

מופ ערבה תיכונה וצפונית/דו"ח שנתי סופי :

מספר מחקר : 93-04-0002

שם התוכנית : יצירת אוכלוסייה כל-זכרית בדגי גופי

חוקר ראשי : ד"ר יאיר כהן

חוקר משנה : ד"ר אנדרי שיראק, ליאור דור

סטטוס התכנית : סופית

מועד התחלה וסיום התוכנית : 2017-2019

תקציר

יצור אוכלוסיות זכריות של גופי, שנחשב לדג נוי הכי פופולארי, הוא נושא בעל חשיבות רבה בקרב הרבה מגדלי דגים למטרה זו בגלל שהערך של הזכרים באוכלוסיה מגיע ליותר מ- 30% בהשוואה לנקבות בגלל הצבעים שלהם. מחקר זה ביסס פרוטוקול גידולי לקווים שונים של גופי לייצור גנוטיפים של XY המופיעים כנקבות על ידי שימוש בהורמון ביטא-אסטרדיול. בנוסף, על מנת לעשות זיהוי מוקדם לנקבות XY בקרב הצאצאים ולהתקדם לביסוס אוכלוסיות זכריות, פיתחנו סמן מוליקולארי שנבדק על שני קווי גופי. באמצעות סמן זה ניתן לקבוע את מין הצאצאים בדרך מהירה ויעילה, דבר הנחוץ לייצור אוכלוסיה זכרית. התקבלו תוצאות הקדמיות לטיפול נקבות XY עם זכרים רגילים על מנת לקבל צאצאים שהם YY. שלב אחרון זה נמצא עדיין בשלב המחקר וניסויים מתבצעים להשלמתו.

רקע, תיאור הבעיה ומטרות המחקר

עלויות היצור והשינוע בענף גידול דגי הנוי בערבה הן גבוהות וכדי שהמגדלים יוכלו להתחרות עם השווקים האחרים (בעיקר במזרח אסיה) יש צורך בפיתוח מוצר יעיל. הגופי (*Poecilia reticulata*) הוא אחד המינים הפופולריים ביותר בעולם ואחד המינים העיקריים המיוצרים בערבה לצורכי יצוא. מין זה הוא משריץ חיים, צאצאיו גדולים ובעלי קצב גדילה מהיר יחסית וניתן לריבוי לאורך כל השנה. בנוסף, הגופי הוא דג נוי אידאלי עם הבדלים מורפולוגיים ברורים בין הזכרים והנקבות כאשר הזכרים הם צבעוניים ביותר ובעלי סנפירי זנב וגב גדולים וארוכים ובעלי ערך שוק גבוה בכ-30% מזה של הנקבות.



איור 1: זכר מקו Red Blonde

הצורך במיון לזכרים ונקבות דורש טשטוש של הדגים, והתהליך כולו כרוך ביצירת עקה לדג אשר יכולה לגרום לתחלואה ואף למוות וכן כרוכה בעלויות רבות. לכן בעבר נעשו ניסיונות ליצור אוכלוסיות כל-זכריות באמצעות טיפולים הורמונאליים עם שיעורי הצלחה שונים. מנגנון הרבייה של הדג הוא XY וקיים הבדל מורפולוגי בין כרומוזומי המין אשר תועד ציטולוגית (Nanada et al., 2014). הרכבת גנום של נקבת גופי קיימת במאגר ה-NCBI וכוללת 23 קבוצות תאחיזה. מחקר קודם העריך כי אזור קביעת הזוויג בגופי נמצא באזור הטרמינאלי של קבוצת התאחיזה 12 (Tripathi et al., 2009) ממצא זה מהווה בסיס לאיתור הגן לקביעת מין, וכשלב ביניים, לפיתוח סמן גנטי אמין האחוז אליו. בהמשך, טיפול באסטרדיול עם הכלאות נבחרות ליצור נקבות בעלות גנוטיפ YY, בגן לקביעת זוויג, אשר יוכלאו עם זכרים YY יניב אוכלוסיות כל-זכריות גנטיות, ללא צורך במיון.

