

247

857-0285-99

קוד מחקר:

נושא: אופטימיזציה של מכון הטלה לסרטן האוסטרלי *CHERAX QUADRICARINATUS*: בקרת רבייה ואילוף הטלות בחורף

מוסד: אוניברסיטת בן-גוריון, ת.ד. 653, באר שבע

חוקר ראשי: דר' אמיר שגיא

חוקרים שותפים: 2

1997-1999

תקופת מחקר:

מאמרים:

**תקציר**

מעקב אחר קבוצות רבייה של הסרטן *Cherax quadricarinatus* מצביע על האטת קצב הרבייה בחודשי החורף.

מטרת המחקר: לפתח טכנולוגיה אשר תאפשר שליטה ברבייה. במהלך המחקר השלמנו אפיון פרטני של מכלול השינויים החלים בנקבה במהלך מחזור הרבייה ברמת השחלה וההמולימפה. הגדרנו את הדינמיקה של האווציט ושל מגוון פוליפפטידים סגוליים לרבייה. זיהינו חלבון חדש קושר סידן המהווה סמן ייחודי לתחילתו של תהליך הויטלוגנזה השניוני. חלק מהפוליפפטידים הספציפיים לשלבים ויטלוגניים שניוניים בודדו משחלות וביצים, כנגדם הופקו נוגדנים במסגרת פיתוח המבדקים לבגרות מינית והבשלת שחלות ברמה הביוכימית/פיסולוגית (ELISA). כמו כן הוקם מבחן התנהגותי המזהה את מועד הרצפטיביות של נקבות מבודדות. הצענו פתרון אופרטיבי להשריית רבייה בחורף באמצעות התערבות כירורגית בקומפלקס האנדוקריני בגבעול העין בנקבות צעירות אשר יושם בהצלחה במשק מסחרי. מאחר והשיטה האנדוקרינית כירורגית מוגבלת לפרטים צעירים, גורמת נזק לאמהות והיא עתירת עבודה, ביצענו (ללא הצלחה) מגוון ניסיונות התערבות אנדוקריניות להשריית רבייה באמצעות החדרת הורמונים יובנליים. כשלון החדרת האנלוג היציב של ההורמון היובנלי בהזרקה תוך שימוש בנשא שומני הביא לפיתוח שיטה להחדרת הורמונים הידרופוביים דרך המזון. יעילות החדרת ההורמון לסרטנים דרך המזון נבחנה באמצעות כרומטוגרפיה גאזית וספקטרוגרף מסות ואכן נמצא כי ההורמון חודר ומצוי ברקמות של הסרטנים המטופלים. כל ניסיונות החדרה של אנלוגים של ההורמון היובנלי דרך המזון לא גרמו לשינוי בתפקודים רבייתיים אך השפיעו על המהלכים הנשליים. כמו כן ביצענו ניסויים בהשפעת סרוטונין על מערכת הרבייה ונמצא כי בניגוד לנתוני הספרות, מסרטנים אחרים, הרי שבסרטן זה לא נמצאה השפעה לסרוטונין על מהלך הרבייה. לעומת זאת, באמצעות שינויים במשטר התאורה והטמפרטורה של עדר הרבייה נגרמה הסטה משמעותית של תקופת החורף והדמיית כניסה ל"אביב" מוקדם תוך השגת הטלות חורפיות. כמו כן נבדקה השפעת צפיפות האמהות על ייצור צעירים והוצע כי ניתן להשיג רבייה במין זה בצפיפויות גבוהות מהנהוגות במשק ובכך לייעל משמעותית את תהליך הייצור.

אופטימיזציה של מכון הטלה לסרטן האוסטרלי *Cherax quadricarinatus* :  
בקרת רבייה ואילוף הטלות בחורף  
דו"ח מדעי סופי מוגש ע"י  
אמיר שגיא

המחלקה למדעי החיים, אוניברסיטת בן גוריון בנגב ת.ד. 653 באר שבע 84105.  
sagia@bgumail.bgu.ac.il  
אילן קרפלוס וגדעון חולתא.  
המחלקה למדגה ולחקלאות מים, מינהל המחקר החקלאי ת.ד. 6 בית דגן 50250.

## תקציר

מעקב אחר קבוצות רבייה של הסרטן *Cherax quadricarinatus* מצביע על האטת קצב הרבייה בחודשי החורף. על כן נוצר הצורך לפתח טכנולוגיה אשר תאפשר שליטה ברבייה. במהלך המחקר השלמנו אפיון פרטני של מכלול השינויים החלים בנקבה במהלך מחזור הרבייה ברמת השחלה וההמולימפה. הגדרנו את הדינמיקה של האואוציט ושל מגוון פוליפפטידים סגוליים לרבייה. זיהינו חלבון חדש קושר סידן המהווה סמן ייחודי לתחילתו של תהליך הויטלוגנזה השניוני. חלק מהפוליפפטידים הספציפיים לשלבים ויטלוגניים שניוניים בודדו משחלות וביצים, כנגדם הופקו נוגדנים במסגרת פיתוח המבדקים לבגרות מינית והבשלת שחלות ברמה הביוכימית/פיסילוגית (ELISA). כמו כן הוקם מבחן התנהגותי המזהה את מועד הרצפטיביות של נקבות מבדדות. הצענו פתרון אופרטיבי להשריית רבייה בחורף באמצעות התערבות כירורגית בקומפלקס האנדוקריני בגבעול העין בנקבות צעירות אשר יושם בהצלחה במשק מסחרי. מאחר והשיטה האנדוקרינית כירורגית מוגבלת לפרטים צעירים, גורמת נזק לאמהות והיא עתירת עבודה, ביצענו (ללא הצלחה) מגוון ניסיונות התערבות אנדוקריניות להשריית רבייה באמצעות החדרת הורמונים יובנליים. כשלון החדרת האנלוג היציב של ההורמון היובנלי בהזרקה תוך שימוש בנשא שומני הביא לפיתוח שיטה להחדרת הורמונים הידרופוביים דרך המזון. יעילות החדרת ההורמון לסרטנים דרך המזון נבחנה באמצעות כרומטוגרפיה גאזית וספקטרוגרף מסות ואכן נמצא כי ההורמון חודר ומצוי ברקמות של הסרטנים המטופלים. כל ניסיונות החדרה של אנלוגים של ההורמון היובנלי דרך המזון לא גרמו לשינוי בתפקודים רבייתיים אך השפיעו על המהלכים הנשליים. כמו כן ביצענו ניסויים בהשפעת פרוטונין על מערכת הרבייה ונמצא כי בניגוד לנתוני הספרות, מסרטנים אחרים, הרי שבסרטן זה לא נמצאה השפעה לסרטונין על מהלך הרבייה. לעומת זאת, באמצעות שינויים במשטר התאורה והטמפרטורה של עדר הרבייה נגרמה הסטה משמעותית של תקופת החורף והדמיית כניסה ל"אביב" מוקדם תוך השגת הטלות חורפיות. כמו כן נבדקה השפעת צפיפות האמהות על ייצור צעירים והוצע כי ניתן להשיג רבייה במין זה בצפיפויות גבוהות מהנהוגות במשק ובכך לייעל משמעותית את תהליך הייצור.

## מבוא

הסרטן האוסטרלי *Cherax quadricarinatus* הנו סרטן מים מתוקים גדול מקבוצת ה-crayfish, הגדל היטב באקלים ממוזג. ניסויי גידול ראשוניים מצביעים על סיכויי התאמתו כמוצר יצוא בעל ערך מוסף גבוה למדגה הישראלית. מעקב אחר קבוצות רבייה שנערך במחלקה למדגה מצביע על האטת קצב הרבייה בספטמבר עד עצירה כמעט מוחלטת בחודשים נובמבר – ינואר (Barki et al., 1997). מניסיונותינו הראשוניים עולה כי יתכן אילוף הטלה חורפי בסרטן זה תוך שימוש באמצעים כירורגיים אנדוקריניים (Sagi et al., 1997). עובדה שקיבלה חיזוק נוסף מתוצאות השנה השניה של המחקר הנוכחי. ליישום מסחרי מוצלח של הגידול במשקי מדגה נוספים יש צורך בפיתוח טכנולוגיה למכון הטלה אופטימלי שבו יתקיימו הטלות גם בחודשים אוקטובר – ינואר על מנת שניתן יהיה לאמן את הצעירים ולאכלסם למתקני הגידול באביב ולקיים רבייה במשך כל השנה. התערבויות כירורגיות/אנדוקריניות וסביבתיות נבדקו במהלך עבודה זו.

לשם יצירת תשתית ידע נאותה (החסרה כמעט לחלוטין במין זה) לצורך יישום שיטות אנדוקריניות מתקדמות יותר, השלמנו מערכת מחקרית שתיארה אתמאפייני מערכת הרבייה בסרטן *C. quadricarinatus* ברמת האואוציט וברמת נפיצות החומרים החלבוניים המושקעים בו כחומרי תשמורת. חומרים אלה, הספציפיים לשלבים השונים במחזור הרבייה, בודדו וחלקם שימשו כאנטיגנים ליצירת נוגדנים שישמשו במבחני ELISA לאיתור מצבה הרבייתית של נקבה וכן לבחינת השפעתם של גורמים הורמונאליים על פעילות השחלה ואשר מהווים פקטורים להערכה רבייתית בניסויים *in vivo*. הסקירה נעשתה גם ברמת הליפופרוטאינים הסגוליים לרבייה במערכת ההובלה (HDL). ההורמון היובנלי משמש כגונדוטרופן בנקבות של פרקי רגליים ונמצא שקצב ייצורן ורמתו במערכת ההובלה של נקבות סרטנים הנו במתאם טוב עם שלבי הבשלת

השחלה. לאחרונה דווח כי הורמון זה מעודד את התפתחות השחלה בסרטנים מסוג crayfish (Laufer et al., 1998). לאור תכונותיו ההידרופוביות של החומר הוחלט להחדירו לסרטנים באמצעות הזרקה בנשא שומני או דרך המזון. כמו כן נבחנה השפעתו של ההורמון סרטונין אשר הוצע בספרות כמעודד נידורמוןאלי ברביית סרטנים (Kulkarni et al., 1992).

## תוצאות

### 1. אפיון מערכת הרבייה ומחזור הרבייה

א. אפיון התנהגותי של השלב הרצפטיבי במחזור הרבייה

לסרטן המים המתוקים האוסטרלי, *Cherax quadricarinatus*, רבייה עונתית של אביב-קיץ עם מספר מחזורי הטלה, ללא סינכרוניזציה בין נקבות באוכלוסייה (Barki et al., 1997). מועד ההזדווגות נמצא בתלות במצב המוכנות לרבייה של הנקבה בלבד. היכולת לזהות את מצבה הרבייתי של הנקבה ומוכנותה להזדווגות והטלה מהווה כלי חשוב לצורך מחקרים הקשורים ברבייה, כמו גם לסינכרון הטלות בעדר רבייה.

ישנם מיני סרטנים בהם זיהוי המצב הרבייתי של הנקבה נעשה בנקל, לדוגמה

פרונית המים המתוקים, *Macrobrachium rosenbergii*, שבה הגונדה נראית מבעד לשריון האטום למחצה והנקבה מתנשלת לפני ההזדווגות. אולם ב *C. quadricarinatus* ההזדווגות איננה כרוכה בנשל מקדים ועדיין לא קיימת שיטה מהימנה, בלתי חודרנית, לחיזוי מצבה הרבייתי של הנקבה או מוכנותה להזדווג. מטרת הניסוי הנוכחי היתה למצוא מבחן

התנהגותי לזיהוי מוכנות להזדווגות בנקבות *Cherax quadricarinatus*.

הניסוי נערך ב 12 אקוריונים זהים במידות של 50X50 ס"מ (אורך X רוחב), נפח

מים 70 ליטר. כל אקוריון הכיל פילטר ביולוגי פינתי עם אבן אויר וגוף חימום מבוקר ע"י תרמוסטט. טמפרטורת מינימום ומקסימום הממוצעות שנמדדו לאורך תקופת הניסוי היו,

בהתאמה,  $26.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$  ו  $27.9 \pm 0.7^\circ\text{C}$ , והונהג משטר תאורה (אור טבעי ומנורות נאון

בתקרה) של 14:10 שעות חושך:אור. כל אקוריון חולק לשני חלקים שווים ע"י מחיצה

אנכית שקופה ומחוררת. האקוריונים מוקמו בתוך תא המוקף יריעת ניילון שחורה כדי

למנוע הפרעה חיצונית, וכן היו מבודדים אחד מהשני. לכל אקוריון הוכנס זוג סרטנים

משני עברי המחיצה- זכר ונקבה בעלי משקל דומה, כך שהתאפשר קשר ויזואלי וכימי אך

לא מגע פיסי ביניהם, ולכל חיה ניתן מחסה (צינור PVC בקוטר 75 ואורך 220 מ"מ).

נערכו תצפיות יומיות שכללו שני סוגי תיעוד: א) תצפית פעילות - בכל מחצית השעה (בין

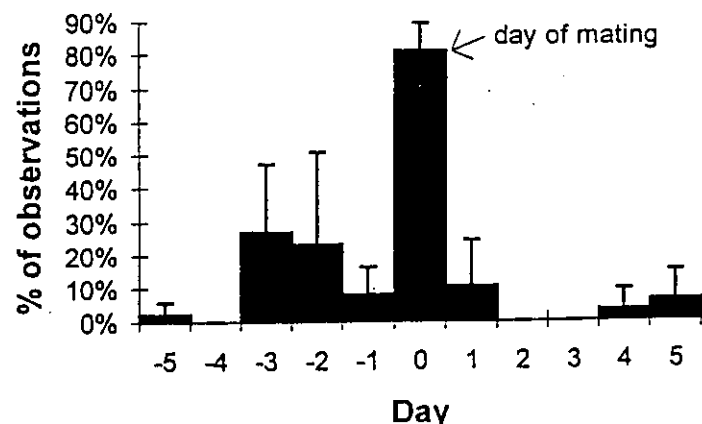
השעות 08:00-15:00) נרשם מיקום הסרטנים: בתוך המחסה או מחוץ למחסה. ב) תצפית

התנהגות - מידי 24 שעות (בין השעות 16:00-18:00) המחיצה הורמה והתאפשר מגע בין

זוג הסרטנים למשך 10 דקות אשר צולם בווידיאו. הרמת המחיצה והצילום התבצעו מעבר

לידיעת הניילון למזער הפרעה לסרטנים. התצפיות בכל זוג נמשכו עד 5 ימים לאחר שנצפו

ההזדווגות או נשל של הנקבה.

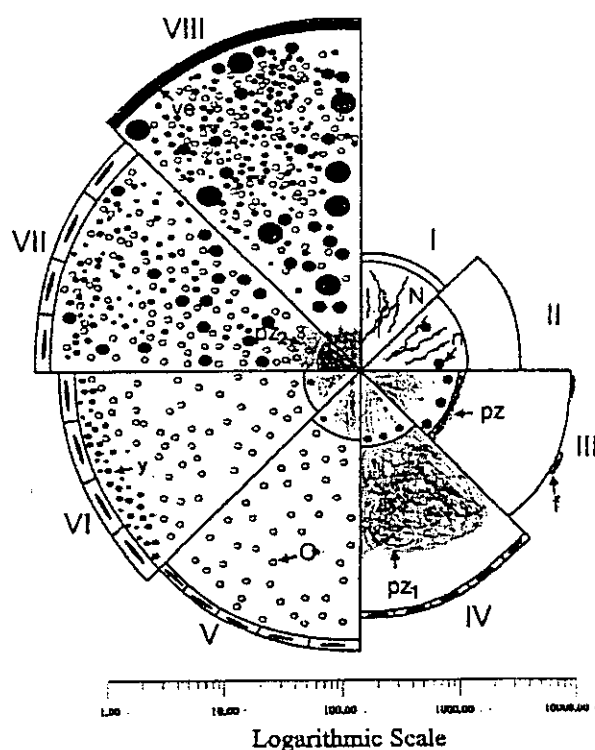


איור מס' 1: אחוז התצפיות הממוצע וסטיות תקן ( $n=6$ ) בהן נצפתה נקבת *Cherax quadricarinatus* מחוץ למחסה בסווח זמנים של חמישה ימים לפני ואחרי יום ההזדווגות (יום 0).

ניתוח שוניות לפי מודל של תצפיות חוזרות על כל זוג והתייחסות להתנהגות הזכר כ-קווריאנט הראה השפעה מובהקת של יום התצפית ( $f_{10,29}=10.08$ ,  $P<0.001$ ) וחוסר השפעה של פעילות הזכר ( $f_{1,29}=0.98$ ,  $P=0.33$ ) על אחוז התצפיות בהן הייתה הנקבה מחוץ למחסה. ניתוח קונטרסטים בין הימים השונים הראה פעילות גבוהה של הנקבה ביום ההזדווגות לעומת כל שאר הימים ( $f_{1,29}=39.02$ ,  $P<0.001$ )

### ב. אפיון השחלה והאאוציט

ממדגם של נקבות בשלבי פוריות שונים שנותרו במעבדה עולה כי במהלך ההתפתחות השחלתית ניתן לזהות שני חלקים: ויטלוגנזה ראשונית עד שלב האאוציט הליפדי (איור מס. 1 שלבים 1-5) וויטלוגנזה שניונית שבמהלכה מצויים בשחלה אאוציטים בכל השלבים הראשוניים ובנוסף להם קבוצה בולטת של אאוציטים במצב סינכרוני המצויים בשלבים מתקדמים יותר (איור מס. 2 שלבים 6-7).



איור מס. 2: תיאור סכימטי של ממצאי אפיון מחזור הרבייה ברמת האאוציט בשחלות הסרטן *C. quadricarinatus*.

מבין שלבי הויטלוגנזה הראשונית נמצא כי בארבעת השלבים הראשוניים צבעה של השחלה לבן חלבי, הציטופלסמה של האאוציט גדלה בנפחה, ישנה הופעה של גרעינונים (nu) בגרעין ומופיעים תאים פוליקולאריים (FC) בהיקף האאוציט. בשלב החמישי (שלב האאוציט הליפדי lipid stage) משתנה צבעה של השחלה לצהבהב כתום עקב הופעת גרנולות ליפידיות (L) באאוציט. זיהוי ליפדי נעשה בצביעת Sudan black. בכל השלבים של הויטלוגנזה הראשונית לא קיימות גרנולות של חלבוני תשמורת בציטופלסמה. אאוציטים בשלבים השישי (שלב החלמון yolk stage) והשביעי נפוצות גרנולות של חלבוני תשמורת (Vt). זיהוי הגרנולות נעשה באמצעות צביעת PAS ו-Sudan black. הציטופלסמה ממשיכה לגדול בנפחה עד לקוטר אאוציט של 1,300 מיקרומטר ויותר. נפחו היחסי של הגרעין קטן והחומר הכרומטיני מתרכז כך שהגרעין מצטייר כמאוד בסופילי (בצביעת המטוקסילין ואאחין).

במהלך התפתחות השחלה (תהליך המכונה ויטלוגנזה) ובמהלך התפתחות העובר היה שינוי בולט בפרופיל הפוליפפטידי (בהפרדות כרומטוגרפיות 7% SDS-PAGE) בשחלה ובביצים (איור 3). פוליפפטידים אלו חולקו לשתי קבוצות עיקריות לפי זמני הופעתם והיעלמותם. קבוצה ראשונה של פוליפפטידים זוהתה לראשונה בשחלה בשלב של

ויטלוגנזה ראשונית (איור 3, בארות A-C). הפוליפפטידים מקבוצה זו היו בעלי משקל מולקולרי יחסית נמוך, מתחת ל-100 kDa. בקבוצה זו בלטו 3 פוליפפטידים במשקל מולקולרי משוער של 95, 86, 75 קילודלטון. רמתם של פוליפפטידים אלו עלתה במהלך הויטלוגנזה השניונית, אך הלכה וירדה במקביל להתפתחות העובר, עד שכמעט ולא הובחנו בסרטנים צעירים (איור 3, באר G). קבוצה שניה של פוליפפטידים זוהתה לראשונה בשחלות במצב של ויטלוגנזה שניונית (איור 3, באר D). קבוצה זו הכילה פוליפפטידים בעלי משקל מולקולרי גבוה יחסית, מעל ל-100 kDa. בקבוצה זו בלטו 3 פוליפפטידים במשקל מולקולרי משוער של 177, 155, 106 קילודלטון. פוליפפטידים אלו נמצאו גם בביצים שרק הוטלו (איור 3, באר E), אך 4 עד 5 ימים לאחר ההטלה נעלמה קבוצה זו של פוליפפטידים (איור 3 באר F) ולא הופיעה עוד.

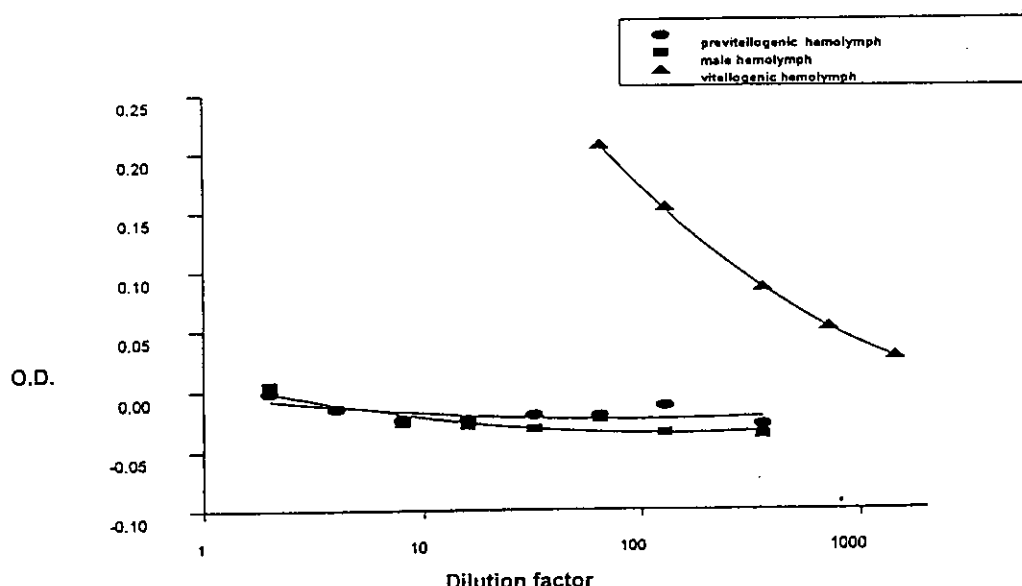


איור מס. 3: הפרדה כרומטוגרפית (7% SDS-PAGE) של פוליפפטידים ממיצוי שחלות במצבים ויטלוגניים שונים (בארות A-D) ומביצים במצבי התפתחות עובריים שונים (בארות E-G).

כנגד פוליפפטידים נבחרים (177, 106, 95 kDa) מכל קבוצה שתוארה לעיל פותחו נוגדנים רב שבטיים בארנבת. מיצוי הפוליפפטיד הנבחר הוזרק לארנבת בנוכחות חלבונים המעוררים את המערכת החיסונית (אדג'ובנט). לאחר שלש הזרקות של האנטיגן הופרד הסרום ונבחנה הריאקטיביות שבין המרכיבים השונים וחלבוני ההמולימפה (בדומה לתהליך שתואר בדו"ח השנה הראשונה). הנוגדנים הללו מתווספים לנוגדן הראשון שפותח בשנה הראשונה ויוכלו לתת לנו מענה מדויק יותר לגבי השפעה אפשרית בשלבי ההבשלה השונים של השחלה.

ג. אפיון חלבון סגולי בחלמון וכימות חלבונים קרום ריאקטיביים בהמולימפה פוסט-פוליפפטיד חדש עם יכולת לקשור קלציום במשקל מולקולרי של 106 kDa התגלה בחלק הליפו-פרוטאיני של חלבוני השחלה. פוליפפטיד זה נצבע בצבע כחול בצביעה של "stains all", צביעה זו מעידה כי ה-106 kDa הינו טעון שלילית. המטען השלילי של פוליפפטיד זה לא נבע מנוכחות של שיירי סוכרים מהמשפחה של ה-sialic acid. מצד שני נמצא כי חלבון זה עובר פוספורילציה וכי כ-30% מתכולת חומצות האמינו שלו הינן בעלות מטען שלילי. כמו כן נמצא כי חלבון זה יכול לקשור קלציום, כאשר הפוליפפטיד הורץ על גבי SDS-PAGE לאחר שנחשף לקושרי מתכות (EDTA, EGTA), נצפה כי הפוליפפטיד הופרד כעת לשני פוליפפטידים שונים בעלי משקל מולקולרי שונה. אך כאשר הפוליפפטיד הורץ על גבי SDS-PAGE לאחר שנחשף לקלציום רק פוליפפטיד אחד נצפה. יתרה מזו, בשיטת ה-calcium overlay, נצפה כי פוליפפטיד זה יכול לקשור קלציום המסומן רדיואקטיבי. בשיטת האימונוהיסטוכימיה, נצפה כי פוליפפטיד זה ממקום אך ורק בביציות במצב מתקדם התהליך הויטלוגנזה (secondary-vitellogenic), מחוקם באופן ספציפי בבועות החלמון של הביצית. פוליפפטיד זה בודד מן הגל ועבר מיצוי חשמלי במטרה לפתח נוגדנים רב שבטיים בארנבת מיצוי הפוליפפטיד הנבחר הוזרק לארנבת בנוכחות חלבונים המעוררים את המערכת החיסונית (אדג'ובנט). לאחר שלש הזרקות של האנטיגן הופרד הסרום מדם הארנבת

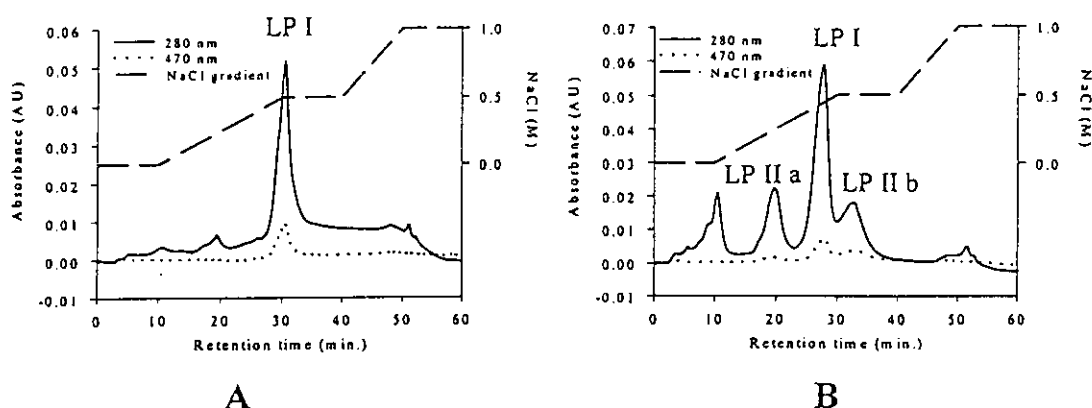
והספציפיות שלו נבדקה באמצעות מבחן דיפוזיה כפול כנגד המולימפה של זכר, נקבה פרה-ויטלוגנית ונקבה ויטלוגנית. המשקע שנוצר העיד על הכרות מובהקת בין הסרום לבין המולימפה מנקבה ויטלוגנית בעוד ששאר מדגמי ההמולימפה לא הגיבו. לאור הממצאים האיכותיים נבנה מבחן ELISA להערכה כמותית של חומר אימונוריאקטיבי בדמן של נקבות. לעריכת מבחן זה יש צורך בכמות מזערית של המולימפה (10 מיקרוליטר) ורגישות גבוהה וביכלתו לזהות רמות נמוכות של חומר (8-10 ננוגרם/מ"ל). באיור מס. 4 מוצגות עקומות מיהול של דוגמאות המולימפה מזכר, נקבה פרה-ויטלוגנית ונקבה ויטלוגנית. נמצא כי בנקבה ויטלוגנית עם העלייה במיהול ההמולימפה התקבלה ירידה בקריאות הצפיפות האופטית. לעומת זו המולימפה מזכרים ונקבות פרה-ויטלוגניות לא הראו אימונוריאקטיביות גם בהעדר מיהול.



איור מס. 4: עקומות מיהול של דוגמאות המולימפה מהמולימפה של זכר, נקבה פרה-ויטלוגנית ונקבה ויטלוגנית במבחן ELISA. (O.D. אורך גל 405 ננומטר)

ד. ליפופרוטאינים סגוליים בהמולימפה  
מהמולימפת הסרטן בודדו שני ליפופרוטאינים, אשר הכילו שייר קרוטנואזי ושייר סוכרי וכונו LP I ו-LP II. פרופיל פוליפפטידי על גבי SDS-PAGE הראה כי LP I מורכב פוליפפטיד יחיד, בן כ- 96 kDa וכי LP II מורכב משתי תתי-יחידות נטיביות דומות, LP IIa ו-LP IIb (איור מס. 5, B), אשר כוללות פוליפפטידים בני 80 ו-177 kDa. LP I נמצא הן בזכרים (איור מס. 5, A) והן בנקבות, ללא קשר למצבן הרבייתי, בעוד ש-LP II נמצא רק בנקבות המצויות בוויטלוגנזה שניונית (איור מס. 5, B). הספציפיות של LP II למצב רבייתי מתקדם זה הוכחה באמצעים שונים, טבעיים ומניפולטיביים: א. מעקב אחר הופעת החלבונים בהמולימפת הנקבות במהלך חודשי הפסקת הרבייה החורפית הראה כי בעיצומו של החורף נעלם הליפופרוטאין ממערכת ההובלה. ב. נעשה שימוש בבלוטה האנדודוגנית, הממלאת תפקיד בהתמיינות זוויתית בסרטנים והידועה כמעכבת את ההתפתחות הנקבית. השתלת הבלוטה בנקבות צעירות הביאה להעדר הליפופרוטאין מן ההמולימפה.

בהמשך, אופיינו חלבונים אלה מבחינה ביוכימית ואף שימשו כאנטיגנים ליצירת נוגדנים לצורך פיתוח מבחן ELISA מסוג תחרותי. מטרת מבחן זה הינה לאפשר את כימותו של הסמן בהמולימפת הסרטן לשם קביעת מצבה הויטלוגני של הנקבה ולשם בחינת השפעת טיפול הורמונלי על ההתפתחות הרבייתית.



איור מס. 5: הפרדת HDL מהמולימפת זכרים (A) ונקבות בוגרות (B), באמצעות HPLC. קו מקווקו מייצג את מפל ריכוזי NaCl. קו רציף מייצג את הבליעה (280 nm), קו מנוקד מייצג את הבליעה (470 nm).

## 2. אופטימיזציה של מערכת ההטלה

### א. צפיפות נקבות

עקב תפוקת ביצים נמוכה להטלה בנקבות crayfish יש להחזיק מספר גדול של נקבות על מנת לייצר מספר משמעותי של צעירים. במכון הטלה, המרחב ונפח המים מהווים גורם מגביל למספר החיות שניתן להחזיק. לפיכך, אחד הגורמים החשובים לתפוקה מקסימאלית של צעירים הוא צפיפות מרבית של נקבות. מחקרים קודמים שעסקו ברביית *quadracarinaratus* בתנאי מכון הטלה השתמשו בטווח צפיפויות בין 6-20 סרטנים למ<sup>2</sup> ויחס זוויגים של זכר אחד ל 1 עד 5 נקבות

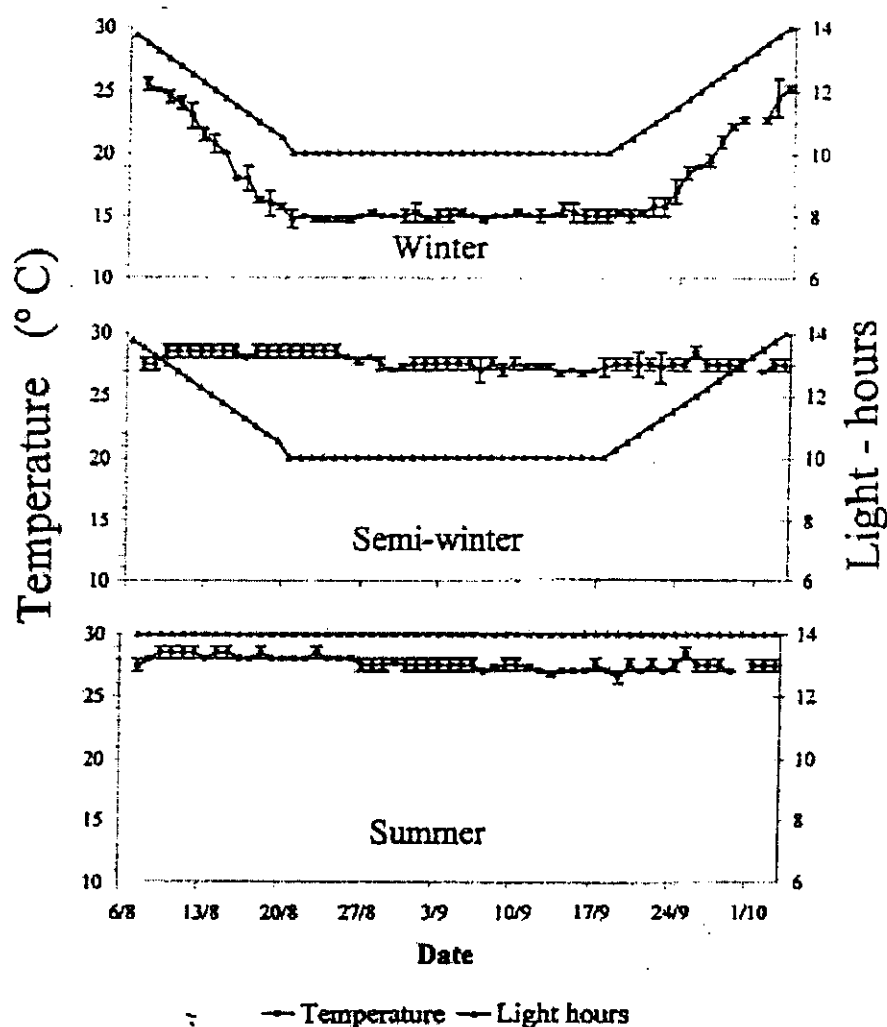
(Yeh and Rouse, 1995; Jones, 1995; Barki et al., 1997; Sagi et al., 1997; Austin, 1998). גם בצפיפות הגבוהה (20 למ<sup>2</sup>) לא נראתה ירידה בפוריות הנקבות. מטרת העבודה היתה לבחון טווח צפיפויות של נקבות גבוה מהדיווחים הקודמים על מנת למצוא צפיפות מרבית לייצור מקסימאלי של צעירים בתנאי מכון הטלה. הניסוי נערך במערכת מים ממוחזרים במיכלי פלסאון (120 ליטר, שטח קרקעית 0.3 מ<sup>2</sup>). בכל מיכל הוכנסו מחסות שתפסו 46% מנפח המים. פרטים לגבי מערכת ההטלות והתנאים הסביבתיים תוארו בעבודות קודמות (Barki et al., 1997; Sagi et al., 1997). נבחנו שלוש צפיפויות שונות ביחס זוויגים קבוע (1:5): 20 למ<sup>2</sup> (הצפיפות הגבוהה ביותר שדווחה), וצפיפות כפולה ומשולשת מזו. כלומר: זכר + 5 נקבות; 2 זכרים + 10 נקבות; 3 זכרים + 15 נקבות, למיכל (0.3 מ<sup>2</sup>). נערך מעקב יומי אחר נשלים ומעקב שבועי אחר הטלות. שלשה שבועות אחרי כל הטלה, הביצים הוסרו, נספרו ונבדקו לחיוניות תחת בינוקולר. הניסוי נמשך 14 שבועות עד אשר כ 30% מהנקבות הטילו שנית. מתוך 69 מנקבות ששרדו לאורך כל הניסוי, 65 הטילו לפחות פעם אחת. לא נמצא הבדל מובהק בין הצפיפויות בשיעור ההטלות לאחר 12 שבועות - 67-75.6% בצפיפויות השונות (מבחן שונויות (ANOVA) חד-כיווני,  $P > 0.05$ ). הטלות שניות החלו בשבוע 11 עם אותו שיעור הטלות בצפיפויות השונות עד שבוע 14 (33-30%). כמו כן, לא נמצא הבדל מובהק בין הצפיפויות במספר הביצים להטלה, שהיה בממוצע  $7.5 \pm 2.7$  לגרם נקבה (ניתוח שונויות משותפות (ANCOVA) תוך ביטול השפעת גודל הנקבה,  $P > 0.05$ ). שיעור הנשלים היה נמוך (20-30%) ודומה ( $P > 0.05$ ) בכל הצפיפויות. על פי הנתונים שהתקבלו בניסוי, פוטנציאל התפוקה של מכון הטלה בצפיפות הגבוהה שנבדקה הנו כ 12000 ביצים ל מ<sup>2</sup> לתקופה של 12 שבועות (אפריל-יוני).

### ב. שינויים בטמפרטורה ותאורה

טמפרטורה ופוטופריודה הינם שני הגורמים הסביבתיים המרכזיים המווסתים את העונתיות של מחזורי הנשל והרבייה בסרטנים במגוון רחב של מינים. נבדקה האפשרות

להססת עונת הרביה לחורף באמצעות סימולציה חלקית ומלאה של תנאי חורף בתקופת הקיץ.

30 נקבות שהטילו לפחות פעם אחת קודם לכן הוכנסו באופן אקראי בתחילת חודש אוגוסט לתקופה של 60 ימים לאחד משלושה צירופים של משטר הארה וטמפרטורה: 1. תנאי תאורה וטמפרטורה של קיץ (14 שעות אור, טמפרטורה  $28-27^{\circ}\text{C}$ ). 2. תנאי חורף למחצה (תנאי טמפרטורה קיץ ותנאי תאורה של חורף- במשך 15 ימים הפחתה הדרגתית של 0.25 שעה ליום של שעות ההארה מ 14 שעות ל 10 שעות, 30 ימים 10 שעות אור ביממה ו 15 ימים תוספת הדרגתית של 0.25 שעה ליום מ 10 ל 14 שעות אור ביממה). 3. תנאי חורף- תאורה כמו ב- 2. הפחתה הדרגתית של הטמפרטורה ל  $15^{\circ}\text{C}$  במשך 15 ימים 30 ימים שמירה על טמפרטורה של  $15^{\circ}\text{C}$  ולאחר מכן עליה הדרגתית ל  $27^{\circ}\text{C}$  במשך 15 ימים (איור 6).



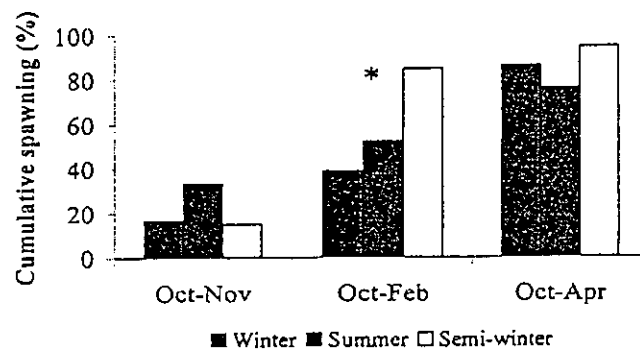
איור מס. 6: משטרי ההארה והטמפרטורה בטיפולים השונים.

במהלך 60 ימי הטיפול הוחזקו הנקבות ללא זכרים ובהזנה בעודף. בתום הטיפול הועברו הנקבות לבדיקת פעילותן הרבייתית במשך תקופה של 7 חודשים. הפעילות הרבייתית נבחנה בתנאי קיץ (טמפרטורה ופוטופריודה), וביחס זכרים לנקבות של 7:1 כל יום נבדקו הנשלים ופעם בשבוע הטלות. כל חיה סומנה באופן אינדיבידואלי באמצעות תג שהודבק לגופה.

לא היה הבדל בשעור ההישרדות, בקצב ההתנשלות ובסה"כ הטלות ראשונות בטיפולים השונים בסיכום שבעת חדשי המעקב. ההטלות הראשונות המצטברות בשלשת



לא היה הבדל בשעור ההישרדות, בקצב ההתנשלות ובסה"כ הטלות ראשונות בטיפולים השונים בסיכום שבעת חדשי המעקב. ההטלות הראשונות המצטברות בשלשת הטיפולים מוצגות באיור מספר 7. בתקופת הסתיו (אוקטובר-נובמבר) לא היו הבדלים מובהקים ברמת ההטלות המצטברות בטיפולים השונים. לעומת זאת בתקופת סתו וחורף (אוקטובר-פברואר) היו ההבדלים מובהקים ( $X^2=10.392$ , d.f.=2,  $P<0.008$ ). בטיפול בתנאי חורף למחצה (פוטופריודה של חורף וטמפרטורה של קיץ) התקבלה עליה בשיעור של פי שלוש בהטלות הראשונות לעומת טיפולי הקיץ והחורף. ייתכן ואפקט זה לא התקבל בטיפול החורף בגלל המרכיב המעקב של הטמפרטורה הנמוכה. היכולת להעתיק עונת הרבייה לחורף באמצעות שינוי במשטר התאורה בלבד הינה קלה ליישום במשקים חקלאיים כך שניתן יהיה לקבל כבר באביב צעירים מאומנים אשר נולדו בחורף.



איור מס. 7: הצטברות הטלות ראשונות בשלושת הטיפולים, בסתיו (אוקטובר-נובמבר), בסתיו-חורף (אוקטובר-פברואר) ובסתיו-חורף-אביב (אוקטובר-אפריל).

### 3. התערבויות אנדוקריניות

#### א. התערבויות כירורגיות

בעבודה זו הוכח שוב כי ההתערבות הכירורגית בגבעול העין הנה שיטה טובה להשריית רבייה בחורף (ראה איור 8 A) אך שיטה זו מתאימה אך ורק לנקבות צעירות וקטנות יחסית, גורמת פגיעה ונזק בלתי הפיכים לנקבות המטופלות וכמו כן היא עתירת עבודה ובשל כך פחות ישימה. לכן המשכנו במאמצינו למצוא שיטת התערבות אנדוקרינית או סביבתית שתביא להשריית רבייה במין זה.

#### ב. החדרת אנלוגים של ההורמון היובילי

##### 1. החדרה באמצעות נשא שומני

מטרת הניסוי הייתה לבחון השפעת רמות שונות של אנלוג ההורמון הנעורים על ההישרדות הנשל והרבייה בנקבות בחורף שזו להם עונת ההטלות הראשונה. הניסוי נערך ב 5 טיפולים. בנוסף ל 3 רמות של ההורמון שהוחדר לנקבות באמצעות הזרקה עם נשא שומני נכללו גם שתי ביקורות. נקבות המוזרקות בנשא השומני בלבד ללא ההורמון ונקבות שעברו בנוסף לכך גם קיסוס גבעול העין, טיפול שנמצא על ידינו כיעיל להקדמת עונת הרבייה בנקבות.

כל טיפול נערך ב 5 מכלים המחוברים לפילטר ביולוגי נפרד כדי למנוע מעבר חומרים מומסים במים בין הטיפולים. בכל מיכל (80 ליטר) הוחזקו 5 נקבות עם זכר אחד. תיאור מפורט של מכלי הניסוי, המחסות, משטר ההאכלה, סימון הנקבות והמעקב היומי והשבועי אחריהן מפורט ב (Barki et al., 1997).

הניסוי הנוכחי נמשך 15 שבועות (אוקטובר - ינואר). תוצאות הניסוי מסוכמות בטבלה 1. בכל הטיפולים הייתה פגיעה קשה ביותר בהישרדות. ההישרדות הממוצעת לטיפול הייתה בשיעור של כ 40%. עיקר התמותות התרחשו בשבוע השני (21.5%) והשלישי (41.5%). במחקרים קודמים באותן מערכות ריבוי התקבלו שיעורי הישרדות שמעל ל 95%. שיעור ההטלות בניסוי זה היה אפסי וכנראה גם הוא

התקבל עקב החשיפה לנשא השומני. בניסויים קודמים שנערכו בחורף במערכות ריבוי אלו בנקבות שעברו קיטוס גבעול העין וזו להם עונת ההטלה הראשונה, התקבלו הטלות בשיעור שמעל ל 60% מהנקבות המטופלות (Sagi et al. 1997).

טבלה מס. 1: השפעת הזרקת אנלוג של הורמון הנעורים מטופרן באמצעות נשא שומני על ההישרדות הנשל והרבייה של נקבות *Cherax quadricarinatus*

הטיפול	הישרדות (%)	הטלות (%)	נשלים (%)
בקורת הזרקת שמן	50.0±25.8	5.0±10.0	10.0±15.5
גבעול העין + הזרקת שמן	20.0±14.1	8.0±11.0	
הורמון רמה נמוכה בשמן	20.0±14.1	0	28.0±17.9
הורמון רמה בינונית + בשמן	40.0±20.0	0	20.0±20.0
הורמון רמה גבוהה + בשמן	68.0±17.9	4.0±8.9	16.0±8.9

2. החדרה דרך המזון

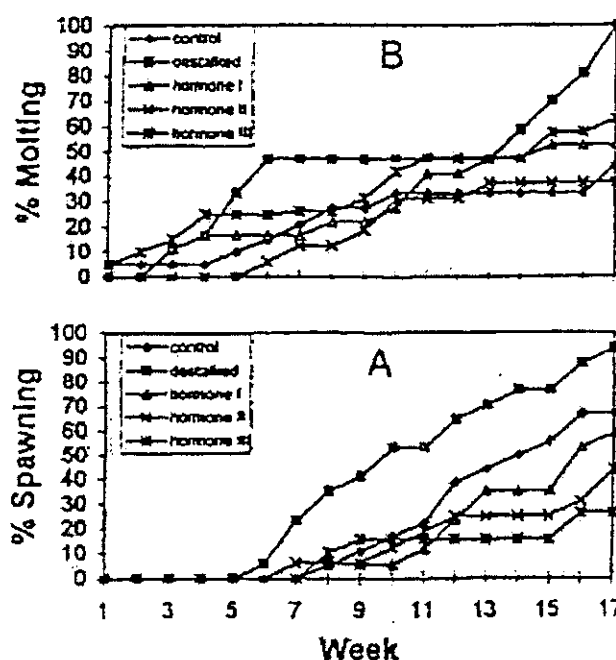
בניסוי החדרת האנלוג של ההורמון היובילי שביצענו בשנה הקודמת נמצא כי הנשא השומני גרם לתמותות ולהטלות הנמוכות שכן בכל הטיפולים כולל הביקורות היו ההישרדות ושיעורי ההטלות נמוכים. כמו כן במהלך הניסוי צפינו בבעיות שומן אשר הצטברו בהמולימפה ולא סולקו. לכן ראינו צורך במציאת שיטת החדרה שונה. בשנה זו בוצעה החדרת ההורמון האנלוגי דרך המזון לפי הפרוטוקול הבא: האנלוג הומס בתחילה בהקסאן, עורבב לאחר מכן באתנול ואז הושרו גרעיני החיטה בתמיסה הנ"ל. לאחר מכן נודפה תמיסה זו בתוך מנדף במשך הלילה, תוך כדי טלטול. רמות האנלוג היו 0.001, 0.01 ו- 0.1 גרם של אנלוג לכל 200 גרם של גרעיני חיטה. בכדי לבדוק את החדרת האנלוג לחיות הניסוי, נאספו רקמות שונות של הסרטנים מקבוצות הטיפול ומהביקורת וכן דגימות ממי המיכלים, ובוצעה בהם בדיקה של גז כרומטורף- מסה ספקטומטרית (Gas chromatograph- mass spectrometry). תוצאות בדיקה זו מסוכמות בטבלה 2. תוצאות בדיקה זו מראות כי ישנה קורלציה בין רמות האנלוג במי מיכלי הטיפולים לבין הרמות השונות של האנלוג בטיפולים. כמו כן נמצא כי האנלוג חדר לרקמות שונות בסרטנים המטופלים בהתאמה לרמות הטיפול. רמות גבוהות של אנלוג נמצאו בזימים ובשחלות, אולם הרמות הגבוהות ביותר נמצאו בהפטופנקריאס.

טבלה מס. 2: נפיצות של האנלוג היציב של ההורמון היובילי שהוחדר לנקבות צידקס ברקמות השונות ובמי מיכלי הגידול.

Treatment	Muscle (µg/g)	Gills (µg/g)	Ovary (µg/g)	Hepatopancreas (µg/g)	Water (µg/g)
Control	0.02	0.04	0.04	0.06	0.0
First level	6.1	7.6	22	100	0.001
Second level	0.48	1.4	6	134	0.014
Third level	2.8	64	27	480	0.02

במהלך הניסוי נבחנה השפעת רמות שונות של אנלוג הורמון הנעורים על ההישרדות, הנשל והרבייה בנקבות בחורף שזו להם עונת ההטלות הראשונה. הניסוי כלל 5 טיפולים. בנוסף ל- 3 רמות של האנלוג שהוחדר לנקבות באמצעות המזון (גרעיני חיטה כמתואר בסעיף הקודם) נכללו גם שתי ביקורות; נקבות שהוזנו בגרעיני החיטה ללא הורמון ונקבות שעברו בנוסף לכך גם קיטוס גבעול העין (כביקורת חיובית ובמינה נוספת של ההתערבות הכירורגית אנדוקרינית). כל חיה הוזנה בגרעיני חיטה מועשרים באנלוג 3 פעמים בשבוע, 2% ממשקל גופה לכל הזנה. כל טיפול כלל 4 מיכלים המחוברים לפילטר ביולוגי נפרד כדי למנוע מעבר חומרים מומסים בין הטיפולים. בכל מיכל (120 ליטר) הוחזקו 5 נקבות עם זכר אחד. תיאור מפורט של מיכלי הניסוי, המחסות, משטר ההאכלה, סימון הנקבות והמעקב היומי והשבועי אחריהן מפורט ב (Barki et al. 1997). השרדות הנקבות היתה גבוהה בכל הטיפולים ולא ירדה מתחת ל 80%. שיעור ההטלות היה גבוה באופן מובהק בטיפול קיטוס גבעול העין (destalked) לעומת שאר הטיפולים משלב

מוקדם יחסית של הניסוי. שעור ההטלות במינון הגבוה של אנלוג ההורמון היה נמוך לעומת הביקורת (איור 2A). הבדל זה היה מובהק מבחינה סטטיסטית החל מהשבוע ה-15. במינון הנמוך והבינוני של האנלוג היתה מגמה של הפחתה בהטלות לעומת ביקורת אך ההבדל לא היה מובהק. בניגוד לשיעור ההטלות, היתה מגמה (לא מובהקת) לשיעור נשלים גבוה יותר בטיפול מינון גבוה של אנלוג ההורמון לעומת הביקורת (איור 8B).



איור מס. 8: שעור מצטבר של הטלות (A) ונשלים (B) במהלך 17 שבועות הניסוי בטיפולים השונים. ביקורת - Control; קיטום גבעול העין - Destalked; רמת אנלוג הורמון נמוכה, בינונית וגבוהה - Hormone I, II, III, בהתאמה.

### ג. סרטונין

בוצעו שלשה ניסויים בהחדרת סרטונין: ניסוי ראשון בוצע באוניברסיטת בן גוריון. מערך הניסוי כלל בקורת ושלושה טיפולים, בקורת אשר קיבלה הזרקה של נשא ההורמונים בלבד (Saline), טיפול ראשון היה הזרקה של מעכב שחרור של סרטונין (5,6-DHT, 5,6-dihydroxytryptamine) בכמות של 15 מיקרוגרם לגרם חיה, טיפול שני היה הזרקה של סרטונין בכמות של 15 מיקרוגרם לגרם חיה וטיפול שלישי כלל הזרקה של סרטונין (15 מיקרוגרם לגרם חיה) ביחד עם מעורר שחרור של סרטונין (Fenfluramine) בכמות של 15 מיקרוגרם לגרם חיה. בכל טיפול היו 10 נקבות בנות חמישה חודשים במשקל ממוצע של 15 גרם. ההזרקות בוצעו ביום הראשון, החמישי והעשירי לניסוי. ביום החמישה עשר לניסוי, נותחו הנקבות. נמדד קוטר ביצית ממוצע וכן GSI. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין הביקורת לבין הטיפולים השונים בכל הפרמטרים.

טבלה מס. 3: ניסוי סרטונין ראשון:

טיפול	מספר נקבות ששרדו (מתוך 10)	GSI	קוטר ביצית (מיקרו-מטר)
ביקורת	7	$2.09 \pm 0.66$	$1125 \pm 225$
מעכב (5,6-DHT)	10	$1.33 \pm 0.29$	$900 \pm 345$
סרטונין	8	$1.31 \pm 0.53$	$895 \pm 300$
סרטונין + מעורר שחרור (Fenfluramine)	9	$1.66 \pm 0.50$	$1027 \pm 325$

ניסוי שני בוצע באוניברסיטת בן-גוריון. מערך הניסוי כלל בקורת ושלווה טיפולים, בקורת אשר קיבלה הזרקה של נשא ההורמונים בלבד (Saline), טיפול ראשון היה הזרקה של סרוטונין בכמות של 15 מיקרוגרם לגרם חיה, טיפול שני כלל הזרקה של סרוטונין בכמות של 25 מיקרוגרם לגרם חיה, וטיפול שלישי כלל הזרקה של סרוטונין בכמות של 50 מיקרוגרם לגרם חיה. בכל טיפול היו 10 נקבות בנות שלווה חודשים במשקל ממוצע של 8 גרם. ההזרקות בוצעו פעם בשבוע במשך חודש. בסוף הניסוי, נותחו הנקבות. נבחנו הפרמטרים שהוזכרו למעלה ולא נמצא כל הבדל משמעותי בין הביקורת לטיפולים.

טבלה מס. 4: ניסוי סרוטונין שני:

קוטר ביצית (מיקרו-מטר)	GSI	מספר נקבות ששרדו (מתוך 10)	טיפול
527±128	0.428±0.152	7	ביקורת
595±225	0.427±0.167	8	סרוטונין (15 מיקרוגרם לגרם חיה)
627±375	0.649±0.517	8	סרוטונין (25 מיקרוגרם לגרם חיה)
525±223	0.374±0.098	8	סרוטונין (50 מיקרוגרם לגרם חיה)

ניסוי שלישי בוצע במכון וולקני. מערך הניסוי כלל בקורת וטיפול אחד, בקורת אשר קיבלה הזרקה של נשא ההורמונים בלבד (Saline), וטיפול אשר כלל הזרקה של סרוטונין בכמות של 50 מיקרוגרם לגרם חיה. בכל טיפול היו 15 נקבות, אשר היו כשבועיים לאחר הטלה ונשאו עליהן עוברים במצב מתקדם. ההזרקות בוצעו פעם בשבוע במשך חודש, בוצע מעקב אחר נשלים והטלות. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין הטיפולים.

טבלה מס. 5: ניסוי סרוטונין שלישי:

מספר ימים עד לנשל	מספר נקבות שהתנשלו	מספר ימים עד להטלת ביצים	מספר נקבות שהטילו	טיפול
39.3±7.5	3	32.5±8.18	10	בקורת
38.5±9.3	4	36.16±8.8	6	סרוטונין

## סיכום ומסקנות

### 1. אפיון מחזור הרבייה ומערכת הרבייה

חיזוי למוכנות להזדווגות בנקבות *Cherax quadricarinatus* המתבסס על תצפית פעילות הנקבה מאפשר זיהוי אמין של השלב הרצפטיבי אך בחלון זמן צר, כלומר ביום ההזדווגות עצמו.

אפיון המחזור הרבייתי מאפשר חלוקה חדשה בין שלבים של ויטלוגנזה ראשונית לבין שלבי התפתחות השחלה לקראת הטלה שהם שלבי הויטלוגנזה השניונית. אין ספק שענינו המרכזי של מחקר זה בשפעול השלב השניוני ולכן התמקדנו באפיון שלב זה ברמת נפישות החלבונים ואופיים הביוכימי וברמת הבקרה האנדוקרינית של התהליך. אכן השלמנו את אפיון המחזור הרבייתי תוך הבחנה מבנית וביוכימית בין שלבים של ויטלוגנזה ראשונית לבין שלבי התפתחות השחלה לקראת הטלה שהם שלבי הויטלוגנזה השניונית. האפיון כלל תיאור של חלבון חדש קושר סידן המהווה סמן לתהליך הויטלוגני השניוני וכן אפיון מדויק של מרכיבי HDL המולימפטיים האופייניים לשלב רבייתי זה. הפוליפפטיד במשקל מולקולרי של 106 kDa נבחר כמועמד ראשון ליצירת נוגדנים ובניית מבחן ה-ELISA. ממחקר זה עולה כי הנוגדן במסגרת מערכת ה-ELISA מהווה כלי ספציפי ורגיש לזיהוי מצבים רבייתיים קיצוניים. כמו כן ניסינו להפיק אנטיגן ישיר מחומרים המולימפטיים אשר רמתם משתנה במהלך מחזור הרבייה (ויטלוגני). השתמשנו במרכיבים חלבוניים ספציפיים לכל אחד משלבי הבשלת השחלות לשם יצירת נוגדנים ובניית מבחן ה-ELISA.

האפיון הדקדקני של מחזור הרבייה הן מנקודת מבט התנהגותית והן מההיבט הפיסיולוגי מהווה אבן דרך בחקר הסרטן האוסטרלי ויהווה בסיס לכל מחקר עתידי בנושאי הרבייה ובקרתה במין זה.

2. אופטימיזציה פיסית של מערכת ההטלה  
ניסוי צפיפות אמהות הראה שבתנאים שבדקנו ניתן להעלות את הצפיפות לפחות פי 3 ממה שדווח בעבודות קודמות, כלומר 54 מטילות + 6 זכרים למ<sup>2</sup>. גם בצפיפות הגבוהה לא נמצאה הפחתה בפוריות הנקבות כך שיתכן וניתן להעלות את הצפיפות מעבר לטווח הנבדק.

נערך ניסיון לניוד עונת החורף והדמיית כניסה ל"אביב" מוקדם תוך התערבות בתנאים הסביבתיים במכון ההטלה כגון פוטופריודה וטמפרטורה. נמצא כי שנוי במשטר התאורה היה מכריע והביא לעליה משמעותית בהטלות חורף. היכולת להעתיק עונת הרבייה לחורף באמצעות שינוי במשטר התאורה בלבד הנה קלה ליישום במשקים חקלאיים כך שניתן יהיה לקבל כבר באביב צעירים מאומנים אשר נולדו בחורף.

3. התערבויות אנדוקריניות  
במהלך מחקר זה הוכח שוב כי ההתערבות הכירורגית בגבעול העין הנה שיטה טובה להשריית רבייה בחורף אך שיטה זו מתאימה אך ורק לנקבות צעירות וקטנות יחסית, גורמת פגיעה ונזק בלתי הפיכים לנקבות המטופלות וכמו כן היא עתירת עבודה ובשל כך פחות ישימה משיטות חשיפה אנדוקריניות שניסו לפתח. למרות זאת במצב הידע הקיים ניתן להמליץ למגדל ליצור אוכלוסייה מטופלת בסמוך לכניסה לחורף כדי להבטיח ייצור צעירים בעת הפסקת הרבייה.  
בניסוי הראשון שנערך בהחדרת האנלוג של ההורמון היובנילי להערכתו הנשא השומני היה הגורם לתמותות ולהטלות הנמוכות שכן בכל הטיפולים כולל הביקורות היו ההישרדות ושיעורי ההטלות נמוכים. כמו כן במהלך הניסוי צפינו בבועות שומן אשר הצטברו בהמולימפה ולא סולקו. לכן היה צורך במציאת שיטת החדרה שונה. פיתחנו שיטה של החדרת האנלוג ההורמונאלי דרך המזון ושיטה זו הוכחה כיעילה מאד. נמצאה כמות גדולה יחסית של האנלוג ההורמונאלי ברקמות שונות לאחר הזנה במזון מטופל. אולם, האנלוג שבו השתמשנו לא הניב את התוצאות המקוות מבחינת רבייה והשפיע בעיקר על קצב ההתנשלות (תוצאה מעניינת בפני עצמה).  
לאור תוצאות אלה זו ופרסומים עדכניים בספרות המקצועית החלטנו לנסות להחדיר חומרים מסוג סרוטונין בהמשך המחקר. שלא כבסרטנים אחרים, הוספת סרוטונין לא גרמה לעליה במספר ההטלות.

## ספרות

- Austin, C.M., 1998. A comparison of clutch and brood size in the red claw, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) and *C. destructor* Clark (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture* 167, 135-145.
- Barkı, A., Levi, T., Hulata, G., Karplus, I., 1997. Annual cycle of spawning and molting in the red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under laboratory conditions. *Aquaculture* 157, 239-249.
- Jones, C.M., 1995. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) (Decapoda, Parastacidae) I. Development of hatchery and nursery procedures. *Aquaculture* 138, 221-238.
- Laufer, H., Biggers, W.J., and Ahl, J.S.B., 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111:113-118.
- Sagi, A., Shoukrun, R., Levy, T., Barki, A., Hulata, G., Karplus, I., 1997. Reproduction and molt in previously spawned and first-time spawning red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* females following eyestalk ablation during the winter reproductive-arrest period. *Aquaculture* 156, 101-111.
- Yeh, H.S., Rouse, D.B., 1995. Effects of water temperature, density, and sex ratio on the spawning rate of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von martens). *J. World. Aquacult. Soc.* 26, 160-164.

1.	מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תור התייחסות לתוכנית העבודה.
א.	אפיון מחזור הרבייה ובניית מבחנים ביולוגיים.
ב.	אופטימיזציה פיסית של מערכת הרבייה ואילוצי רבייה חורפית.
ג.	התערבויות אנדוקריניות ואילוצי רבייה חורפית.
2.	עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
א.	מחזור הרבייה והמערכת הרבייתית אופיינו מבחינה התנהגותית ופיסולוגית.
ב.	נבחנו סוגיות צפיפות הנקבות במערכת ההטלה והשריית רבייה חורפית באמצעות נידוד תקופת החורף באמצעים סביבתיים.
ג.	נבחנו התערבויות אנדוקריניות כירורגיות ופרמקולוגיות בגבעול העין, בהורמונים יובנליים ובסרוטונין.
3.	המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.
א.	העבודה הציגה אבן דרך מדעית במחקר של האספקטים התנהגותיים ופיסולוגיים של מערכת הרבייה במין זה שתהווה בסיס לכל מחקר עתידי.
ב.	הוצגו פתרונות יישומיים לסוגיית האופטימיזציה של המערכת מבחינת צפיפות המטילות, הוכחה אפשרות נידוד תקופת החורף אשר מאפשרת יישום פשוט להשריית הטלות בחורף.
ג.	בוססה השיטה האנדוקרינית הכירורגית לאילוצי רבייה חורפית. פותחה שיטה להחדרת הורמונים יובנליים דרך המזון אך לא נמצאה שיטה פרמקולוגית יעילה להשריית רבייה חורפית.
4.	הבעיות שונות לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן.
א.	בעיית השריית הרבייה בדרך פרמקולוגית לא נפתרה ומצריכה מחקר נוסף. פתרונות המוצאים על ידי מחקר זה לשלב הרבייה מעורבות את הצורך בפיתוח שלב פיסוס יעיל לסרטן.
5.	האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך, מרבית הידע פורסם או בתהליך פרסום (ראה רשימת פרסומים וימי עיון מצורפת). חלקו בהליך יישום במערכת של משק רבייה מסחרי ראשון בערבה.

#### פירוט הפרסומים

1. דו"ח המפרט את תוצאות המחקר נמסר למגדלי הסרטנים וחוקרי המדגה במסגרת כינוס מגדלי הסרטנים אשר נערך בתחנת הניסיונות לחקלאות המים של משרד החקלאות בדור 30/12/97. וכן בכינוס מטעם האגודה לחקלאות מים שהתקיים במעיין צבי בנושא אינטרדוקציה של מינים חדשים למדגה הישראלי אפריל 1999.
2. השפעת הצפיפות על תפוקת ביצים בתנאי מכון הטלה מתוארת במאמר הבא:  
Barki, A., and Karplus, I.. 2000. Crowding female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under small-tanks hatchery conditions: What is the limit?  
*Aquaculture* 181:235-240
3. השיטה הדיאגנוסטית למחזור הרבייה באמצעות ELISA תוארה במאמר הבא:  
Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrun, R., and Weil, S., 1999. A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary vitellogenic specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115:37-45.
4. שיטת הזיהוי ההתנהגותית של נקבות רצפטיביות מתוארת במאמר הבא  
Barki, A., and Karplus, I.. 1999. Mating behavior and a behavioral assay for female receptivity in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *J. Crust. Biol.* 19(3):493-497.
5. המאמר הבא מכיל את התיאור ההיסטולוגי והחלבוני של מחזור הרבייה:  
Abdu, U., Yehezkel, G., and Sagi, A., 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invert. Reprod. Devel.* 37: 75-83.

6. מאמר נוסף נשלח לפרסום בנושא גילוי החלבון החדש קושר הסיזן בנקבות במהלך הויטלוגנזה השניונית.
- Abdu, U., Khalaila, I., Weil, S., and Sagi, A., 2000. Novel phosphopolypeptide with calcium-binding ability in the yolk of the crustacean *Cherax quadricarinatus* (submitted)
7. מאמר נוסף שנשלח לפרסום מתאר חלבונים ספציפיים למחזור הרבייה בהמולימפה של הנקבה.
- Yehezkel, G., Chayoth, R., Abdu, U., Khalaila, I., and Sagi, A., 2000. High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (submitted)