

ייצור זכרים YY בקו אמנון מטופח "צ'טרלדה":

בדיקת היתכנות לייצור אמנון כל זכרי מקו מטופח עבור המדגה הישראלי

עיינה בנט, טטיאנה זק – תחנת מחקר לחקלאות מים, דור, אגף הדיג משרד החקלאות

אבשלום הורביץ – מדגה דן

אנדרי שיראק, אייל סרוסי – המעבדה לגנטיקה מולקולרית וכמותית, מכון וולקני

תקציר: ייצור אמנונים כל זכריים ללא שימוש בהיפוך זוויג הורמונלי יכול להוות יתרון שיווקי ממשקי וכלכלי. המחקר הנוכחי נועד לתגבר את הבסיס הטכנולוגי שיאפשר לעשות זאת בהיקף מסחרי, זאת ע"י הכנת גרעיני רבייה של זכרי אמנון צ'טרלדה בעלי גנוטיפ YY ופרוטוקול בקרה על ייצור של זכרים אלו. שיטת ייצור כל זכרי זאת תצטרף לשיטת ההכלאה בין המינים אמנון ירדן ואמנון היאור אשר מקנה גם עמידות יחסית לקור אולם עד כה מתאפיינת בפוריות נמוכה יחסית. העבודה תתבצע באמצעות תכנית הכלאות והטלות ייחודיות, סימון אינדיווידואלי של דגים, הפקות DNA וזיהוי גנוטיפים באמצעות הסמן הגנטי HIT, הכנה וניהול של גרעיני רבייה ואימות מדדי פוריות וביצועי גדילה בתנאים סמי מסחריים. הניתוחים הסטטיסטיים בוצעו בעזרת תכנת SPSS. במחצית השנה הראשונה של המחקר נוצרו גרעיני רבייה של זכרים ונקבות בעלי גנוטיפים חשובים. ביניהם גרעין רבייה של כ- 250 זכרי YY, ותשתית לייצור זכרים נוספים כאלו בהמשך. נבדקו חיוניותם וביצועי הגידול של זכרים אלו בתנאים סמי מסחריים וכן הפוריות שלהם בהטלות ספונטניות עם נקבות נורמליות. בנוסף נחשפו כל הגנוטיפים האפשריים בהכלאות השונות בתוך אוכלוסיית צ'טרלדה מיוחדת שברשותנו ונבדקו דוגמאות DNA בשיטת GBS על מנת להבין את המקור הגנטי ל"הפתעות" ביחסי הזוויגים בעתיד. חלק מזכרי ה- YY שימשו לייצור דגי צ'טרלדה, אשר גודלו בנפרד במשך כחצי שנה ונבדקו לבדיקת יחס הזוויגים. שיעור של 80-96% זכרים באוכלוסיית הצאצאים יוחס לשונות הגנטית הנמצאת ב- 4 אתרי DNA רלוונטיים אצל האימהות דווקא. במסגרת המחקר שופר הסמן הגנטי לברירת נקבות אשר יניבו שיעור גבוה (מעל 90%) של זכרים בצאצאי ההכלאה עם זכרי YY וכן עם זכרים מהמין אמנון הירדן.

מבוא ויעדי המחקר: גידול חקלאי יעיל של דגי אמנון מחייב ייצור אוכלוסייה כל-זכרית, המאופיינת באחידות וקצב גידול גבוה (Beardmore et al., 2001). ייצור באמצעות האכלת דגיגים בהורמון סינטטי טומן בחובו חסרונות סביבתיים, תדמיתיים ואף כלכליים ועל כן מזה כעשור מתקיימות בישראל פעילויות מחקר וטיפוח גנטי של מיני אמנונים שמטרתם אספקת אוכלוסיות כל זכריות מבחינה גנטית אשר מבטלות את התלות בהיפוך זוויג הורמונאלי- (Cnaani and Levavi, 2009). פיתוח של קווי אמנון ישראלים שתכונותיהם הגנטיות ותהליך הייצור שלהם מציב אותם כמוצרים איכותיים יותר בהשוואה לאמנונים המיובאים הן מן הפן הבריאותי והן מן הפן הסביבתי, ומקנה להם יתרון שיווקי. בשנה האחרונה נפתחה בפנינו דרך נוספת להשגת ייצור דגיגים כל זכריים, הפעם בתוך קו הצ'טרלדה עצמו: במהלך עבודת ברירה וטיפוח באמצעות סמנים גנטיים גילינו בתוך אוכלוסיית הצ'טרלדה של תחנת דור פרטים בעלי תצורה אלילית חריגה, וכאשר הכלאנו ביניהם התקבלו זכרים עם גנוטיפ כרומוזומלי YY על קבוצת תאחיזה 23 (ללא מניפולציות כרומוזומליות וללא היפוך זוויג).

