

הקציר הדו"ח:

גידול הבאס המפוספס. הבאס הלבן והמיכלוא ביניהם (מין חדש לגידול בחקלאות המים בישראל) עלול לגרום לחדירה בלתי רבוייה ולרבייה בלתי מבוקשת של דגים אלה בנופי המים הטבעיים במדינה. מניעת הסכנה הנ"ל אפשרית ע"י גידול אוכלוסיה שאינה מסוגלת להתרבות, שפרטיה עקרים או חד-זוויגיים. מטרת המחקר היו לבחון דרכים ליצירת אוכלוסיות המכילות פרטים חד-זוויגיים או טריפלואידיים (עקרים) של מיני באס ומיכלואיהם. המחקר התמקד בעיקר במטרה הראשונה שנראתה בעלל סיכויי הצלחה גבוהים יותר. באבאים חד-זוויגיים של דגים מחקבלים בד"כ מזוויג פרטים נורמליים הומונמטיים עם פרטים הפוכי זויג שהתקבלו מטיפול הורמונאלי להפיכתם לזוויג האחר. במחקר הנוכחי הוחלט כי הנקבות הן הזוויג ההומונמטי (המקרה השכיח בדגים) וקבענו את התנאים המיטביים להפיכת נקבות גנטיות לזכרים באמצעות טיפול במטילטסטוסטרון (MT). לניסויים, שנערכו בתנאי מערכת מים סגורה, שימשו קבוצות דגים באס ומיכלוא באס. הראנו אפשרות לקבל היפוך זויג ע"י שימוש במזון יבש המכיל את ההורמון וכן ע"י העשרה בהורמון של פגיות ארטמיה והאכלת הדגים בהן. בניסויים המוצגים ביותר התקבלו כתוצאה מהטיפול בקבוצות שהכילו 92%-100% זכרים. בעזרת בדיקות היסטולוגיות נקבע כי להצלחת היפוך הזויג, הטיפול בהורמון MT ברך להתחיל בגיל שלפני תחילת התמיינות תאית בגזרה. על-פי התוצאות מומלץ הפרוטוקול הבא להיפוך זויג בבאס המפוספס ומיכלואיו: הזנת הדגים במזון המכיל הורמון MT במינון של 30 מ"ג לק"ג מיום 95 ועד יום 130 מהבקיעה (למכלוא) ומיום 63 עד יום 93 מהבקיעה בבאס המפוספס. כשהדגים במשקל ממוצע של 1 גרם. דגים מקבוצות הטיפול המובלחות (100% זכרים) קרובים כיום לבגרות מינית ויכולים לשמש להכלאות לשם (1) זיהוי זכרים הפוכי-זוויג: (2) זיהוי מנגנון קביעת הזויג בבאס. ניסויים להשריית טריפלואידיה נערכו לשם בביאת התנאים המיטביים לעיכוב החלוקה המיוטית השניה בביצה, המביאה לדיפלואידיזציה של גרעין הביצה ולקבלת טריפלואידים לאחר ההפריה. עקב קשיים באילוף ההטלות בנקבות באס מפוספס נקבעו תנאים מיטביים כדלקמן: בניסויים להשריית ניגונגזה בבאס הלבן בלבד: הלם חום בטמפרטורה של 36 מ"צ, הגיתן 3 דקות לאחר ההפריה למשך 2 דקות, כאשר טמפרטורת מי ההדגה לפני ההלם היא 21-22 מ"צ. המשך ניסויים בהשריית פוליפלואידיה מחייב שיפור בטכנולוגית אילוף הטלות בבאס הנהוגות במדגרות בארץ.

מדינת ישראל / משרד החקלאות ופיתוח הכפר
המדען הראשי

פרויקט פיתוח שלוחות גידול חדשות במדגה

בחינת יעילות היפוך זוויג הורמונאלי וטריפלואידיה למניעת רבייה בלתי מבוקרת
במכלואי באס

**Evaluation of sex inversion and triploidy for prevention of uncontrolled
reproduction in bass hybrids**

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 358-0172-97

מוגש ע"י:

Nina Cherfas

נינה צ'רפס*

Dept. of Aquaculture, A.R.O.

המחלקה למדגה, מינהל המחקר החקלאי

Boris Gomelsky

בוריס גומלסקי

Dept. of Fisheries, Fish & Aquaculture

האגף לדייג, תחנה למדגה וחק' מים, דור

Research Station, Dor

Gideon Hulata

גדעון חולתא*

Dept. of Aquaculture, A.R.O.

המחלקה למדגה, מינהל המחקר החקלאי

Achikam Gisis

אחיקם גיסיס

Fish Hatchery, Kibbutz Hamaapil

מדגרת דגים, קיבוץ המעפיל

Dept. of Aquaculture, A.R.O.

(* המחלקה למדגה, מינהל המחקר החקלאי

P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel

ת.ד. 6, בית דגן 50250

E-mail: VLAQUA@VOLCANI.AGRI.GOV.IL Fax: (+972) 3 9605667 Phone: (+972) 3 9683388 טלפון:

פברואר 1998

מבוא

הצעת המחקר הוגשה על רקע הרצון להרחיב את האזורים בהם ניתן לגדל בארץ את הבאס לבן (*Morone chrysops*), הבאס המפוספס (*M. saxatilis*) והמכלוא ביניהם. בשל היותם אקוטים ובעלי כושר רבייה מוגבל כיום גידול דגים אלה בארץ לאזורי חוף הים התיכון, וזאת מפאת החשש לחדירה, ולו מקרית ובשוגג, של דגים אלה לגופי מים פנימיים ובמיוחד לאגם הכינרת (Kissil, 1996). מניעת יכולתם להתרבותם במקווי מים טבעיים, אם יחדרו אליהם, אפשרית ע"י גידול אוכלוסיות חסרות כושר רבייה. המטרה הכללית של תכנית מחקר זו הייתה בחינת שיטות לקבלת צאצאים חד-זוויגיים או טריפלואידים (עקרים) של דגים אלה שהינם חסרי כושר רבייה.

