

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 356-0486-09

ניצול שונות בגן לפרולקטין לקבלת אוכלוסיות דגים מותאמות לגדילה במליחיות שונות

Utilization of variation in the prolactin gene for obtaining fish populations suitable for culture at specific salinities

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

גדעון חולתא המכון לחקר בעלי-חיים, מחלקה לעופות ומדגה, מינהל המחקר החקלאי

מיכה רון המכון לחקר בעלי-חיים, מחלקה לבקר וגנטיקה, מינהל המחקר החקלאי

Gideon Hulata, Inst. of Animal Science, Dept. of Poultry and Aquaculture Science, ARO, Volcani Center, Bet Dagan 50250. E-mail: vlaqua@volcani.agri.gov.il

Micha Ron, Inst. of Animal Science, Dept. of Ruminant Science and Genetics, ARO, Volcani Center, Bet Dagan 50250. E-mail: micha@agri.huji.ac.il

יוני 2010

תמוז תש"ע

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר

תקציר

1. הצגת הבעיה

בשנים האחרונות הולך וגובר השימוש במים מליחים לגידול דגים בישראל. מגדלים אמנונים במים שמליחותם מגיעה ל- 5 ppt (אשר אינם מתאימים לגידול דגים אחרים). באזורים שונים בארץ מגדלים דגי-ים במים מליחים וכן מגדלים מכלוא באס מפוספס במים במליחיות משתנות. אם גם בדגים אלה קיים קשר בין גנוטיפים בגן ל- *prl 1* לבין קצב הגדילה במליחיות שונות כפי שנמצא באמנונים, אזי שימוש בסמנים לסלקציה בבחירת דגי רבייה על פי הגנוטיפ ויצירת עדרי רבייה המעמידים אוכלוסיות צאצאים בעלות התאמה ספציפית לרמות מליחות שונות (גבוהה או נמוכה) תשפר את ביצועי הגדילה של הדגים ותשפר את רווחיות הגידול.

2. מטרת המחקר

מטרת העל של תכנית מחקר זו היתה "לברר קיום קשר בין גנוטיפים בגן לפרולקטין לבין ביצועי גדילה במליחיות שונות באחדים ממיני דגים המגודלים בישראל בתנאי מליחות משתנים, ולנצל את המידע שיתקבל לסלקציה בסיוע סמנים ליצירת להקות רבייה בעלות התאמה ספציפית לתנאי מליחות שונים". המחקר תוכנן לאשש בשלב ראשון ממצא מקדים לגבי אמנונים, ובהמשך לטפל במינים אחדים של דגי-ים.

3. שיטות

דנ"א הופק מדגימות סנפיר באמצעות השקעת מלח, בפרוטוקול שכולל במעבדתו של החוקר הראשי מספר 2. קביעת גנוטיפים התבצעה ע"י קריאת הגודל של סמן מיקרוסטילטי המצוי בפרומוטור של פרולקטין, במכשיר ABI 377 DNA sequencer. רנ"א הופק מרקמות היפופיזה זזימים באמצעות Tri-reagent, וסינתזת הגדיל המשלים (cDNA) בוצעה באמצעות אנזים MMLV-Super Script II של חברת Invitrogen. ריאקצית כימות של רמות הביטוי של גנים בוצעה במכשיר Step-one plus Real time pcr system של חברת Applied Biosystems וריאקצית ההגברה באמצעות מיקס Absolute Blue QPCR SYBR Green של Thermo Scientific. ניתוח רמות הפעילות הפיסיולוגית של משאבות נתון אשולגן בוצע ע"פ פרוטוקול של McCormick. תוצאות הניסויים נותחו בעזרת מודל של ניתוח שונות Oneway ANOVA, והשוואת הממוצעים במבחן Tukey-Kramer HSD, בתוכנת JMP 6.0.

4. תוצאות עיקריות

באמנון מוזמביק (בעל התאמה למים מלוחים) זוהו בפרומוטור של הגן לפרולקטין שני אללים אותם כינינו 253 ו-263, בעלי רצף חוזר CA_{33} ו- CA_{38} , בהתאמה. באמנון היאור (בעל התאמה למים מתוקים) זוהו שני אללים אחרים: 247 (CA_{30}), ו-257 (CA_{35}) [שמות האללים מציינים את גודל מקטע ה-PCR המכיל את המיקרוסטילט].

בהכלאה בין שני המינים זיהינו אפקט מובהק של הגנוטיפ על קצב הגדילה ($p=0.006$). הגנוטיפ בעל קצב הגדילה הממוצע הגבוה ביותר במים מלוחים היה 247/247, שנבדל באופן מובהק מגנוטיפים 247/263 ו-253/263.

מצאנו מתאם חיובי וגבוה ($R^2=0.76$) בין רמות הביטוי של הקולטן לפרולקטין לבין רמות הביטוי של משאבות הנתרן-אשולגן בזימים.

בשני המינים נצפתה תבנית זהה בה ישנה עלייה דרמטית ברמת האוסמולריות ב-24 השעות הראשונות לאחר ההעברה למים מליחים ולאחריה ירידה הדרגתית. תבנית מקבילה נצפתה ברמת הביטוי של NKCC בזימים; ותבנית הופכית בה ישנה ירידה דרמטית ולאחריה התמתנות נצפתה ברמות הביטוי של NCC. בהתאם לתפקידו המוכר של פרולקטין כהורמון המתאם אקלום למים מתוקים, זיהינו ירידה מובהקת ברמות הביטוי של הגן בהיפופיזה בשני המינים, בעקבות ההעברה למים מליחים. החל מ-24 שעות ולאורך תקופת הניסוי, רמות הביטוי היחסיים בדגי אמנון היאור היו נמוכות באופן מובהק מאלה שבאמנון מוזמביק. ריצוף הגן לפרולקטין בדקר המכמורת ובקיפון גדול-הראש נמצא בשלבי ביצוע.

5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

טרם התקבלו תוצאות הראויות ליישום.

