

## **פיתוח אוכלוסייה כל-נקבית של פרונית המים המתוקים *Macrobrachium rosenbergii***

**כמוצר מסחרי חדש בחקלאות המים הישראלית**

דוח מסכם של המחקר 2018-19

מגישים: פרופ' אמיר שגיא ודר' אבשלום הורביץ

דו"ח זה בא לסכם את המחקר שהתנהל בשנים 2018 ו 2019 במימון קרן המחקרים של אמ"ד. מטרתו הייתה לפתח פרוטוקול לייצור מסחרי של אוכלוסייה כל-נקבית של מקרוברכיום שיאפשר גידול סרטן זה בבריכות הדגים ושיווקן לאורך כל השנה למאכל בני אדם או ליישומים אחרים כגון הדברה ביולוגית.

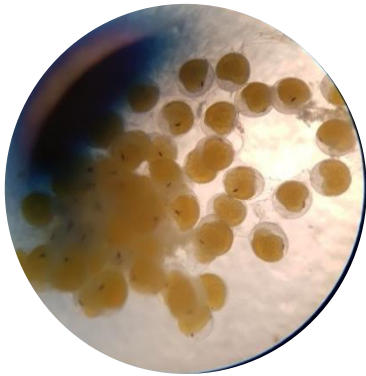
המחקר התנהל בשלושה תחומים במקביל:

1. מכון רבייה (בקיבוץ דן) - עסק בייצור לרוות ופוסט לרוות של נקבות רגילות (בעלות גנוטיפ WZ) תוך שימוש בזכרים נורמליים (ZZ) ונקבות בעלות גנוטיפ WW. בנוסף עסק המכון בניסיונות לייצור כמויות מסחריות של אימהות, כלומר נקבות WW תוך שימוש בנקבות WW וזכרים שהם נקבות מהופכות מין בעלי גנוטיפ WW גם הם. הבעיה הייתה שרק אחוז קטן של הזכרים מהופכי המין היו פוריים והמכון עסק בניסויים ממשקיים לשיפור אחוז הפוריות של הזכרים האלה.
2. מחקר מדעי – עסק באספקטים האנטומיים, פיזיולוגיים והורמונליים וגנטיים של הכשל הרבייתי בזכרים מהופכי זוויג. המחקר נערך במקביל ע"י שני מסטרנטים אחד באוניברסיטת בן-גוריון והשני באוניברסיטת חיפה.
3. שמירת חורף – כחלק מהאסטרטגיה של יצירת רצף שיווקי של מקרוברכיום נערכו ניסויים של שמירת חורף שכן סרטן זה רגיש לקור ואינו שורד בתנאים של החורף הישראלי בבריכות הדגים. הניסויים נערכו בחוות הדגים של דגי הדן בחמת גדר.

### **הפעילות במכון הרבייה של פרונית הצפון בקיבוץ דן:**

במהלך השנתיים של המחקר עסק המכון כאמור בייצור אוכלוסייה כל-נקבית של מקרוברכיום לאכלוס בבריכות דגים וייצר בשנת 2018 כ 60,000 פוסט לרוות (PL) וב 2019 כ 200,000 PL מלהקות רבייה שנרכשו מחברת אנזוטיק. במקביל עסק בניסיונות לייצר "אימהות" כלומר נקבות בעלות גנוטיפ WW שמיועדות לשמש במכונת רבייה, לייצור אוכלוסייה כל-נקבית. לצורך פעילות זו נדרשו זכרים בעלי גנוטיפ נקבי WW כלומר נקבות WW מהופכות מין. תהליך היפוך הזוויג נעשה בחברת אנזוטיק מבר-שבע על פי ידע שפותח באוניברסיטת בן-גוריון. הבעיה הייתה עם הפוריות של הזכרים ועל כך התמקד המחקר. במכון נעשתה עבודה רבה למציאת נקבות מהופכות עם גנוטיפ WW שיתפקדו כזכרים פוריים. לשם כך אוכלסו במכון 4-5 "זכרים" (נקבות מהופכות) עם כ 10 נקבות בכל מכל. נערך מעקב יומי אחר התנהגות החיות וכל נקבה שנצפתה נושאת ביצים הושמה בסל צף למעקב. נקבה שלא הופרתה זורקת את הביצים

