

השפעת החקלאות הימית על השונות הגנטית של אוכלוסיות טבעיות - דגי דניס בים התיכון ובים סוף כמודל

מרינה פרילינג^[1], יוני זוהר^[2], דני גולני^[3] וירון טיקוצינסקי^[1]*

^[1] בית הספר למדעי הים, המרכז האקדמי רופין, מכמורת

^[2] המכון לביוטכנולוגיה ימית, אוניברסיטת מרילנד, בולטימור

^[3] המחלקה לאבולוציה, סיסטמטיקה ואקולוגיה, האוניברסיטה העברית בירושלים

* yaront@drupin.ac.il

דני דניס בכלוב, סמוך לתוף מכמורת | צילום: דוד קבלי



מחקרי נקודת חיץ

תקציר

דג הדניס הוא מין תת־טרופי הנפוץ בים התיכון, הן במי הים הן במים מליחים, כגון לגונות השוכנות בסמוך לחוף ושפכי נהרות. כיום קיים גידול חקלאי של דגי דניס כמעט בכל ארצות הים התיכון. עשרות מכוני רבייה של דגי דניס בעלי גרעיני רבייה משלהם פזורים לאורך חופי הים התיכון. במדינת ישראל, כמקובל בעולם, אין פיקוח על ההרכב הגנטי של האוכלוסיות המשמשות לגידולי החקלאות הימית. אחד האיומים המשמעותיים על האוכלוסייה הטבעית של דגי הדניס הוא בריחה של דגים רבים מחוות הדגים אל הטבע והפרת האיזון הגנטי של אוכלוסיית־הבר. כתוצאה מהתהליך זה, קטנה השונות הגנטית של האוכלוסייה הטבעית, ופוטנציאל ההישרדות שלה אמור לקטון מאוד.

במחקר הנוכחי ביקשנו להשוות את ההרכב הגנטי של אוכלוסיית דגי הדניס בטבע להרכב הגנטי של אוכלוסיות הדגים בגידולי החקלאות הימית. ביקשנו גם לחקור את השפעת אוכלוסיית החקלאות הימית על ההרכב הגנטי של האוכלוסייה הטבעית. אספנו דגימות דגי דניס מהחקלאות הימית ומהטבע. הפקנו די־אן־איי וניתחנו את השונות הגנטית באמצעות סמני די־אן־איי מיטוכונדרי ורצפים גנומיים חוזרים (Short Tandem Repeats – STRs).

האוכלוסייה הטבעית של דגי דניס בחופי מדינת ישראל קטנה מאוד. לפי סקרי דיג ועדויות דייגים, יש קושי רב במציאת דגי דניס בטבע, ומכאן מספרם הנמוך במדגם המוצג במחקר זה. לא ברור אם הדיג המואץ או זליגה של אוכלוסיית החקלאות הימית הם שהביאו למצב. במחקרנו הוכחנו שהרכב האוכלוסייה הטבעית לא שונה באופן מובהק מזה של אוכלוסיית החקלאות הימית. אין באפשרותנו לגלות את הרכב האוכלוסייה הטבעית לפני כניסת החקלאות הימית של דגי הדניס לים התיכון, מאחר שקיימות מעט מאוד דגימות היסטוריות שאפשר לנתחן. זוהי הוכחה לכך שחיוני לדעת את ההרכב הגנטי של גידול חקלאות ימית כלשהו ואת הרכב האוכלוסייה הטבעית שהוא עלול לדלל. אנו ממליצים על יישום מדיניות זו בפיקוח על גידולי החקלאות הימית.

