

INOVTEHNOSTUR

TEHNOLOGIE DE SELECTIE SI AMELIORARE GENETICA IN VEDEREA CRESTERII PROFITABILITATII ACVACULTURII STURIONILOR

Raport Etapa I/2016 - Rezumat |

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.I.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 descarcate 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 nisetru (*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*, *gnhr* 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 β 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 *β -actin*, *gapdh* și *ARNr 28S* au fost alese drept posibile gene de referință. Gena *β -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 *β -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 selectati

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 (*β -actină*, *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.

656	AJ251	<i>lh</i>	176 pb	lh-F	5'-CTGCRGAGACACTGACACAC-
	lh-R			5'-AGAGGTCTGGATGAGGAGGC-	
1138	DQ20	<i>igf1</i>	188 pb	igf1-F	5'-TCCTGYGTGTTCTGTGCCTG-3'
	igf1-R			5'-CTGGAAGCAGCACTCRTTCA-	
9361	HQ43	β - <i>actin</i>	161 pb	β -	5'-TGACCCTGAAGTAYCCMATC-
	β -			5'-CTTCTCTCTGTTRGCTTGG-3'	
586	EF413	<i>gapd</i> <i>h</i>	114 pb	gapdh	5'-AGACACCCGCTCNTCHATCT-
	gapdh			5'-TCCACGACTCTGTTGCTGTA-	
741	JQ250	ARM <i>r 28S</i>	160 pb	28S-F	5'-TGTTTGTGAATGCAGCCCAA-
	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, steroidii sexuali sunt considerați printre cele mai importante substanțe implicate în reglarea neuroendocrină a reproducerii. Acești steroidi sexuali joacă un rol important în diferențierea sexuală, dezvoltarea gonadelor, în procesul de spermiație la masculi, de maturație ovocitară și ovulația la femele. De asemenea, acești steroidi 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 steroidii sexuali sunt cei care induc în mod natural, de fapt, sexul peștilor. Astfel, produșii normali 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 steroidi studiați în literatura de specialitate și rolurile lor cele mai importante sunt:

Estradiolul (E2) mediază secreția de vitelogenină în hepatocite având precursorul 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 maturația sexuală, fiind prezent și la femelele anumitor specii de sturioni. **17 α , 20 β – dihidroxy-4pregnen-3-one (DP)** este considerat unul dintre steroidii care induc maturația 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 β -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 (Volff, 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 femeie 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 heterogamică (WZ femele) respectiv, masculii sunt homogametic (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 1.2 Stabilirea unui panel optim de gene corelate cu producția și calitatea cărni 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 cărni 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 constată 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 candiadată 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-1* a 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 corporală și indivizii cu un anumit haplotip au demonstrat o rata 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 exclusive 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), păstravul 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 păstravul 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.

Genă	Denumire primer	Secvență primer
<i>gh</i> (growth hormone)	GH1_F	5'GRMCAAAAACCTGAAMRAATGGC3'
	GH1_R	5'TAGAAGTTCRCRAAACCCNCCT3'
	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'CCTCTCAGCAACCCCCAGAACCTC3'
	Igf-1_Ex3_F	5' CCTTGCTCTTTACATGCTCGCCAT3'
	Igf-1_Ex3_R	5'GCCGCCAAAGGTGCTTCAACATAG3'
<i>mstn</i> (miostatina)	Mstn-1b1_F	5'AAACTGGGCATTCAATGTTCCACCATACCA3'
	Mstn1b1_R	5'CTGCAGTGGCTATTGGGAAAGCTCGCTAAT3'
	Mstn-1b2_F	5'ACTTGACGTACGAGCCGAGTTCC3'
	Mstn1b2_R	5'TTGCCGCAGCCACACCCGACAAC3'
	carpMstn_F	5'AGCCTACCATAAAAGGTGTGTG3'
	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'ACGGAATGGTGAGAAACT3'