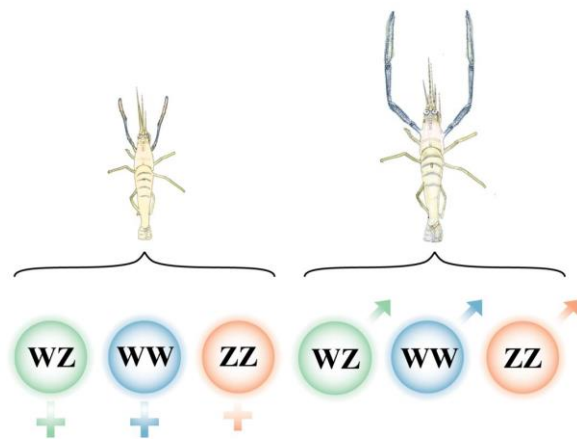
לאחר מס' ימים. נקבה שהופרתה, שומרת את הביצים וניתן לקבוע פוריות ודאית ע"י בדיקה בבינוקולר 6-7 ימים לאחר ההטלה (ראה איור 1).



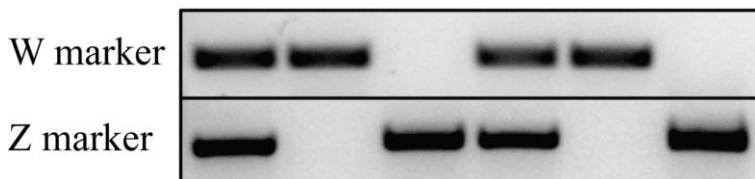
**איור 1:** ביצים בתחילת התפתחות עוברית. ניתן להבחין בשלב זה בקו העיין המתפתחת בעוברים.

בכדי לדעת מי הוא הזכר שהפרה את הנקבות נבדק כל זכר אינדיבידואלית ע"י זיווג פרטני עם נקבה רצפטיבית (שמוכנה להזדווגות) ובדיקת פוריות הביצים שנקבה ספציפית זו הטילה. כל זכר שהיה בבדיקה פרטנית כזו, הציג התנהגות רבייתית אבל לא הפרה את הנקבה, מוגדר כ "כשל" ומועבר למיכל של כושלים. באופן זה נמצאו בתחילה 2 זכרים פוריים בלבד מתוך שתי להקות שהגיעו למכון והעבודה נמשכת במגמה לבסס עדר רבייה משמעותי יותר. בהמשך נמצאו זכרים פוריים נוספים והתברר שבאמצעות שיפור הטכנולוגיה של היפוך הזוויג ושל תנאי הגידול בכל השלבים ניתן להגדיל משמעותית את אחוז הזכרים הפוריים.

היכולת לנתר ולקבוע בעילות גבוהה ביותר את קיומן של אוכלוסיות כל נקביות WZ ו WW מבוססת על הפיתוח והאפיון של סמנים גנומיים הדירים המסוגלים לזהות את קיומו של כרומוזום W או כרומוזום Z (ראה איור 2).