התחנה עוסקת בימים אלו בהכנת קבוצת זכרים כאלו לצורכי מחקר. זכרים בעלי גנוטיפ כזה מניבים צאצאים זכריים בלבד בהכלאה עם נקבות נורמליות מאותו מין. אם דרך זו תתממש היא תהווה חלופה נוספת לייצור צאצאים כל זכריים ללא שימוש בהורמונים במדגה הישראלי. לייצור דגיגים כל זכריים בהכלאות בין מיניות (נקבה של יאור X זכר של ירדן) יש יתרונות, כגון עמידות לקור ואון כלאיים, והוא כרוך במורכבות של ניהול עדרי הרבייה משני מינים שונים. ייצור דגיגים כל זכריים בהכלאה בתוך קו מטופח כמו הצ'יטרלדה יהיה בעל יתרונות אחרים ודרישות ממשקיות שונות. היכולת לבחור בין שני פתרונות בעלי היתכנות חקלאית ומסחרית תהווה יתרון לענף. במחקר הנוכחי נבדקה ההיתכנות של מימוש חלופת ייצור כל זכרי בתוך אוכלוסיית קו הצ'יטרלדה שנפתחה בפנינו.

תיאור נקודת ההתחלה של המחקר: בעבודות קודמות הראנו שע"י מבחן HIT אפשר לברור מתוך סטוקים "מעורבים" (שעברו היברידיזציה) פרטים עם צירוף אללי כמו במינים טהורים בשלושת האתרים לקביעת זיווג בלבד וע"י שימוש בפרטים אלו כהורים לקבל יחס זיווגי של מעל 99% זכרים בצאצאים. בהשוואת ביצועי הגידול של צאצאי ההכלאות ניתן היה לראות את יתרון הקו הצ'יטרלדה ואת יכולת ההורשה של יתרון זה גם לצאצאי הכלאה בין מינית. תוך שימוש במבחן HIT נוסד בתחנת דור גרעין צ'יטרלדה טהור לזיווג לצורכי רבייה (400 זכרים ו- 500 נקבות) להמשך המחקר. בנייתו הגנטי באמצעות מספר סמנים אשר פותחו לשם כך, התגלו 2 תצורות אלליות חריגות באוכלוסיית הצ'יטרלדה בדור: א. 10% נקבות בסטוק בעלות גנוטיפ זכרי XY, ב. כ-40% זכרים בעלי גנוטיפ נקבי XX. בעקבות ממצאים אלו עלתה האפשרות להגיע לזכרים בעלי גנוטיפ YY על קבוצת תאחיזה 23 ע"י הכלאות XY x XY. הנקבות שנמצאו בעלות פנוטיפ זכרי (XY) הוכלאו עם זכרים רגילים (XY) ומתוך צאצאי הכלאה זו נבררו 2 זכרים בעלי גנוטיפ YY. בסריקה מולקולרית של האוכלוסייה בודדו מספר זכרים נוספים בעלי גנוטיפ נקבי (XX). ההטלות שבוצעו כבסיס למחקר זה מופיעות בטבלה 1.

טבלה 1. הכלאות בין אמנונים בעלי תצורות אלליות שונות על קבוצת תאחיזה 23 בתוך אוכלוסיית צ'יטרלדה "דור", אביב – קיץ 2017. f:m הינו יחס זיווגי בין זכרים לנקבות. יחס צפוי חושב רק מתוך התחשבות באתר על קבוצת תאחיזה 23.

