

**משרד החקלאות – דף שער לדו"ח מדעי לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי**


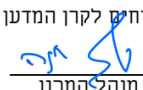
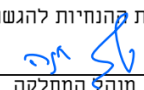
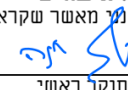
קוד זיהוי	894 - 0192 - 16
א. נושא המחקר (בעברית)	בניית מפת תאחיזה וזיהוי אתר לקביעת זווית לייצור אוכלוסית בורים כל-נקבית

ג. כללי		
מוסד מחקר של החוקר הראשי		
חקר ימים ואגמים, המרכז הלאומי לחקלאות ימית, אילת		
תאריכים		סוג הדו"ח
תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון	תקופת המחקר עבודה מוגש הדו"ח	
שנה חודש	שנה חודש	שנה חודש
04 / 2017	12 / 2016	12 / 2013
מסכם		התחלה
סיום		

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	חוקר ראשי
חנה	רוזנפלד	
חוקרים משניים		
מ'כה	רון	1
אנדרי	שיראק	2
איריס	אשכנזי	3
		4
		5
		6
		7

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
קרן מדען ראשי		100,000

ה. אישורים
 הני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצוי בתוספת זו.
 03.04.17 תאריך (שנה) (חודש) (יום)

DEPUTY DIRECTOR
 KAREN MAMAN
 DIRECTOR
 ISRAEL OCEANOGRAPHIC & LIMNOLOGICAL RESEARCH LTD.
 מנהל המכון (פקולטה)
 מנהל המחלקה
 חוקר ראשי
 אמרכלות (רשות המחקר)

בניית מפת תאחיזה וזיהוי אתר לקביעת זווית לייצור אוכלוסית בורים כל-נקבית

Linkage map construction and identification of sex determining locus for the production of grey mullet (*Mugil cephalus*) all-female stock

שנת המחקר: שלישית מתוך שלוש שנים

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

ד"ר חנה רוזנפלד, רביית דגים, חקר ימים ואגמים לישראל, המרכז הלאומי לחלאות ימית, אילת
ד"ר איריס אשכנזי, רביית דגים, חקר ימים ואגמים לישראל, המרכז הלאומי לחלאות ימית, אילת
פרופ' מיכה רון, המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני
ד"ר אנדרי שיראק, המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני

Dr. Hanna Rosenfeld, National Center for Mariculture, P.O.B. 1212, Eilat 88112.

E-mail: hannarosenfeld@gmail.com

Dr. Iris Meiri Ashkenazi, National Center for Mariculture, P.O.B. 1212, Eilat 88112.

E-mail: irismeiri@gmail.com

Prof. Micha Ron, Animal Genetics, Institute of Animal Science, ARO, The Volcani Center, Israel.

E-mail: micha.ron@mail.huji.ac.il

Dr. Andrey Shirak, Animal Genetics, Institute of Animal Science, ARO, The Volcani Center, Israel.

E-mail: shiraka@volcani.agri.gov.il

תקציר

דג הבורי, *Mugil cephalus*, נמנה על דגי המאכל הנפוצים בישראל. מבחינה חקלאית קיים יתרון כלכלי לגדל אוכלוסיות בורי כל-נקביות בשל קצבי גדילה מהירים של הנקבות בהשוואה לזכרים בגיל התואם. כמו כן, שחלות הדג משמשות להכנת מאכל גורמה בעל ערך כלכלי רב. אחת הדרכים לבסס אוכלוסיות כל-נקביות היא הכלאה בין נקבות הפוכות זווית (זכרים פנוטיפים) לבין נקבות טבעיות. אולם, העדר סמני זווית מורפולוגיים או גנטיים מקשה לאחר היפוך הזווית, לזהות את הזכרים הפנוטיפים, ולהפרידם מהזכרים הגנטיים. לאור האמור לעיל, בעבודה הנוכחית בססנו ממשק טיפולים הורמונאליים, שנמצא יעיל בהשריית פנוטיפ זכרי בדגי בורים, פותחה שיטה כמותית לאפיון איכות הזרע בדגי בורי, ובוצע מעקב אחר תהליך ההתפתחות המינית של הדגים המטופלים. בתום 3 שנות המחקר הדגים עדין לא הגיעו לבגרות מינית. במקביל, בוססה תשתית גנטית לדג הבורי. פותחו 245 סמנים, מהם 156 התפצלו במשפחת מיפוי המונה 48 צאצאים. הורכבה מפה גנטית באורך של 1200 יחידות מיפוי (cM) הכוללת 24 קבוצות תאחיזה בהתאמה למספר הכרומוזומים. סמן יחיד בקבוצת תאחיזה מספר 9 נמצא אחוז לאתר קביעת מין. באמצעות מיפוי השוואתי לגנום האמנון והאדם, זוהו 5 סמנים פוטנציאליים לקביעת זווית. לאחר אנליזה גנטית לתיקוף הסמנים, זוהו שני סמנים (558,560) שאפשרו זיהוי זווית. עם זאת, הזיהוי התאפשר במשפחות דגים נתונות בלבד. העבודה הנוכחית בססה כלים וחומר גנטי לבסוס אוכלוסיות כל נקביות בדג הבורי, עם זאת, נדרש מחקר משלים לזיהוי אלל אוניברסלי המבדיל בין זכר לנקבה, ולקידום ההכלאות המבוקרות בין הזכרים הפנוטיפים והנקבות הטבעיות. אין ספק כי המשך מחקר ופתוח טכנולוגיה ליצירת קו גנטי של דגי בורי כל-נקביים, יקנו יתרון למכוני הרבייה המסחריים בארץ ויעודדו ייצור לטובת יצוא.

