

## פתוח חלופות ידידותיות לסביבה להיפוך זווית אמנונים במערכות גידול מסחריות

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות  
ע"י

חנה רוזנפלד מחלקת רבייה, חקר ימים ואגמים, מלח"י, אילת.  
יגאל מגן התחנה לחקר המדגה, דור


Hanna Rosenfeld, Israel Oceanographic & Limnological Research Ltd., National  
Center for Mariculture, P.O.B. 1212, Eilat 88112. E-mail: [hanna@ocean.org.il](mailto:hanna@ocean.org.il)  
Igal Magen, Ministry of Agriculture and Rural Development, Aquaculture Research  
Station, Dor MP Hof HaCarmel 30820 E-mail: [igalm@moag.gov.il](mailto:igalm@moag.gov.il)

מאי 2011

ניסן תשע"א

*הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.*

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא = מחק את המיותר \***

  
חתימת החוקר

## תקציר

אחת הדרכים המקובלות להשריית פנוטיפ זכרי באוכלוסיית דגים (הפיכת דגים בעלי גנוטיפ נקבי לזכרים פונקציונאליים) מתבססת על חשיפתם בשלבי ההתמיינות המינית לאנדרוגנים דוגמת 17 $\alpha$ -Methyltestosterone (MT). על כן, במשקים מסחריים מתבצע איסוף יומי של דגיגים מבריכות ההטלה, ואלו מועברים לבריכות אימון בהן ניתן מזון מועשר ב-MT למשך כ- 28 יום. שיטה זו מצטיינת באחוזי הצלחה גבוהים ועלויות נמוכות, אולם, מעוררת בעיות סביבתיות ממשקיות וכלכליות. בעבודה זו נבחנה האפשרות להשרות היפוך זווּי ע"י שמוש בחומרים ידידותיים לסביבה תוך צימצום משך זמן החשיפה למספר שעות בודדות על ידי טיפולי טבילה. נערכו מספר ניסיונות על מנת למצוא (א) את גיל הדגיגים המתאים ביותר לחשיפה, ו- (ב) את ריכוז ההורמון האופטימאלי. תוצאות הניסויים העידו כי התקופה הקריטית לחשיפה לחומרים מזכרים היא ביום 11 לאחר ההפריה. במקביל נבחנו מינונים שונים של אנדרוגן (1.8mg/l ו- 3.6mg/l) בחשיפות לתקופות זמן שונות (4 ו-8 שעות). כמו כן, נבחנה ההשפעה המזכרת של חשיפה לטמפרטורה גבוהה 36°C לבד או בשילוב עם חשיפה לאנדרוגן. ממצאינו מצביעים כי טיפול משולב, שכלל: חשיפה לאנדרוגן 1.8 mg/l למשך 4 שעות ולטמפרטורה גבוהה 36°C במשך יומיים הוביל לזיכור מקסימאלי (81% זכרים). עם זאת, טיפולי הטבילה והחשיפה לטמפרטורה לא הובילו לזיכור מלא של כל הפרטים באוכלוסייה ולפיכך לא יוכלו בשלב זה להחליף את הטיפול המסורתי.

## מבוא

דג האמנון בעל חשיבות מסחרית רבה בארץ ובעולם. במהלך העשור האחרון, יצור האמנונים גדל בקצב שנתי של 14%, ובמהלך 2001 חצו ערכיו את גבול ה- 8000 טון. בזכות עמידותו לתנאי סביבה קיצוניים (טווח מליחיות רחב, ריכוזי חמצן נמוכים, תחום רחב של pH וצפיפות גבוהה) דג האמנון שולב במערכות גידול אינטנסיביות חדשניות, אשר איפשרו למקסם את היצור, מחד, ולשפר את הרווחיות מהדג, מאידך. עם זאת, בעיה ממשקית שכיחה בה נתקלים מגדלי האמנונים היא הגעתו המוקדמת של הדג לבגרות מינית (גיל 3-4 חודשים) ובעקבות כך, קיומם של מחזורי הטלה מרובים במרווחים של שלושה שבועות בקירוב. ההשלכות הישירות הן: האטה בשיעורי הגדילה בשלב מוקדם יחסית בחיי הדג, התבדרות בגודלם של דגי הבריכה, ריבוי הטלות ("הטלות פרא"), עליה תלולה בביומסה, צריכה מוגברת של מזון וחמצן ובעטים של כל אלה, ירידה נוספת בקצבי הגדילה של הדגים.

לאור זאת, גידול אמנונים במתקנים חקלאיים מושתת על אוכלוסיית דגים חד זווּיגית, "כל-זכרית", המאפשרת בקרה מלאה על מספר הדגים המאכלסים כל בריכה ועל כמות המזון הנצרכת תוך מניעת הטלות ספונטניות. יתרון כלכלי נוסף לגידולו של הזווּיג הזכרי מתבסס על קצב הגדילה המהיר של אמנון זכר ביחס לנקבת הדג.

