

שנת המחקר: שלישיית מתוך שלוש שנים
פיתוח להקות רבייה ליצירת אוכלוסייה כל-זכרית באמנון בהיקף מסחרי

Development of tilapia brood-stocks producing all-male progeny on a commercial scale

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף מדגה

ע"י

סרוסי איל, אנדריי שיראק, מיכה רון; אסף ברקי המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי
אילן הלחמי, המכון להנדסה חקלאית, מנהל המחקר החקלאי.
עיינה פרלברג, טניה זק תחנת מחקר דור, ענף הדיג, משרד החקלאות.

Eyal Seroussi, Institute of Animal Science, ARO, HaMaccabim Road, Rishon LeTsiyon, P.O.B 15159, 7528809, E mail: seroussi@agri.huji.ac.il; Andrey Shirak, Institute of Animal Science, ARO, HaMaccabim Road, Rishon LeTsiyon, P.O.B 15159, 7528809, E mail: shiraka@agri.gov.il; Ilan Halachmi, Institute of Agricultural Engineering, ARO, HaMaccabim Road, Rishon LeTsiyon, P.O.B 15159, 7528809, E mail: halachmi@volcani.agri.gov.il; Asaf Barki, Institute of Animal Science, ARO, HaMaccabim Road, Rishon LeTsiyon, P.O.B 15159, 7528809, E mail: barkia@volcani.agri.gov.il; Tatyana Zak, Fish and Aquaculture Research Station, Dor, E mail: Taniyaz@moag.gov.il; Ayana Perelberg, Fish and Aquaculture Research Station, Dor, E mail: ayanab@moag.gov.il; Micha Ron, ARO, Institute of Animal Science, HaMaccabim Road, Rishon LeTsiyon, P.O.B 15159, 7528809, E mail: micha@agri.huji.ac.il

1. תקציר

הבעיה: גידול חקלאי יעיל של דגי אמנון מחייב ייצור אוכלוסייה כל-זכרית, המאופיינת באחידות וקצב גידול גבוה. הכלאה בין זכר של אמנון ירדן לבין נקבה של אמנון יאור מניבה צאצאים כל-זכריים, אך בין שני המינים קיים חסם התנהגותי. **מטרה:** ברירה של להקות רבייה ליצירה המונית של דגי אמנון כל-זכריים. **שיטות:** דגים סומנו בתגי זיהוי אלקטרוניים. זיהוי נקבות מגיבות לזכר ממין אחר נעשתה ע"י בחינה ידנית של נוכחות הטלה פורייה בפה. פותחו סמנים SNP ונקבעו גנוטיפים בריצוף עמוק (Genotyping By Sequencing, GBS). נבדק הקשר הסטטיסטי בין גנוטיפים עבור הסמנים הגנטיים לבין השתתפות הנקבות בהטלות פוריות בין-מיניות. **תוצאות:** בהכלאות בין קווי אמנון היאור והירדן, אותרו נקבות היברידיים הנמשכות אל קני זכרי ירדן (מגיבות). אם הן בעלות דפוס אללי של אמנון היאור באתרי קביעת הזוויג בקבוצות התאחיזה הרלוונטיות (1, 3, 23), הצאצאים שלהן הם כל-זכריים. עם זאת, ללא סלקציה לאללים האמורים, קו ההורים המבוסס על נקבות אלה בהדרגה מאבד את היכולת לייצר אוכלוסייה כל-זכרית. בצענו אנליזה בשיטת GBS שהובילה לאפיון 4983 סמנים אינפורמטיביים של שינוי בסיס יחיד (SNPs) מ-13 נקבות מגיבות ו-28 לא מגיבות משתי משפחות. בתיקון להשוואות מרובות (FDR), אנליזה סטטיסטית כל-גנומית לקשר בין הסמנים המאופיינים והאתרים הגנומיים המשפיעים על היענות נקבית הסמוכים להן גלתה שבעה SNPs שעברו את הסף של שיעור גילוי שגוי של 0.061. ההסתברויות המובהקות ביותר היו לסמנים על קבוצות תאחיזה 9 ו-14. כדי לאמת את התוצאות, השתמשנו בסמנים מיקרוסטטיים בקבוצות תאחיזה אלה. הסמנים הנוספים תוכננו בתוך הגנים המועמדים *PTGDSL* ו-*CASRL*, בהתאמה. על ידי הגדלת המדגם ל-22 נקבות מגיבות ו-47 שאינן מגיבות אישרנו את הקשר של קבוצות התאחיזה האמורות והיענות הנקבית. ההשפעות המשולבות של הסמן *GM171* והסמן הגני *CRSL-LOC100690618* על קבוצות תאחיזה 9 ו-14, הסבירו 37% מן השונות פנוטיפית של אינטראקציה רבייתית ($p < 0.0001$). בהתבסס על ממצאים אלה, נכתב מאמר העומד בפני פרסום בכתב עת חשוב (Heredity), בו אנו מציעים אסטרטגיה לייצור המוני כל-זכרי של אמנון באמצעות סלקציה המבוססת על אתרים גנומיים שמשפיעים על קביעת הזוויג והיענות הנקבית. בהמשך, הניסוי הורחב ללהקת צ'יטרלדה והודגם שלזן זה יכולת ליצור אוכלוסייה כל-זכרית בעלת בצועים משופרים בקצב הגידול. **מסקנות:** ברירה של להקת רבייה צ'יטרלדה מהווה תחליף עדיף לאמנון היאור. השבחה מונחית סמנים באתרים לקביעת המין ולרבייה בין מינית בזן זה יביאו ליצירת אוכלוסייה כל-זכרית באמנון בהיקף מסחרי.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי:

1 דן מירס, עורך הראשי של הביטאון הישראלי והבינלאומי בתחום המדגה.

2 חנה רוזנפלד, חוקרת במרכז לחקלאות ימית (מלח"י).

3 יאיר כהן, חוקר במו"פ ערבה.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא (מחק את המיותר)

*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)

תתימת החוקר  תאריך: 25.2.2018

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. Shirak, A., Zak, T., Dor, L., Benet-Perlberg, A., Ron, M. and Seroussi, E. (2017) Development of tilapia broodstocks producing all-male progeny on a commercial scale. Abstract and lecture in 8th International Conference on Fisheries & Aquaculture, Toronto, Canada <https://www.omicsonline.org/speaker/eyal-seroussi-agricultural-research-organization-aro-rishon-lestiyon-israel/>

2. Shirak, A., Zak, T., Dor, L., Benet-Perlberg, A., Weller, J.I., Ron, M. and Seroussi, E. (2018) Quantitative trait loci on LGs 9 and 14 affect the reproductive interaction between two *Oreochromis* species, *O. niloticus* and *O. aureus*. *Heredity* (In revision).

נושא	עמוד
2.1 מבוא, תוצאות ראשוניות ותיאור הבעיה.	2-3
2.3 מטרות המחקר.	3
3. פירוט עיקרי הניסויים.	3-10
4. סיכום ומסקנות.	11
5. רשימת ספרות.	11-12
סיכום עם שאלות מנחות	13

2.1 מבוא, תוצאות ראשוניות ותיאור הבעיה.