מטרת העל של תכנית מחקר זו (כפי שהוגדרה בהצעת המחקר שאושרה) היתה "לברר קיום קשר בין גנוטיפים בגן לפרולקטין לבין ביצועי גדילה במליחיות שונות באחדים ממיני דגים המגודלים בישראל בתנאי מליחות משתנים, ולנצל את המידע שיתקבל לסלקציה בסיוע סמנים ליצירת להקות רבייה בעלות התאמה ספציפית לתנאי מליחות שונים". המחקר תוכנן לאשש בשלב ראשון ממצא מקדים לגבי אמנונים, ובהמשך לטפל באחדים מהמינים הבאים (התקציב שהוקצה למחקר והעלויות הכרוכות בביצועו לא יאפשרו לטפל ביותר משני מינים): מכלוא באס מפוספס (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*), לברק (European sea bass, *Dicentrarchus labrax*), דניס (*sea bream, Sparus aurata*), ברמונדי (*Lates calcarifer*) ומוסר (red drum, *Sciaenops ocellatus*).

מטרת העל של תכנית המחקר לא הושגה. עקב מחלה פרש בשלב מוקדם תלמיד המחקר (תומר בורובסקי, האחראי על המכון לרביית דגי-ים בקיבוץ מעגן מיכאל) שהיה אמור לקדם חלק זה של התכנית, כולל הרבייה וייצור המשפחות. דבר זה גרם לעיכוב בביצוע העבודה וגם לשינוי הדגשים בה. יחד עם זאת, הושגה התקדמות רבה בלימוד הקשר בין השונות ברצף החוזרני בפרומוטר של פרולקטין לבין ביצועי גדילה במים מליחים באוכלוסיות מקומיות של אמנונים, הן מבחינה גנטית והן מבחינה פיזיולוגית (זאת מעבר למוצהר בתכנית המחקר). הושגה התקדמות חלקית בזיהוי שונות דומה במיני דגי-ים המגודלים במים בעלי מליחות נמוכה, וטרם הוחל בניצול מידע זה לסלקציה ליצירת להקות רבייה בעלות התאמה ספציפית לתנאי מליחות שונים.

זיהוי פולימורפיזם באמנונים ובניית המודל המשפחתי:

מדגם מייצג של אוכלוסיית האמנונים בארץ נסרק בעבר (2006) ע"מ לזהות פולימורפיזם ברצף המיקרוסטילטי שבפרומוטר הגן לפרולקטין. באמנון מוזמביק *Oreochromis mossambicus* (בעל התאמה למים מלוחים) זוהו שני אללים אותם כינינו 253 ו-263, בעלי רצף חוזר CA_{33} ו- CA_{38} , בהתאמה. באמנון היאור *O. niloticus* (בעל התאמה למים מתוקים) זוהו שני אללים אחרים: 247 (CA_{30}), ו-257 (CA_{35}) [שמות האללים מציינים את גודל מקטע ה-PCR המכיל את המיקרוסטילט].

על מנת לבנות מודל לבחינת הקשר בין האללים לבין קצב גדילה התבצעה הכלאה בין אמנון מוזמביק הטרזיגוט (253/263) ואמנון היאור הטרזיגוט (247/257) (איור 1). הכלאה זו נועדה ליצור התפצלות של הגנוטיפים ההוריים בדור F_2 , בו ניתן לבחון קשרים בין הסמנים ובין קצב הגדילה במשפחות המתפצלות.

שיטות

דנ"א הופק מדגימות סנפיר באמצעות השקעת מלח, בפרוטוקול שכולל במעבדתו של החוקר הראשי מספר 2 [1]. קביעת גנוטיפים התבצעה ע"י קריאת הגודל של סמן מיקרוסטילטי המצוי בפרומוטר של פרולקטין, במכשיר ABI 377 DNA sequencer. רנ"א הופק מרקמות היפופיזה וזימים באמצעות Tri-reagent, וסינתזת הגדיל המשלים (cDNA) בוצעה באמצעות אנזים MMLV-Super Script II של חברת Invitrogen. ריאקצית כימות של רמות הביטוי של גנים בוצעה במכשיר Step-one plus Real time pcr system של חברת Applied Biosystems; וריאקצית ההגברה באמצעות מיקס Absolute Blue QPCR SYBR Green של Thermo Scientific. ניתוח רמות הפעילות הפיזיולוגית של משאבות נתון אשלגן בוצע ע"פ פרוטוקול של McCormick [2]. תוצאות הניסויים נותחו בעזרת מודל של ניתוח שונות Oneway ANOVA, והשוואת הממוצעים במבחן Tukey-Kramer HSD, בתוכנת JMP 6.0.

בניית פרוטוקול גידול ובחינת השפעת גנוטיפים על קצב הגדילה באמונים:

כאשר דור F_1 הגיע לבגרות מינית (בסביבות יוני 2008), ביצענו מספר הכלאות בין הפרטים, וגידלנו משפחות של דור F_2 בתנאים שונים, ע"מ לבסס פרוטוקול גידול להמשך המחקר. המטרה בשלב זה היתה לבחון מהם תנאי הגידול המאפשרים לזהות אפקטים של הגנוטיפים על קצב הגדילה, לזהות אילו הכלאות יוצרות גנוטיפים כאלה, ומהם האללים בעלי השפעות על התכונה. במודל המשפחתי שבנינו ניתן לבחון את האינטראקציות בין ארבעה אללים שונים הנבדלים ע"פ הסמן המיקרוסטיליטי. ע"י הכלאות מכוונות ניתן לבחון את האפקט של גנוטיפים הומוזיגוטים לכל אלל, ואפקטים של צירופי אללים על התכונה. המשפחות מכל הכלאה גודלו תחילה במים מתוקים לתקופת אקלום משתנה, וכעבור תקופה הועברו כמחצית הדגים מכל משפחה למים מליחים (1.5% מלח, ppt 15). כאשר נראתה שונות ברורה בגודל בין הדגים בכל טיפול (כעבור כ-3 חודשים), הוקרבו המשפחות, משקל כל דג נרשם, ונלקחה ממנו דוגמת סנפיר לצורך הפקת דנ"א ובדיקה של הגנוטיפ.

לא בכל ההכלאות שביצענו זיהינו אפקטים גנטיים על התכונה; קצב הגדילה של המשפחות לא היה אחיד ולא תמיד זוהתה תאחיזה בין הסמן לתכונה. לאחר כיוול התנאים הניסויים הוגדרו התנאים המיטיבים בהם התקבלה תאחיזה בין הגנוטיפ לקצב הגדילה.

