעומת זאת, נמצא כי וולדנות הכבשים קשורה באופן מובהק ($P < 0.05$) לסוג המיטוכונדריה אותו הן נושאות. הוולדנות הממוצעת של כבשים מהקבוצות HA, HB, HC הייתה 2.14, 2.30, 2.25 טלאים להמלטה, בהתאמה. השערתנו היא כי לסוג המיטוכונדריה השפעה על איכות הביציות המתפתחות בשחלה והחורגות ממנה, ומכאן ההבדל בולדנות בין הקבוצות השונות. התוצאות בסעיפים 3.2.1 ו-3.2.2 מוצגות במאמר שפורסם (Reicher et al., 2012).

3.2.3 חקר הפעילות הביוכימית של מיטוכונדריות מפרטים השייכים לקבוצות מיטוכונדריאליות שונות- זרחון חימצוני ויצירת ATP מתבצעים במיטוכונדריה על ידי מערך של למעלה מ-85 חלבונים הממוקמים במעטפת המיטוכונדריה. חלבונים אלה מאורגנים בחמישה צברים (קומפלקסים). צברים 1 עד 4 מהווים את שרשרת העברת האלקטרונים במיטוכונדריה, בעוד הצבר החמישי מייצר את ה-ATP. חלק מחלבוני צברים 1, 3, 4 ו-5, אך לא של צבר חלבונים 2 מקודדים על ידי גנים מיטוכונדריאליים, ומשועתקים במיטוכונדריה. אנו שאלנו האם שוני במעקובת הדנ"א בין סוגי המיטוכונדריה השונים קשור לרמת הפעילות הביוכימית של המיטוכונדריה. לבדיקת הנושא, מיטוכונדריות בודדו מכבדים של חמישה פרטים מכל סוג מיטוכונדריאלי HA, HB, HC, והכמויות והפעילות שלהן נבדקו בשיטות מקובלות תוך ביצוע שתי חזרות עבור כל דגימה. התוצאות מוצגות כממוצעים \pm שגיאת תקן. עיקר המסקנות המחקר עד כה הן: א. הגנוטיפים המיטוכונדריאליים בצאן אכן שונים זה מזה הן בריכוז המיטוכונדריות בכבד והן בפעילותן הסגולית; ב. ריכוז המיטוכונדריות בכבדים של פרטים מסוג HC גבוה יותר מאשר בפרטים המשתייכים לסוגים HA ו-HB; ג. במיטוכונדריות מטיפוס HB קומפלקס 4 פעיל יותר; ד. בהתחשב בריכוז המיטוכונדריות בכבד ובפעילות הסגולית שלהן נראה כי הגנוטיפ HA נחות בהשוואה לשני הגנוטיפים האחרים בכל בקשור לריכוז המיטוכונדריות ופעילותן החמצונית. להזכיר, גנוטיפ זה היה נחות בולדנות, כפי שנמצא בכבשי אפק אספ.

3.2.4 יצור רדיקלים חופשיים ע"י מיטוכונדריות מפרטים השייכים לקבוצות מיטוכונדריאליות שונות- יצור רדיקלים חופשיים של חמצן במיטוכונדריה חשוב מפני שהוא הגורם לנזקי חמצון במקרים פתולוגיים רבים. יצור הרדיקלים סופראוקסיד ומי חמצן יכול להוביל לפגיעה בתפקוד התאי על ידי חמצון של חלבונים מבניים ומטבוליים. כדי לחקור את התפקוד של מיטוכונדריות מהפולוגרופים A, B ו-C, מדדנו את רמות היצור של הרדיקלים במיטוכונדריות שבודדו מכבד טלאים בני 5 חודשים (איור 5). אין בהבדלים שנצפו בכדי להעיד על השפעה מובהקת של הפולוגרופ על קצב יצירת הרדיקל.

איור 5. יצירה של רדיקלים חופשיים על ידי מטוכונדריות מהפלוגרופים שונים.

Reactive oxygen species (ROS) formation was measured using isolated mitochondria (0.25 mg/ml) in 100 μ l wells in the presence of 2 μ M DCFDA. The reaction was incubated for 30 min and the state-two respiration was initiated by addition of 10 mM succinate. Fluorescence was measured at Ex 485 EM 520.



3.2.5 ריצוף עמוק של גנום נפל כבשה- כדי להקל על זיהוי מוטציות האחראיות לתמותת ברחם במהלך ההיריון של תלמים בני שגרים גדולים. בוצע ריצוף עמוק של 100 בסיסים משני הקצוות של מקטעי דנ"א באורך ממוצע של כ-600 בסיסים. הדנ"א הופק מרקמת טחול של נפל כבשה (איור 6). התקבלו 170,695,202 מקטעים שרוצפו באיכות טובה (דרוג האיכות הממוצע ב-5% העליונים של סולם סולקסה, ~38). מפוי הרצפים לגנום המיטוכונדריאלי העיד שכ-3% שייכים לגנום זה, תוצאה המעידה על כסוי ממוצע של כ-700 פעמים. שאר הרצפים כיסו את הגנום הגרעיני בשעור ממוצע של כ-11 פעמים. על כן, בהנחה שתאי הטחול דיפלואידים נתן לשער כי בממוצע בכל תא טחול נכחו 126 מיטוכונדריות. הגנום המיטוכונדריאלי השכיח מביניהם היה וריאנט של הפלוגרופ B שלא דווח בספרות, עד כה (טבלה 2). נתגלו בדנ"א של הנפל מספר מוטציות ברצפים של גנים מיטוכונדריאליים. להערכתנו אין במוטציות שהתגלו במיטוכונדריה של הנפל בכדי להסביר את הכשל בשרידות של עובר זה.

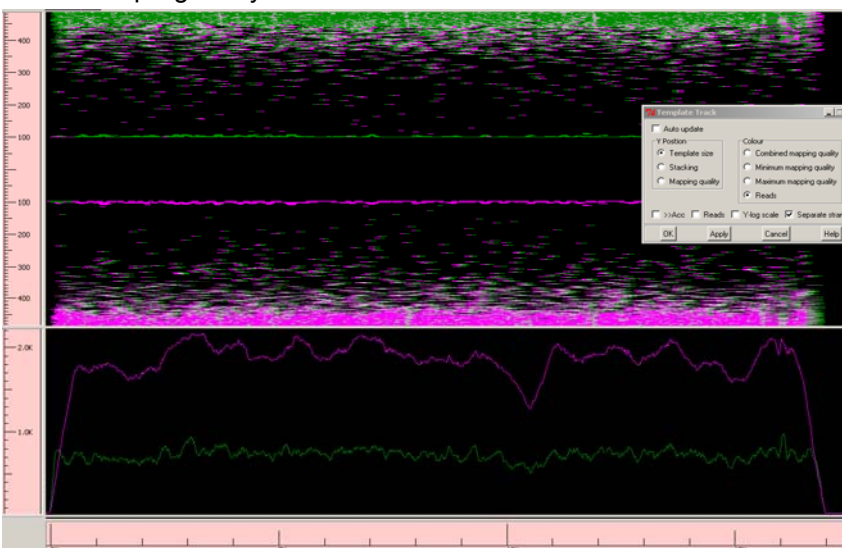
טבלה 2. שינויים בגנום המיטוכונדריאלי של נפל הכבשה.

Grenthem values (Science 185 862-864, 1974) are low: V to M is 21 and A to V is 64.

Position	654	3091	3743	5085	6491	7254	7671	7674	7985	9377	9998	10533	13014	15924	16070
Mutation	t→c	a→t	c→t	g→a	a→g	c→t	a→t	c→t	c→t	a→g	c→t	t→c	t→c	g→a	t→a
Gene	Ribosomal	NADH 1	tRNA Lucien	tRNA alanin	Cox1	Cox2			ATPase6	Cox3	NADN 4L	NADN 4L	NADH5	Control	Control
Amino Acids		S = S			V = V	L = L			A → V	V → M	L = L	Y = Y	A = A		

איור 6. ריצוף עמוק של גנום נפל כבשה- הגנום המיטוכונדריאלי.

DNA was extracted from the spleen tissue of a female fetus (#685932, IL# 4310) following intrauterine death at the ~20th week of pregnancy with retention of the fetus for about one week. The dead fetus (3.2 kg) was part of a triplet. Brothers (4 kg, and 4.9 kg) were born alive. Deep sequencing was performed using HiSeq2000 technology (Illumina, USA) and the pair end protocol on one lane that has yielded total of 341,390,404 reads (100 bp each). DNA fragment sizes were estimated in the range of 450 bp to 750 bp with average of 580 bp. The figure present template display of 114,932 reads that were mapped to the mitochondrion using GAP5. On the upper part fragments along the mitochondrial genome (X axis) are delineated according to their sizes (Y axis), for both strands. The portions of the fragment sequences colored in green for forward strand sequences and magenta for reverse strand sequences. On the lower part, the actual depth of coverage (Y axis) provided by the read sequence is given in green, while the coverage of the whole fragments is given in magenta.



