

**PN-III-P2-Parteneriate 53PTE/2016 - Tehnologie de selecție și ameliorare genetică în vederea creșterii profitabilității acvaculturii sturionilor**  
**ACRONIM: INOVTEHNOSTUR**

**Etapa I. Identificarea parametrilor optimi de creștere în acvacultură și stabilirea protocoalelor moleculare și biochimice de analiză a hibridului best beluga**

A.I.1 Stabilirea unui panel optim de markeri moleculari corelați cu sexarea timpurie la sturioni bazat pe experiența anterioară.

A.I.2 Stabilirea unui panel optim de gene corelate cu producția și calitatea cărnii la sturioni bazat pe experiența anterioară.

A.I.3 Evaluarea fenotipică (geomorfometrică) și caracterizarea condiției corporale la Best beluga din loturile experimentale.

A.I.4 Selecția exemplarelor din efectivele de Best beluga, producție 2014, 2015, 2016, existente în ferma Horia, județul Tulcea, care vor constitui loturile experimentale.

A.I.5 Selecția exemplarelor din efectivele de Best beluga, existente în ferma Răbăgani, județul Bihor, care vor constitui loturile experimentale.

A.1.6 Diseminarea rezultatelor prin inițierea paginii web a proiectului.

**REZUMAT**

Identificarea sexului sturionilor prin metode moleculare are importanță economică ridicată. Aflarea sexului indivizilor, încă dintr-un stadiu incipient, poate ajuta fermele piscicole, acestea putându-se axa asupra producției de caviar sau asupra producției de carne. Astfel, prin creșterea diferențiată a indivizilor aparținând celor două sexe se pot evita costurile creșterii comune a acestora. Căutarea unui mod de discriminare a sexului la sturioni urmărește în prezent tehnicile de biologie moleculară moderne, bazate pe secvențializarea de nouă generație (NGS – Next Generation Sequencing). La mai multe specii de sturioni a fost secvențializat și analizat transcriptomul. Acesta prezintă avantajul unei dimensiuni mai mici comparativ cu genomul și al posibilității de a evalua și a selecta genele cu o expresie diferită între cele două sexe. Desemnarea secvențele de primeri pentru amplificarea markerilor de interes s-a realizat cu ajutorul programului Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) și cu secvențe nucleotidice descărcate din baza de date GenBank.

La ora actuală, în acvacultură, sunt căutate metode non-invazive de investigare și apreciere a maturității sexuale la pești, aplicabile celor mai mici clase de vârstă. La unele specii de pești, valoroase din punct de vedere economic așa cum este cazul sturionilor, se aplică tehnici de investigare precum ar fi utilizarea unui endoscop (Hurvitz et al., 2007), prin ultrasonografie sau cele bazate pe diferiți parametri biochimici și hormoni sexuali. Utilizarea acestor metode non-invazive ar fi nu numai în beneficiul studiului populațiilor sălbatice dar și al dezvoltării unei acvaculturi eficiente prin determinarea sexului speciei respective la vârste cât mai mici. Cei mai activi steroizi studiați în literatura de specialitate și rolurile lor cele mai importante sunt: Estradiolul (E2), Testosteronul (T), 11-Ketotestosteron (11-KT) și 17 $\alpha$ , 20 $\beta$  – dihidroxy-4pregnen-3-one (DP).

O problemă de mare interes în acvacultură este cea legată de calitatea produselor oferite pe piață. Printre practicile frecvent utilizate în acvacultura modernă se numără și selecția asistată de markeri (Marker Assisted Selection) și ameliorarea genetică. Selectarea indivizilor care posedă anumite caracteristici (rezistență la boli, producție de crescută de carne, calitate superioară a cărnii etc.) și dezvoltarea unor linii ameliorate poate crește într-un mod semnificativ productivitatea și, implicit, profitabilitatea acvaculturii sturionilor. În cazul unor specii cu importanță economică mare au fost stabiliți o serie de markeri ADN corelați cu producția și calitatea cărnii. Identificarea anumitor polimorfisme mononucleotidice SNP (Single Nucleotide Polymorphism) la nivelul acestor markeri a fost corelată cu o serie de caractere productive, dar și cu fermitatea fileului și a cărnii, în general. Consecutiv analizei datelor din literatură, dar și prin prisma experienței anterioare, a fost selectat un panel optim de markeri corelați cu caracteristici morfo-productive superioare la speciile de pești ce se pretează la creșterea în acvacultură: gh, ghr, igf1, mstn (mstn 1a, mstn 1b), cast2, myoD1a, myoD1b, capn1, capn3 și myf5.

Declinul capturilor de sturioni înregistrat în ultimile decenii a generat un interes deosebit pentru dezvoltarea unor tehnologii de reproducere și creștere a acestor pești în condiții controlate. Astfel, în ultimii ani au fost optimizate

tehnologii specifice creșterii intensive a larvelor și puilor până la talia de comercializare. Pentru evaluarea morfometrică a reproducătorilor au fost măsurate 16 caractere biometrice și 3 caractere meristice cuantificate pentru ambele părți ale corpului în vederea evaluării ulterioare a gradului de asimetrie. În cazul hibridilor luați în studiu, analiza principalilor parametri hematologici și biochimici s-a făcut cu scopul evaluării stării fiziologice de întreținere, în condițiile specifice creșterii în sistem intensiv de producție. Reacția hematologica este dată de variațiile hematocritului, hemoglobinei, numărului de eritrocite, precum și de a constantelor eritrocitare, înregistrate în cazul analizelor efectuate pe hibridii luați în studiu.

### ***Activitatea I.1 Stabilirea unui panel optim de markeri moleculari corelați cu sexarea timpurie la sturioni bazat pe experiența anterioară***

Sturionii nu prezintă dimorfism sexual în nici un stadiu al dezvoltării (Keyvanshokoo și Gharaei, 2010), ceea ce face separarea precoce a sexelor o adevărată problemă în sturionicultură. Pentru diferențierea precoce a sexelor au fost încercate mai multe metode. În cazul studiilor genetice au fost încercate tehnici precum RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) și ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), acestea bazându-se pe analiza fragmentelor de ADN și observarea posibilelor diferențe dintre sexe (Wuertz și colab., 2006; Keyvanshokoo și colab., 2007; McCormick și colab., 2008). De asemenea, au fost secvențializate genele *sox* pentru a se observa posibile diferențe între sexe (Hett și Ludwig, 2005; McCormick și colab., 2008). Au fost testate și metode proteomice pentru observarea diferențelor în expresia proteică dintre testicule și ovare de la sturioni (Keyvanshokoo și colab., 2009). Niciuna dintre tehnicile prezentate în tabelul 2 nu au arătat diferențe între cele două sexe din punct de vedere al analizei moleculare. Studiul proteomului a arătat diferențe în expresia proteică, dar proteinele respective nu erau implicate în diferențierea sexuală. Niciuna dintre aceste tehnici nu au arătat diferențe între cele două sexe din punct de vedere al analizei moleculare.

În 2010, Hale și colaboratorii au căutat în librăriile de ADNc generate de la mascul și femela de *Acipenser fulvescens* următorul set de gene: *sry* (gena responsabilă pentru determinarea sexuală de la mamifere), *dmrt1* (gena responsabilă pentru determinarea sexuală de la păsări) și *sox2*, *sox4*, *sox17*, *sox21*, *sox9*, *rspo1*, *dmrt1*, *wt1*, *wnt4*, *foxL2*, *tra-1*, *fem1* (gene implicate în cascada determinării sexuale de la vertebrate). În acest studiu s-a observat o expresie diferită între sexe pentru genele *dmrt1* și *tra-1*. Expresia genei *dmrt1* a fost mai mare la mascul, în timp ce gena *tra-1* a prezentat un nivel de expresie mai mare la femelă. Acest tip de expresie este corelat cu sistemul ZW unde în cazul păsărilor femele este prezentă o singură copie a genei *dmrt1*. Toate genele testate și observate sunt prezente atât la femele cât și la masculi, lucru ce este în corelație cu sistemul ZW pentru determinarea sexuală de la sturioni (Hale și colab., 2010).

Consecutiv analizei transcriptomului la nisetrul (*Acipenser gueldenstaedtii*) au fost selectate următoarele gene ca având specificitate de expresie între sexe: *gsdf*, *foxL2*, *hsd17b1* și *cyp19a1a*. Gena *gsdf* are expresie mai mare în țesutul gonadal de la masculi în timp ce *foxL2*, *hsd17b1* și *cyp19a1a* prezintă expresie mai mare în țesutul gonadal de la femele (Hagihara și colab., 2014).

Prin analiza transcriptomului de la *A. sinensis* s-a observat că gena *dmrt1* prezintă același nivel de expresie atât la femele cât și la masculi. De interes sunt următoarele gene: *dmrt3*, *igf-1*, *lhx1* și *sox11* care au fost găsite doar în transcriptomul gonadelor de la mascul, în timp ce genele: *cyp19a1a*, *foxL2*, *gnrhr* și *nanos3b* erau prezente numai în transcriptomul ovarelor.

Studiile NGS realizate până în prezent au fost însoțite de studii pentru confirmarea expresiei prin qPCR. Au fost testate prin qPCR diferite gene precum: *dmrt1*, *ar*, *sox9*, *igf1* (gene implicate în diferențierea testiculelor) și *cyp17*, *star* și *lh* (gene implicate în sinteza steroizilor sexuali). În cazul studiului gonadelor diferențiate (diferențiere observată prin teste histologice) de la indivizi de 16 luni din specia *A. baerii*, s-a observat o diferență între expresia genelor *igf1*, *ar*, *lh*, *cyp17*, între masculi și femele, genele respective fiind supraexprimate în cazul masculilor. În cazul studiului gonadelor nediferențiate nu au fost observate diferențe în expresia genică a genelor menționate (Berbejillo și colab., 2011). Unele gene precum *igf1* sunt posibil active la începutul gametogenezei și genele: *dmrt1*, *ar*, *lh*, *cyp17A1*, *star*, *sox9* sunt posibil implicate în diferențierea testiculelor la *A. baerii*.

#### **Selectarea markerilor moleculari**

Consecutiv analizei datelor din literatură, dar și prin prisma experienței anterioare, a fost selectat un panel optim de markeri corelați cu sexarea timpurie la *best beluga*:

1) **Gena ar** (androgen receptor) are rol principal în diferențierea sexuală la masculi în cazul multor vertebrate, inclusiv specia *Danio rerio* (Gorelick și colab., 2008). Studii de expresie genică au fost realizate pentru *A. baerii* arătând că gena *ar* este exprimată în cantitate mare în cazul masculilor care trec prin diferențiere sexuală (Berbejillo și colab., 2012). 2) **Gena dmrt1** (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) este posibil implicată în dezvoltarea sexuală a masculilor la sturioni, prezentând expresie ridicată în testicule față de ovare pentru specia *A. sinensis* (Leng și colab., 2016), dar și pentru specia *A. baerii* (Berbejillo și colab., 2012; Berbejillo și colab., 2013). Date similare au fost observate și de către Fajkowska și colab., 2016 în cazul speciei *A. gueldenstaedtii*. Folosind studii de NGS, Hale și colab., 2010 au arătat că expresia *dmrt1* este mai mare în cazul testiculelor decât în cazul ovarelor. 3) **Gena sox9** (sex-determining region Y-box 9) este implicată la vertebrate în diferențierea testiculelor, eveniment corelat cu supraexpresia acestei gene pentru masculi (Sun și colab., 2013). În cazul speciei *A. baerii*, Berbejillo și colab., 2012 au sugerat că această genă este posibil implicată în diferențierea testiculelor, fiind exprimată în cantitate mai mare în testicule față de ovare, rezultat confirmat și de alt studiu (Berbejillo și colab., 2013). 4) **Gena wt1** (wilms tumor 1) este implicată în reglarea genelor cu rol în dezvoltarea sexuală la masculi și funcționează drept activator de transcriere (Shimamura și colab., 1997). 5) **Gena foxL2** (forkhead box L2) este exprimată în special în ovare și reglează expresia genei care codifică pentru aromatază, implicată în sinteza de estrogeni. În cazul speciei de sturioni *Scaphirhynchus platyrhynchus*, expresia *foxL2* este semnificativ mai mare pentru femele față de masculi (Amberg și colab., 2010). 6) **Gena cyp17A1** (cytochrome P450 family 17 subfamily A polypeptide 1) codifică pentru un factor de transcriere pentru celulele Leydig fiind implicată în dezvoltarea testiculelor. Această genă prezintă expresie mai mare în cazul masculilor față de femele, fenomen observat pentru specia *A. baerii* (Berbejillo și colab., 2012). 7) **Gena star** (steroidogenic acute regulatory protein) a fost studiată de Berbejillo și colab., 2012 în cazul speciei *A. baerii*, autorii observând o expresie mai ridicată la masculi decât la femele. 8) **Gena lh** (luteinizing hormone) codifică pentru subunitatea  $\beta$  a hormonului luteinizant și a fost studiată atât pentru specia *A. gueldenstaedtii* (Hurvitz și colab., 2005) cât și pentru *A. baerii* (Berbejillo și colab., 2012), observându-se o expresie mai ridicată în cazul masculilor față de femele. 9) **Gena igf1** (insulin-like growth factor 1) a fost studiată pentru sturioni în cazul speciei *A. baerii*, observându-se că în stadii incipiente de gametogeneză aceasta este exprimată mai mult la masculi decât la femele (Berbejillo și colab., 2012).