גידול חקלאי יעיל של דגי אמנון מחייב ייצור אוכלוסייה כל-זכרית, המאופיינת באחידות וקצב גדילה גבוה. הכלאה בין זכר של אמנון ירדן לבין נקבה של אמנון יאור מניבה צאצאים כל-זכריים, אך בין שני המינים קיים חסם רבייתי התנהגותי המונע ייצור דגיגים בהיקפים מסחריים של עשרות מיליונים לשנה. תוצאות הקדמיות הראו שבדור ראשון של הכלאות חוזרות בין אמנון ירדן ויאור ניתן לאתר נקבות "מגיבות", בעלות אללים של אמנון יאור באתרים לקביעת-זוויג, שנמשכות לקיני הזכרים של אמנון ירדן, ושזיווג זה מוביל ליצירה המונית של דגיגים כל-זכריים. אולם ללא ברירה לגנים המבקרים תכונה זאת מאבד קו ההורים את יעילותו כעבור מספר דורות. תכנית זאת הוגשה כתוכנית המשך לבדיקת התכנות חד-שנתית (מחקר 13-0430-362), שמטרתה הייתה להתוות דרך ליישום מבחנים התנהגותיים וגנטיים לברירה של להקות רבייה ליצירה המונית של דגיגי אמנון כל-זכריים. שיטות העבודה שנבחנו היו זיהוי נקבות מגיבות לזכר ממין אחר ע"י בחינה ידנית של נוכחות הטלה פורייה בפה. נבחנה התכנות לזיהוי מבוסס תדר-רדיו של התנהגות הדגים בבריכת בטון ע"י הצבת האנטנה באזור האכלה או בשטח הקינון. גנוטיפים עבור סמנים מיקרוסטיליטיים באזורים גנומיים מועמדים נבדקו ע"פ אורך האללים שסומנו פלואורסצנטית באמצעות רצף דנ"א אוטומטי (ABI3130). נבדק הקשר הסטטיסטי בין הסמנים הגנטיים לבין אתרים גנומיים המשפיעים על השתתפות נקבות בהטלות פוריות בין-מיניות. תוצאות עיקריות שתוארו היו: מערכת קורא-התגים שנרכשה (Biomark-HPR Plus) מסוגלת לקרוא תגים (PIT tags) בטווח הקריאה של עד כ- 25 ס"מ בברכת בטון, שהוא טווח מתאים למעקב אחר קן זכר יחיד, בלא הפרעות מקינים סמוכים. על בסיס סריקת אזורים גנומיים הדומים לקולטני ריח זיהינו במדגם של 63 נקבות, סמן גנטי (MIC340) הנמצא בקשר סטטיסטי מובהק ($p=1.5 \times 10^{-8}$) עם אתר גנומי המשפיע על השתתפות בהטלות פוריות בין-מיניות. בנוסף, איתרנו את הגן Anti müllerian hormone, (AMH) בקבוצת תאחיזה 23 הקובע את הזוויג באמנון יאור. פיתחנו את מבחן "היט" (Hybrid Identification Test, Hit), המבוסס על אתרים בקבוצות תאחיזה 1, 3 ו-23, המעורבים בקביעת הזוויג, לאיתור אללים זרים בסמנים גנטיים בלהקות רבייה של ההורים בהכלאה בין-מינית (ראה תיבת טקסט - מבחן היט). יישום הסלקציה בעזרת סמנים גנטיים בקו אמנון מטופח לקצב גדילה (צ'יטרלדה, Chitralada) צפוי לאפשר יצירה המונית של דגיגי אמנון כל-זכריים.

תיאור מבחן "היט" (איור 1): שני קווים של אמנון יאור ושל אמנון ירדן נבדקו בתחנת דור בעזרת "היט" באתרים לקביעת זוויג. זהו פרטים עם אללים המאפיינים מין אחר באתרים אלה (טבלה 1). שני הקווים נבחנו לשיעור נקבות לפני טיהורם ממכלואים ואחרי הטיהור בעזרת הפירות מלאכותיות ו/או ברבייה טבעית בברכות עפר (טבלה 2). סה"כ הורחקו 22 ו-30 אחוזים של זכרים ונקבות של אמנון ירדן, בהתאמה, ו-23 ו-3 אחוז זכרים ונקבות של אמנון יאור, בהתאמה.

טבלה 1. שיעור פרטים המכילים אללים זרים בכל אחד מהסמנים הגנטיים באתרים לקביעת זוויג.

קבוצת תאחיזה	אמנון ירדן		אמנון יאור	
	נקבות	זכרים	נקבות	זכרים
1	11.8 (28/238)	9.3 (16/172)	0.4 (3/688)	6.7 (9/134)
3	10.2 (24/235)	8.2 (14/170)	1.4 (10/688)	8.6 (11/128)
23	10.3 (24/234)	7.6 (13/170)	1.6 (11/688)	9.1 (12/132)

טבלה 2. יחס זוויגים בצאצי מכלוא לפני ואחר טיהור הקווים.

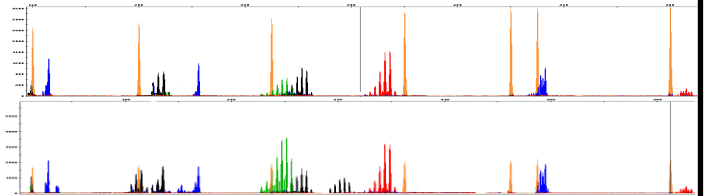
מצב קיים	סוג רבייה	מדגם	זכרים	נקבות	נקבות, %
לפני טיהור	מלאכותית	6,600	6,092	508	7.7
לפני טיהור	טבעית	1,000	607	393	39.3
אחרי טיהור	מלאכותית	2,400	2,380	20	0.8
אחרי טיהור	טבעית	3,000	2,968	32	1.1

בדקנו שיעור של נקבות בצאצי מכלואים שהתקבלו מהפירות מלאכותיות ב-60 וב-20 זוגות של להקות רבייה של תחנת דור, לפני ואחרי הטיהור, בהתאמה. לפני הטיהור שיעור הנקבות התפלג בטווח של 0-52% עם ממוצע של 7.7%; ולאחר הטיהור הצטמצם לטווח של 0-8%, עם ממוצע של 0.8% (טבלה 2). שיעור הנקבות שהתקבלו מרבייה טבעית בברכות רבייה הצטמצם באופן משמעותי יותר מאשר בהפירות מלאכותיות. כך לפני הטיהור השיעור היה 39.3% ולאחרי הטיהור 1.1% (טבלה 2, איור 2). יתכן שהופעת נקבות בודדות בין צאצי המכלוא לאחר הטיהור נובעת מהשפעה סביבתית, בעיקר הטמפרטורה, על הזוויג. חשוב לציין שההבדל המשמעותי בין שיעור הנקבות בצאצי הפריה מלאכותית של להקות רבייה לפני טיהור (7.7%) לבין שיעור הנקבות שהתקבלו בהפירות טבעיות בברכות (39.3%) מצביע על יתרון רבייתי של דגי-מכלוא, לעומת זכרים ונקבות משני מינים שונים של אמנון.

איור 2. איסוף דגי מכלוא מקווים מטהורים בתחנת מחקר דור: יבול של 3000 פרטים (99% זכרים) באמנון.



איור 1. אנליזה של סמנים גנטיים בשלושת האתרים המשפיעים על קביעת זוויג בקבוצות התאחיזה השונות. באמנון.



טבלה 3. ניסוי רבייה במכלים של הכלאה בין קווים נקביים עם זכרים של אמנון הירדן.

מכל	מס. פרטים שנבחנו	זכרים	נקבות	נקבות, %
1	100	100	0	0.0
2	109	104	5	4.6
3	100	98	2	2.0
4	109	109	0	0.0

אימות ייצור דגיגי אמנון כל-זכרי על ידי הכלאות חוזרות

ארבעה קווים נקביים שהתקבלו מקיבוץ ניר-דוד ופותרחו על בסיס הטכנולוגיה של הכלאה בין שני המינים של אמנון והכלאה חוזרת של המכלוא עם אמנון היאור נבחנו בתחנת דור לרמת פעילות מינית של נקבות הקו עם זכרים של אמנון הירדן וליחס זוויגי בהכלאה זאת (טבלה 3). שלושה זכרים ועשר נקבות אוחדו בכל אחד מארבעה מכלי רבייה למשך 22 יום. בכל אחד מהמכלים נמצאו בין 5,000 לבין 6,000 דגיגים, זאת אומרת כ-0.5 הטלה לדגה (1,000-1,200 דגיגים מהטלה), שהיא רמה מרבית של פעילות רבייה. כעבור חודשיים נותחו דגיגים במדגמים של 100-109 פרטים. צאצאים כל-זכריים נמצאו בשניים מתוך ארבעת המדגמים, ובשניים אחרים נמצאו אחוזים נמוכים של נקבות (טבלה 3). תוצאות אלו מוכיחות שהטכנולוגיה של הכלאות חוזרות מסוגלת להשביח קווי מכלוא של אמנון שהכלאתם עם אמנון ירדן מובילה ליצירה המונית של דגיגי אמנון כל-זכריים. כמחצית מהנקבות הטילו תוך תקופה של 22-26 ימים (מחזור של דגי אמנון בהתאם לגילם). שיעור זה (0.5) נמצא יציב בשני המינים של האמנון, בריבוי של מכלואי דור ראשון ביניהם, או עם דגי מינים טהורים. לעומת זאת, במחקרנו נמצאו מקרים בודדים של רבייה בין זכרים ונקבות של שני מינים טהורים בשיעור של כ-0.015. יתכן שמקרים אלה הם תוצאה מזיהום הדדי של עדרי רבייה.