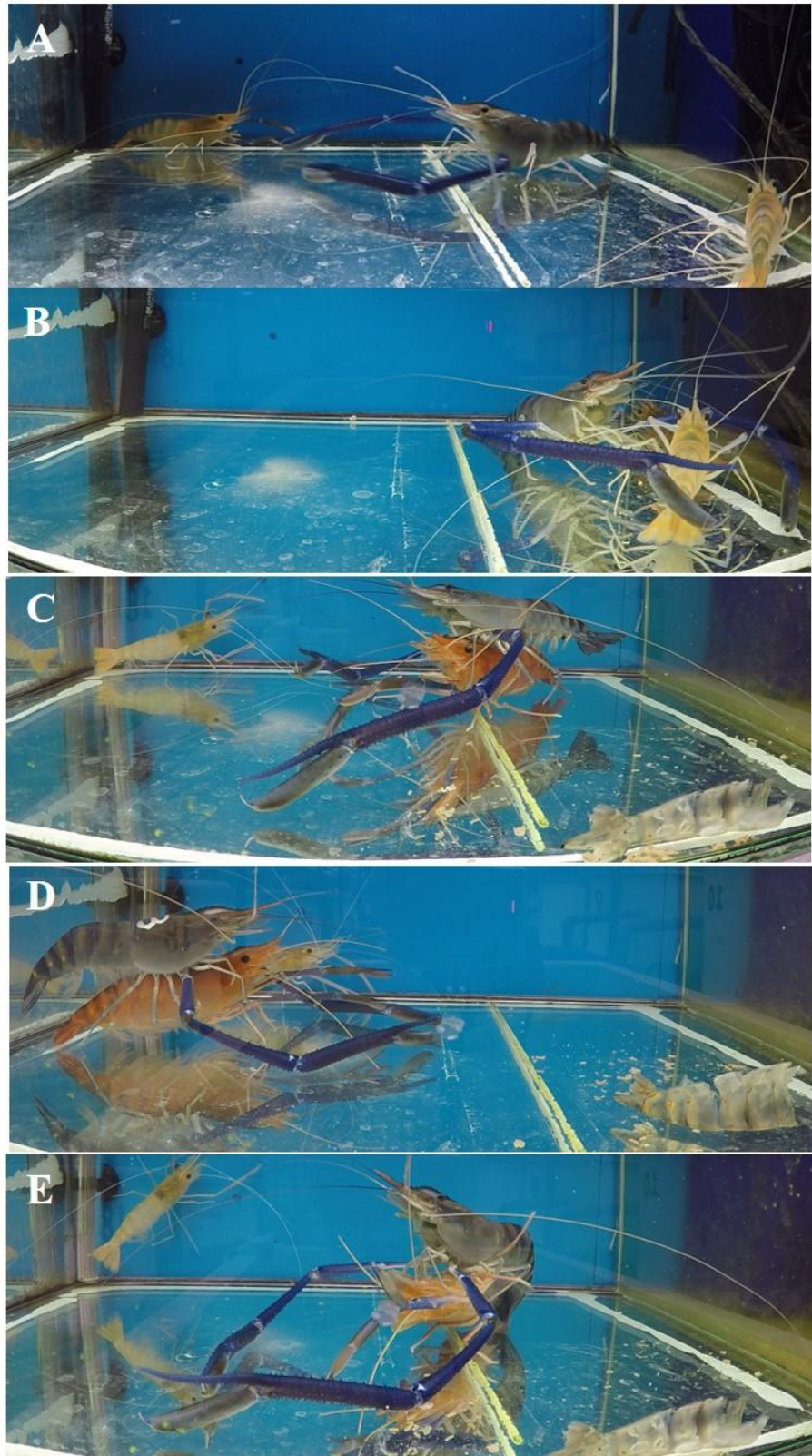


**איור 2:** מערך זיהוי באמצעות סמנים גנומיים של כל הקומבינציות האפשריות של שילוב פנוטיפ-גנוטיפ. הג'ל המוצג מראה הגברת PCR של סמנים גנומיים ייחודיים ל W ו Z. בפנל העליון הפנוטיפים הזכריים והנקביים וקומבינציות כרומוזומי המין שלהם. בפנל התחתון, מופע הסמנים הייחודיים לאחר הגברת ב PCR.



### **בחינת הסיבות לכשל רבייתי של נקבות מהופכות:**

מרבית הפרטים המהופכים אשר לא הראו פעילות רבייתית מוצלחת, כן הצליחו להראות התנהגות רבייתית אופיינית של שמירה על נקבה והזדווגות תקינה אך ללא הפרייה של הביצים בנקבה. התנהגות זו תועדה במבחני התנהגות של נקבות מהופכות אשר הראו כשל רבייתי. באיורים הבאים (איורים 3A-3E) מתועדים מצגים שונים במהלך החיזור, שמירה והזדווגות של נקבה מהופכת (בעלת כשל רבייתי) עם נקבה נורמלית. כל הנקבות המהופכות אשר נבדקו במבחני ההתנהגות הראו התנהגות רבייתית תקינה כשל זכר נורמלי אולם לא הצליחו להעמיד צאצאים. גם כאשר נבדקה פעילות זו מול נקבות נורמליות שונות.