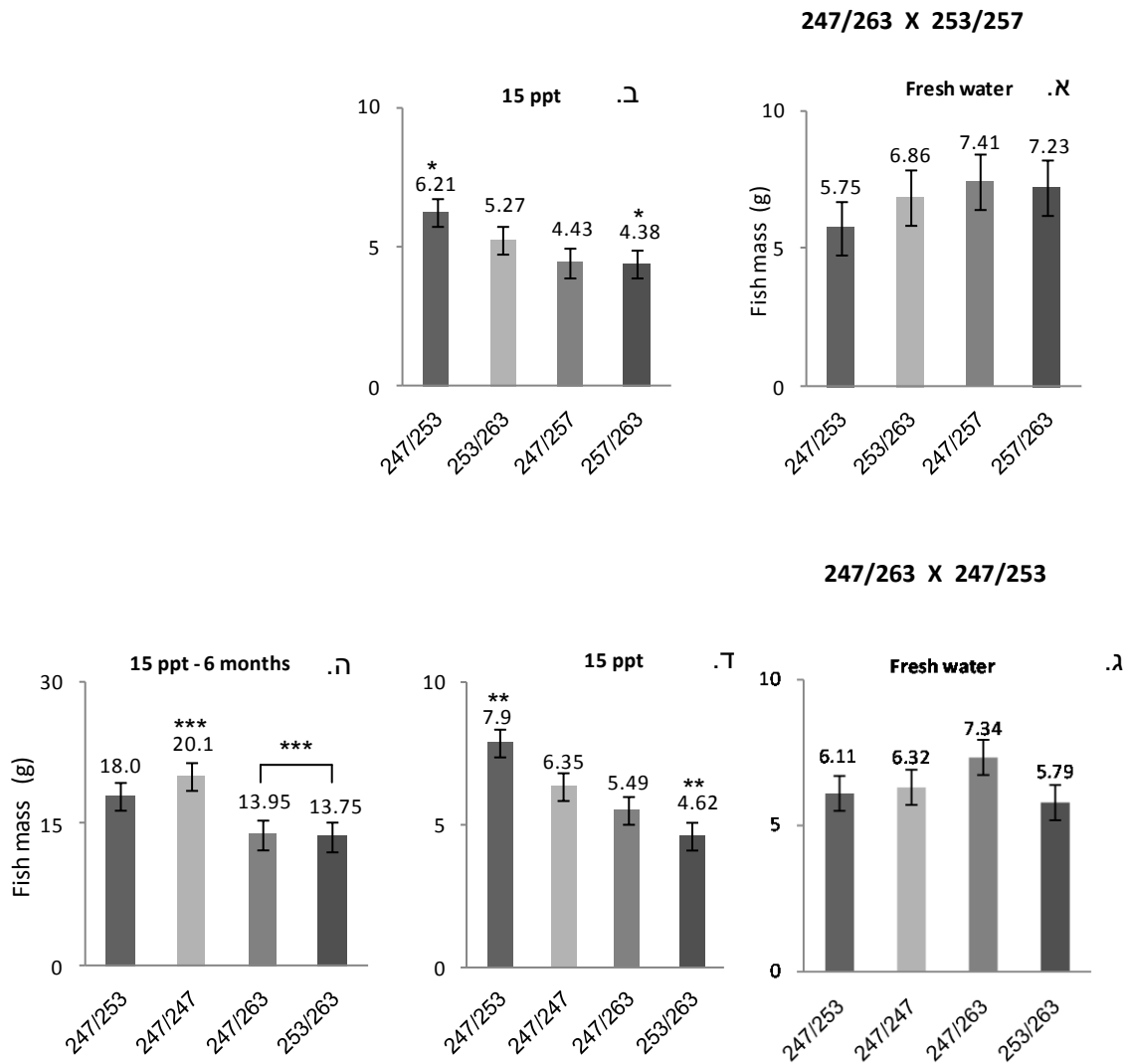
הכלאה 247/263 x 253/257 : בהכלאה זו מתקבלים הגנוטיפים הפרנטליים של אמנון מוזמביק (253/263), ושל אמנון יאור (247/257). זיהינו אפקטים של הגנוטיפ על קצב הגדילה במים מליחים ($p=0.033$). הגנוטיפ בעל ממוצע הגדילה הטוב ביותר היה 247/253, והוא נבדל באופן מובהק מהנמוך ביותר 257/263 ($p<0.05$, איור 1ב). במים מתוקים לא זוהה אפקט גנטי על קצב הגדילה (א1).

הכלאה 247/253 x 247/263 : בהכלאה זו מתקבל גנוטיפ הומוזיגוטי של האלל 247, ושלושה גנוטיפים הטרוזיגוטיים. במים מליחים זיהינו אפקטים של הגנוטיפ על קצב הגדילה ($p=0.044$). בהכלאה זו ניתן לזהות השפעה מיטיבה של אלל 247 לעומת 263 על רקע של אלל שני משותף: הגנוטיפ בעל ממוצע הגדילה הטוב ביותר היה 253/247, והוא נבדל באופן מובהק מהנמוך ביותר 253/263 ($p<0.05$, איור 1ד). במים מתוקים לא זוהה אפקט גנטי על קצב הגדילה (איור 1ג). בנוסף, ובניגוד להכלאה הקודמת, לא נמצא הבדל מובהק בממוצעי הגדילה בין מים מליחים או מתוקים. משפחה נוספת מהכלאה זו גודלה במים מליחים ומדגם ממנה נקצר לאחר תקופה ארוכה יותר (בגיל שישה חודשים). במשפחה זו זיהינו אפקט מובהק יותר של הגנוטיפ על קצב הגדילה ($p=0.006$). הגנוטיפ בעל הממוצע הגבוה ביותר היה 247/247, שנבדל באופן מובהק מגנוטיפים 247/263 ו-253/263 ($p<0.05$, איור 1ה).

ניתוח מתאמים בין גנוטיפ לקצב גדילה במשפחה הניסויית:

בשלב ראשון בחנו קיום מתאם בין קצבי גדילה לסמן מיקרוסטיליטי השוכן על הפרומטר של פרולקטין בדגי F_2 מהכלאה פרנטלית של אמנון מוזמביק עמיד למליחות (גנוטיפ 253/263) עם אמנון יאור עמיד פחות (גנוטיפ 247/257). מצאנו אפקט מובהק של גנוטיפ על קצב גדילה במים מליחים בהכלאה מסוג 247/253X247/263 (גיל שלושה חודשים, $p<0.05$), במדגם מתוך הכלאה דומה 247/253X247/263 (גיל 6 חודשים, $p<0.001$) ובהכלאה 247/263X253/257 (גיל שלושה חודשים, $P<0.05$).