מעריכים מומלצים: פרופ' צבי ירון, אוני' תל אביב; פרופ' אמיר שגיא, אוני' בן גוריון;
ד"ר אייל סרוסי, מכון וולקני

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

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

תאריך: 2.04.2017

חתימת החוקר

תוכן עינינים

3.....	רקע.....	.1
3.....	מטרות המחקר.....	.2
4.....	מהלך עבודה ותוצאות.....	.3
4.....	3.1 ביסוס קבוצת נקבות הפוכות זוויג (זכרים פנוטיפים) כאמצעי לפיתוח קווי אוכלוסיות כל-נקביות.....	
4.....	3.1.1 בסוס ממשק הורמונאלי להיפוך זוויג והשריית פנוטיפ זכרי בדגי בורי.....	
4.....	3.1.2 מעקב אחר התפתחות מינית בקרב הדגים הפוכי הזוויג.....	
5.....	3.2 בניית תשתית גנומית לדג בורי לאיתור אזורים וגנים המקודדים לתכונות חשובות לגידול חקלאי.....	
5.....	3.2.1 ריצוף דנ"א, בשיטת "ריצוף עמוק", של זכר ונקבה ממשפחת המיפוי, לבניית מפת גנום של דג הבורי.....	
6.....	3.2.2 פיתוח סמנים גנטיים לבניית מפת תאחיזה.....	
7.....	3.2.3 זיהוי אתרים בגנום לקביעת זוויג.....	
7.....	3.2.4 תיקוף סמני קביעת זוויג.....	
8.....	סכום עקרי הממצאים עד כה.....	.4
9.....	רשימת ספרות מצוטטת.....	.5

1. רקע

דג הבורי (קיפון גדול ראש, *Mugil cephalus*) ניחן בכושר הסתגלות למליחויות שונות (ממי ים ועד למים מתוקים) ולכן מותאם לגידול מסחרי. בישראל ייצור הבורי מהווה כ- 9.5% מסך הייצור במדגה, ומקיים שוק יציב לאורך השנה. ע"פ נתוני ארגון המזון והחקלאות של האו"ם (FAO), אף ברמה העולמית ניכרת עליה דרמטית בצריכת דגי בורי. בנוסף לדרישה לבשר הדג, גלום פוטנציאל כלכלי רב בשחלות הדג, המשמשות להכנת מעדנים הנמכרים במחירים של 50-180€ לק"ג. יתרון כלכלי זה, בשילוב עם קצב גדילה מהיר שמגלות נקבות הבורי ביחס לזכרים, הופכים את הזוויג הנקבי למועדף מבחינה חקלאית. עם זאת, למרות העלייה ברווחיות גידול הבורי הנראית בשנים האחרונות, התעשייה לא מצליחה להגדיל את נפחי הייצור בעיקר בשל מגבלה באספקת דגיגים. העובדה כי גידול הבורי מתבסס על איסוף דגיגים מהים מונעת שליטה בזמינות הדגיגים וכן מונעת אפשרות לטפח קווים משופרים גנטית תוך העצמת תכונות רצויות מבחינה חקלאית. בהקשר זה, בשנים האחרונות הצטבר במלח"י (אילת) ידע רב בתחומי הרבייה (Aizen et al., 2005), הגידול הדרולוגי וההזנה של דג הבורי. חבילת ידע זו, המאפשרת את סגירת מעגל חיי הדג במתקנים חקלאיים, מצויה בשלבי גימלון התחלתיים במכונני רביה מסחריים בישראל. השליטה המלאה במחזור חיי הבורי, מחד, והפוטנציאל לצמצם את זמן הדור בתנאי "שבי", מאידך, פותחים בפנינו, לראשונה, את הדרך לטיפול גנטי של מין דג זה. לאור האמור לעיל, בפרויקט הנוכחי מוקד מאמץ מחקרי בביסוס תשתית גנומית שתאפשר בעתיד טיפוח גנטי יעיל של קווים המותאמים לגידול חקלאי. ההתקדמות שחלה בשנים האחרונות בטכנולוגיה של ריצוף דנ"א, הורידה בשני סדרי גודל את הזמן וההשקעה הכספית הנדרשים להקים תשתית גנומית, ולפיכך נתן לישים כיום גישה זו בדג הבורי, למרות שטרם בוססו עבורו נתוני גנום. בהתאם, יעדי הפרויקט כוללו את פיתוחם של סמנים גנטיים, מיקרוסטליטים מסוג (STR) Short Tandem Repeat, המאופיינים בפולימורפיזם גבוה (ריבוי אללים) גם בקווי שאר (Shirak et al., 2006, 2013; Dor et al., 2014a,b). סמני ה-STR אפשרו לקבוע הורות, לברר את דפוס ההתנהגות הרבייתית של הדג ולבנות מפת תאחיזה למיפוי גנום הדג. בנוסף, באמצעות אנליזת Quantitative trait locus (QTL), אשר הוכחה כיעילה ביותר במחקר אוכלוסיות הטרוגניות (Eshel et al., 2014), אותרו איזורים גנומיים, המקודדים לתכונות יעד חשובות ובכלל זה, זיהוי סמני זוויג, אשר יסייעו לנו בעתיד לבסס אוכלוסיות כל נקביות של דגי הבורי, ובכך להגדיל באופן ניכר את ריווחיות המגדל.