הכלאה	גנוטיפ אב	גנוטיפ אם	מטרה	גודל אוכלוסיית הצאצאים	יחס זיווגים צפוי f:m	יחס זיווגים במדגם מוגבל בפועל (מדגם) f:m
A	XY	XY	זכרים עם גנוטיפ YY	8,000	1:3	1:1.9 (2000) 65% זכרים
B	YY	XY	זכרים גנוטיפ YY, נקבות גנוטיפ XY	800	0:1	1:4.5 (103) 82% זכרים
C	YY	XX	אוכלוסייה כל זכרית	600	0:1	0:1 (101) 100% זכרים

מטרות המחקר:

1. בדיקת ההתאמה של זכרים עם גנוטיפ YY לייצור דגיגים כל זכריים מהקו צ'יטרלדה עבור גידול חקלאי מסחרי בישראל.
2. בדיקת היתכנות של ייצור זכרי YY צ'יטרלדה, כדגי רבייה, בהיקף מסחרי.
3. בדיקת היתכנות של ייצור אוכלוסיית נקבות צ'יטרלדה בעלות גנוטיפ XX בלבד אשר יתאימו לייצור דגיגים כל זכריים בהכלאה בתוך קו זה.
4. זיהוי מרכיב גנטי חדש המאפשר לקבל נקבות XY, פיתוח סמן גנטי לזיהוי ושילובו במבחן HIT.

5. התייעלות של ייצור המוני של זכרים ונקבות XX ו-XY מהיבטים ביצועים וכלכליים.

פירוט תכנית המשימות למחקר זה מופיע בטבלה 2.

טבלה 2: פירוט תכנית המחקר בנושא אוכלוסיית אמנונים כל זכרית מקו צ'יטרלדה.

יעד	משימות	מקום ביצוע
א. ביסוס קבוצות רבייה ייחודיות באמצעות ברירה המבוססת על סמנים גנטיים	1. זכרים YY - ברירה סימון ואיתור	דור
	2. נקבות XY - ברירה סימון ואיתור	דור
	3. נקבות XX בלבד - ייצור ואימות אוכלוסיית זכרים ונקבות XX בלבד	דור
	4. הפקות דנ"א, ביצוע מבחני HIT	מכון וולקני
ב. השוואת ביצועי גדילה ופוריות של זכרים YY ו-XY	1. גידול השוואתי בתנאים זהים	דור
	2. השוואת פוריות בהטלות קבוצתיות	דור
ג. אימות וניתוח יחסי זוויגים באוכלוסיות הצאצאים של זכרים YY עם נקבות XX/XY	1. מבחני צאצאים	דור
	2. הפקות דנ"א, ביצוע מבחני HIT	מכון וולקני
ד. היתכנות של ייצור זכרי YY בקנה מידה מסחרי	1. הטלות בקבוצות גדולות	דור / מדגה דן מבוא חמה
	2. בדיקת התפלגות זוויגים	דור
	3. הפקות דנ"א, ביצוע מבחני HIT	מכון וולקני
ה. זיהוי מרכיב חדש לקביעת זוויג ע"י GBS, עדכון מבחני HIT ושיפור התכנות של ריבוי סטוקים הוריים וייצור כל זכרי	1. הכנות דוגמאות לשיטת GBS	מכון וולקני
	2. אנליזה של תוצאות GBS	מכון וולקני
	3. פיתוח סמן חדש ושילובו במבחן HIT	מכון וולקני
	4. בדיקת יעילות של מבחן HIT	מכון וולקני

תוצאות (מוצגות לפי סעיפי התכנית כפי שהופיעו בהצעת המחקר):

א. ביסוס קבוצות רבייה ייחודיות בהיקף סמי מסחרי, באמצעות ברירה המבוססת על סמנים גנטיים

1. קבוצת זכרים YY: כ- 8000 דגיגים צאצאי הכלאות B+A (ראה טבלה 2). גודלו עד לגודל בו ניתן להפריד בין הזוויגים לפי סימנים חיצוניים. על מנת להאיץ את הגידול הוחלט לבצעו במתקנים מבוקרים. חלק מהדגיגים הועברו לגידול במתקני תחנת גינוסר וחלקם במתקנים המבוקרים בדור. לאחר הגיע הדגיגים לגודל המתאים למיון לפי סימני הזוויג (כ- 50 גרם) הופרדו זכרים מנקבות. כ- 1000 זכרים סומנו בשבבים אלקטרוניים ודוגמאות רקמה מכל אחד מהם הועברו לביצוע מבחן גנטי במעבדה לגנטיקה כמותית לאיתור גנוטיפ YY. על פי 525 תוצאות המבחנים שכבר הושלמו הורכבו 3 קבוצות זכרים: זכרי YY (n=255), זכרי XY (n=240) וזכרי XX (n=30).