אחת הדרכים המקובלות להשריית פנוטיפ זכרי באוכלוסיית אמנונים היא חשיפתם, באמצעות המזון, למשך 28 ימים ראשונים לאחר ההטלה ל- 17 $\alpha$ -Methyltestosterone (MT). שיטה זו מצטיינת באחוזי הצלחה גבוהים ועלויות נמוכות, אולם, מעוררת בעיות סביבתיות ממשקיות

וכלכליות. השימוש בהורמון לאורך זמן במערכת גידול דגים, חושף את הדגיגים, המגדל והסביבה להשפעותיו השליליות של ה-MT (נאסר ע"י הרשות האמריקאית לאישור תרופות [DEA] לשימוש בחקלאות המים עקב עדויות להיותו מסרטן). בנוסף, מבחינה ממשקית מהווה טיפול ממושך (28 יום) בתנאי צפיפות גבוהה ותחלופת מים קטנה, גורם המעודד תחלואה ומעכב קצבי גדילה של דגיגים.

### מטרות המחקר

לאור האמור לעיל, בחרנו בעבודה הנוכחית :

- א) לבחון אפשרויות לצמצום זמן החשיפה לאנדרוגן בעת השריית פנוטיפ זכרי באוכלוסיית אמנונים. לצורך כך, אומצו טיפולי טבילה קצרים (4 שעות חשיפה) בנוכחות האנדרוגן  $17\alpha$ -methyl-dihydrotestosterone (MDHT). אנדרוגן זה, בניגוד ל-MT אינו עובר ארומטיזציה, על כן, נמנע החשש שריכוזים גבוהים שלו יעודדו באופן פרדוקסלי פנוטיפ נקבי.
- ב) לאפיין במדויק את התקופה בה לרוות האמנון רגישה ביותר לטיפול ב-MDHT.
- ג) לבחון חלופה ידידותיות לסביבה לייצור זכרים פנוטיפים. במסגרת זו תבחן ההשפעה של חשיפה למשטר טמפרטורה קיצוני ( $36^{\circ}\text{C}$ ).

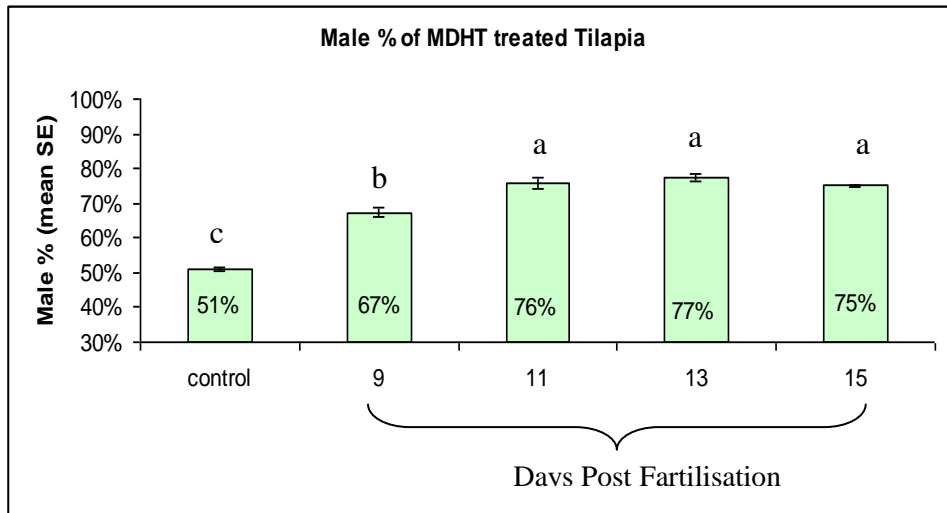
### פירוט העבודה והתוצאות המיוחסות לתקופת הדו"ח

שלבי העבודה המשותפים לכל הניסויים, כללו :