2. מטרת המחקר

לנוכח צמצום התקציב המאושר לפרויקט (שליש מתקציב המקור), המחקר מוקד להשגת היעדים הבאים:
1. בניית תשתית גנומית לדג בורי לאיתור אזורים וגנים המקודדים לתכונות חשובות לגידול חקלאי. מטרת-על זו כללה את השלבים הבאים:

- א) בסוס להקת דגי בורי, צאצאי דור ראשון (G1) ממספר הורים מצומצם.
- ב) זיהוי גנטי של אחים מלאים להקמת משפחת מיפוי.
- ג) ריצוף דנ"א, בשיטת "ריצוף עמוק", של זכר ממשפחת המיפוי, לבניית מפת גנום של דג הבורי.
- ד) פיתוח סמנים גנטיים לבניית מפת תאחיזה.
- ה) אנליזה של הסמנים במשפחת המיפוי לזיהוי אתרים בגנום לקביעת זוויג.
- ו) ריצוף דנ"א, בשיטת "ריצוף עמוק", של נקבה ממשפחת המיפוי, להשוואה עם זכר באתר לקביעת הזוויג.

2. ביסוס קבוצת נקבות הפוכות זוויג (זכרים פנוטיפים) כאמצעי לפיתוח קווי אוכלוסיות כל-נקביות. מטרת על זו כללה את היעדים הספציפיים הבאים:

- א. ביסוס טיפול הורמונאלי להשריית פנוטיפ זכרי בדגי בורי.
- ב. פתוח מבחן כמותי לאפיון איכות הזרע בדגי בורי.

3. מהלך עבודה ותוצאות

3.1 ביסוס קבוצת נקבות הפוכות זויג (זכרים פנוטיפים) כאמצעי לפיתוח קווי אוכלוסיות כל-נקביות.

3.1.1 בסוס ממשק הורמונאלי להיפוך זויג והשריית פנוטיפ זכרי בדגי בורי

עבודה מקדימה שבוצעה במלח"י הצביעה על גונדה בלתי ממוינת בדגי בורי בגיל 9-11 חודשים, ועל רגישות מוגברת לאנדרוגנים אקסוגנים, בגיל 6-10 חודשים. בהתאם, דגי בורי (G2), עברו טיפול היפוך זויג, חשיפה בגיל 6 חודשים למשך שישה חודשים לאנדרוגן במינון 15 מ"ג מטילטסטוסטרון [MT] לק"ג מזון, עברו באופן יעיל היפוך זויג (100% זכרים). עם זאת, נתן היה להבחין בפערי גדילה משמעותיים בהשוואה לדגים בלתי מטופלים. עיכוב זה הסתמן כבלתי הפיך שכן הדגים לא הצביעו על התפתחות נורמלית במהלך השנה האחרונה, גם לאחר שינוי הדיאטה למזון רגיל אשר לא כלל את האנדרוגן. בסדרת ניסויים נוספת, שתי קבוצות דגיגים בני 6 ו-7 חודשים נחשפו באמצעות המזון, ל-10 מ"ג MT למשך 4 חודשים רצופים. בשתי נקודות זמן (גיל 9 חודשים וגיל 12 חודשים) נאספו קטעי גונדות לצורך אנליזה הסטולוגית לקביעת זויג וכן תועדו נתונים מורפומטרים (משקל ואורך; טבלה 1). נמצא כי חשיפה לאנדרוגן MT (10 מ"ג לק"ג מזון למשך 4 חודשים) הובילה בשתי קבוצות הניסוי ל-100% זיכור בדגיגים בהגיעם לגיל שנה. מבחינת ההשפעות על קצבי הגדילה, בטווח הקצר היה עכוב קל בדגיגים מטופלי ה-MT בהשוואה לדגיגי הבקורת, אולם לאחר השלמת הטיפול, בגיל 12 חודשים, פער זה הצטמצם ולא נכר הבדל סטטיסטי מובהק ($P > 0.05$) במשקלי הדגים המטופלים בהשוואה לדגי הבקורת (טבלה 1).

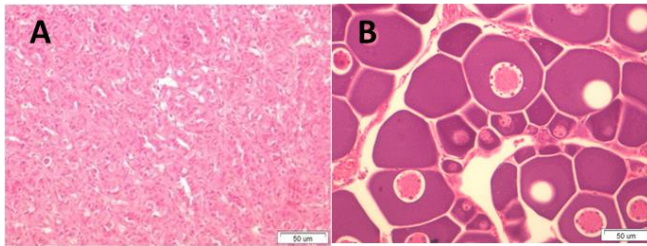
יחסי זויגים (%)			אורך (סמ')	משקל (גר)	קבוצת הטיפול	גיל הדגים בעת הדיגום
זכרים	נקבות	בלתי ממויין				
20	30	50	14.93±0.57 ^a	36.96±3.37 ^b	Control	גיל 9 חודשים
90	0	10	13.42±0.49 ^a	26.83±2.85 ^a	6 M	
80	0	20	13.79±0.37 ^a	28.21±2.33 ^a	7 M	
60	20	20	16.39±0.29 ^a	54.04±3.31 ^a	Control	גיל 12 חודשים
100	0	0	15.60±0.43 ^a	44.98±4.56 ^a	6M	
100	0	0	15.83±0.44 ^a	50.41±4.82 ^a	7M	

טבלה 1. נתוני גדילה והתמיינות זויגית בקבוצות בורי מטופלות באנדרוגן מטילטסטוסטרון בהשוואה לקבוצת ביקורת בלתי מטופלת.