לאחר ניתוח ההכלאות הערכנו שהאלל 247 שמקורו באמנון יאור בעל פוטנציאל להיות במתאם עם העלאת קצב הגדילה במים מליחים; ואלל 263 שמקורו באמנון מוזמביק עשוי להיות במתאם עם הורדת קצב הגדילה. זאת, בדומה לתוצאות שדווחו בעבר [3].



איור 1. הבדלי גדילה במים מלוחים ומתוקים בהכלאות האינפורמטיביות בשלב בניית המודל.
א,ב. הכלאה 247/263X253/257. קצב הגדילה של הגנוטיפים של צאצאי ההכלאה במים מתוקים, ובמים מליחים. הבדל מובהק בין גנוטיפ 247/253 לבין 257/263 בצאצאי ההכלאה במים מליחים [$p < 0.05$].
ג-ה. הכלאה 247/263X247/253. קצב הגדילה של הגנוטיפים של צאצאי ההכלאה במים מתוקים (ג), במים מליחים בגיל 3 חודשים (ד), ובמים מליחים בגיל שישה חודשים (ה). הבדל מובהק בין גנוטיפ 247/253 לבין 253/263 בגיל שלושה חודשים [$p < 0.05$]; הבדל מובהק בין גנוטיפ 247/247 לבין 247/263 ו-253/263 במדגם שנלקח בגיל שישה חודשים [$p < 0.05$].

לאחר ניתוח ההכלאות הערכנו שהאלל 247 שמקורו באמנון יאור בעל פוטנציאל להיות במתאם עם העלאת קצב הגדילה במים מליחים; ואלל 263 שמקורו באמנון מוזמביק עשוי להיות במתאם עם הורדת קצב הגדילה. זאת, בדומה לתוצאות שדווחו בעבר [3].

129 פרטים שנותרו מהמשפחה מסוג 247/253X247/263, שממנה נלקח המדגם המובהק לעיל, הוקרבו בהמשך ונלקחו מכל דג דגימה של היפופיזה, זימים, ודגימת דם לבדיקת אוסמולאריות. לאחר קביעת כלל

הגנוטיפים, הופק RNA, שממנו סונתז לאחר מכן cDNA, מ-20 דוגמאות של היפופיזה וזימים מכל גנוטיפ (סה"כ 80 דוגמאות מכל רקמה). רמות הביטוי של הגן לפרולקטין (PRL) בהיפופיזה ורמות הביטוי של הגנים לקולטן לפרולקטין (PRLR) ולמשאבות נתרן-אשלגן בזימים (Na⁺/K⁺-ATPase -NKA) נקבעו ב Real Time PCR. לאותם 80 פרטים נקבעה גם רמת האוסמולאריות בדם באמצעות ניתוח מהירות הקפיאה של הפלסמה, שנמצאת ביחס הפוך לכמות המומסים.

מתאם בין גנוטיפים לרמות הביטוי של פרולקטין ואפקטורים בזימים:

במשפחה הניסויית הנ"ל נמצא מתאם שונה בין קצב גדילה לבין הגנוטיפים מזו שבמדגם המובהק שקדם לקצירה שלה; כך שהתקשינו לקבל תמונה ברורה בנוגע למתאם בין גנוטיפים לפרמטרים אוסמורגולאטוריים. תנאי הגידול הלא קבועים של משפחה זו גם מקשים על קביעת מסקנות בנוגע להשפעות הפקטורים על קצבי גדילה.

ככלל, לא נמצא אפקט מובהק בין גנוטיפים לבין רמות הביטוי של פרולקטין בהיפופיזה ושל הקולטן ומשאבות הנתרן-אשלגן בזימים. ניתן היה לזהות מגמה בה רמות הביטוי של פרולקטין והפקטורים בזימים היו הנמוכים ביותר בגנוטיפ 247/247, אך בשום פעם לא באופן מובהק. לעומת זאת נמצא אפקט גבולי על האוסמולאריות, כאשר גנוטיפ 247/247 ברמת האוסמולאריות הגבוהה באופן מובהק מ-247/253 ($p=0.045^*$).

מתאם בין רמות פרולקטין לרמות פקטורים בזימים:

לא נמצא מתאם בין רמות הביטוי של פרולקטין לבין רמות הביטוי של הקולטן לפרולקטין או משאבות נתרן-אשלגן בניסוי זה. כמו כן לא נמצא מתאם עם רמת האוסמולאריות.

מתאם בין רמות הביטוי של משאבות נתרן-אשלגן לקולטן של פרולקטין:

מצאנו מתאם חיובי וגבוה ($R^2=0.76$) בין רמות הביטוי של הקולטן לפרולקטין לבין רמות הביטוי של משאבות הנתרן-אשלגן בזימים. תוצאות אלה יכולות להעיד על רגולציה משותפת של הקולטן לפרולקטין ושל משאבות הנתרן-אשלגן בדגים מאוקלמים למים מליחים.

בירור הבסיס הפיזיולוגי ליכולת גידול במים מליחים:

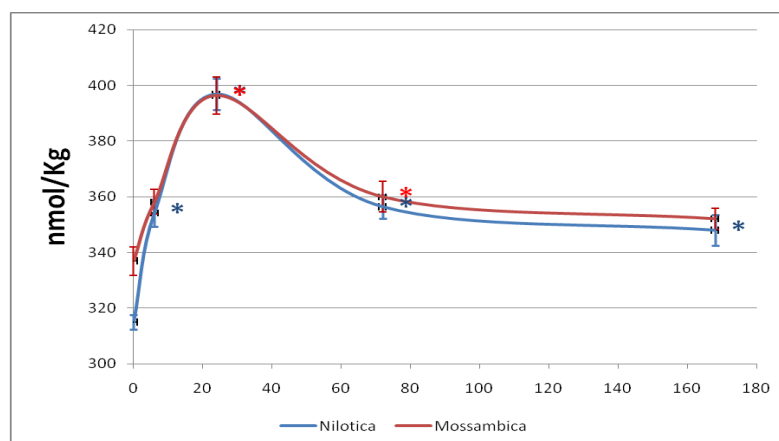
בניסוי זה נבחנו שינויים במדדים פיזיולוגיים וברמות הביטוי של גנים בשני המינים שהיו המקור לאוכלוסייה המתפצלת בנייתוח הגנוטיפים, אמנון יאור ואמנון מוזמביק, במהלך מעבר ממים מתוקים למים מליחים. אוכלוסייה המורכבת מדגים בוגרים משני המינים גודלה יחדיו במים מתוקים למשך תקופת אקלום קצרה, והועברה ביחד למיכל במערכת מים מליחים (15 ppt). שמונה פרטים מהמין אמנון מוזמביק וחמישה פרטים מהמין אמנון יאור נדגמו מהאוכלוסייה מיד לפני ההעברה (נקודת זמן '0'); ובפרקי זמן במהלך שבוע (6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר). בכל מדגם הוקרבו הדגים, ונלקחו דגימות היפופיזה, זימים, ודם לצורך ניתוח שינויים ברמות הביטוי של גנים אוסמורגולטוריים ושל מדדים פיזיולוגיים במהלך האקלום לסביבה ההיפרטונית. בדומה לניסוי הקודם, בכל דגימה נבדקו רמות האוסמולריות בדם, רמות הביטוי של פרולקטין (PRL) בהיפופיזה, ורמות הביטוי של הגן לרצפטור לפרולקטין (PRLR) ולמשאבות נתרן-אשלגן (NKA). בנוסף, נבדקו רמות הביטוי של גנים אוסמורגולטוריים נוספים: CaSR (Ca⁺ Sensing Receptor) בהיפופיזה; משאבות היונים NCC (Na⁺/Cl⁻ co-transporter) ו-NKCC (Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporter).