2. קבוצת נקבות XY: 844 נקבות שנבררו מתוך צאצאי הטלה B ו-A סומנו בשבבים ודוגמאות רקמה מכל אחת הועברו לביצוע מבחן גנטי לאיתור הגנוטיפ XY בנקבות. על פי תוצאות המבחנים שכבר הושלמו הורכבו 2 קבוצות נקביות: נקבות XY (n=196) ונקבות XX (n=624).

3. בוצעה הכלאה בין זכרים XX לבין נקבות XX. הצאצאים גודלו והופרדו לקבוצה נקבית וקבוצה זכרית. מדגם של 60 הועבר למבחן גנטי על מנת לאמת את גנוטיפ XX. הגנוטיפ אומת.

בסה"כ סומנו 1748 דגים בשבבים, מכל אחד מהם נדגמו רקמות למבחן הגנטי. בוצעו 1344 הפקות DNA ומבחני HIT והושלם תהליך מיון לפי פנוטיפ של 1344 דגים. 404 דגים נוספים סומנו ונדגמו, עבורם יש עדין להשלים את המבחנים והמיון. **בטבלה 3** מסוכמות תוצאות המיון לפי הסמנים הגנטיים של 1344 הדגים שנבדקו. אלו קבוצות הרבייה שעומדות לרשותנו להמשך.

טבלה 3: גרעיני הרבייה שהתקבלו לאחר מיון על פי סמנים גנטיים (HIT).

YY	XY	XX	זוויג תפקודי / גנוטיפ
0	196	624	נקבות
255	239	30	זכרים

דגים אלו התקבלו כאמור מ – 3 הכלאות שונות. על מנת להבין את התפלגות הזוויגים והתפלגות התצורות האליות שניתן לקבל מכל הכלאה נעשה ניתוח נתונים שתוצאותיו מובאות בטבלה 4. תוצאות אלו מלמדות על פוטנציאל הייצור של גרעיני הרבייה הרצויים (נקבות XY, זכרים YY, נקבות XX), וכן על הופעת טיפוסים לא צפויים כגון: עד 28% זכרים בהכלאה XX*XX, עד 21% נקבות בעלות גנוטיפ XY בהכלאה XY*YY. הגורם הגנטי שאחראי לתופעות הללו באוכלוסיית הצ'יטרלדה שלנו התבררו לאחר השלמת ניתוח התוצאות של בדיקות ה- GBS אשר בוצעו בארה"ב (סעיף ו' למטה).

טבלה 4: התפלגות צירופי זוויג/גנוטיפ בצאצאים לפי גנוטיפים של הורים באחוזים. באדום: הופעה בלתי צפויה של זוויגים בעלי תצורה אללית חריגה.

הכלאה								תוצרי הכלאה (% מהצאצאים)
אב	אם	אב	אם	אב	אם	אב	אם	
XY * YY		XX * XX		XX * YY		XY * XY		
0		2-28%		0		2-14%		זכרים XX
40-53%		0		50-100%		27-34%		זכרים XY
39-47%		0		0		21-24%		זכרים YY
0		72-98%		0		21-41%		נקבות XX
0-21%		0		0-50%		5-12%		נקבות XY

היחס בין הזוויגים בהכלאות השונות לא סיפקו הסבר מלא למנגנון קביעת זוויג ולא תאמו את הצפוי. לא נמצאו נקבות עם גנוטיפ YY. הזוויגים הבלתי צפויים מעידים על כך שקיים גורם גנטי נוסף שמשפיע על התמינות הזוויגים. איתור הגורם הזה והבנתו יאפשר לנו לבחור רק את ההורים המאפשרים צאצאים כל זכריים.

ביצוע שיטת GBS

את הטיפוסים החשובים לייצור כל זכרי (זכרים YY ונקבות XX) ולהמשכיות עדר רבייה זה (נקבות XY) ניתן להשיג בהכלאה XY x XY (טבלה מס' 4, מודגש באדום). אבל היכרות טובה יותר של אתרים משניים לקביעת הזויג יכולה לשפר משמעותית את הסמנים בעזרתם נבחר את עדרי הרבייה שלנו, לצמצום את מספר הבדיקות הנדרשות וכתוצאה מכך להוזיל את יישום הטכנולוגיה. למטרה זאת נדגמה משפחה ספציפית (XY*XY) של 93 פרטים שהזויג שלהם היה ידוע, והוריהם עברו הפקת DNA באיכות גבוהה ביותר אשר נשלח לבדיקת GBS. זוהי שיטה מיוחדת המבטיחה רמת ניקיון גבוהה מאוד של החומר הגנטי. ביצוע ניתוח גנטי בשיטה GBS נעשה במעבדה חיצונית באוניברסיטת ויסקונסין, ארה"ב. השיטה גילתה עשרות אלפים של הבדלים מסוג החלפת בסיס (SNP) בין אחים מלאים. ניתוח ביואינפורמטי של ההבדלים הללו חשפו את הקשר בין הגנוטיפ של ההורים (במספר אתרים שונים) לזויג של הצאצאים.

