



2000-2002

תקופת המחקר:

857-0403-02

קוד מחקר:

Subject: YIELD ENHANCEMENT IN THE AUSTRALIAN CRAYFISH *CHERAX QUADRICARINATUS* BY POPULATION, GENETIC AND ENDOCRINE MANIPULATIONS.

Principal investigator: SAGI AMIR

Cooperative investigator: GIDON HULATA, KARPLUS ILAN

Institute: Ben-Gurion University of the Negev

שם המחקר: שיפור בתפוקת הפיטום האינטנסיבי של הסרטן האוסטרלי *Cherax quadricarinatus* באמצעות מניפולציות אוכלוסיות, גנטיות ואנדוקריניות

חוקר ראשי: אמיר שגיא

חוקרים שותפים: גדעון חולתא, אילן קרפלוס

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

תקציר

מטרת המחקר לפתח טכנולוגיה לפיטום אינטנסיבי של סרטנים מהירי גדילה. מהלך המחקר כלל ניסיון ליצירת אוכלוסיות חד זוויגיות תוך שימוש במניפולציות אנדוקריניות וגנטיות בקבוצות הורים, ובחינת קצבי הגידול של מקטעים שונים באוכלוסייה בתנאי פיטום אינטנסיביים.

המחקר התנהל בארבעה מישורים: א. בחינת ביצועי גדילה של זכרים בתנאי הדמיה של מערכת אינטנסיבית בגדלי תא משתנים. הוכח כי לזכרים יתרון במערכת של תאים מבודדים אך תאים קטנים גורמים לעיכובי גדילה ומוצע גודל תא מיטבי. ב. ניסיון גידול במערכת משק אינטנסיבית הוכיח חשיבות להפרדה ומניעת אינטראקציות אך הגדילה במשק המודל לא הגיע לביצועי מערכת ההדמיה. ג. מבחינת תרומת האינטראקציה החברתית לגדילה נמצא כי מגע פיזי הכרחי וכי גירויים כימיים, ויזואליים ושילוב של השניים כשמקורם בסרטנים גדולים אין בהם כדי לעכב גדילתם של סרטנים קטנים. אין לצפות לעיכובי גדילה במערכת גידול אינטנסיבית בתנאי שימנע מגע פיזי בין הסרטנים הגדלים בתאים סמוכים. ד. ניסיונות להיפוכי זוויג נערכו בדיאטרמיה ובהסרה כירורגית של הבלוטה האנדרוגנית מפרטים אינטרסקסואליים. שרידות הפרטים הייתה קטנה. מספר פרטים הראו סימנים של היפוכי זוויג מושלמים והועברו להמשך רבייה. תוך כדי המהלך נחשף מנגנון קביעת הזוויג הגנטי בסרטנים WZ ZZ כאשר הזכר הומוגמטי. ה. נמשך, אך לא הגיע לסיומו תהליך זיהוי של גורם אנדוקריני הגורם לזכריות תוך ביצוע תרבית איבר של הבלוטה האנדרוגנית וניקוי תוצרי הפרשה ב- HPLC ו- SDS-PAGE.

דוח לתכנית מחקר 857-0403-00

שיפור בתפוקת הפיטום האינטנסיבי של הסרטן האוסטרלי *Cherax quadricarinatus* באמצעות מניפולציות אוכלוסייתיות, גנטיות ואנדוקריניות.

Yield enhancement in the Australian caryfish *Cherax quadricarinatus* by population, genetic and endocrine manipulations

דו"ח מדעי מסכם מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

פרופ' אמיר שגיא המחלקה למדעי החיים, אוניברסיטת בן גוריון בנגב, באר שבע

ד"ר אסף ברקי, פרופ' אילן קרפלוס ופרופ' גדעון חולתא המחלקה למדגה, מינהל המחקר החקלאי.

Amir Sagi Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, P.O.Box 653,

Beer-Sheva 84105, Israel E-mail: sagia@bgumail.bgu.ac.il

Assaf Barki, Karplus Ilan, Hulata Gideon

Department of Aquaculture, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization,

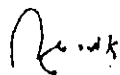
The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet-Dagan 50250, Israel

E-mails: barkia@volcani.agri.gov.il, karplus@agri.gov.il, vlaqua@agri.gov.il

פברואר 2003

אדר א' תשס"ג

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים



חתימת החוקר

תקציר

מטרת המחקר לפתח טכנולוגיה לפיטום אינטנסיבי של סרטנים מהירי גדילה. המחקר כלל ניסיון ליצירת אוכלוסיות חד זוויגיות תוך שימוש במניפולציות אנדוקריניות וגנטיות בקבוצות הורים, ובחינת קצבי הגידול של מקטעים שונים באוכלוסייה בתנאי פיטום אינטנסיביים. המחקר התנהל בארבעה מישורים: א. בחינת ביצועי גדילה של זכרים בתנאי הדמיה של מערכת אינטנסיבית בגדלי תא משתנים. הוכח כי לזכרים יתרון במערכת של תאים מבודדים אך תאים קטנים גורמים לעיכובי גדילה ומוצע גודל תא מיטבי. ב. ניסיון גידול במערכת משק אינטנסיבית הוכיח חשיבות להפרדה ומניעת אינטראקציות אך הגדילה במשק המודל לא הגיע לביצועי מערכת ההדמיה. ג. מבחינת תרומת האינטראקציה החברתית לגדילה נמצא כי מגע פיזי הכרחי וכי גירויים כימיים, ויזואליים ושילוב של השניים כשמקורם בסרטנים גדולים אין בהם כדי לעכב גדילתם של סרטנים קטנים. אין לצפות לעיכובי גדילה במערכת גידול אינטנסיבית בתנאי שימנע מגע פיזי בין הסרטנים הגדלים בתאים סמוכים. ד. ניסיונות להיפוכי זוויג נערכו בדיאטרמיה ובהסרה כירורגית של הבלוטה האנדרוגנית מפרטים אינטרסקסואליים. שרידות הפרטים הייתה קטנה. מספר פרטים הראו סימנים של היפוכי זוויג מושלמים והועברו להמשך רבייה. תוך כדי המהלך נחשף מנגנון קביעת הזוויג הגנטי בסרטנים WZ ZZ כאשר הזכר הומוגמטי. ה. נמשך, אך לא הגיע לסיומו תהליך זיהוי של גורם אנדוקריני הגורם לזכריות תוך ביצוע תרביית איבר של הבלוטה האנדרוגנית וניקוי תוצרי הפרשה ב- HPLC ו- SDS-PAGE.

במסגרת החדרת הסרטן האוסטרלי *Cherax quadricarinatus* כמוצר יצוא במדגה הישראלי

הגיעו המשקים (עין-יהב וצופר) לשלב פיתוח מערכות הפיטום. מאחר ושלב הפיטום הוא שלב עתיר השקעה, בכדי להבטיח את הצלחתו והרחבת החדרת הגידול למשקים נוספים, חיוני לבצע מהלך מחקרי רלוונטי שיתרכז בשיפור קצב הגידול של אוכלוסיית הסרטנים שתבחר לשלב הפיטום. מהלך זה יגדיל את היבול ליחידת פיטום וישפר את רווחיותו. ממחקר קודם שביצענו שלא בתנאים אינטנסיביים עולה כי קצב הגידול של סרטנים זכרים עולה באופן משמעותי על זה של נקבות, אך גם באוכלוסיות הזכריות קיימים מקטעים בעלי קצבי גידול שונים (Sagi et al., 1997a). כמו כן יש משמעות לאינטראקציות חברתיות.

ממחקרים שנערכו בתחנת המחקר בדור עולה כי יבול הבריכות שבהם גודלו זכרים בלבד עלה על יבול שהושג בגידול משותף. נתון חשוב נוסף הוא ש 15.3% מהזכרים הגיעו למשקלים של מעל 100 גר' לעומת 0.4% מהנקבות (Sagi et al., 1997a). ביצענו בחינה של האמור לעיל בתנאי פיטום אינטנסיביים בשתי שנות המחקר הראשונות במערכת הדמיה של הגידול האינטנסיבי בתאים מבודדים, במדולים של שבע קומות גידול.