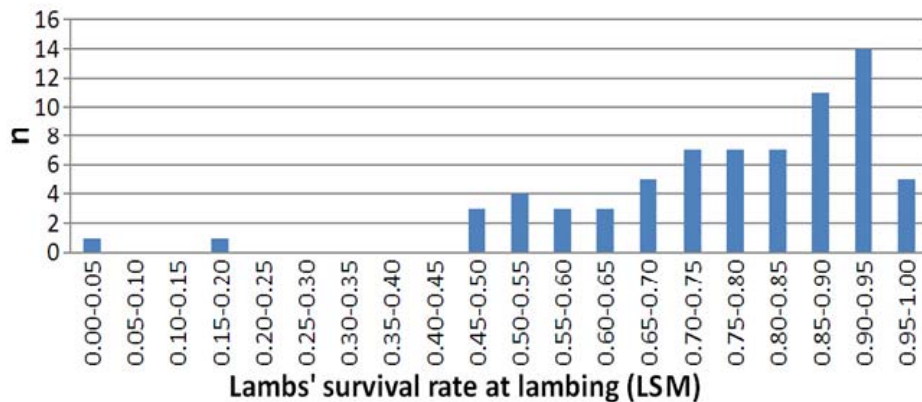
3.2.6 השפעת גנום הכבש בישראל על תכונות יצור-

3.2.6.1 שרידות עוברים וחלב- נקבעו גנוטיפים ל-202 דגימות באמצעות שבב דנ"א של חברת אילומינה המאפשר לקבוע בו-זמנית את הגנוטיפ של פרט ב-54,241 אתרים OvineSNP50 (<http://www.sheepmap.org/genseq.php>). האנליזה של OvineSNP50 בוצעה במעבדות AgResearch בניו-זילנד. האנליזות נערכו במתווה המתואר בפרק הקודם (בקר) עבור מספר תכונות חשובות לחקלאי לגביהן קיים בידנו רישום פנוטיפי: גיל בהמלטה ראשונה, וולדנות, כמות חלב, ושרידות עוברים. באוטוזום 6 נצפתה כצפוי ובמובהקות של ($p=6.64E-08$) השפעת המוטציה בגן *FecB* (בורולה, Davis et al., 1982) על ולדנות. ניכר כי בניגוד לבקר קיימים בכבש גנים כמותיים עיקריים שאפשר היה לאבחן את קיומם במדגם מצומצם יחסית. הוחלט להתמקד בשלב ראשון באימות האתרים לגנים כמותיים לכמות חלב באוטוזום 1 ושרידות עוברים בכרומוזום 3 ו-8. לפי תוצאות הריצוף העמוק של נפל הכבשה התברר שקיים גן שמדווח בספרות ההומנית שקשור לעיכוב בהתפתחות העובר ברחם ובו מוטציות המשנות את מבנה החלבון שיכולות להתקשר לאתר הגנומי לשרידות עובר בכרומוזום 8. אנו בשלב של אימות תגלית זאת. האימות יכול פיתוח מבחן לאיתור ההפלוטיפ בעל הערך כלכלי ומבחי אסוציה במדגם של פרטים רבים ובמבנים משפחתיים. אימות הגנים האמורים כגנים כמותיים עיקריים יצדיק ישום תוכנית השבחה מונחית סמנים בעדר לתכונות האמורות. כמו כן יבחנו הגנים המועמדים באזורים הגנומיים והקשר האפשרי שלהם למערכי גנים הקשורים לויסות המאזן האנרגטי בחיה.

3.2.6.1 תמותת טלאים סביב מועד ההמלטה- המחקר נערך בעדר המחקר של מרכז וולקני בית דגן אשר מונה כ-400 אמהות אפק-אסף. לבחינת גורמים הקשורים ללידת טלאים מתים נבדקו נתוני הלידה של 980 טלאים אשר נולדו במהלך ארבעה מחזורי גידול ב-419 המלטות. מתוך הטלאים, 802 נולדו חיים ו-178 נולדו מתים (ממוצע תמותה של 18%). שיעור הטלאים המתים היה תלוי בגודל השגר כאשר עבור שגרים של 1, 2, 3, 4, 5, ו-6 טלאים, שיעור התמותה הממוצע היה 0.0, 0.07, 0.24, 0.28, 0.21 ו-0.72, בהתאמה. בדיקת במעבדות המכון הוטרינרי של גורמי הפלה בטלאים מתים הניבה תשובה שלילית ומכאן, נשללה האפשרות כי מות הטלאים נגרם עקב זיהום בקטריאלי או ויראלי. אבחון מבנה גלגל העין ומצב האיברים הפנימיים של הטלאים המתים לימד כי, למעט מספר מקרים של עוברים אשר שהפסיקו להתפתח מוקדם מאוד במהלך ההיריון, תמותת הטלאים ארעה ברחם, מספר ימים לפני ההמלטה, ולא כתוצאה מקשיים במהלך ההמלטה (דיסטוכיה).

ניתוח שונות של מדדים מורפומטרים של הטלאים הנולדים כלל במודל הסטטיסטי את ההשפעה של: קבוצת הגידול, גודל שגר, מספר המלטה, מין הטלה והיות הטלה חי או מת בעת ההמלטה. הניתוח הראה כי בעוד שהטלאים אשר נולדו חיים והטלאים שנולדו מתים לא נבדלו באורך הגוף (Crown-Rump Length) שהיה (ממוצע±ש.ת.) 51.4 ± 0.4 ס"מ, הרי משקל הגוף של הטלאים המתים היה באופן מובהק ($p<0.0001$) נמוך מאשר משקל הגוף של הטלאים החיים: 3.5 ± 0.1 ק"ג לעומת 4.1 ± 0.1 ק"ג. מכאן ניתן ללמוד כי תמותת העוברים ברחם התרחשה לפי ההערכה 7 עד 10 ימים לפני תום ההיריון (Gootwine, 2013), כתוצאה כנראה מתנאי עקה שהתפתחו ברחם.

בחירת כבשים וולדניות לצורך מבחני אסוציאציה גנומיים (GWAS): לסריקה של סמנים הקשורים לתכונה של חיות טלאים בהמלטה נבחרו 71 כבשים בעלות ולדנות ממוצעת של 3.04 טלאים להמלטה, וחיות טלאים של 0.80 ממוצע. נתוני הכבשים כללו 4 עד 8 המלטות לכבשה, עם שגרים בני אחד עד שישה טלאים. עבור כל המלטה חושב שיעור חיות הטלאים כאשר הערכים נעו בין 0- כל הטלאים נולדו מתים, לבין 1- כל הטלאים נולדו חיים. דירוג הכבשים לפי חיות הטלאים בהמלטה נעשה בניתוח שונות כאשר במודל נכללו: מספר כבשה ($n=71$), מספר המלטה (1-8) וגודל השגר (1-6). התפלגות הכבשים לפי שרידות הטלאים הממוצעת שלהן בהמלטה מוצגת באיור 7. לשתי כבשים הייתה חיות טלאים ממוצעת נמוכה ביותר- מתחת ל-20%. חיות הטלאים הממוצעת אצל שאר הכבשים נעה בין 0.45 ל-0.99.



איור 7: התפלגות 71 כבשים ולדניות בעלות ולדנות ממוצעת של 3.04 טלאים להמלטה על פי חיות הממוצעת של הטלאים שלהן בעת ההמלטה.

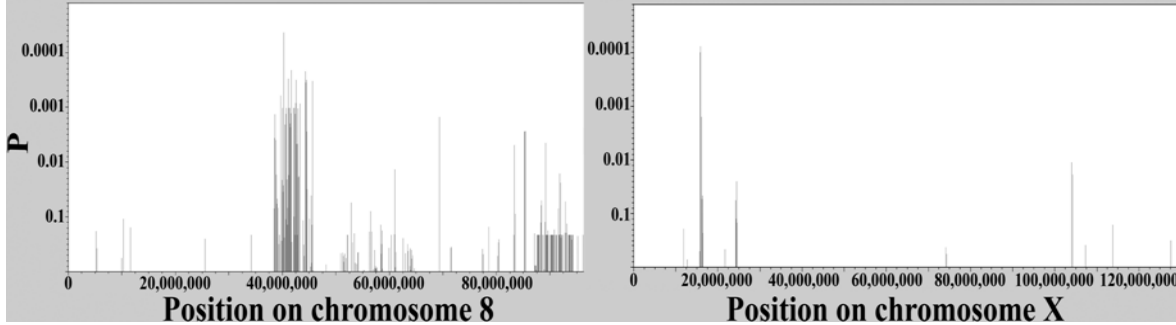
דגימות DNA מ-71 הכבשים נבדקו הקשר בין קבוצות הפלוטיפים של 10 סמנים ובין תכונת חיות הטלאים נבדק בעזרת תוכנת PLINK (Purcell et al., 2007). הפלוטיפים בארבעה עשר אזורים על פני כרומוזומים מס. 1, 8, 10, 26 ו-X הראו קשר מובהק עם התכונה של חיות טלאים בהמלטה, כמוצג בטבלה 3. מספר ההפלוטיפים בכרומוזומים היה 126,664, 44,537, 37,363, 14,550 ו-20,833 עבור הכרומוזומים 1, 8, 10, 26 ו-X, בהתאמה. גרפים מסוג "מנהטן" המציגים את מיקום על כרומוזומים 8 ו-X של הפלוטיפים בעלי קשר מובהק לתכונת חיות הטלאים מוצגים איור 8. ניתוח הקשר בין הגנוטיפים השונים בכל סמן ותכונת שרידות הטלאים נבחן בנוסף גם בעזרת תוכנת EMMAX (Kang et al., 2010). תוכנה זו לוקחת בחשבון קשרי המשפחה בין פרטים השונים באוכלוסייה בכואה להעריך קשר בין סמן לתכונה. ב-10 מתוך 14 האזורים שאותרו על ידי ניתוח PLINK נמצאו בניית EMMAX סמנים הקשורים באופן מובהק לתכונת חיות הטלאים בהמלטה.

