

יצירת אוכלוסייה כל-זכרית בדגי גופי

יאיר כהן, זיגי פנו-ווינטרס - מו"פ ערבה תיכונה וצפונית תמר
אנדרי שיראק, ליאור דור - המכון לחקר בעלי חיים, מינהל המחקר החקלאי בית דגן
כתובת להתכתבות: siggiwinters@gmail.com

תקציר

יצור אוכלוסיות זכריות של גופי (*Poecilia reticulata*), שנחשב לדג נוי הכי פופולארי, הוא נושא בעל חשיבות רבה בקרב הרבה מגדלי דגים למטרה זו בגלל שהערך של הזכרים באוכלוסייה מגיע ליותר מ-30% בהשוואה לנקבות בגלל הצבעים שלהם. עבודה זו שנערכה בתחנת יאיר מו"פ ערבה בשנת 2019 ביססה 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, פותח סמן מולקולרי שנבדק על שני קווי גופי. באמצעות סמן זה ניתן לקבוע את מין הצאצאים בדרך מהירה ויעילה, דבר הנחוץ לייצור אוכלוסייה זכרית. התקבלו תוצאות הקדמיות לטיפוח נקבות XY עם זכרים רגילים על מנת לקבל צאצאים שהם YY. שלב אחרון זה נמצא עדיין בשלב המחקר וניסויים מתבצעים להשלמתו.

מבוא

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 זווית, 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.

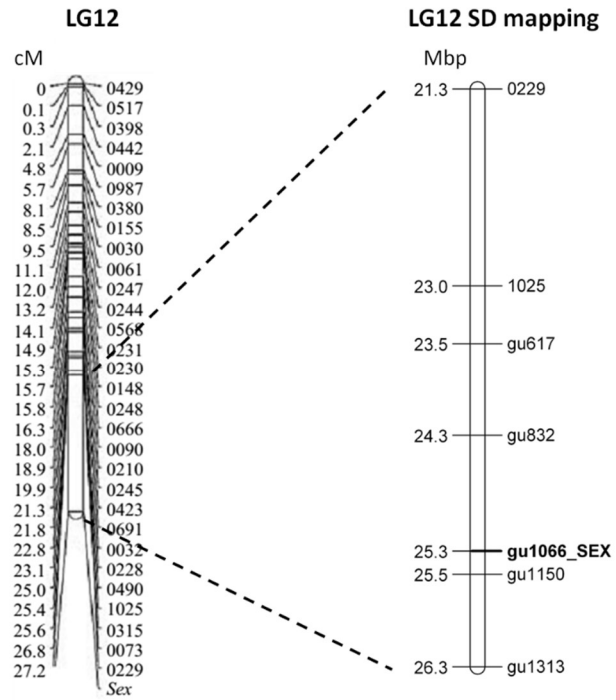
שיטות וחומרים

כל ניסויי הרבייה וכן פיתוח הפרוטוקול להיפוך זווית הורמונלי התבצעו בשנת 2019 במחלקת חקלאות מים בתחנת יאיר, מו"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.

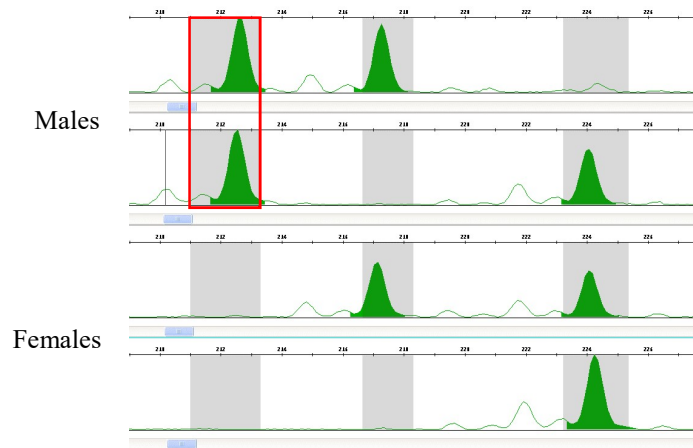
ב. איתור סמנים גנטיים בתאחיזה לגן לקביעת זווית - בוצעה הורדה של 5 מיליון הבסיסים הקיצוניים בקבוצת התאחיזה 12 לצורך פיתוח 7 סמנים מיקרוסטיליטים מסוג AC\TG (איור 2). סמנים אלו נבחנו באוכלוסיות ובמשפחות ובוצעה אנליזה של הגנוטיפים בהשוואה למין.

ג. יצור אוכלוסיות כל-זכריות גנטיות - המשך הכלאות בין זכר יחיד לנקבה. לאחר ההפריה הנקבות מואכלות במזון המכיל הורמונים על מנת להפוך את זווית 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 הזווית 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.