2. מטרת המחקר. (מטרות שהוגדרו בתוכנית 362-0430 ותכנית המשך 20-11-0017)

א. שימוש בזיהוי אלקטרוני (RFID), ללימוד ההתנהגות בקן הזכר בתנאי בריכות ופתוח מבחן התנהגותי לברירת נקבות "מגיבות" שיתחרה כלכלית במבחן הידני הקיים לזיהוי נקבות אמנון מדור מכלוא שמגיבות לזכרי אמנון הירדן; ב. פתוח מבחן גנטי מבוסס סמנים גנטיים לזיהוי נקבות אמנון "מגיבות"; ג. יישום מבחן התנהגותי וגנטי לברירה של להקות רבייה ליצירה המונית של דגיגי אמנון כל-זכריים.

3.1 בדיקה להעלאת אחוז הנקבות הפעילות

נקבות של הכלאה $Rr \times Rr$ עברו מבחנים לבדיקת קשר בין פעילות רבייתית לבין גנוטיפ עבור סמן MIC340 (טבלה 4).
תוצאות: סה"כ 69 נקבות של אמנון היאור עברו את המבחנים במכלים עגולים עם זכרים של אותו מין ומין אמנון ירדן.
 נמצא קשר הדוק בין סמן לפעילות ($p=3.4 \times 10^{-7}$), אך אחוז נקבות פעילות לא גדל באופן משמעותי (22/69, 32%) לעומת הכלאה $Rr \times rr$ (30%).

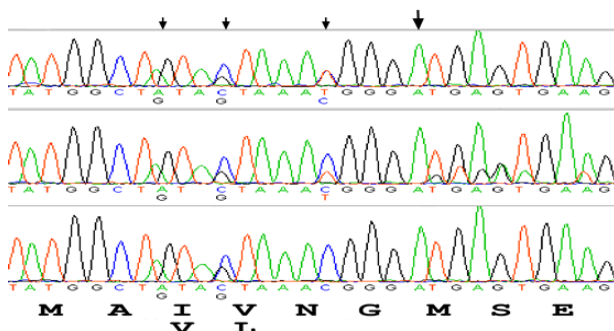
טבלה 4. קשר בין גנוטיפ עבור סמן MIC340 לבין פעילות רבייתית בין מינית בנקבות שהתקבלו בהכלאה $Rr \times Rr$.

rr	Rr	RR	הטלה פורייה
0	12	10	+
29	16	2	-

יתר על כן, כמו בהכלאה $Rr \times rr$, 22-26 נקבות נפסלו עקב חוסר פעילות עם זכרים של אותו מין, לכן אחוז נקבות פעילות בשני הניסויים נשאר קרוב ל-20%. גם בהכלאה $Rr \times rr$ וגם בהכלאה $Rr \times Rr$ סמן MIC340 עבר סגרגציה לא מנדלית. בהכלאה $Rr \times rr$ לא היו צפויים פרטים עם גנוטיפ RR וצפוי יחס 1:1 בין גנוטיפים הוריים. ביחד עם זה התקבל יחס 9:17:37 בין גנוטיפים RR:Rr:rr, בהתאמה. בהכלאה $Rr \times Rr$ היה צפוי יחס 1:2:1 בין גנוטיפים RR:Rr:rr והיחס שהתקבל 12:28:29 שונה אך לא באופן משמעותי מהצפוי ($p=0.13$). **מסקנה:** למרות קשר חזק עם סמן MIC340 מנגנון התורשה של פעילות רבייתית בין מינית אינו ברור ולא מאפשר בשלב זה שיפור משמעותי באחוז נקבות פעילות. יתכן, שלסמן MIC340 יש null alleles ו/או קימת השפעה נוספת של אתרים גנומיים אחרים.

3.2 פיתוח סמן מחליף ל-MIC340

כיוון שסמן MIC340 אינו מראה תורשה מנדלית בוצעו ניסיונות להחליפו בעזרת סמנים מיקרוסטליטיים אחרים או בעזרת סמני SNP. למטרה זאת נקבע רצף גנים קרובים לסמן MIC340 שדומים למשפחת קולטנים ריח VNR2. כל פולימורפיזם שאותר נבחן לחוזק קשר שלו לפעילות רבייתית. לא נמצאו סמנים מיקרוסטליטיים אחרים באזור סמוך שגם כן מראים קשר לפעילות רבייתית. בבדיקת רצף של גנים סמוכים נמצאו פולימורפיזם מסוגים שונים (איור 3) וחלקם בתאחיזה מלאה לסגרגציה לסמן MIC340. ביחד עם זה, לא אותר סמן אינפורמטיבי יותר מסמן MIC340.



איור 3. פולימורפיזם ברצף גן דמוי VNR2, השוואה בין רצפים של שלושה פרטים ממשפחת המבחנים. אותיות מסמנות תרגום לחומצות אמיניות ומקומות החלפתם.

3.3 זיהוי סמנים נוספים המסבירים את הבקרה גנטית של פעילות רבייתית בין מינים בסריקה כל-גנומית

לצורך זיהוי אתרים גנומיים המספקים הסבר לתורשת פעילות רבייתית בין מינית נבחרה שיטה מולקולרית (GBS) Genotyping-by-sequencing. השיטה מבוססת על חיתוך גנום בעזרת אנזימי הגבלה, בידוד מקטעים קצרים וריצופם לאורך כ-100 בסיסים, זיהוי פולימורפיזם פנימי במקטעים וקביעת גנוטיפ עבור כל פרט. השיטה צפויה לספק גנוטיפים של פרטי משפחה עבור מאות עד לאלפי סמני SNP לבדיקת קשר לפעילות רבייתית (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012). דנ"א של 22 נקבות פעילות ו-47 נקבות לא פעילות מניסוי שני הוכן לבדיקה והועבר למעבדת שירות באוניברסיטת ויסקונסין. במטרה לקבוע את מקור הזיהום של עדרי רבייה מקוריים שגרם לשבירת מחסום רבייתי בין מיני, ביחד עם הדוגמאות אלה נמסרו דנ"א של אמנון היאור ממקורות שונים ושל זכרים של אמנון הירדן. כל דגימות דנ"א עברו בדיקה ועמדו בסטנדרטים מומלצים של חברת Illumina. **תוצאות:** 250 מיליון רצפים באורך של כ-100 בסיסים התקבלו עבור 93 פרטים שנמסרו לבדיקת GBS. מתוך חישוב של דיגום כ-1% של גנום אמנון בגודל 1.1 Gbp צפוי כיסוי ממוצע של $24 \times$.

3.4 בדיקת יכולת לשחזר מקווים היברידיים של אמנון היאור ייצור צאצאים כל-זכריים תוך שמירת רמת אינטראקציה רבייתית גבוהה

בניסוי זה תוכנן להראות אפשרות לזהות בין נקבות של הכלאה חוזרת (backcross) נקבות עם צירוף אללי אופייני הזהה לנקבות טהורות של אמנון היאור בשלושת האתרים לקביעת זוויג. בשלב שני לבדוק כמה מתוך הנקבות שומרות יכולת להתרבות עם זכרים של אמנון הירדן. בשנה א' של המחקר יצרנו מכלוא "הפוך" (נקבה של אמנון הירדן עם זכר של אמנון היאור) ונקבה F1 הוכלאה עם זכר של אמנון היאור. הצאצאים גודלו עד גיל חודשיים בו ניתן בוודאות לקבוע זוויג ודגימות סנפירים של 70 נקבות של הכלאה חוזרת (backcross) שימשו לצורך הפקת דנ"א ובדיקת אללים בשלושה אתרים לקביעת זוויג. נקבות עם פרופיל גנטי כמו בנקבות של נקבות טהורות של אמנון היאור נמצאות כעת במבחנים ליחס זוויגי בצאצאים ופעילות מינית. **תוצאות:** 70 נקבות של הכלאה חוזרת נבדקו ב-3 אתרים לקביעת זוויג ו-12 נקבות נמצאו נושאות פרופיל אופייני לנקבות טהורות באתרים לקביעת זוויג. הנקבות הופרדו מיתר הנקבות והוכנו לבדיקת פעילות רבייתית עם זכרים של אמנון הירדן ולבדיקת אחוזי נקבות בצאצאיהן. במדגמים (78, 92, 103) של צאצאים משלוש הטלות ראשונות של שלוש נקבות שונות נמצאה אוכלוסיה כל זכרית עם מספר נקבות בודדות (2, 2, 1) בהתאמה. בבדיקה של 5 נקבות אלה נמצא פרופיל זכרי בסמנים המיקרוסטיליטיים בשלושת האתרים לקביעת זוויג. כך שיתכן שנקבות אלה נוצרו מהיפוך זוויג כתוצאה של גורמים סביבתיים או של גורמים גנטיים בלתי ידועים.