התוצאות הראו כי קיים סמן נוסף לקביעת הזויג אשר יכול להסביר מדוע מתקבלים בהכלאות מסוימות טיפוסים בלתי צפויים כגון זכרים בעלי גנוטיפ XX ונקבות בעלות גנוטיפ XY. התוצאות מוסברות בסעיף ה' למטה.

ב. השוואת ביצועי גדילה ופוריות של זכרים YY וזכרים XY

צאצאים זכריים בלבד מהטלה A אוכלסו לגידול בבריכת בטון שנפחה 50 קו"ב. זכרים בעלי גנוטיפ YY וזכרים בעלי גנוטיפ XY, סומנו בסימן קבוצתי (צבע) מבדיל. מיד לאחר הסימון נשקלו הדגים ואוכלסו יחד לבריכת הגידול המשותפת (מכוסות ברשת נגד ציפורים ובעלות אספקת מים ואוורור קבוע). לאחר תקופה של 120 ימים הוצאו כל הדגים מהבריכה נספרו נשקלו והופרדו על פי השתייכותם הגנוטיפית, והתוצאות מוצגות בטבלה 5.

טבלה 5. מדדי פוריות של 25 נקבות XX שהוכלאו עם זכרי YY ועם זכרי XY בקבוצות שהורכבו מזכר ו-5 נקבות. למרות העדיפות המספרית במדדי הפוריות של ההטלות עם זכרי YY רק במספר ההטלות לנקבה פעילה נמצא הבדל מובהק לטובת זכרי YY, אולם מובהקות זו הייתה גבולית ($p=0.05$). על נתונים אלו הופעל מבחן one-way Anova. ממוצעים באותו טור המסומנים באותיות שונות הראו מובהקות סטטיסטית ($p<0.05$)

גנוטיפ זכר	נקבות פעילות בקבוצה	מספר הטלות לקבוצה	מס' הטלות לנקבה פעילה	לרוות לנקבה פעילה	לרוות להטלה
XY	56%	3.4	1.20 ^b	471	413
YY	56%	4.8	1.71 ^a	1183	561

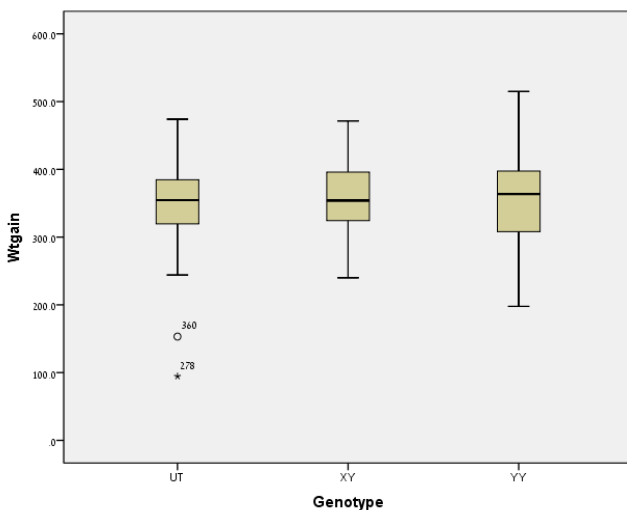
ג. השוואת פוריות בהטלות קבוצתיות:

במערכת מכלי פלסטיק המיועדת לכך אוכלסו 10 קבוצות הטלה, כל אחת הורכבה מזכר ו-5 נקבות. ב-5 מהמכלים אוכלסו זכר YY אחד עם 5 נקבות XX בכל מכל, ואילו ב-5 מכלים אחרים יאוכלסו זכר XY אחד עם 5 נקבות XX בכל מיכל. במערכת המכלים התקיימו תנאים אופטימאליים להטלת אמנון יאור (טמפ', ממשק הארה, איכות מים וכו'). נעשה מעקב אחר הפוריות בקבוצות ההטלה השונות באמצעות איסוף ביצים מפיות הנקבות, הדגרת הביצים עד לבקיעה