	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'CAGAGTTCTTCTTGTG3'
<i>MyoD1b</i>	M3_F	5'TGTGACAAATACAGAGCC3'
	M3_R	5'TATCCGATTGGTAGTTCC3'
	M4_F	5'AACTGCTCAGACGGAA3'
	M4_R	5'TCGTTGAAGTAGGTGC3'
	M5_F	5'TCGCCGAAACTCCAAAT3'
	M5_R	5'GCCATCCTCTTCTTCTACT3'
	S5_F	5'GTGAGATGGAGTTGTCG3'
	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'TATCCGATTGGTAGTTCC3'
	S9_F	5'GGAACTACCAATCGGA3'
	S9_R	5'GCCTAACAAGTCACAAT3'
	S10_F	5'AAGACCTTGGCAGACAT3'
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.

În prima etapă, proiectul a urmărit, pe lângă elaborarea unui protocol metodologic de sexare timpurie la sturioni, caracterizarea condiției și a performanței de creștere a hibridului Best-Beluga 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.

O dată cu selecția exemplarelor ce au format loturile experimentale s-a realizat marcarea individuală și evaluarea morfometrică a loturilor de hibrizi (Foto 1.).



Foto 1. Masuratori biometrice la BestBeluga

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.

Între caracterele luate în studiu au fost puse în evidență puternice relații de corelație fiind identificate o serie de relații liniare sau de putere exprimate cu ajutorul ecuațiilor de regresie.

De asemenea, pentru cele trei generații de hibrizi din cele două locații (sistem creștere deschis și sistem închis, recirculant) s-au efectuat teste de comparație a mediilor valorilor diferitelor caractere în funcție de sistemul de producție. S-a observat astfel că media greutatea hibrizilor din loturile crescute în sistem deschis sunt mai mari comparativ cu cele crescute în sistem închis cu excepția lotului din 2014 unde s-au înregistrat valori medii ale greutății individuale semnificativ mai mari pentru lotul de la Rabagani. Este evident faptul că menținerea sturionilor în condiții relativ constante în ceea ce privește temperatura apei tehnologice (ferma Rabagani beneficiază de alimentare din sursa mezotermală) a permis obținerea, după 3 ani de creștere, unui spor de producție remarcabil, multe din exemplare depășind masa medie de 6kg.

Odată cu evaluarea morfometrică din fiecare lot experimental au fost selectate câte un esanțion de câte 10 exemplare de la care s-au prelevat probe de sânge (Foto 2) în vederea caracterizării profilului sanguin atât din punct de vedere hematologic cât și biochimic. Cu această ocazie au fost prelevate și probe de biochimie, în vederea evaluării calității carnii înainte și post iernare.



Foto 2. Prelevare probe de sânge din vena caudală

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.

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.

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.

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

- ✚ în ceea ce privește numărul de eritrocite nu au fost evidențiate modificări semnificative la comparația mediilor obținute pentru cele trei loturi experimentale. Așadar, analiza statistică nu a evidențiat diferențe notabile determinate de vârstă.
- ✚ 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 ($20,41 \pm 2,47$ %).
- ✚ 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.
- ✚ 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 rată a sintezei hemoglobinei diferită de cea a diviziunilor celulare care este mai redusă. În majoritatea situațiilor, HEM se corelează cu VEM.
- ✚ 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, T., 2008). Cu toate acestea, valorile proteinelor totale s-au încadrat în limitele normale pentru puietul de sturioni.
- ✚ 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; $p > 0,05$, $p = 0,064$).

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., Semenkova 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. Semenkova (2004) Serum levels of testosterone, 11-Ketotestosterone and oestradiol-17 β 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. Semenkova. (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., Martínez-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., Martínez-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., Iliiev, 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, Kuhn 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, 3rd 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., Miyanji 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.

Keyvanshokoo S., Gharaei A. (2010) A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture Research* 41(9): e1-e7.

Keyvanshokoo 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.

Keyvanshokoo 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, Hovannisyann Hrachya G. (2015) Measurements of serum steroid hormones (testosterone, 11-ketotestosterone, and 17 β -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 București

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., Díaz, 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., Patrino, 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, Björnsson 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., Mélard, 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 β - 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.