פיטום חד זוויתי זכרי מקובל במערכות אינטנסיביות של גידול בעלי חיים במשק החקלאי. בגידול סרטנים נראה כי שיטת המיון הידנית הנה עתירת עבודה ויש להחליפה בטכנולוגיה שבמסגרתה ייוצרו אוכלוסיות חד זוויות תוך היפוך הזווית. אנו מציעים פיתוח שיטה הנסמכת על עבודות קודמות שלנו בסרטנים (Sagi et al., 1990), וכן על סדרה של תוצאות שקיבלנו לאחרונה במסגרת מחקרנו ב- *Cherax*: אוכלוסיית הסרטן האוסטרלי הנדון מורכבת מזכרים ונקבות בעלי מופעים שונים ותפקוד מיני שונה, אך ניתן למצוא באוכלוסיות הסרטנים גם סימנים למידה מסוימת של פלסטיות זוויתית בצורת פרטים המציגים דו-מיניות חלקית (אינטרסקס). מחקרים בפרטים אינטרסקסואליים אפשרו את איתור הבלוטה האנדוקרינית הדומיננטית המעודדת התפתחות זכרית ומעכבת הבשלת הגונדות הנקביות (Khalaila et al., 1999). בהמשך עבודתנו ביצענו הכלאות בין פרטים נורמאליים ופרטים אינטרסקסואליים (Khalaila, pers. comm.) ומתוצאות ראשוניות הוצע מודל הורשת זווית שבו הזכר בסרטן זה הומוגמטי והנקבה הטרוגמטית (Hulata and Sagi, unpublished). מודל זה דומה למודל שהוצע בעבר על ידי חוקרים בסרטנים אחרים (Katakura et al., 1989; Malecha, 1992). במידה ותיאוריה זו נכונה הרי שהכלאות בין זכרים נורמאליים לבין זכרים מהופכי מין יתנו אוכלוסיית צאצאים חד זוויתית זכרית. בעבר הצלחנו להגיע להיפוכי מין פונקציונאליים בסרטן אחר (Sagi et al., 1997b), ובמחקרנו האחרונים ב- *Cherax* הצלחנו לגרום להבשלת שחלה וניוון מערכת המין הזכרית בפרטים אינטרסקסואליים (שהם זכרים פונקציונאליים) על ידי הסרת הבלוטה האנדוקרינית (Khalaila et al., 1999). לצורך זה התאמנו התערבות מיקרוכירורגית מהירה.

מטרות המחקר:

- א. בחינת ביצועי גדילה של זכרים בתנאי הדמיה של מערכת אינטנסיבית בתאים מבודדים בגדלים שונים בקומות.
- ב. בחינת ביצועי גדילה בתנאי המשק במערכת מסחרית של גידול בתאים נפרדים.
- ב. בחינת השפעות חברתיות על גדילה: (1) עוצמת עיכובי הגדילה החברתית ובחינת קיומה של הגברת גדילה בין צמדי סרטנים שוני גודל. (2) בחינת חשיבות אופי המגע בין הסרטנים והמודליות החושית המעורבת בהשפעות החברתיות על הגדילה.
- ג. ניסיונות להיפוכי זווית בדיאטרמיה ובהסרה כירורגית של הבלוטה האנדרוגנית מפרטים אינטרסקסואליים.
- ד. זיהוי של גורם אנדוקריני המופרש מהבלוטה האנדרוגנית והגורם לזכריות.

פירוט הניסויים והתוצאות

א. בחינת ביצועי גדילה של זכרים בתנאי הדמיה של מערכת אינטנסיבית

תיאור מערכת הגידול

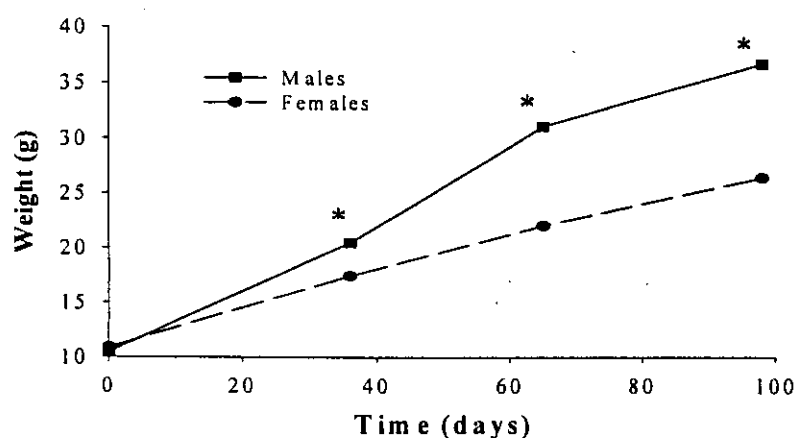
מערכת הגידול בניסויים אלה כללה 126 תאים בודדים, שהוצבו בבריקה, ששטח הקרקעית שלה היה 3 מטר² ועומק המים בה היה 1 מטר. המערכת כללה 18 יחידות, כאשר כל יחידה הכילה 7 תאים עגולים נפרדים באותו הגודל שהיו מוצבים אחד מעל השני. כל יחידה הייתה מורמת 20 ס"מ מקרקעית הבריקה. הקירות והתחתית של כל תא היו עשויים מפוליפרופילן מחורר, כדי להבטיח זרימה חופשית של מים. אל כל תא, שגובהו היה 11 ס"מ, הגיע צינור האכלה אישי שהיה עשוי מ-PVC וקוטרו היה 2.1 ס"מ. טמפרטורת המים נשמרה $27 \pm 3^\circ \text{C}$. איכות המים הובטחה על ידי סחרור של כל נפח המים דרך ביופילטר של 0.3 מ³ כל שעה. הביופילטר הכיל גרגרי פוליפרופילן בקוטר 3 מ"מ. תחלופת המים הייתה 10% ליום. ניקוי התאים נעשה על ידי הזרמת מים דרך צינורות ההאכלה וסיפון של קרקעית הבריקה פעמיים בשבוע. המדדים הבאים נמדדו פעמיים בשבוע: ניטריט (פחות מ- 1 ppm), ניטראט (פחות מ- 50 ppm), pH (8.0 ± 0.5) וחמצן (6.5 ± 1 מ"ג לליטר). מזון שכלל כופתיות תערובת דגים (בכל יום) וגרעיני חיטה (פעמיים בשבוע) ניתן לכל תא פעמיים ביום דרך צינור ההאכלה האישי. כמות המזון לסרטן ליום חושבה על פי 4% ממשקל הפרט הגדול ביותר בניסוי. הסרטנים נשקלו (± 0.01 גרם) כפעם בחודש והתוצאות מוצגות כממוצע \pm סטיית התקן. קצב הגדילה חושב על פי המשוואה $\text{growth rate} = (W_t - W_i) / t$. הנתונים מבוטאים כממוצע \pm סטיית התקן (SD). ניתוח סטטיסטי נעשה על ידי שימוש ב two way analysis of variance) ANOVA, ערכי P נמוכים מ- 0.05 נחשבו למובהקים סטטיסטית.

ניסוי 1- גדילה של זכרים ונקבות בתאים נפרדים

בניסוי זה יחידות של 3 קטרים שונים מוקמו באופן אקראי בבריקה, כשהקטרים היו: 25 ס"מ (התאים הגדולים), 20 ס"מ (התאים הבינוניים) ו- 16 ס"מ (התאים הקטנים) שנתנו את שטחי

הקרקעית 490.9, 314.2 ו- 201.1 ס"מ², בהתאמה. שישים ושלוש נקבות ו- 63 זכרים במשקל גוף ממוצע של 10.7 ± 1.1 גרם נאספו ממערכת אימון במשק בן במושב צופר שבערבה. כל סרטן אוכלס בתא נפרד במערכת הגידול למשך 98 ימים, ממרץ עד יולי. זכרים ונקבות אוכלסו לסירוגין בכל אחת מ- 18 היחידות ופרט לכך פיזור הסרטנים היה אקראי. המשקל הממוצע של הזכרים בניסוי זה היה גבוה יותר באופן מובהק ממשקלן הממוצע של הנקבות מהיום ה- 36 של הניסוי. יתרון זה נשמר עד לסוף הניסוי ($p < 0.001$, איור 1). ביום ה- 36 של הניסוי, המשקל הממוצע של הזכרים היה 20.5 ± 5.0 גרם, בעוד שמשקלן הממוצע של הנקבות היה 17.4 ± 3.5 גרם. בסוף הניסוי המשקלים הממוצעים היו 36.6 ± 11.6 גרם עבור הזכרים ו- 26.4 ± 6.9 גרם עבור הנקבות. בזמן זה פיזור המשקלים של הזכרים היה רחב יותר ונע בין 16.2 ל- 73.1 גרם, בעוד שמשקל הנקבות נע בין 13.7 ל- 48.6 גרם.