ואימון ראשוני. מערכת ההטלות הופעלה למשך 60 יום. נאספו המדדים: מס' הנקבות הפעילות בכל קבוצה, מס' הטלות ממוצע לנקבה, מס' הטלות ממוצע לתקופה, מס' לרוות ממוצע להטלה / לנקבה / לתקופה. התוצאות מובאות בטבלה 6 ובאיור 1. מהתוצאות עד כה עולה כי אין הבדל מובהק בין הפוריות של נקבות נורמליות אשר הוכלאו עם זכרי YY לבין הפוריות של נקבות שהוכלאו עם זכרים נורמליים (XY), זאת למרות עדיפות מספרית הנראית בטבלה 6.

טבלה 6. ביצועי הגדילה של צאצאים זכריים מהכלאה XY*XY, מהטלה קבוצתית אחת. השוואה בין זכרים בעלי גנוטיפ XY, זכרים בעלי גנוטיפ YY, וזכרים מאותה הטלה שהגנוטיפ שלהם לא נבדק (UT). לפי מבחן סטטיסטי one way Anova, אין הבדל בין ביצועי הגדילה של זכרים בעלי שני הגנוטיפים.

SGR	קצב גידול gr/day	משקל מוסף Weight gain	משקל סופי f.Weight	משקל אכלוס St.Weight	n	גנוטיפ זכרים
1.52	3	360	432.7	73.1	87	XY
1.50	2.95	354	431.5	77.5	44	YY
1.53	2.96	355	422.6	69.0	229	UT



איור 1. תיאור גרפי של השוואת תוספת המשקל בקרב זכרים בעלי גנוטיפ XY, YY, וכלל האוכלוסייה של צאצאים זכריים מהכלאה XY*XY (UT)

ד. ייצור צאצאים כל זכרים ואימות יחסי זווים באוכלוסיות הצאצאים של זכרים YY עם נקבות XX. במהלך פברואר – מרץ 2018 יוצרו באמצעות הטלות קבוצתיות (כמתואר בסעיף ג') 46,000 דגים כל זכריים, צאצאי הכלאות בין זכרים YY לבין נקבות XX. דגים אלו אוכלסו לבריכות עפר סמי מסחריות בסוף אפריל 2018 למעקב אחר ביצועי הגדילה במהלך 5 חודשי הקיץ (מאי – ספטמבר). מתוך צאצאי קבוצת ההטלה בהן הוכלאו זכרי YY עם נקבות XX נדגמו באופן אקראי 300-500 דגים לבדיקת התפלגות הזווים. דגים אלו הוחזקו במיכל פלסטיק במתקן מבוקר. קביעת הזווים נעשתה באמצעות בדיקה מקרוסקופית של הגונדות. בבדיקת מדגם ראשוני קטן (50 דגים) התקבלה התפלגות של 100% זכרים. **בדיקת המדגם המלא (דהיינו 300-500 דגים מכל הטלה) הראתה כי שיעור הזכרים בצאצאים נע בין 85% ל-100% כתלות בנקבות אשר השתתפו בהטלה.** כל הנקבות הללו נדגמו לבדיקה גנטית, ובתכנית ההמשך של המחקר נבצע מיון חוזר של אוכלוסיית האימהות על מנת להבטיח 100% זכרים בצאצאיהן בעתיד.

ה. צירוף המידע מבידיקות GBS ונתוני הופעת נקבות XY לזיהוי אתר רביעי (W) המעורב בקביעת הזוויג.
 ניתוח תוצאות בדיקות GBS עם התפלגות הופעת נקבות XY הביא לזיהוי שני אתרים נוספים שמעורבים בקביעת הזוויג: LG15, LG7, מבין שני האתרים הללו LG7 הוא האתר שיכול להוות סמן גנטי למיון נקבות וזכרים אשר בצאצאיהם לא יימצאו נקבות XY (שאינן רצויות בגידול מסחרי כיוון שהן בעלות פוריות מסוימת). לאחר קבלת סמן זה נבדקו בדיקה חוזרת כ- 800 נקבות וכ- 200 זכרים. ע"י מיון של הדגים הללו לפי תוצאות הסמן החדש נבנה בדור גרעין רבייה לייצור נקבות צ'יטרלדה אשר ב-4 האתרים השונים לקביעת הזוויג שלהן יופיעו אללים שאינם מאפשרים הופעת נקבות XY, נקבות XXW. גרעין רבייה זה המורכב מכ-200 נקבות וכ- 50 זכרים יאפשר לנו לייצר נקבות המתאימות לייצור צאצאים כל זכריים בהכלאה עם זכרי YY, וזאת ללא צורך בבדיקה גנטית של האימהות. במהלך חורף 2019 הגדלנו את אוכלוסיית האימהות הללו וכן את גרעיני הרבייה המאפשרים ייצור שוטף של אימהות כאלו. במקביל נבצע הטלות פיילוט בהכלאת נקבות XXW עם זכרי YY, וכן בהכלאת נקבות XXW עם זכרי מקו ירדן נקי (ZZ), לבדיקה חוזרת של התפלגות הזוויגים בצאצאים.