טבלה 3. אזורים על גבי כרומוזומים בהם הפלוטיפים בני 10 סמנים הראו קשר מובהק עם התכונה של חיות טלאים בהמלטה אצל כבשי אפק-אספ. מיקום האזורים הוא על פי גרסה 3.1 של גנום הכבש:

<http://www.livestockgenomics.csiro.au/cgi-bin/qbrowse/oarv3.1>

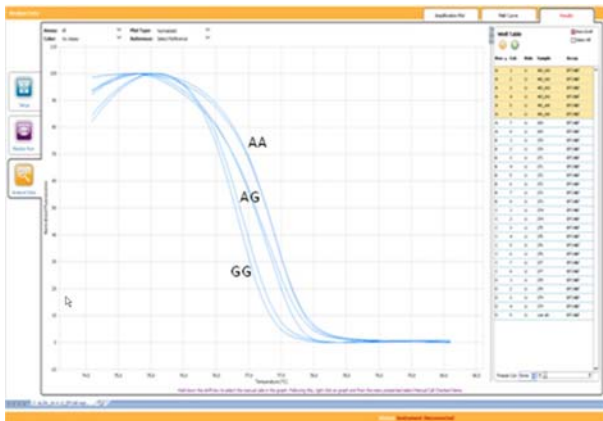
מס. הכרומוזום	מיקום ממוצע של הפלוטיפ (מספר הבסיס)	גבול המובהקות על פי בונפרוני	מובהקות הקשר בין הפלוטיפים לתכונה
1	16,490,782	3.9×10^{-7}	2.35E-08
1	43,949,968		3.67E-08
1	71,400,547		4.91E-08
1	235,394,255		1.57E-09
8	40,265,910	1.12×10^{-6}	9.70E-10
8	69,304,389		3.44E-08
8	85,363,790		6.12E-08
10	53,294,175	1.34×10^{-6}	1.09E-07
10	69,065,997		7.21E-07
10	77,943,181		4.77E-07
26	13,164,433	3.43×10^{-6}	7.35E-09
26	34,043,911		1.18E-06
X	15,882,148	2.4×10^{-6}	3.69E-09
X	104,021,421		5.36E-07

איור 8. אזורים כרומוזומליים על גבי כרומוזום 8 וכרומוזום X בהם הפלוטיפים בני 10 סמנים הקשורים לחיות טלאים בהמלטה בכבשי אפק-אסף. מובהקות הקשר נבחנה תוך התחשבות בתיקון בונפרוני להשוואות מרובות.



3.2.6.2 הרחבת בחינת הקשר בין SNPs בכרומוזום מס. 1 ותכונת חיות הטלאים- חיפוש במאגר ה-DNA שלנו העלה דוגמאות מ-47 כבשים נוספות אשר בדומה ל-71 הכבשים הראשונות היו בעלות ולדנות ממוצעת של קרוב לשלושה טלאים. DNA זה לא היה באיכות המתאימה לבדיקה בשבב. אולם, פיתחנו בדיקת גנוטיפים תוך שימוש בטכניקת High Resolution melting (HRM) (איור 9). הסתייענו בשיטה זו לקביעת הגנוטיפ אצל 47 הכבשים במספר סמנים על כרומוזום 1, באזור שנמצא בקשר מובהק עם תכונת חיות הטלאים. רשימת הסמנים ומיקומם מופיעה בטבלה 4.

איור 9. תוצאות בדיקת HRM בא ניתן להבחין בין שלושת הגנוטיפים בסמן OAR1_39806322.



טבלה 4. רשימת SNPs על כרומוזום 1 שנבדקו ב-47 כבשים בטכניקת HRM.

מיקום הסמן (מס. בסיס) על כרומוזום 1 בגרסה 3.1 של גנום הכבש	סמן
38,512,700	Oar1_39725206
38,544,440	OAR1_39763346
38,589,079	OAR1_39806322
38,633,519	OAR1_39850200
38,690,672	s06710

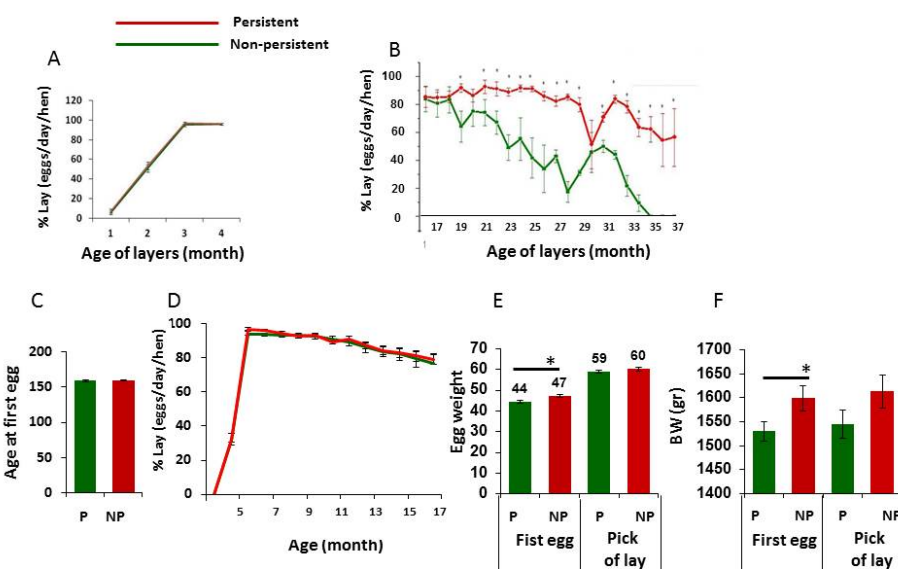
ניתוח שונות בחן את הקשר בין החיות הממוצעת של הטלאים של 118 (71+47) הכבשים והאללים השונים בכל סמן וסמן (טבלה 2). זאת, לאחר שהנתון של חיות הטלאים עבר טרנספורמציה לוגריתמית. במקרה של הסמן OAR1_39806322 התקבלו כי לגנוטיפ ב-SNP זה אפקט מובהק ($P < 0.014$) על חיות הטלאים (טבלה 5). ניתוח התוצאות תחת מודל של דומיננטיות (הגנוטיפים AA ו-AG צורפו יחד) הגדיל את מובהקות האפקט ($P < 0.0043$).

טבלה 5. חיות טלאים אצל כבשי אפק אסף כתלות בגנוטיפ בסמן OAR1_39806322, לפי מודל הורשה אדטיבי ודומיננטי.

מודל דומיננטי	מודל אדטיבי	n	גנוטיפ בסמן OAR1_39806322
חיות טלאים בהמלטה	חיות טלאים בהמלטה		
0.71 A	0.73 AB	16	AA
	0.70 B	37	AG
0.80 B	0.80 A	65	GG

3.3.1 מעקב אחרי ביצועי ההטלה של דור F2- בשלוחת ההטלה, משך תקופת ההטלה היעילה הוא מהגורמים הכלכליים המשפיעים ביותר על רווחיות הענף. בהצעת מחקר זו ביקשנו לבדוק את היתכנות יצירת קווים גנטיים של מטילות הנבדלות בייעילות ההטלה בגיל המבוגר. קווי מטילות אלה יאפשרו את איתור המסלולים הפיסיולוגיים, הגנטיים והמולקולאריים הדרושים לייעילות הטלה טובה בגיל המבוגר.