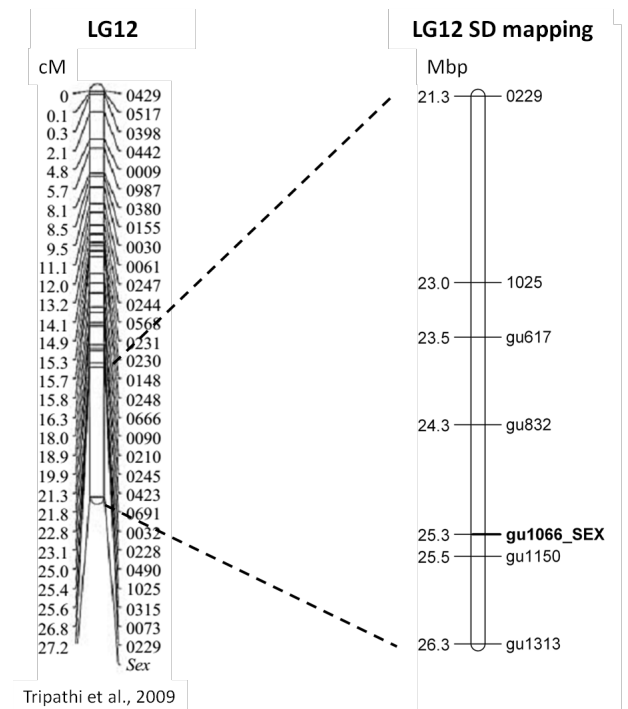
מטרות המחקר

- א. איתור הגן לקביעת מין, וכשלב ביניים, פיתוח סמן גנטי אמין האחוז אליו.
- ב. יצור אוכלוסיות כל-זכריות גנטיות מסוג YY.

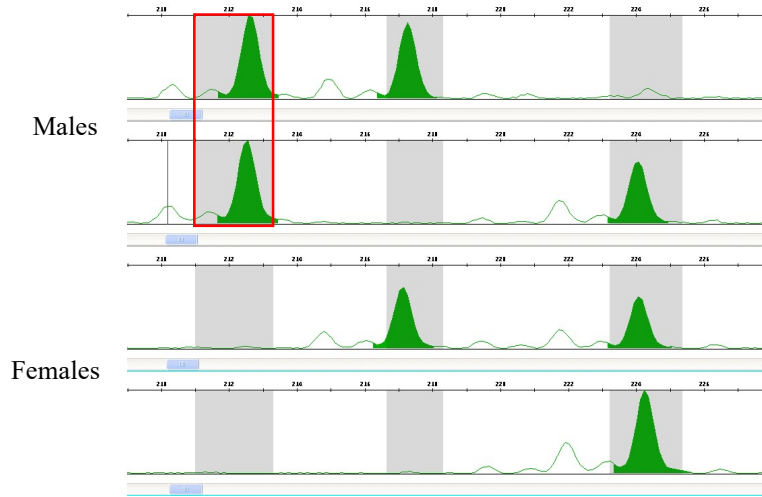
מהלך המחקר ושיטות העבודה

- כל ניסויי הרבייה וכן פיתוח הפרוטוקול להיפוך זוויג הורמונלי מתבצעים במחלקת חקלאות מים במו"פ ערבה.
- א. יצור משפחות ואוכלוסיות – נלקחו דגימות סנפיר והופק DNA מ-5 משפחות אחאים במו"פ ערבה, מ-3 משפחות שהתקבלו ממגדלי דגי נוי בערבה ומאוכלוסיות דגים נוספות מהקווים Flame ו-Red blonde. 10 זכרים ונקבות בוגרים מקו Blue התקבלו לבדיקה ראשונית.
 - ב. איתור סמנים גנטיים בתאחיזה לגן לקביעת זוויג - בוצעה הורדה של 5 מיליון הבסיסים הקיצוניים בקבוצת התאחיזה 12 לצורך פיתוח 7 סמנים מיקרוסטליטים מסוג AC\TG (איור 2). סמנים אלו נבחנו באוכלוסיות ובמשפחות ובוצעה אנליזה של הגנוטיפים בהשוואה למין.
 - ג. יצור אוכלוסיות כל-זכריות גנטיות - המשך הכלאות בין זכר יחיד לנקבה. לאחר ההפריה הנקבות מואכלות במזון המכיל הורמונים על מנת להפוך את זוויג הצאצאים הזכרים לנקבות וכך לקבל נקבות XY. בוצעה חזרה שלישית לכל אחד משלושת הטיפולים (מינונים שונים של הורמונים). לאחר ההשרצה הצאצאים גודלו לשלב בוגר והופעת סימני המין המשניים הראתה כי כל הצאצאים אכן התפתחו פנוטיפית כנקבות. בוצעה אנליזה היסטולוגית של