בזימים, ורמות הפעילות הפיזיולוגית של משאבות הנתרן-אשלגן. מטרתנו בניסוי זה לנסות לבנות פרופיל מקיף של ההתאמות הנדרשות בפקטורים אלה בזמן האקלום; ולנסות לחשוף ע"י השוואה של תהליך האקלום בין מינים הנבדלים בעמידותם למליחות, פקטורים ורגולציות קריטיות העומדים בבסיס יכולת העמידות למליחות.

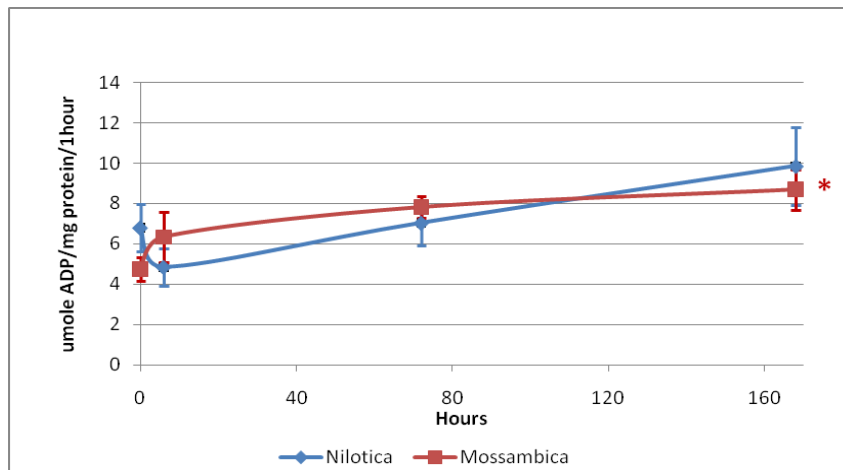
א. מדדים של אוסמולאריות בדם, ופעילות של משאבות NKA בזימים.

נמצאו הבדלים המובהקים מזמן '0' ברמת האוסמולאריות בדם בדגי אמנון מוזמביק בזמנים 24, ו-72 שעות לאחר האקלום. בדגי אמנון יאור נמצאו הבדלים בכל הדגימות החל משש שעות לאחר האקלום (איור 3). בשני המינים רמת האוסמולאריות הנצפית היתה גבוהה ביותר בזמן 24 שעות והראתה מגמת ירידה בהמשך הדגימות. רמת האוסמולאריות בדגי אמנון מוזמביק היתה גבוהה באופן מובהק מדגי אמנון יאור בזמן 0 (t test, p<0.01).

באמנון מוזמביק נמצא הבדל מובהק ברמת פעילות משאבות נתרן-אשלגן בזימים מזמן '0' 168 שעות לאחר האקלום ההעברה למים מליחים (איור 4). לא נמצאו הבדלים מובהקים בין המינים לאורך זמני הדגימות. נמצא מתאם חיובי בין הזמן מההעברה למים מליחים לבין רמת הפעילות של המשאבות.

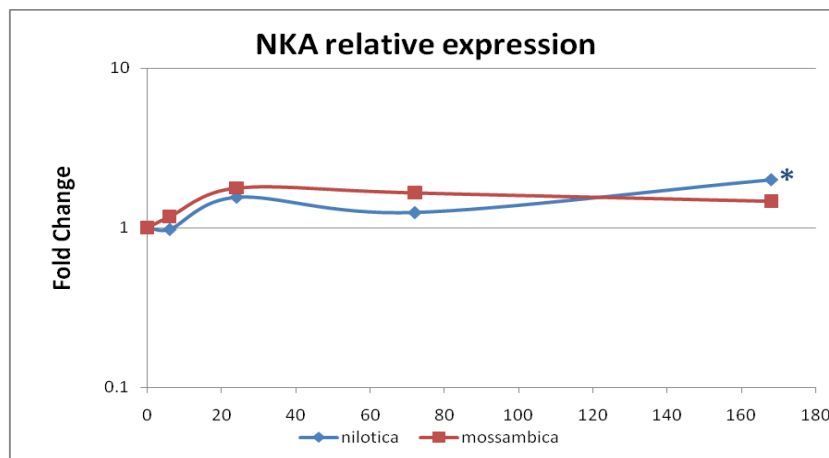


איור 3. שינויים ברמת האוסמולאריות בדם לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ו-6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. n=8 בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; n=5 בכל קבוצת זמן לאמנון יאור. ערכים המסומנים ב-* נבדלים באופן מובהק מזמן '0' ($p<0.001$).



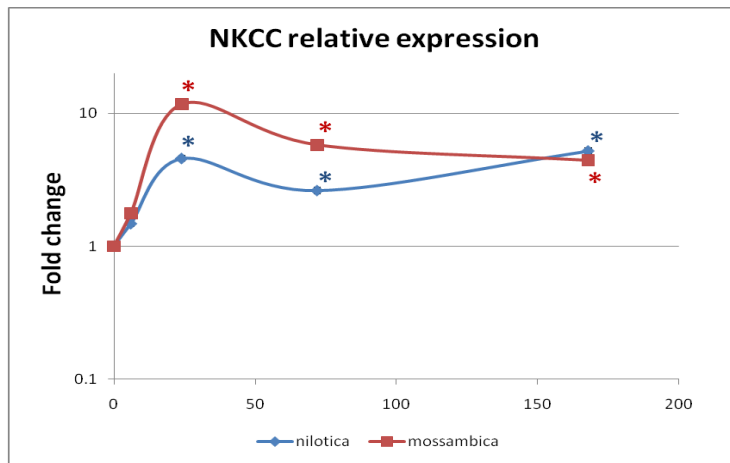
איור 4. שינויים ברמת פעילות משאבות NKA בזימים לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ובנקודות זמן 6, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. n=8 בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; n=5 בכל קבוצת זמן לאמנון יאור. ערכים המסומנים ב-* נבדלים באופן מובהק מזמן '0' ($p < 0.05$).