בשלב הראשון של המחקר עקבנו אחר יעילות ההטלה של המטילות מדור F2 של הטיפוח. בתחילת ההטלה לא נמצא כל הבדל בין שתי הקבוצות כפי שהיה צפוי כי הטיפוח נעשה על יעילות ההטלה בגיל המבוגר. בגיל המבוגר של המטילות בשתי בקבוצות הייתה וריאציה רבה בייעילות ההטלה שלא נבדלה באופן מובהק בין הקווים אך כן נמצא מתאם בייעילות ההטלה בין אחיות (צאצאיות של אותה מטילה), שמעיד על תורשתיות של התכונה. להמשך המחקר נבחרו שתי קבוצות של מטילות אחיות שהראו אחידות בייעילות ההטלה (קבוצה 1 ו 2 של מתמידות וקבוצה 3 ו 4 של מפסיקות; איור 10B), מטילות אלה שמשו ליצירת הדור השלישי של הטיפוח. להפריית השתמשנו בזרע של האחים של המטילות שנבחרו אך בהצלבה (1 ל- 2, 2 ל- 1, 3 ל- 4, 4 ל- 3) כדי לשמר את הווריאציה הגנטית. מדדי הכניסה להטלה של המטילות מהדור השלישי (איור 10 C-F) הראו כי גיל המטילות בכניסה להטלה, כמו גיל המטילות ביום בו התחילו להטיל (גיל ביצה ראשונה; איור 10C), יעילות ההטלה וקצב ההגעה לשיא ההטלה (איור 10D) לא היו שונה בין שני הקווים. נתון זה חשוב כי מטרת הטיפוח היא לא לפגוע במדדי ההטלה בכניסה להטלה ובשלב של שיא ההטלה, אלא, להשפיע על מדדי ההטלה בגיל המבוגר בלבד. למרות זאת, כן נמצא הבדל משמעותי במשקל הממוצע של הביצה הראשונה (איור 10E) ובמשקל הגוף שנמדד לכל מטילה ביום שבו הוטלה הביצה הראשונה (גיל ביצה ראשונה; איור 10F). ההבדלים במשקלי הביצים ובמשקלי הגוף של המטילות לא היו משמעותיים בגיל של שיא ההטלה (גיל 7 חודשים). המשמעות של הבדלים אלה והקשר האפשרי ביניהם לבין מדדי ההטלה יבדקו בהמשך המחקר בהתאם לתוצאות ההטלה בגיל המבוגר. אנו מצפים כי ההתפצלות בייעילות ההטלה של המטילות המתמידות והמסיימות תופיע אחרי גיל 18 חודשים כפי שנמדד לגבי אימותיהן (איור 10B), אך מועד הגשת הדו"ח לא אפשר את סיום המעקב.

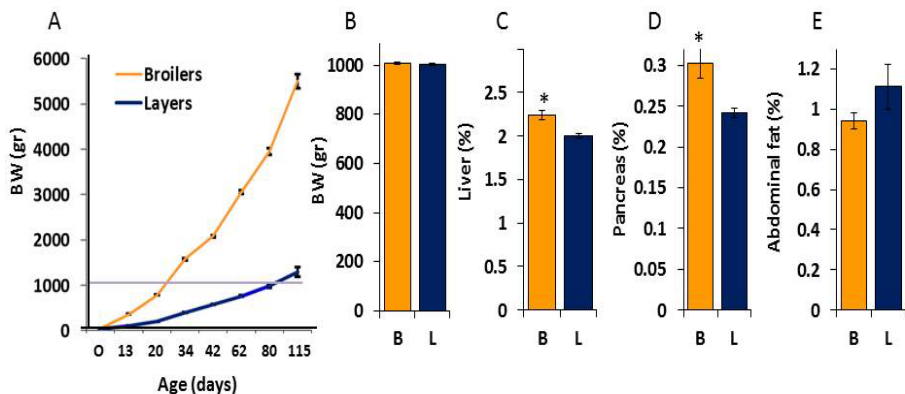


איור 10: אפיון יעילות ההטלה של האימהות מדור F2 ושל מדדי ההטלה של צאצאיותיהן מדור F3. שתי קבוצות של אחיות מהלהקה שטופחה להטלה יעילה בגיל המבוגר (Persistent) ושתי קבוצות מהלהקה שטופחה להטלה בלתי יעילה (Non-persistent) הטילו בייעילות דומה בגיל הצעיר (A) אך נבדלו בגיל המבוגר (החל מגיל 18 חודשים; B). הצאצאיות מדור F3 התחילו להטיל באותו גיל (C) והטילו בייעילות דומה עד לגיל 14 חודשים (D). משקל הביצה היה שונה משמעותית בין שתי הקבוצות כשנמדד בביצה הראשונה (E). משקל גוף שוטלה אך לא בשיא ההטלה (F). משקל גוף שנמדד לכל מטילה ביום שבו הטילה את הביצה הראשונה היה שונה משמעותית בין הקבוצות ההבדל המשמעותי לא נשמר בשיא ההטלה (גיל 7 חודשים; E). * מיצג שונות סטטיסטית. $P < 0.05$. מספר המטילות המייצגות כל אחת מקבוצות הטיפוח הוא 50 ב A, B ו 35 ב C-F.

3.3.2 אנליזה של שונות מטכונדריאלית - לאנליזה של שונות מיטוכונדריאלית של המטילות נבחרו באקראי 10 מטילות מתמידות ו-10 בלתי מתמידות מדור המייסדות G0. דגימות כבד שנשמרו בפריוזר שמשו להפקה של DNA. פרימרים התוחמים את רצף ה-D loop של המיטוכונדריה בעופות שמשו להגברת (PCR) של הדנ"א של העופות. רצף הפרימרים היה: 5'-F ונשלחו לריצוף. על פי הרצף נמצא כי בכל המקרים, הרצפים היו זהים. תוצאה זו מעידה על כך שהמטילות בלהקת המוצא למרות שאינן מייצגות זן טהור, ולמרות שהטיפוח בעופות מרכיב משילוב של כמה זנים בשלשה שלבים של הכלאות, הן בעלות רצף D loop זהה וכנראה כולן צאצאיות של אם יחידה.

3.3.4 רצוף הגנום של מטילה מצטיינת - כדי לצור בסיס נתונים שיישקף גנים אופייניים להטלה יעילה, עקבנו אחר המטילות המתמידות מדור F2 (איור B8), ובחרנו מטילה אחת שהמשיכה להטיל ביעילות של מעל 80% עד לגיל של 3 שנים. רצוף עמוק לגנום של מטילה זו (מטילה מס' 13) נעשה בדנ"א גנומי שהופק מדגימת דם. בוצע ריצוף עמוק של 100 בסיסים משני הקצוות של מקטעי דנ"א באורך ממוצע של כ-600 בסיסים. התקבלו 112,832,081 מקטעים המעניקים כיסוי ממוצע של 21.5x. משום שבבניה של גנום התרנגולת שפורסמה במאגרי מידע ציבוריים חסרים גנים רבים (Hughes & Friedman, 2008), העדפנו לצור בניה בלתי תלויה על סמך הרצפים שהתקבלו. הבניה כללה: הסרת אדפטורים ואיחוד זוגות רצפים של מקטעים קצרים (>200), שילוב שתי התוכנות SeqPrep, Trimmomatic, <https://github.com/jstjohn/SeqPrep> <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>; תקון שגיאות (מודול Corrector_AR של SOAPec <http://soap.genomics.org.cn>); ובנית קונטיגים (SOAPdenovo2, <http://sourceforge.net/projects/soapdenovo2/files/SOAPdenovo2>). התקבלו 3,560,117 קונטיגים עם אורך ממוצע של 441 בסיסים, כאשר הארוכה ביותר של 89,891 בסיסים סה"כ כ-1.5 מליארד בסיסים. אורך זה עולה בכ-50% על הצפוי משום שהתוכנה מתקשה בשילוב רצפים שמקורם ממצב דיפלואידי, כלומר קימים שני העתקים שונים של הגנום בפרט שנבדק. בסיס הנתונים של רצוף גנום התרנגולת שקבלנו שימש לנו לסריקה של כמה גנים מועמדים ובדיקה של שינויים גנטיים בהם. בשלב זה נמצאו כמה שינויים (SNPs) בגן לקולטן ללפטין ובגן *POMC*. דרוש מבחן אסוציאציה, בהיקף נרחב, כדי לאשר את המתאם בין שינויים גנומיים אלה ליעילות הטלה. בנוסף שימש מסד נתונים זה לחיפוש של רצפים חדשים של הגן ללפטין שמצאנו במקביל בכמה ציפורים. חיפוש זה תרם תרומה משמעותית למסקנה שלנו שחלק מהעופות אבדו וחלק שמרו את הגן ללפטין. ממצא חדשני זה שלנו שהושג בחלקו במסגרת מחקר זה היווה בסיס לכתיבת שלשה מאמרים מהם אחד כבר התקבל (Gertler et al., 2013).

3.3.5 השוואת ריצוף עמוק של רנ"א מרקמות הקשורות בחילוף חומרים בין פרגיות מזון הפטמים והמטילות הקלות - קיימים כמה מודלים להשמנה בעופות אך המודל הרלוונטי ביותר למחקר החקלאי הוא זה של המטילות והפטמים, כי במודלים אחרים יתכן שנעשה טיפוח לאללים שאינם מטיבים עם מדדי הייצור. מאחר שהמטילות הקלות מצטיינות ביעילות ההטלה והפטמים מצטיינים בגדילה מהירה ונצילות מזון גבוהה סביר להניח כי חלק משמעותי מההבדלים הגנטיים בין הזנים קשורים למנגנונים אלה. כדי להגביר את הסיכוי לאתר רצפי רנ"א שגורמים להבדלים הפסילוגניים בין הזנים ולא את אלה שנובעים מגורמים אחרים בחרנו לבצע את ההשוואה בפרגיות במשקל גוף זהה ולא בגיל זהה. כפי שניתן לראות באיור 11, גם במשקל גוף זהה נמצא הבדל משמעותי בגודלן של רקמת הכבד והלבלב שהיו גדולים יותר בפטמים. במידת צבירת שומן בחלל הבטן, לא נמדד הבדל משמעותי למרות שנראתה מגמה של עליה דווקא בפרגיות הקלות (איור 11).