הגונדות. לאחר הפקת DNA מהצאצאים נעשה שימוש בסמן המבדיל שפותח (gu1066) על מנת לזהות את הצאצאים בעלי הגנוטיפ הזכרי (איור 3). נקבות הפוכות הזוויג הוכלאו עם זכרים רגילים על מנת לקבל בין היתר צאצאים זכרים בעלי גנוטיפ YY (איור 4). אוכלוסייה כל-זכרית תתבסס על פרטים כאלו מסוג YY. לאחר שנקבעה יעילותו של הסמן gu1066 הפלורסנטי לזיהוי גנוטיפ המין הוחלט להמשיך ולהשתמש בו כדי לבדוק גנוטיפים של פרטים נוספים מ-3 קבוצות צאצאים (חצאי אחים) שהפכו לנקבות לאחר טיפול הורמונלי ונבדקה סטייה מהיחס הצפוי של 1:1 בין שני הגנוטיפים XX:XY. נקבות F2 בעלות גנוטיפ XY אוחדו עם זכרים טבעיים ליצירת הדור הבא.

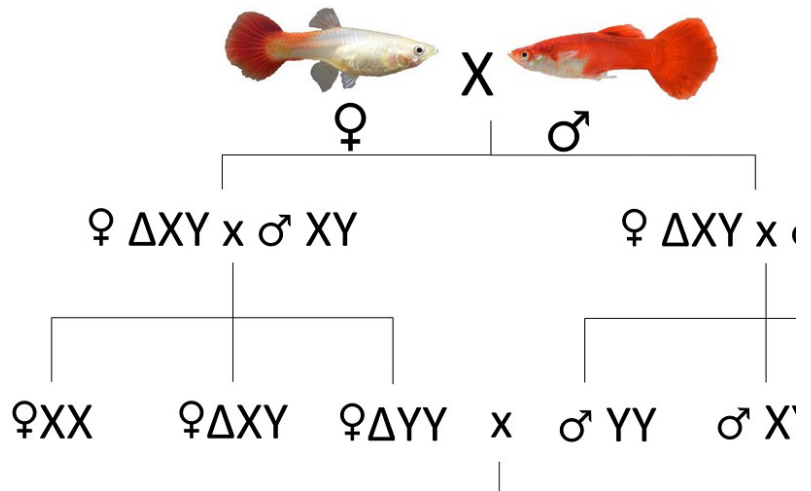


איור 2. מיפוי האזור הגנומי הקובע את המין בגופי בקבוצת תאחיזה 12



איור 3. תצוגת גנוטיפים בסמן גנטי gu1066 האחוז לגן לקביעת המין

ΔXY – נקבות הפוכות מין (גנוטיפ זכרי)



איור 4. יצור אוכלוסיות כל-זכריות

הניסוי מתבצע במערך האקווריומים הניסויי במו"פ ערבה :
 16 נקבות בהריון מתקדם מוקמו בשורת האקווריומים העליונה.
 אחרי השרצה ראשונה נתחיל במתן מזון עם הורמונים $400 \mu\text{g}$ אסטרדיול /g מזון.
 שהוכן ע"פ הפרוטוקול. לאחר השרצה הצאצאים יעברו לאקווריום שמתחת לנקבה.
 טיפולים:

1. ביקורת – ללא הורמונים. ישמרו צאצאים מהשרצה שנייה.
 2. צאצאים מקבלים הורמונים 5 ימים לאחר ההשרצה ללא מתן הורמונים לנקבה.
 3. נקבות מקבלות הורמונים לאחר השרצה – צאצאים של השרצה שנייה מקבלים הורמונים לאחר 5 ימים.
 4. נקבות מקבלות הורמונים 14 יום לאחר השרצה ראשונה. צאצאים של השרצה שנייה מתחילים לקבל הורמונים לאחר 5 ימים.
- צאצאים יקבלו מזון בתוספת מוינה או ארטמיה – שבועיים ראשונים שתי ארוחות מזון חי ואחת הורמונים. ואח"כ ארוחה אחת מזון חי ושתי ארוחות הורמונים עד גיל חודשיים.
- ברגע שניתן – לקיחת זנבות לדגימה.
- רבייה – באקווריום עם תאי השרצה. מעקב מידי יום.