השלב הראשון בדרך ליצירת צאצאים חד-זוויגיים של דגים הוא היפוך זוויג הורמונאלי, ובהמשך זיווג פרטים הפוכי-זוויג עם פרטים נורמלים מהזוויג האחר (ראה למשל בעבודות קודמות שלנו בדגים אחרים - Rosenstein and Hulata, 1994; Gomelsky et al., 1994; Cherfas et al., 1996). בספרות המקצועית פרסומים בודדים בלבד בנושא זה. הניסיון הראשון לקבלת היפוך זוויג הורמונאלי בבאס המפוספס לא היה מוצלח (Kincaid et al., 1994), ותוצאות חיוביות ראשונות הוצגו במקביל בכנס בינלאומי לגנטיקה בחקלאות מים בקיץ האחרון ע"י Schultz et al. (1997) וע"י קבוצתנו (דיווח ראשוני על תוצאות המחקר הנוכחי). בנושא השריית טריפלואידים במיני באס נערך עד כה מחקר בודד (Kerby et al., 1989) שבו התקבלו צאצאים טריפלואידים של מכלוא באס מפוספס כתוצאה מטיפול בהלם טמפרטורה. בהעדר פרוטוקולים מסודרים להשריית היפוך זוויג וטריפלואידים במיני באס התמקד מחקר זה בניסיון לסגור את פערי הידע בנושא. יש לציין כי בשנות ביצוע המחקר טרם נרכשה מיזמנות מלאה בריכוז מלאכותי של מיני הבאס ומכלואיו ובגידול פגיות בתנאים מלאכותיים במדגרה המסחרית (שיטת הגידול המקובלת היא הוצאת הפגיות לבריכה להזנה על מזון חי טבעי ימים מעטים לאחר הבקיעה).

המחקר התמקד במטרות הבאות:

1. קביעת התנאים המיטביים להשריית היפוך זוויג במיני באס ומכלואי.
2. קביעת התנאים המיטביים להשריית טריפלואידים במיני באס ומכלואי.

עיקר המאמצים הוקדשו למטרה הראשונה, מתוך מחשבה שמטרה זו ניתנת להשגה יותר בקלות. העבודה התנהלה בהתאם לתכנית הראשונית, להוציא סטיות קלות שנבעו מבעיות טכניות שלא נצפו מראש וממאפיינים ביולוגיים של הנושא, כדלקמן:

השריית היפוך זוויג

1. בגלל תמותה מסיבית של דגים גינוגוניים סמוך לאחר בקיעתם, לא התאפשר להסיק על המנגנון הגנטי לקביעת הזוויג בדגים אלה מנתוני הרכב הזוויגים בצאצאים גינוגוניים.
2. ניסויי היפוך זוויג הצטמצמו לקבלת זכרים הפוכי זוויג בלבד, ולא הספקנו לבצע הכלאות מבחן לזיהוי זכרים הפוכי זוויג עקב אי הגעתם לבגרות מינית במהלך תקופת המחקר.

השריית טריפלואידים

נערכו ניסויים לכירורג האפשרות להשריית דיפלואידיזציה של סט הכרומוסומים בביצה. ניסויי ההמשך המתוכננים הופסקו עקב תמותה מסיבית של עוברים ופגיות. בדו"ח זה מוצגים עיקרי התוצאות שהתקבלו. פירוט נוסף ניתן בדיווחים השנתיים ובפרסומים.

תאור המחקר ופירוט הניסויים

הניסויים נערכו במדרגת הדגים בקיבוץ המעפיל, ובתחנה למדגה וחקלאות מים בדור בעונות הרבייה 1995-1997. שיקולי מנהלי המדרגה ותכניות העבודה שלה הכתיבו את זמניות מיני הבאס ומכלואיהם בכל עונה.

קביעת התנאים המיטביים להשריית היפוך זווּיג במיני באס ומכלואי

אופי הטיפול ההורמונאלי המועדף, כלומר קבלת זכרים או נקבות הפוכי זווּיג, תלוי במאפייני המערכת הגנטית לקביעת הזווּיג בדג ובזווּיג המועדף לגידול. בהעדר תשובות לשאלות הנ"ל בחרנו לבחון את האפשרות לקבלת זכרים הפוכי זווּיג, על בסיס ההנחה כי המודל השכיח יותר בדגים של נקבות הומוגמטיות בכרומוסומי הזווּיג מתקיים גם במינים אלה. במיני בהם הנקבה הומוגמטית, מתקבלת מזיווג נקבות רגילות (XX) עם זכרים הפוכי זווּיג (XX) אוכלוסייה חד-זווּיגית כל-נקבית. הניסויים תוכננו לברר את התנאים המיטביים להיפוך זווּיג בעזרת הורמון זכרי (אנדרוגן סינתטי), תוך דגש על מציאת העיתוי הרצוי לחשיפה להורמון. תוכנו שלוש שלבים בעבודה: ניסויים הקדמיים בגידול פגיות של באס על מזון מלאכותי ומזון חי במערכת מים סגורה (1995); ניסויים להשריית היפוך זווּיג לזכרים (1996); גידול לבגרות מינית ובחינה של הפוכי הזווּיג (1996-1997).