מסקנה: 17.1% נקבות של הכלאות חוזרות נמצאו נושאות פרופיל אופייני לנקבות טהורות באתרים לקביעת זוויג, אחוז זה קרוב לערך הצפוי שהוצג בהצעת מחקר ($1/8=12.5\%$). בשלב זה עדיין לא הושלמו כל הניסויים, אך ברור שיש לפחות 3 נקבות פעילות מול הזכרים של אמנון הירדן, שמניבות 98-99% של זכרים.

3.5 קביעת מקור גנטי לאמנונים מזן צ'יטרלדה

אחת המטרות העיקריות של המחקר הייתה לפתח יכולת לקלוט חומר גנטי משובח מבחינת קצבי גדילה, עמידות למחלות וטמפרטורות קיצוניות וכו' מתוכניות טיפוח רב שנתיות בחו"ל, לשחזר את יכולתם לייצר צאצאים כל-זכריים בהכלאה עם זכרים של אמנון הירדן תוך כדי שמירה על רמה גבוהה של אינטראקציה רבייתית. בשלב ראשון 60 פרטים של להקת צ'יטרלדה (Sukmanomon et al., 2012) נבדקו בשלושת האתרים לקביעת זוויג.

תוצאות: בכל אחד מהאתרים לקביעת זוויג נמצאו אללים אופייניים למינים אמנון היאור ואמנון הירדן. בקבוצת תאחיזה 1 ו-3 נמצאה כמות קטנה של אללים ממין אחר, על פי גודל המקטע, יתכן שהם שייכים לאמנון מוזמביק (O. *mossambicus*). שכיחות האללים של אמנון הירדן סה"כ הייתה כמחצית (38-50%). המגוון שלהם היה גבוה רק בקבוצת תאחיזה 3. האללים של אמנון היאור שייכים לשני זנים גנאי ומצרי (טבלה 5). כיוון שמגוון אללים גדול יצר

מספר גבוה של צירופים גנוטיפיים, לא היה ניתן למצוא קשר על פי מדגם מצומצם בין סוג האלל וקביעת זוויג. בשלב זה, הוחלט לברור להמשך המחקר פרטים בעלי אללים ידועים, תוך כדי העשרה לאללים של אמנון יאור ממקור גנאי.

טבלה 5. מגוון, מקור ותדירות אללים באתרים לקביעת זוויג בלהקת הצ'יטרלדה המקורית

LG	# total alleles	# (%) <i>O. aureus</i> alleles	# (%) <i>O. niloticus</i> Ghana alleles	# (%) <i>O. niloticus</i> Egypt alleles	# (%) Unknown alleles
1	9	1 (44%)	5 (25%)	2 (24%)	1 (7%)
3	8	5 (50%)	1 (22%)	1 (20%)	1 (8%)
23	8	1 (38%)	2 (19%)	5 (43%)	0 (0%)

מסקנה: מתוך אנליזה האללים באתרים לקביעת זוויג ניתן לזהות שהמקור הגנטי של זן הצ'יטרלדה הוא בן כלאים של שלושה מינים לפחות (אמנון היאור, אמנון הירדן ואמנון מוזמביק). יתר על כן, ניתן לזהות אללים שייכים לשני המקורות (זנים) של אמנון יאור-מצרי וגנאי. בהפתעה, אותרה כמותית תרומה גנטית גדולה ביותר של אללים מאמנון הירדן, למרות שהצ'יטרלדה מוזכרת בספרות בתור זן של אמנון היאור.

3.6 קביעת זוויג בלהקה נבחרת של אמנוני צ'יטרלדה

לאחר ריבוי של פרטים נבחרים (24 הטלות) של צ'יטרלדה, נבחן הרכב האללים בשלושת אתרי קביעת הזוויג ב-200 פרטים ונבחן הקשרים בין אללים אלה לזוויג. **תוצאות:** לאחר טיהור ראשוני וסלקציה לטובת אמנון היאור ממקור גנאי, מספר האללים בקבוצות התאחיזה 1, 3 ו-23 ירד 9-, 8 ו-8, ל-6, 5 ו-5, בהתאמה. שכיחות האללים ממקור אמנון היאור הגנאי עלתה מ-19-22 עד ל-57-68 אחוז באתרים לקביעת הזוויג. לא נמצאו אללים ממקור לא ידוע (טבלה 6).

טבלה 6. מגוון ותדירות אללים באתרים לקביעת זוויג בלהקה מטוהרת של הצ'יטרלדה

LG	# total alleles	# (%) <i>O. aureus</i> alleles	# (%) <i>O. niloticus</i> Ghana alleles	# (%) <i>O. niloticus</i> Egypt alleles	# (%) Unknown alleles
1	6	4 (63%)	4 (63%)	1 (13%)	0 (0%)
3	5	1 (68%)	1 (68%)	1 (10%)	0 (0%)
23	5	2 (57%)	2 (57%)	2 (25%)	0 (0%)

מספר אללים בקבוצות תאחיזה 1 ו-3 נשאר גבוה ולא מאפשר במדגם הנוכחי לזהות קשר לזוויג. עם זאת נמצא שבקבוצת תאחיזה 23 בגן *AMH* (Eshel et al., 2014) אללים עם גודל מקטע 421-432 bp מסמנים את העותק הארוך והשלם (L) של הגן ואלל עם גודל מקטע 208 bp מסמן את העותק הקצר (S) והחסר של הגן שקובע זכריות במינים טהורים של אמנון היאור (טבלה 7). בדיקת קשר בין הסמן *AMH* לזוויג הראתה מובהקות של $p=7.7 \times 10^{-16}$.

טבלה 7. קשר בין אללים של הגן *AMH* לזוויג בלהקה המטוהרת

Alleles		Sex	
Allele1	Allele2	Females	Males
Short	Long	13	33
Long	Long	137	17

מסקנה: סילוקם של האללים ממקור אמנון הירדן וממקורות לא ידועים אפשר לגלות את השפעתו של הגן *AMH* על קביעת הזוויג בזן הצ'יטרלדה. ביחד עם זאת מומלץ שהברירה של האללים ממקור אמנון היאור הגנאי חייבת להיות הדרגתית כדי לא לאבד שונות גנטית ולשמור על התכונות של קצבי הגדילה הגבוהים של זן הצ'יטרלדה. בנוסף לכך חשוב לשמור על המגוון הגנטי הקשור לפעילות רבייתית בין מינים.

3.7 קביעת יחס זוויג בלהקה מטוהרת של אמנוני צ'יטרלדה

שליטה ביחסי זוויג חשובה לא רק בהכלאות בין מיניות אלה גם כן בתוך להקת הצ'יטרלדה. כיוון שייצור כל זכרי דורש בעיקר נקבות של אמנוני היאור. חשוב שבתוך להקת הרבייה של הצ'יטרלדה יחס זוויגים לא יהיה מוטה לטובת הזכרים. במטרה לבדוק השפעה של AMH, נבחרו שני סוגים של זכרים ונקבות של צ'יטרלדה (נושאי צורת AMH קצרה S או ארוכה L) והוכלאו בארבעה צירופים אפשריים (זכר SL x נקבה SL, זכר SL x נקבה LL, זכר LL x נקבה SL וזכר LL x נקבה LL). **תוצאות:** צאצאים של 12 הטלות גודלו במכלים נפרדים עד גיל של חודשיים בו נקבע הזוויג של כל אחד מהצאצאים. ברוב הקבוצות נמצאה הטיה משמעותית מיחס זוויג 1:1 (טבלה מס' 8).

בהכלאות של נקבות עם הגן הקצר של AMH (S) התקבלו הטיית משמעותית ויציבות של יחס הזוויגים מהשיעור הצפוי של 1:1. ב- 50% מהכלאות האחרות גם התקבלו הטיית משמעותית, אך ההטיית וערכן אינן עקביות. בהכלאות SL x SL התקבלה הטיה משמעותית לכיוון זכרים (86% זכרים) ובהכלאות LL x LL התקבלה הטיה משמעותית ועקבית לכיוון נקבות (85% נקבות).