תוצאות

הסמן gu1066, הממוקם 25.3 מיליון בסיסים מתחילת קבוצת תאחיזה 12 (איור 2), נמצא באסוציאציה מלאה למין באוכלוסיות, וכמעט מלאה במשפחות (איור 3). סמן זה נמצא יעיל בזיהוי המין בקווים הגנטיים Red Blonde ו- Flame אך לא בקו Blue. נמצא שוני בהתפלגות גנוטיפ XX לעומת XY בשלוש הקבוצות של צאצאים (טבלה 1), אך הסטייה מהיחס הצפוי של 1:1 לא נמצאה מובהקת במבחן כי בריבוע באף אחת מהקבוצות או בכלל המדגם.

טבלה 1. מבחן כי בריבוע¹ להתפלגות צאצאים בעלי גנוטיפ XX ו-XY באוכלוסייה כל-נקבית

Group #	XY (n)	XX (n)	XY freq.	p-value ¹
1	7	8	0.47	0.37
2	6	10	0.37	0.57
3	7	11	0.39	0.55
Total	20	29	0.66	0.65

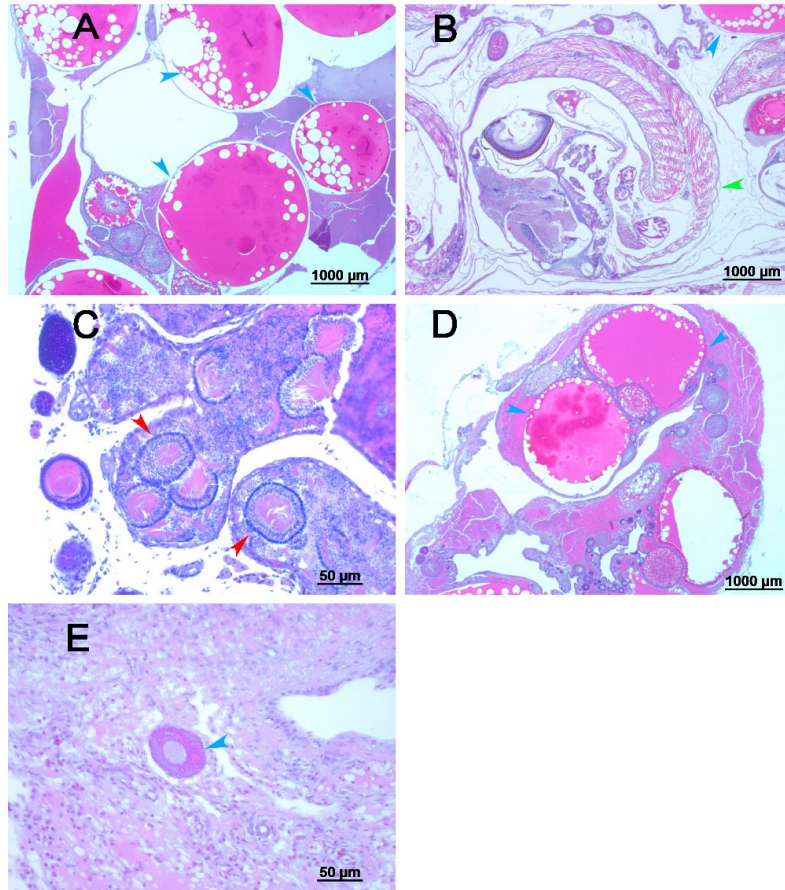
נקבות בעלות גנוטיפ XY אוחדו עם זכרים טבעיים והתקבלו ארבעה צאצאים (F₃) במשפחה אחת אשר נבחנו באמצעות הסמן הפלורסנטי.

המשפחה כללה שלושה צאצאים בעלי גנוטיפ XY לעומת צאצא אחד עם גנוטיפ XX. לא התקבלו פרטים עם גנוטיפ מסוג YY.