מילות מפתח: אוכלוסייה טבעית · דניס (סְפָרוּס זָהוּב, *Sparus aurata*) · חקלאות ימית (חקיין) · פוטנציאל הישרדות · שונות גנטית

מבוא

דג הדניס (סְפָרוּס זָהוּב, *Sparus aurata*) הוא מין תת־טרופי הנפוץ בים התיכון וכן בחוף המזרחי של האוקיינוס האטלנטי – מבריטניה ומיצרי גיברלטר ועד רפובליקת קייפ־זרדה, בסמוך לאיים הקנריים [5]. גידול דגי הדניס בים התיכון הגיע ל־139,187 טונות בשנת 2010 [3]. עד לשנת 2008 התרכז רוב גידול הדגים בישראל בים סוף. אז הועברו כלובי הדגים לים התיכון, שם גודלו דגי דניס מראשית שנות ה־2000. דגי הדניס אינם שוכנים טבעיים בים סוף, אך זמן קצר לאחר הכנסת הכלובים ניתן היה למצוא להקות שלהם שם. כיום, לאחר הוצאת הכלובים, נעלמו להקות דגי הדניס ממפרץ אילת (על פי סקרי דיג של דני גולני).

בים התיכון פועלים כיום 65 מכוני רבייה של דגי דניס ברוב המדינות השוכנות לחופיו ובכללן ישראל [11]. לכל מכון רבייה יש בדרך כלל גרעין רבייה משלו, המורכב מדגים בקבוצות גיל שונות וממקורות שונים מגידול טבעי או חקלאי. בישראל פועלים שני מכוני רבייה, אחד באילת ואחד במעגן מיכאל, המספקים את

הביקוש המקומי, אולם בעבר יובאו דגים ממכוני רבייה ביוון ובקפריסין [11].

במדינת ישראל, כבשאר מדינות העולם, אין פיקוח על הרכב האוכלוסיות המשמשות לגידולי החקלאות הימית. באופן כללי מושפע מספר האוכלוסיות המייסדות את מאגר הדגים מאילוצים כלכליים של היצרן, ולפיכך השונות הגנטית של אוכלוסיית הדגים מוגבלת, דבר שמקטין את יכולתה לעמוד בשינויים סביבתיים ובמחלות [1].

שונות גנטית היא תנאי הכרחי לכך שאוכלוסיות ישרדו בטבע. ירידה בשונות הגנטית מביאה לירידה בכושר ההסתגלות של האוכלוסייה ובסופו של דבר עלולה גם לגרום להכחדתה, בתהליך של ערבול הגורם להכחדה (extinction vortex) [6]. אחד האיומים המשמעותיים על האוכלוסייה הטבעית של דגי הדניס הוא בריחה של דגים רבים מחוות הדגים אל הטבע, התרבות עם דגי־הבר והפרת האיזון הגנטי של אוכלוסיית־הבר [7].

היסטוריות שאפשר לנתחן, לא היה באפשרותנו לגלות את הרכב האוכלוסייה הטבעית לפני כניסת החקלאות הימית של דגי הדניס לים התיכון.

יש חשיבות רבה למעקב אחר השונות הגנטית של דגי הדניס בחופי הים התיכון. כמו כן יש צורך לבדוק את ההרכב הגנטי של אוכלוסיית דגי הדניס בחקלאות הימית ואת יחסי הגומלין בין שתי האוכלוסיות. כך יהיה אפשר לסייע לקיומה של אוכלוסייה טבעית של דגי דניס בחופי מדינת ישראל, וכן ללמוד ממקרה זה לקראת גידולי חקלאות ימית נוספים.

שיטות

מ-81 דגים נאספו דגימות: 29 דגים נתפסו לאורך חופי ישראל מחיפה בצפון ועד אשדוד בדרום, ו-52 דגים נאספו מכלובי דגים במעגן מיכאל, מכלובי אשדוד וממכון הרבייה של חברת ערדג (לאתרים המדויקים ולזמנים - ראו **טבלה 1** בנספח שבאתר כתב העת).

די־אן־איי הופק בעזרת ערכת Accuprep® genomic DNA extraction kit.

תכנון התחלים (פריימרים) עבור הדי־אן־איי המיטוכונדרי נעשה בתכנת Oligo Analyzer, בהתבסס על רצף המצוי בספרות (GenBank). סך הכול תוכנו 10 תחלים, ומתוכם נבחר השילוב שנותן תוצרים מיטביים מבחינת איכות וגודל. נוסף על כך, נעשה שימוש ב-11 זוגות תחלים עם סמן פלורסצנטי עבור אזורי חזרות בדי־אן־איי הגנומי (STR) (8, 9, 12) (פירוט התחלים ב**טבלה 2** שבנספח).