3.1.2 מעקב אחר התפתחות מינית בקרב הדגים הפוכי הזויג

בתום שנת גידול שניה (נובמבר 2015) נדגמו 35 דגים מקבוצת הביקורת (טבלה 2). אנליזה הסטולוגית של דגימות גונדה שמשה לקביעת זויג וכן לבחינת התפתחות מינית. במקביל דגימת סנפיר מדגים אלה שמשה לזיהוי באמצעות סמני דני"א (פירוט בהמשך). כמודגם באיור 1, הן הזכרים והן הנקבות בקבוצה, הצביעו על התפתחות ראשונית בלבד.

טבלה 2. פרטי משקל, אינדקס גונדה וזוויג בדגי בורי בני שנתיים (נובמבר 2015).



איור 1. חתכים הסטולוגיים של גונדות של דגי בורי בגיל שנתיים. (A) אשך ו-(B) שחלה, המציגים התפתחות מינית ראשונית.

במהלך מאי 2016, תוייגו כל הדגים בקבוצות אשר עברו תהליך זיכור, הדגים נשקלו ונלקחה דוג' מסנפיר הזנב לקביעת זוויג באמצעות סמני דני"א (פירוט בהמשך). במהלך יולי 2016, תחילת עונת הרבייה הטבעית, הדגים קבלו טיפול משולב הכולל FSH רקומביננטי ($5\mu\text{g}/\text{KgBW}$) ואנטגוניסט לדופאמין (מטוקלופרמיד $15\text{mg}/\text{KgBW}$). במהלך אוקטובר, עם התקדמות העונה, נערכו ביופסיות. הדגים לא הציגו התפתחות מינית ולא נתן היה לזהות נוכחות זרע.

#	משקל (ג')	אורך (ס"מ)	אינדקס גונדה (%)	זוויג עי"פ היסטולוגיה
1	61.01	22.5	0.18	F
2	65.1	21.1	ND	M
3	92.4	23.7	0.33	F
4	108.6	27.8	0.41	F
5	131.5	32.3	0.09	M
6	186.9	30	0.08	M
7	109.2	24.9	0.11	M
8	68	21.7	0.22	F
9	57.3	20.6	0.26	F
10	41.2	18.7	ND	M
11	215	30.9	ND	M
12	47	17.1	ND	F
13	41.5	19.9	ND	M
14	54	22.8	ND	M
15	45.6	24.1	ND	M
16	36.6	20.6	ND	M
17	153.82	25.3	ND	M
18	131.3	24.1	ND	M
19	139.12	25.3	0.56	F
20	74.1	19.8	ND	M
21	57.2	18.2	ND	M
22	225	18.7	0.32	F
23	176	25.7	0.24	F
24	243.64	28.7	0.29	F
25	67.16	19.3	0.16	F
26	127.43	24	0.14	F
27	113.53	22.6	ND	M
28	130.95	24.5	0.3	F
29	122.44	23.5	0.16	F
30	135.45	25	ND	M
31	193.08	26.8	0.21	F
32	144.9	24.3	0.23	F
33	124.8	23.7	0.18	F
34	180.46	26.8	0.13	F
35	114.56	23.5	0.30	F

3.2 בניית תשתית גנומית לדג בורי לאיתור אזורים וגנים המקודדים לתכונות חשובות לגידול חקלאי