טבלה 8. הטיית זוויג בלהקה המטוהרת

Parents		Progeny			
Male genotype (RFID tag)	Female genotype (RFID tag)	# males	# females	% males	% males mean±SD
SL (CHF35)	SL (CHM7402)	110	20	84.6	85.9±2.3
SL (CHF61)	SL (CHM7402)	90	11	89.1	
SL (CHF61)	SL (CHM1088)	89	17	84.0	
LL (CHF7)	SL (CHM1088)	15	117	11.4	15.3±3.6
LL (CHF7)	SL (CHM7402)	10	40	20.0	
LL (CHF6195)	SL (CHM2515)	14	83	14.4	
LL (CHF55)	LL (CHM4387)	4	153	2.5	29.1±18.8
LL (CHF51)	LL (CHM4537)	39	53	42.4	
LL (CHF7)	LL (CHM4537)	22	30	42.3	
SL (CHF61)	LL (CHM4537)	18	116	13.4	19.1±16.0
SL (CHF61)	LL (CHM4387)	3	96	3.0	
SL (CHF35)	LL (CHM0853)	41	59	41.0	

רקע אפור מדגיש את ההטיית הקיצונית בממוצע יחס הזוויגים בצאצאים של נקבות נושאות אלל קצר S

מסקנה: מספר העותקים של הגן AMH מראה קשר לקביעת הזוויג, אבל לא מספק הסבר מלא עבור כל הפרטים שנבדקו. בפרטים מסוימים עם האלל הקצר לזכריות של AMH (S) יש אתר אחר שמתגבר על S וקובע נקביות. קרוב לוודאי שהאתר האחר הוא אלל W על קבוצת תאחיזה 3 שמקורו ממערכת קביעת זוויג WZ/ZZ של אמנוני הירדן. בשלב זה לא ניתן לענות על השאלה האם אפשר לייצר צ'יטרלדה כל-זכרי תוך כדי חידוש סטוקים ובחירת גנוטיפים מתאימים. במטרה לענות על השאלה נדרשת שליטה טובה יותר על מערכת קביעת הזוויג בקבוצת תאחיזה 3.

3.8 השפעת מצב האללים בקבוצת תאחיזה 3 על יחס זוויגים בהכלאה בין צ'יטרלדה לזכרים של אמנוני הירדן

לפני טיהור ראשוני נבחן היחס הזוויגי ב- 20 משפחות, כל אחת כוללת נקבה שונה של צ'יטרלדה ושני זכרים של אמנוני ירדן. המשפחות התקבלו ע"י הפריות מלאכותיות וגודלו עד גיל בו ניתן פנוטיפית לקבוע את הזוויג. משפחות מתפצלות מבחינת זוויג נבדקו בסמן MIC387B, שנמצא במחקרים קודמים בתאחיזה גבוהה ביותר לאתר המשפיע על הזוויג בקבוצת תאחיזה 3. בעבר הדגמנו שאורכם של אללים מיקרוסטליטיים באוכלוסייה מתחלק לסדרות, כאשר כל סדרה מתפתחת מאלל קדום שהאללים הצעירים שהתפתחו ממנו דומים לו בגודלם. סמן MIC387B הראה שלוש סדרות של אללים ותאחיזה של אחת מהסדרות הייתה אינפורמטיבית מבחינת הקשר לזוויג בתוך משפחות אך לא באוכלוסייה. **תוצאות:** ב- 8 משפחות התקבל יחס זוויג קרוב ל- 1:1, ב- 6 משפחות התקבלו זכרים בלבד וב- 6 משפחות התקבלו 2-

4% של נקבות. בדיקה של 10 משפחות עם יחס זוויגי קרוב ל- 1:1 הראתה תאחיזה חזקה בין הזוויג לבין התפצלות האלים בסמן זה. **מסקנה:** התפצלות סמנים על קבוצות תאחיזה 3 ו-23 בצ'יטרלדה נמצאת בקשר חזק עם יחס זוויגי בהכלאות בתוך הזן ובין הזן לבין אמנון הירדן. עם זאת, נדרש פיתוח סמן אוניברסלי על קבוצת תאחיזה 3 (בדומה לגן *AMH*) שיאפשר סלקציה מהירה באוכלוסיות אמנונים ממקורות שונים.

3.9 בדיקת פעילות רבייתית בין נקבות צ'יטרלדה לזכרים של אמנון הירדן ובחינת אתרים גנומיים למחסום התנהגותי, האם הם משותפים או שונים בלהקות דור וצ'יטרלדה.

אותה שיטה שתיארנו להכלאה בין נקבות של אמנון היאור מלהקת דור עם זכרי אמנון הירדן יושמה עם נקבות צ'יטרלדה מאותה משפחה, בנות אם שהניבה צאצאים כל זכרים בהכלאה עם אמנון ירדן. הנקבות גודלו עד שלב בגרות (3 חודשים) ונבחנו לפעילותם עם זכרים של צ'יטרלדה. נקבות פעילות נבחנו בפעילות עם זכרים של אמנון הירדן. בתכנון לבחון כ- 100 נקבות בשני סיבובים. **תוצאות:** עד כה נבחרו כ- 50 נקבות פעילות עם זכרים של צ'יטרלדה שחולקו למכלים של 4 ממ"ק עם זכרים של אמנון הירדן.

3.10 בדיקת פעילות רבייתית בין נקבות צ'יטרלדה לזכרים של אמנון הירדן.

בבדיקה של 100 נקבות של קו צ'יטרלדה נמצאו 25 נקבות מגיבות עם זכרים של אמנון הירדן. שיעור גבוה של נקבות מגיבות עולה בקנה אחד עם ממצא שלנו לגבי אחוזים גבוהים של אללים ממקור של אמנון הירדן באתרים לקביעת זוויג. לפיכך, לא קיימת שום בעיה לסלקציה נגדית בקו צ'יטרלדה – מצד אחד שיחזור פרופיל אללי באתרים לקביעת זוויג המאפיין אמנון יאור, מצד שני בחירת אללים להכרות המאפשרת רבייה חופשית עם אמנון הירדן. סלקציה נגדית כזאת תאפשר ייצור להקות כל-זכריות בהיקפים מסחריים.

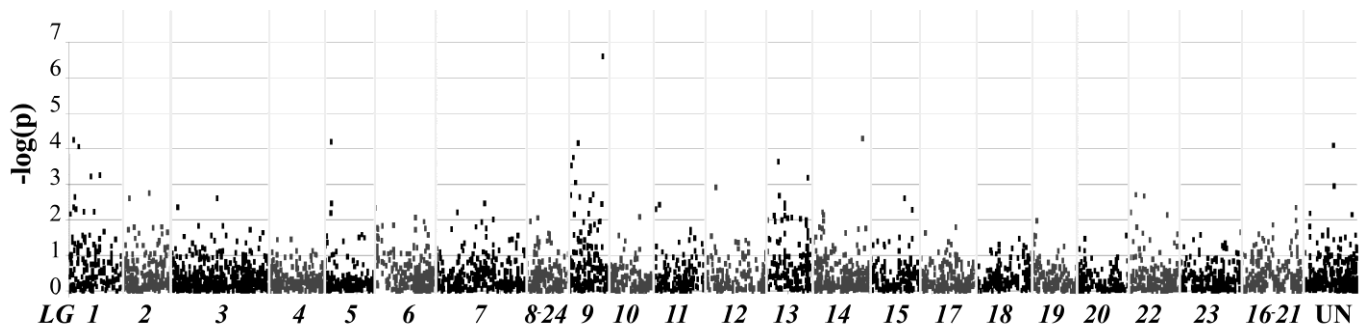
3.11 בדיקת פעילות רבייתית של גנוטיפים זכריים XX, XY ו-YY וגנוטיפים נקביים XX ו-XY