ב. מדדים של רמות הביטוי של NKA, NCC, NKCC, ו-PRLR בזימים.
 באמנון יאור נמצא הבדל מובהק מזמן '0' ברמות הביטוי של הגן NKA (משאבת נתרן-אשלגן) בזימים בנקודת זמן 168 שעות לאחר האקלום (כפליים ביחס לזמן '0'). לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמות הביטוי בין המינים (איור 5).



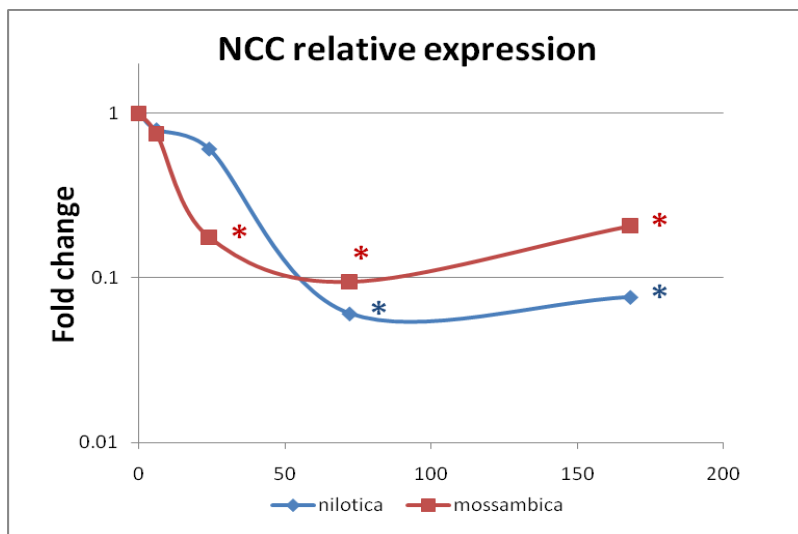
איור 5. שינויים ברמות הביטוי של NKA בזימים לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף הלוגריתמי מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ובנקודות זמן 6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. n=8 בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; n=5 בכל קבוצת זמן לאמנון יאור. ערכים המסומנים * מציינים שינוי מובהק מזמן '0' ($p < 0.05$).

בשני המינים נמצאו הבדלים מובהקים מזמן '0' ברמות הביטוי של הגן NKCC (Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co- transporter) בזימים החל מזמן 24 ולאורך המשך הדגימות (איור 6). רמות הביטוי של אמנון מוזמביק נמצאו גבוהות באופן מובהק מאילו של אמנון יאור בזמן 24 (t test $p < 0.001$) ובזמן 72 (t test $p < 0.05$).



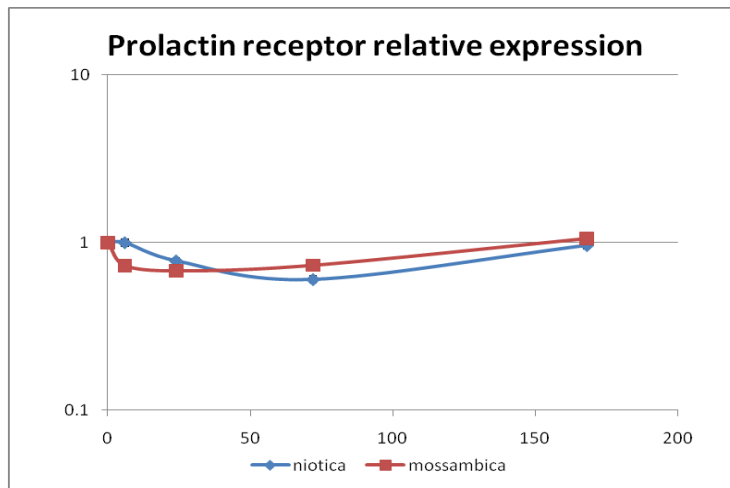
איור 6. שינויים ברמות הביטוי של NKCC בזימים לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף הלוגריטמי מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ובנקודות זמן 6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. n=8 בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; n=5 בכל קבוצת זמן לאמנון יאור. ערכים המסומנים * מציינים שינוי מובהק מזמן '0' ($p < 0.001$).

נמצא ביטוי נמוך באופן מובהק מזמן '0' של הגן NCC ($\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^-$ co-transporter) בזימים בדגי אמנון מוזמביק החל מזמן 24 ובהמשך (איור 7). בדגי אמנון יאור נמצא ביטוי נמוך באופן מובהק מזמן 72 שעות לאחר האקלום. רמות הביטוי של הגן נמצאו נמוכות באופן מובהק בדגי אמנון מוזמביק מדגי אמנון יאור בזמן 24 (t test, $p = 0.0039$).



איור 7. שינויים ברמות הביטוי של NCC בזימים לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף הלוגריטמי מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ובנקודות זמן 6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. n=8 בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; n=5 בכל קבוצת זמן לאמנון יאור. ערכים המסומנים * מציינים שינוי מובהק מזמן '0' ($p < 0.0001$).