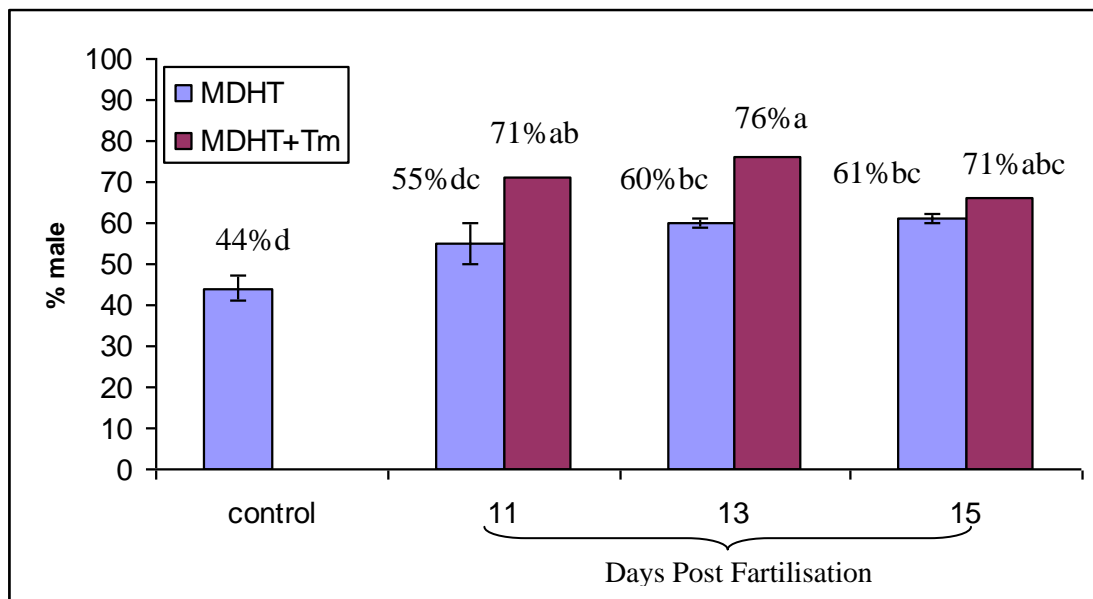
- הפריה *in vitro*, המתבססת על סחיטת ביצים (ממספר נקבות) וזרע (ממספר זכרים), ערבובם והדגרת הביצים המופרות בצוגר למשך חמישה ימים (עד בקיעה) בטמפרטורה של  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- איחוד הדגיגים במיכל וחלוקה למגשים בהתאם לקבוצות הטיפול השונות (שתי חזרות לכל טיפול).
- חשיפת הדגיגים לאפקטור (הורמון ו/או טמפרטורה גבוהה) לפרקי זמן משתנים, בהתאם למצויין בכל ניסוי.
- בסיס החשיפה, גידול בתנאים נורמאליים עד לשלב של כ- 5 גרם, עיתוי בו נערכה בדיקה לזיהוי זוויג הדג.

### תוצאות

בשלב ראשון נבחנה התקופה הקריטית לחשיפה לאנדרוגן MDHT. לצורך כך, דגיגים בגילאים של 9, 11, 13, ו-15 ימים מבקיעה נחשפו במשך 4 שעות לאנדרוגן MDHT במינון של  $1.8 \text{ mg/l}$ . ממצאינו מצביעים על שכיחות זכרים גבוהה יותר בכל קבוצות הטיפול בהשוואה לקבוצת הבקורת שלא נחשפה לאנדרוגן (איור 1). האפקט המירבי (-75% זכרים) נצפה בקבוצות הגיל של 11, 13 ו-15 ימים מבקיעה והיה שונה באופן מובהק ( $P < 0.05$ ) בהשוואה לקבוצת הגיל של 9 ימים מבקיעה (67% זכרים). שילוב הטיפול באנדרוגן עם חשיפה לטמפרטורה גבוהה ( $36^{\circ}\text{C}$  למשך יומיים) נמצא יעיל יותר באופן מובהק ( $P < 0.05$ ) מהטיפול באנדרוגן בלבד (איור 2).