אנליזה הסטולוגית של גונדות מופיעה באיור 5 ומאשרת את מצב הגונדות. מבין הנקבות שקיבלו טיפול הורמונלי, ל-19% היו שחלות מפותחות בהשוואה ל-64% בקבוצת הביקורת של נקבות (יחס מובהק במבחן כי בריבוע).

איור 5: אנליזה היסטולוגית של עוברי גופי בגיל 10-14 חודש ¹
A ¹ . XX, נקבה, רקמת שחלה נורמאלית; B. XX, נקבה עם עובר; C. XY, זכר, רקמת אשך נורמאלית; D.

ΔXY , נקבה, רקמת שחלה נורמאלית; E. ΔXY , שיעור גבוה של רקמה לא ממויינת; XX ו-XY נקבעו באמצעות סמן



גנטי gu1066; הזויג נקבע על ידי הפנוטיפ; Δ טיפול בהורמון אסטרדיול; חיצים בכחול – זקיקים בשלבי התפתחות שונים; ; חיצים באדום – צינוריות זרע; חיצים בירוק – עובר. סרגל גודל מוצג בצד הימני בתחתית כל תמונה (ביחידות מיקרומטר).

לאור התוצאות הנ"ל בקו Blue והתוצאות הניסוי הקודם התחלנו ניסוי נוסף במו"פ ערבה בסוף 2019 עם דגים מקו Red Blonde. בדיקות שערכנו בקו זה הראו התאמה עם המרקרים הגנטיים שפותחו לזיהוי הזויג. ניסויים הקדמיים שבהם השתמשנו בסמן gu1066 הראו בצורה חד משמעית ש-97 נקבות עם שינוי מין לזכרים מבחינה גנטית. נקבות אלה שימשו לביצוע הכלאות עם זכרים רגילים. אולם, רק 19% הראו שחלות בוגרות על ידי שימוש בהיסטולוגיה. רק נקבה אחת עם שינוי מין כזה נתנה ארבעה צאצאים חיים, ששלושה מהם נבדקו ונמצאו XY בעוד הרביעי היה XX. ניסוי חדש עם הקו Red Blonde נמצא כרגע בביצוע על מנת לקבל אחוזי הזדווגות גבוהים של נקבות XY ומספר גדול של צאצאים.

בניסוי שכלל טיפולים הורמונליים שונים לא נמצאה שרידות נמוכה יותר של גנוטיפ XY לעומת XX באוכלוסיית הגופי הכל-נקבית. מבין הנקבות (XY) שקיבלו טיפול הורמונלי, ל- 19% היו שחלות מפותחות בהשוואה ל-64% בקבוצת הביקורת של נקבות.

בניסויים עתידיים יהיה צורך לבחון אם ניתן להגדיל את אחוז נקבות XY באוכלוסייה, ויש להמשיך ולבחון האם נקבות הפוכות הזויג (XY) פעילות רבייתית ומניבות זכרים בעלי גנוטיפ YY מהקו Red Blonde ו-Flame, והפוטנציאל של אסטרטגיה זו לייצור אוכלוסיות זכריות.

בסך הכל נבחנו 15 סמנים גנטיים שונים כאשר אחד מהם שנקרא gu1066 בוסס כסמן אמין לזיהוי מין בקווים הגנטיים Red Blonde ו-Flame, אך לא בקו Blue.

במספר קטן של דוגמאות, האלל הזכרי לא זוהה בכל הזכרים על ידי שימוש בסמן זה, למרות שלא זוהה גם באף נקבה. ניתן שהכישלון בזיהוי כל הזכרים על ידי שימוש בסמן gu1066 נובע מכך שחלק מהאללים אינם פונקציונאליים (Paetkau and Strobeck 1994). סמן גנטי שני שהיה בתאחיזה מובהקת הוא gu832, שזוהה בקו Flame אבל לא בקו Red Blonde.

הסמן מאפשר קביעת גנוטיפ בפרק זמן קצר. בעתיד, יש לפתח סמנים גנטיים נוספים לצורך זיהוי גנטי בקווים אחרים, כמו למשל הקו Blue. פיתוח סמנים כאלה מקווים שונים יקל על מלאכת ייצור אוכלוסיות כל-זכריות לפחות לשני קווים של גופי, וזה יביא לאפשרויות נוספות בייצור המסחרי.

