

ריצוף גנומי עמוק חושף פרופיל מיקרוביוטי בקשיות הזרעה של פרים ישראליים



איל סרוסי, מורן גרשוני
המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי

תיאור הבעיה הנחקרת ופערי הידע בנושא

- ❑ מיקרוביוטה היא קהילה של מיקרואורגניזמים, שבית הגידול שלה נמצא בגוף החי.
- ❑ מיקרואורגניזמים אלה מקיימים סימביוזה קומנסלית ופתוגנית עם הגוף וכוללים חיידקים, נגיפים, טפילים, פטריות, בקטריופאגים וחד-תאיים פרוטיסטים.
- ❑ כל בעלי החיים מאחסנים קהילות מיקרואורגניזמים בגופם ועל גופם, שיכולים להשפיע באופן משמעותי על הביולוגיה של המארח.
- ❑ ביונקים, נוזל הזרע של זכרים בריאים בדרך כלל אינו מכיל חיידקים.
- ❑ אף על פי כן, צינור השופכה, עור ושיער מכילים מספר מיקרואורגניזמים שיכולים לגרום לזיהום של דגימות זרע בזמן איסוף דגימות, כחלק מהליכי ההפרייה המלאכותית.

תיאור הבעיה הנחקרת ופערי הידע בנושא

- זיהום וויראלי וחיידקי של נוזל הזרע הוא גורם חשוב הקשור למצב הבריאותי של פרים, שיכול להשפיע באופן משמעותי על הזרעה מלאכותית ועל העברת מחלות בבקר.
- כדי למזער את סכנות הזיהום, אנטיביוטיקה מוספת באופן שגרתי לקשיות ההזרעה, בכדי לשלוט על צמיחת חיידקים.
- טיפול זה לא מגן בפני וירוסים.
- לאחרונה נעשה מאמץ מחקרי בעולם לאפיין את מיקרוביוטה הנורמלית בזרמת פרים ודווח שהשונות הטבעית של החיידקים בין פרטים מורכבת מחמש קבוצות עיקריות.
- שיפור הכלכליות של הטכנולוגיות לקביעת רצף גנומית (כיום כ- 3000 ש"ח לדגימה) מאפשר זיהוי של הגנומים הנלווים לדגימת דנ"א שמופקת מזרמה.
- עד להיום, הפקדנו 33 גנומים מפרי הזרעה ישראליים בבנק הגנים PRJEB59761.

שיטות: ריצוף גנומי עמוק של פרי הזרעה ישראלים.

נגיפים Kbp	מקטעי בקטריות	מס. מקטעים	טכנולוגיה	
7.3	102,765	401,967,974	NS	בוילר
2214.6	127,860	361,519,877	NS	אבשה
13.3	129,455	449,885,842	NS	סג
7.0	94,879	399,980,764	NS	סופון
5.1	813,673	382,156,099	NS	ור
24.8	176,720	458,256,777	NS	מפרק
		408,961,222 ±15,495,834	ממוצע ± שגיאת תקן	NovaSeq 6000
86.4	44,772	310,285,759	HS	ג'רמין
4.8	131,921	319,575,305	HS	ג'יי
37.2	59,905	337,946,649	HS	ג'ייג'יי
4.5	81,281	300,382,216	HS	בופון
5.4	82,354	273,572,927	HS	מאקרו
1.8	136,121	285,115,013	HS	סטארט
3.6	110,871	302,259,900	HS	איסר
6.0	90,100	296,384,014	HS	אטב
6.0	45,817	327,126,812	HS	גרדן
3.3	60,657	317,888,134	HS	ארטיסט
4.5	111,464	304,472,448	HS	סטז'ר
		306,819,016 ±5,585,356	ממוצע ± שגיאת תקן	HiSeq 2500

□ דנ"א הופק מקשיות הזרעה של 17 פרים, שנבחרו לייצג מספר שושלות. ריצוף גנום שלם בוצע עם טכנולוגיות של אילומינה, על ידי מרכז קביעת רצף בדרום קוריאה.

□ בטכנולוגיות אלה, הדנ"א עבר קיטוע מכני ובוצעה קביעת רצף דו-צדדית (paired-end) למקטעים.