איור 11: מעקב אחר קצב הגדילה והרכב הגופה של הפרגיות. (A) 50 פרגיות מזן הפטמים (broiler, B) ומזן המטילות (Layer, L) נרכשו במדגרה חיצונית ביום הבקיעה, גודלו יחד באותם תנאים והוזנו באותן תערובות. בגיל 30 יום נבחרו 10 פרגיות הפטמים שהגיעו למשקל של $1\text{Kg} \pm 0.1$ ובגיל 90 יום נבחרו 10 פרגיות מזן המטילות שהגיעו לאותו משקל גוף (ק"ג). הפרגיות שמשו להפקה של RNA ולבדיקה של האחוז ממשקל הגוף של הרקמות המטבוליות (כבד, לבלב, ושומן חלל הבטן; B-E).

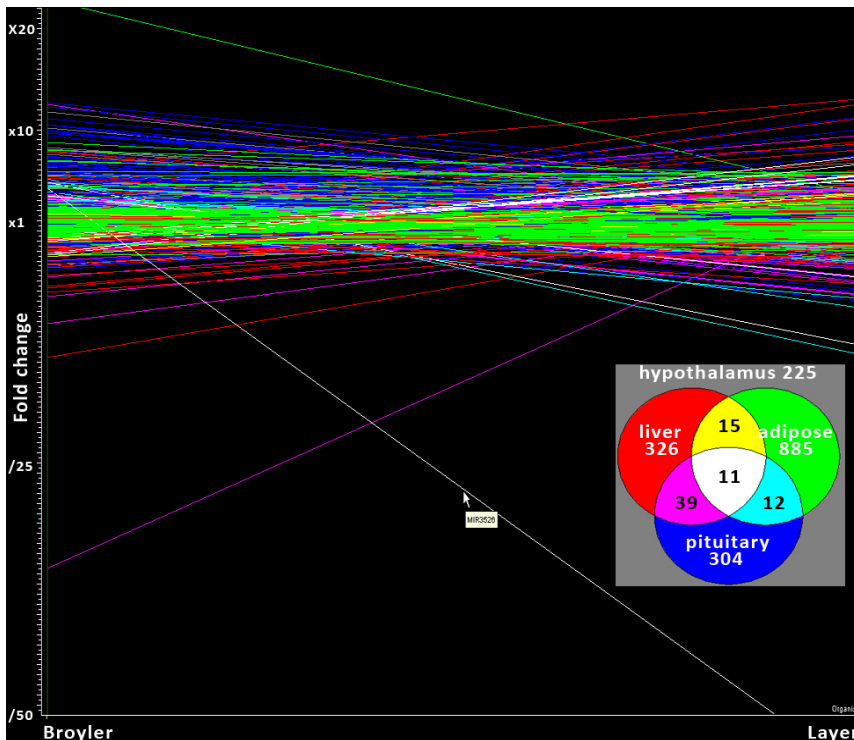
לצורך הריצוף הוכנו 8 ספריות (טבלה 6) שרוצפו בנתיב (Lane) יחיד, של 100 בסיסים מקצה יחיד, סה"כ 185,318,267 רצפים. הרצפים מופו לטרנסקריפטום התרנגולת בעזרת תוכנת mrsfast-ultra (<http://mrsfast.sourceforge.net>) ורמת הביטוי הוערכה בעזרת מודול CountReads של תכנת GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk>). איכות התוצאות מודגמת באיור 12. נוצר בסיס נתונים רחב המצביע על שלושה מנגנונים עקריים שעומדים מאחורי שינויים ברמת הביטוי של גנים בין פטמים למטילות: 1. שינוי במערכת החיסון המלווה במאפיינים של דלקת בפטמים; 2. שינוי בביטוי של חלבוני המטריצה החוץ תאית; 3. שינוי באנזימים מטבולים ברקמות הכבד והשומן (איור 12).

טבלה 6. ריצוף עמוק של 8 ספריות ביטוי ברקמות כבד, שומן, היפופיזה, היפוטלמוס של מטילות ופטמים.

Strain	Tissue	Chicken	Sample	Total reads	Mapped genomic reads	Mitochondrial reads	Number of mapped genes*
Layers	hypophysis	7	1	21,280,507	12,721,019	1,552,304	1,192
	hypothalamus	9	2	21,550,981	14,424,483	2,072,150	1,202
	adipose tissue	7	3	26,119,899	16,978,776	1,116,517	1,214
	liver	7	4	22,372,987	14,381,592	399,417	725
Broilers	hypophysis	9	5	27,893,251	16,920,311	1,901,272	840
	hypothalamus	9	6	20,677,256	13,497,088	2,424,517	1,268
	adipose tissue	8	7	21,156,008	14,130,885	707,685	1,243
	liver	9	8	24,267,378	15,268,117	476,533	1,055

*Genes were accounted from minimum 100 Hits/ Million reads

איור 12. רמת ביטוי של 1,995 גנים משתנה פי עשר ויותר ברקמות כבד, שומן, היפופיזה והיפוטלמוס בין מטילות ופטמים.



רמות הביטוי היחסיות לחציון של כל הרקמות מצוינות במטילות (ימין, Layer) ופטמים (שמאל, Broiler). מופעים גנים שרמתם הממוצעת בארבע הרקמות השתנתה פי עשר. השווה פרטנית של כל סוג רקמה בין זני התרנגולות הראתה ש-1,995 גנים הראו שינוי בביטוי של מעל סדר גודל באחת מהרקמות. שינויים של שלוש מהרקמות והחפיפות ביניהם מוצגים בדיאגרמת ון (ימין, למעלה). הצבעים של התעתיקים השונים המופיעים בתמונה תואמים למיקומם בקבוצות של דיאגרמה הון. חץ מצביע לקו של המיקורונ"א שרמת ביטוי בפטמים גדולה פי 320 מרמת הביטוי שלו במטילות (שיפוע היורד משמאל לימין, בלבן). אנליזה של העשרה באנוטציה של הגנים המתבטאים הראתה שבקבוצת הכבד (אדום) והשומן (ירוק) מופיעים אנזימים, ושבקבוצת ההיפופיזה גנים הקשורים למטריצה החוץ תאית (כחול, $p < 0.05$). הגנים שהשתנו בכל הרקמות היו קשורים למערכת

בנוסף, נמצאו כמה ממצאים משמעותיים לגבי גנים ספציפיים שאת משמעותם הביולוגית אנו חוקרים עתה: (1) הביטוי הדומיננטי של הקולטן הארוך ללפטין (Ob-Rb) נמצא בהיפופיזה בניגוד ליונקים שבהם הקולטן מתבטא בעיקר בהיפוטלמוס. בהתאמה לכך מצאנו ביטוי גבוה ביותר של הקולטן ללפטין בהיפופיזה של יונים בשיטה אחרת (real time PCR). ממצא זה הדומה לדיווח קודם בצפרדעים מעיד לדעתנו על האפשרות שהתפקיד הקדום יותר של הלפטין הוא בבקרה על הגדילה ועל מערכת הרבייה ולא על התיאבון. (2) ביטוי גבוה של mir-3526, שמתבטא פי עשרה עד 500 (איור 12), בכל הרקמות שנבדקו בפטמים לעומת במטילות. זה מיקרו-רנ"א ספציפי לעופות המתקשר למצבי עקה הקשורים בזהומים חיידקיים ונגיפיים. (3) מצאנו ביטוי גבוה של מרבית הגנים ממשפחת ה- Hox רק ברקמת השומן ולא ברקמות אחרות. רק שניים מבין הגנים האלה (*HOX-C10 & D10*) נבדלו בין פטמים למטילות והיו בעלי ביטוי גבוה של פי 3 ו 8, בהתאמה. (4) הגן *FTO* שהתגלה לאחרונה כקשור להשמנה מסיבית ולסינדרום המטבולי ביונקים. *FTO* נמצא ברמה גבוהה פי 15 בהיפוטלמוס של פטמים. לסיכום בסיס הנתונים שהתקבל בניסוי זה בעל ערך רב לזיהוי גנים ומסלולים ביוכימיים הקשורים להשמנה, ובקרת האנרגיה בעופות.