כפי שנמצא קודם לכך (סעיף 3.7) סמן באקסון 7 של *AMH* נמצא בקשר חזק מאוד לקביעת זוויג בקו צ'יטרלדה אף על פי שהוא רק אחד מלפחות שלושה אתרים שמעורבים בקביעת הזוויג. ביחד עם זה חסר באקסון 7 הוא סמן לא אינפורמטיבי, זאת אומרת מאפשר להבדיל בין גנוטיפ XX לבין גנוטיפ XY אבל לא מאפשר להבדיל בין גנוטיפ XY לבין גנוטיפ YY. בהתאם לכך פיתחנו סמן נוסף המבוסס על חסר באקסון 6 של *AMH* והוא נתן אפשרות לזהות את כל שלושת הגנוטיפים אפשריים: XX, XY ו-YY ב-LG23. יתר על כן, בהכלאות של זכרים ונקבות עם גנוטיפ XY נמצאו זכרים עם כל שלושת הגנוטיפים, אך לא נמצא גנוטיפ YY בנקבות. עד כה נבחנו כ-1000 פרטים צאצאים של מכלוא XY×XY. בנקבות כ- 25% נשאו גנוטיפ XY. בזכרים, 10% נשאו XX, 60% XY ו-30% YY. יחס 2:1 הצפוי בין זכרים YY לבין XY נמצא בכל הגילאים של הפרטים הנבדקים ומעיד על כושר שרידה דומה בין שני הגנוטיפים. 30 נקבות XY שהיו בהרכב של קבוצת רבייה של צ'יטרלדה (5 נקבות וזכר אחד) התרבו בשיעורים זהים (30%) לנקבות עם גנוטיפ XX. גם 8 זכרים YY ו-8 זכרים XY השתתפו במספר דומה של הטלות (17 ו-19, בהתאמה). עד כה נבחנו רק 3 זכרים XX וגם בהם לא נמצאו בעיות של רבייה. ביחד עם זה עדיין לא נבחנה פעילות תחרותית של זכרים בעלי גנוטיפים XX, XY ו-YY ולכן יש חשש שטעות בקביעת גנוטיפ בייצור זכרים YY בהיקפים גבוהים עלולה להעניק יתרון לזכר שאינו XY ופגיעה בשיעור כל-הזכריות בצאצאים.

3.12 מבחן אסוציאציה גנומית (GWAS) עם היענות הנקבית.

לאחר שנבחנו כי אחוז הנקבות המגיבות גדל ($\sim 7\times$) בקו הורים שיוסד מנקבות מגיבות, הגענו למסקנה כי תכונה זו עשויה להיות בעלת תורשתיות משמעותיות וכי סריקה רחבה של הגנום להבדלים גנטיים בין נקבות מגיבות ושאינן מגיבות עשויה להצביע על האזורים הגנומיים העיקריים המעורבים. קביעת גנוטיפים באמצעות ריצוף עמוק (GBS) היא אמצעי חדשני שמקל על סריקה כזאת. תוצאות מבחן t של GWAS על בסיס 41 הנקבות עם גנוטיפים תקפים ופנוטיפים

להיענות נקבית ניתנים באיור 4. מספר הפרטים עם גנוטיפים תקפים עבור כל סמן נע בין 31 ל-41 עם ממוצע של 36.5. התדירות הממוצעת של הטרוזיגוטים הייתה 0.35 בלבד, לעומת הערך הצפוי של 0.5. חלקית, הטיה זו עשויה להיות בגלל הדרישה לגנוטיפים תקפים עם יחס שלא יעלה על 1 ל-4 בין האללים בפרטים הטרוזיגוטים. הקשר המשמעותי ביותר עם ההיענות הנקבית היה במיקום 22.9 MBp על קבוצת תאחיזה 9. קשר זה עם סמן במיקום הזה היה היחיד שעמד בספי המובהקות המחמירים של תיקון Bonferroni לריבוי השוואות ($p=0.001$). שישה סמנים נוספים על קבוצת תאחיזה 1, 5, 14 ומיקום לא ידוע על פיגום-גנומי מספר 320 הגיעו לשיעור גילוי שגוי של 6% FDR (טבלה 2). לכן צפוי כי לפחות 5 מסמנים מאלה מייצגים אפקטים אמיתיים. ההסתברויות במבחן כי ברובע עבור הסמנים עם ההסתברויות הנמוכות ביותר היו מעט גבוהות יותר (הנתונים אינם מוצגים).



איור 4. מבחן אסוציאציה גנומית (GWAS) עם ההיענות הנקבית על בסיס 4,983 סמנים של שינוי בבסיס יחיד (SNPs).

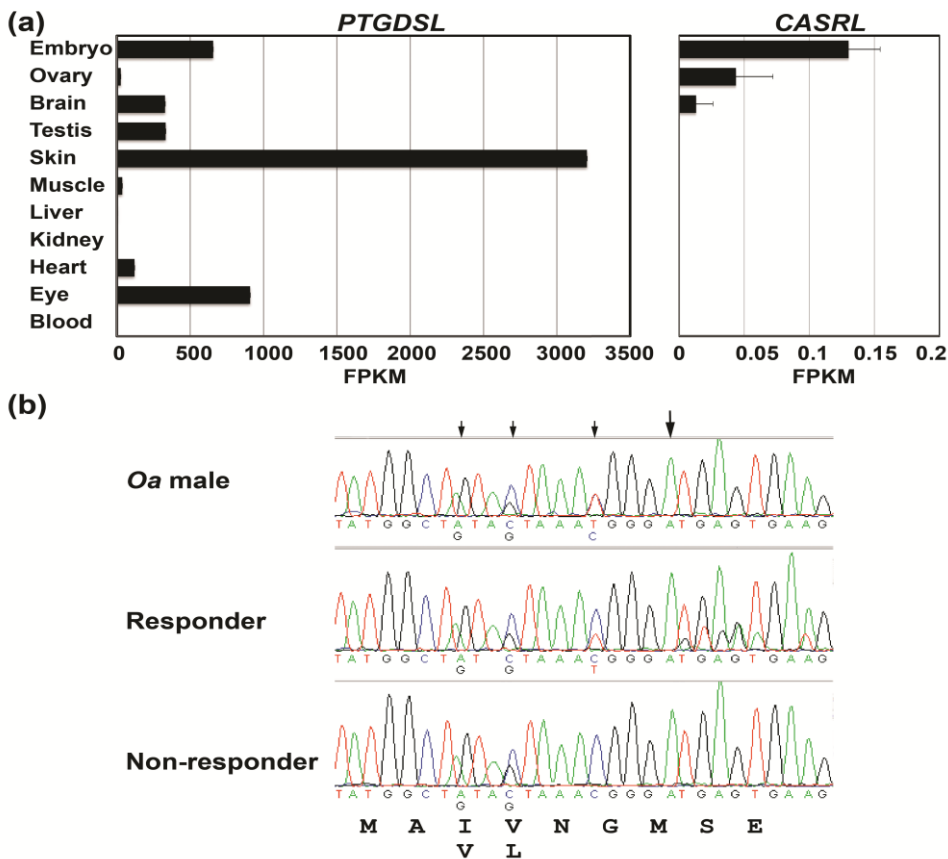
3.13 בחירת גנים מועמדים בקבוצת תאחיזה 9 ו-14

כדי לאמת את קיומם של האתרים הכמותיים (QTLs) העיקריים להיענות הנקבית, חיפשנו גנים מועמדים בקבוצת התאחיזה שבהן אותרו ההשפעות העיקריות. גן נחשב למועמד חזק אם אורתולוגיים שלו דווחו כמתווכים אינטראקציה רבייתית; דפוס הביטוי שלו מתאים לתפקיד זה; ואם הייתה וריאציה משמעותית ברצף המקודד שלו בין הגן של אמנון היאור והירדן. לצורך כך קבענו את הרצף של כל הגנום במסגרת מחקר זה. באמצעות מילות מפתח (מין, פרומון, חוש הריח, טעם, פרוסטגלנדין, ליפוקלין) חיפוש באנוטציה של הבנייה הגנומית (NCBI Gene Database) גילה 12 ו-74 גנים רלוונטיים בקבוצת תאחיזה 9 ו-14, בהתאמה.

בקבוצת תאחיזה 9 איתרנו גן המוגדר כליפוקלין (*PTGDSL*, LOC100712094) שהיה אורתולוגי (זהות 30%, דמיון 49%) לגן ההומני prostaglandin-H2 D-isomerase (*PTGDS*). פרוסטגלנדינים מהווים את הפרומונים של המין הנקבי לאחר הביזבוג בדגי זהב (Sorensen et al, 1988) והסינתזה שלהם גם ממלאת תפקיד מרכזי בביזבוג, עם הבדלים ספציפיים למין ברגולציה או בעיתוי (Lister & Van der Kraak, 2009). לאור זאת, בדקנו את ביטוי הגן האמור בעזרת נתוני RNA-seq שהופקדו בבנק הגנים (PRJNA78915). ניתוח זה הצביע על כך ש-*PTGDSL* מתבטא בעיקר בעור, ממצא שתואם לתיווך אינטראקציות חיצוניות (איור 5a). השוואה בין האזור המקודד לגן באמנון היאור והירדן גילתה כי באחרון היה חילוף חומצות אמינו לא שמרני שמקודד על ידי האקסון הרביעי (M86T).