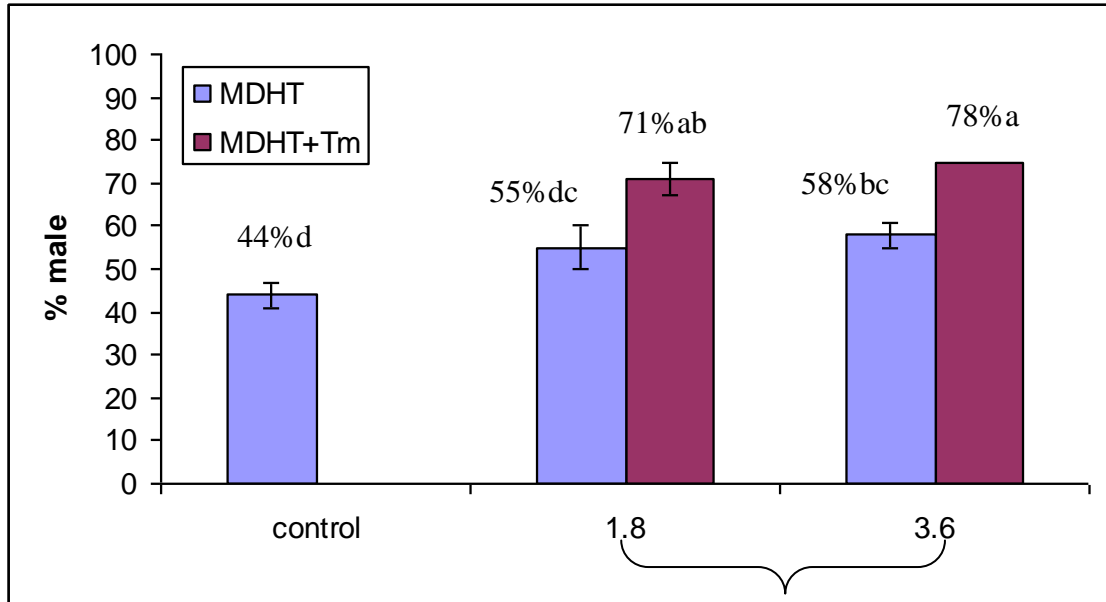


**איור 1.** כיוול התקופה הקריטית לחשיפה לאנדרוגן MDHT מינון  $1.8\text{mg/l}$  למשך 4 שעות. ממוצעים אשר לידם אותיות שונות נבדלים באופן מובהק ( $p < 0.05$ ) R- Square= 0.983



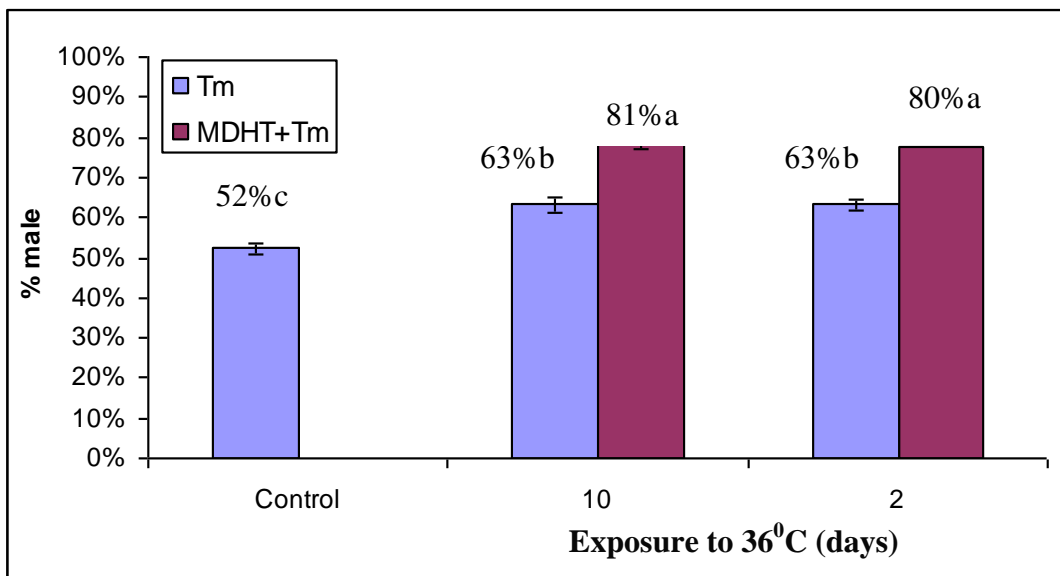
**איור 2.** בחינת ההשפעה של טיפולים משולבים, חשיפה ל-  $1.8\text{mg/l}$  MDHT למשך 4 שעות ולטמפרטורה גבוהה  $36^\circ\text{C}$  בגילאי דגיגים משתנים. ממוצעים אשר לידם אותיות שונות נבדלים באופן מובהק ( $p < 0.05$ ) R- Square= 0.943

חשיפה למינוני MDHT שונים (1.8 ו- 3.6 mg/l) הצביעה על תגובתיות דומה, ללא תרומה נוספת בעקבות הכפלת המינון (איור 3). כמו כן, לא נצפה יתרון מובהק ( $P > 0.05$ ) עבור זמני חשיפה ארוכים יותר לטמפרטורה גבוהה ( $36^{\circ}\text{C}$ ), 10 ימים בהשוואה ליומיים (איור 4), או עבור חשיפה ארוכה יותר לאנדרוגן, 8 בהשוואה ל-4 שעות (איור 5).