סיכום שאלות מנחות

ההתקדמות במחקר שחלה ממועד כתיבת הדו"ח האחרון (כולל דו"ח חצי שנתי)

כפי שדווח בדו"ח של 2019, פיתוח סמן גנטי לזיהוי נקבות XY לא היה מספיק ספיציפי בניסוי האחרון בו השתמשנו בקו הכחול. כן פותח סמן ספיציפי בהצלחה כדי לזהות נקבות XY בשני הקווים Red Blonde ו-Flame. על כן, התחלנו בניסוי חדש עם הקו Red Blonde. כרגע שלושת הטיפולים ההורמונאליים יושמו בהצלחה, כאשר הדורות הראשון והשני מראים תכונות של נקבות. לאחר הזיהוי הגנטי שלהם על ידי שימוש בסמן gu1066 לזיהוי נקבות XY שיזווגו עם זכרים על מנת ליצור זכרים שהם YY.

פעילויות שנעשו במו"פ במהלך תקופה (סיורים, ביקורים, הרצאות, כינוסים, פיתוחים חדשים וכו')

נעשו מפגשים שנתיים במחלקה למחקר בחקלאות ימית במו"פ על מנת לעדכן את החקלאים המקומיים בהתקדמות המחקר, כולל ההתקדמות בייצור אוכלוסיות גופי כל-זכריות. נעשו דיונים עם החקלאים במפגשים הללו, כאשר נעשו כל הזמן גם דיונים לא פורמאליים עם החקלאים בצורה מתמדת. בנוסף, קיים שיתוף פעולה הדוק עם שלוש חוות לגידול דגים בערבה: החווה של מנור, של גינת ושל שגב. קווים שונים של גופי המגודלים בחוות אלה סופקו על מנת לבצע ניסויים במסגרת המחקרים שלנו.

פרסומים

פורסם מאמר מסכם שכולל את מירב התוצאות על איתור סמן גנטי לקביעת מין :

Dor L., Shirak A., Kohn Y., Gur T., Weller J.I., Zilberg D., Seroussi E. and M. Ron (2019) Mapping of the sex determining region on linkage group 12 of Guppy (*Poecilia reticulata*). *Genes/ Genomes/ Genetics* 9: 3867-3875.

המלצות להמשך המחקר או שינוי במחקר

הניסוי הנוכחי יראה לראשונה אם נקבות XY יכולות להתרבות עם זכרים לייצור גנוטיפים של YY בלבד. להצלחה במחקר זה תהיה השלכה ישירה על רווחיות מגדלי הגופי בערבה ובכלל. ייצור של זכרים בלבד יאפשר חסכון בכוח עבודה הדרוש למיון האינטנסיבי של הדגים ובעיקר יעלה את רווחיות החווה בגלל מחירם הגבוה יותר של הזכרים.

בהמשך, השוואה גנומית של זכרי YY מול נקבות XX יכולה לסייע בזיהוי ההבדלים הגנומיים בין שני המינים וכן באיתור סמנים מבדילים נוספים ואף גן/ים קובעי מין. בנוסף, הרכבת הרצף הגנומי של כרומוזום ה-Y בגופי ניתנת לביצוע על ידי מיון כרומוזומים להעשרה וריצוף כרומוזום Y, ואנליזה חישובית (Tomaszkiewicz et al., 2016).

ביבליוגרפיה

Dor L., Shirak A., Kohn Y., Gur T., Weller J.I., Zilberg D., Seroussi E. and M. Ron (2019) Mapping of the sex determining region on linkage group 12 of Guppy (*Poecilia reticulata*). *Genes/ Genomes/ Genetics* 9: 3867-3875.

Nanda, I., S. Schories, N. Tripathi, C. Dreyer, T. Haaf et al., (2014) Sex chromosome polymorphism in guppies. *Chromosoma* 123: 373–383.

Paetkau, D., and C. Strobeck, (1994) Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.* 3: 489–495.

Tomaszkiewicz, M., S. Rangavittal, M. Cechova, R. C. Sanchez, H. W. Fescemyer *et al.*, (2016) A time- and cost-effective strategy to sequence mammalian Y chromosomes: An application to the de novo assembly of gorilla Y. *Genome Res.* 26: 530–540.