3.4 אמנון

3.4.1 אפיון הפעילות האוסמורגולטורית במערכת העיכול-

תאים עשירים במיטוכונדריה בעור ובאפיתל הזימים אחראים בדגי אמנון על הפרשת עודפי יונים במי ים וקליטתם במים מתוקים בעזרת פעולה משותפת של מספר טרנספורטרים ותעלות יונים, כאשר היותר מוכרים מביניהם הם משאבות נתרן-אשלגן (*NKA*), קו-טרנספורטרים של כלור וקטיונים (*NKCC, NCC*) ותעלת כלור מסוג Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) (Evans et al., 2005). קבוצה של דגי אמנון היאור ואמנון מוזמביק גדלו במים מתוקים ובמים מלוחים ומהם נילקחו דוגמאות מרקמות שונות. נדגמו חלקים שונים של מערכת העיכול (ושט, קיבה, מעי קדמי, מעי אמצעי, מעי אחורי), כלייה, זימים, וממברנת האופרקולום (רקמת עור), כרקמות המעורבות בפעילות אוסמורגולטורית, ושריר הלב כביקורת. מכל הדוגמאות הופק רנ"א

ונבדקה רמת הביטוי של ארבעה גנים לחלבונים ממברנליים המוכרים כמעורבים באוסמורגולציה והוזכרו למעלה (*NKA, NKCC, NCC*) במקביל אופיינו דגמי ההתבטאות של גנים פחות מוכרים בתהליכי אוסמורגולציה אשר נמצאו באנליזת הטרנסקריפטום. באנליזה זו הושם דגש על גנים המעורבים ברגולציה של אשלגן- קוטרנספורטרים מקבוצת *KCC* ותעלות האשלגן תלויות המתח *KCNJ15* ו *KCNJ16*. בנוסף, נבחנו טרנספורטרים של פפטידים קצרים ושל חומצות אמינו המעורבים הן בספיגת מזון במעי והן בתהליכים אוסמורגולטוריים בכלייה. אפיינו את השפעת מליחות המים על דפוסי ההתבטאות של הטרנספורטרים (*PepT1*) *SLC15A1*, (*PepT2*) *SLC15A2*, ו- *SLC7A9* ($B^{0+}AT$) ברקמות שונות ובשלבם שונים של תהליך עיכול המזון, הן ברמת הרנ"א והן ברמת החלבון. בשלב הבא אנו מתכננים לבחון את האינטראקציה בין טרנספורטרים אלה ובין תעלות ומשאבות יונים ליצירת מיקרוסביבה בסיסי המעי.

3.4.2 אנליזה של הטרנסקריפטום הגרעיני-

נבחרו דגים משני מיני אמנונים, אמנון היאור ואמנון מוזמביק, לאנליזות הגנומיות. דגים משני המינים הועברו לגידול במים מתוקים ובמים מלוחים. מדגים אלו נלקחו דוגמאות רקמה מהמעי הקדמי והאחורי ובוצע ריצוף עמוק של הטרנסקריפטום (טבלה 7, איור 13A).

טבלה 7. ריצוף עמוק של 8 ספריות ביטוי ברקמת המעי של אמנון.

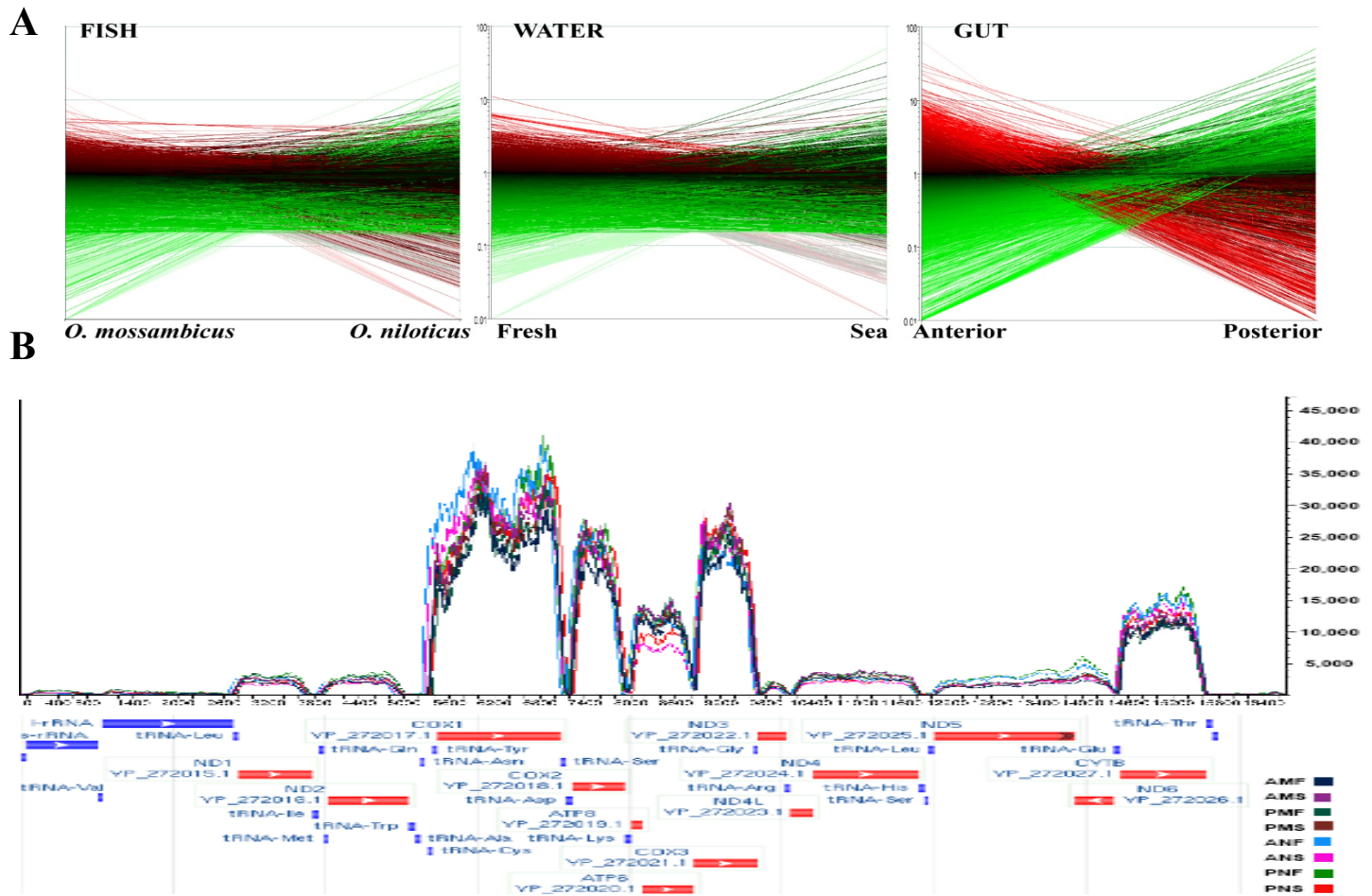
Water salinity	Fish	Species	Intestine tissue	Sample	Total reads	Mapped genomic reads	Mitochondrial reads	Number of mapped genes*
SW	5	<i>O. niloticus</i>	Anterior	1	20,551,526	12,232,132	906,255	1,285
			Posterior	2	20,831,885	12,970,007	1,081,843	1,321
	5	<i>O. mossambicus</i>	Anterior	3	18,270,126	14,184,717	1,014,320	1,139
			Posterior	4	20,264,277	13,908,868	1,020,472	1,381
FW	5	<i>O. niloticus</i>	Anterior	5	21,114,889	14,348,233	1,153,535	1,305
			Posterior	6	17,443,589	13,683,846	1,016,357	1,323
	5	<i>O. mossambicus</i>	Anterior	7	19,575,859	12,997,209	1,168,220	1,402
			Posterior	8	18,583,158	12,320,487	1,046,669	1,227

*Genes were accounted from minimum 100 Hits/ Million reads

זיהוי הגנים המתבטאים בשני המינים נעשה על ידי השוואת הרצף לגנום אמנון היאור שפורסם. השוואה זאת העידה שזן אמנון היאור שבידנו שונה מהמפורסם אולם דרגת הדמיון של הרצף היתה גבוהה (>95%) עבור שני המינים, אמנון היאור ואמנון מוזמביק, כך שניתן היה לזהות באמינות את הגנים האורתולוגיים. אולם רק 74% מהרצפים מופו לגן המקודד בעיקר משום שבניית הגנום נוכחית במקרים רבים אינה כוללת את כל רצף המשועתק ומתרכזת באזור המקודד לחלבון בלבד. ברצפים שזוהו, אותרו שינויים בביטוי הגנים בהתאם לתנאים השונים שנבחנו בניסוי (איור 13A), כאשר המיקום לאורך המעי היה הגורם העיקרי שהשפיע על רמות הביטוי. מסקנות נוספות שנגזרו מניסוי זה היו: 1. רמות הביטוי של יותר גנים באמנון היאור הושפעו ממליחות מאשר באמנון מוזמביק. 2. מספר הגנים מבוקרי המליחות היה גבוה יותר בכ 50% במעי הקדמי של אמנון היאור לעומת אמנון מוזמביק, אך במעי האחורי מספרם היה גבוה רק בכ- 5%. 3. נמצאו כ 70 גנים בעלי תגובה הפוכה למליחות, כאשר ביטויים עולה במין אחד הוא יורד במין השני. תופעה זו הייתה ייחודית למעי הקדמי. 4. בתנאים שנבחנו, זוהו שינויים מובהקים ברמות הביטוי גנים של טרנספורטרים, ביניהם הקשורים לויסות לחץ הדם. כדי לאמת

את התוצאות נבחנו קבוצת דגים חדשה בה נמדדו רמות הביטוי של גנים נבחרים מקבוצה זאת בעזרת הגברה כמותית של הרנ"א שליח שבודד (rtPCR).