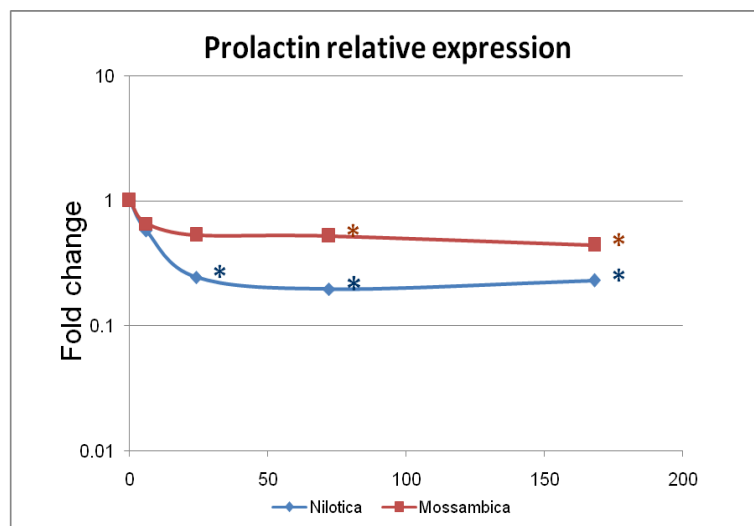
לא נמצאו הבדלים מובהקים מנקודת הזמן '0' ברמות ביטוי הקולטן לפרולקטין לאורך תקופת האקלום בכל אחד מהמינים (איור 8). לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמות הביטוי בין המינים בכל אחת מנקודות הדגימה.



איור 8. שינויים ברמות הביטוי של הקולטן לפרולקטין בזימים לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף הלוגריטמי מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ובנקודות זמן 6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. $n=8$ בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; $n=5$ בכל קבוצת זמן לאמנון יאור.

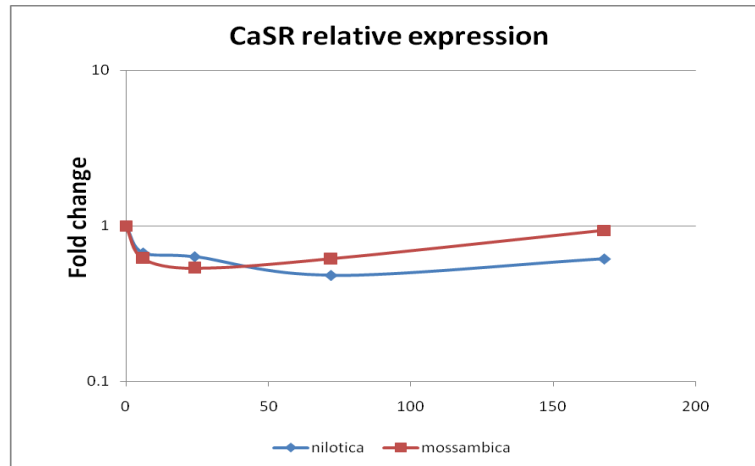
ג. מדדים של רמות הביטוי של PRL, GH, ו-CaSR בהיפופיזה.

בדגי אמנון מוזמביק נמצאו רמות ביטוי נמוכות באופן מובהק מזמן '0' של פרולקטין בהיפופיזה כעבור 72 שעות וכעבור 168 שעות מתחילת האקלום. בדגי אמנון יאור נמצאו רמות ביטוי נמוכות באופן מובהק החל מזמן 24 שעות ובהמשך הדגימות לאורך השבוע. נמצאו הבדלים מובהקים ברמות הביטוי בין המינים בזמנים 24, 72 ו-168, כאשר רמות הביטוי היחסי של דגי אמנון יאור נמוכות באופן קבוע מדגי אמנון מוזמביק (t test $p<0.05$, איור 9).



איור 9. שינויים ברמות הביטוי של פרולקטין בהיפופיזה לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף הלוגריטמי מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודת זמן 0, ובנקודות זמן 6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. $n=8$ בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; $n=5$ בכל קבוצת זמן לאמנון יאור. ערכים המסומנים * מציינים שינוי מובהק מזמן '0' ($p<0.5$).

לא נמצאו הבדלים מובהקים מנקודת הזמן '0' ברמות ביטוי הגן CaSR (Ca Sensing Receptor) בהיפופיזה לאורך תקופת האקלום בכל אחד מהמינים (איור 10). לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמות הביטוי בין המינים בכל אחת מנקודות הדגימה.



איור 10. שינויים ברמות הביטוי של CaSR בהיפופיזה לאורך תקופת האקלום. הערכים בגרף הלוגריטמי מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן בנקודות זמן 0, 6, 24, 72, ו-168 שעות לאחר אקלום למים מליחים. n=8 בכל קבוצת זמן לאמנון מוזמביק; n=5 בכל קבוצת זמן לאמנון יאור.

דיון:

המטרה המרכזית של ניסוי זה היא להשוות בין התגובות האוסמורגולטוריות של אמנון מוזמביק הנחשב כבעל עמידות גבוהה למליחות ושל אמנון היאור בעל העמידות הנמוכה למליחות, לעלייה גבוהה ומיידית ברמת המליחות. תבנית זהה בה ישנה עלייה דרמטית ברמת האוסמולריות ב-24 השעות הראשונות לאחר ההעברה למים מליחים ולאחריה ירידה הדרגתית, נצפתה בשני המינים. תבנית מקבילה נצפתה ברמת הביטוי של NKCC בזימים; ותבנית הופכית בה ישנה ירידה דרמטית ולאחריה התמתנות נצפתה ברמות הביטוי של NCC. ההתאמה בין הפרמטרים האלה יכולה להעיד בצורה בלתי ישירה שרגולציה יעילה של הגנים לתעלות יונים אלה עומדת בבסיס יכולתו של האמנון להתאקלם בצורה מוצלחת לסביבה מלוחה. בעבודות שנכתבו לאחרונה, אופיינו תעלות היונים NKCC ו-NCC כמרקרים ספציפיים לסוגי תאי-כלור (התאים האוסמורגולטוריים המרכזיים בזימים) האופייניים למים מלוחים ולמים מתוקים, בהתאמה [4,5]. בין שני המינים נצפה הבדל מובהק ברמות הביטוי של גנים אלה 24 שעות מתחילת האיקלום. בזמן זה, רמות הביטוי היחסי של משאבות NKCC גבוהים יותר בדגי אמנון מוזמביק מאשר בדגי אמנון יאור. במקביל, רמות הביטוי של הגן למשאבות NCC נמוכות יותר בדגים אלה מאשר באמנון יאור. שינויים אלה ברמות הביטוי יכולים להעיד על יכולת גיוס מוגברת של תאי כלור מותאמי מים מלוחים, ועל יכולת סילוק מהירה יותר של תאי כלור מותאמי-מים מתוקים (שפעילותם אינה מטיבת בסביבה מלוחה), באמנון מוזמביק לעומת אמנון יאור. דפוס השינוי באוסמולריות הדם וברמות הביטוי של הגנים שנבדקו בעבודה זו מצביע על פרק הזמן שבין 24 ל-72 שעות לאחר המעבר למים מליחים כקריטי מבחינת השינויים הפיזיולוגיים שעובר הדג לצורך התאמתו לסביבה החדשה. כמו כן, ברוב הפרמטרים ניתן לראות הבדלים בין שני המינים, אם במהירות התגובה ואם בעוצמתה. ייתכן שהבדלים אלו הם חלק מהבסיס הביולוגי שעומד מאחורי השונות בביצועי הגדילה במים מלוחים בין שני המינים. תוצאות אלו שבהן מאופיינים שינויים פיזיולוגיים על ציר הזמן חשובות כבסיס לתכנון ניסויים עתידיים שייבחנו את ההתאמה של אמנונים למליחיות שונות.