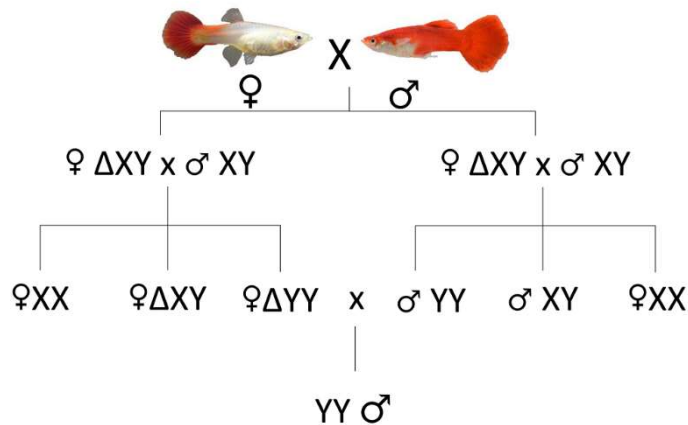


Tripathi et al., 2009

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



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



איור 4: יצור אוכלוסיות כל-זכריות: ΔXY – נקבות הפוכות מין (גנוטיפ זכרי)

הניסוי התבצע במערך האקווריומים הניסויי בתחנת יאיר מו"פ ערבה: 16 נקבות בהריון מתקדם מוקמו בשורת האקווריומים העליונה. אחרי השרצה ראשונה הוחל במתן מזון עם הורמונים $400 \mu\text{g}$ אסטרדיול g מזון. שהוכן ע"פ הפרוטוקול. לאחר השרצה הצאצאים הועברו לאקווריום שמתחת לנקבה. טיפולים:

1. ביקורת – ללא הורמונים. ישמרו צאצאים מהשרצה שנייה.
 2. צאצאים מקבלים הורמונים 5 ימים לאחר השרצה 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.

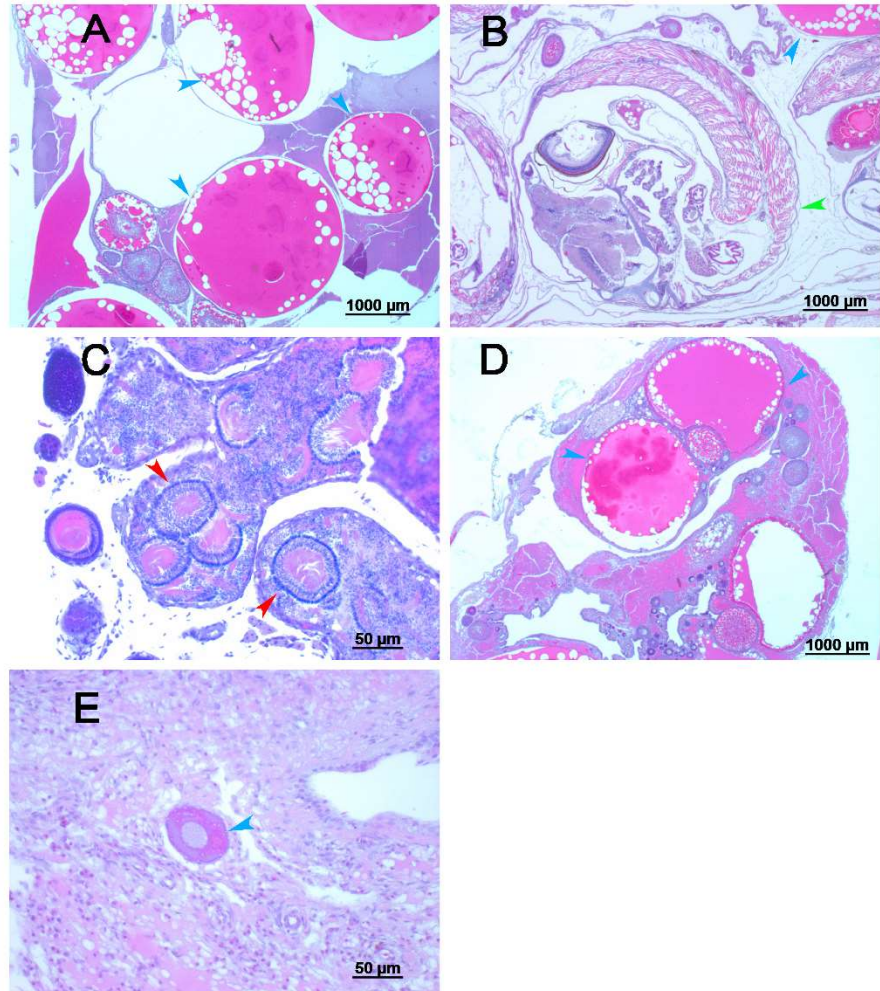
תוצאות

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

p-value ¹	X Y fr eq .	X X (n)	X Y (n)	Gro up #
0.37	0.47	8	7	1
0.57	0.37	10	6	2
0.55	0.39	11	7	3
0.65	0.66	29	20	Tot al

נקבות בעלות גנוטיפ XY אוחדו עם זכרים טבעיים והתקבלו ארבעה צאצאים (F_3) 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 4 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 4 : אנליזה היסטולוגית של עוברי גופי בגיל 10-14 חודש¹

A¹. 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 ממוינת; 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, שלושה 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.

דיון

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 הפכות 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. יתכן שהכישלון בזיהוי כל הזכרים על ידי שימוש בסמן gu1066 נובע מכך שחלק מהאללים אינם פונקציונליים (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.

בהמשך, השוואה גנומית של זכרי YY מול נקבות XX תוכל לסייע בזיהוי ההבדלים הגנומיים בין שני המינים וכן באיתור סמנים מבדילים נוספים ואף גנים 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).

הבעת תודה

תודה לקרן המדען משרד החקלאות על מימון תוכנית מחקר 93-04-0002. תודתינו נתונה לקק"ל על תמיכתה במערך הניסויים של מו"פ ערבה.

מקורות

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.

Tripathi, N., Hoffmann, M., Weigel, D., Dreyer C. (2009) Linkage Analysis Reveals the Independent Origin of Poeciliid Sex Chromosomes and a Case of Atypical Sex Inheritance in the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Genetics*

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.