תגובות ההגברה (PCR) של הדי־אן־איי עבור כל אתר כוילו לתנאים המיטביים, ולאחר מכן בוצעו עבור כלל הדגימות. התוצרים הורצו באלקטרופוזיז על ג'ל אגארוז לשם אימות קבלת תוצר.

התוצרים שהתקבלו מה-D-loop נשלחו לריצוף (מעבדות חי בע"מ). לאחר קבלת הרצפים בוצעה עבודה ביואינפורמטית בתכנת Bioedit, להשוואת הרצפים (בשיטת ClustalW Multiple Alignment), למציאת המוטציות ולבניית עץ פילוגנטי (בשיטת Neighbor Joining) להערכת השונות באוכלוסיית הדגים שנבדקה.

תוצרי ניתוח רצפים גנומיים חוזרים (STR) הוגברו בעזרת תחלים פלורסצנטיים, ונשלחו להערכת אורך המקטע (מעבדות חי בע"מ).

תוצאות

הנתונים שהתקבלו מבדיקת הדי־אן־איי המיטוכונדרי והגנומי נותחו לקביעת השונות הגנטית בכל אוכלוסייה (טבע וחקלאות ימית), וכן לשם השוואה בין האוכלוסיות.

מחקר שבוצע על דגי סלמון באירלנד הראה ירידה משמעותית בשרידות של האוכלוסייה הטבעית בשל זליגה של דגים שמקורם בחקלאות הימית, והעובדה שהם מתרבים עם אוכלוסיות־הבר^[10]. כמו כן, הוכח הצורך במניעת מעבר הגנים מהגידולים החקלאיים אל האוכלוסיות הטבעיות, בייחוד אם הן אינן גדולות ויציבות דיין, וכמובן אם הן בסכנת הכחדה^[4]. מחקר שנעשה על אוכלוסיות דגי דניס ביוון הצביע על הבדלים בעושר הגנטי בין דוגמאות טבעיות לדוגמאות שמקורן בחקלאות הימית, אך עדיין לא הוכחה השפעת החקלאות הימית על פוריות האוכלוסייה הטבעית^[9].

על קצה המזלג

- * משבר הדיג העולמי מאיץ את פיתוח ענף החקלאות הימית, הכולל גידול נרחב של דגי דניס בים התיכון.
- * החקלאות הימית מציבה איום אקולוגי אפשרי על אוכלוסיות הדניס הטבעיות - בריחת דגים מהכלובים שתביא לירידה בשונות הגנטית של אוכלוסיות־הבר.
- * החוקרים נעזרו בשיטות גנטיות חדשניות לאפיין ולזיהוי מולקולרי של ההרכב הגנטי של אוכלוסיות הכלובים והאוכלוסיות הטבעיות, אך לא מצאו שוני מהותי ביניהן.
- * עקב חוסר הידע בדבר הרכב האוכלוסייה הטבעית לפני תחילת פעילותה של החקלאות הימית, לא ניתן לדעת אם האוכלוסייה הטבעית כבר התדלדלה.
- * הכותבים מתריעים כי יש לעצב מדיניות פיקוח ברורה על הרכב אוכלוסיות הדגים בחקלאות הימית ולאסוף מידע על ההרכב הגנטי של האוכלוסיות הטבעיות של אותם מיני דגים.

האוכלוסייה הטבעית של דגי הדניס בחופי מדינת ישראל קטנה מאוד. לפי סקרי דיג שעורך אחד מהמחברים (דני גולני) ועל סמך עדויות דייגים, יש קושי רב במציאת דגי דניס בטבע, ומכאן מספרם הנמוך במדגם המוצג במחקר זה. לא ברור אם הדיג המואץ או זליגה של אוכלוסיית החקלאות הימית הם שהביאו למצב. במחקר הנוכחי ביקשנו להשוות בין ההרכב הגנטי של אוכלוסיית דגי הדניס בטבע להרכב הגנטי של אוכלוסיות הדגים בגידולי החקלאות הימית. ביקשנו גם לחקור את השפעת אוכלוסיית החקלאות הימית על ההרכב הגנטי של האוכלוסייה הטבעית. למרות זאת, מאחר שקיימות מעט מאוד דגימות

הופכים לנקבות (דו-מיניות קדם-זכרית - protandry) [13]. הודות לכך יכול המגדל להשתמש באותו דג כמרבח זכר ולאחר מכן גם כנקבה, ובכך להקטין עוד יותר את המגוון הגנטי של דורות ההמשך [1].