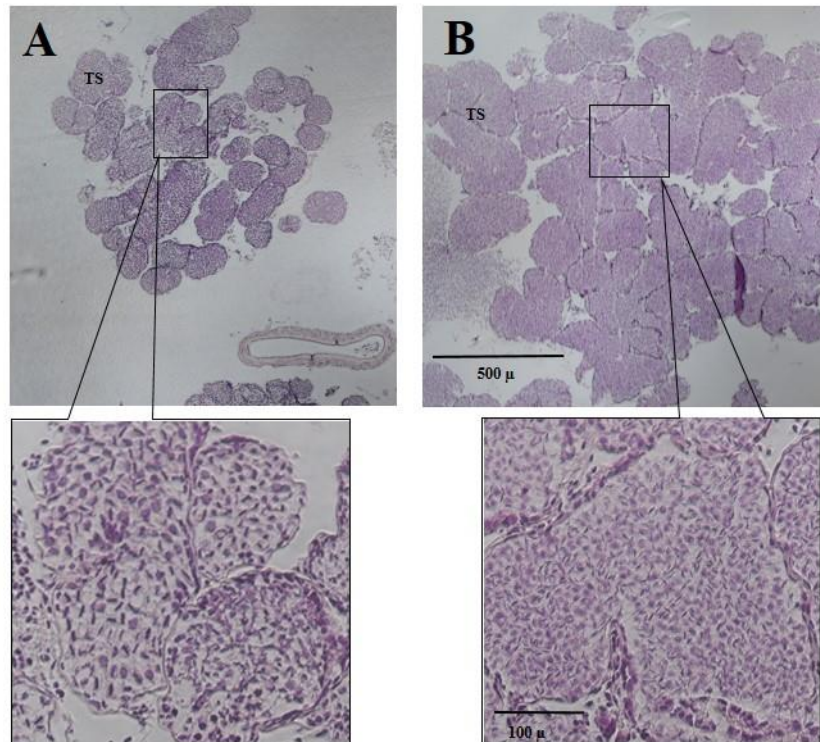


איור 3: שלבים התנהגותיים במהלך החיזור וההזדווגות בין נקבה מהופכת בעלת כשל רבייתי ובין נקבה נורמלית. A- גישוש, B- מגע, C- שמירה לאחר נשל מכין רבייה, D- גהירה, E- הזדווגות.

בחינה היסטולוגית של מערכת הרבייה בנקבות מהופכות (זכר WW) נעשתה בהשוואה לבחינת מערכת תקינה בזכרים (ZZ).

דגימות אשך, צינור מוביל זרע ובלוטה אנדרוגנית נותחו מחיות תקינות (ZZ) ומנקבות מהופכות (WW) אשר הראו כשל רבייתי. דגימות אלו קובעו כפורמלין, נחתכו במיקרוטום ונצבעו בצביעת המטוקסילין אאוזין לצורך הסתכלות מיקרוסקופית.

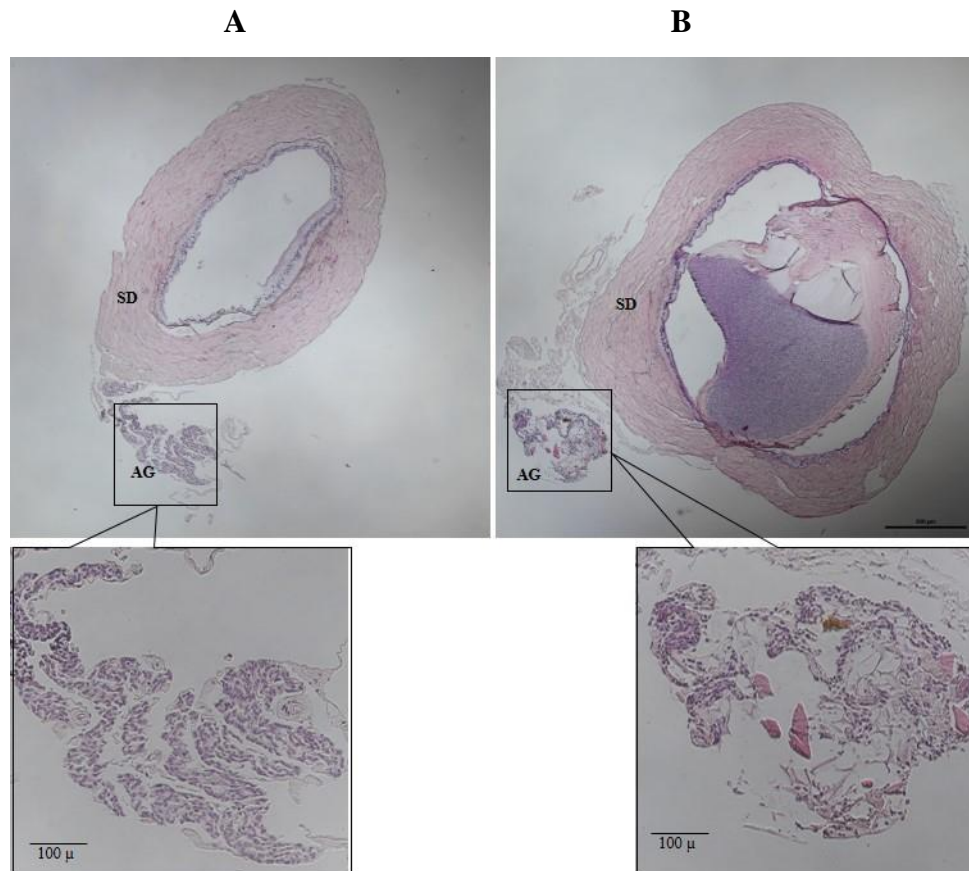
מבחינת חתכי האשכים בחיות ביקורת (זכר ZZ) ובחיות מהופכות (זכר WW) נצפו הבדלים ברמת הפעילות הספרמטוגנית באשך (ראה איור 4). בזכר ZZ נצפה אשך ובו אבוביות זרע המראות שלבי התפתחות שונים (ספרמטוגוניה, ספרמטידים וספרמטוזואה) (ראה איור 4A) בעוד שבאשך של זכר WW נצפו אבוביות ובהם ספרמטוזואה, וכן כמות לא מבוטלת של תאי זרע אשר לא השלימו את תהליך הבשלתם. בנוסף כמעט ולא נצפו ספרמטוגוניה פעילים, דבר המצביע על פגיעה בפעילות הספרמטוגנית (ראה איור 4B).



איור 4: חתך באשך של זכר ZZ נורמלי (A) ושל נקבה WW מהופכת (B). הריבוע על גבי התמונה מתאר איזור אשר מוצג בהגדלה. TS - אבובית זרע.

בבחינה של צינור מוביל הזרע (SD), האמפולה והבלוטה האנדרוגנית (AG) נמצאו הבדלים בין זכר ZZ נורמלי ובין זכר WW (ראה איור 5). בזכר ZZ נורמלי נצפתה בלוטה אנדרוגנית תקינה בעלת שלוחות תאים אפיתליאליים בתוך מעטפת של רקמת חיבור (ראה איור 5A) בעוד שבזכר WW נצפתה בלוטה

אנדרוגנית בעלת מעט מאוד תאים תקינים כאשר מרביתה נראתה ריקה מתאים אפיתליאליים כשרק מעטפת רקמת החיבור נצפית (ראה איור 5B).



איור 5: חתך מייצג בצינור מוביל זרע והבלוטה האנדרוגנית בזכר ZZ נורמלי (A) ובזכר WW (B). SD - צינור זרע, AG - בלוטה אנדרוגנית.

#### בחינת ביצועי הגדילה של נקבות WW בגידול משולב עם אמנונים

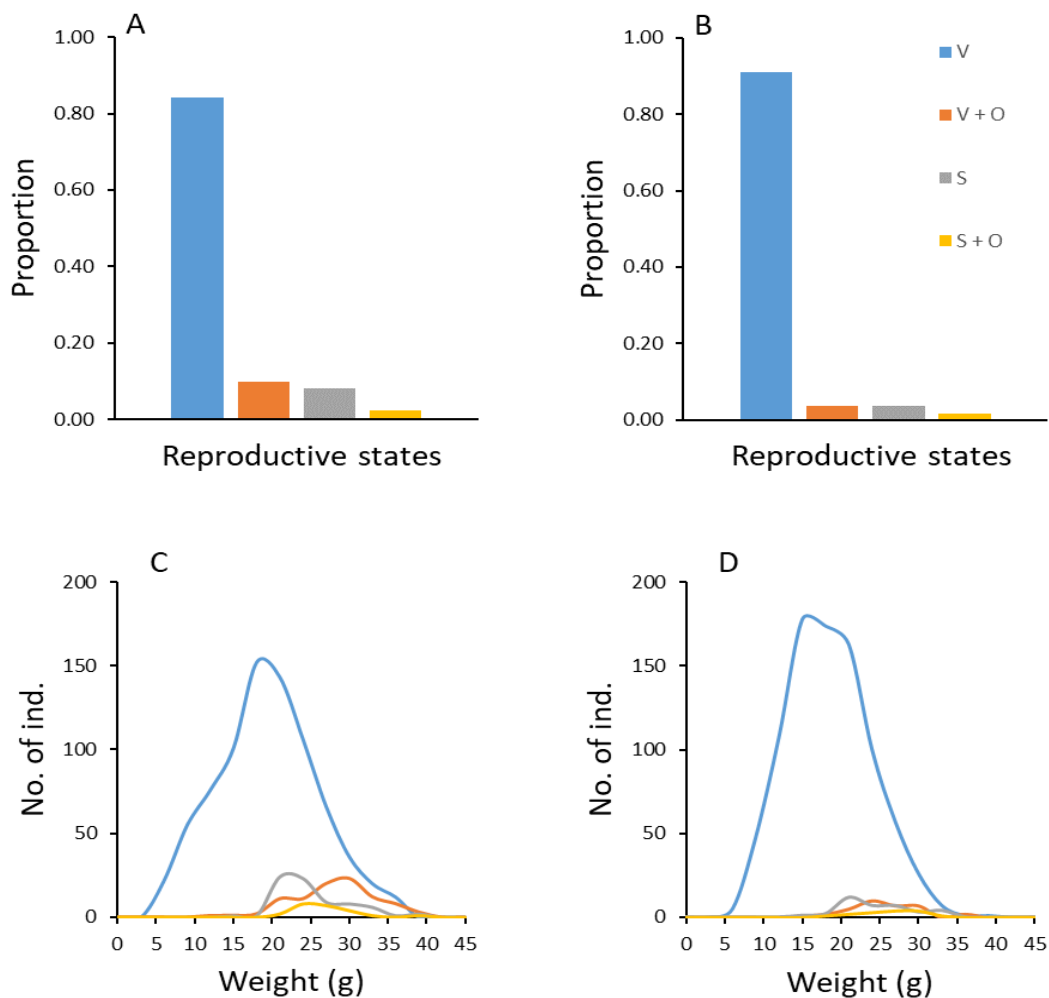
כחלק ממערך הפיתוח של אוכלוסיות כל נקביות של פרוניות, נבחנו הביצועים של אוכלוסיות כל נקביות WZ לעומת אוכלוסיות כל נקביות WW.

ביצועים אלו נבדקו בגידול משולב עם אמנונים בתחנת הניסיונות דור במהלך מאי - אוקטובר 2018. בניסוי זה אוכלסו האמנונים בצפיפות של 2 דגים למטר ואילו הסרטנים אוכלסו בצפיפות של 4 פרטים למטר רבוע. תקופת הגידול הייתה של כ 4 חודשים. שתי אוכלוסיות הסרטנים (כל נקבי WZ וכל נקבי WW) הראו אחידות גבוהה בגודל גוף עם שרידה נאותה (ראה טבלה 1) ותוספת יכול משמעותית של 55-60 קילוגרם של פרוניות לדונם בנוסף ליכול הדגים. באף אחת מבריכות הגידול לא נצפו זכרים והרוב הגדול של הנקבות היו לא רבייתיות (בתולות) שהינן בעלות קצבי גידול גבוהים יותר מנקבות רבייתיות (ראה איור 6). עם זאת, כפי שפורסם במאמר המסכם ניסוי זה (Molcho, et al 2020) ממוצעי המשקלים של הפרוניות היה נמוך מהצפוי ונובע בעיקרו מתקופת הגידול הקצרה יחסית בניסוי זה

ומתחרות משמעותית על מקורות המזון בין הסרטנים ובין הדגים. בקיץ 2019 בוצע ניסוי נוסף בתחנת הניסיונות דור ובו נמצא כי תוספת מזון שוקע אכן שיפרה את הביצועים של הסרטנים באופן מובהק. טבלה מספר 1: גדילה שרידה ויבול של אוכלוסיות כל נקביות WW ו WZ בגידול משולב עם

אמנונים

WW (3 בריכות)	WZ (3 בריכות)	
80 ± 9.2	83.4 ± 2.8	שרידה (%)
55.2 ± 4.1	59.9 ± 9.3	יבול (ק"ג לדונם)
17.6 ± 0.18	19.2 ± 0.22	משקל גוף
4.0 ± 0.04	4.1 ± 0.1	SGR (%/days)



איור 6: היחסים של שלבים רבייתיים שונים ופיזור גדלים של נקבות בגידול משולב עם אמנונים  
A ו C כל נקבי WZ, B ו D כל נקבי WW.

V- virgin; V+O- virgin with S- spent; S+O- spent with developed ovaries;  
ovaries.

## שמירת חורף בחמת גדר

אחד ממרכיבי תכנית המחקר עסק בפיתוח פרוטוקול לשמירת חורף של סרטנים כשלב הכרחי בממשק גידול שיאפשר שיווק רציף כל השנה. פעילות זו נעשתה בחמת גדר (ראה איור 7). הניסויים נערכו בחורף 2018 וכן בחורף 2019 בקבוצה של 10 בריכות בטון מלבניות בגדלים של 20, 30 ו- 50 קוב. האכלוס היה בנובמבר בצפיפויות של 30 או 60 חיות למטר מרובע במשקל ממוצע של 15-20 גרם.

הסרטנים הוחזקו בבריכות הנ"ל בטמפרטורה של  $18-20^{\circ}\text{C}$  כשהטמפרטורה נשמרה באמצעות שילוב של מים ירוקים שאובים מבריכת עפר ומים חמים גאותרמיים. הסרטנים קיבלו מזון שרימפס מתוצרת צמח בשיעור של 1% מהביומסה לקיום בלבד (שלא במגמת פיטום). לצורך הגדלת שטחי פנים, הוכנסו צברים של סרטנים ששימשו כמקומת מסתור לחיות בתקופת הנשל ולהקטנת אינטראקציה בין הפרטים על מנת להקטין את הטריפה ולשפר את ההישרדות.

מניתוח התוצאות של שני מחזורי הניסויים ניתן להסיק שכל עוד נשמרת טמפרטורה נמוכה בתחום של  $18-20^{\circ}\text{C}$  ההישרדות היא סבירה (65-80%) אבל אם מאילוץי מקום כמו שקרה בחמת גדר, משאירים את הסרטנים בבריכות החורף מעבר לחודש אפריל ההישרדות יורדת משמעותית. מרגע שהטמפרטורה עולה המטבוליזם עולה, קצב ההתנשלויות של החיות עולה וגם שיעור הקניבליזם והטריפה גובר. זה הביא לאובדן של כ-50% נוספים של האוכלוסייה בתקופה החמה של מאי עד יולי, למרות תוספת מזון שהסרטנים קיבלו. לא נמצא הבדל משמעותי בין ההישרדות הסופית לצפיפות האכלוס הראשוני (פירוט כל הנתונים של האכלוסים והפירוקים הובא בדוחות הקודמים).



איור 7: אתר המדגה בחמת גדר



## חשיבות המחקר ותרומתו לענף המדגה מבחינה מקצועית וכלכלית

המחקר שבוצע לא היה מראש תנאי הכרחי לפיתוח אוכלוסייה כל-נקבית של פרוניות כמוצר מסחרי חדש למדגה הישראלי אבל תוצאותיו מגדילות את סיכויי ההצלחה של מיזם גידול הסרטנים ומקטינות מאוד את הסיכוי לכישלון כפי שהיה בעבר בשנות השמונים.

החלק המדעי של ה"כשל הרבייתי" תרם רבות להבנת התופעה בזכרים מהופכי הזוויג וכיום, יחד עם המרכיב הממשקי של פעילות זו כבר אפשר לקבוע שקטע זה אינו מהווה יותר מגבלה. החלק שעסק במכון הרבייה חשוב ביותר להבטחת האספקה של פוסט לרוות לאכלוס בבריכות באביב. החלק של המחקר שעסק בשמירת חורף של פרוניות, חיוני לפיתוח ממשק גידול ושיווק רציף לאורך כל השנה (ראה תרשים זרימה של ייצור פרוניות).

היישום העיקרי של גידול הפרוניות בשנתיים האחרונות היה בעמק המעיינות להדברה ביולוגית של חלזונות כאמצעי להילחם בטפיל הצנטרוצסטוס הפוגע בדגי אמנון, באס ואחרים. כחלק חשוב ממהלך זה נעשה שימוש בחיות אשר עברו שמירת חורף במתקנים בחמת גדר. בהמשך לעונת הגידול של שנת 2018 גם ב 2019 הועברו חיות בוגרות במשקל ממוצע של 20-25 גרם ואוכלוסי בבריכות גידול של דגי אמנון ובאס. האכלוס בוצע באמצע יולי והבריכות הורדו באמצע נובמבר (4 חודשי גידול בבריכה). משקל ממוצע של פרוניות מגידול זה הגיע ל 80-90 גרם ומעיד על פוטנציאל גבוה וגידול מיטבי של הסרטנים גם בתקופת גידול קצרה יחסית. התוצאות של פעילות זו (מההיבט ההדברתי שלה) יתפרסמו במסגרת אחרת אבל כבר כיום יש אינדיקציות חיוביות ביותר על הצלחת הפעילות הזו.

בהקשר של הפרוניות ישנן כמה תובנות חשובות שמן הראוי להדגיש:

1. אכלוס הסרטנים בשלב PL חייב להתבצע מספר ימים לפני אכלוס הדגים. זה מאפשר לסרטנים למצוא מסתור ומקטין את הטריפה ע"י הדגים.
2. צפיפות האכלוס המומלצת היא 4 חיות למטר ורצוי לשלב גם סרטנים גדולים יותר של כ 15 – 20 גרם שיטפלו בחלזונות הבוגרים.
3. אין צורך להאכיל את הסרטנים. הם יגדלו יפה על החלזונות ועל שאריות המזון והפרשות הדגים.
4. בעת פירוק הבריכה בסוף הקיץ יש להוריד מים לאט כדי לאפשר לסרטנים לרדת עם המים. מומלץ להוציא קודם את רוב הדגים ורק אחר כך לשלות את הסרטנים תוך הפרדת הטלה פראית ומיון לגודל. חיות מעל 30 גרם מיועדות לשיווק, קטנים יותר לשמירת חורף והמשך גידול בעונה הבאה.
5. יש לעשות מראש סידורים להעשרה בחמצן של בור הדייג.

תרשים זרימה של ייצור פרוניות ושיווק כל השנה

דצמ'	נוב'	אוקט'	ספט'	אוג'	יולי'	יוני'	מאי'	אפר'	מרץ	פבר'	ינו'	
שיווק משמירת חורף	שיווק משמירת חורף	שיווק	פיטום	פיטום	פיטום	פיטום	פיטום	אימון	רבייה וייצור PL	רבייה וייצור PL		גידול מסורתי
							שיווק משמירת חורף	שיווק משמירת חורף	שיווק משמירת חורף	שיווק משמירת חורף	שיווק משמירת חורף	
שמירת חורף	שמירת חורף	פיטום	פיטום	פיטום	פיטום	פיטום	אימון	רבייה וייצור PL	רבייה וייצור PL			אכלוס מדורג 1
		שיווק	שיווק	שיווק	שיווק	שיווק	פיטום	פיטום	שמירת חורף	שמירת חורף	שמירת חורף	
שמירת חורף	שמירת חורף	פיטום	פיטום	פיטום	פיטום	אימון	רבייה וייצור PL	רבייה וייצור PL				אכלוס מדורג 2
שיווק משמירת חורף	שיווק משמירת חורף	שיווק	שיווק	שיווק	שיווק	פיטום	פיטום	פיטום	שמירת חורף	שמירת חורף	שמירת חורף	

**ניתוח כלכלי:**

הנחות המוצא הכלכליות למיזם הפרוניות מתבססות על הנתונים הבאים שמקורם בתוצאות שהתקבלו במשקים ובתחנת המחקר בדור:

גידול להדברה ביולוגית

אכלוס לדונם: 4 חיות למטר, PL 4,000. במחיר של 36 אגורות זה עלות של 1440 ₪ לדונם. בהישרדות בתום עונת גידול של 5 חודשים: 60%, גודל ממוצע של 30 גרם ומחיר לקג' של 60 ₪ מתקבלת הכנסה של 4,320 ₪ או רווח של 2,880 ₪ לדונם מהסרטנים בלבד עוד לפני היתרונות של ההדברה הביולוגית. מזה כמובן צריך להפחית עלויות של עבודה בשלייה, חמצן, הובלות וכדומה. גידול למאכל בשילוב עם אמנונים

אכלוס לדונם: 6 סרטנים למטר, PL 6,000. במחיר של 36 אגורות זה עלות של 2,160 ₪ לדונם. הישרדות בתום עונת גידול של 5 חודשים: 70% (4,200 חיות בגודל ממוצע של 30 גרם). תפוקה לדונם: 126 קג' מחיר מכירה: 60 ₪ לקג' הכנסה לדונם: 7,560 ₪. רווח צפוי לדונם: 2,268, 30% מהפרוניות בלבד! (נלקח בחשבון הוצאות עבודה, מזון, אנרגיה, הובלות וכו').

דגשים לשמירת חורף

1. המערכת לשמירת חורף של מקרוברכיום יכולה להיות מבוססת על בריכות מגדלים וסוגים שונים בעדיפות לבריכות עפר.
2. הבריכות צריכות להיות מכוסות במבנה חממה ומקור מים שיאפשר טמפרטורה של 18-20°C.

3. על פני רוב שטח הבריכה צריך להתקין מסתורים כך שיתאפשר מצד אחד ניקוז מים ולכלוך ומצד שני שטח פנים גדול למסתורים.
  4. צפיפות האכלוס יכולה להיות כ 60 חיות למטר או אפילו יותר, תלוי במבנה המסתורים.
  5. בקרה על הטמפרטורה ואיכות המים כולל חמצן, הכרחית!
  6. האכלה בשיעור של כ 1% ליום מזון שרימפס בפיזור רחב ולא נקודתי.
  7. יש להוציא את הסרטנים משמירת החורף לאכלוס להמשך גידול מיד כשהטמפרטורות בבריכות מאפשרות זאת.
- שאלת המפתח היא כמובן גודל השוק בישראל ומה הפוטנציאל לייצא. את זה קשה מאוד להעריך כל עוד אין כמויות משמעותיות של פרוניות להציע לשוק אבל ברור שזה תלוי במידה רבה באיכות המוצר (טריות, גודל ואחידות) ובעיקר בזמינות לאורך כל השנה, נושא שהיה במוקד המחקר שבוצע.

### **לסיכום**

אנו מודים לארגון מגדלי דגים על התמיכה במחקר ומאחלים למשקי המדגה שידעו לעשות שימוש בתוצאותיו להמשך פיתוח גידול הסרטנים בישראל.