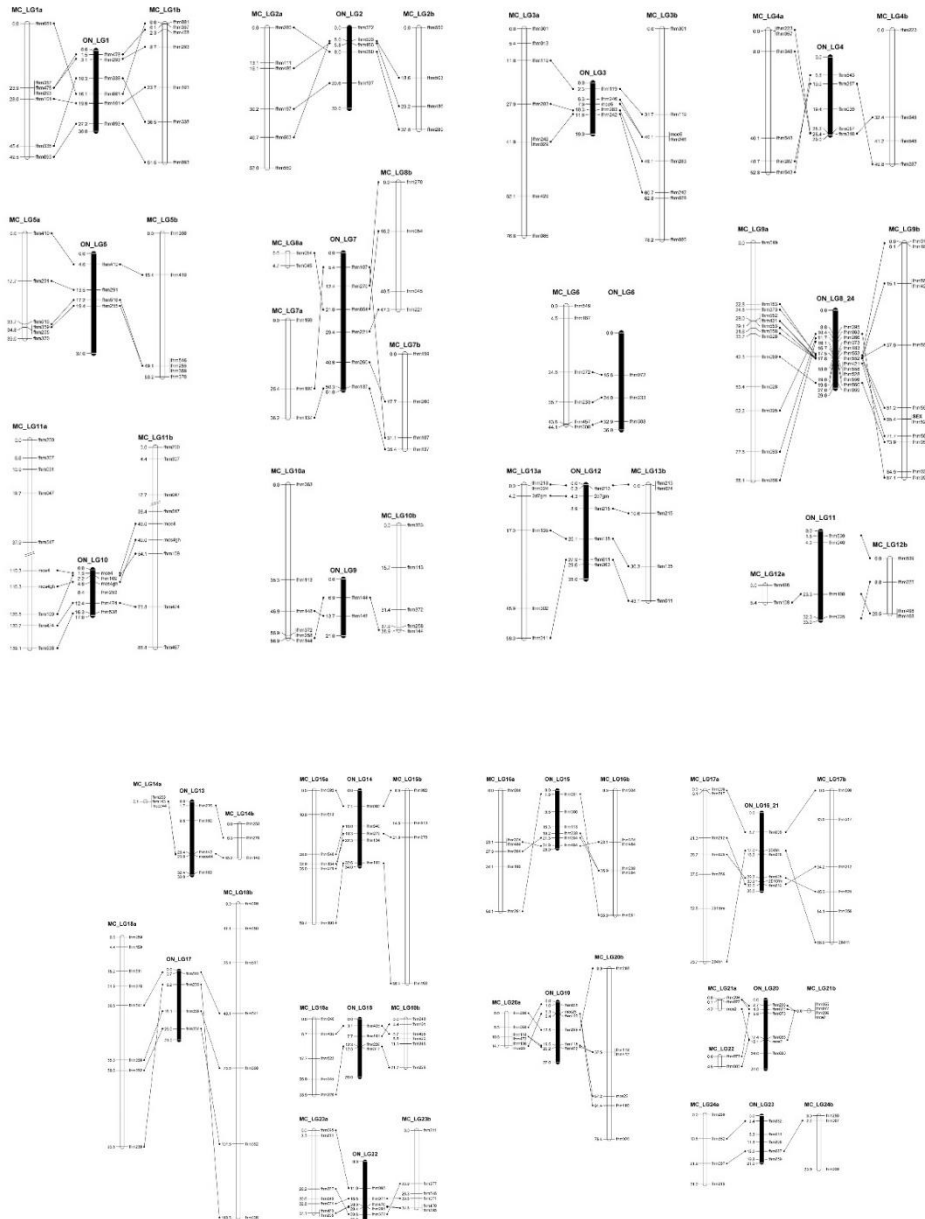
בשנת המחקר הראשונה בוססה להקת דגי בורי צאצאי דור ראשון (G1) ממספר הורים מצומצם (נקבה ושני זכרים). הדגים סומנו וזוויגם נקבע באמצעות ביופסיות של קטעי גונדה (בדיקת סוג הגמטות שהם מייצרים, ביציות או תאי זרע). כדי לזהות בקרב צאצאי G1 את אותם אלו המהווים אחים מלאים, בוססה בשלב ראשון, אנליזה גנטית לקביעת הורות באמצעות 12 סמנים מיקרוסטליטים. סמנים אלה, אשר פותחו על בסיס מידע קיים במאגר ה-NCBI, נמצאו יעילים בבסוס משפחת המיפוי. דני"א הופק מסנפירים של 105 פרטי G1 באמצעות קיט מסחרי EPICENTRE (Medison, WI, USA). על בסיס איכות הדני"א וכמותו, נמצא כי 92 צאצאי G1 מתאימים לפרויקט המיפוי, 50 זוהו כאחים מלאים ומהם 48 פרטים נבחרו למשפחת מיפוי.

3.2.1 ריצוף דני"א, בשיטת "ריצוף עמוק", של זכר ונקבה ממשפחת המיפוי, לבניית מפת גנום של דג הבורי

במחקר הנוכחי, בדומה למחקר קודם עם דג הדקר (Dor et al., 2014a,b), ביססנו באמצעות ריצוף עמוק במכשיר HiSeq2500 (Roy J. Carver Biotechnology Center, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, USA), סמנים אינפורמטיביים מאחד מפרטי משפחת המיפוי. רוצפו 174 מיליון מקטעים באורך ממוצע של כ-400 בסיסים משני הקצוות. קריאות הרצף היו של 160 בסיסים כל אחת. סה"כ כמות הבסיסים שרוצפה בהיקף של 56 GB מהווה כיסוי של כ-43 פעמים (43x) של גנום הבורי. קריאות רצף חופפות חוברו לקונטיגים (Contig). קונטיגים בעלי קריאות ממקטעים משותפים הורכבו לתוך פיגומים כרומוזומליים (Scaffolds) ע"י תוכנת SopDeNovo. רצף הפיגום הארוך ביותר כלל כ-33 אלף בסיסים בלבד. בשנה השניה של המחקר, רוצף באופן דומה, דני"א של נקבה ממשפחת המיפוי. רוצפו מעל 300 מיליון מקטעים באורך ממוצע של כ-260 בסיסים משני הקצוות.

3.2.2 פיתוח סמנים גנטיים לבניית מפת תאחיזה

רצפי הפיגומים הגנומיים נסרקו לצורך איתור רצפים מיקרוסטילטיים משני סוגים: (א) מסוג $(CA)_{10}$ ו- $(TG)_{10}$ הצמודים לרצף בסיסים לא מזוהה (NNN), ו- (ב) רצפים מיקרוסטילטיים מסוג $(TTAGGG)_4$ ו- $(CCCTAA)_4$ הנפוצים באזורים טלומריים. בנוסף, הפיגומים נסרקו במטרה לאתר רצפים דומים ל-15 גנים הקשורים לקביעת זווית או נמצאים בתאחיזה לאתרים הקובעים זווית במיני דגים שונים. פותחו 245 סמנים, מהם 156 התפצלו במשפחת מיפוי המונה 48 צאצאים. הורכבה מפה גנטית באורך של 1200 יחידות מיפוי (cM) הכוללת 24 קבוצות תאחיזה בהתאמה למספר הכרומוזומים. איור 2 מציג באופן סכמתי את קבוצת התאחיזה.