בכל התוצאות שהתקבלו ניכר הצורך בהגדלת המדגם, אך כאמור - יש קושי גדול במציאת דגים מן הטבע. לעתים, לאחר סערה גדולה, יש מספרים גדולים של דגי דניס בים ואף קל לדוג אותם, אך הם מייצגים כמובן אירוע של בריחה מן הכלובים, ולכן אין להסיק מהם על האוכלוסייה הטבעית.

ניתוח ההרכב הגנטי של האוכלוסיות בהסתכלות על הדי-אן-איי המיטוכונדרי מראה שבעה הפלוטיפים שונים. האוכלוסייה הטבעית מתחלקת לארבעה הפלוטיפים. שלושה מהם נפוצים מאוד וכוללים דגים משתי האוכלוסיות. רק דג אחד מהטבע היה בעל הפלוטיפ ייחודי. הפלוטיפ טבעי זה רחוק רק במוטציה אחת מאחד משלושת הפלוטיפים הנפוצים. לשם השוואה ניתן היה למצוא באוכלוסיית החקלאות הימית שלושה הפלוטיפים שאינם נפוצים. יש להדגיש שמדגם החקלאות הימית היה גדול ממדגם האוכלוסייה הטבעית, אך בכל מקרה אין עדות לכך שהאוכלוסייה הטבעית מגוונת יותר.

התמונה הכללית של סמני ה-STR מראה שונות רבה, וזה אולי סימן מעודד לגבי הרכב שתי האוכלוסיות, זו שבטבע, ובייחוד זו שבחקלאות הימית. בהשוואה בין האוכלוסייה הטבעית לבין זו המשמשת לחקלאות הימית המצב מעודד פחות, כי אין למעשה הבדל בין שתי האוכלוסיות. מבין 157 אללים שנמצאו סך הכול בכל האתרים, נמצאו 123 באוכלוסיית החקלאות הימית לעומת 92 בלבד באוכלוסייה הטבעית. מרבית האללים מהאוכלוסייה הטבעית (58) נמצאו גם באוכלוסיית החקלאות הימית. בבחינת התפצלות האללים עבור כל אחד מהסמנים (התוצאות אינן מוצגות) ניתן לראות בדרך כלל כי אלל אחד נפוץ הרבה יותר מהשאר (45%-15%). האללים הנפוצים מרכיבים 39% מאוכלוסיית החקלאות הימית ו-32% מהאוכלוסייה הטבעית. שיעור ההומוזיגוטים בשתי האוכלוסיות תואם את ההומוזיגוטיות המצופה לאור שכיחות האללים.

הניתוח שלנו מתבסס על שינויים (מוטציות) של החלפת בסיסים המתרחשים בתדירות נמוכה, ועל שינויים במספר החזרות, שקורים בתדירות רבה יותר באתרי רצפים חוזרים. שילוב של שתי השיטות מראה לנו שאין הבדל משמעותי בין שתי האוכלוסיות. הן דומות בהרכבן הגנטי, ואי אפשר לקבוע אם פרט מסוים שייך באופן מובהק לאוכלוסייה הטבע או החקלאות הימית על פי הסמנים הגנטיים שנבדקו. האוכלוסייה הטבעית היא בעלת שונות נמוכה מעט יותר, אך המדגם קטן יותר. תנאי לביסוס תוצאות מחקר זה.

לסיכום, התוצאה המשמעותית ביותר אינה נובעת מהניתוח

תוצאות די-אן-איי מיטוכונדרי

אין הפרדה ברורה בין הפלוטיפים (haplotype - רצף בסיסים) של אוכלוסיית החקלאות הימית ואוכלוסיית-הבר, והפרטים מופיעים על העץ באופן מעורב. מבין שבעת הפלוטיפים שהוגדרו, שלושה נפוצים מאוד וכוללים דגים משתי האוכלוסיות. נוסף על כך נמצאו גם ארבעה הפלוטיפים נדירים יותר - שלושה של דגים מהחקלאות הימית ורק דג אחד עם הפלוטיפ ייחודי מהטבע (ראו **איור 1** שבנספח).