□ לכל מקטע רוצפו 151 נוקלאוטידים מכל קצה, והרצפים הופקדו בבנק הגנים.

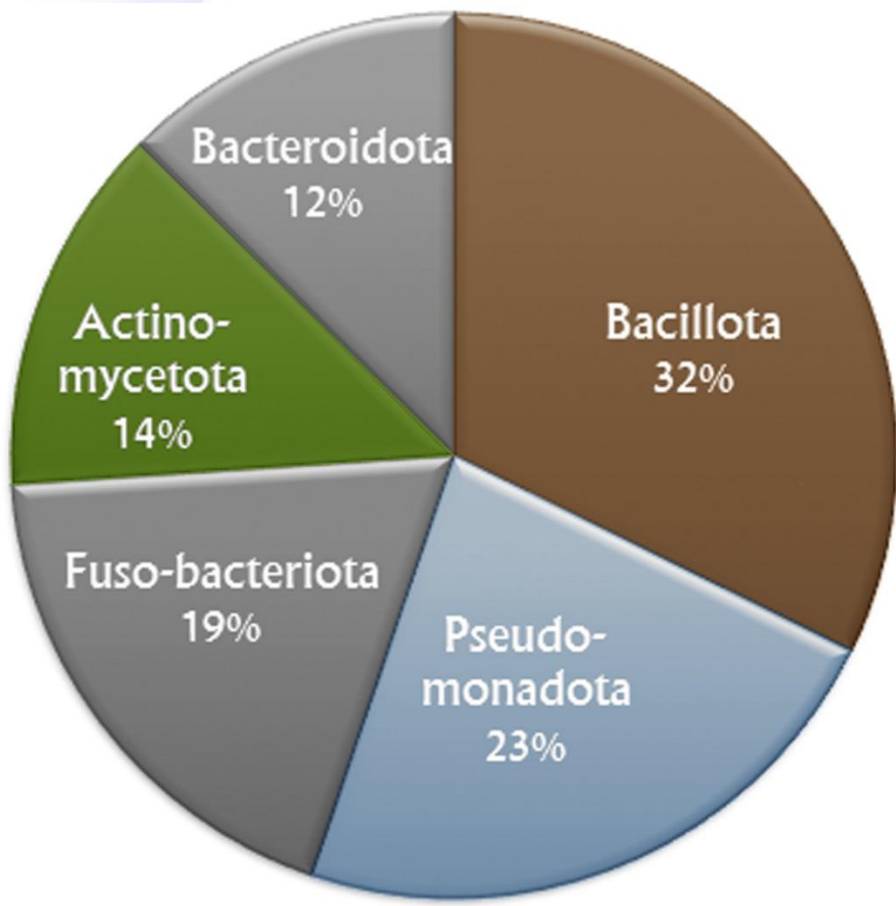
שיטות

נגיפים Kbp	מקטעי בקטריות	טכנולוגיה	
7.3	102,765	NS	בוילר
2214.6	127,860	NS	אבשה
13.3	129,455	NS	סג
7.0	94,879	NS	סופון
5.1	813,673	NS	ור
24.8	176,720	NS	מפרק
86.4	44,772	HS	ג'רמין
4.8	131,921	HS	ג'יי
37.2	59,905	HS	ג'ייג'יי
4.5	81,281	HS	בופון
5.4	82,354	HS	מאקרו
1.8	136,121	HS	סטארט
3.6	110,871	HS	איסר
6.0	90,100	HS	אטב
6.0	45,817	HS	גרדן
3.3	60,657	HS	ארטיסט
4.5	111,464	HS	סטז'ר

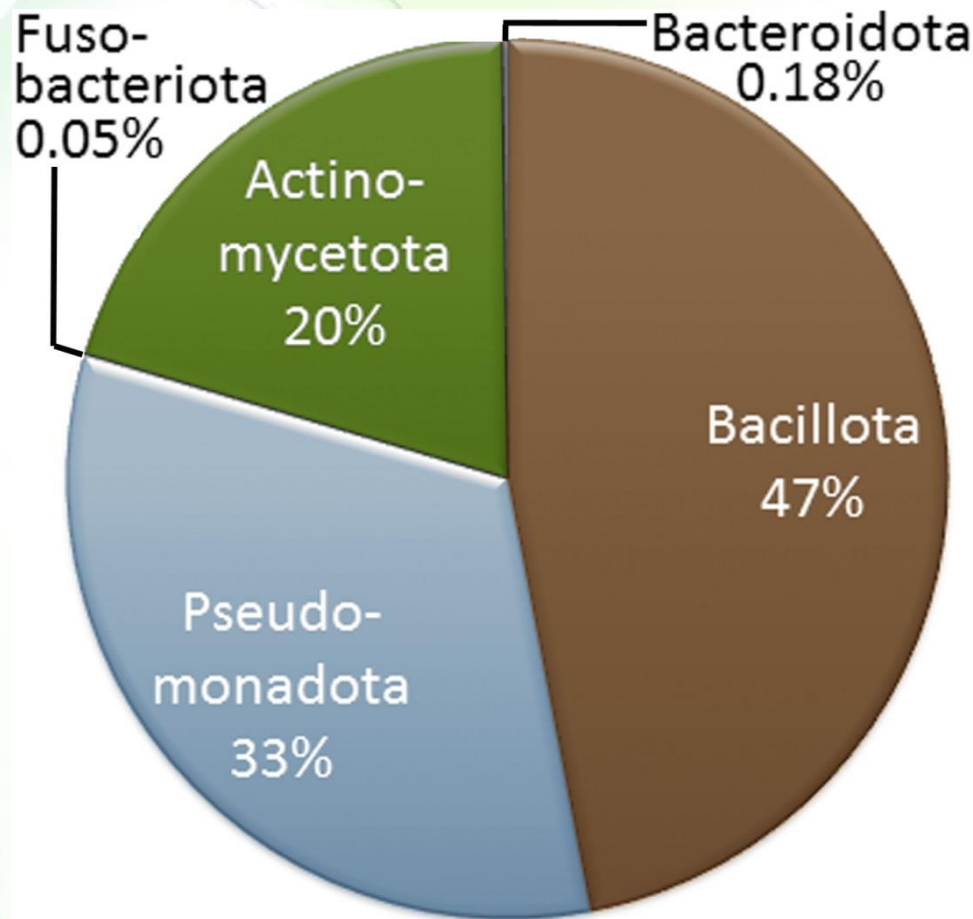
- כחלק מהפקדת הרצף בבנק הגנים, התבצעה אנליזת STAT של מקורו הביולוגי.
- אנליזה זאת מבוססת על ניתוח של מסד נתונים שכולל רצפים ייחודים בני 32 נוקלאוטידים (-k-mers), שמאפיינים את כל המינים המתועדים בבנק הגנים.
- האנליזה מאפשרת לכמת את שיעור הדנ"א הזר בכל הפקדה ולזהות את מקורו המיקרוביוטי.

התפלגות חמש קבוצות החיידקים העיקריות במיקרוביום נוזל הזרע.

התפלגות טבעית (תועדה בפרי סימנטל).



התפלגות ממוצעת ב-16 פרי הזרעה ישראליים.

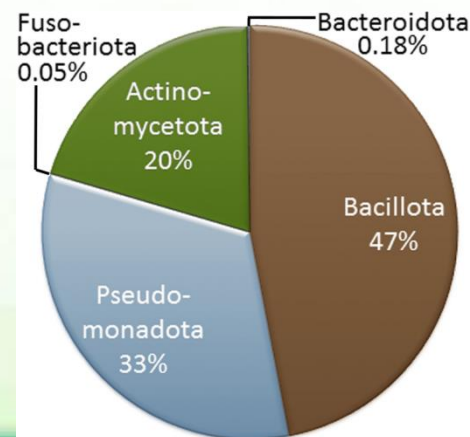


תוצאות - מיקרוביום

מקטעי בקטריות	טכנולוגיה	
102,765	NS	בוילר
127,860	NS	אבשה
129,455	NS	סג
94,879	NS	סופון
813,673	NS	ור
176,720	NS	מפרק
44,772	HS	ג'רמין
131,921	HS	ג'יי
59,905	HS	ג'ייג'יי
81,281	HS	בופון
82,354	HS	מאקרו
136,121	HS	סטארט
110,871	HS	איסר
90,100	HS	אטב
45,817	HS	גרדן
60,657	HS	ארטיסט
111,464	HS	סטז'ר

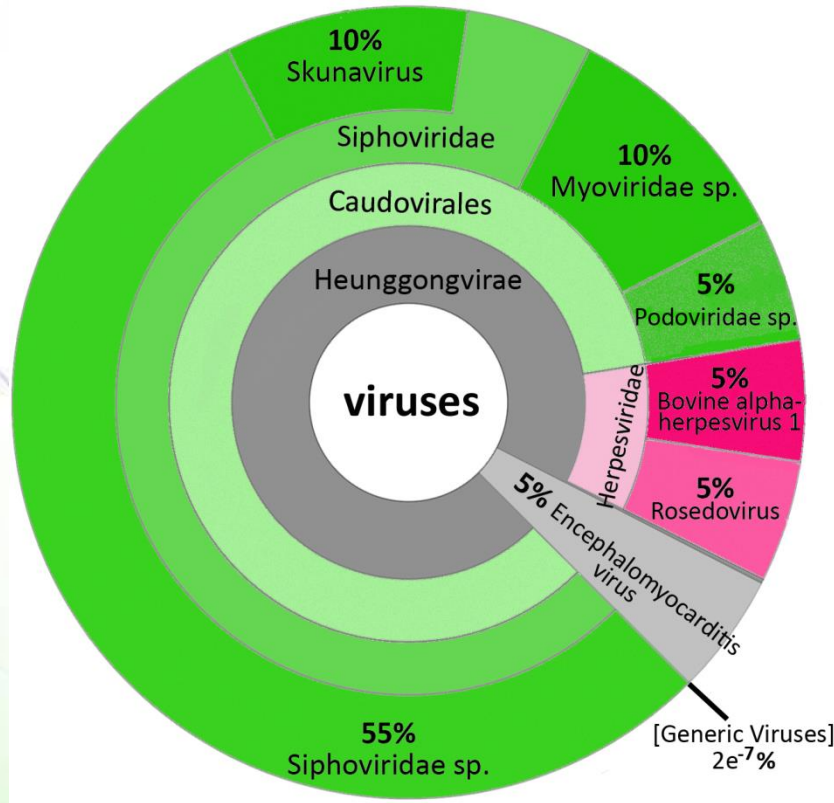
□ דגימת הזרע של הפר "ור" הייתה חריגה - 0.21% דנ"א בקטריאלי, שרובו משויך לפתוגן הצמחי, גרם חיובי (*Erwinia*), בעוד הממוצע בשאר הדגימות היה 3 ± 29 פרומיל.

□ התפלגות המיקרוביום בדגימות אלה דמתה לטבעית ($r=0.82$), עם תת-ייצוג לקבוצות *Bacteroidota* ו-*Fusobacteriota*.

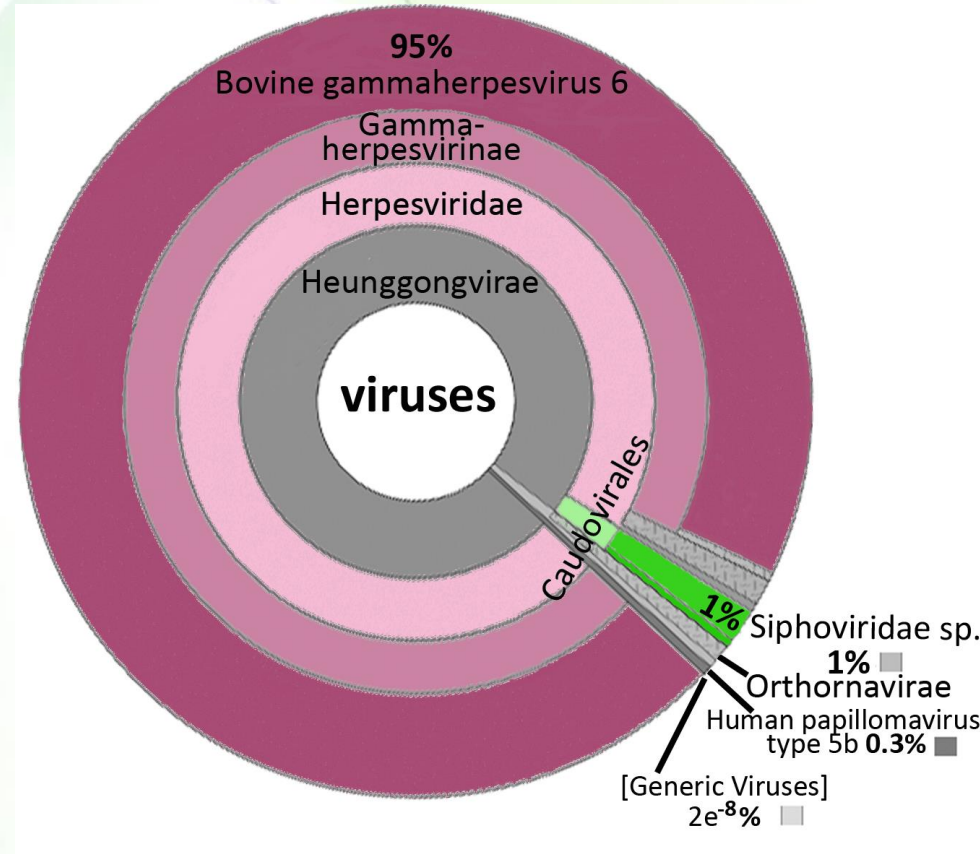


נגיפים בנוזל הזרע: התפלגות נורמלית וחריגה

התפלגות אופיינית
(תועדה בפר גרדון).



אינפקציה בהרפס
(תועדה בפר ג'רמין).



גאוני ירוק = בקטריופאגים,
בעלי "זנב" (cauda)

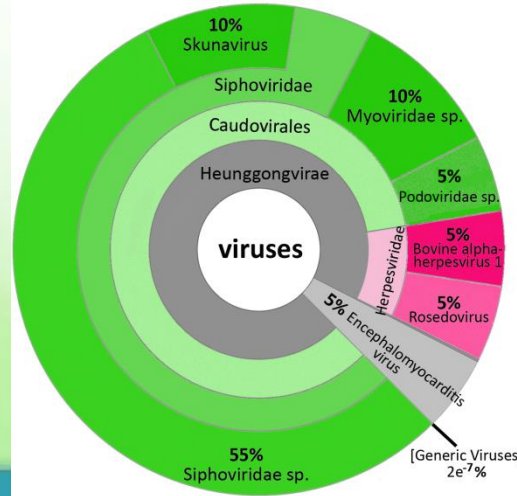
גאוני וורוד = נגיפי
קבוצת הרפס

תוצאות - וירוס

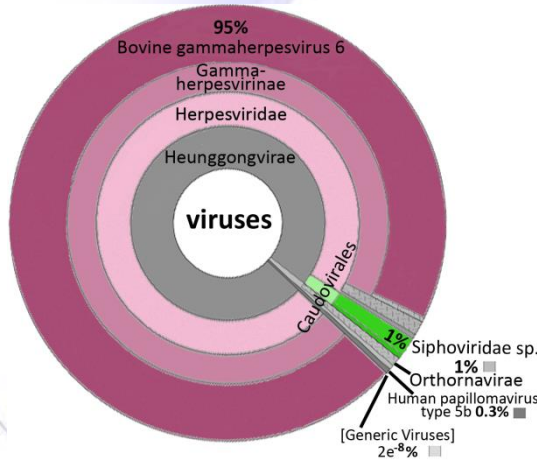
נגיפים Kbp	טכנולוגיה	
7.3	NS	בוילר
2214.6	NS	אבשה
13.3	NS	סג
7.0	NS	סופון
5.1	NS	ור
24.8	NS	מפרק
86.4	HS	ג'רמין
4.8	HS	ג'יי
37.2	HS	ג'ייג'יי
4.5	HS	בופון
5.4	HS	מאקרו
1.8	HS	סטארט
3.6	HS	איסר
6.0	HS	אטב
6.0	HS	גרדן
3.3	HS	ארטיסט
4.5	HS	סטז'ר

□ חריגה ניכרת (פי 369 מהחציון) מכמות הנגיפים הנורמלית אותרה בנתוני הפר "אבשה" שכללו בעיקר מקטעי נגיף קורונה.