איור 2. מפה של קבוצות התאחיזה בגנום דג קיפון גדול ראש. שתי הגרסאות ההוריות לקבוצת התאחיזה (ביחידות סנטימורגן) מוצגות משני צידי האזור האורתולוגי של גנום האמנון (במיליוני בסיסים).

3.2.3 זיהוי אתרים בגנום לקביעת זוויג.

סמן יחיד בקבוצת תאחיזה מספר 9 נמצא אחוז לאתר קביעת מין. באמצעות מיפוי השוואתי לגנום האמנון ולגנום האדם נמצאו 70 גנים באתר לקביעת מין. מהם 5 הציגו מעורבות בתהליך קביעת המין. ממצאינו עד כה, סוכמו למאמר ראשון (Dor et al., 2016). השוואת נתוני הריצוף של הזכר לנתונים שהתקבלו עבור הנקבה באתר לקביעת מין הובילו לזיהוי הבדלים בגנים המעורבים בקביעת הזוויג.

3.2.4 תיקוף סמני קביעת זוויג

במהלך השנה שלישית נערך תיקוף לסמני הזוויג. לצורך כך נלקחה דגימת דני"א מ 35 פרטים מקבוצת הביקורת (טבלה 2) לקבוצת הטיפול ההורמונלי להיפוך הזוויג. אפיון גנוטיפי באמצעות חמשה סמנים באזור קביעת המין הצביע כי באוכלוסיית הבקרה קיימים אללים זהים לאלו של אוכלוסיית המיפוי וכן נמצאו אללים חדשים. כמו כן, נמצא ש-9 פרטים אינם שייכים להטלה העיקרית (טבלה 3, סמון צהוב). אפיון גנוטיפי תוך משפחתי של שני סמנים (fhm558 and fhm560) איפשר להבחין ברמת דיוק גבוהה בין זכרים ונקבות (טבלה 3, סימון כחול וורוד, בהתאמה) ומצביע כי סמנים אלו גובלים באתר לקביעת זויג. סמנים fhm552 ו-fhm528 ספקו מידע חלקי ואילו סמן fhm421 הוסיף מידע להגברת הביטחון בקביעת שייכות למשפחה בלבד. כמצויין לעיל, זויג הדג אושש באמצעות אנליזה הסטולוגית (טבלה 2). עד כה, טרם נמצא אלל אוניברסלי המבדיל בין זכר לנקבה, עם זאת

טבלה 3. אפיון גנוטיפי באמצעות חמישה סמנים באזור קביעת הזוויג (fhm 560; 558; 552; 528; 421). חיצים שחורים מצביעים על אירועי רקומבינציה, המעידים כי סמנים fhm558 ו-fhm560 גובלים באזור לקביעת זוויג.

#	Sex	fhm421		fhm528		fhm552		fhm558		fhm560	
1	F	206	232	215	251	430	435			140	150
12	F	206	232	215	251	430	435	198	198	140	150
23	F	206	232	215	251	430	435	198	198	140	150
24	F			215	251	430	435	198	198	140	150
25	F			215	215	430	465	198	198	140	140
28	F	224	232	215	215	430	465	198	198	140	140
3	F	224	232	215	215	430	465	198	198	140	140
32	F	206	232	215	251	430	435	198	198	140	150
34	F			215	215	430	465	198	198	140	140
4	F	224	232	215	215	430	465	198	198		
8	F	224	232	215	215	465	470	197	198	140	140
9	F	206	232	215	215	430	435	198	198	140	140
10	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	150
11	M	224	232	215	215	465	470	197	198	138	150
13	M	224	232	215	215	465	470	197	198	138	140
14	M	224	232	215	215	465	470	197	198	138	140
15	M	224	232	215	215	430	465	197	198	138	140
16	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	150
17	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	150
18	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	150
2	M			251	251	430	465	197	198	138	140
20	M	206	232	251	251	430	465	197	198	138	150
21	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	150
27	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	140
35	M	206	232	251	251	435	470	197	198	138	150
7	M	206	232	251	251	430	465	197	198	140	150
19	F	214	224	213	243	430	470	196	198	142	146
22	F	224	224	243	251	445	479	196	197	144	146
26	F			213	243	435	479	196	198	142	146
29	F	224	224	243	251	445	479	196	197	144	146
31	F	214	224	213	243	435	479	196	198	142	146
33	F	224	224	243	255	445	479	196	197	142	144
30	M	206	208	243	251	435	460	198	198	150	150
5	M			215	255	445	465	196	197	144	144
6	M	224	232	215	255			196	197	142	142
Potential parents		232/232	206/224	215/251	215/251	430/470	435/465	197/198	198/198	138/140	140/150

באופן דומה אופיינו 247 דגי בורי מקבוצות הטיפול המזכר. אותרו 65 אחים מלאים לאלו מקבוצת הביקורת מהם 41 זוהו כבעלי גנוטיפ נקבי (טבלה 4). פרטים אלו מהווים עתודה של זכרים פנוטיפיים (נקבות XX הפוכות זוויג), לצורך הכלאה עם נקבות נורמליות לקבלת אוכלוסיות כל-נקביות.

טבלה 4. קביעת גנוטיפ באתר לקביעת זוויג על פי סמנים בקבוצת הטיפול המזכר

Tank #	Total	Family	%	XX	XY
S1	40	8	20	3	5
S2	67	19	28	10	9
S4	80	24	30	19	5
S5	60	14	23	7	7

4. סכום עקרי הממצאים עד כה

- ✓ הרבייה בדגי בורי הינה קבוצתית כאשר יותר מפרט אחד מכל זוויג תורם חומר גנטי לצאצאים של הטלה בודדת. בקבוצת הדגיגים הנבדקת תרומת האבות הייתה דומה (0.54: 0.46). לפיכך, אין להניח שקיימת דומיננטיות רבייתית של אחד משני הזכרים. בכלל הצאצאים במדגם נמצאו כ-50% נקבות, כ-40% זכרים וכ-10% בעלי זוויג לא ידוע. ממצאים אלה מצביעים על יחס מאוזן בין זכרים ונקבות בדג הבורי.
- ✓ הטיפול ההורמונאלי (10 מ"ג MT למשך 4 חודשים רצופים) נמצא יעיל להשריית 100% זיכור בדגיג בורי בני 6 ו-7 חודשים ומסתמן כי לא גרם לעכוּבי גדילה בהשוואה לקבוצת הביקורת. עם זאת, משך טיפול קצר יותר (2-3 חודשים) הוביל לזיכור חלקי בלבד (80 ו-90%, בהתאמה). עושה רושם, כי טיפול ה MT הינו יעיל גם כאשר נתן לדגים בגיל 14 חודשים.
- ✓ פותחה שיטה יעילה (CASA) לבחינת השפעת הטיפול המזכר על איכות הזרע, שתסייע לנו לבחור באופן אובייקטיבי את הזכרים הפנוטיפים בעלי הסכוי הטוב ביותר להוביל להטלות פוריות, בשלב ניסויי ההכלאות לקבלת אוכלוסיות כל-נקביות.
- ✓ לא נצפתה בגירה מינית בדגים בגיל 3 בקירוב.
- ✓ ב"ריצוף עמוק" התקבלה כמות מידע המהווה כיסוי של כ-43 יחידות גנום של דג הבורי, הגבוה פי 32-35 בהשוואה לממצאים בדג הדקר. בהרכבת הגנום של דג הבורי הפיגום הגנומי הארוך ביותר התקבל באורך של כ-33 אלף בסיסים, בלבד, לעומת 960 אלף בסיסים בדג הדקר. נתן להניח כי גנום הבורי, בדומה ל- Cyprinids ו-Salmonids, מכיל רמת טטראפלואידיות (ancestral tetraploidy) גבוהה יותר מאשר הדקר.
- ✓ הצלחת פיתוח סמנים פולימורפים נמצאה נמוכה בדג הבורי (71%) בהשוואה לדקר (90%). בבדיקת סמנים רבים שנכשלו במיפוי נמצאו שני תוצרי דנ"א בכל אחד מהפרטים של משפחת המיפוי. גם במקרה זה נתן ליחס את התוצאה לרמת טטראפלואידיות גבוהה יותר בדג הבורי.
- ✓ פותחו 245 סמנים, מהם 156 התפצלו במשפחת מיפוי המונה 48 צאצאים. הורכבה מפה גנטית לדג הבורי באורך של 1200 יחידות מיפוי (cM) הכוללת 24 קבוצות תאחיזה בהתאמה למספר הכרומוזומים. סמן יחיד בקבוצת תאחיזה מספר 9 נמצא אחוז לאתר קביעת מין. באמצעות מיפוי השוואתי לגנום האמנון והאדם נמצאו 70 גנים באתר לקביעת מין, מהם 5 מעורבים בתהליך קביעת המין.
- ✓ נערך ריצוף עמוק ל- DNA של זכר ושל נקבה, שהינם אחים למשפחת המיפוי. השוואת הרצף ביניהם באתר לקביעת מין סייע למקד את המחקר לגנים הרלבנטיים לקביעת מין.
- ✓ מתוך 35 הפרטים בקבוצת הבקרה ניתן להבחין ב 9 פרטים אשר לא שייכים לזוג הורים עיקרי.
- ✓ בסמן fhm421 לא נמצא אלל או גנוטיפ המבחין בין זכר לנקבה.
- ✓ סמנים fhm558 ו-fhm560 מראים חלוקה יפה לגנוטיפים זכריים ונקביים וגובלים אזור לקביעת זוויג.

✓ בקרב אוכלוסיית הדגים שנחשפו לטיפול המזכר, זוהו 41 פרטים בעלי גנוטיפ נקבי. פרטים אלו מהווים עתודה של זכרים פנוטיפים (נקבות XX הפוכות זוויג), וישמשו במחקר המשך, לצורך הכלאה עם נקבות נורמליות לקבלת אוכלוסיות כל-נקביות.

לסכום, פתוח הסמנים הגנטיים לזוויג והשרייה יעילה של פנוטיפ זכרי בדגי בורי, בעקבות חשיפה לאנדרוגנים, מהווים בסיס לבצוע מערך הכלאות ליצירת קו גנטי כל-נקבי. תוצרי מחקר זה צפויים להוסיף ולבסס כלים ומסד נתונים, שיישומם יוביל ליעול ממשק גידול דג הבורי בחוות בארץ, יקנה יתרון לחקלאי הישראלי מול גורמים מתחרים בעולם ויתרום לגיוון סל המוצרים מדג זה, הן לשוק המקומי והן ליצוא.