3.4.3 אנליזה של הטרנסקריפטום המיטוכונדריאלי- מקורם של כ-5% מהרצפים היה מטוכונדריאלי (טבלה 7, איור 13B). ניתוח של השינוי ברמות הביטוי של הגנים המיטוכונדריאליים העיד על בקרה שלעיתים שונה בין המינים ושמבוססת על שני מנגנונים. 1- שינוי כולל של ביטוי כל הגנים שיתכן ומעיד על שינוי במספר המיטוכונדריאליים. בשני המינים היתה עליה במעי הקדמי בשיעור ממוצע של 12% ואילו במעי האחורי היתה ירידה ממוצעת של 7%, בתגובה לעליה במליחות. 2- שינוי דפרנציאלי בביטוי גנים מטוכונדריאליים- מנגנון זה נצפה רק באמנון היאור. למשל במעי הקדמי יורדת רמת הביטוי של הגן *ATP5* ואילו זאת של *COX3* עולה (איור 13B).



איור 13. רמות הביטוי של גנים במעי דג האמנון במים מתוקים ומלוחים.

The anterior (A) and posterior (P) intestines were sampled from fish maintained in sea-water (S, 35 ppt) and in freshwater (F, 1 ppt), five *O. niloticus* (N) and five *O. mossambicus* (M) in each salinity. Total RNA was extracted from each of the 40 samples and equal amounts were pooled from each five replicates. The resulting eight cDNA libraries were sequenced on an Illumina Hi-Seq2000 device and the obtained sequence reads were mapped to the NCBI tilapia transcriptome database using SMALT software, determining the number of hits per gene. **A.** An analysis of transcription levels visualized using GeneSpring software and consists of 3 panels showing the differential expression of all genes in respect to 3 conditions: the fish species, the water salinity and the tissue sample location within the gut. The identity of variable tested for each condition is noted below the X axis. Number of hits for each gene is indicated on a logarithmic scale (Y axis). Genes that their first variable had lower or higher expression comparing to the average are colored by green and red, respectively. **B.** An analysis of mitochondrial gene expression patterns visualized using GAP5 software and consists of overlay of 8 template displays identified by the color key at the bottom right. Each experiment is identified by a three letter code describing the tissue (A or P), the species (M or N) and the water salinity (F or S). The genes encoded by the mitochondrial genome are delineated according to their position in the genome (X axis), while the Y axis indicates the depth of coverage.

3.4.4 רצוף הגנום של נקבת אמנון הירדן- אמנון הירדן (*Oreochromis aureus*) גדל באופן טבעי במערכת ירדן-כנרת. הוא האמנון העמיד ביותר לטמפרטורות נמוכות. תכונה זאת בנוסף לקצב גדילה טוב, צבע ומבנה גוף נאים הביאו לשילובו בתכנית טיפוח הקלאי בתחנת המחקר דור, ולברירת להקות רבייה בעלות תכונות גנטיות משופרות של מין זה. כדי לצור בסיס נתונים שיישקף גנים אופייניים למין חשוב זה בצענו רצוף עמוק לגנום של נקבה בעזרת דנ"א גנומי שהופק מדגימת סנפיר, במתווה דומה למתואר עבור ריצוף התרנגולת. בוצע ריצוף עמוק של 100 בסיסים משני הקצוות של מקטעי דנ"א באורך ממוצע של כ-600 בסיסים. התקבלו 141,161,231 מקטעים המעניקים כיסוי ממוצע של $\times 26$. בניית הגנום כללה: הסרת אדפטורים ואיחוד זוגות רצפים של מקטעים קצרים (>200, שילוב שתי התוכנות Trimmomatic, SeqPrep); תקון שגיאות (מודול Corrector_AR של SOAPec); ובניית קונטיגים (SOAPdenovo2). התקבלו 3,916,548 קונטיגים עם אורך ממוצע של 383 בסיסים, כאשר הארוכה ביותר של 58,033 בסיסים, סה"כ כ- 1.4 מליארד בסיסים. אורך זה עולה בכ- 27% על הצפוי משום שהתוכנה מתקשה בשילוב רצפים שמקורם ממצב דיפלואידי, כלומר קימים שני העתקים שונים של הגנום בפרט שנבדק.

Reviewed Journals:

1. Glick G., Shirak A., Uliel S., Zeron Y., Ezra E., Seroussi E., Ron M. and Weller J.I. (2012) Signatures of contemporary selection in the Israeli Holstein dairy cattle. *Anim. Genet.* **43** Suppl 1:45-55.
2. Reicher, S., Seroussi, E., Weller, J.I., Rosov, A. and Gootwine, E. (2012) Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock. *J. Anim. Sci.* **90**:2084-91.
3. Seroussi, E., Glick, G., Shirak, A., Ezra, E., Zeron, Y., Ron, M. and Weller, J.I. (2013) Maternity validation using sire-only BovineSNP50 BeadChip data. *Anim. Genet.* **44**:754-757.
4. Gertler, A., Shinder, D., Yosefi, S., Shpilman, M., Rosenblum, C.I., Ruzal, M., Seroussi, E., and Friedman-Einat, M. (2013) Pegylated leptin antagonist with strong orexigenic activity in mice is not effective in chickens. *J. Exper. Biol.* **217**: 180-184.
5. Weller, J.I, Glick, G., Shirak, A., Ezra, E., Seroussi, E., Shemesh, M., Zeron, Y., and Ron, M. (2013) Predictive ability of selected subsets of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a moderately sized dairy cattle population. *Animal* **8**: 208-216.

Articles of symposia proceedings and meeting Abstracts:

1. Seroussi U., Seroussi E. (2013) Applying machine learning to the prediction of breeding values using single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a small-sized dairy cattle population. <http://ibs13.cs.bgu.ac.il/sites/default/files/IBS13-posters.pdf>. The 15th Israeli Bioinformatics Symposium, Beer-Shiva, Israel. The poster is accessible at: <http://cowry.agri.huji.ac.il/SeroussiBio15thPoster.pdf>.
2. Seroussi, E., Shirak A., Ron M. (2013) Inferring the genotype of kappa casein of the Israeli dairy bull population using genomics. The 25th Ruminant Science Conference, Jerusalem, Israel.
3. Cnaani A., Ronkin D., Seroussi E. (2013) Comparative transcriptome analysis of *Oreochromis mossambicus* and *O. niloticus* to fresh or salt water. http://www.sebiology.org/meetings/Past_Meetings/Valencia/Programmes/Animal.pdf. Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, Valencia, Spain.
4. Ronkin D., Cnaani A., Seroussi E. (2013) A comparative transcriptome analysis of differential salinity adaptation between two tilapiine species, Mozambique and Nile tilapia.
5. Lam, A., Rosov, A., Shirak, A., Seroussi, E., and Gootwine, E. (2013). Genetic variation in Afec-Assaf ewes differing in their lamb survival rate at birth. ASAS meeting 2013, Abstract #: W206. <http://m.jtmtg.org/PresDetail.aspx?view=sci&selectby=daytime&dt=7/10/2013&ap=AM&sespage=1&sessionID=5802&prespage=1&presID=56110&prestyle=abs>
6. Gootwine, E., Rosov, A., Abu Siam, M., Seroussi, E. (2013). Increasing prolificacy of Awassi and Assaf breeds by introgression of the FecB (Booroola) mutation: achievements and challenges. Proceeding of the 20th Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics (AAABG) conference, Napier, New Zealand Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet. **20**:78-81 <http://www.aaabg.org/aaabghome/proceedings20.php>

5. ביבליוגרפיה.

Baruch E, Weller JI, Cohen-Zinder M, Ron M, Seroussi E (2006) Efficient inference of haplotypes from genotypes on a large animal pedigree. *Genetics* **172**: 1757-1765

Burgess T. A., Robich M. P., Chu L.M., Bianchi C, Sellke F. W. (2011) Improving glucose metabolism with resveratrol in a swine model of metabolic syndrome through alteration of signaling pathways in the liver and skeletal muscle. *Arch. Surg.* **146**:556-564

Clarkson, R.W., Wayland, M.T., Lee, J., Freeman, T., Watson, C. J. (2004) Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res.* **6**:R92-109.

Cohen-Zinder, M., Seroussi, E., Larkin D.M., Looor, J.J., Everts-van der Wind, A., Heon-Lee, J., Drackley, J.K., Band, M.R., Hernandez, A.G., Shani, M., Lewin, H.A., Weller, J.I., Ron, M., (2005) Identification of a

missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research* **15**, 936-944.