סיכום תוצרי העבודה:

א. זכרים בעלי גנוטיפ YY ותשתית לייצור עתידי שלהם:

קבלת זכרים בעלי גנוטיפ YY מחייבת בדיקה גנטית על מנת להבדילם מזכרים טבעיים (XY), אולם באמצעות שימוש בנקבות יחודיות בעלות גנוטיפ XY ניתן להגדיל משמעותית את שיעורם. על כן נוצר סטוק של נקבות כאלו לשימוש עתידי, וכן הוגדל גרעין של זכרים אשר נבדקו והוכחו כנושאי גנוטיפ YY. גרעין זה ישמש לצרכים מחקריים וסמי מסחריים, ואיננו מספיק לייצור מסחרי. יוצרה אוכלוסיית דגיגים (5000) ששיעור זכרי YY בה גבוה יחסית (כ- 50%). אוכלוסייה טרם מוינה.

ב. נמצא כי זכרי YY אינם נבדלים בפוריותם ובביצועי צאצאיהם מזכרים טבעיים (XY)

ג. התגלה מרכיב / אתר גנטי רביעי (חדש) המשפיע על התמיינות הזוויג ואחראי להיווצרותן של נקבות בעלות גנוטיפ XY בשיעור נמוך באוכלוסייה. בעקבות הגילוי עודכן ושופר הסמן הגנטי שבעזרתו בוררים הורים המתאימים לייצור כל זכרי.

ד. קו אימהות לייצור כל זכרי — הוגדלה האוכלוסייה של זכרים ונקבות שהגנוטיפ שלהם הוא XX. באמצעות הסמן הגנטי החדש נבררו נקבות לייצור משופר (מעל 90% זכרים). נקבות אלו הוכלאו עם זכרי YY ועם זכרי אמנון ירדן לבדיקת יחסי הזוויגים בהכלאה עם זכרי YY וכן עם זכרים של המין אמנון הירדן. לאחר בקרת איכות אשר תראה שאכן שיעור הזכרים בצאצאים עולה על 90%, תהיה בידינו להקת רבייה המייצרת נקבות לייצור כל זכרי, ללא צורך בבדיקה גנטית.

מקורות:

1. Beardmore et al. (2001) Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197:283-301.
2. Cnaani, A., & Levavi-Sivan, B. (2009). Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. *Sexual Development*, 3(2-3), 164-175.

3. 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: Genes, Genomes, Genetics*, 2(1), 35-42.
4. Shirak, A., Palti, Y., Cnaani, A., Korol, A., Hulata, G., Ron, M., & Avtalion, R. R. (2002). Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *Journal of Heredity*, 93(4), 270-276.
5. Shirak, A., Seroussi, E., Cnaani, A., Howe, A. E., Domokhovskiy, R., Zilberman, N., Kocher T. D., Hulata G. & Ron, M. (2006). Amh and Dmrt2 genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics*, 174(3), 1573-1581.
6. Shirak A., Reicher S., Uliel S., Mehlman T., Shainskaya A., Ron M. and Seroussi E. (2011). Gender and reproductive activity modulate the composition of serum lipocalins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* 504(1): 22-30.
7. Shirak A., Zak T., Benet-Perlberg A., Ron M. and Seroussi E. Development of tilapia broodstocks producing all-male progeny on a commercial scale (in preparation).
8. Sukmanomon, S.; Kamonrat, W.; Poompuang, S.; Nguen, T.T.T.; Bartley, D.M.; May, B.; Na-Nakorn, U. Genetic changes, intra- and inter-specific introgression in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand. *Aquaculture*, v.324-325, p.44-54, 2012.