בהתאם לתפקידו המוכר של פרולקטין כהורמון המתאם אקלום למים מתוקים, זיהינו ירידה מובהקת ברמות הביטוי של הגן בהיפופיזה בשני המינים, בעקבות ההעברה למים מליחים. החל מ-24 שעות ולאורך תקופת הניסוי, רמות הביטוי היחסיים בדגי אמנון יאור היו נמוכות באופן מובהק מאלה שבאמנון מוזמביק. תוצאות

אלה יכולות להעיד על הבדלים במנגנוני הבקרה של הגן בין המינים. בניסוי שלנו לא נמצא מתאם בין רמות הביטוי של הגן לפרולקטין לרמות הביטוי של הרצפטור שלו בזימים, או לרמות הביטוי של הגנים האוסמורגולטוריים שנבחנו. ייתכן שהירידה הנמוכה יחסית לביטוי הגן לפרולקטין באמנון מוזמביק מצביעה על כך שהשינוי האוסמוטי אינו מהווה עקה שדורשת בקרה מערכתית כמו באמנון היאור.

זיהוי פולימורפיזם בגן לפרולקטין במינים אחרים

במקביל לעבודה זו, החלה גם עבודה לאפיון השונות הגנטית בגן לפרולקטין במינים אחדים של דגים-המגודלים בארץ במליחיות נמוכות. סריקה במאגרי מידע שונים העלתה שהגן טרם רוצף ברוב המינים הרלוונטיים. רצף מלא של הגן קיים בדג הדניס (*Sparus aurata*) ונמצא כמכיל גם כן רצף חוזר של CA בפרומוטור. מין זה אינו מגודל בארץ במים בעלי מליחות נמוכה ולכן לא המשכנו לעסוק בו. מאמצינו התמקדו בשנה האחרונה בריצוף הפרומוטור בדגי דקר המכמורת (*Epinephelus aeneus*), וקיפון גדול הראש - בורי (*Mugil cephalus*). עבודה ביואינפורמטית למטרה זו לא נשאה פרי, בגלל מיעוט מידע השוואתי רלוונטי במאגרי המידע. בעקבות זאת הוחלט לנסות ולרצף באמצעות קיט של TAKARA המאפשר לרצף את מקטע ה-DNA הלא מוכר המצוי במעלה הגן לפרולקטין. הפעולה מתאפשרת ע"י ביצוע של PCR תוך שימוש בפריימר באזור השמור יחסית של הרצף המקודד בתחילת הגן, ופריימר התואם למקטע מלאכותי המוסף לאזור ה-5' של ה-DNA באמצעות ליגציה. בדקר אנחנו בעיצומם של ניסיונות לשפר את הפרוטוקול של הקיט כך שיתקבלו תוצרי PCR בודדים שיאפשרו ריצוף. בדג הבורי, שבו טרם רוצף הגן לפרולקטין, אנו מנסים לרצף תחילה את הגן באמצעות פריימרים מאמנון, שגילינו שעשויים להיות הומולוגיים לדג זה. לצורך זה נדגמו היפופיזות מדגי בורי בתנאי מליחות שונים, הופק RNA וסונתז cDNA שיוכל לשמש כתבנית לצורך ריצוף הגן.

פרות

- [1] Zilberman, N., S. Reikhav, et al. (2006). High-throughput genomic DNA extraction protocol from tilapia's fin tissue. *Aquaculture* **255**(1-4): 597-599.
- [2] McCormick, S. D. (1993). Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na⁺, K⁺-ATPase Activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**(3): 656-658.
- [3] Streelman, J. T. and T. D. Kocher (2002). Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiol. Genom.* **9**(1): 1-4.
- [4] Hiroi, J., S. Yasumasu, et al. (2008). Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *J. Exp. Biol.* **211**(Pt 16): 2584-2599.
- [5] Inokuchi, M., J. Hiroi, et al. (2008). Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1 a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **151**(2): 151-158.

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.
מטרת העל של תכנית מחקר זו היתה "לברר קיום קשר בין גנוטיפים בגן לפרולקטין לבין ביצועי גדילה במליחיות שונות באחדים ממיני דגים המגודלים בישראל בתנאי מליחות משתנים, ולנצל את המידע שיתקבל לסלקציה בסיוע סמנים ליצירת להקות רבייה בעלות התאמה ספציפית לתנאי מליחות שונים". המחקר תוכנן לאשש בשלב ראשון ממצא מקדים לגבי אמנונים, ובהמשך לטפל במינים אחדים של דגי-ים.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
בהכלאה בין שני המינים זיהינו אפקט מובהק של הגנוטיפ על קצב הגדילה ($p=0.006$). הגנוטיפ בעל קצב הגדילה הממוצע הגבוה ביותר במים מלוחים היה 247/247, שנבדל באופן מובהק מגנוטיפים 247/263 ו-253/263. מצאנו מתאם חיובי וגבוה בין רמות הביטוי של הקולטן לפרולקטין לבין רמות הביטוי של משאבות ($R^2=0.76$) הנתרן-אשלגן בזימים. ריצוף הגן לפרולקטין בדקר המכמורת ובקיפון גדול-הראש נמצא בשלבי ביצוע.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
מטרת העל של תכנית המחקר לא הושגה.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
מטרת העל של תכנית המחקר לא הושגה. הושגה התקדמות חלקית בזיהוי שונות דומה במיני דגי-ים המגודלים במים בעלי מליחות נמוכה, וטרם הוחל בניצול מידע זה לסלקציה ליצירת להקות רבייה בעלות התאמה ספציפית לתנאי מליחות שונים. יעשו מאמצים להמשיך בנושא.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטטים - יש לציין שם ומס' פנטט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
--
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
<input type="checkbox"/> רק בספריות
<input type="checkbox"/> ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
<input type="checkbox"/> לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שנייה במחקר שאושר לשלוש שנים