□ במקביל לשכיחות החיידקים במיקרוביוטה הנורמלית של נוזל הזרע, קבוצת הנגיפים העיקרית (85%) שאופיינה הייתה בקטריופאגים, בעלי "זנב" (cauda), המשמש לחדירה לתאי החיידקים (*Caudovirales*).



תוצאות - וירוס



□ כמות הדנ"א הנגיפי בדוגמאות הפר "ג'רמין" הייתה חריגה (פי 14 מהחציון), שבעיקרה נבעה מנוכחות 533 מקטעים מגנום נגיף הרפס-6 של בקר.

□ מיפוי של רצפים אלה לגנום הנגיף, אימתו את מקורם, בעומק כיסוי של כאחד, כך שעל כל כ- 30 תאי זרע צפוי שימצא וויריון יחיד.

□ הפרשה טרנסמיסית של נגיף זה בנוזל הזרע תועדה בפרים סמוך להופעתו בדם. בנוסף, הופעתו נצפתה ברקמות מעוברים שהופלו, בסמיכות לאיתור פתוגן חיידקי.

□ תצפיות אלה העלו חשש שהרפס-6 עלול לפגוע בפוריות, אבל מחקרים נרחבים יותר דווחו על שכיחות נרחבת שלו בקר ללא השפעות שליליות והציעו שמדובר באורגניזם קומנסאלי.

השפעה של הרפס על הפוריות באדם

- דנ"א של הרפס מתגלה לעתים קרובות בזרע של חולים גברים פוריים ובלתי פוריים אסימפטומטיים. נקשר עם ספירת זרע נמוכה, תנועתיות מופחתת של הזרע ומוות אפופטוטי, כמו גם עם צמיגות לא תקינה ודלקת בערמונית.
- כמו וירוסים רבים, עשוי להיות מועבר ויכול להגביר את הסיכון להפלה.
- מסלולי זיהום וטיפולים טכניים: וויריוני הרפס נמצאו הן בנוזל הזרע והן בזירעונים, נצמדים לממברנת הזרע. אפילו שיטת שטיפה של גרדיינט עם שתי צפיפויות הוכחה כלא יעילה בהפחתת העומס הנגיפי בזרע, כנראה בגלל קשירה חזקה של חלקיקי וירוס עם ראשי זרע.
- אינו נמצא ברשימת הווירוסים שחובה לנטר בבנק הזרע, כמו וירוסי ההפטיטיס והאיידס.

סיכום והערות

- ❑ ריצוף גנומי עמוק הוא אמצעי לאפיון הפרופיל מיקרוביוטי בקשיות הזרעה ואמצעי זה חשוב ביחוד לאפיון אינפקציות ויראליות שעשויות לפגוע בפוריות ובריאות העדר.
- ❑ קיימת בעיה של זיהום התוצאות על ידי מרכז הריצוף. (למשל של קורונה, ו-*Erwinia*).
- ❑ ממדגם הגנומים שנבחנו בדוגמאות עולה כי השימוש בקשיות ההזרעה הישראליות בטוח.
- ❑ עם זאת, מומלץ להרחיב את היקף הריצוף העמוק של גנומים מקשיות הזרעה, כאמצעי בקרה על איכות הזרע.
- ❑ מחיר האנליזה במגמת ירידה והיא גם מספקת מידע גנטי מלא, שחשוב לתוכנית ההשבחה, בהשוואה לפרופיל הגנטי החלקי של סמנים גנטיים מהשבב, שמיועד לחישוב הערכות גנומיות.
- ❑ מחקר זה מומן ע"י קרנות המחקר של מועצת החלב והלאומית למדע.