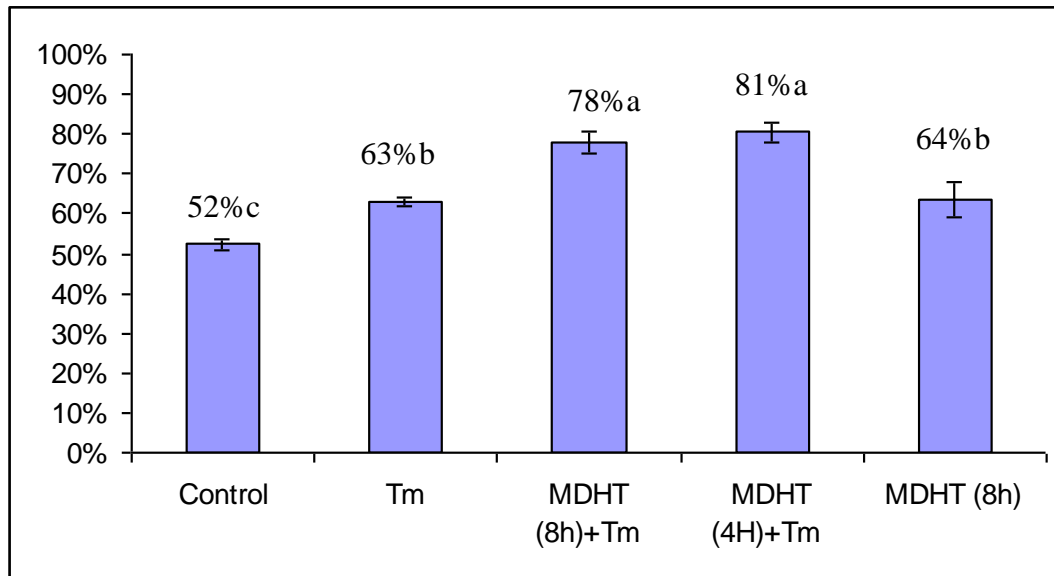


MDHT (mg/l) 11 dpf

**איור 3.** בחינת ההשפעה של טיפולים משולבים, חשיפה ל- MDHT בריכוזים שונים למשך 4 שעות ולטמפרטורה גבוהה  $36^{\circ}\text{C}$  גיל הדגיג 11 dpf. ממוצעים אשר לידם אותיות שונות נבדלים באופן מובהק R- Square= 0.943 ( $p < 0.05$ )

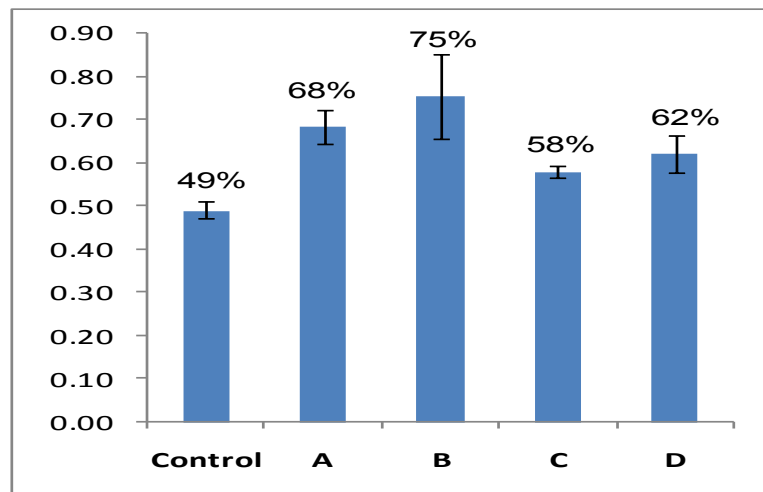


**איור 4.** כיוול משך החשיפה לטמפרטורה גבוהה  $36^{\circ}\text{C}$  במינון של- MDHT 1.8 mg/l גיל הדגיג 11 dpf. ממוצעים אשר לידם אותיות שונות נבדלים באופן מובהק R- Square= 0.969 ( $p < 0.05$ )



**Tm= 2-days exposure to 36°C**

**איור 5:** כיוול משך החשיפה לאנדרוגן, גיל הדגיג 11dpf מינון 1.8 mg/l בטמפרטורה 36 °C למשך יומיים. ממוצעים אשר לידם אותיות שונות נבדלים באופן מובהק (R- Square= 0.969 (p<0.05)

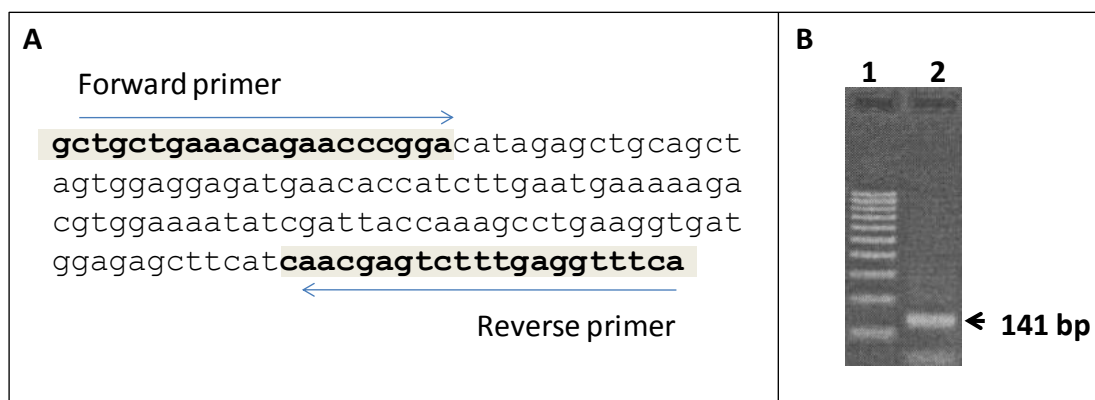


**איור 6.** השפעת טיפול משולב הכולל שני מחזורי חשיפה לאנדרוגן ולטמפרטורת מים גבוהה. [A]- חשיפה כפולה לאנדרוגן MDHT במינון 0.5 מ"ג למשך 4 שעות בימים 11 ו-13 לאחר הפריה, ולטמפרטורת מים גבוהה (36°C) בימים 11-14 לאחר הפריה. [B]- חשיפה כפולה לאנדרוגן MDHT במינון 1.8 מ"ג למשך 4 שעות בימים 11 ו-13 לאחר הפריה, ולטמפרטורת מים גבוהה (36°C) בימים 11-14 לאחר הפריה. [C]- חשיפה בודדת לאנדרוגן MDHT במינון 0.5 מ"ג למשך 4 שעות ביום 11 לאחר הפריה, ולטמפרטורת מים גבוהה (36°C) בימים 11-12 לאחר הפריה. [D]- חשיפה בודדת לאנדרוגן MDHT במינון 1.8 מ"ג למשך 4 שעות ביום 11 לאחר הפריה, ולטמפרטורת מים גבוהה (36°C) בימים 11-12 לאחר הפריה

בניסוי נוסף נבחנה ההשפעה של טפול משולב הכולל: שני מחזורי חשיפה קצרים (4 שעות כל אחד) לאנדרוגן MDHT (מחזור ראשון ביום 11 לאחר הפריה, ומחזור שני - ביום 13 לאחר הפריה), וטמפרטורת מים גבוהה ( $36^{\circ}\text{C}$ ; במשך 48 שעות). במינון ההורמון הגבוה (1.8 מ"ג לליטר) לא התקבלו הבדלים מובהקים בשכיחות הזכרים בקבוצות שנשפו חשיפה בודדת (יום 11 לאחר הפריה) או חשיפה כפולה (בימים 11 ו-13 לאחר הפריה) לאנדרוגן MDHT (איור 6). עם זאת, שכיחות זכרים נמוכה יחסית התקבלה עבור חשיפה אחת למינון נמוך של האנדרוגן (0.5 מ"ג לליטר). בדומה לממצאי ניסויים קודמים, אף לא אחד מהטיפולים הוביל לכדי זיכור מלא של אוכלוסית האמנונים. יתר על כן, נתן להבחין בחוסר עקביות באשר לשכיחות הזכרים המתקבלת בעקבות טיפולים דומים בניסויים שונים.

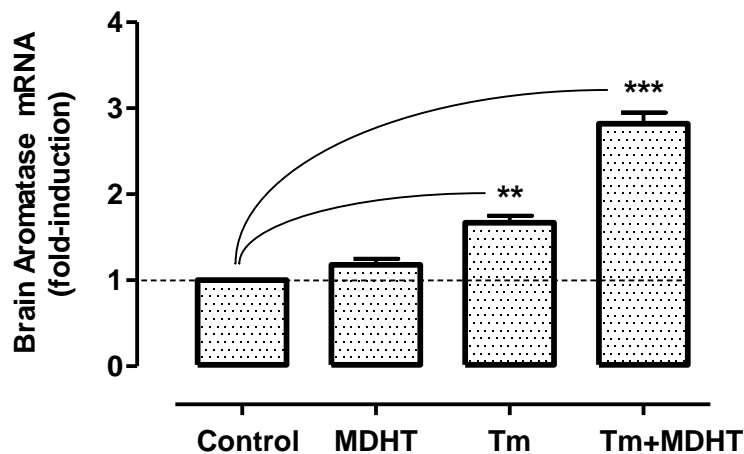
### בחינת השפעתם של טיפולים מזכרים על ביטוי הגן המקודד לנגזרת המוחית של ארומטאז

ארומטאז מקטלו את ההמרה של אנדרוגנים לאסטרוגנים ולפיכך מיחסים לו תפקיד מפתח בהכוונת ההתמינות המינית. בנוסף לנגזרת הפועלת בגונדה, זוהתה במגוון מיני דגים נגזרת מוחית של ארומטאז, אשר בניגוד לחוליתנים אחרים, מגלה קצבי פעילות מוגברים ובעקבות כך מובילה לסנתזה של רמות גבוהות של נורואסטרוגנים (Blázquez and Somoza, 2010). בשנים האחרונות הצטברו עדויות ובכלל זה באמנונים (Tsai et al., 2003), כי נגזרת הארומטאז המוחית מעורבת בהולכת סיגנל הטמפרטורה ובעקבות כך עשויה להשפיע על תהליך ההתמינות המינית. בכדי לפתח מבחן מהיר אשר יצביע על אפקטיביות הטיפול (טמפרטורת מים גבוהה ו/או חשיפה לאנדרוגן) בהכוונת ההתמינות המינית באמנון, בחנו את ביטוי הגן המקודד את הנגזרת המוחית של ארומטאז (*cyp19a1b*), בחלון הזמן בו נצפתה רגישות גבוהה במיוחד לאפקטורים אלו (11 ימים מהפריה). על בסיס רצף ידוע (gene bank accession number AF 306786) תוכנן צמד פריימרים, אשר שמשו בראקצית PCR להגברת מקטע בגודל 141 זוגות בסיסים (איור 7).



**איור 7- (A)** רצף חלקי של הגן המקודד לנגזרת המוחית של ארומטאז בדג האמנון. הפריימרים שמשו להגברת הרצף באמצעות PCR מודגשים וכיוונם מצויין באמצעות חץ. **(B)** תוצר PCR מופרד ע"ג גיל אגרוז במקביל לסמני גודל.

במקביל, RNA מוצה מראשן של לרוות בגיל 11dpf מקבוצת הביקורת ומקבוצות הטיפול השונות, ובכלל זה: (1) MDHT במינון של 1.8mg/l למשך 4 שעות, (2) טמפרטורה גבוהה, 36°C, למשך יומיים ו-(3) לשילוב של 1 ו-2. לאחר כימות רמות ה-RNA נערכה ראקצית RT-PCR וחושב היחס בין גן המטרה (ארומטאז מוחי) לגן מנרמל (18S). כמוצג באיור 8, התוצאות מצביעות על תוצר שעתוק מוגבר של הנגזרת המוחית של ארומטאז, בקבוצות אשר טופלו בטמפרטורה גבוהה לבד (Tm) או בשילוב עם חשיפה לאנדרוגן (Tm+MDHT), בהשוואה לקבוצת הביקורת (Control) ולקבוצת הדגים שנחשפה לאנדרוגן בלבד (MDHT). מענין לציין כי קיים מתאם חיובי בין רמות השעתוק של ארומטאז המוחי לתדירות הזכרים שהתקבלה בטיפול בטמפרטורה (ראה איור 5), דהינו, שכיחות זכרים גבוהה יותר בטיפול המשולב (81%) ופחותה בטיפול הטמפרטורה בלבד (63%). בעוד שממצאינו מאוששים את ההנחה כי הנגזרת המוחית של ארומטאז מהווה גן מטרה חשוב להולכת סיגנל הטמפרטורה, העדר השפעה של האנדרוגן על ביטוי הגן לארומטאז, מרמזת על פעילותו בשלבים המצויים ב"מורד הזרם" (down stream) ביחס לארומטאז. לאור זאת, נתן להסיק כי מבחן זה עשוי לנבא את יעילות הטיפול המזכר המושפע מטמפרטורה, אך לא את הטיפול המושפע מאנדרוגנים.



**איור 8-** השפעת טיפולים מזכרים על רמות שעתוק הגן המקודד לארומטאז מוחי בלרוות דגי אמנון בגיל 11 ימים מהפריה. רמות שעתוק הגן לארומטאז המוחי נורמלו ביחס ל-18S. ערכי קבוצות הטיפול מוצגים ביחס לקבוצת הביקורת. (Multiple Range Test;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ ). באור קיצורים: MDHT - חשיפה לאנדרוגן במינון של 1.8mg/l למשך 4 שעות, Tm - חשיפה לטמפרטורה גבוהה, 36°C, למשך יומיים.



## דיון ומסקנות

השריית היפוך זווית בדג באמצעות אפקטור חיצוני (הורמונים, טמפרטורה וכו') מחייבת תזמון מדויק בין מועד החשיפה לאפקטור לבין התקופה הקריטית בדג, המגלה רגישות לאפקטור זה. באמנונים קיים קושי לקבוע באופן מדויק את מועד ההפריה ו/או הבקיעה של החרוה משום שמרבית הזנים המסחריים הנם דוגרי פה. כמו כן, קצב ההתפתחות העוברית עשוי להשתנות בעקבות שינויים בטמפרטורת המים. בכדי להתגבר על קשיים אלו, הדגיגים אשר שמשו בניסויי היפוך המין סופקו על ידי מערך הטלה מבוקר הפועל בתחנה לחקר המדגה בדור ( Magen and Zak, 2004). תנאי הגידול הקבועים והשליטה בעיתוי ההפריה, אפשרו לנו לתעד, ע"פ שינויים מורפולוגיים, את קצב ההתפתחות העוברית באמנון ולהנהיג הגדרות עקביות באשר לגיל הדגיג. במסגרת סדרת ניסויים בהם נחשפו דגיגי אמנון לאנדרוגן MDHT נתן היה לקבוע את העיתוי האופטימלי למתן הטיפול. במספר ניסויים עוקבים נתן היה להבחין כי הטיפול אפקטיבי ביותר כאשר גיל הדגיגים הנחשפים הינו 11 יום מהפריה. יום זה זוהה כשלב קריטי להשריית זיכור ע"י שני האפקטורים הנבדקים: MDHT וטמפרטורת מים גבוהה [36°C]. תנאי החשיפה האופטימאליים עבור האפקטור MDHT היו מינון של 1.8 מ"ג לליטר, למשך 4 שעות טבילה. פרמטרים אלו הגבירו באופן מובהק את שכיחות הזכרים ביחס לביקורת. עם זאת, הכפלת מינון ההורמון ו/או זמן החשיפה לא תרמו תרומה נוספת. שכיחות הזכרים שהתקבלה, בעקבות החשיפה לאנדרוגן, אומנם גבוהה ביחס לקבוצת הביקורת אך הערך הוא נמוך ביחס לזה שהתקבל בעבודות מקבילות באמנונים (Gale et al., 1999; Wassermann & Afonso, 2003). לאור זאת, יש יסוד טוב להניח כי פקטורים נוספים, דוגמת מידת הרגישות של הפרט לטיפול, עשויים להשפיע על תהליך הזיכור. במקביל נבדקה ההשפעה של טמפרטורת מים גבוהה על זיכור אמנונים. חשיפה לטמפרטורה גבוהה 36°C במשך 2 ימים הגבירה באופן מובהק את שכיחות הזכרים באוכלוסייה בהשוואה לקבוצת הביקורת (איור 4). הארכת משך החשיפה ל-10 ימים לא שיפרה את התוצאות. טיפול משולב, שכלל: חשיפה לאנדרוגן 1.8 מ"ג לליטר למשך 4 שעות ולטמפרטורה גבוהה 36°C במשך יומיים הוביל לזיכור מקסימאלי 81% זכרים. מתוצאות העבודה בשלב זה ניתן לראות שטמפרטורה גבוהה והאנדרוגן פועלים באופן אדטיבי/סינרגיסטי בשלב ההתמיינות המינית באמנונים לקביעת פנוטיפ זכרי. עם זאת בניסויים חוזרים, התקבלו שכיחויות זכרים נמוכות יותר (68% ו-75%). חוסר העקביות באשר לשכיחות הזכרים המתקבלת בעקבות טיפולים דומים בניסויים שונים מחזק את חשיבותו של המרכיב הגנטי בתהליך ההתמיינות המינית בדג האמנון. זאת, בנוסף לעובדה כי אף לא אחד מהטפולים שנוסו בפרוייקט הנוכחי הובילו לזיכור מלא מדגישים את הצורך בפתרון גנטי, המתבסס על הכלאה בין מינים בעלי מנגנון קביעת זווית שונה (Interspecific hybridisation). דוגמא לכך נתן לראות במיכלוא הנפוץ בין זכר אמנון ירדן, נושא הומוגמטות מטיפוס ZZ, לנקבה אמנון יאור, נושאת הומוגמטות מטיפוס XX (Pruginin et al., 1975; Wohlfath, 1994). יחד עם זאת, על מנת להמנע מטעויות העבר ולהבטיח את ביסוסן של אוכלוסיות אמנונים כל-זכריות בסדר גודל מסחרי, יהיה צורך להקפיד על שמירתם של קווי הורים נקיים.

- Baroiller, J. F., Chourrout, D., Fostier, A., Jalabert, B. 1995. Temperature and sex chromosomes governs sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool. 273: 216-223.
- Blázquez, M., Somoza, G.M. 2010. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. Gen Comp Endocrinol. 166: 470-477.
- Gale, W. L., Fitzpatrick, M. S., Lucero, M., Contreras-Sanches, W. M., Schreck, C. B. 1999. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. Aquaculture, 178: 349-357.
- Magen, I., Zak, T. 2004. Year round reproduction system for tilapia. Proceeding of the fifth international conference on recirculating aquaculture. 60-67.
- Tsai, C.L., Chang, S.L., Wang, L.H., Chao, T.Y. 2003. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. J Neuroendocrinol. 15:97-102
- Wassermann, G. J., Afonso, L.O.B. 2003. Sex Reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) by androgen immersion. Aquacult. Res. 34: 65-71.