Genele  *$\beta$ -actin*, *gapdh* și *ARNr 28S* au fost alese drept posibile gene de referință. Gena  *$\beta$ -actin* a mai fost utilizată drept genă de referință în studii de expresie genică la sturioni precum: Berbejillo și colab., 2012, Berbejillo și colab., 2013, Leng și colab., 2016. Gena *gapdh* a fost utilizată drept genă de referință în studiul realizat de Fajkowska și colab., 2016. În studiul realizat de Amberg și colab., 2010 este sugerat că gena  *$\beta$ -actin* nu este propice drept gena de referință deoarece diferă între grupe, în același timp celelalte gene testate pentru acest rol au avut aceeași problemă, autorii alegând să normalizeze datele față de cantitatea totală de ARN.

#### **Desemnarea primerilor pentru amplificarea markerilor selectați**

Desemnarea secvențele de primeri pentru amplificarea markerilor de interes s-a realizat cu ajutorul programului Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). În acest scop secvențele nucleotidice pentru fragmentele genice care se doresc a fi amplificate au fost descarcate din baza de date GenBank și introduse în programul Primer3. Au fost setați diferiți parametri, referitori la lungimea primerilor, conținutul în GC, temperatura de melting și au fost generate secvențele de primer corespunzătoare (Figura 1).

Dificultatea a constat în faptul că nu pentru toate genele vizate au fost determinate secvențele la sturioni. În acest caz, au fost luate drept referință secvențe genice de la alte specii de pești, care au fost aliniate pentru evidențierea regiunilor conservate. Acestea au fost considerate cele mai bune zone de legare a primerilor, iar pentru a crește rata de succes a amplificării au fost introduse în secvența de primer nucleotide degenerate. Pentru verificarea expresiei genice a markerilor posibil implicați în determinarea sau diferențierea sexuală la sturioni au fost desemnați primerii prezentați în tabelul 1.

Ultimele 3 perechi de primeri ( *$\beta$ -actin*, *gapdh*, *ARNr 28S*) au fost desemnate pentru a fi testate drept markeri pentru gene de referință. Pe lângă primeri este prezentată și secvența referință din GenBank pe baza căreia au fost desemnați aceștia. Secvențele de primeri au fost create cu Primer BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) și testate pentru a se confirma specificitatea și temperatura de hibridizare folosind programul bioinformatic Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). Cu ajutorul programului BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a fost testată specificitatea perechii de primeri față de secvențe de referință din GenBank. Toți primerii au fost desemnați pentru amplificarea unor fragmente cu dimensiuni între 100 și 200 pb, având temperatura optimă de hibridizare la 60°C.



AJ251656	<i>lh</i>	176 pb	lh-F	5'-CTGCRGAGACACTGACACAC-3'
			lh-R	5'-AGAGGTCTGGATGAGGAGGC-3'
DQ201138	<i>igf1</i>	188 pb	igf1-F	5'-TCCTGYGTGTTCTGTGCCTG-3'
			igf1-R	5'-CTGGAAGCAGCACTCRTTCA-3'
HQ439361	$\beta$ -actin	161 pb	$\beta$ -actin-F	5'-TGACCCTGAAGTAYCCMATC-3'
			$\beta$ -actin-R	5'-CTTCTCTCTGTTRGCTTTGG-3'
EF413586	<i>gapdh</i>	114 pb	gapdh-F	5'-AGACACCCGCTCNTCHATCT-3'
			gapdh-R	5'-TCCACGACTCTGTTGCTGTA-3'
JQ250741	<i>ARNr 28S</i>	160 pb	28S-F	5'-TGTTTGTGAATGCAGCCCAA-3'
			28S-R	5'-GACCCCATCCGTTTACCTCT-3'

Identificarea timpurie a sexului, respectiv studiul procesului de ovogeneza și spermatogeneza la sturioni este unul dintre obiectivele calitative importante în cadrul proiectului de cercetare deoarece cercetările cu privire la fiziologia reproducerii sturionilor permit obținerea unor rezultate mai bune în tehnologia de reproducere artificială și creștere în piscicultură a sturionilor.

La pești, steroizii sexuali sunt considerați printre cele mai importante substanțe implicate în reglarea neuroendocrină a reproducerii. Acești steroizi sexuali joacă un rol important în diferențierea sexuală, dezvoltarea gonadelor, în procesul de spermiație la masculi, de maturare ovocitară și ovulația la femele. De asemenea, acești steroizi condiționează dezvoltarea caracterelor sexuale secundare și intervin în declanșarea comportamentului genitorilor (dans nupțial) care acompaniază reproducerea jucând rolul feromonilor (Fostier et al., 1983)

La pești, determinismul genetic al sexelor este un fenomen complex, în care pe lângă factorii genetici sunt implicate și condițiile de mediu în care are loc dezvoltarea ontogenetică și care conduce la transformarea gonadei nediferențiate în ovare sau testicule (Piferrer & Guiguen, 2008). Yamamoto (citată de Bahamonde et al., 2013) avansează în 1969 ipoteza conform căreia steroizii sexuali sunt cei care induc în mod natural, de fapt, sexul peștilor. Astfel, producții normale ai steroidogenezei la pești sunt cei clasici, respectiv, estrogenii (estrone și estradiol), androgenii (testosteron, 11-ketotestosteron) și progesteronul (progesteron, dihidroxiprogesteron și alte derivate).

Cei mai activi steroizi studiați în literatura de specialitate și rolurile lor cele mai importante sunt:

**Estradiolul (E2)** mediază secreția de vitelogenină în hepatocite având precursor testosteronul (T). Participă în unele procese metabolice (metabolismul carbohidraților și lipidelor) și mobilizarea calciului (Ceapa, 2002). Prezența acestuia în masculi este în mod normal redusă dar ea poate crește spectaculos sub influența hranei (Pelissero et Le Menn, 1991);

**Testosteronul (T)** este considerat unul dintre precursorii E2 și 11-KT, putând acționa pentru menținerea comportamentului sexual (migrația anadromă, i.e) evoluția normală a spermatogenezei (Barannikova et al. 2008) dar și în creșterea secreției de hormon gonadotrop (GtH) pentru care poate avea și efect inhibitor în anumite concentrații (Ceapa, 2002; Fostier et al. 1983). De-a lungul timpului diferite alte efecte au fost studiate: dezvoltarea caracterelor sexuale secundare, inversia de sex la femele, anomalii funcționale ale gonadelor în cazul unor dezechilibre hormonale (Cuisset 1994)

**11-Ketotestosteron (11-KT)** sintetizat de gonadele masculine este utilizat în identificarea sexului la sturionul siberian de vârstă imatură (Cuisset et al. 1994) corelat cu maturarea sexuală, fiind prezent și la femelele anumitor specii de sturioni.

**17 $\alpha$ , 20 $\beta$  – dihidroxy-4pregnen-3-one (DP)** este considerat unul dintre steroizii care induc maturarea la femelele peștilor. (Webb et al. 2000, Kime et al. 1994).

Din literatura de specialitate, analizând intervalele de variație pentru acești hormoni steroidieni sexuali, prezentate la diferite specii de sturioni aflate în diferite biotopuri se observă o mare variabilitate a tuturor parametrilor biochimici explicabilă prin fluctuațiile caracteristice vârstei, stadiului de maturare al gonadei, condițiilor de viață și, nu în ultimul rând, al variabilității inter-individuale și a stării de stres.

În funcție de balanța ce se stabilește între concentrațiile hormonilor steroidieni masculi (ex. 11-KT, 11-ketotestosteron) și a celor feminini (E2, 17 $\beta$ -estradiol), apare în mod expres o diferențiere sexuală, respectiv dacă este un exces de 11KT, atunci acest scenariu ar favoriza apariția masculilor, în timp ce excesul de E2 induce diferențierea femelelor, ca în cazul *Perca fluviatilis* (Rougeot et al., 2007) și *Oryzias latipes* (Seki et al., 2005).

Se consideră că la pești în determinismul genetic al sexelor intervin mai multe gene plasate pe una sau mai multe perechi de autosomi și că determinarea sexelor la pești nu este deci cromozomială ci poligenică (Volf, 2005). De aceea sexele prezintă o mare labilitate, sexele se pot inversa, ceea ce conduce la unele specii la manifestarea intersexualității (Jackson et al., 2006). Aceasta este cea mai frecventă anomalie în determinarea sexului și constă în apariția unor indivizi cu caractere morfologice și funcționale intermediare între cele două sexe.

Printre factorii de mediu care pot influența determinarea sexului la pești se enumeră temperatura (Piferrer et al., 2012), pH-ul (Baroiller et al., 1999) și factorii sociali comportamentali (Munday et al., 2006). Într-o primă fază se consideră că determinarea sexului se datorează atât factorilor genetici, cât și celor de mediu, ceea ce imprimă o anumită derulare a proceselor de diferențiere anatomică și funcțională a gonadelor (Orlando & Guillette, 2007). Fenomenul nu se manifestă de la început ci treptat, de unde rezultă ipoteza că fiecare individ mascul sau femeii poartă informația pentru ambele sexe și că în procesul diferențierii ontogenetice unul din factori devine dominant, iar manifestarea fenotipică este în funcție de prezența hormonilor sexuali, masculi sau femeli.

Sturionii sunt specii gonocorice iar femela este heterogametică (WZ femele) respectiv, masculii sunt homogametici (ZZ masculi), sistem tipic avian (Devlin & Nagahama, 2002), ipoteze susținute de literatura de specialitate la specia *Acipenser transmontanus* (Van Eenennaam et al., 1999), *Acipenser brevirostrum* (Flynn et al., 2006), baster (*Huso huso* femelă × *Acipenser ruthenus* mascul) (Omoto et al., 2005). Teoretic, acest fapt ar conduce la un raport numeric între sexe echilibrat, de 1:1, în populațiile mari de sturioni atât din mediul natural, cât și din ferme (specia *A. transmontanus*, Doroshov, 1997). Se pare că la nivelul condițiilor din fermă raportul se modifică, fiind în favoarea femelelor, situație descrisă de Flynn et al. (2006) la specia *A. brevirostrum* (56 %) sau de Hurvitz et al. (2007) la *A. gueldenstaedtii* (55%), explicația fiind legată de fenomenul natural de longevitate al femelelor de sturioni.

În consecință, dat fiind rolul subliniat de literatura de specialitate privind implicația hormonilor steroidieni în diferențierea anatomică și funcțională a gonadelor, respectiv în stimularea comportamentului de reproducere, maturarea ovocitelor și spermiație, considerăm că realizarea unui profil hormonal particularizat speciei de sturion din ferma agentului economic va permite selecția cât mai timpurie a masculilor pentru a fi vânduți pentru producția de carne și pentru acoperirea cheltuielilor de producție, în timp ce femelele sunt crescute mai departe pentru obținerea caviarului.

### ***Activitatea I.2 Stabilirea unui panel optim de gene corelate cu producția și calitatea cărnii la sturioni bazat pe experiența anterioară***

Determinarea factorilor moleculari care controlează creșterea și dezvoltarea musculaturii în scopul îmbunătățirii calității și cantității fileului reprezintă un obiectiv important pentru cercetarea în domeniul acvaculturii. Identificarea unor polimorfisme la nivelul unor markeri ADN, care să fie corelate cu producția și calitatea cărnii la hibridii de Best beluga ar putea pune bazele selecției asistate de markeri la sturioni.

Consecutiv analizei datelor din literatură, dar și prin prisma experienței anterioare, **a fost selectat un panel optim de markeri corelați cu** caracteristici morfo-productive superioare la speciile de pești ce se pretează la creșterea în acvacultură: *gh*, *ghr*, *igf1*, *mstn* (*mstn 1a*, *mstn 1b*), *cast2*, *myoD1a*, *myoD1b*, *capn1*, *capn3* și *myf5*.

**GH (Growth Hormone)** – sistemul hormonului de creștere reglează creșterea somatică și musculară, sinteza proteică și alte procese metabolice, atât la mamifere, cât și la pești. Rata de creștere are este o caracteristică poligenică, cu un grad de moștenire moderat, fiind influențată atât de factori prenatali, cât și postnatali (Falconer, 1989). Componentele axei hormonului de creștere joacă un rol cheie în reglarea procesului de creștere în regnul animal. Drept urmare, există o preocupare constatată a cercetătorilor pentru identificarea unor variante alelice ale genelor implicate în axa hormonului de creștere care să fie asociate cu un fenotip de creștere superior.

Gena care codifică pentru sinteza hormonului de creștere este considerată o genă candidată informativă pentru selecția indivizilor cu bune performanțe de creștere. Diferite polimorfisme evidențiate la nivelul acestei gene au fost asociate cu caracteristici de creștere superioare (greutatea coroprală, lungimea totală, lungimea corpului, etc.). La specia de acvacultură *Siniperca chuatsi* au fost identificate patru polimorfisme de tip SNP la nivelul genei *GH*. Două mutații au fost evidențiate în intronul 4 (g.4940A>C, g.4948A>T), una în exonul 5 (g.5045T>C) și una în intronul 5 (g.5234T>G), trei dintre acestea fiind semnificativ asociate cu performanțele de creștere. La tilapia (*Oreochromis niloticus*) alte două polimorfisme au fost identificate în regiunea promotor (Cuevas-Rodríguez et al., 2016). Mutații similare asociate cu o rată și un ritm de creștere superioare au fost

identificate la diferite specii de salmonide, cum ar fi *Salvelinus alpinus* (Tao et al., 2003), *Salmo salar* (Ryynanen & Primmer, 2004), *Oncorhynchus mykiss* (Gorji et al., 2016) etc.

**GHR (Growth Hormone Receptor)** este o proteină transmembranară care face parte din clasa I a superfamiliei receptorilor pentru citokine (Zhu et al., 2001) și mediază activitatea hormonului de creștere prin transducerea semnalului GH la nivel celular, care are drept consecință activarea transcrierii mai multor gene (Kobayashi et al., 1999). Gena care codifică pentru receptorul hormonului de creștere a fost caracterizată cu succes la diferite specii cum ar fi, *Scophthalmus maximus* (Calduch-Giner et al., 2001), *Oncorhynchus masou* (Fukada et al., 2004; Benedet et al., 2005), *Oreochromis mossambicus* (Kajimura et al., 2004), *Carassius auratus* (Lee et al., 2001), *O. mykiss* (Very et al., 2005). Cu toate că până în prezent nu au fost identificate situsuri polimorfice la nivelul acestui locus, această genă poate fi o bună candidată pentru selecția asistată de markeri în acvacultură, dată fiind asocierea găsită între existența anumitor polimorfisme și modularea creșterii la alte vertebrate.

**IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1)** Factorii de creștere *insulin-like* fac parte dintr-o familie complexă care include trei hormoni, trei receptori și trei factori proteici de legare (*binding proteins*) care interacționează pentru a regla dezvoltarea și diferențierea celulară la vertebrate (Florini et al., 1996). *Igf-1a* fost analizată până în prezent la animale de fermă în scopul îmbunătățirii performanțelor productive. Diferite polimorfisme în regiunea promotor au fost asociate cu un fenotip cu rată superioară de creștere (Pozzi Pereira et al., 2005). La peștii teleosteeni gena *igf-1* codifică pentru o peptidă de 70 aminoacizi și a fost caracterizată la diferite specii printre care tilapia (Reinecke et al., 1997), crap (Vong et al., 2003), somon (Tsai et al., 2014), etc. La somonul de Atlantic (*Salmo salar*) un lot experimental alcătuit din 4800 de indivizi a fost analizat la nivelul secvenței nucleotidice a genei pentru *igf-1*. Au fost identificate trei polimorfisme mononucleotidice: SNP1 5763G>T (în regiunea promotor), SNP2 7292C>T (în intronul 1) și SNP 3 4671A>C (în intronul 3). Polimorfismele 1 și 3 au fost semnificativ asociate cu creșterea și calitatea fileului (Tsai, 2014).

**Miostatina (mstn)** cunoscută și ca factorul GDF-8 (Growth/ Differentiation Factor – 8) este exprimat la vertebratele terestre numai la nivelul mușchiului scheletic în toate stadiile de dezvoltare și acționează ca și regulator negativ al dezvoltării musculaturii (McPherron et al., 1997). Au fost identificate variante alelice diferite ale acestei gene care au fost asociate cu diferențe de creștere la vertebrate. Această asociere între polimorfismele evidențiate la nivelul genei *mstn* și creșterea indivizilor recomandă acest marker pentru selecția și reproducerea dirijată în acvacultură.

La pești, gena *mstn* este formată din trei exoni și doi introni și are o secvență relativ conservată (Xu et al., 2003; Biga et al., 2005). Până în prezent gena a fost caracterizată la diferite specii de pești osoși, cum ar fi, păstrăvul curcubeu (Rescan et al., 2001), somonul de Atlantic (Ostbye et al., 2001), tilapia, bibanul alb (Rodgers et al., 2001), lavracul alb (Terova et al., 2006), etc. Gena prezintă două copii, fiecare dintre acestea fiind exprimate specific în diferite tipuri tisulare (Roberts & Goetz, 2003; Biga et al., 2005). La doradă, cea de-a doua copie a genei *mstn* (*mstn b*) este exprimată exclusiv la nivelul sistemului nervos central și numai într-o etapă târzie a ontogenezei (Maccatrozzo et al., 2001b). Mai mult, contrar vertebratelor terestre la care transcripții genei *mstn* sunt exprimați doar în mușchiul scheletic, la pești au fost detectați și în rinichi, tegument, gonade și branhii. Aceste descoperiri indică faptul că acest factor de creștere și diferențiere este implicat în activități fiziologice diferite. De exemplu, identificarea acestuia în branhii, tegument și tubulii renali sugerează implicarea în osmreglare (Radaelli et al., 2003), în timp ce expresia *mstn* din ovar poate fi corelată cu un posibil rol în dezvoltarea gonadelor, creșterea și maturarea (Roberts & Goetz, 2001). Genele *mstn-1* și *mstn-2* prezintă o secvență diferită, mai ales în regiunile non-codante, unde au fost evidențiate zone extinse de inserție/ deleție (Rescan et al., 2001). Nu este cunoscut modul în care aceste modificări ale secvenței din regiunile necodante influențează expresia organ/ țesut specifică la pești. La specia *Aristichthys nobilis* au fost evidențiate două polimorfisme 1668 T > C (în intronul 2) și 2770 C>A (în regiunea 3'UTR) care au fost asociate cu lungimea totală, lungimea corpului și greutatea coroprală (Liu et al., 2012). Diferite stocuri de acvacultură au fost investigate la specia *Cyprinus carpio* în încercarea de a stabili dacă există o corelație între anumite polimorfisme la nivelul *mstn* și performanțele superioare de creștere. Au fost identificate patru mutații de tip SNP : c.371 + 749A > G, c.371 + 781T > C (în intronul 2) și c.42A > G, c.72C > T (în exonul 3). Polimorfismele de la nivelul exonului 3 au fost asociate semnificativ cu greutatea coroprală și indivizii cu un anumit haplotip au demonstrat o rată de creștere mai bună (Sun et al., 2012).

**Factori reglatori miogenici (Miogenic Regulatory Factors, MRFs)** (miogenina, myoD1a, myoD1b, myo-d, myf-5, myf-6) sunt reuniți într-o familie de factor de transcriere, numită și complexul genei *myoD*. Aceștia sunt implicați în procesul de miogeneză și sunt exprimați exclusiv în mușchiul scheletic al vertebratelor. Studiile

filogenetice au arătat că membrii complexului *myoD* au apărut în urma unor procese de duplicație ale unei gene ancestrale existente înaintea separării liniilor majore de vertebrate (Atchley et al., 1994). Această ipoteză a fost susținută de rezultatele obținute la șoreci în urma unor experimente *knock-down*. Absența miogeninei și a factorului *myf-5* a determinat apariția unor modificări ale musculaturii scheletice (Venuti et al., 1995), în timp ce absența *myoD* s-a tradus într-o dezvoltare normală a embrionilor fiind însoțită de o supraexpresie a *myf-5* (Rudnicki et al., 1992).

Genele aparținând complexului *myoD* au fost caracterizate la puține specii de pești, cum ar fi crapul comun (Kobiyama et al., 1998), zebrafish (Chen et al., 2001), păstrăvul curcubeu (Johansen & Overturf, 20015), plătica (Tan et al., 2006) etc. O comparație între genele care codifică pentru sinteza acestor factori de transcripție a arătat că regiunea care exprimă domeniul de tip funcțional helix-loop-helix este conservată la aceste gene, reflectând funcția conservată a proteinelor de legare la ADN, care mediază reglarea transcripției la nivelul mușchiului scheletic. La păstrăvul curcubeu au fost identificate polimorfisme de tip SNP la nivelul genelor *MyoD1a*, *MyoD1b* și *MyoD2*. Astfel, la nivelul genei *MyoD1a* au fost identificate două polimorfisme mononucleotidice, 129G→A în exonul 1 și 37 G→A în exonul 2, acesta din urmă determinând înlocuirea argininei cu lizină la nivelul catenei polipeptidice. La nivelul genei *MyoD2* au fost identificate șapte polimorfisme nucleotidice 218T→C, 224T→C, 242A→C, 246T→A, 248T→C, 305T→C și 329C→T. Polimorfismele identificate au fost asociate la această specie cu o calitate superioară a cărnii.

***Calpastatina* (*cstn*)** este un inhibitor endogen al calpainei, importantă pentru menținerea texturii mușchiului scheletic și al degradării post-mortem a miofibrilelor.

### **Desemnarea primerilor pentru amplificarea markerilor ADN corelați cu caracterele morfo-productive la Best beluga**

Similar stabilirii secvențelor de primeri pentru amplificarea markerilor corelați cu determinismul sexual la acest hibrid de acvacultură, și pentru amplificarea markerilor de corelați cu cantitatea și calitatea cărnii, desemnarea secvențelor oligonucleotidice s-a realizat cu ajutorul programului Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). Pentru amplificarea fiecărui marker de interes au fost desemnate mai multe variante de primeri, în funcție de regiunea care se dorește a fi amplificată și ținând cont de zona în care au fost raportate în literatura de specialitate diferitele polimorfisme asociate cu apariția unor fenotipuri cu caractere de creștere superioare sau cu o bună calitate a fileului.

**Tabel 2.** Listă markerilor corelați cu caracterele morfo-productive superioare și secvența primerilor selectați.

<b>Gena</b>	<b>Denumire primer</b>	<b>Secvență primer</b>
<i>gh</i> (growth hormone)	GH1_F	5'GRMCAAAAACCTGAAMRAATGGC3'
	GH1_R	5'TAGAACTTCCRAAACCNCT3'
	GH2_F	5'ATTGTGGCTCTCATGAGGA3'
	GH2_R	5'CTCYCCACAAAACGYCTGCA3'
<i>Igf1</i> (insulin-like growth factor 1)	Igf-1_Pro_Ex1_F	5'CCAACGCCTATAACAACCTCATCC3'
	Igf1_Pro_Ex1R	5'TCAGTCAAACGTGCACTCACAG3'
	Igf-1_Ex2_F	5'GCCATAGGTGCGTAAATCGTGCGT3'
	Igf-1_Ex2_R	5'CCTCTCAGCAACCCCAAGAACCTC3'
	Igf-1_Ex3_F	5' CTTGCTCTTTACATGCTCGCCAT3'
	Igf-1_Ex3_R	5'GCCGCCAAAGGTGCTTCAACATAG3'
<i>mstn</i> (miostatina)	Mstn-1b1_F	5'AAACTGGGCATTCAATGTTCCACCATAACCA3'
	Mstn1b1_R	5'CTGCAGTGGCTATTGGGAAAGCTCGCTAAT3'
	Mstn-1b2_F	5'ACTTGACGTACGAGCCGAGTTCC3'
	Mstn1b2_R	5'TTGCCGCAGCCACACCGACAAC3'
	carpMstn_F	5' AGCCTACCATAAAAAGGTGTGTG3'
	carp_Mstn_R	5'TCAATAGTGTCCATTCCCAAGT3'
	calb_Mstn_F	5'GGTTCGTATCTTAGCCAATCT3'
calb_Mstn_R	5'AACTCACCAGTCCATCCTCTC	
<i>myo1Da</i>	M1_F	5' GAAGGCGACTGAGCAAGGTG3'
	M1_R	5'GGGACAGGCAGAGGTAT3'
	M2_F	5'ACGGAATGGTGAGAACT3'



	M2_R	5'GGGACAGGCAGAGGTAT3'
	S1_F	5'CGTCTACTAACCCAAACC3'
	S1_R	5'ACCATTCCGTCTGAGC3'
	S2_F	5'AACTGCTCAGACGGAA3'
	S2_R	5'TTGGTGGACAAGACTGA3'
	S3_F	5'GACGGAGAAACAAGTAT3'
	S3_R	5'CCACATCATAGCAAAAC3'
	S4_F	5'GAGTATATTTGACCCAG3'
	S4_R	5'CAGAGTTCCTTCTTGTG3'
<i>MyoD1b</i>	M3_F	5'TGTGACAAATACAGAGCC3'
	M3_R	5'TATCCGATTGGTAGTCC3'
	M4_F	5'AACTGCTCAGACGGAA3'
	M4_R	5'TCGTTGAAGTAGGTGC3'
	M5_F	5'TCGCCGAAACTCCAAAT3'
	M5_R	5'GCCATCCTCTTCTTCTACT3'
	S5_F	5'GTGAGATGGAGTTGTGCG3'
	S5_R	5'TCCCGCATAGTAGCAG3'
	S6_F	5'CGAAGACGAGCACATC3'
	S6_R	5'TCTCCACCTTGGGAAG3'
	S7_F	5'CGAGAACCTGAAGAGA3'
	S7_R	5'AGAGCAGTTGGACTGT3'
	S8_F	5'CATCCAGTCCACAGTC3'
	S8_R	5'TATCCGATTGGTAGTCC3'
	S9_F	5'GGAACTACCAATCGGA3'
	S9_R	5'GCCTAACAAGTCACAAT3'
	S10_F	5'AAGACCCTTGGCAGACAT3'
	S10_R	5'CCGTTTCGCTCAGGATA3'
S11_F	5'ATCTATCCTGAGCGAA3'	
S11_R	5'GCCATCCTCTTCTTCTA3'	

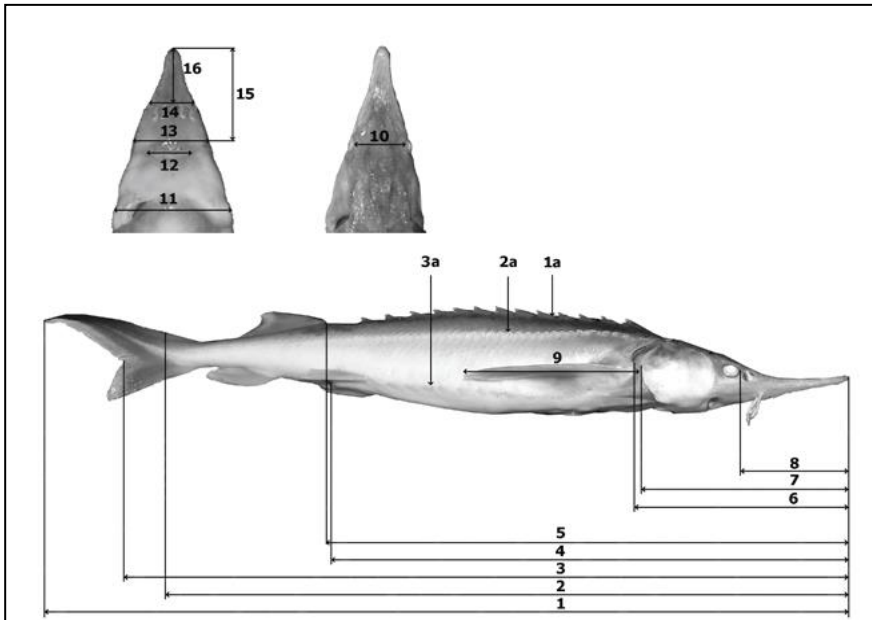
***Activitatea I.3 Evaluarea fenotipică (geomorfometrică) și caracterizarea condiției corporale la Best beluga din loturile experimentale. Activitatea I.4 Selecția exemplarelor din efectivele de Best beluga, producție 2014, 2015, 2016, existente în ferma Horia, județul Tulcea, care vor constitui loturile experimentale. Activitatea I.5 Selecția exemplarelor din efectivele de Best beluga, existente în ferma Răbăgani, județul Bihor, care vor constitui loturile experimentale.***

Odată însă cu dezvoltarea tehnologiilor și sistemelor de creștere intensivă a sturionilor a apărut necesitatea obținerii unor linii de descendenți care vor moșteni caracterele pozitive de la părinții lor în vederea îmbunătățirii indicatorilor tehnologici în condiții intensive de exploatare.

În ceea ce privește descrierea morfometrică pentru diferitele specii de sturioni, literatura de specialitate oferă informații modeste, studiile care urmăresc modul cum anumite caractere sunt transmise descendenților fiind extrem de restrânse.

Proiectul de față urmărește, pe lângă elaborarea unui protocol metodologic de sexare timpurie la sturioni, caracterizarea condiției și a performanței de creștere a hibridului BestBeluga în diferite sisteme de creștere. În acest context, principalul obiectiv al etapei de față a fost reprezentat de formarea loturilor experimentale de remonți și montarea unor experimente de creștere care să evidențieze, în etapele următoare, gradul de plasticitate tehnologică a hibridurilor în comparație cu liniile parentale. Odată cu selecția exemplarelor ce formează loturile experimentale s-a realizat marcarea individuală și evaluarea morfometrică a loturilor experimentale de hibriduri. Datele obținute sunt importante din punct de vedere științific, având totodată o importanță practică deosebită deoarece va permite identificarea proporțiilor corpului care sunt cele mai avantajoase din punct de vedere tehnologic precum și a valorii comerciale a diferitelor cohorte din cadrul loturilor.

Pentru evaluarea morfometrică a reproducătorilor au fost măsurate 16 caractere biometrice și 3 caractere meristice cuantificate pentru ambele părți ale corpului în vederea evaluării ulterioare a gradului de asimetrie (Figura 1, Tabel 3). Toate măsurătorile au fost efectuate in vivo după ce reproducătorii au fost aneșteziați cu 2-fenoxietanol (0,5 ml/l).



**Figura 1.** Evaluarea caracterelor biometrice și meristice cuantificate.

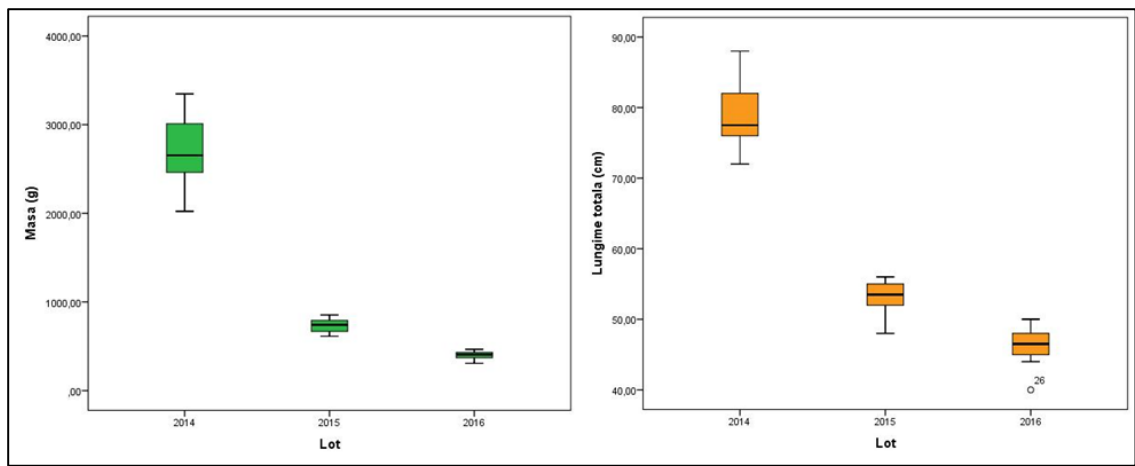
**Tabel 3.** Codificarea caractere biometrice și meristice cuantificate.

Cod	Caracter
L	1.Lungimea totală
Ls	2.Lungime standard
Lf	3.Lungimea la furca
Lra	4.Lungimea de la vârful rostrului până la marginea anterioară a anusului
Lrad	5.Lungimea de la vârful rostrului până la marginea anterioară a dorsalei
Lrap	6.Lungimea de la vârful rostrului până la marginea anterioară a pectoralei
LC	7.Lungimea capului
Dpo	8.Distanța preorbitală
Lp	9.Lungimea înotătoarei pectorale
Do	10.Distanța între ochi
lC	11.Lățimea maximă a capului
Lg	12.Lungimea gurii
lCg	13.Lățimea capului la nivelul gurii
lCm	14.Lățimea capului la baza mustaților
lpo	15.Lungime preorală
lm	16.Lungime mustați
Sd	1a.Numărul de scuturi dorsale
Pls	2as.Numărul de plăci laterale stanga
Pld	2ad.Numărul de plăci laterale dreapta
Svs	3as.Numărul de scuturi ventrolateral stanga
Svd	3ad.Numărul de scuturi ventrolateral dreapta

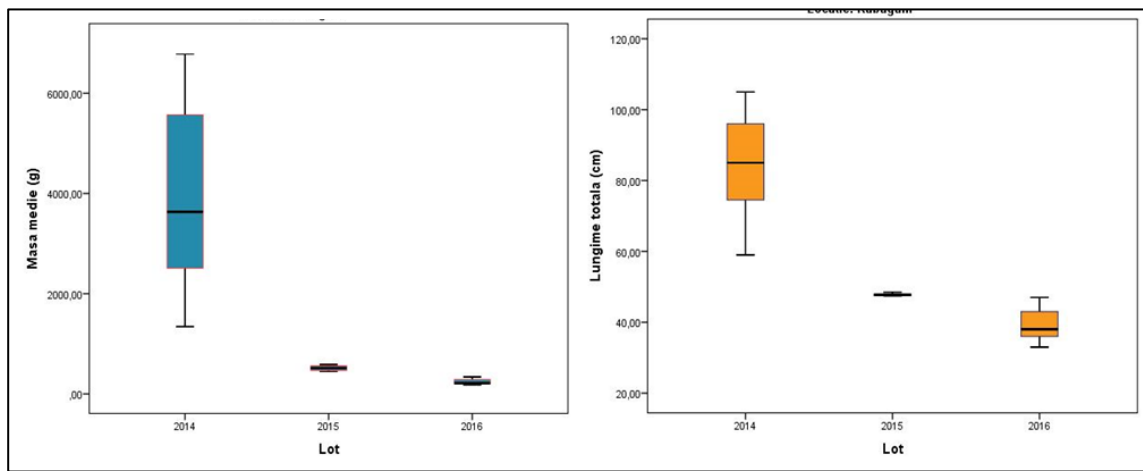
Valorile medii absolute pentru greutate și lungimea totală sunt redată în tabelele 1 și 2, în timp ce în figurile 2 și 3 sunt evidențiate valorile minime, maxime și percentile ale tuturor caracterelor biometrice cuantificate la hibridii

din loturile experimentale de la fermele Horia și Răbăgani. Între caracterele considerate există puternice relații de corelație fiind identificate o serie de relații liniare sau de putere exprimate cu ajutorul ecuațiilor de regresie rediate sintetic în tabelul 4 și figura 4. Pentru cele trei generații de hibrizi din cele doua locatii, s-au efectuat teste de comparatie a mediilor valorilor diferitelor caractere in functie de sistemul de productie (Tabel 5).

Se observa astfel ca media greutatilor hibrizilor din loturile crescute la Horia sunt mai mari comparativ cu cele crescute la Rabagani cu exceptia lotului din 2014 unde s-au inregistrat valori medii ale greutatii individuale semnificativ mai mari pentru lotul de la Rabagani. Este evident faptul ca mentinerea sturionilor in conditii relativ constante in ceea ce priveste termica apei tehnologice (ferma Rabagani beneficiaza de alimentare din sursa mezotermala) a permis obtinerea, dupa 3 ani de crestere, unui spor de productie remarcabil, multe din exemplare depasind masa medie de 6 kg.



**Figura 2.** Masa și lungimea totală (valori minime, maxime, percentile) la loturile experimentale de hibrizi de la ferma Horia.



**Figura 3.** Masa și lungimea totală (valori minime, maxime, percentile) la loturile experimentale de hibrizi de la ferma Răbăgani.

**Tabel 2.** Valorile absolute pentru caractere biometrice cuantificate la remonții din diferitele generații crescute la ferma Horia.

	2014				2015				2016			
	Min	Max	Medie	Std. Dev	Min	Max	Medie	Std. Dev	Min	Max	Medie	Std. Dev
<b>G</b>	2022,0	3348,0	2720,0	412,7	614,0	854,0	741,4	80,04	308,00	466,00	399,60	51,85
<b>Lt</b>	72,00	88,00	79,30	5,06	48,00	56,00	53,30	2,31	40,00	50,00	46,20	2,90

Ls	60,00	70,00	64,30	2,83	38,00	44,00	41,60	1,96	31,00	38,00	34,60	2,27
Lf	67,00	77,00	70,80	3,12	42,00	50,00	46,60	2,46	35,00	43,00	39,60	2,50
Lra	46,00	60,00	50,20	4,08	28,00	34,00	31,80	1,87	24,00	28,00	26,10	1,45
Lrad	46,00	52,00	49,10	1,97	30,00	34,00	32,60	1,26	24,00	30,00	26,80	1,75
Lrap	18,00	21,00	18,60	1,07	12,00	14,00	12,60	0,70	10,00	12,00	11,20	0,92
Lc	16,00	19,00	17,20	0,79	11,00	13,00	11,90	0,57	9,00	11,00	10,40	0,70
Dpo	6,00	8,00	7,30	0,95	5,00	6,00	5,70	0,48	4,00	6,00	5,10	0,57
Lp	6,00	10,00	8,10	1,10	6,00	7,00	6,50	0,53	4,00	6,00	4,80	0,79
Do	4,00	5,00	4,80	0,42	3,00	3,00	3,00	0,00	3,00	3,00	3,00	0,00
IC	9,00	11,00	9,60	0,70	6,00	7,00	6,30	0,48	5,00	6,00	5,90	0,32
Lg	5,00	7,00	5,80	0,63	3,00	4,00	3,10	0,32	3,00	4,00	3,10	0,32
LCg	6,00	8,00	6,50	0,71	4,00	4,00	4,00	0,00	3,00	4,00	3,90	0,32
LCm	3,00	4,00	3,70	0,48	2,00	3,00	2,10	0,32	2,00	3,00	2,30	0,48
lpo	6,00	8,00	6,90	0,74	5,00	7,00	6,10	0,57	4,00	6,00	5,10	0,74
lm	2,00	4,00	2,70	0,67	1,00	2,00	1,90	0,32	2,00	3,00	2,20	0,42

**Tabel 3.** Valorile absolute pentru caractere biometrice cuantificate la remonții din diferitele generații crescute la ferma Răbăgani.

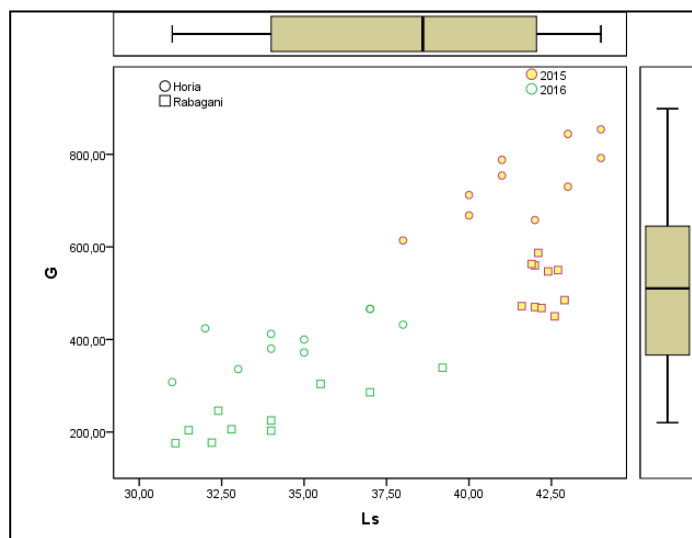
	2014				2015				2016			
	Min	Max	Medie	Std. Dev.	Min	Max	Medie	Std. Dev.	Min	Max	Medie	Std. Dev.
G	1342,00	6780,00	3986,57	2089,26	450,00	587,00	515,20	50,52	176,00	339,00	236,60	55,82
Lt	59,00	105,00	84,29	17,38	47,40	48,50	47,82	0,36	33,00	47,00	38,90	4,47
Ls	48,00	97,00	76,86	17,93	41,60	42,90	42,24	0,40	31,10	39,20	33,97	2,59
Lf	43,00	91,00	70,86	17,34	39,00	40,90	40,02	0,72	24,80	37,00	30,20	3,83
Lra	39,00	69,00	54,29	11,40	28,40	29,60	28,96	0,41	17,60	26,10	22,10	2,85
Lrad	29,00	68,00	52,00	13,54	29,40	30,90	30,09	0,62	18,80	27,00	23,33	2,70
Lrap	12,00	26,00	19,29	5,35	11,10	12,00	11,51	0,29	9,50	11,50	10,22	0,63
Lc	10,00	22,00	16,57	4,39	10,60	11,30	10,87	0,23	8,70	10,00	9,22	0,42
Dpo	6,00	13,00	9,43	2,37	5,30	5,70	5,46	0,13	4,20	5,20	4,62	0,30
Lp	6,00	12,00	9,71	2,29	5,70	6,20	5,98	0,16	3,40	4,50	3,90	0,42
Do	3,00	7,00	5,14	1,46	2,60	3,00	2,80	0,13	2,10	2,60	2,34	0,18
IC	6,00	16,00	11,86	3,63	5,40	6,20	5,74	0,28	4,10	5,50	4,71	0,41
Lg	2,00	7,00	4,86	1,86	2,20	2,40	2,28	0,06	2,40	2,70	2,57	0,11
LCg	5,00	11,00	7,43	2,30	3,60	4,50	4,02	0,37	3,40	4,30	3,82	0,27
LCm	3,00	7,00	4,86	1,35	3,20	3,40	3,28	0,08	2,10	3,30	2,65	0,39
lpo	7,00	13,00	10,14	2,34	6,40	6,50	6,46	0,05	4,10	5,80	4,90	0,60

Im	2,00	5,00	3,29	1,25	1,70	1,80	1,76	0,05	1,20	1,80	1,53	0,17
----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

**Tabel 4.** Modele de regresie pentru caractere biometrice cuantificate la remontii de la ferma Horia.

	Lot	Ecuatii de regresie	R <sup>2</sup>
Regresii tip putere pentru caracterizarea relatie lungime (L) – greutate (G)	H2014	$G = 1,32x L^{1,74}$	0,55
	H2015	$G = 0,40 x L^{1,88}$	0,59*
	H2016	$G = 0,25 x L^{1,92}$	0,70*
	R2014	$G = 0,17xL^{2,77}$	0,94*
	R2015	$G = 0,38 x L 1,89$	0,64*
	R2016	$G = 0,312x L 1,80$	0,94*
Regresii liniare pentru caracterizarea relatiei lungime totala (Lt) – Lungime standard (Ls)	H2014	$Lt=1,44 +13,53Ls$	0,65*
	H2015	$Lt=1,08 +8,31Ls$	0,83*
	H2016	$Lt=1,07 +9,06Ls$	0,70*
	R2014	$Lt =0,96Ls + 10,28$	0,72*
	R2015	$Lt=1,04 +11,23Ls$	0,66*
	R2016	$Lt=1,64 -18,36Ls$	0,94*

\*Regresii cu semnificație statistică pentru  $\alpha=0.05$  (Anova)



**Figura 4.** Corelatii lungime standard – greutate pentru esantionale de hibrizi selectionați (generații 2014-2016) din cele doua unitati de productie (Horia și Răbăgani).

**Tabel 5.** Testarea diferentei dintre valorile medii ale carcaterelor biometrice masurate la loturile din 2015 si 2016 crescute in doua sisteme de productie respectiv, Horia și Răbăgani.

Caracter	Sistem productie	2016	2015	2014
		Medie	Medie	Medie
<b>G</b>	Horia	399,60*	741,40*	2720,00*
	Rabagani	236,60*	515,20*	3986,57*
<b>Lt</b>	Horia	46,20*	53,30*	79,30*
	Rabagani	38,90*	47,82*	84,29*
<b>Ls</b>	Horia	34,60	41,60	64,30
	Rabagani	33,97	42,24	76,86

<b>Lf</b>	Horia	39,60*	46,60*	70,80
	Rabagani	30,20*	40,02*	70,86
<b>Lra</b>	Horia	26,10*	31,80*	50,20
	Rabagani	22,10*	28,96*	54,29
<b>Lrad</b>	Horia	26,80*	32,60*	49,10
	Rabagani	23,33*	30,09*	52,00
<b>Lrap</b>	Horia	11,20*	12,60*	18,60
	Rabagani	10,22*	11,51*	19,29
<b>Lc</b>	Horia	10,40*	11,90*	17,20
	Rabagani	9,22*	10,87*	16,57
<b>Dpo</b>	Horia	5,10*	5,70	7,30*
	Rabagani	4,62*	5,46	9,43*
<b>Lp</b>	Horia	4,80*	6,50*	8,10
	Rabagani	3,90*	5,98*	9,71
<b>Do</b>	Horia	3,00*	3,00	4,80
	Rabagani	2,34*	2,80	5,14
<b>IC</b>	Horia	5,90*	6,30*	9,60
	Rabagani	4,71*	5,74*	11,86
<b>Lg</b>	Horia	3,10*	3,10*	5,80
	Rabagani	2,57*	2,28*	4,86
<b>LCg</b>	Horia	3,90	4,00*	6,50
	Rabagani	3,82	4,02*	7,43
<b>LCm</b>	Horia	2,30	2,10*	3,70*
	Rabagani	2,65	3,28*	4,86*
<b>lpo</b>	Horia	5,10	6,10	6,90*
	Rabagani	4,90	6,46	10,14*
<b>lm</b>	Horia	2,20*	1,90	2,70
	Rabagani	1,53*	1,76	3,29

Odata cu evaluarea morfometrica din fiecare lot experimental au fost selectate cate un eșantion de cate 10 exemplare de la care s-au prelevat probe de sange in vederea caracterizarii profilului sanguin atat din punct de vedere hematologic (anexa 1) cat si biochimic (anexa 2). Cu aceasta ocazie au fost prelevate si probe de biochimie, in vederea evaluarii calitatii carni inainte si post iernare (anexa 3).

Sângele, datorită dinamismului și funcțiilor îndeplinite în organism, poate răspunde prin mecanisme homeostatice la modificările externe astfel încât să păstreze în limite normale integritatea funcționării organismului (Klontz, 2013). Noțiunea de profil metabolic sanguin presupune determinări hematologice sanguine și biochimice (profil proteic, glucidic, mineral) în urma cărora se obțin informații despre starea fiziologică a peștilor. Date din literatura de specialitate au evidențiat avantajul oferit de realizarea cu regularitate a investigațiilor hematologice de rutină, în vederea testării homeostaziei sanguine. Astfel, analizele hematologice pot constitui o metodă rapidă de diagnostic precoce a eventualelor modificări fiziologice în rândul biomasei din sistemele de producție acvacolă.

În cazul hibridilor luați în studiu, analiza principalilor parametri hematologici și biochimici s-a făcut cu scopul evaluării stării fiziologice de întreținere, în condițiile specifice creșterii în sistem intensiv de producție. Reacția hematologică este dată de variațiile hematocritului, hemoglobinei, numărului de eritrocite, precum și de a constantelor eritrocitare, înregistrate în cazul analizelor efectuate pe hibridii luați în studiu, prezentate sintetic în tabelul 6.

**Table 5.** Tablou sintetic privind media valorilor parametrilor hematologici și biochimici a hibridilor din loturile experimentale.

Parametri hematologici		LOTURI EXPERIMENTALE		
		2014	2015	2016
E (x10 <sup>6</sup> cel./μl)	<i>Media</i>	<b>0,97</b>	<b>0,83</b>	<b>0,73</b>
	<i>St.dev.</i>	0,23	0,19	0,13
	<i>Min.</i>	0,59	0,51	0,50
	<i>Max.</i>	1,39	1,18	0,95
Hb (g/dL)	<i>Media</i>	<b>8,66</b>	<b>7,37</b>	<b>7,49</b>
	<i>St.dev.</i>	0,87	0,59	0,64
	<i>Min.</i>	7,45	6,51	6,62
	<i>Max.</i>	9,95	8,55	8,77
Ht (%)	<i>Media</i>	<b>23,10</b>	<b>20,41</b>	<b>21,17</b>
	<i>St.dev.</i>	2,91	2,47	1,57
	<i>Min.</i>	17,76	17,09	19,51
	<i>Max.</i>	26,24	25,66	23,81
VEM (fL)	<i>Media</i>	<b>251,69</b>	<b>260,48</b>	<b>302,34</b>
	<i>St.dev.</i>	55,44	71,00	55,30
	<i>Min.</i>	184,46	198,25	205,37
	<i>Max.</i>	321,96	402,55	395,80
HEM (pg)	<i>Media</i>	<b>94,62</b>	<b>93,85</b>	<b>108,32</b>
	<i>St.dev.</i>	20,36	22,90	28,08
	<i>Min.</i>	69,91	72,39	77,07
	<i>Max.</i>	126,25	141,44	175,41
CHEM (g/dL)	<i>Media</i>	<b>37,72</b>	<b>36,36</b>	<b>35,75</b>
	<i>St.dev.</i>	2,01	2,49	4,96
	<i>Min.</i>	34,75	33,32	29,29
	<i>Max.</i>	41,94	40,41	44,32
TP (g/dL) Proteine totale	<i>Media</i>	<b>5,14</b>	<b>5,78</b>	<b>4,50</b>
	<i>St.dev.</i>	0,42	0,70	0,24
	<i>Min.</i>	4,43	4,89	4,01
	<i>Max.</i>	5,76	7,42	4,81
GLU (mg/dL) Glucoză	<i>Media</i>	<b>78,05</b>	<b>79,26</b>	<b>81,90</b>
	<i>St.dev.</i>	2,81	2,14	2,56
	<i>Min.</i>	73,29	76,38	77,79
	<i>Max.</i>	82,43	84,06	85,42

Analizând valorile indicilor hematologici și biochimici prezentate analitic în tabelul de mai sus se desprind următoarele observații:

o în ceea ce privește numărul de eritrocite nu au fost evidențiate modificări semnificative la comparația mediilor obținute pentru cele trei loturi experimentale (ANOVA,  $p > 0,05$ ,  $p = 0,14$ ), valorile obținute încadrându-se în ecartul optim pentru sturioni  $0,56 \div 1,23 \times 10^6$  celule/μl sânge (Ghittino, 1983; Docan, 2011). Așadar, analiza statistică nu a evidențiat diferențe notabile determinate de vârstă.

o referitor la hematocrit comparând valorile înregistrate pentru cele trei loturi experimentale, acesta nu a înregistrat valori semnificativ diferite (ANOVA,  $p > 0,05$ ;  $p = 0,19$ ), valorile cele mai scăzute fiind obținute în lotul H2015 ( $20,41 \pm 2,47$  %). Valorile înregistrate în cazul indivizilor analizați indiferent de lotul de proveniență s-au situat în intervalul optim raportat în studii similare pentru diferite specii de sturioni (Knowles și colab., 2006; Dicu și colab., 2013).

o analiza variației cantității de hemoglobină evidențiază o tendință de scădere semnificativă în cazul sturionilor aparținând loturilor din H2015, H2016 (ANOVA,  $p < 0,05$ ;  $p = 0,015$ ) comparativ cu cei din lotul H2014 unde s-au înregistrat valori ușor mai crescute ale concentrației de hemoglobină, probabil datorate intensificării proceselor de hemoglobinosinteză odată cu vârsta.

o în ceea ce privește analiza constantelor eritrocitare, acestea au o valoare de diagnostic deosebită oferind informații referitoare la forma, mărimea și încărcarea cu hemoglobina a eritrocitelor. Interpretarea statistică a datelor evidențiază diferențe ne semnificative între loturile de hibridi analizate în cazul VEM (ANOVA,  $p > 0,05$ ;  $p = 0,32$ ), HEM (ANOVA,  $p > 0,05$ ;  $p = 0,55$ ) și CHEM, (ANOVA,  $p > 0,05$ ;  $p = 0,69$ ), vârsta diferită neafectând volumul ocupat de eritrocite și nici gradul lor de încărcare cu hemoglobină. Cu toate acestea, valorile ușor mai crescute pentru VEM la hibridii din H2016 pot indica o rata a sintezei hemoglobinei diferită de cea a diviziunilor celulare care este mai redusă. În majoritatea situațiilor, HEM se corelează cu VEM.

Analizele biochimice pot oferi informații importante pentru monitorizarea stării de sănătate a peștilor, prin detectarea eventualelor perturbări metabolice. Date din literatura de specialitate atestă modificări ale indicatorilor biochimici în funcție de vârstă, sex sau stare de sănătate (Akrami et al., 2013, Charoo et al., 2013).

o Concentrația proteinelor plasmatică este afectată, în primul rând, de modificările volumului plasmatic, care la pești a putut fi observată în unele condiții stresante. În studiul nostru valoarea proteinelor plasmatică a variat între  $4,50 - 5,78$  g/dl, în cazul lotului H2016 înregistrându-se valori ușor mai reduse ( $4,50$  g/dl), diferențele fiind semnificative statistic la compararea cu celelalte loturi (ANOVA,  $p < 0,05$ ;  $p = 0,002$ ). În general, un nivel scăzut al proteinemiei indică aport necorespunzător al proteinelor în hrană care va intensifica astfel catabolismul proteic ducând în final la epuizarea organismului (Patriche, 2008). Cu toate acestea, valorile proteinelor totale s-au încadrat în limitele normale pentru puietul de sturioni.

o Cuantificarea glucozei din sângele hibridilor luați în studiu a înregistrat valori similare cu cele găsite în literatura de specialitate (Saeedeh, R. et al, 2008), fără diferențe semnificative din punct de vedere statistic (ANOVA;  $p > 0,05$ ,  $p = 0,064$ ). Glucoza este considerată sursă importantă de energie pentru menținerea homeostaziei organismului, în timpul glicolizei anaerobe glicogenul stocat în ficat și mușchi putând fi utilizat în producerea de ATP.

Valorile optime ale principalilor indici hematologici și biochimici în cazul hibridilor analizați indică o stare fiziologică normală a hibridilor de cultură, asigurată de calitatea condițiilor de creștere, a furajelor administrate, respectiv a nutriției echilibrate aceștia fiind principalii factori pentru menținerea sănătății metabolice a sturionilor.

## BIBLIOGRAFIE

- Akrami R., et al., 2013 Age and sex specific variation in hematologic and serum biochemical parameters of Beluga (*Huso huso*, 1758). *International Journal of Aquatic Biology* 1(3):132 – 137.
- Amberg, Jon J., Goforth, Reuben, Stefanavage, Tom, Sepulveda, Maria S. (2010) Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*). *Fish Physiology And Biochemistry* 36(4): 923-932.
- Atchley, W.R., Fitch, W.M., Bronnerfraser, M., 1994. Molecular evolution of the Myod family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11522 –11526.
- Bahamonde Paulina A. , Kelly R. Munkittrick, Christopher J. Martyniuk (2013) Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? *General and Comparative Endocrinology* 192: 25–35
- Barannikova I. A., Bayunova L. V., Semenova T. B., Trenkler I. V. (2008) Changes in the physiological state of hiemal form of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* in the Volga after holding it and hormonal impacts., *Journal of Ichthyology*, 48(5):402–407.
- Barannikova I., L. Bayunova, and T. B. Semenova (2004) Serum levels of testosterone, 11-Ketotestosterone and oestradiol-17 $\beta$  in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. *J. Fish. Biol.* 64 (5): 1330–1338
- Barannikova I.A., L.V. Baunova, A.B. Gruslova and T.B. Semenova. (2003) Steroids in sturgeon's migration regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 263–264
- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Fostier, A. (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910–931.
- Benedet, S., Björnsson, B., Taranger, G.L., Andersson, E., 2008. Cloning of somatolactin alpha, beta forms and the somatolactin receptor in Atlantic salmon: seasonal expression profile in pituitary and ovary of maturing female broodstock. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 42.



- Berbejillo J., Martinez-Bengochea A., Bedó G., Brunet F., Volff J.N., Vizziano-Cantonnet D. (2012) Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular Reproduction And Development* 79(8): 504-516.
- Berbejillo J., Martinez-Bengochea A., Bedó G., Vizziano-Cantonnet D. (2011) Molecular characterization of testis differentiation in the Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*. *Indian Journal of Science & Technology - Proceedings of 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Cochin, India.* 4(S8): 71-72.
- Bidwell Christopher A., Carlson Don M. (1995) Characterization of vitellogenin from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Mol Evol* (1995) 41:104-112.
- Biga, P.R., Roberts, S.B., Iliev, D.B., McCauley, L.A.R., Moon, J.S., Collodi, P., Goetz, F.W., 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141, 218–230.
- Birstein V., Bemis W.E., Waldman J. 1997. The threatened status of acipenseriform species: a summary, *Environ.Biol. Fish.* 48: 427-435.
- Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D. 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane anchored forms. *Endocrinology*, 142, pp. 3269–3273.
- Ceapa C, Williot P, Le Menn F, Davail-Cuisset B (2002) Plasma sex steroid and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) during spawning migration in the Danube River. *J Appl Ichthyol* 18:391–396.
- Ceapa C. (2001). Contribuții la studiul biologiei și exploatarei pastrugii (*Acipenser stellatus* Pallas 1771) pe parcursul migrației de reproducere în Dunărea inferioară. Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați-teza de doctorat, 142 p.
- Charoo S. Q., et al., 2013. Sexual differentiation in blood biochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Advanced Fisheries and Aquatic Science*, Vol. 1(1): 32-38
- Chen W. X., Ma Y. & Liu K. H. 2015. Association of MyoD1a and MyoD1b gene polymorphisms and meat quality traits in rainbow trout. *Genet Mol Res* 14, 9034–9044.
- Chen, Y.H., Lee, W.C., Liu, C.F., Tsai, H.J., 2001. Molecular structure, dynamic expression, and promoter analysis of zebrafish (*Danio rerio*) Myf-5 gene. *Genesis* 29, 22–35.
- Cuevas-Rodríguez BL, Sifuentes-Rincón AM, Ambriz-Morales P., García-Ulloa M., Valdez-González FJ, Rodríguez-González H. (2016) Novel Single Nucleotide Polymorphisms In Candidate Genes For Growth In Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, 45(6):345-348.
- Cuisset B, Pelissero C., Nunez J. & F. Le Menn, (1991) ELISA for Siberian sturgeon vitellogenin. In: *Acipenser*. (Williot P., ed.), pp.107-111. Bordeaux, France: Cemagref Publications.
- Cuisset B, Pradelles P, Kime DE, Kühn ER, Babin P, Davail S, LeMenn F (1994) Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetyl cholinesterase as label: application to the measurement of 11- ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comp Biochem Physiol* 108:229–241.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364
- Dicu Maria Desimira (Stroe), V. Cristea, Angelica Docan, Iulia Rodica Grecu, Lorena Dediu, M.T. Coadă (2013). The influence of feeding frequency on the hematological profile of *A. stellatus* (Pallas 1771), reared in a recirculating aquaculture system, *Scientific papers Animal Science Iași*, vol. 59, pp 242-246.
- Docan, A., Cristea, V., Dediu, L. (2011). Effect of feeding with different dietary protein level on hematological indices of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* reared under recirculating systems condition, *AACL Bioflux* 4(2), pp 180-186.
- Doroshov S.I., J.P. Van Eenennaam, G.P. Moberg (1999) Development of white sturgeon broodstock *Journal of Applied Ichthyology*, 15 (4-5): 326–327.
- Doroshov SI, Moberg GP, Van Eenennaam JP (1997) Observations on the reproductive cycles of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Environ Biol Fish* 48:265–278
- Fajkowska, M., Rzepkowska, M., Adamek, D., Ostaszewska, T., Szczepkowski, M. (2016) Expression of dmrt1 and vtg genes during gonad formation, differentiation and early maturation in cultured Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Journal of Fish Biology*.
- Falconer, D.S. (1989). Introduction to quantitative genetics, 3<sup>RD</sup> Edn. Longman Sci And Tech: Harlow, UK. 438pp.
- Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J. (2006) Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*, 253(1-4): 721-727
- Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J. (2006) Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture* 253: 721–727.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y (1983) The gonadal steroidogenesis. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds) *Fish physiology*. Academic, New York, pp 277–372
- Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW. 2004. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen Comp Endocrinol*, 139:61–71.
- Ghittino P., (1983) *Technology and Pathology in Aquaculture*, vol. 1.
- Gorelick, Daniel A., Watson, William, Halpern, Marnie E. (2008) Androgen receptor gene expression in the developing and adult zebrafish brain. *Developmental Dynamics* 237(10): 2987-2995.
- Gorji A.E., Rahmani H., Miyajiri GR - Growth parameters evaluation and identification of growth hormone receptor gene polymorphism in various strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. 2016. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 7:435, doi: 10.4172/2155-9546.1000435
- Hagihara S, Yamashita R., Yamamoto S., Ishihara M., Abe T., Ijiri S., Adachi S. (2014) Identification of genes involved in gonadal sex differentiation and the dimorphic expression pattern in undifferentiated gonads of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833. *Journal of Applied Ichthyology* 30(6): 1557-1564.

- Hale M.C., Jackson J.R., DeWoody J.A. (2010) Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica* 138(7): 745-756.
- Hett A.K., Ludwig A. (2005) SRY-related (Sox) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Genome* 48(2): 181-186.
- Hurvitz A., Degani G., Goldberg D., Din S.Y., Jackson K., Levavi-Sivan B. (2005) Cloning of FSHb, LHb and glycoprotein a subunits from the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), b-subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. *General and Comparative Endocrinology* 140(1): 61-73.
- Hurvitz Avshalom, Karen Jackson, Gad Degani, Berta Levavi-Sivan (2007) Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture* 270, pp. 158-166
- Jackson Karen, Avshalom Hurvitz, Svetlana Yom Din, Doron Goldberg, Oren Pearlson, Gad Degani, Berta Levavi-Sivan (2006) Anatomical, hormonal and histological descriptions of captive Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) with intersex gonads. *General and Comparative Endocrinology* 148: 359-367
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Sequence, conservation, and quantitative expression of rainbow trout Myf-5. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 140, 533-541.
- Kajimura, S., Hirano, T., Visitacion, N., Moriyama, S., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 178, 91-99.
- Keyvanshokoh S., Gharaei A. (2010) A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture Research* 41(9): e1-e7.
- Keyvanshokoh S., Kalbassi M.R., Hosseinkhani S., Vaziri B. (2009) Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. *Animal Reproduction Science* 111(2-4): 361-368.
- Keyvanshokoh S., Pourkazemi M., Kalbassi M.R. (2007) The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology* 23(1): 1-2.
- Kime DE (1993) "Classical" and "non-classical" reproductive steroids in fish. *Rev Fish Biol Fish* 3:160-180
- Kime, D.E., Abdullah, M.A.S., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Epler, P. (1994) Substrate concentration affects the in vitro metabolism of 17-hydroxyprogesterone by ovaries of the carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 13 (4): 317-324
- Knowles, S., Hrubec TC., Smith SA., Bakal RS., 2006 Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Veterinary Clinical Pathology* (35) 4:pp 434 - 440.
- Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH & Lucy MC 1999 Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 140 3947-3954.
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Suetake, H., Johnston, I.A., Watabe, S., 1998. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *Journal of Experimental Biology* 201, 2801-2813.
- Lee, L.T., Nong, G., Chan, Y.H, Tse, D.L., Cheng, C.H. 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene*, 270, pp. 121-129.
- Leng, X. Q., Du, H. J., Li, C. J., Cao, H. (2016) Molecular characterization and expression pattern of *dmrt1* in the immature Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. *Journal of Fish Biology* 88(2): 567-579.
- Liu L, Yu X, Tong J: Molecular characterization of myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Mol Biol Rep.* 2012, 39: 9211-9221. 10.1007/s11033-012-1794-6.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G., Patarnello, T., 2001. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Letters* 509, 36-40.
- McCormick C.R., Bos D.H., DeWoody J.A. (2008) Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Journal of Applied Ichthyology* 24(6): 643-645.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
- Moghim, M., Vajhi, A.R., Veshkini, A., Masoudifard, M. (2002). Determination of sex and maturity in *Acipenser stellatus* by using ultrasonography. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 325-328.
- Mola Abbas Esmaeili, Hovannisyan Hrachya G. (2015) Measurements of serum steroid hormones (testosterone, 11-ketotestosterone, and 17 $\beta$ -estradiol) in farmed great sturgeon. *Comp Clin Pathol* (2015) 24: 509-513
- Munday, P.L., White, J.W., Warner, R.R. (2006) A social basis for the development of primary males in a sex-changing fish. *Proc. R. Soc. B* 273, 2845-2851
- Nazeri S., B. Mojazi Amiri, M. R. Nazeri & A. R. Mirvaghefi (2014) Sexing of farmed immature beluga (*Huso huso*) using steroid hormone levels as indicators. *Comp Clin Pathol* 23: 631-635
- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K. (2005) Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female x *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture* 245 (1-4): 39-47
- Orlando, E.F., Guillette Jr., L.J. (2007) Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. *Environ. Res.* 104: 163-173
- Ostbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, O., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European Journal of Biochemistry* 268, 5249-5257.
- Patriche T. (2008). *Imunitatea la pești*, Editura didactică și pedagogică Bucuresti
- Pelissero, C., LeMenn, F., Narbonne, J.F. (1991) Plasma kinetics of ingested tritiated estradiol and the influence on estradiol plasma levels in the cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 231-245
- Piferrer, F., Guiguen, Y. (2008) Fish Gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Res. Fish. Sci.* 16: 35-55.
- Piferrer, F., Ribas, L., Diaz, N. (2012) Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation. *Mar. Biotechnol.* 14: 591-604

- Pozzi Pereira, A., de Alencar, M.M., de Oliveira, H.N., de Almeida Regitano, L.C. 2005. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genetics and Molecular Biology*, 28, pp. 230–236.
- Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M., Funkenstein, B., 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell and Tissue Research* V311, 239–250.
- Reinecke M, Bjornsson BT, Dickhoff WW, McCormick SD, Navarro I, Power DM & Gutierrez J. 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 142, 20–24.
- Rescan, P.Y., Jutel, I., Ralliere, C., 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204, 3523–3529.
- Roberts, S.B., Goetz, F.W., 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *Febs Letters* 491, 212–216.
- Roberts, S.B., Goetz, F.W., 2003. Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Molecular and Cellular Endocrinology* 210, 9–20.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129, 597–603.
- Rougeot, C., Krim, A., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P., M elard, C. (2007) Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology* 67: 1046–1052
- Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., Jaenisch, R., 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic Hlh gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383–390.
- Ryynanen, H.J., Primmer, C.R., 2004. Primers for sequence characterization and polymorphism detection in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth hormone 1 (GH1) gene. *Molecular Ecology Notes* 4, 664–667.
- Seki, M., Yokota, H., Maeda, M., Kobayashi, K.(2005). Fish full life-cycle testing for 17 $\beta$ - estradiol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1259–1266.
- Shimamura, Ryuji, Fraizer, Gail C., Trapman, Jan, YfC, Lau, Saunders, Grady F. (1997) The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clinical Cancer Research* 3(12): 2571-2580.
- Sun Y, Yu X, Tong J: Polymorphisms in myostatin gene and associations with growth traits in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Int J Mol Sci.* 2012, 13: 14956-14961. 10.3390/ijms131114956.
- Sun, D., Zhang, Y., Wang, C., Hua, X., Zhang, X. A., Yan, J. (2013) Sox9-related signaling controls zebrafish juvenile ovary and testis transformation. *Cell death & disease* 4(11): e930.
- Tan X.G., Zhang Y.Q., Zhang, P.J., Xu P., Xu Y. 2006. Molecular structure and expression patterns of flounder (*Paralichthys olivaceus*) Myf-5, a myogenic regulatory factor. *Comparative Biochemistry and Physiology B—Biochemistry & Molecular Biology* 145, 204–213.
- Tao, W.J., Boulding, E.G. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Heredity*, 91 (2003), pp. 60–69
- Terova, G., Bernardini, G., Binelli, G., Gornati, R., Saroglia, M., 2006. cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and the effect of fasting and refeeding on their abundance levels. *Domestic Animal Endocrinology* 30, 304–319.
- Tsai HY, Hamilton A, Guy DR, Houston RD. Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene are associated with growth-related traits in farmed Atlantic salmon. *Anim Genet.* 2014; 45:709–15.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I. (1999) Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon *Journal of Heredity*, 90 (1): 231-233
- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N., Klein, W.H., 1995. Myogenin is required, for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *Journal of Cell Biology* 128, 563–576.
- Vong, Q.P., Chan, K.M., Leung, K., Cheng, C.H.K., 2003. Common carp insulin-like growth factor-I gene: complete nucleotide sequence and functional characterization of the 5'-flanking region. *Gene* 322, 145–156.
- Webb M.A.H, Feist G, Foster EP, Schreck CB, Fitzpatrick MS (2002). Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators. *Trans Am Fish Soc.* 131:132–142
- Webb, M.A.H., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I.(2000) Effects of steroid hormones on in vitro oocyte maturation in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 23(4): 317-325
- Wuertz S., Gaillard S., Barbisan F., Carle S., Congiu L., Forlani A., Aubert J., Kirschbaum F., Tosi E., Zane L., Grillasca J. (2006) Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* 258: 685-688.
- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., Du, S.-J., 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 206, 4067–4079.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 3A. Academic Press, New York, pp. 117–175.
- Zhu, T., Goh, E.L.K., Graichen, R., Ling, L., Lobie, P.E., 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cellular Signalling*, 13, 599–616.

## PROTOCOL REALIZARE HEMOLEUCOGRAMA

Datele examenului hematologic sunt, de cele mai multe ori, utilizate corelativ, pentru evaluarea stării fiziologice a organismului dar și pentru diagnosticul unor boli ale organelor hematopoietice.

Analizele hematologice la pești se realizează după metode curente aplicate în hematologia veterinară (Blaxhal , 1973, Ghergariu și col., 1985, Svobodova, Z., 1991).

Examinarea seriei eritrocitare și leucocitare presupune recoltarea probelor biologice de sânge (cca. 0,5 - 2 ml, în funcție de talia peștelui). La pești există mai multe metode de recoltare a sângelui: puncție cardiacă – la pești de dimensiuni mari, puncție din vena caudală – la pești de diferite dimensiuni, tăierea pedunculului caudal – la pești de dimensiuni mici.

Nr. crt.	Parametru hematologic	Metoda de lucru	Aparatura utilizată
1	Număr Eritrocite mil/ $\mu$ l sânge.	clasică $X = \frac{4000 * 200 * N}{80} = 10000 * N$ N- eritrocite numărate în 80 de pătrate; 4000-volumul pătratelor cu latura de 1/20 mm; 200 -diluția sângelui	Hemocitometru Neubauer, Lichid Vulpian Microscop ZEISS – AXIO IMAGER A1 (10 oc x 40 ob)
2	Hematocrit (%)	Microhematocritului	Centrifuga HETTICH HAEMATOCKIT 210 Tuburi capilare heparinizate
3	Leucocrit (%)	Microleucocritului	
4	Hemoglobină (g/100 ml sânge)	Metoda cu cianmethemoglobină și reactiv Drabkin	Spectrofotometru UV-VIS
5	Volumul Eritocitar Mediu (VEM), pg	$VEM = \frac{Ht * 10}{E}$ Ht -hematocrit E - număr eritrocite	
6	Hemoglobina Eritocitară Medie (HEM)	$HEM = \frac{Hb * 10}{E}$ Hb - hemoglobina E - număr eritrocite	
7	Concentrația în Hemoglobină Eritocitară Medie (CHEM)	$CHEM = \frac{Hb * 100}{Ht}$ Hb–hemoglobina, Ht -hematocrit	

## EXAMENUL BIOCHIMIC A SÂNGELUI

Pentru determinarea celor 26 de parametri biochimici (ALB, ALKP, ALT, AMYL, AST, BUN, CHOL, CK, CREA, GGT, GLOB, GLU, LAC, LDH, LIPA, NH<sub>3</sub>, PHOS, TBIL, TP, TRIG, UCREA, UPCRATION, UPRO, URIC, CA) se folosește Analizorul de biochimie uscată VETTEST 8008.

Se recomanda ca probele de sânge să fie centrifugate imediat după recoltare. Dacă nu este posibil, se stochează proba la 4-8 °C, la întuneric centrifugându-se în maxim o oră.

Parametru biochimic	Codificare parametru biochimic	Timp centrifugare, manopera probelor de sânge
Albumina	ALB	-
Fosfataza Alcalina	ALKP	-
Alanin AminoTransferaza	ALT(GOT)	-
Amilaza	AMYL	-
Aspartat Amino Transferaza	AST ( SGOT)	Probele trebuie centrifugate imediat după prelevare. Apariția ușoară a hemolizei poate determina o creștere a AST plasmatic.
Calciu	Ca <sup>2+</sup>	Evitarea expunerii probei la aer
Colesterol	CHOL	-
CreatininKinaza	CK	Probele de sânge trebuie centrifugate imediat
Creatinina	CREA	-
Gamma Glutamiltransferaza	GGT	-
Glucoza	GLU	Probele trebuie centrifugate imediat după prelevare. În tuburile cu heparina litiu, poate apărea hemoliza; Concentrația glucozei poate să se reducă până la 10% într-o oră la 20 °C.
Lactat Dehidrogenaza	LDH	Probele trebuie centrifugate imediat după prelevare. Apariția hemolizei, chiar și ușoară, poate induce creșterea LDH.
Lipaza	LIPA	-
Magneziu	Mg <sup>2+</sup>	Probele de sânge trebuie centrifugate imediat după prelevare. Probele hemolizate pot da rezultate eronate în sensul apariției unei concentrații crescute.
Amoniu	NH <sub>3</sub>	Probele de sânge trebuie centrifugate imediat după prelevare. Se va evita expunerea probelor la aer. Tuburile cu probe trebuie ținute închise ermetic.
Fosfor Anorganic	PHOS	Probele de sânge trebuie centrifugate imediat după prelevare;

		Probele hemolizate pot da erori in sensul cresterii concentratiei de fosfor.
Bilirubina Totala	TBIL	Probele de sange trebuie centrifugate imediat. Daca nu se pot analiza imediat plasma trebuie indepartata si stocata la intuneric la 4-8 °C deoarece concentratia de bilirubina scade rapid la expunerea la lumina.
Proteina Totala	TP	Hemoliza poate determina creșterea concentrației proteinelor plasmaticice.
Trigliceride	TRIG	-
Bun Urea	UREA	-

### Anexa 3

## COMPOZIȚIA BIOCHIMICĂ A PEȘTELUI

În compoziția chimică a peștelui intră diferite substanțe chimice printre care: proteine, grăsimi, substanțe minerale și apă. Acestea sunt componenții din care sunt constituite țesuturile și organele peștelui. La carnea de pește, compoziția chimică este variabilă, depinzand de specia analizata, anotimp, sex sau mediul de cretere. Metodele folosite pentru determinarea compozitiei chimice sunt descrise pe scurt in tabelul urmator:

Nr. crt.	Parametru biochimic	Metoda de lucru	Aparatura utilizată
1	Lipide	<p>Extracție cu eter de petrol Conform AOAC metodei oficiale 991.36 pentru Carne si produse din carne, Martie 1997.</p> <p>Modul de calcul:</p> <p>% lipide=<math>[(m_2-m_1)*100]/m_0</math>, unde</p> <p><math>m_2</math>=masa paharului dupa extractie,g;</p> <p><math>m_1</math>=maha paharului gol, cu pietre de extractie, g;</p> <p><math>m_0</math>=masa probei, g.</p>	Soxtherm Gerhardt
2	Proteine	<p>Metoda de analiza utilizata:combustie catalitica la temperatura inalta in concordanta cu metoda Dumas.</p> <p>Metoda de detectie folosita: Thermal Conductivity Detection (TCD).</p>	Primacs SN 100 Analyzer
3	Determinarea umiditatii si a substantei uscate	<p>Se determina prin metoda indirecta prin uscare intensiva la etuva la <math>105\pm 2^\circ</math> C. Metoda se bazeaza pe cantariri succesive pana se ajunge la masa constanta.</p> <p>alculul rezultatelor</p> <p>Umiditatea probei se calculeaza cu ajutorul formulei urmatoare:</p> $\text{Apa \%} = \frac{m - m_1}{m_2} \times 100$ <p>in care:</p>	Etuva cu convecție forată Jeiotech OF-02G

		m = tara creuzetului + produsul înainte de uscare, m1 = tara creuzetului+ produsul după uscare, m2 = cantitatea de produs luata in lucru, dedusa din tara creuzetului + produsul înainte de uscare, minus tara creuzetului	
4	Determinarea substantelor minerale totale	Se determina prim metoda calcinarii lente la 550° C, pana se obtine o cenusa de culoare alba sau cenusie deschisa, fara urme de carbune. Continutul de substante minerale totale (cenusa) se calculeaza cu ajutorul formulei: Cenusa % = (m1/m2)X 100, in care: m1 = cantitatea de cenusa, in g; m2 = cantitatea de produs luata in lucru, in g.	Cuptor de calcinare termoreglabil Nabertherm
5	Calculul caldurii de combustie	Cu ajutorul bombeii calorimetrice se determină cantitatea de căldură dezvoltată prin arderea unei mase de combustibil cântărită foarte precis. Determinarea se face prin metoda amestecurilor, la baza căreia stă unul din principiile calorimetriei, principiul egalității schimbului de căldură. Rezultatul se exprima in cal/g	Calorimetru Isoperibol Parr 6400

Participari conferinte:

- Alexandru Burcea, Gina-Oana Popa, Iulia Elena Florescu, Andreea Dudu, Sergiu Emil Georgescu, Marieta Costache, Method validation for the expression of genes possibly involved in sexual differentiation in *Acipenser stellatus*, Book of abstracts, The 8th International Zoological Congress of "Grigore Antipa" Museum, Bucharest, 16-19 November 2016.
- Andreea Dudu, Sergiu Emil Georgescu, Marilena Maereanu, Marieta Costache, New approaches in sturgeon conservation and aquaculture by using genetic and biochemical markers, Book of abstracts, The 8th International Zoological Congress of "Grigore Antipa" Museum, Bucharest, 16-19 November 2016.
- Iulia Gune, Alexandru Burcea, Oana Popa, Andreea Dudu, Sergiu Georgescu, Sorina Dinescu, Iulia Grecu, Lorena Dediu, Angelica Docan, Marieta Costache, The effects of starving and refeeding on Hsp genes transcription in *Acipenser stellatus* (Pallas, 1771) under aquaculture conditions, Book of abstracts, The 8th International Zoological Congress of "Grigore Antipa" Museum, Bucharest, 16-19 November 2016.