איור 1- גדילה של זכרים ונקבות בתאים נפרדים לאורך תקופה של 98 ימים

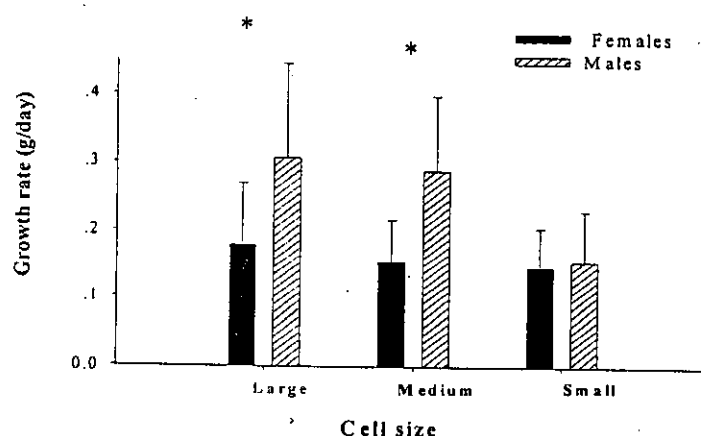


לגודל התא היתה השפעה מובהקת על משקלי הזכרים והנקבות. יחד עם זאת, מנקודת מבט חקלאית-כלכלית ההבדלים בין משקלי הנקבות בגדלי התאים השונים הם זניחים. ניתוח סטטיסטי הראה השפעה מובהקת של גודל התא כבר אחרי 36 ימים, כאשר המשקל הממוצע היה גבוה יותר בתאים הגדולים והבינוניים לעומת המשקל הממוצע בתאים הקטנים ($p < 0.01$). במהלך הניסוי לא היה הבדל מובהק בין משקלי הזכרים בתאים הגדולים והבינוניים. בסוף הניסוי המשקל הממוצע של הזכרים בתאים הגדולים היה גבוה באופן מובהק ממשקלם בתאים הקטנים (40.6 ± 12.7 ו- 29.7 ± 7.1 גרם בהתאמה).

קצב הגדילה של הסרטנים הזכרים היה באופן מובהק גבוה יותר מקצב הגדילה של הנקבות, ללא התייחסות לגודל התא (איור 2). קצב הגדילה המינימלי היה 0.06 גרם ליום עבור הזכרים ו- 0.04 גרם ליום עבור הנקבות וקצב הגדילה המקסימלי היה 0.64 ו- 0.39 גרם ליום עבור הזכרים והנקבות בהתאמה. קצב הגדילה הושפע באופן מובהק מגודל התא (איור 2). קצב הגדילה של הזכרים בתאים

הגדולים והבינוניים היה גבוה באופן מובהק ($p < 0.05$) מקצב הגדילה של הזכרים בתאים הקטנים 0.18 ± 0.09 , 0.29 ± 0.11 , 0.31 ± 0.14 גרם ליום, בהתאמה). קצב הגדילה של הנקבות היה 0.14 ± 0.06 , 0.15 ± 0.06 , 0.19 ± 0.07 גרם ליום, עבור התאים הגדולים, הבינוניים והקטנים, בהתאמה.

איור 2- קצבי הגדילה של זכרים ונקבות בתאים נפרדים בגדלים שונים לאורך תקופה של 98 ימים



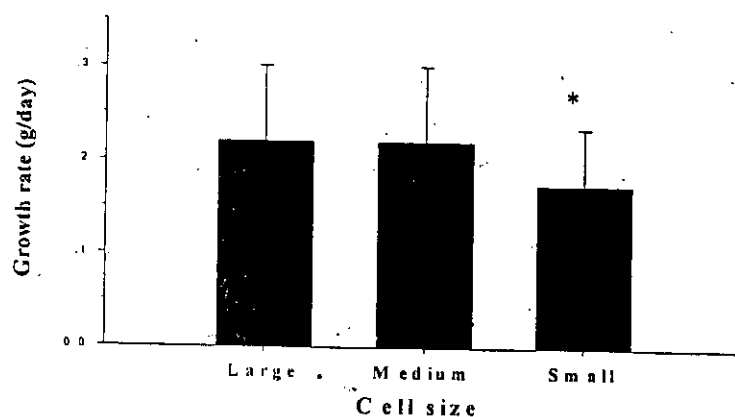
במהלך הניסוי מתו זכר אחד ושתי נקבות, דבר המייצג שרידה דומה וגבוהה של 98.4% (עבור הזכרים) ו-96.8% (עבור הנקבות).

ניסוי 2- השפעות גודל התא ומיקומו במערכת הגידול על הגדילה של זכרים בתאים נפרדים

לאור ממצאי הניסוי הראשון, שהראו שקצב הגדילה של הזכרים גבוה יותר באופן מובהק מקצב הגדילה של הנקבות, ניסוי שני תוכנן על מנת לבחון את הגדילה של הסרטנים ואת השפעות גודל התא ומיקומו על זכרים שגודלו באותה מערכת גידול. מאה עשרים ושישה זכרים של הסרטן

C. quadricaratus במשקל ממוצע של 23.2 ± 3.4 נאספו מבריכה באוניברסיטת בן גוריון בנגב בבאר שבע. כל סרטן אוכלס בתא נפרד למשך 206 ימים, מאוגוסט עד מרץ. הזכרים פוזרו באופן אקראי בין התאים. המשקלים וקצבי הגדילה הושוו בין גדלי התא השונים ובין הקומות השונות. בדומה לניסוי 1, קצבי הגדילה הממוצעים של הזכרים בתאים הבינוניים והגדולים (0.22 ± 0.08 גרם ליום) היה גבוה באופן מובהק ($p < 0.05$) לעומת קצב הגדילה הממוצע בתאים הקטנים (0.17 ± 0.06 גרם ליום). קצב הגדילה נע בין 0.05 ל-0.38 גרם ליום (איור 3).

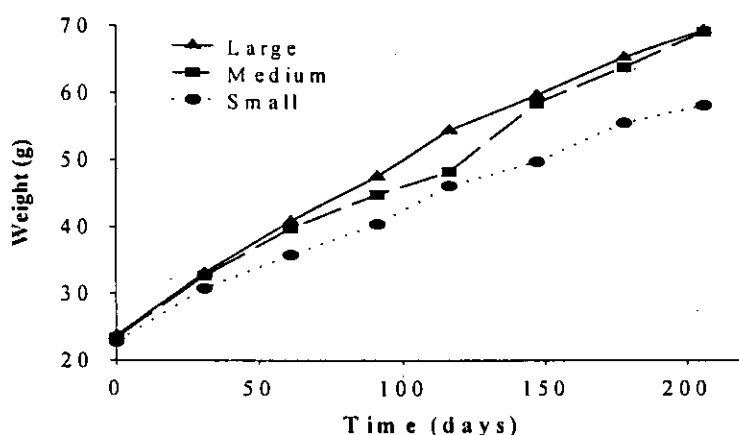
איור 3- קצבי הגדילה של זכרים בתאים נפרדים בגדלים שונים לאורך תקופה של 206 ימים



בדומה לממצאים בניסוי 1, לגודל התא היתה השפעה ניכרת על משקל הזכרים (איור 4). המשקל הממוצע של הזכרים בתאים הגדולים נעשה גבוה יותר באופן מובהק ביחס למשקלם הממוצע בתאים הקטנים מהיום ה- 91 לניסוי ונשאר גבוה יותר באופן מובהק עד סוף הניסוי ($p < 0.05$). בסוף הניסוי המשקל הממוצע של הזכרים בתאים הגדולים היה 69.28 ± 15.72 גרם ושל הזכרים בתאים הקטנים היה 58.11 ± 12.66 גרם. לעומת זאת, המשקל הממוצע של הזכרים בתאים הבינוניים נעשה גבוה יותר באופן מובהק ממשקלם בתאים הקטנים רק מהיום ה- 147 לניסוי ($p < 0.05$) ובשלב זה לא היה שונה באופן מובהק ממשקל הזכרים בתאים הגדולים.

המשקלים של הזכרים ביום ה- 206 לניסוי נעו בין 35.8 ל 108.4 גרם.

איור 4- גדילה של זכרים בתאים נפרדים בגדלים שונים לאורך תקופה של 206 ימים



נראה כי המיקום האנכי של התאים השפיע על קצב הגדילה של הזכרים. קצב הגדילה של הזכרים בתאים התחתונים (0.272 ± 0.89 גרם ליום) היה גבוה יותר באופן מובהק ($p < 0.01$) בהשוואה לקצב הגדילה בתאים העליונים (0.158 ± 0.57 גרם ליום).

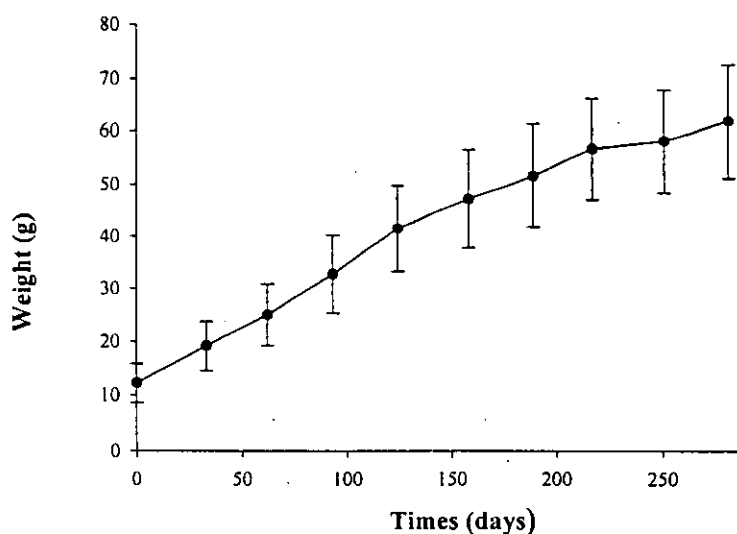
במהלך הניסוי מתו בסה"כ 34 זכרים, נתון שמייצג הישרדות של 73.0%. נראה כי פיזור התמותה היה מקרי בגדלי התאים השונים.

ניסוי 3- תצפית מסכמת- מגודל אימון עד גודל שיווק- גדילה של זכרים שמקורם מאותה ההטלה בתאים גדולים בלבד

בניסוי זה נערכה תצפית על הגדילה של סרטנים זכרים בתאים גדולים בלבד. בניגוד לניסוי 1, שלא השלים גדילה עד למשקל המתאים לשיווק, ובניגוד לניסוי 2, שהחל במשקל ממוצע גבוה יחסית, ניסוי זה כלל את טווח המשקלים מסוף תקופת האימון ועד למשקל המתאים לשיווק. בכדי לשמור על אחדות הפרטים בתצפית הועברה נקבה בוגרת נושאת ביצים למיזופ ערבה. כחודשיים לאחר שחרור

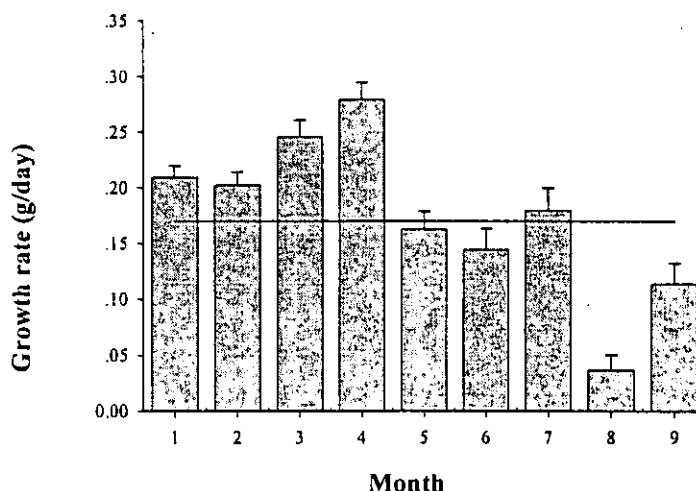
הצאצאים הפרדנו בין הזכרים לנקבות והזכרים גודלו במערכת אימון. כשלושה חודשים לאחר השחרור אוכלסו מאה עשרים ושישה מהזכרים, במשקל ממוצע של 12.22 ± 3.66 . כל סרטן אוכלס בתא נפרד למשך 281 ימים, מאוקטובר עד יולי. הזכרים אוכלסו בתאים באופן אקראי ונשקלו כפעם בחודש. חושבו קצבי הגדילה וערכי ה-SGR הכללי והחודשי והמשקלים הושוו בין הקומות השונות. בניסוי זה המשקל הממוצע של הזכרים בתחילת הניסוי היה 12.22 ± 3.66 גרם ובסוף הניסוי, לאחר 281 ימים, היה 61.25 ± 9.83 גרם (איור 5).

איור 5- גדילה של זכרים בתאים נפרדים לאורך תקופה של 281 ימים



בבדיקת המשקלים של הזכרים בקומות השונות לא היה הבדל מובהק סטטיסטית בין הקומות השונות. קצב הגדילה הכללי של הזכרים בניסוי זה, המתואר בקו המאוזן, היה 0.17 ± 0.04 גרם ליום, בעוד שקצב הגדילה החודשי השתנה מאד במהלך חודשי הניסוי (איור 6). קצב הגדילה הגבוה ביותר (0.28 ± 0.17 גרם ליום) היה בחודש הרביעי, בין ינואר לפברואר, כאשר בחודש זה המשקל הממוצע של הזכרים עלה מ 32.75 ± 7.43 גרם ל 41.5 ± 8.24 גרם. לאחר החודש הרביעי חלה ירידה בקצב הגדילה החודשי, כאשר בחודש השמיני, בין מאי ליוני, נמדד קצב הגדילה הנמוך ביותר (0.04 ± 0.15 גרם ליום). בחודש זה המשקל הממוצע של הזכרים עלה מ 56.52 ± 9.69 גרם ל 57.99 ± 9.80 גרם.

איור 6- קצב הגדילה החודשי והכללי של זכרים בתאים נפרדים לאורך תקופה של 271 ימים



בסוף הניסוי משקל הסרטן הנמוך ביותר היה 33.8 גרם ומשקל הסרטן הגבוה ביותר היה 89.7 גרם. ההישרדות בניסוי זה היתה 91.27% ונראה כי פיזור התמותה היה אקראי.

סיכום

הניסוי הראשון הראה שזכרים גדלים בקצב מהיר יותר מנקבות במערכת גידול זו של תאים נפרדים. בתאים הגדולים פוטנציאל הגדילה של הזכרים היה כמעט כפול מפוטנציאל הגדילה של הנקבות. תוצאות אלה מציעות שבגידול חד זוויגי כל זכרי התפוקה יכולה היות גדולה ב- 25%, ביחס לתפוקה של האוכלוסיה המעורבת. בניסויים הראשון והשני לא ניכר עיכוב גדילה בטווח המשקלים שנבדקו בתאים הגדולים והבינוניים, עובדה התומכת בכך שגודלי תאים אלה הם אופטימאליים או אף גדולים מידי. בתאים הקטנים ניכר עיכוב של הגדילה. התצפית המסכמת מדגימה את ביצועי הגדילה של זכרים בתאים גדולים בלבד, מהגודל של סוף תקופת האימון ועד למשקל המתאים לשיווק.

ב. בחינת ביצועי גדילה בתנאי המשק במערכת מסחרית של גידול בתאים נפרדים (Battery culture system)

אחת הבעיות המרכזיות בשלב הפיטום של סרטנים מקבוצת ה crayfish היא הצפיפות המוגבלת בה ניתן לגדלם (בצפיפות גבוהה מעוכבת גדילת הסרטנים) והפחתים הנגרמים ע"י אינטרקציות וקניבליזם בין הסרטנים. פתרון אפשרי לבעיה זו הוא גידול הסרטנים במערכת תאים בודדים. בניסוי מעבדה מקדים (ראה ג') הראנו שעייכוב גדילה מתרחש כאשר קיים מגע פיזי מלא, בעוד שקשר ויזואלי או כימי בלבד אינו משפיע. עובדה זו תומכת בהתאמתו של הצ'רקס לגידול במערכת תאים בודדים בו נמנעת אפשרות לקשר פיסי אך לא ויזואלי או כימי.

בשנים האחרונות הוקם פרויקט במשק יוסי בן במושב צופר בתמיכת המדען הראשי של משרד החקלאות לפיטום סרטני צ'רקס במערכת תאים נפרדים. ערכנו 2 ניסויים משלימים במטרה לבחון את ביצועי הגדילה במערכת זו באתר חוות הגידול.

תיאור המערכת

המערכת בנויה יחידות רבועיות, כל יחידה כוללת 144 תאים בסידור של 9 קומות, 16 תאים (4X4) בקומה. שטח התא הבודד הוא 484 ס"מ. לכל תא פתח כניסת מזון משלו. היחידות ממוקמות בטור בתוך מיכלים ארוכים וצרים עם סיחרור מים מקצה אחד לקצה השני והשבתם דרך ביופילטר, וכן אבני אויר לכל אורך המיכל.

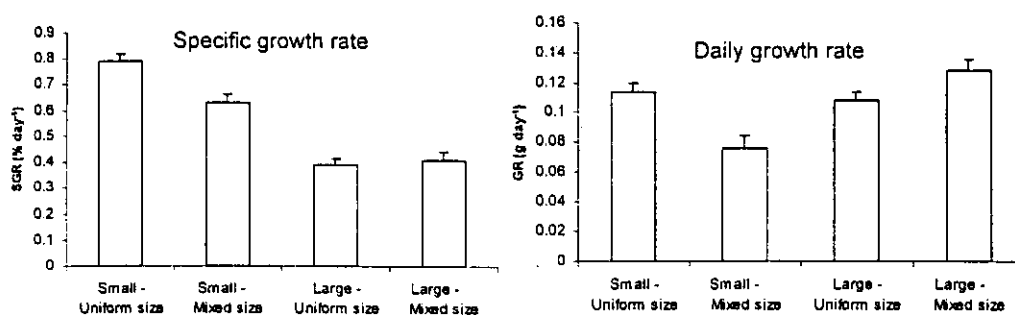
ניסוי 1

מטרת הניסוי: לבחון את השפעת הגורמים הבאים על הגדילה: גורם א - גודל הסרטנים (קטן או גדול); גורם ב - גודל יחסי של הסרטן השכן (הרכב כלוב אחיד גודל או מעורב); גורם ג - הקומה בכלוב; גורם ד - מיקום בתוך הקומה (חיצוני או פנימי).

שיטות: הניסוי כלל 3 יחידות כלובים שאוכלסו בזכרים בלבד. שתי יחידות אוכלסו בסרטנים אחידי גודל, אחת בסרטנים קטנים והשניה בגדולים (גודל התחלתי 1.5 ± 8.8 ו 5.3 ± 23.1 גר', בהתאמה, $n=144$), והיחידה השלישית אוכלסה באופן מעורב במספר שווה של גדולים וקטנים ($n=72$) לסרוגין, באופן שכל סרטן קטן היה מוקף אופקית ואנכית בסרטנים גדולים וכל סרטן גדול מוקף בסרטנים קטנים. הניסוי נמשך 3 חדשים והופסק בסוף נובמבר לאחר שטמפרטורת המים ירדה מתחת ל 21 מעלות. נערכו שקילות חודשיות של כל סרטן ונערך מעקב אחר ההשרדות. קצב הגדילה היומי (GR) וקצב הגדילה הספציפי (SGR) חושבו עבור סרטנים ששרדו עד סוף הניסוי והנתונים נותחו במבחן שונות (ANOVA) עם 4 הגורמים העיקריים ואינטרקציות בין גורם א ל- ב ובין גורם ג ל- ד.

תוצאות: שעורי ההשרדות היו 82.6% ו 68.8% עבור גדולים וקטנים בהתאמה בכלובים אחידי הגודל, ו 84.7% בכלוב המעורב (עם מספר דומה של קטנים וגדולים - 60 ו 62 פרטים). קצבי הגדילה מתוארים באיור 1. קצבי הגדילה הממוצעים בטיפולים השונים לא עלו על 0.14 גרם ליום (GR) ו 0.9% ליום (SGR). בניתוח הסטטיסטי על קצב הגדילה הספציפי (SGR) נמצאה השפעה מובהקת גם לגודל הסרטן ($F_{1,305}=108.1, P<0.001$) וגם להרכב גודל הסרטנים בכלוב ($F_{1,305}=8.5, P<0.01$). נמצאה גם אינטרקציה מובהקת בין שני גורמים אלו ($F_{1,305}=12.4, P<0.001$) אשר הראתה שרק סרטנים קטנים הושפעו על ידי הרכב הסרטנים בכלוב. הגדילה של סרטנים קטנים היתה פחותה בכלוב המעורב לעומת הכלוב האחד (איור 7). גורם הקומה השפיע אף הוא על קצב הגדילה בכלוב המעורב לעומת הכלוב האחד (ביותר בקומה התחתונה לעומת שאר הקומות. אולם לא נמצאה השפעה מובהקת למיקום בתוך הקומה (חיצוני או פנימי) על קצב הגדילה.

תוצאות הניתוח עבור קצב הגדילה היומי (GR) הראו תמונה דומה בכללותה. אמנם לא נמצאה השפעה מובהקת לגורם הרכב הסרטנים בכלוב, אולם נמצאה אינטרקציה מובהקת בין גורם זה לגודל הסרטן ($F_{1,305}=17.7, P<0.001$) שהראתה קצב גדילה נמוך יותר בכלוב המעורב לעומת אחיד הגודל אצל הסרטנים הקטנים אך לא אצל הגדולים (איור 7), כפי שנמצא עבור מדד הגדילה SGR.



איור 7. קצב גדילה ספציפי וקצב גדילה יומי של סרטנים זכרים במערכת תאים נפרדים לפי גודל הסרטן (small; large) והרכב הסרטנים ביחידת הכלוב (uniform size; mixed size).

ניסוי 2

מטרת הניסוי: בחינת הקשר בין הגדילה לנוכחות סרטנים בתאים צמודים ואנכית.

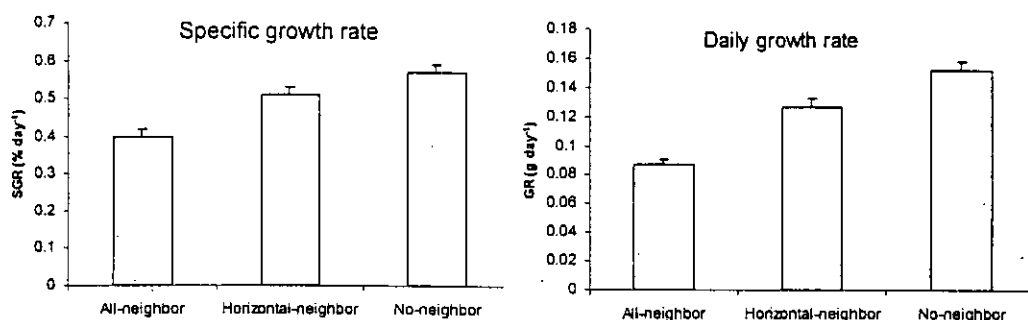
שיטות: הניסוי כלל 3 יחידות כמתואר בניסוי 1.

הכלובים אוכלסו בסרטנים זכרים (16.5 ± 4.6 גר') לפי הטיפול הבאים:

טיפול א: שכנים צמודים אופקית ואנכית – כלוב מאוכלס במלואו ($n=144$); טיפול ב: שכנים צמודים אופקית בלבד – קומות מאוכלסות במלואן (5) ולא מאוכלסות (4) לסירוגין ($n=80$); טיפול ג: ללא שכנים צמודים – כל קומות מאוכלסות בחציין כלוח שחמט, כל דופן של תא מאוכלס גובלת עם תא ריק ($n=72$).

הניסוי נמשך 5 חדשים במהלכם נערכו שקילות חודשיות של כל סרטן. כדי לשמור על מספר שכנים קבוע, סרטנים שברחו או מתו הוחלפו באחרים. רק סרטנים ששהו לפחות 4 מתוך חמשת חדשי הניסוי נכללו בניתוח נתוני הגדילה. נערך מבחן שונות לגורם השכנים (3 טיפולים) וגורם הקומה. **תוצאות:** שיעור הסרטנים ששרדו במשך 5 חדשי הניסוי היה 40.2% בכלוב המלא, 63.7% בכלוב של שכנים אופקית-בלבד ו 79.2% בכלוב ללא שכנים. בניתוח הסטטיסטי על SGR נמצאה השפעה

מובהקת לטיפול ($F_{2,208}=20.0$, $P<0.001$) ולקומה ($F_{8,208}=2.87$, $P<0.01$) עם גדילה באופן מובהק נמוכה יותר בכלוב המלא מאשר בשני הכלובים האחרים (איור 8), ובקומה העליונה לעומת שאר הקומות. תוצאות הניתוח עבור קצב הגדילה היומי (GR) הראו תמונה דומה (איור 8).



איור 8. קצב גדילה ספציפי וקצב גדילה יומי של סרטנים זכרים במערכת תאים נפרדים עם שכנים צמודים מכל הצדדים (All-neighbor), שכנים צמודים אופקית בלבד (Horizontal- neighbor) וללא שכנים צמודים (No-neighbor).

סיכום

קצבי הגדילה במערכת התאים הנפרדים היו נמוכים בהרבה מאלו המתקבלים בגידול משותף בבריכות או במיכלים במערכת אינטנסיבית. נוכחות של שכנים בכלל ושל שכנים אנכית בפרט השפיעה על ההשרדות והגדילה. כמו כן, גדילה של סרטנים קטנים הושפעה ע"י שכנים גדולים אך לא להיפך. הגדילה בקומה התחתונה היתה טובה ובקומה העליונה פחותה בהשוואה לשאר הקומות, ככל הנראה עקב הבדלים ברמת האור ונפילת שאריות מזון מתאים עליונים לקומה התחתונה.

מסקנות

קצבי הגדילה הנמוכים העידו על בעיות ממשקיות הקשורות למערכת, בעיקר מבחינת ההזנה הלקויה. ההבדלים בגדילה והשרדות בין הטיפולים השונים העידו על קיום אינטרקציות בין סרטנים על אף התאים הנפרדים, הן כתוצאה ממעבר של סרטנים בין תאים והן כתוצאה מחוסר היכולת להימנע לחלוטין ממגע פיזי, בעיקר בין שכנים-אנכית, דרך החריצים הקיימים בין התאים. המלצות לשיפור המערכת והממשק: (א) יש לשפר את מבנה וקשיחות הכלובים כדי להבטיח שסרטנים לא יברחו או יעברו מתא לתא; (ב) להכניס קרקעית אטומה (ללא חריצים) למניעת מגע בין סרטנים ונפילת כופתיות המזון מהתא. (ג) יש להקפיד על אכלוס סרטנים בגודל דומה לצמצום עיכובי הגדילה.

ג. הבקרה החברתית של הגדילה

הניסוי הראשון נערך משך 66 ימים עם 160 סרטנים זכרים צעירים, מחציתם קטנים במשקל של כ- 2 גרם ומחציתם השניה גדולים במשקל של כ- 3.5 גרם. הניסוי כלל את 6 הטיפולים הבאים בהם גודלו זוגות סרטנים (פרט גדול יחד עם פרט קטן) בסוגי מגע שונים ב- 80 אקוריוני זכוכית (25X40X20 ס"מ): 1. זוג סרטנים המגודל יחד בקשר פיזי מלא ($n=20$). 2. זוג סרטנים המגודל בקשר פיזי אך אשר צבתותיהם הודבקו למניעת יכולת פגיעה בפרט השני ($n=12$). 3. זוג סרטנים בקשר כימי וויזואלי אך ללא מגע פיזי. ההפרדה נעשתה ע"י מחיצה שקופה ומחוררת שאפשרה קשר ויזואלי, דרכה עבר צינור PVC אשר דרכו הוזרם אוויר שגרם לחילוף מים מתמיד בין שני חלקי האקוריום ($n=12$). 4. זוג סרטנים בקשר כימי בלבד. ההפרדה כמו ב- 3 אך המחיצה המחוררת היתה אטומה כך שהתאפשר מעבר גירויים כימיים בלבד בין הסרטנים ($n=12$). 4. זוג סרטנים בקשר ויזואלי בלבד. ההפרדה ע"י מחיצה שקופה לא מחוררת שאפשרה קשר ויזואלי בלבד בין הסרטנים ($n=12$). 5. זוג הסרטנים בהפרדה מלאה. ההפרדה היתה באמצעות מחיצה אטומה למעבר מים. ($n=12$). 80 אקוריוני הניסוי הוצבו ב- 2 קומות (בלוקים). סדר הטיפולים ומיקומו של הסרטן הגדול או הקטן בתא הקדמי או האחורי בכל אקוריון נקבעו באופן אקראי. המזון - כופתיות סרטנים ימיים שניתנו כל יום בעודף. כל הסרטנים סומנו באזור הקרפס בעזרת כתם של לקה ורודה כדי להבטיח מעקב אמין אחר אירועי הנשל. כל יום בוצע מעקב אחר נשלים. 3 ימים לאחר נשל סומנו הסרטנים מחדש ונשקלו. לכל אקוריון הוכנסו 2 מחסות, 2 אבני אוויר ו- 2 פילטרים ביולוגיים כדי להבטיח איכות מים מיטבית. אחת לשבוע בוצע מעקב אחר איכות המים (אמוניה- 0; pH 7.6-8; חמצן מעל 85% מרוויה). לקראת סוף תקופת הניסוי תועדה בעזרת מסרטת וידאו התנהגות הסרטנים. כל סרטן הוסרט משך 10 דקות - 5 דקות לפני ואחרי מתן המזון.

הניתוח הסטטיסטי של תוצאות הגדילה בוצע בעזרת ניתוח שונות 4 כיווני- הטיפול (6 רמות), גודל הסרטן (גדול או קטן), הקומה (עליונה או תחתונה), ומיקום הסרטן (תא קידמי או אחורי). עבור כל הפרמטרים הנבדקים לא נמצאה השפעה מובהקת לקומה ולמיקום הסרטן ($P > 0.05$), לכן אין התייחסות נוספת לגורמים אלו בתוצאות. בחינת הבדלים בין טיפולים נעשתה עבור סרטנים גדולים וקטנים ע"י מבחן Tukey-Kramer. גדילת הסרטנים חושבה באמצעות מדדים של קצב גדילה יומי (GR), קצב הגדילה הספציפי (SGR), תוספת המשקל לנשל ומספר הימים המפרידים בין אירוע נשל אחד לבא אחריו (האינטרוול). חישוב GR ו SGR נעשה על המשקל באיכלוס ובתום הניסוי, וחישוב תוספת המשקל לנשל והאינטרוול בין הנשלים התבצע על המשקלים לאחר הנשל הראשון והשני ומספר הימים ביניהם.

הישרדותם של הסרטנים הגדולים יחסית במהלך הניסוי היתה 100% בכל 6 הטיפולים למעט 2 מיקרים בהם נעלמו הסרטנים מהאקוריום (טבלה 1). גם בקבוצת הסרטנים הקטנים, ההישרדות היתה גבוהה, 80%-90% למעט בגידול בצמדים עם מגע פיזי מלא בו ההישרדות היתה בשיעור של 70% (טבלה 2). מרבית הסרטנים שחסרו בטיפול זה נטרפו ע"י הסרטן הגדול בסמוך לנשל של הסרטן הקטן. רק בסרטנים הקטנים מטיפול זה אובחנו פגיעות באנטנות, בצבתות וברגלי ההליכה שנגרמו תוך אינטראקציות אגרסיביות עם הפרט הגדול.

נמצאו הבדלים מובהקים בקצב הגדילה היומי (GR) בין הטיפולים ($P < 0.001$) בין סרטנים מגדלים שונים ($P < 0.001$) וכן נמצאה אינטראקציה בין טיפול לגודל ($P < 0.001$). מכלל 12 הצירופים של גודל וטיפול, הגדילה היתה מעוקבת רק בסרטנים הקטנים במגע פיזי מלא (1) או עם צבתות מודבקות (2). קצב הגידול היומי היה כשליש מזה שהתקבל בכל שאר הצירופים (טבלה 1 ו-2). נמצאו הבדלים מובהקים בקצב הגדילה הספציפי (SGR) בין הטיפולים ($P < 0.001$) ובין סרטנים מגדלים שונים ($P < 0.001$) וכן נמצאה אינטראקציה חיובית בין טיפול לגודל ($P < 0.001$). קצב הגדילה הספציפי היה גבוה בממוצע בכ- 30% בסרטנים קטנים לעומת סרטנים גדולים בכל הטיפולים למעט בגידול בצמדים עם מגע (טבלה 1 ו-2). באותם 2 הטיפולים (1 ו-2) היה קצב הגידול הספציפי נמוך יותר בסרטנים הקטנים לעומת הגדולים. לסרטנים הקטנים בגדילה בצמדים תוך מגע פיזי מלא היה קצב גידול ספציפי נמוך ב- 50% מזה של הסרטנים הקטנים בכל שאר הטיפולים. ההבדל בתוצאות של קצב הגידול היומי (קטנים = גדולים) וקצב הגידול הספציפי (קטנים < גדולים) טמון בכך שקצב הגידול היומי מתייחס לערכים המוחלטים של העלייה במשקל (גר' ליום) ואילו קצב הגדילה הספציפי מתייחס לתוספת המשקל היחסית (% מהמשקל ליום).

נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים בתוספת המשקל לנשל באחוזים ($P < 0.001$). לא נמצא הבדל בין סרטנים מגדלים שונים ($P > 0.05$), אך נמצאה אינטראקציה מובהקת בין טיפול לגודל ($P < 0.001$). תוספת המשקל בסרטן הקטן בטיפול עם מגע פיזי מלא היה נמוך מזה של כל הסרטנים האחרים ושיעורו כמחצית התוספת שלהם לנשל. תוספת המשקל של הסרטן הקטן בטיפול עם צבתות מודבקות היתה גבוהה במקצת וחפפה בחלקה לזה של סרטנים מטיפולים אחרים (טבלה 1 ו-2).

נמצאו הבדלים מובהקים באינטרוול הזמן בין נשלים בין הטיפולים ($P < 0.001$) ובין סרטנים מגדלים שונים ($P < 0.001$). נמצאה אינטראקציה מובהקת בין טיפול לגודל ($P < 0.009$). בכל הטיפולים ללא מגע פיזי מלא או עם צבתות מודבקות היה אינטרוול הנשל בסרטנים קטנים קטן בכ- 30% בממוצע מזה של הסרטנים הגדולים (טבלה 1 ו-2) ואילו בסרטנים קטנים שגודלו תוך מגע מלא או חלקי עם סרטנים גדולים התארך אינטרוול הנשל והיה שווה לזה של סרטנים גדולים. עדין לא נותחו סרטי הוידאו. באותם סרטים ינותחו משך השהיה במחסות וכן זמן ההגעה לכופתית המזון. כמו כן ינותחו האינטראקציות האגרסיביות בין הסרטנים. מסתמנת מגמה של סילוק

הסרטן הקטן מהמזון ע"י הסרטן הגדול. דבר זה מצביע על תחרות ישירה בין הסרטנים על המזון כגורם חשוב בעיכוב הגדילה התברתי.

הוחל בביצוע ניסוי נוסף בו פערי הגודל בין הסרטן הקטן והגדול גדולים בהרבה מאלו שהיו בניסוי הראשון. נבחנו 4 טיפולים ב- 10 חזרות כל אחד, בהם בודדו סרטנים קטנים (משקל ממוצע 5 גרם) מסרטנים גדולים (משקל ממוצע כ- 50 גרם) באופן מלא, בידוד תוך קשר כימי ביניהם, קשר ויזואלי בלבד וקשר כימי וויזואלי. התמונה המסתמנת דומה לזו שהתקבלה בניסוי הראשון. (ראה שילוב הקטע הזה בחלק הבא)

טבלה 1. נתוני (ממוצע \pm שגיאת תקן) קצב גדילה יומי (GR), קצב גדילה ספציפי (SGR), תוספת

משקל יחסית לנשל (Increment), זמן בין נשלים (Interval) והישרדות בזכרים הגדולים

בטיפולים השונים.

Treatment	GR (g day^{-1})	SGR (% day^{-1})	Increment (%)	Interval (days)	Survival (%)
Isolated	0.090 ± 0.008	$1.52 \pm .09$	70.1 ± 4.7	25.0 ± 2.1	91.7
Chemical	$0.100 \pm .007$	$1.75 \pm .08$	72.3 ± 2.8	26.1 ± 2.0	100
Optical	$0.093 \pm .005$	$1.55 \pm .06$	71.8 ± 3.5	24.0 ± 1.3	100
Chemic+ Optical	$0.109 \pm .005$	$1.67 \pm .04$	67.7 ± 1.4	27.6 ± 1.8	100
Communal	$0.106 \pm .008$	$1.68 \pm .09$	67.4 ± 4.5	28.5 ± 2.6	100
Comm Imobiliz	$0.085 \pm .009$	$1.42 \pm .10$	63.9 ± 3.9	24.9 ± 1.2	91.7

טבלה 2: נתוני (ממוצע \pm שגיאת תקן) קצב גדילה יומי (GR), קצב גדילה ספציפי (SGR), תוספת משקל יחסית לנשל (Increment), זמן בין נשלים (Interval) והישרדות בזכרים הקטנים בטיפולים השונים.

Treatment	GR (g day^{-1})	SGR (% day^{-1})	Increment (%)	Interval (days)	Survival (%)
Isolated	0.099 ± 0.009	2.28 ± 0.13	77.1 ± 3.7	16.8 ± 0.8	91.7
Chemical	0.112 ± 0.009	2.43 ± 0.10	74.4 ± 2.6	17.3 ± 0.9	83.3
Optical	0.103 ± 0.011	2.29 ± 0.15	72.6 ± 4.1	17.8 ± 2.0	91.7
Chem+ Optical	0.113 ± 0.008	2.32 ± 0.09	77.1 ± 3.8	18.0 ± 0.9	91.7
Communal	$0.031 \pm .004$	1.04 ± 0.10	37.1 ± 3.3	29.0 ± 1.8	70
Comm-Imobiliz	$0.036 \pm .006$	1.13 ± 0.13	51.6 ± 5.7	24.5 ± 1.3	100

ג. ניסיונות להיפוכי זווית ובחינת מנגנון הורשת הזווית.

היפוכי זווית

בעקבות תוצאות השנה הראשונה נערכו ניסיונות להשריית היפוך זווית בשנה זו בעיקר בפרטים אינטרסקסואליים (שהם תפקודית זכרים) תוך הסרה של הבלוטה האנדרוגנית. ההתערבות נערכה בשתי שיטות, בהסרה כירורגית ובהסרה דיאטרמית. נעשה ניסיון להתרכז בפרטים במשקל שמתחת לשלושה גרם מתוך ההנחה שזהו שלב מוקדם מספיק שיאפשר השגת היפוך זווית פונקציונאלי. המשקל הממוצע בזמן הניתוח היה 3.67 ± 2.74 גרם.

מהתוצאות עולה כי מרבית הפרטים לא שרדו את ההתערבות הדיאטרמית או הכירורגית.

הדבר היה חריף במיוחד בקרב הזכרים שלהם שתי בלוטות אנדרוגניות דבר שחייב התערבויות כפולות. לעומת זאת בפרטים אינטרסקסואליים, שלהם בלוטה אנדרוגנית אחת, נצפתה הישרדות מעט טובה יותר. בסה"כ נותחו 183 פרטים וכיום ממשיכים בניסוי 16 פרטים. מידת ההצלחה של היפוכי הזווית היתה נמוכה: 4 פרטים נראו חיצונית כפרטים שעברו היפוך זווית כפי שהתבטא בהופעת סימני מין משניים נקביים, כשערות לנשיאת ביצים על גבי רגלי השחייה, ואי הופעת סמני מין משניים זכריים, ככתם האדום על גבי הפרופודוס של הזרוע. 4 הפרטים האלה הועברו לרבייה אך לא הטילו ביצים. 12 הפרטים הנוספים המשיכו בגדילתם. נמצא כי הפרטים עברו היפוך זווית מלא אך לא הגיעו עדיין לידי רבייה.

טבלה 3: סיכום נתוני ניתוחים בפרטים אינטרסקסואליים עד לדצמבר 2001

סוג הניתוח	מתו כתוצאה מהניתוח	מתו בהמשך הניסוי	הוגדרו כ"כישלון" ונגרעו	ממשיכים בניסוי	סה"כ
כירורגיה	39	63	0	7	109
דיאטרמיה	12	38	15	9 (4 ברביה)	74
סה"כ	51	101	15	16	183

מנגנון הורשת הזויג

במקביל נערכה מערכת של ניסיונות שבחנה את מודל ההורשה בסרטנים אלה תוך השוואת הכלאות בין פרטים אינטרסקסואליים ונקבות להכלאות בין זכרים ונקבות. נמצא הבדל מובהק ביחסי הזויגים באוכלוסיות הצאצאים (1:3 ו-1:1 בהתאמה). מניתוח תוצאות אלה וביצוע מספר הכלאות חוזרות מוצא כי מודל ההורשה בסרטן זה הנו מסוג ZZ ZW כאשר הזכר הנו הומוגמטי. הפרטים האינטרסקסואליים המתפקדים כזכרים נמצאו למעשה כנקבות גנטיות (ZW). הדבר מחזק את ההנחה כי היפוך זויג בזכרים בני הדור הראשון והכלאתם עם זכרים נורמאליים יביא ליצירה של אוכלוסיה חד זויגית.

ד. זיהוי של גורם אנדוקריני מהבלוטה האנדורוגנית הגורם לזכריות.

לאחר שנתברר למעלה מכל ספק כי לזכרים יתרון מכריע בגידול אינטנסיבי וכי הבלוטה האנדורוגנית היא המקור הבלעדי להורמון האחראי להתמיינות הזויגית הזכרית, נראה שיש צורך מידי בהקדשת מאמץ מחקרי לבידוד וזיהוי הגורם האנדורוגני אשר יוכל לשמש כלי עיקרי ביצירת אוכלוסיות חד זויגיות זכריות בעתיד. מהלך זה מצוי בשלבי ביצוע וכולל את השלבים הבאים:

איור 9: הפרדה של

תוצרי הפרשה חלבונים

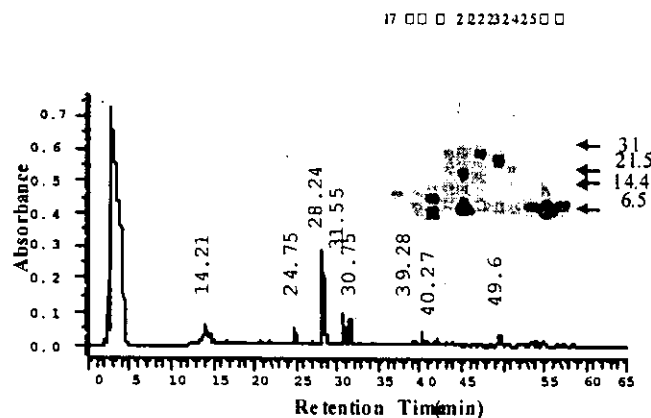
מסומנים ב S^{35} מבלוטות

אנדורוגניות בעזרת

HPLC והפרדת

הפרקציות השונות על גבי

ג'ל SDS-PAGE



1. יצירת בלוטות אנדרוגניות מוגדלות היפרטרופיות באמצעות התערבויות אנדוקריניות. 2. הוצאת הבלוטות האנדורוגניות המוגדלות לשם מיצוי או תרבית איבר. 3. תרבית איבר של הבלוטות האנדורוגניות בנוכחות חומצות אמיניות מסומנות רדיואקטיבית ומיצוי של חומרים מהבלוטה וחומרי הפרשה ממדיום הגידול. 4. הפרדה של המיצוי החלבוני מהבלוטות האנדורוגניות ומדיום הגידול שלהם באמצעות

אלקטרופורזה על גבי ג'ל או HPLC ורדיוגרמה לשם זיהוי התוצרים החלבוניים המסומנים. באיור הבא ניתן לראות גרף של HPLC שנעשה לתוצרי הפרשה מבלוטות היפרטרופיות, שהודגרו במשך 24 שעות בנוכחות חומצות אמיניות מסומנות ב- S^{35} . באיור 3 ניתן לראות רדיוגרמה של התוצרים המסומנים, שהתקבלו בפרקציות ה- HPLC השונות, לאחר הפרדתם באמצעות אלקטרופורזה על גבי ג'ל. במהלך המחקר נערוך סקירה מקיפה של כל תוצרי ההפרשה תוך בחינת פעילותם במבחן ביולוגי. בשלב זה התמקדנו באיזור המצוי בין 42 ל-44 דקות והמייצג פרקציות המכילות חלבונים מופרשים בגדלים 17, 50 ו-6 kDa.

פרסומים

ממצאי שנים א' ו- ב' של המחקר הוצגו ביום עיון שערך המדען הראשי במשרד החקלאות (20.2.2001). חלק מהממצאים נערכו למאמרים ונשלחו לפרסום תוך אזכור המענק מקרן המדען בסעיף תודות:

- Manor, R., Segev, R., Pimenta-Leibovitz, M., and Sagi, A., 2002. Intensification of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* culture: II. Growout in a separate cell system. *Aquacult. Eng.* 26:263-276.
- Sagi, A., Manor, R., Segall, C., Davis, C., and Khalaila, I., 2002. On intersexuality in the crayfish *Cherax quadricarinatus*: an inducible sexual plasticity model. *Invert. Reprod. Devel.* 41:27-33.
- Khalaila, I., Manor, R., Weil, S., Granot, Y., Keller, R., and Sagi, A., 2002. The eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen Comp. Endocrinol.* 127(2):147-156.
- Barki, A., Karplus, I., Khalaila, I., Manor, R., and Sagi, A., 2003. Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish. *J. Exp. Biol.* (submitted).
- Karplus, I., Khalaila, I., Sagi, A., and Barki A., 2003. Male-like behavioral patterns in androgenic gland implanted female crayfish, *Cherax quadricarinatus*: Female-male interactions. *Behaviour*, (submitted).
- Barki, A., and Karplus, I., 2003. The relationship between size rank and growth potential in juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, (submitted).

<p>1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p>
<p>א. <u>בחינת ביצועי גדילה של זכרים ונקבות בתנאי הדמיה של מערכת אינטנסיבית, בחינת גודל תא.</u></p> <p>ב. <u>בחינת ביצועי הגדילה והאינטראקציות במשק מודל.</u></p> <p>ג. <u>בחינת האפקטים של אינטראקציות חברתיות על גדילה, בחינת תקשורת טקטאלית, ויזואלית וכימית.</u></p>
<p>ד. <u>ניסיונות להיפוכי זווית בדיאטרמיה ובהסרה כירורגית של הבלוטה האנדורוגנית מפרטים אינטרסקסואליים.</u></p> <p>ה. <u>זיהוי של גורם אנדוקריני מהבלוטה האנדורוגנית הגורם לזכריות.</u></p>
<p>2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p>
<p>1. <u>בוצעו שלשה ניסוי לבחינת ביצועי גדילה של טרטנים בתנאי הדמיית מערכת אינטנסיבית ונמצא שזכרים בעלי יתרון מובהק. גודל התא הקטן גורם עיכוב גדילה. התפוקות האפשריות ממערכת מבודדת גדולות בסדרי גודל ממערכות קונבנציונאליות.</u></p> <p>2. <u>בוצע ניסיון לגידול במשק תצפית שהעיד שוב שהאינטראקציות בין הפרטים צריכות להלקח בחשבון. ביצועי הגדילה במשק המודל לא הגיעו לביצועי ההדמיה דבר המעיד על כשל מערכת הכלובים המסחרית.</u></p> <p>3. <u>בוצעו שני ניסיונות לבחינת השפעת אינטראקציות חברתיות על גדילה ונמצא כי ההשפעה הנה תלוית מגע פיזי ואינה מתבטאת בתנאי תקשורת ויזואלית או כימית.</u></p> <p>4. <u>בוצעה סדרה של הסרות של הבלוטה האנדורוגנית בפרטים אינטרסקסואליים. ההישרדות הייתה נמוכה ביותר, מספר פרטים נראו כמהופכי זווית והועברו להמשך מעקב ורבייה. נחשף מנגנון הורשת הזווית בסרטנים.</u></p> <p>5. <u>המשכנו בתהליך המיצוי והאפיון של החומרים החלבוניים המיוצרים ומופרשים מהבלוטה האנדורוגנית במטרה לאפיין את ההורמון האנדורוגני.</u></p>
<p>3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.</p>
<p>1. <u>יתרון הגדילה בזכרים מהווה המלצה יישומית ישירה למגדלים. מוצע גודל תא מיטבי למערכת הפיטום האינטנסיבית ויש להקדיש מאמץ מיוחד ליצירת אוכלוסיות חד זוויות זכריות אם באמצעות היפוכי זווית ברמת עדר הרבייה או אפיון הגורם האנדורוגני האחראי על ההתמיינות הזוויתית הזכרית.</u></p> <p>2. <u>המערכת המסחרית הראשונה שנוסתה אינה מגיעה לתוצאות המאפשרות רווחיות. יש לשפר מספר פרמטרים ולשקול הפרדה יותר משמעותית בין הפרטים.</u></p>

3. מבחינת השפעת אינטראקציות חברתיות על הגדילה נמצא כי יש תלות במגע פיזי ואין השפעה לתקשורת כימית וויזואלית. לכן במערכות האינטנסיביות המתוכננות יש למנוע ככל האפשר מגע בין הפרטים.

4. שיטות הכירורגיה והדיאטרמיה בעייתיות מבחינת הישרדות אך יש ללמוד קודם כל את תוצאות הרבייה (אם יהיו כאלה) של הפרטים האינטרסקסואליים המהופכים. נמצא כי מנגנון קביעת הזויג הגנטי בסרטנים אלה הנו ZW/ZZ כאשר הזכר הומוגמטי.

5. יש להמשיך במאמץ לזהות את הגורם האנדרוגני.

4. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן.

עיקר הבעיות קשורות באופן בחירת זכרים מיטבי גדילה, יצירת אוכלוסיות חד זויגיות ואפיון הגורם האנדוקריני האחראי להתמיינות הזויגית הזכרית. נמצא כי יש פוטנציאל לגידול בתנאי תאים מבודדים אך המערכת שנבנתה במשק המודל אינה מביאה לתוצאות המקוות.

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.

ימי עיון מדען ראשי ובאופן בלתי פורמאלי בקרב מגדלים ומגדלים פוטנציאליים.

כמו כן, ראה רשימת פרסומים.