בניסויים ההקדמיים נקבעו התנאים לגידול מלאכותי של הדגים במערכות מים סגורות כשהם מחזנים במזון יבש או חי מלאכותיים. בהתאם נערכו בשנת 1996 ניסויים לקבלת היפוך זווּיג. נערכו שלוש ניסויים - בשני הראשונים השתמשנו בדגיגי מכלוא באס לבן X באס מפוספס, ובשלישי בדגיגי באס מפוספס הכוללים באופן נורמלי זכרים ונקבות (ראה פרטים בטבלה 1). היפוך הזווּיג הושג באמצעות חשיפה לאנדרוגן 17 אלפא-מטילסטוסטרון (MT) שניתן בהזנה דרך הפה כשהוא מוסף במזון יבש (במינון של 30 מ"ג לק"ג מזון יבש) או ע"י העשרת פגיות של ארטמיה (*Artemia nauplii*) בהורמון. העשרה זו נעשתה ע"פ השיטה של Martin-Robichaud et al. (1994). לקביעת עיתוי התחלת הטיפול המיטבי ב-MT (המועד בו הגונדה מגיבה להשריה באמצעות ההורמון) טופלו מדגמי דגים במשך כ-5 שבועות במועדים שונים שבין 33 ל-98 ימים מהבקיעה. בכל ניסוי נכללה גם קבוצת ביקורת שגודלה באותם תנאים ומזון מלאכותי (יבש או חי) שלא הוסף לו ההורמון. בזמן הטיפול ההורמונאלי הוחזקו הדגים במערכות מים סגורות שתוארו ע"י Gomelsky et al. (1994). כל מערכת הייתה בנויה משלושה מיכלי פלסטיק (פלסאק) בנפח 120 ליטר, מהם שימשו שנים לגידול הדגים והשלישי כפילטר ביולוגי משותף לשני מיכלי הגידול. טמפרטורת המים (ambient temperature) נעה בתקופות שונות בניסוי בין 21 ל-26.5 מ"צ. בגמר הטיפול במזון המכיל ההורמון הועברו הדגים למיכלי גידול גדולים יותר או לכריכות עפר לגידול עד בגרות מינית.

יעילות הטיפול ההורמונאלי נבדקה על פי ההבדלים ביחס הזווּיגים בקבוצות הטיפול ובקבוצות הביקורת. הנתונים נאספו ע"י תצפיות בדגים מגיל 8-9 חודשים ועד לגיל 21 חודשים. גונדות הוצאו בניתוח ונבדקו המבנה המורפולוגי, הצבע והמשקל, ובמקצת מהדגים נערכה בדיקה היסטולוגית תחת מיקרוסקופ בשיטות סטנדרטיות. התוצאות מוצגות בטבלה 2.

בכל קבוצות הביקורת נמצא (כצפוי) יחס זורגים קרוב ל-1:1 ($P>0.05$). בקבוצות הטיפול בניסוי מספר 1 נמצא יחס זורגים שונה בהתאם למועד התחלת הטיפול. התוצאות הטובות ביותר התקבלו בקבוצה 3 בניסוי 1, בניסוי 2 ובקבוצות 4-2 בניסוי 3. שיעור הזכרים באחוזים בקבוצות אלה היה (בהתאמה) 95.1, 97.2 ו-92.3-100 ($P<0.001$). בקבוצות האחרות לא היה יחס הזורגים באופן מובהק ($P>0.05$) מאשר בקבוצות הביקורת. במקצת מהקבוצות, במיוחד בקבוצות 1 ו-2 בניסוי 1 נמצאו פרטים דו-מיניים.

תוצאות ניסוי 1 (טבלה 2) מראות כי במכלואי באס עולה יעילות הטיפול האנדרוגני עם העלייה בגיל תחילת הטיפול. בקבוצה 3 (ניסוי 1) ובקבוצת הטיפול בניסוי 2, שנחשפו למשטר טיפול דומה, התקבלו תוצאות מוצלחות טובות. בניסוי 3, בבאס המפוספס, התקבלו תוצאות טובות בכל תקופות הטיפול - כלומר משך הזמן בו הגונדה רגישה לטיפול ארוך יותר מאשר במכלוא. אפשר שהכישלון בקבוצה 1 נובע ממינון נמוך של ההורמון כתוצאה מאכילה חלשה של מזון יבש ע"י הבאס המפוספס).

הבדיקות ההיסטולוגיות חשפו מספר מאפיינים של התפתחות הגונדות במהלך היפוך הזוויג. במקצת מקבוצות הטיפול ב-MT נמצאו בבדיקה הראשונה (בגיל 8-9 חודשים) פרטים בעלי גונדות מחרות, שבהן נצפתה רקמת אשך במבנה אופייני לשחלה (איור 1-3). במועדים מאוחרים יותר נצפו רק פרטים בעלי אשכים במבנה נורמלי, ואפשר שבבדיקה הראשונה נצפה שלב מעבר מנקבה לזכר. תוצאה דומה של טרנספורמציה בעקבות טיפול אנדרוגני להיפוך זוויג תוארה גם במינים אחרים (Jensen et al., 1983; Gomelsky, 1985).

הגידול ההדרגתי בערך ה-GSI (אינדקס גונדוסומטי) מצביע על תהליך ההתבגרות בדגים. ה-GSI בזכרים בני 18 חודשים מקבוצות הטיפול ב-MT והביקורת היה 0.11-0.13 אחוז, וכמשך 3 החודשים הבאים עלה ה-GSI בקצב מזורז והגיע לערכים של 0.9-2.1 אחוז בדגים בני 21 חודשים. ערכים אלה דומים לאלה שדווחו לגבי זכרים בשלים לרבייה של באס (Holland et al., 1996). ממצאת מהזכרים בני 21 חודשים בקבוצות הביקורת ומקבוצות הטיפול ב-MT בהן נמצאו מעט נקבות או ללא נקבות בכלל (קבוצה 3 ניסוי 1 וקבוצת הטיפול בניסוי 2) הגיעו לבגרות מינית והפרישו זרע בלחיצה על הבטן שלהם.

התוצאות מצביעות על הצלחה בטיפול להיפוך זוויג אנדרוגני בבאס המפוספס והמכלוא שלו עם הבאס הלבן, ע"י חשיפה דרך הפה ל-MT. על פי התוצאות, בתקופה שלאחר התחלת ההתמיינות האנטומית ולפני ההתמיינות התאית הגונדה רגישה לטיפול ההורמונאלי, ובה יש להפעיל את הטיפול ב-MT לקבלת היפוך זוויג מוצלח. להלן פרוטוקול מומלץ להיפוך זוויג ב-MT בתנאי גידול במערכות מים סגורות:

הזנה במזון יבש מתוסף בהורמון MT במינון של 30 מ"ג לק"ג מזון, במשך חודש, החל מגיל חודשיים בבאס המפוספס, ובמשך כ-5 שבועות, החל מגיל 3 חודשים, במכלוא. בתנאים אלה צפוי לקבל אוכלוסייה המכילה 90-100 אחוז זכרים.

קביעת התנאים המיטביים להשריית טריפלואידיה במיני באס ומכלואי.

ניתן להשרות טריפלואידיה בדגים ע"י עיכוב החלוקה המיטוטי השניה, סמוך לאחר ההפריה, הגורמת להשאת שתי מערכות הכרומוסומים בביצה (דיפלואידית). הדרך היעילה ביותר לקביעת התנאים המיטביים לעיכוב החלוקה המיטוטי השניה היא ע"י השריית גינונגזה, המתקבלת בצורה דומה לנ"ל לאחר הזרעה בזרע שעבר אינאקטיבציה גנטית. במקרה זה ניתן לאמוד את שיעור הצלחת הדיפלואידית של כרומוסומי הביצה באופן מידי על פי שיעור הפגיות החיוניות שמתקבלות, שכן בהעדר דיפלואידית מתקבלים הפלואידים שאינם חיוניים.

הניסויים למציאת התנאים המיטביים להשריית דיפלואידיזציה בביצי באס (כדרך להשריית טריפלואידיה) נערכו בעונת הרכייה 1995 על ביצי הבאס הלבן. לניסויים השתמשנו בתערובת ביצים שהתקבלו ממספר נקבות ובוזרע שנאסף ממספר זכרים של באס מפוספס. הניסויים כללו: (1) קביעת מנת קרינת UV המיטבית לקבלת אינאקטיבציה גנטית של הזרע (כלומר להשריית התפתחות גינוגנטית); (2) קביעת משתני הולם החום המיטביים להשריית דיפלואידיזציה בביצי הבאס הלבן.

קביעת מנת קרינת UV המיטבית לקבלת אינאקטיבציה גנטית של הזרע: במספר ניסויים הקדמיים נמצאה רמת דילול הזרע (1:30) בתמיסה פיזיולוגית (0.85% NaCl) המבטיחה חדירה אחידה של קרינת UV לתמיסה מבלי לפגוע בשיעור ההפריה (גירוי הביצית להיכנס לחלוקה המיטית השניה בגינוגנזה). שיטת הקרנת הזרע הייתה זוה לזו שהשתמשנו בהשריית גינוגנזה בקרפיון (Cherfas et al., 1990) ונבחנה השפעת קרינת UV במינון של 50-1200 ג'אול למ"ר. מנות של ביצים שהוזרעו בזרע מוקרן במינונים השונים פוזרו באופן אחיד על גבי צלחות פטרי עשויות זכוכית ואלה הועברו למערכת הדגרה כשכל צלחת נמצאת בקערת פלסטיק נפרדת (בעלת תחתית מרשת עדינה לאפשר חילוף מים אך לא בריחת הפגיות הבוקעות). הצלחת האינאקטיבציה (ובעקבותיה קבלת צאצאים הפלואידיים) נחשבה קבלת שעור גבוה של סינדרום הפלואידי (עיוותים מורפולוגיים אופייניים), שעור נמוך ביותר של עוברים ופגיות בעלי מורפולוגיה נורמלית של ההורה הנקבי, וכן על פי בדיקה ציטולוגית המבוססת על שיטתם של (Baksi and Means (1988 (טבלה 3, איור 4).

בניסויים הודגם "Hertwig effect" כירידה בתמותת עוברים ועליה בשכיחות היחסית של פגיות בוקעות במנות קרינת UV מעל 100 ג'אול למ"ר. ממצא זה מדגים את העלייה ההדרגתית בשיעור הנזק הנגרם מההקרנה לכרומוסומים בתאי הזרע עם העלייה במנת הקרינה. מרבית העוברים שהתקבלו מהזרעה בזרע שהוקרן כמות שבין 400 ל-1200 ג'אול למ"ר הראו סינדרום הפלואידי אופייני והיו בעלי סט כרומוסומים אחד בלבד (איור 4). נדיר מאד היה למצוא ביניהם פרטים בעלי מורפולוגיה נורמלית של נקבת הבאס הלבן ונעדרו מלאנופורים בעור. אפשר שהופעת אלה נגרמה כתוצאה מדיפלואידיזציה ספונטנית של כרומוסומי הביצה (תופעה מוכרת בדגים, ראה למשל) ולא בהכרח כתוצאה מהקרנה לקויה. על פי תוצאות אלה נבחרה מנת הקרינה של 800 ג'אול למ"ר כזאת שמבטיחה אינאקטיבציה גנטית של הזרע ללא פגיעה ניכרת בכושר ההפריה.

קביעת משתני הולם החום המיטביים להשריית דיפלואידיזציה: דיפלואידיזציה של סט כרומוסומי הביצה הושרתה בעזרת הולם חום שניתן לביצים בזמן החלוקה המיטית השניה סמוך לאחר הזרעתן. משתני ההולם נבחרו בעקבות עבודתם של (Kerby et al. (1989 בהשריית טריפלואידיה במכלוא הבאס המפוספס. בסה"כ נערכו 3 ניסויים ותוצאותיהם מוצגות בטבלה 4. טמפרטורת הולם החום הייתה בין 36 ל-40.1 מ"צ ועיתוי מתן ההולם הייתה 2 או 3 דקות לאחר ההזרעה, בכל הניסויים למשך 2 דקות.

סימן ליעילות הולם החום הייתה עלייה משמעותית בשיעור הפגיות בעלות מורפולוגיה נורמלית, כלומר דיפלואידיזציה, בצאצאים הגינוגנטיים שהתקבלו. הולם חום של 40 מ"צ גרם לתמותת עוברים מוחלטת. הולם חום של 36 ו-38 מ"צ נתן תוצאות חיוביות (ניסויים 2 ו-3). תפוקת גינוגנטים דיפלואידיים הגבוהה ביותר התקבלה מהולם חום של 36 מ"צ שניתן 3 דקות לאחר ההזרעה. תנאים אלה נבחנו שנית בניסוי 4 והתקבלה תוצאה דומה (24.2% גינוגנטים דיפלואידיים - ראה טבלה 4).

תוצאות ניסויי השריית גינוגנזה מצביעות על האפשרות להשריית דיפלואידיזציה מלאכותית של סט כרומוסומי הנקבה בביצי הבאס הלבן באמצעות הלם חום בזמן החלוקה המיטוטי השנייה. כפי שצוין לעיל, יישום הלם חום כנ"ל לאחר הפריה בזרע תקין, ללא טיפול, מאפשרת קבלת טריפלואידים. להלן פרוטוקול מומלץ לקבלת טריפלואידים ו/או גינוגנטים דיפלואידים בבאס הלבן: הפעלת הלם חום בטמפרטורה של 36 מ"צ למשך 2 דקות, בעבור 3 דקות מההפריה, כאשר טמפרטורת מי ההדגרה לפני מתן ההלם היא 21 מ"צ.

סיכום

בניסויים להיפוך זוויג במסגרת מחקר זה נמצאו התנאים לקבלת זכרים הפוכי זוויג של הבאס המפוספס ומכלואי, ויוצרו זכרים כאלה. כמו כן נלמדו שלבי התפתחות השחלה בהקשר לרגישותה להיפוך הזוויג. השלב הבא, אליו לא הספקנו להגיע בזמן שהוקצב, הוא לזהות זכרים הפוכי זוויג (בעלי גנוטיפ נקבי לקביעת הזוויג) באמצעות מבחן צאצאים ע"י זיווגם עם נקבות רגילות של באס מפוספס או באס לבן. מבחן צאצאים זה יאפשר גם להבין את המנגנון הגנטי לקביעת הזוויג במיני הבאס, על פי ניתוח יחסי הזוויגים שיתקבלו - הופעת נקבות בלבד בצאצאי זכרים נבחנים ויחס של 1:1 באלה של אחרים תאושש השערת העבודה כי הנקבות הינן הזוויג ההומוגמטי, בעוד קבלת קבוצות צאצאים מעורבות בלבד, ביחסי זוויגים 1:1 או 3:1 תצביע על הטרוגמטיות של הנקבות. בהתאם ניתן יהיה לנסח מודל ליצירת אוכלוסיות חד-זוויגיות של באס.

בניסויי השריית גינוגנזה נקבע פרוטוקול לדיפלואידיזציה של כרומוסומי הביצה, ובעזרתו ניתן ליצור אוכלוסיות טריפלואידיות (עקרונות) של הבאס ומכלואי. כפי שצוין לעיל נערכו ניסויי השריית דיפלואידיזציה של כרומוסומי הביצה בעונת הרבייה הראשונה. בעונה שאחריה היו תקלות באילוף דגי באס להטיל במדגרת הדגים בקבוץ המעפיל, ואיכות הביצים ו/או הזרע הירודה לא אפשרה קבלת תוצאות בניסויים, כתוצאה מרמת שרידה נמוכה במיוחד לאחר הלם החום. ניסויים בכיוון זה ניתן לבצע רק לאחר ייצוב תנאי הרבייה במדגרה והבטחת קבלת ביצים זרע באיכות גבוהה.

פרסומים של תוצאות המחקר

1. Gomelsky, B., N. Cherfas, A. Gisis and G. Hulata (1997). Induced diploid gynogenesis in white bass, *Morone chrysops*. Poster presented at the 6th International Symp. on Genetics in Aquaculture, June 1997, Stirling, Scotland. Abstract to appear in special issue of *Aquaculture*. (העתק מוקטן של הפוסטר מצורף).
2. Gomelsky, B., N. Cherfas, A. Gisis and G. Hulata (1998). Induced diploid gynogenesis in white bass, *Morone chrysops*. *Progressive Fish-Culturist*, in press.
3. Gomelsky, B., N. Cherfas, A. Gisis and G. Hulata. Hormonal sex inversion in striped bass (*Morone saxatilis*) and white bass (*M. chrysops*) x striped bass hybrids. (In preparation)

ספרות מצוטטת

- Baksi, S.M. and J.C. Means (1988). Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. *J. Fish Biol.*, 32:321-325.

- Cherfas, N.B., O. Kozinsky, S. Rothbard and G. Hulata (1990). Induced diploid gynogenesis and triploidy in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. 1. Experiments on the timing of temperature shock. *Isr. J. Aquaculture - Bamidgeh*, 42:3-9.
- Cherfas, N.B., S. Rothbard, G. Hulata and O. Kozinsky (1990). Spontaneous diploidization of maternal chromosome set in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Appl. Ichthyol.*, 7:72-77.
- Gomelsky, B.I. (1985). Hormonal sex inversion in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ontogenez*, 16:398-405 (in Russian with English summary).
- Gomelsky, B., N.B. Cherfas, Y. Peretz, N. Ben-Dom and G. Hulata (1994). Hormonal sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 126:265-270.
- Holland, M.C., C.C. Mylonas and Y. Zohar (1996). Sperm characteristics of precocious 1-year-old male striped bass *Morone saxatilis*. XXXX
- Jensen, G.L., W.L. Shelton, S.L. Yang and L.O. Wilken (1983). Sex reversal of gynogenetic grass carp by implantation of methyltestosterone. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 112:79-85.
- Kerby, J.H., J.M. Hinshaw and M.T. Huish (1989). Induction of triploidy in hybrid striped bass using thermal shock and comparative growth between diploid and triploid offspring. *J. World Aquacult. Soc.*, 20:47A (abstract).
- Kincaid, H.L., J.H. Kerby, R.M. Harrell and J.G. Geiger (1994). Initial attempts to affect sex reversal in striped bass. p. 79 in 5th International Symp. On Genetics in Aquaculture, Halifax, Canada - Book of Abstracts.
- Kissil, G.W. (1996). Aquaculture in Israel. *World Aquaculture*, 27:25-30.
- Martin-Robichaud, D.J., R.H. Peterson, T.J. Benfey and L.W. Crim (1994). Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) using 17 α -estradiol-enrichment *Artemia* as food. *Aquaculture*, 123:137-151.
- Rosenstein, S. and G. Hulata (1994). Sex reversal in the genus *Oreochromis*. Optimization of feminization protocol. *Aquacult. Fish. Manage.*, 25:329-393.
- Schultz, J.R., W.V. Heukelem and R.M. Harrell (1997). Sex reversal striped bass (*Morone saxatilis*) to create all-male population. Poster presented at the 6th International Symp. on Genetics in Aquaculture, June 1997, Stirling, Scotland. Abstract to appear in special issue of *Aquaculture*.

טבלה 1. פרטי טיפולי MT בניסויי היפוך הזורג

חזרה	תקופת הטיפול ^a (ימים)	משך הטיפול (ימים)	אופן החשיפה להורמון	מספר דגים התחלתי ² סופי ¹	שרידה (%)	משקל התחלתי ² סופי ¹	ממוצע (ג)
ניסוי מספר 1. מכלוא באס לבן x באס מפוספס (קבוצה 1)							
1	64-34	30	ארטמיה	460	135	29.3	0.51
2	97-67	30	מזון יבש	110	61	55.5	0.72
3	128-98	30	מזון יבש	77	76	98.7	4.70
בקורת				460	126	27.2	0.55
ניסוי מספר 2. מכלוא באס לבן x באס מפוספס (קבוצה 2)							
1	132-92	40	מזון יבש	100	91	91.0	9.80
בקורת				100	87	87.0	10.9
ניסוי מספר 3. באס מפוספס							
1	63-33	30	מזון יבש	250	36	14.4	0.67
2	63-33	30	מזון יבש	250	203	81.2	1.00
3	93-33	60	יבש+ארטמיה	92	70	76.1 ¹	7.40
4	93-63	30	מזון יבש	90	87	85.6	10.1
בקורת 1				250	39	15.6	0.75
בקורת 2				250	209	83.6	1.05

^a (ימים אחרי בקיעה)² (בתחילת הטיפול האנדרוגני ב-MT)¹ (בסיום הטיפול)¹ (במשך הטיפול האנדרוגני במזון (ימים 93-63 מהבקיעה)

טבלה 2. תוצאות ניסויי היפוך זווית אנדרוגני.

	קבוצות ניסוי 3				קבוצות ניסוי 2		קבוצות ניסוי 1			
	1	2	3	4	ב*	1	1	2	3	ב*
מספר דגים נבדקים	16	13	18	17	42	41	49	25	36	55
מספר זכרים	10	12	18	17	20	39	26	15	35	24
אחוז זכרים	63	92	100	100	48	95	53	60	97	44
משקל ממוצע** (ג)										
כל הדגים	203	103	233	187	138	655	727	197	139	300
זכרים בלבד	200	100	233	187	134	655	682	203	136	304
GSI בזכרים** (%)	0.09	0.03	0.20	0.18	0.08	2.14	1.31	0.08	0.79	0.11
\pm s.d.	0.02	0.01	0.15	0.06	0.013	0.22	0.46	0.01	0.48	0.21
גיל הדגים בבדיקה										
אחרונה (חדשים)	11	8	8	8	14	21	21	14.5	13	18

(* קבוצת ביקורת

(** בבדיקה האחרונה

טבלה 3. תוצאות הדגרת ביצי באס לבן שהוזרעו בזרע שהוקרן בקרינת UV במנות שונות.

מנת קרינת UV	מספר ביצים	שיעור הפריה (%)	שיעור תמותה לפני בקיעה (%)	דגיגים שבקעו מספר	דגיגים נורמליים מספר
ג'אול למ"ר				(%)	(%)
0	874	86.6	30.1	585	453
50	471	90.0	69.4	57	0
100	611	83.3	56.8	162	1
400	436	60.6	18.8	306	1
800	483	60.0	10.4	302	2
1200	143	26.6	35.0	84	0

(*) מסה"כ הביצים המופרות

(²) זוהתה כפגית מכלוא על פי הופעת פיגמנטציה

(³) זוהו כבאס לבן על פי העדר פיגמנטציה

טבלה 4. תוצאות ניסויי הלם חום שניתנו לביצי באס לבן*

טיפוס הצאצאים	טמפ' הלם החום (מ"צ)	מספר ביצים	שיעור שרידה (%) ²	מספר עוברים חיים	דגיגים נורמלים שבקעו מספר % ³
ניסוי 2. הלם חום 3 דקות לאחר הזרעה					
ביקורת ¹	ללא הלם	552	58.1	321	249
גינוגנטים	ללא הלם	646	25.1	162	8
גינוגנטים	36.0	751	30.2	227	88
גינוגנטים	38.2	1107	1.5	17	4
גינוגנטים	40.1	--	0.0	0	0
ניסוי 3. הלם חום 2 דקות לאחר הזרעה					
ביקורת	ללא הלם	693	30.2	209	147
גינוגנטים	ללא הלם	1013	14.3	145	6
גינוגנטים	36.0	1901	9.4	178	39
גינוגנטים	38.2	960	7.2	69	5
גינוגנטים	40.1	--	0.0	0	0
ניסוי 4. הלם חום 3 דקות לאחר הזרעה					
ביקורת	ללא הלם	842	34.2	274	82
גינוגנטים	36.2	3496	14.0	491	119

* ניסויים 2 ו-3 נערכו אחד אחרי השני, תוך שימוש באותם ביצים חרע. אפשר שאיכות הביצים ו/או הזרע ירדה עד זמן

ביצוע הניסוי השני (3).

² נקבע 24 שעות לאחר ההזרעה.

³ מסה"כ מספר העוברים החיים 24 שעות לאחר ההזרעה.

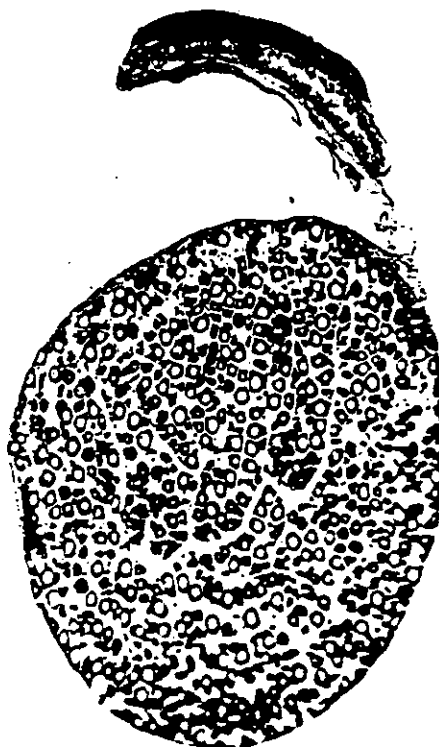
¹ הזרעה בזרע ללא

² לא נספרו

איור 1. חתך בשחלה של נקבה בת 9 חדשים מקבוצת הביקורת (ניסוי 1).

ביציות בשלב התפתחות II.

1



איור 2. אשך של זכר בן 9 חדשים מקבוצת הביקורת (ניסוי 1).

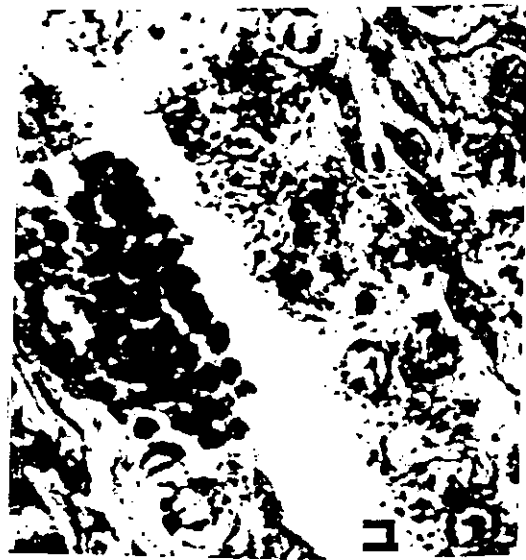
א. חתך

ב. צינוריות זרע : ספרמטוגוניה וצבר ספרמטוציטים ראשוניים.

2



א



ב

איור 3. "אשך" של זכר הפוך זורג בן 9 חדשים מקבוצת טיפול ב-MT מספר 3 (ניסוי 1).

א. התך

ב. צינוריות זרע: ספרמטוגוניה וצבר ספרמטוציטים ראשוניים.

3



א

ב

איור 4. תמונות כרומוסומים במטפזה של פגית מכלוא מקבוצת הביקורת ושל פגית הפלואידית גינוגנטית של באס לבן (הכנת המחקן הציטולוגי ע"פ (Baski and Means 1988)).

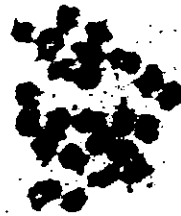
א. פגית מכלוא דיפלואידית ($2n=48$).

ב. פגית הפלואידית גינוגנטית ($n=24$).

4



א



ב

Induced diploid gynogenesis in white bass, *Morone chrysops*

Boris Gomelsky, Nina Cherfas, Achikam Gisis and Gideon Hulata

* Ministry of Agriculture and Rural Development, Department of Fisheries, Fish and Aquaculture Research Station, Dor, M.P. Hof Hacarmel, 30820 Israel

* Agricultural Research Organization, Institute of Animal Science, Department of Aquaculture, Dor, M.P. Hof Hacarmel, 30820 Israel

* Fish Hatchery, Kibbutz Hamaapil, Israel

* Agricultural Research Organization, Institute of Animal Science, Department of Aquaculture, P.O. Box 6, Bat Dagan 50250 Israel

INTRODUCTION

White bass (*Morone chrysops*), striped bass (*M. saxatilis*) and their hybrids are new objects of Israeli aquaculture. The cultivation of these fish is limited to the Mediterranean coastal area, due to danger of their accidental penetration and uncontrolled reproduction in inland natural water reservoirs. This problem may be solved by rearing unisexual or sterile progenies. Investigations on chromosome set and sex manipulations in *Morone* species were initiated to achieve these solutions. We report here results of a study aimed at the determination of optimal parameters for induction of diploid meiotic gynogenesis in the white bass.

DETERMINATION OF OPTIMAL DOSE OF UV IRRADIATION FOR SPERM GENETIC INACTIVATION

Small portions of white bass eggs were inseminated with irradiated (at increasing UV doses) striped bass sperm and incubated on Petri dishes to hatching. The optimal UV dose had to satisfy two criteria: provide genetic inactivation of sperm at the highest fertilization rate.

Results of incubation of white bass eggs inseminated with UV-irradiated striped bass sperm

UV dose (J/m ²)	No. of fertilized eggs	Fertilization rate (%)	Mortality prior to hatching (%)	Total hatchlings (no.)	Normal hatchlings (%)	Normal hatchlings (no.)	Hatchlings (%)
0	874	86.6	30.1	585	68.9	453	51.8
50	471	90.0	69.4	57	12.1	0	0.0
100	611	83.3	56.8	162	26.5	1*	0.1
400	438	60.6	18.8	306	70.2	1*	0.2
800	483	60.0	10.4	302	82.5	2*	0.4
1000	143	28.6	35.0	84	58.7	0	0.0

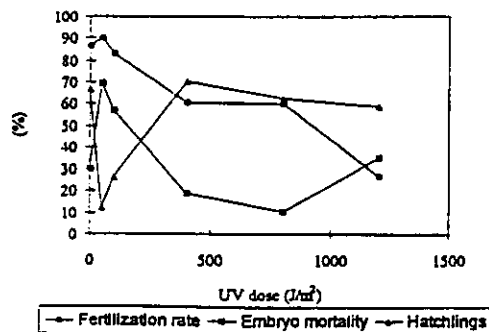
* From the total no. of fertilized eggs.

* Identified as hybrid larvae according to pigmentation type.

* Identified as white bass larvae according to the lack of melanophores.

The main indications of genetic inactivation of irradiated sperm were "Hertwig effect" and haploid syndrome in hatched embryos. Hertwig effect was manifested at doses higher than 100 J/m² as a decrease in embryo mortality and increase in relative number of hatchlings.

'Hertwig effect' in white bass embryos



Embryos obtained at doses 400-1,200 J/m² developed the typical haploid syndrome and had haploid chromosome number.



The metaphase plates of control hybrid and putative gynogenetic white bass larvae

a - hybrid diploid larvae, 2n=48 b - gynogenetic haploid larvae, n=24

DETERMINATION OF OPTIMAL HEAT SHOCK CONDITIONS FOR PRODUCTION OF MEIOTIC DIPLOID GYNOGENES

Three types of progenies were produced for this aim: 1. regular intact control; 2. no-shocked gynogens; and 3. shocked gynogens.

The following parameters of heat shock were investigated:

- shock temperature: from 36 to 40°C
- timing: 2 or 3 min after insemination
- shock duration: 2 min

Portions of white bass eggs inseminated with intact or irradiated (800 J/m²) sperm of striped bass were incubated on Petri dishes to hatching.

The results of heat-shock experiments

Type of progeny	Shock Temperature (°C)	Total number of eggs	Survival rate (%)	Live embryos (no.)	Normal (no.)	hatchlings (%)
Timing: 3 min after insemination *						
Control	no shock	932	38.1	321	248	77.5
Gynogens	no shock	646	25.1	162	6	4.5
Gynogens	36.0	971	30.2	227	86	36.7
Gynogens	38.2	1107	1.5	17	4	23.5
Gynogens	40.1	no data	0.0	0	0	0.0
Timing: 2 min after insemination *						
Control	no shock	982	35.1	328	147	70.3
Gynogens	no shock	1073	14.3	145	6	4.1
Gynogens	36.0	1921	8.4	178	38	21.9
Gynogens	38.0	980	7.2	69	5	7.2
Gynogens	40.1	no data	0.0	0	0	0.0
Timing: 3 min after insemination *						
Control	no shock	842	34.2	274	82	28.9
Gynogens	no shock	692	24.4	168	0	0.0
Gynogens	38.2	3488	14.0	491	119	24.2

* 24 hours after insemination.

* From the number of live embryos at 24 hours.

* Pre-shock water temperature 22.2°C.

* Pre-shock water temperature 21.9°C.

Effectiveness of heat-shock was indicated by the significant increase in the number of maternal type diploid larvae. Such larvae were morphologically normal and had no melanophores of paternal type (contrary to pigmented control hybrids). The best results were obtained at heat shock of 36°C when the high output of diploid gynogens was combined with high post-shock embryo survival.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The following protocol can be recommended for the production of diploid meiotic gynogens in the white bass:

To induce sperm genetic inactivation: UV-irradiation of sperm (diluted at 1:30 in 0.85% NaCl) at a dose of 800 J/m².

To induce diploidization of female chromosome-set: heatshock of 36.0°C for 2 min, initiated 3 min after insemination (for pre-shock water temperature of 21-22°C).

3. סיכום חדש לדוחות מחקר 1997

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. תודה.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
קביעת התנאים המיטיבים להיפוך זריג בנקבות באס ומכלואיהם; השריית טריפלואידיה במיני באס.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
ניסויים להיפוך זריג באמצעות טיפול בדגיגים במזון המכיל 17α -methyltestosterone נקבע פרוטוקול לקבלת זכרים הפוכי זריג בבאס המפוספס ובמכלואי באס.
ניסויים לעיבוד החלוקה המינית השניה בעוברים של הבאס הלבן נקבע פרוטוקול להשריית טריפלואידיה במק זה.

3. מסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.
השלב הבא המתבקש במחקר הוא ביצוע הכלאות מבחן עם הדגים הפוכי הזריג על מנת לברר את מנגנון קביעת הזריג ובעזרת ידע זה לנסח מודל לקבלת צאצאים חד-זריגיים של באס.

4. הבעיות שנתרו לפתרון ואו השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים);
התייחסות המשך המחקר לגביהן.

ניסויים להיפוך זריג הורמונאלי נערכו בדגים דו-מיניים (נורמלים) בלבד עקב תמותת הצאצאים הגינוגנטיים שהתקבלו.
שיפור בטכנולוגיית הרבייה של דגי הבאס נחוץ בכדי לבצע ניסויים נוספים לקבלת צאצאים גינוגנטיים ופוליפלואידים של דגי באס. הצלחה בקבלת צאצאים גינוגנטיים תאפשר גם ביצוע היפוך זריג בצאצאים חד-זריגיים.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מסי פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
תוצאות ביניים הוצגו כפוסטר בכנס בינלאומי, מאמר אחד התקבל לדפוס (טרם פורסם) ושני עומד להישלח לעיתון אחר.