בקבוצת תאחיזה 14 הבחנו בשלושה אשכולות של קולטנים של תחושה כימית (chemosensory) כל אחד, כולל מספר רב של גנים מועמדים. עורר עניין במיוחד, הצביר הטלומרי שהשתרע על פני מיליון בסיסים (15.1-16.1 Mb) בקבוצת תאחיזה 14) עם למעלה מ-90 גנים ופסאודוגנים המקודדים חיישנים לריכוז סידן חוץ תאי (CaSRs). אחד מהם, אפיתל על פני השטח של השחלות, ומתפקדים בפרוליפרציה של הביציות, התבגרות והישרדות זקיק, תומכת במעורבות אפשרית של *CASRL* באות המשפעל את התבגרות הביצית. האות לפעולת הביצית ייחודי למין (Ellinger, 2016). ניתוח של וריאציה בקידוד הרצפים באמנון היאור והירדן הצביע על שונות במספר עותקים (CNV), השמטה של חומצות

אמיניות (M134Δ) וחילוף לא שמרני של חומצות אמינו שמקודדות על ידי האקסון השני (איור 5b). הוריאנט M134Δ היה קשור עם המגיבות כאשר יחס השיאים ברצף הכרומוטוגרמה הצביע גם על נוכחותו של עותק נוסף (למשל יחס 3:1). במוטציה הסינונימית, איור 3b).



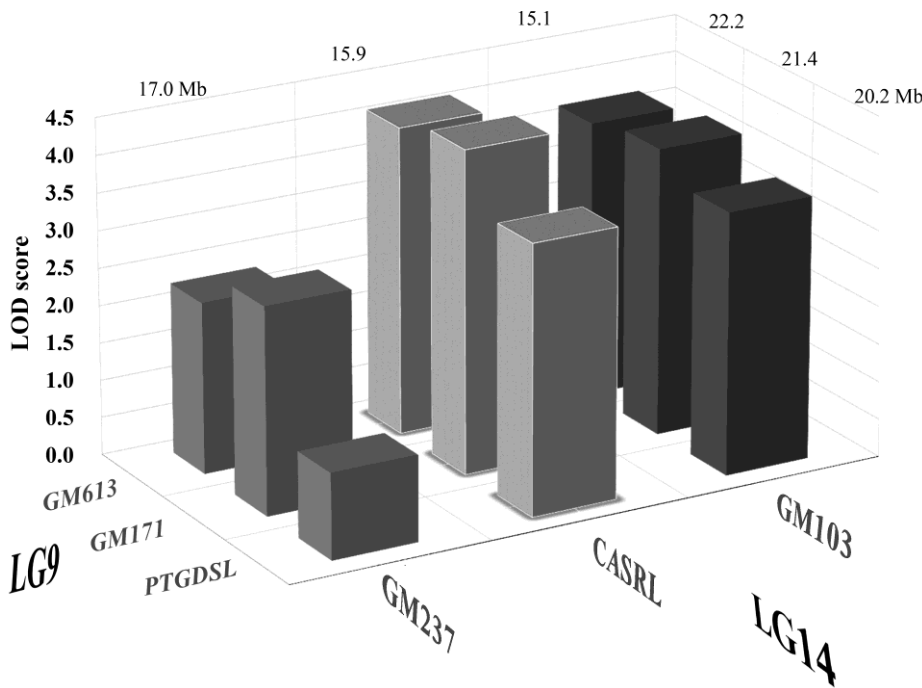
איור 5. שונות רקמתית בביטוי גנים מועמדים. (a) היסטוגרמות מראות את שעורי השעתוק של *PTGDSL* ו-*CASRL* ב 11 רקמות של אמנון יאור. בהתבסס על מטה-אנליזה של נתוני RNA-seq מפרויקט שבו כל דגימה רקמה הוצפה בשלוש חזרות (PRJNA78915). שיעור השעתוק נאמד במספר מקטעי רנ"א לכל אלף בסיסים של הרנ"א הגן הנבדק שנצפו במיליון מקטעים בספריית הביטוי (FPKM). שגיאת התקן חושבה על בסיס שלוש החזרות ומוצגות כקווי סטייה בקצה הימני של כל היסטוגרמה. (b) כרומוטוגרמות רצף טיפוסיות של אקסון השני של *CASRL*. הדנ"א הגנומי הופק מזכרים של אמנון ירדן ($n = 4$), נקבות מגיבה ובלתי מגיבה ($n = 10$, כל סוג) ורוצף באמצעות רצף סנגר והגברת PCR מן התחל הקדימי. שלושה חיצים מצביעים על שלושה מיקומים פולימורפיים המקודדים וריאציות בחומצות האמיניות של I130V, V131L או שינוי נוקליאוטידיים שקט. חץ רביעי גדול מציין את המיקום הראשון בקודון עבור מיתונין (ATG), אשר חסר בגרסה של הגן עם אקסון 2 מקוצר.

כדי לאמת את הקשר בין הגנים המועמדים שנבחרו לבין היענות נקבית, אפיינו סמנים מיקרוסטליטיים בגנים האלה. סמנים אלה מוקמו באזור בין גני בצד ה-5' ובאזור שאינו מתורגם של האקסון האחרון של *PTGDSL* ו-*CASRL*, בהתאמה.

3.14 אימות ההשפעות על קבוצות תאחיזה 9 ו-14 באמצעות סמנים מיקרוסטליטיים

כדי לאשש את ההשפעות המשמעותיות ביותר של הסמנים שהתגלו במבחן אסוציאציה גנומית (GWAS), בדקנו סמנים מיקרוסטליטיים בשתי קבוצות תאחיזה. עבור כל אחת מהקבוצות 9 ו-14, בדקנו שני סמנים ידועים (GM171, GM613) ו- GM103, GM237 (בהתאמה) וסמן אחד שפותח בתוך גן מועמד אטרקטיבי (*PTGDSL-LOC100712094*) ו- *CASRL-LOC100690618* (בהתאמה). הסמן שנבחר עבור הגן *CASRL* הוא MIC340. כל הסמנים השפיעו באופן מובהק על ההיענות הנקבית ($p < 0.0001$), באנליזת GLM לסמן בודד. מובהקות נקבעה גם עבור תשעה שילובים דו-כיווניים של ששת הסמנים, כולל סמן אחד לכל קבוצת תאחיזה. ציוני דרוג ההיתכנות (LOD score) נע בין 1.9 ל 6.1 (איור 6). דרוג ההיתכנות ומקדמי הקביעה היו הגבוהים ביותר עבור שילוב של המיקרוסטליטים GM171 ו-*CASRL*. ממצא שתומך בהשערה כי אשכול הגנים *CASRL* משפיע על תכונה זאת. ציוני דרוג ההיתכנות היו נמוכים יותר עבור שילובים עם *PTGDSL*, מה שמרמז כי הגן הקשור הוא מועמד פחות סביר. ההשפעות המשולבות של GM171 ו-*CASRL* מקבוצות התאחיזה 9 ו-14, בהתאמה, הסתכמו במקדם קביעה של 0.37 להיענות הנקבית. אף על פי שזה כולל את "אפקט המשפחה", כפי שצוין קודם לכן, כמעט ולא היה הבדל בין שיעור התגובה בשתי המשפחות, ואפקט זה לא היה משמעותי בכל אחד מהמודלים שנבדקו.

איור 6. השפעות משולבות של סמנים מיקרוסטילטיים שמקורם בקבוצת תאחיזה 9 ו 14 על אינטראקציית הרבייה הבין מינית של נקבות אמנון. מדדי ההיתכנות (LOD score) נגזרו מערכי F עבור המודלים המלאים הכוללים את ההשפעות של הגנוטיפים המשפחתיים והסמנים עבור שני הסמנים מקוננים בתוך המשפחה.



4. סיכום ומסקנות.

תכונת ההיענות הנקבית היא רב-גנית. בגן המועמד המבטיח, דמוי קולטן ריח ומוגדר כחיישן לריכוז סידן חוץ תאי CASRL-LOC100690618, אותרו שינויים ברצף המקודד לחומצות האמיניות של נקבות אמנון היאור מלהקת דור שמגיבות לזכר אמנון הירדן והוכח קשר סטטיסטי המובהק בין אללים שלו לבין הנקבות שהשתתפו בהטלה מופרית הבין-מינית.

תוצאות אלה סוכמו במאמר (Shirak et al., 2018), שבזמן כתיבת הדו"ח היה בתהליך של תיקונים. המאמר בגרסתו הראשונית נגיש בקישורית http://cowry.agri.huji.ac.il/M19/Shirak_et_al2018.pdf (תחת הסיסמה: madan19). הערות המבקרים מוצגות כאן: <http://cowry.agri.huji.ac.il/M19/HeredityDecisionHDY17A0419.pdf>.

בהמשך, הניסוי הורחב ללהקת צ'יטרלדה שנבררה לצורך זה לפי היכולת לצור אוכלוסייה כל זכרית. הוכחה יכולת לצור אוכלוסייה כל זכרית על בסיס נקבות הזן צ'יטרלדה כתחליף לנקבות אמנון היאור מלהקת דור. זן זה הוא בעל קצב גידול גבוה יותר. אפיון הפולימורפיזם באתרים לקביעת הזוויג ולרבייה בין מינית בזן זה יביאו ליצירת אוכלוסייה כל-זכרית באמנון בהיקף מסחרי.

5. רשימת ספרות.

Ellinger I (2016). The Calcium-Sensing Receptor and the Reproductive System. *Front Physiol* 7.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, et al. (2011) A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* 6: e19379.

Eshel O, Shirak A, Dor L, Band M, Zak T, Gordon M, Caspi V, Feldmesser E, Weller JI, Seroussi E, Hulata G and Ron M (2014) Identification of male-specific *amh* duplication, genes and microRNAs

differentially expressed between genders at early embryonic development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics* **15**:774.

Lister AL, Van der Kraak GJ (2009). Regulation of Prostaglandin Synthesis in Ovaries of Sexually-Mature Zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Reprod Dev* **76**: 1064-1075.

Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink J-L (2012) Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. *PLoS ONE* **7**: e32253.

Shirak, A., Zak, T., Dor L., Benet-Perlberg, A., Weller, J.I., Ron, M., and Seroussi, E. (2018) Quantitative trait loci on LGs 9 and 14 affect the reproductive interaction between two *Oreochromis* species, *O. niloticus* and *O. aureus*. *Heredity* (under revision).

Sorensen PW, Hara TJ, Stacey NE, Goetz FW (1988). F-prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex-pheromone in goldfish. *Biol Reprod* **39**: 1039-1050.

Sukmanomon S, Kamonrat W, et al. (2012), Genetic changes, intra- and inter-specific introgression in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand, *Aquaculture*, **vol. 324-325**, pp. 44-54.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>א. שימוש בזיהוי אלקטרוני (RFID), ללימוד ההתנהגות בקן הזכר בתנאי בריכות ופתוח מבחן התנהגותי לברירת נקבות "מגיבות" שיתחרה כלכלית במבחן הידני הקיים לזיהוי נקבות אמנון מדור מכלוא שמגיבות לזכרי אמנון הירדן; ב. פתוח מבחן גנטי מבוסס סמנים גנטיים לזיהוי נקבות אמנון "מגיבות"; ג. יישום מבחן התנהגותי וגנטי לברירה של להקות רבייה ליצירה המונית של דגיגי אמנון כל-זכריים.</p>
<p>אלו ממטרות המחקר הושגו בעבודת המחקר הנוכחית</p> <p>השימוש בזיהוי אלקטרוני הודגם בניסויים הכוללים מספר מצומצם של פרטים וטווח תנועה מצומצם ולכן לא ישים לאנליזה רבת משפחות ופרטים (מטרה א). שופר האפיון של הסמנים הגנטיים הנדרשים לתהליך הברירה (מטרה ב). הושגה התקדמות בברירה של להקות רבייה ליצירה המונית של דגיגי אמנון כל-זכריים על בסיס הזן צ'יטרלדה (מטרה ג).</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות.</p> <p>בוצעו: בדיקה להעלאת אחוז הנקבות הפעילות; פיתוח סמן מחליף ל- MIC340; זיהוי סמנים נוספים המסבירים את הבקרה גנטית של פעילות רבייתית בין מינים בסריקה כל-גנומית ומבחן אסוציאציה גנומית (GWAS) עם ההיענות הנקבית; בחירת גנים מועמדים בקבוצות תאחיזה 9 ו-14. אימות ההשפעות על קבוצות תאחיזה 9 ו-14 באמצעות סמנים מיקרוסטטיים; בדיקת יכולת לשחזר מקווים היברידיים של אמנון היאור יכולת ייצור צאצאים כל-זכריים תוך שמירת רמת אינטראקציה רבייתית גבוהה; קביעת מקור גנטי לאמנונים מזן צ'יטרלדה (Chitralada); קביעת זוויג בלהקה נבחרת של אמנוני צ'יטרלדה; קביעת יחס זוויגי בצאצאי להקה מטהרת של אמנוני צ'יטרלדה; נבחנה השפעת מצב האללים בקבוצות תאחיזה 3 על יחס זוויגי בהכלאה בין צ'יטרלדה לזכרים של אמנון הירדן; בדיקת פעילות רבייתית בין נקבות צ'יטרלדה לזכרים של אמנון הירדן ובחינת אתרים גנומיים למחסום התנהגותי, האם הם משותפים או שונים בלהקות דור וצ'יטרלדה; בדיקת פעילות רבייתית בין נקבות צ'יטרלדה לזכרים של אמנון הירדן. בדיקת פעילות רבייתית של גנוטיפים זכריים XX, XY ו-YY וגנוטיפים נקביים XX ו-XY. התוצאות הובילו לשיפור האפיון של סמנים גנטיים באתרים לקביעת זוויג הנדרשים לתהליך הברירה של להקות רבייה מזן צ'יטרלדה. הדגמנו שהגן AMH הוא גן עיקרי שקובע את הזוויג בזן זה בהתאמה לתגלית שלנו באמנון יאור (Eshel et al., 2014). בוצע מבחן אסוציאציה גנומית (GWAS) עם היענות נקבית. תכונה כמותית זאת מושפעת מאתרים גנומיים עיקריים על קבוצות תאחיזה 9 ו-14 שמשפיעים על אינטראקציה רבייתית בין שני מיני אמנון היאור והירדן.</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> <p>ברירה של להקות רבייה צ'יטרלדה מהווה תחליף עדיף לאמנון היאור. אפיון הפולימורפיזם באתרים לקביעת הזוויג ולרבייה בין מינית בזן זה יביאו ליצירת אוכלוסייה כל-זכרית באמנון בהיקף מסחרי.</p>
<p>בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביה</p> <p>למרות ההתקדמות שהושגה נותרו אתגרים חשובים להבטחת היכולת של ברירת להקות רבייה שיצרו ביעילות אוכלוסייה כל זכרית של דג האמנון. בראשם זיהוי הגן לקביעת זוויג בקבוצות תאחיזה 3 והפולימורפיזם הקובע בגן זה. גם יכולת הרבייה הבין מינית מושפעת ממספר גנים שאנו רחוקים מזיהויים המלא. שינוי במספר העתקים האופייני לגנים אלה קשה למדידה ומקשה על יישום הממצאים. זיהוי הגנים האחראיים לקביעת הזוויג ולרבייה בין מינית יאפשר את השליטה הנדרשת בברירת להקות הרבייה המבוקשות. השגת מטרות אלה מצריכה הגשת תכנית מחקר המשך.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;</p> <p>1. Shirak, A., Zak, T., Dor, L., Benet-Perlberg, A., Ron, M. and Seroussi, E. (2017) Development of tilapia broodstocks producing all-male progeny on a commercial scale. Abstract and lecture in 8th International Conference on Fisheries & Aquaculture, Toronto, Canada https://www.omicsonline.org/speaker/eyal-seroussi-agricultural-research-organization-aro-rishon-letsiyon-israel/</p> <p>2. Shirak, A., Zak, T., Dor, L., Benet-Perlberg, A., Weller, J.I., Ron, M. and Seroussi, E. (2018) Quantitative trait loci on LGs 9 and 14 affect the reproductive interaction between two <i>Oreochromis</i> species, <i>O. niloticus</i> and <i>O. aureus</i>. <i>Heredity</i> (In revision).</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p> <p>← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p> <p>← חסוי – לא לפרסום:</p> <p>יש להמתין עם פרסום הדו"ח עד לאחר פרסום המאמר</p>