5. רשימת ספרות מצוטטת

- Aizen, J., **Meiri, I.**, Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., **Rosenfeld, H.** 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. Gen. Comp. Endocrinol. 142: 212-221.
- Dor, L., Shirak, A., Rosenfeld, H., Meiri, I., Band, M.R., Korol, A., Yefim, R., Seroussi, E., Ron, M.**, 2016. Mapping of the sex determination region of Flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). Anim. Genet. 47(6):698-707.
- Dor L., Shirak A., Gorshkov S., Ron M., and Hulata G.** 2014a Development of genetic markers for the white grouper (*Epinephelus aeneus*). Aquaculture 420–421 (Suppl 1): S104–S110
- Dor L., Shirak, A. Gorshkov S., Band M.R., Korol AB, Ronin Y., Curzon A., Hulata G., Seroussi E., and Ron M.** 2014b Construction of a microsatellites-based linkage map for the white grouper (*Epinephelus aeneus*). Genes Genomes Genetics 5; 4(8): 1455-64. Eshel, O., **Shirak, A.**, Weller, J. I., Hulata, G., **Ron, M.** 2012. Linkage and physical mapping of sex region on LG23 of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). G3 (Bethesda), 2: 35-42.
- Eshel O., **A. Shirak, L. Dor, M. Band, T. Zak, M. Gordon, V. Caspi, E. Feldmesser, J.I. Weller, E. Seroussi, G. Hulata and M. Ron** 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-.
- Shirak, A., Palti, Y., Bern, O., Kocher, T., Gootwine, E., Seroussi, E., Hulata, G., Ron, M.** Avtalion, R. R. 2013. A deleterious effect associated with UNH159 is attenuated in twin embryos of an inbred line of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). J. Fish Biol. 82: 42–53
- Shirak, A., Bendersky, A., Hulata, G., Ron, M., Avtalion, R. R.** 2006. Altered Self-Erythrocyte Recognition and Destruction in an Inbred Line of Tilapia (*Oreochromis aureus*). J. Immunol. 176: 390-394.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
לפרויקט 2 מטרות על: 1. בניית תשתית גנומית לדג בורי לאיתור אזורים וגנים המקודדים לתכונות חשובות לגידול חקלאי ובכלל זה סמנים לזהוי זוויג. 2. ביסוס קבוצת נקבות הפכות זוויג (זכרים פנוטיפים) כאמצעי לפיתוח קווי אוכלוסיות כל-נקביות
עיקרי התוצאות.
בתקופת המחקר הושגו היעדים הבאים: (1) שיפור המבחן לקביעת הורות, (2) מעקב אחר דפוס רביית הבורי בתנאי שבי, (3) בוססה משפחת מיפוי הכוללת 48 פרטים, (4) ריצוף עמוק של דנ"א של זכר ונקבה ממשפחת המיפוי, (5) פיתוח ראשוני של סמנים גנטיים בדג הבורי, (6) הורכה מפה גנטית באורך של 1200 יחידות מיפוי (cM) הכוללת 24 קבוצות תאחיזה בהתאמה למספר הכרומוזומים (8) זוהו סמנים גנטיים יעילים לקביעת זויג בתוך המשפחה (9) בוסס ממשק טיפולים הורמונאליים יעיל להשריית זיכור בדגי בורי, (10) פותחה שיטה אמינה (CASA) לאפיון איכות זרע דג הבורי של בורי, (11) אותרה עתודה של זכרים פנוטיפים פוטנציאליים לבסוס קו גנטי של דגי בורי כל נקביים.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
הושגה התקדמות משמעותית בכל יעדי המחקר שהוצבו. בעקבות פתוח הסמנים הגנטיים ובנית מפת התאחיזה זוהו 5 סמנים בתאחיזה לאתר קביעת מין. לאחר אנליזת תיקוף, נמצא כי לאחר 2 סמנים, מאפשרים לזהות זוויג במשפחות המיפוי. במקביל הטיפולים ההורמונאליים הובילו לזיכור מלא של דגי בורים, מחד, אך לא גרמו לעיכוב גדילה, מאידך. זאת בנוסף לשיטת ה CASA שפותחה, שפותחה, יאפשרו לנו בהמשך לבחור את הזכרים הפנוטיפים בעלי פוטנציאל ההפריה הטוב ביותר למקסום ההצלחת ההכלאות לקבלת אוכלוסיות כל נקביות.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה;
בתום הפרויקט: (1) הדגים שעברו טיפול זיכור לא השלימו בגירה מינית. (2) לא זוהה סמן אוניברסלי לקביעת זויג.
הוגשה בקשה למחקר המשך ואנו מקווים כי יתאפשר לנו להוסיף ולקדם פיתוח של קו כל-נקבי של דג בורי מנוטר גנטית, ולבסס תשתית ידע לטיפול הקו לשיפור פוריות וייצור מוגבר של שחלות. תוצרי הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
Dor, L., Shirak, A., Rosenfeld, H., Meiri, I., Band, M.R., Korol, A., Yefim, R., Seroussi, E., Ron, M., 2016. Mapping of the sex determination region of Flathead grey mullet (<i>Mugil cephalus</i>). Anim. Genet. 47(6):698-707.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
← חסוי - לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר
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 שניה במחקר שאושר לשלוש שנים