Cole et al., (2012)
http://aipl.arsusda.gov/Report_Data/Marker_Effects/marker_effects.cfm?Breed=HO&Trait=Net_Merit

Davis, G.H., Montgomery, G.W., Allison, A.J., Kelly, R.W., Bray AR. (1982) Segregation of major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *N.Z. J. Agric. Res.* **25**:525–529

Evans, D. H., Piermarini, P. M. Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* **85**, 97-177.

Gertler, A., Shinder, D., Yosefi, S., Shpilman, M., Rosenblum, C.I., Ruzal, M., Seroussi, E., Friedman-Einat, M. (2013) Pegylated leptin antagonist with strong orexigenic activity in mice is not effective in chickens. *J. Exper. Biol.* DOI: 10.1242/jeb.095539

Huang, W., Maltecca, C., Khatib, H. (2008) A proline-to-histidine mutation in *POU1F1* is associated with production traits in dairy cattle. *Anim Genet.* **39**:554-557.

Hughes, AL., Friedman, R. (2008) Genome size reduction in the chicken has involved massive loss of ancestral protein-coding genes. *Mol Biol Evol.* **25**:2681-2688.

Kaerberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P. S., Fields, S., Bedalov, A., Kennedy, B. K. (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280**:17038-17045

Kang, H.M., Sul, J.H., Service, S.K., Zaitlen, N.A., Kong, S., Freimer, N.B., Sabatti, C., Eskin, E. (2010) *Nat. Genet.* **42**: 348.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham P.C. (2007) *Am. J. Hum. Genet.* **81**: 559.

Ron M, Yoffe O, Ezra E, Medrano JF, Weller JI. (1994) Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. *J. Dairy Sci.* **77**:1106-1113.

Seroussi, E., Giora, G., Shirak, A., Yakobson, E., Weller, J.I., Ezra, E., Zeron (2010) Analysis of copy loss and gain variations in Holstein cattle autosomes using BeadChip SNPs. *BMC Genomics* **11**:673.

Weller, J. I., Golik, M., Seroussi, E., Ezra, E., Ron, M. (2003) Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. *J. Dairy Sci.* **86**, 2219-2227

Weller, J.I., Glick, G., Ezra, E., Zeron, Y., Seroussi E., Ron, M. (2010) Paternity validation and estimation of genotyping error rate for the BovineSNP50 BeadChip. *Anim. Genet.* **41**:551-553.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>מטרות המחקר הן: רתימת כלים גנומיים חדשניים לאיתור פולימורפיזם גנטי בחיות משק בעלות דרגות שונות של יעילות אנרגטית לקראת יישום המידע ע"י סלקציה גנומית או ע"י יצירת נכסים אינטלקטואלים שניתן להגן עליהם בפטנטים שייושמו על חברות בארץ ובחו"ל.</p> <p>עיקרי הניסויים והתוצאות.</p> <p>מעלי גירה- הוגדל מדגם השבבים ל- 1496 בפרי-הזרעה ול- 202 בכבש. בוצע ריצוף עמוק של הגנומים של כבש אווסי, של נפל כבשה מזן אסף, של תרנגולת מטילה בעלת יעילות הטלה יוצאת דופן של מעל 80% הטלה רציפה בגיל 3 שנים ושל נקבת אמנון ירדן. בוצע ריצוף עמוק של 8 ספריות רנ"א שליה של המעי הקדמי והאחורי באמנון היאור ומוזמביק ובתרנגולת של 8 ספריות רנ"א שליה של פטמים ומטילות כולל רקמת שומן, היפוטלמוס, היפופיזה וכבד. פורסמו 5 מאמרים: 1- מסכם את חתימות הסלקציה שנצפו בגנום הבקר בישראל בעזרת השבבים; 2- קושר בין השונות בגנום המיטוכונדריאלי ותכונות יצור בגזע אפק-אסף; 3- מתאר דרך להשתמש בנתוני שבב הדנ"א לאיתור ותיקון רשומות ספר העדר; 4- עושה שימוש בריצוף העמוק של תרנגולת להוכחת שבקרת האנרגיה בתרנגולת אינה קשורה לנוכחות הורמון השובע לפטין; 5- מציג שיטות לקביעת הערכות גנומיות, על בסיס נתוני השבבים באוכלוסיית הפרים המצומצמת בישראל בעזרת מדגם מבורר של סמנים. בנוסף, בתרנגולות, הנתונים גנומיים שהופקו מהווים בסיס לשני מאמרים נוספים שנשלחו לפרסום, ובאמנון נמצא בשלבי הכנה מאמר המתאר את שינויי הטרנסקריפטום במעי אמנוני המוזמביק והיאור בתגובה לעקת מליחות.</p> <p>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> <p>שבבי-הדנ"א סיפקו מידע הניתן לישום בשני מישורים: תיקון רשומות היוחסין החיוניות לתוכנית ההשבחה בספר-העדר; והצבעה על האתרים הגנומיים החשובים להשבחה מונחית סמנים גנטיים. פותחו שיטות לקביעת ערך הפרטים לתוכנית ההשבחה על בסיס נתונים גנומיים. נבחנה השפעת גנים חשובים לחקלאי בכרומוזומים 1 (<i>POUIF1</i>), 6 (<i>CSN3</i>, <i>CSN2</i>), ו-18 (<i>PCDC5</i>) בבקר; מיטוכונדריה, 1, 3, ו-8 בכבש. ריצוף העמוק של נפל כבשה אפשר סריקה מהירה של גנים מועמדים וזוהו בהם מוטציות. הקשר הסטיסטי בין שרידות עוברים והמוטציות האמורות נבחן במדגם רחב. מריצוף הטרנסקריפטום של אמנון ושל התרנגולת התקבל מידע רב ואיכותי על הגנים המשתתפים בבקרת מאזן האנרגיה בתגובה למליחות או לגדילה והשמנה, בהתאמה. בשני מיני בעלי החיים מתקדם אימות התוצאות על בסיס <i>rtPCR</i> לקראת פרסומם. מטרת המחקר העקרית הושגה והיא יצירת תשתית גנומית רחבה שתשמש במחקרים בשנים הבאות בבקר לחלב, בכבש, בתרנגולת ובאמנון.</p> <p>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.</p> <p>Reviewed Journals:</p> <ol style="list-style-type: none"> Glick G., Shirak A., Uliel S., Zeron Y., Ezra E., Seroussi E., Ron M. and Weller J.I. (2012) Signatures of contemporary selection in the Israeli Holstein dairy cattle. <i>Anim. Genet.</i> 43 Suppl 1:45-55. Reicher, S., Seroussi, E., Weller, J.I., Rosov, A. and Gootwine, E. (2012) Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock. <i>J. Anim. Sci.</i> 90:2084-91. Seroussi, E., Glick, G., Shirak, A., Ezra, E., Zeron, Y., Ron, M. and Weller, J.I. (2013) Maternity validation using sire-only BovineSNP50 BeadChip data. <i>Anim. Genet.</i> 44:754-757. Gertler, A., Shinder, D., Yosefi, S., Shpilman, M., Rosenblum, C.I., Ruzal, M., Seroussi, E., and Friedman-Einat, M. (2013) Pegylated leptin antagonist with strong orexigenic activity in mice is not effective in chickens. <i>J. Exper. Biol.</i> 217: 180-184. Weller, J.I., Glick, G., Shirak, A., Ezra, E., Seroussi, E., Shemesh, M., Zeron, Y., and Ron, M. (2013) Predictive ability of selected subsets of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a moderately sized dairy cattle population. <i>Animal</i> 8: 208-216. <p>Articles of symposia proceedings and meeting Abstracts:</p> <ol style="list-style-type: none"> Seroussi U., Seroussi E. (2013) Applying machine learning to the prediction of breeding values using single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a small-sized dairy cattle population. The 15th Israeli Bioinformatics Symposium, Beer-Shiva, Israel. Seroussi, E., Shirak A., Ron M. (2013) Inferring the genotype of kappa casein of the Israeli dairy bull population using genomics. The 25th Ruminant Science Conference, Jerusalem, Israel. Cnaani A., Ronkin D., Seroussi E. (2013) Comparative transcriptome analysis of <i>Oreochromis mossambicus</i> and <i>O. niloticus</i> to fresh or salt water. Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, Valencia, Spain. Ronkin D., Cnaani A., Seroussi E. (2013) A comparative transcriptome analysis of differential salinity adaptation between two tilapia species, Mozambique and Nile tilapia. Lam, A., Rosov, A., Shirak, A., Seroussi, E., and Gootwine, E. (2013). Genetic variation in Afec-Assaf ewes differing in their lamb survival rate at birth. ASAS meeting 2013, Abstract #: W206. Gootwine, E., Rosov, A., Abu Siam, M., Seroussi, E. (2013). Increasing prolificacy of Awassi and Assaf breeds by introgression of the <i>FecB</i> (Booroola) mutation: achievements and challenges. Proceeding of the 20th Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics (AAABG) conference, Napier, New Zealand Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet. 20:78-81. <p>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</p> <p>רק בספריות <</p> <p>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) X <</p> <p>חסוי – לא לפרסם <</p>