תוצאות רצפים גנומיים חוזרים (STR)

השתמשנו בתחלים להגברת 11 אתרים על פני הגנום. לא כל תגובות ההגברה אפשרו ניתוח מדויק עבור כל הדגימות. משום כך השתמשנו להמשך הניתוח רק באתרים שהיו לנו עבורם מעל 25 דגימות אינפורמטיביות. ראו **טבלה 3** שבנספח.

בכל אחד מתשעת סמני ה-STR שנותחו נמצאו אללים רבים (10-25) המעידים על שונות גנטית גבוהה. מבין 157 אללים שנמצאו בסך הכול בכל האתרים, נמצאו 123 באוכלוסיית החקלאות הימית לעומת 92 בלבד באוכלוסייה הטבעית. מרבית האללים מהאוכלוסייה הטבעית (58 במספר) נמצאו גם באוכלוסיית החקלאות הימית. עבור כל אחד מהסמנים (**גרפים 1-9** שבנספח) ניתן לראות בדרך כלל אלל אחד נפוץ הרבה יותר מהשאר (45%-15%). האללים הנפוצים מרכיבים 39% מאוכלוסיית החקלאות הימית ו-32% מהאוכלוסייה הטבעית. הומוזיגוטיות של אללים, המעידה על שונות נמוכה ועל זיווגי קרובים, נמצאה ב-18 מקרים בפרטים מן הטבע לעומת 42 מקרים בפרטים מאוכלוסיית החקלאות הימית.

דיון ומסקנות

חקלאות ימית של דגי הדניס בים התיכון החלה לפני עשרות שנים, אך למרות זאת נעשו מעט מאוד מחקרים להערכת המצב הגנטי של אוכלוסיות טבעיות ובחקלאות [2]. בישראל לא נערך מחקר כזה על אף הדיון המתמשך בנושא השפעת החקלאות הימית על הטבע.

גידולים חקלאיים חדשים מתבססים על אוכלוסיות-הבר, אך עם הזמן יוצרים דגי החקלאות הימית את מקור האוכלוסיות של הדורות הבאים, והשונות באוכלוסייה פוחתת. אחד החששות העיקריים בחקלאות הימית של מיני דגים הוא השפעת הצטמצמות השונות הגנטית של הדגים בכלובים על הצלחת גידולם בשבי ועל היותם מסחריים. עם זאת, כמעט שלא מתנהלים מעקב ותחזוקה של גרעיני רבייה שכוללים תקנות ונהלים מסודרים שמטרתם שמירה על שונות גנטית. יתרה מכך, חוות רבות אינן מחזיקות גרעין רבייה, ורוכשות דגים מספק חיצוני.

כל דגי הדניס מתחילים את חייהם כזכרים ומאוחר יותר

247: 219-225.

[3] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programme. www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata. Viewed 30 Dec 2012.

[4] Fraser DJ, Houde AS, Debes PV, et al. 2010. Consequences of farmed-wild hybridization across divergent wild populations and multiple traits in salmon. *Ecological Applications* 20: 935-953.

[5] Froese R and Pauly D. 2006. Fish base. www.fishbase.org. Updated Nov 2010.

[6] Gilpin ME and Soulé ME. 1986. Minimum viable populations: Processes of species extinction. In: Soulé ME (Ed). Conservation biology: The science of scarcity and diversity. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.

[7] Grigorakis K and Rigos G. 2011. Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 855: 899-919.

[8] Launey S, Krieg F, Haffray P, et al. 2003. Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (*Sparus aurata* L.): Characterization, polymorphism and linkage. *Molecular Ecology Notes* 3: 457.

[9] Loukovitis D, Sarropoulou E, Vogiatzi E, et al. 2012. Genetic variation in farmed populations of the gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece using microsatellite DNA markers. *Aquaculture Research* 43: 239-246.

[10] McGinnity P, Prodöhl P, Ferguson A, et al. 2003. Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceeding of The Royal Society B* 270: 2443-2450.

[11] Sola L, Moretti A, Crosetti D, et al. 2007. Gilthead seabream - *Sparus aurata*. In: Svåsand T, Crosetti D, Garcia-Vazquez E, and Verspoor E (Eds). Genimpact - Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802), European Commission.

[12] Wu L, Kaufman L, and Fuerst PA. 1999. Isolation of microsatellite markers in *Astatoreochromis alluaudi* and their cross-species amplifications in other cichlids. *Molecular Ecology* 8: 895-897.

[13] Zohar Y, Abraham M, and Gordin H. 1978. The gonadal cycle of the captivity reared hermaphroditic teleost, *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Annales Biology, Animal Biochemistry Biophysics* 18: 877-882.

הגנטי אלא מן הקושי להשיג את הנתונים. נכון לשנת 2012, האוכלוסייה הטבעית של דגי דניס בחופי מדינת ישראל דלילה. דגי דניס שניצודים בכמויות של יותר מפרטים בודדים מקורם בתקלות שהביאו לבריחתם מן הכלובים. הם גם מתנהגים כדגי שבי, ולא מנסים כלל להתחמק מהדייגים. לאור היעלמות הדגים מהטבע באילת לאחר הוצאת הכלובים, אנו יכולים לשער כי דגי החקלאות הימית אינם שורדים היטב בטבע. אמנם מפרץ אילת אינו סביבתם הטבעית, אבל גם בים התיכון, על אף בריחה מהכלובים, דגי הדניס אינם מצליחים לבסס אוכלוסייה לאורך חופי הארץ.

מה הסיבה לדלילות אוכלוסיית דגי הדניס בחופי ישראל? אפשרות אחת היא דחיקת האוכלוסייה מסביבתה הטבעית על-ידי כמויות של דגים שזלגו מן החקלאות הימית. אפשרות נוספת היא שהדגים שזלגו מן החקלאות הימית התרבו עם האוכלוסייה הטבעית, הורידו את השונות, והחלו את תהליך הערבול הגורם להכחדה. גם הדיג המוגבר בתקופה האחרונה יכול היה להביא לירידה משמעותית במספרם של דגי הדניס בטבע. אין ברשותנו כרגע מדגם גדול מספיק של פרטים מן הטבע כדי לבסס תאוריה זו או אחרת. מכל מקום יש לזכור שגם בעבר, לפני פעילות החקלאות הימית, לא היה דג הדניס נפוץ מאוד בחופי ארצנו ועל כן - הירידה בנוכחותו אינה דרסטית.

נראה שקיימת שונות באוכלוסיית החקלאות הימית בדגי הדניס, אך אין לנו מידע על הקשר בינה לבין האוכלוסייה הטבעית שהייתה כאן. למרות מאמצינו, הצלחנו לאתר רק מספר זעום של דגימות היסטוריות של דגי דניס מאזורנו. גם אותם דגים שנמצאו, נשמרו בפורמלין, דבר שהקשה על הניתוח הגנטי שלהם. עד כה לא הצלחנו ליצור מדגם רחב מספיק שילמד על ההיסטוריה של השונות הגנטית של אוכלוסיית הדניס בחופי מדינת ישראל. תכנית של ריבוי והשבה אל הטבע של דגי דניס תהיה מאתגרת במיוחד. סיכויי הצלחתה יהיו נמוכים לאור מחסור במידע חיוני הנוגע לשונות הגנטית, ועקב חוסר התאמת דגי החקלאות הימית לטבע.

אנו ממליצים לכן ללמוד ממקרה גידול דגי הדניס ולפקח על ההרכב הגנטי באוכלוסיות של גידולים חקלאיים ימיים שסיכויי הזליגה שלהם לים הפתוח גבוהים.

מקורות

[1] Alarcón JA, Magoulas A, Georgakopoulos T, et al. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230: 65-80.

[2] Brown RC, Woolliams JA, and McAndrew BJ. 2005. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture*