

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



**Etapa II. Analiza parametrilor optimi de creștere în acvacultură la Best beluga și implementarea protocoalelor moleculare și biochimice de analiză a acestora.**

## Activitati etapa II:

- ↻ *Activitatea II.1 Recoltare, transport și stocare de probe biologice.*
- ↻ *Activitatea II.2 Adaptarea și optimizarea protocoalelor de analiză a markerilor moleculari asociați cu calitatea cărnii și sexarea timpurie în concordanță cu panelul stabilit.*
- ↻ *Activitatea II.3 Analiza nivelurilor de expresie a genelor corelate cu determinarea sexului în țesuturi cu origine embrionară diferită la indivizi aparținând unor clase de vârstă diferite.*
- ↻ *Activitatea II.4 Analiza profilului hormonal prin determinarea cantitativă a steroizilor sexuali la hibridul monitorizat în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere.*
- ↻ *Activitatea II.5 Analiza prin secvențializare și identificarea polimorfismelor mononucleotidice existente la nivelul genelor corelate cu producția și calitatea cărnii.*
- ↻ *Activitatea II.6 Analiza calitativa a cărnii la hibridul monitorizat în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere.*
- ↻ *Activitatea II.7 Analiza stării de confort fiziologic prin analiza complexă la nivel hematologic la hibridul monitorizat în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere.*
- ↻ *Activitatea II.8 Analiza performanțelor productive în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere a hibridului.*
- ↻ *Activitatea II.9 Selecția reproducătorilor cu performanțe de creștere și adaptare superioare, din specia hibridă necesari pentru obținerea noilor loturi experimentale.*
- ↻ *Activitatea II.10 Realizarea reproducerii în vederea obținerii unui nou lot de Best Beluga.*
- ↻ *Activitatea II.11 Monitorizarea pe toată perioada de dezvoltare larvară și de creștere a parametrilor bioproductivi ai exponenților loturilor experimentale.*
- ↻ *Activitatea II.12 Diseminarea rezultatelor prin prezentarea la conferințe naționale și/sau internaționale, publicarea de articole științifice și completarea paginii web a proiectului.*

## REZUMAT

Sexarea este o problemă de mare importanță în acvacultura sturionilor și care necesită identificarea unor soluții eficiente. În funcție de specie, identificarea sexului indivizilor este posibilă la vârsta de aproximativ 4 ani prin diferite metode, dintre care cea mai precisă este metoda ecografică. Reducerea vârstei la care să fie posibilă identificarea sexului sturionilor ar permite separarea pe sexe și eliminarea din stoc a masculilor, ceea ce ar atrage după sine o reducere semnificativă a costurilor asociate cu hrana și maximizarea spațiului dedicat creșterii. Cele mai recente studii referitoare la sexarea sturionilor din acvacultură au fost orientate către identificarea unor gene candidate a căror expresie poate fi corelată cu determinismul sexului. Ca posibili markeri pentru identificarea sexului la sturioni au fost propuse următoarele gene: *ar* (implicată în dezvoltarea masculilor), *dmrt1* și *sox9* (controlează diferențierea testiculară), *wtl* (implicată în determinismul sexual la mascul), *foxl2* (marker al dezvoltării ovariene), *cyp17a* și *star* (afectează sinteza de hormoni androgeni), *lh* (codifică pentru gonadotropină) și *igfl* (implicată în dezvoltarea testiculară). Aceste gene prezintă un nivel de expresie ridicat în gonade, corelat cu diferențierea către unul dintre cele două sexe, dar s-a dovedit că se exprimă diferențiat și în alte țesuturi. În cadrul primei etape a proiectului a fost realizată analiza acestor markeri la hibridul Best beluga. Totodată, pentru a putea controla procesul de reproducere al sturionilor obținuți și crescuți în condiții de acvacultură este necesar să dispunem de informații legate de ciclul sexual, dezvoltarea gonadelor, precum și fluctuațiile hormonale asociate. Indiferent de procesul fiziologic ce este luat în considerare, de obicei în mecanismele de control și reglaj, sunt implicați și hormonii steroidieni. Astfel, cunoașterea profilului hormonal

al indivizilor cu vârste diferite, care fac parte din populația supusă selecției, prin determinarea concentrațiilor estradiolului (E2) și testosteronului (T), oferă indicații privind atât starea fiziologică a organismului animal, cât și asupra potențialului de identificare precoce al sexului. În aceasta etapă a proiectului s-au cuantificat hormonii steroidieni de la hibridii bester și Best beluga precum și de la speciile pure morun, cega, pastruga la diferite vârste. Printre practicile frecvent utilizate în acvacultura modernă se numără și selecția asistată de markeri (*Marker Assisted Selection*). 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 (salmonide, tilapia, ciprinide etc.) au fost stabiliți deja o serie de markeri ADN corelați cu producția și calitatea cărnii. Identificarea anumitor polimorfisme mononucleotidice SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) la nivelul genelor *myoD1*, *igf*, *capn3*, *mstn1a*, *mstn1b* sau *gh* a fost corelată cu o creștere a producției și calității cărnii, fiind corelată în special cu fermitatea fileului. O parte dintre acești markeri au fost analizați și în cazul hibridului de acvacultură Best beluga.

Pe lângă mecanismele fiziologice și de biologie moleculară implicate în determinarea prematură a sexului s-au urmărit și o serie de aspecte tehnologice în vederea identificării particularităților productive și caracterizării plasticității tehnologice la hibridul Best Beluga. Astfel, au fost demarate experimente tehnologice pilot în două sisteme de producție diferite, anume sisteme deschise de tip "flow-through" și sisteme recirculante, pentru doi hibridi obținuți din genitori de acvacultura: bester (B) și Best-beluga (BB).

### ***Activitatea II.1 Recoltare, transport și stocare de probe biologice.***

Pentru realizarea analizelor de biochimie, biologice moleculare, hematologie au fost prelevate probe de sânge și țesut.

**Recoltarea probelor de țesut** de la acipenseride se face după următorul protocol: **i.** o porțiune mică din înotătoarea anală este recoltată cu ajutorul unor foarfece, după curățarea prealabilă cu etanol 70%. Persoana care prelevează probele trebuie să aibă mânuși curate, fără mucus sau solzi. Foarfecele trebuie să fie curățate cu etanol 70% între două colectări succesive. **ii.** Fiecare probă de înotătoare va fi stocată separat în tuburi de plastic care conțin etanol de concentrație superioară (96-100%). Este foarte important ca întreaga porțiune de țesut să fie complet imersată în alcool și să nu fie expusă contactului cu aerul deoarece aceasta poate afecta calitatea ADN. Nu este necesar ca recipientul cu proba să fie ținut la temperaturi scăzute. **iii.** Fiecare tub se etichetează corespunzător cu informațiile care se referă la individ, specie, număr și data colectării probei.

**Recoltarea probelor de sânge** s-a realizat prin metoda puncției din vena caudală. Anterior recoltării probelor de sânge s-a procedat la anestezierea peștilor, cu soluție de 2-fenoxietanol. Sângele recoltat (1 mL) a fost distribuit în tuburi Ependorf hepariante în prealabil, pentru determinarea indicilor hematologici și a constantelor eritrocitare. Astfel, numărul de eritrocite s-a determinat prin diluția probelor cu lichid vulpian și numărarea cu hemocitometrul Neubauer, hemoglobina s-a determinat prin metoda colorimetrică cu reactiv Drabkin și citirea la spectrofotometru la o lungime de undă de 540 nm, iar hematocritul s-a determinat prin centrifugarea probelor de sânge timp de 5 minute la 12000 rotații/min, în tuburi microcapilare heparinizate

**Depozitarea** probelor este realizată astfel încât acestea să fie ferite de variații extreme de temperatură, la -20°C. Probele pot fi păstrate o perioadă îndelungată înainte de extracția ADN. Plasma provine din centrifugarea probelor de sânge prelevate cu ocazia campaniilor de teren, probe ce au fost menținute la -80 °C până la prelucrarea lor.

***Activitatea II.2 Adaptarea și optimizarea protocoalelor de analiză a markerilor moleculari asociați cu calitatea cărnii și sexarea timpurie în concordanță cu panelul stabilit. Activitatea II.3 Analiza nivelurilor de expresie a genelor corelate cu determinarea sexului în țesuturi cu origine embrionară diferită la indivizi aparținând unor clase de vârstă diferite. Activitatea II.5 Analiza prin secvențializare și identificarea polimorfismelor mononucleotidice existente la nivelul genelor corelate cu producția și calitatea cărnii.***

Principalii markeri moleculari analizați în vederea corelării cu sexarea timpurie și cu calitatea cărnii la hibridul de acvacultură Best beluga sunt prezentați în continuare:

- Gena *ar* (*androgen receptor*) are rol principal în diferențierea sexuală la masculi în cazul vertebratelor. Studii de expresie genică au fost realizate pentru *Acipenser baerii* arătând că gena este supraexprimată în cazul masculilor care trec prin procesul de diferențiere sexuală (Berbejillo et al., 2012).
- 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 la speciile de sturioni *Acipenser sinensis* și *Acipenser baerii* (Leng et al., 2016; Berbejillo et al., 2012; 2013).
- Gena *sox9* (*sex-determining region Y-box 9*) este implicată în cazul vertebratelor în diferențierea testiculelor. În cazul speciei *Acipenser baerii*, Berbejillo et al. (2012) au sugerat că această genă este posibil implicată în diferențierea testiculelor fiind supraexprimată aici față de ovare.
- Gena *wt1* (*wilms tumor 1*) este implicată în dezvoltarea sexuală la masculi și funcționează drept activator de transcriere (Shimamura et al., 1997).
- Gena *foxL2* (*forkhead box L2*) este exprimată în special în ovare și este implicată în sinteza de estrogeni. În cazul speciei *Scaphirhynchus platorynchus*, expresia acesteia este semnificativ mai mare pentru femele față de masculi (Amberg et al., 2010).
- Gena *cyp17A1* (*cytochrome P450 family 17 subfamily A polypeptide 1*) codifică pentru un factor de transcriere din celulele Leydig fiind implicată în dezvoltarea testiculelor. Gena prezintă expresie mai mare în cazul masculilor față de femele, fenomen observat pentru specia *Acipenser baerii* (Berbejillo et al., 2012).
- Gena *star* (*steroidogenic acute regulatory protein*) a fost studiată la sturionul siberian, autorii studiului observând o expresie mai ridicată la masculi decât la femele (Berbejillo et al., 2012).
- Gena *lh* (*luteinizing hormone*) codifică pentru subunitatea  $\beta$  a hormonului luteinizant și a fost studiată atât pentru specia *Acipenser gueldenstaedtii* (Hurvitz et al., 2005), cât și la *Acipenser baerii* (Berbejillo et al., 2012) ambele studii raportând o expresie mai ridicată în cazul masculilor față de femele.
- Gena *igf1* (*insulin-like growth factor 1*) a fost studiată pentru sturioni în cazul speciei *Acipenser baerii*, observându-se că în stadii incipiente ale gametogenezei aceasta este supraexprimată la masculi comparativ cu femelele (Berbejillo et al., 2012).

În cazul markerilor ADN asociați cu calitatea cărnii, s-a pornit de la studii efectuate pe alte specii cu importanță economică mare (salmonide, tilapia etc.). În cadrul acestor studii au fost identificați deja o serie de markeri ADN corelați cu o creștere a producției și calității cărnii, în special cu fermitatea fileului, cum ar fi genele *myoD1*, *igf*, *capn3*, *mstn1a*, *mstn1b* sau *gh* (Johansen și Overtuf, 2005; Chen et al., 2015).

#### **Optimizarea protoalelor și analiza markerilor ADN**

În vederea optimizării și analizei markerilor moleculari asociați cu calitatea cărnii, s-a realizat inițial extracția și purificarea ADN genomic din fragmente de țesut prelevate din înotoătoare anală de la hibridii de Best beluga. În acest scop, s-a utilizat protocolul clasic de izolare prin liză celulară cu pronază și sodium dodecil sulfat, digestia ARN cu ribonuclează, precipitarea proteinelor cu amestec fenol-clorofom și precipitarea ADN cu etanol absolut. S-a evaluat concentrația și puritatea probelor ADN genomic obținute prin metoda spectrofotometrică.

Ulterior s-a realizat desemnarea temperaturii optime de hibridizare a primerilor specifici unor secvențe din interiorul genelor *igf* și *gh*. Primerii au fost desemnați pentru specii pure de sturioni utilizând baza de date GenBank și s-a încercat utilizarea lor pentru hibridii Best beluga. Pentru a crește probabilitatea amplificării, au fost utilizați primeri degenerați. Secvențele primerilor și mărimea așteptată a ampliconilor obținuți prin PCR cu ajutorul acestora sunt prezentate în tabelul 1.

**Tabel 1.** Secvențele și mărimile estimate ale primerilor utilizați în analiza genelor corelate cu calitatea cărnii.

Denumire	Secvență	Mărimea estimată a ampliconilor (pb)
<b>GH 1 F</b>	5'-GRMCAAAAAGTGAAMRAATGGC-3'	491
<b>GH 1 R</b>	5'-TAGAACTTCCRAAACCNCCT-3'	
<b>GH 2 F</b>	5'-ATTGTGGCTCTCATGAGGA-3'	203
<b>GH 2 R</b>	5'-CTCYCCACAAAACGYCTGCA-3'	
<b>IGF 1A F</b>	5'-TGTCGAAAATGTCTGTGTAATGT-3'	356
<b>IGF 1A R</b>	5'-GTCAGGCACAGAACACACAG-3'	
<b>IGF 1B F</b>	5'-CTGTGTGTTCTGTGGCTGAC-3'	382
<b>IGF 1B R</b>	5'-GGTAGTTCCTGTTGCCTGTG-3'	
<b>IGF 2 F</b>	5'-CGAGAGCTGCAACGTTAACC-3'	661
<b>IGF 2 R</b>	5'-CTTGGGAGGGTGATGAGAGG-3'	

După etapa de optimizare a temperaturii de hibridizare a primerilor, au fost selectați pentru reacția de secvențiere primerii GH 2 (temperatură de hibridizare 54°C, ampliconul de 200 pb), IGF1B (temperatură de hibridizare 57°C, ampliconul de 382 pb) și IGF 2 (temperatura de hibridizare 51°C, ampliconul de 600 pb). Toate celelalte perechi de primeri nu au generat amplificări satisfăcătoare. Ampliconii obținuți pentru toți indivizii analizați, au fost purificați cu kitul Wizard SV Gel Purification System (Promega) conform instrucțiunilor producătorului și apoi supuși reacției de secvențiere folosind kitul Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies). Producții de amplificare au fost precipitați utilizând kitul BigDye XTerminator (Life Technologies).

În vederea optimizării și analizei ulterioare a nivelurilor de expresie a genelor corelate cu determinarea sexului în țesuturi cu origine embrionară diferită la indivizi de Best beluga aparținând unor clase de vârstă diferite, au fost colectate următoarele tipuri de probe: mușchi alb, ficat, rinichi, gonade și fragment de înotătoare anală. Indivizii aveau 21 de luni la momentul recoltării. Probele au fost prelevate în RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen), transportate la 4°C până în laborator și apoi transferate la -80°C în congelator.

*Izolarea de ARN total* pentru experimentele de expresie genică s-a realizat din fragmente de țesut de aproximativ 15 mg de la indivizi hibridi Best beluga folosind kitul RNeasy Mini Kit (Qiagen) și protocolul specific acestui kit pentru gonade, rinichi, ficat și înotătoare anală în timp ce pentru mușchi alb a fost utilizat kitul RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Digestia cu deoxiribonuclează a fost realizată utilizând kitul RNase-Free DNase Set (Qiagen).

După izolare s-a utilizat spectofotometrul BioSpec-Nano (Shimadzu) pentru determinarea concentrației și puritatea soluției de ARN total. De asemenea, după izolare, ARN total a fost evaluat din punct de vedere al integrității folosind kitul RNA 6000 Nano Kit (Agilent) și aparatul 2100 Bioanalyzer (Agilent).

După determinarea integrității ARN a fost realizată reacția de reverstranscriere folosind kitul iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad). Numai probele ARN având valoarea RIN (RNA Integrity Number) peste 8 au fost utilizate pentru reverstranscriere.

După revers transcriere s-a trecut la reacția qPCR pentru care a fost utilizat kitul iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Aparatul de qPCR a fost iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (BioRad), pentru care s-a utilizat programul prezentat în tabelul 2.

**Tabel 2.** Programul reacției Real-Time PCR.

Denaturare	Denaturare	Hibridizare	Extindere	Colectare date	Curba de topire
95°C 5 minute	95°C 30 secunde	58°C 30 secunde	72°C 30 secunde		
35 de cicluri					

Pentru curba de calibrare au fost utilizate 6 puncte cu diluții seriale diferite (1000 ng/reacție, 100 ng/reacție, 10 ng/reacție, 1 ng/reacție, 0,1 ng/reacție, 0,01 ng/reacție). Genele *β-actin*, *gapdh* și *ARNr28S* au fost alese drept gene de referință.

Pentru validarea markerilor moleculari s-au utilizat ampliconi din qPCR care au fost purificați și secvențializați. În vederea secvențializării ampliconilor ADNc se utilizează kitul BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Electroforeza capilară pentru fragmentele ADN se realizează în aparatul ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), obținându-se secvența corespunzătoare regiunii amplificate.

#### **Analiza datelor experimentale**

În vederea corelării markerilor ADN cu calitatea și cantitatea cărnii la hibridii de Best beluga, în urma reacției de secvențiere, secvențele rezultate au fost vizualizate cu programul BioEdit și comparate atât între ele, cât și cu secvențele existente în bazele de date (GenBank Database) pentru speciile pure. În urma analizei nu au fost observate polimorfisme care să poată fi asociate cu un ritm rapid de creștere sau cu o calitate superioară a cărnii.

În vederea analizei markerilor corelați cu sexarea timpurie, datele, reprezentate de curba de topire și de valorile Cq (Threshold Cycle), au fost obținute din programul aparatului iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Pentru calcularea nivelului de expresie ( $2^{-\Delta Cq}$  genă de interes) s-a utilizat media aritmetică a replicatelor tehnice și a celor biologice (Cq). Pentru normalizarea datelor am scăzut Cq genă de referință din Cq genă de interes (Vandesompele et al., 2002). Pentru calcul eficienței (E) reacției qPCR s-a utilizat formula  $E=10^{1/\text{pantă}-1}$ , iar observarea coeficientului de regresie (R2) a fost realizată prin raportarea valorilor din curba de calibrare față de Cq pentru fiecare punct din curbă. De asemenea, s-a testat setul de date ( $2^{-\Delta Cq}$  genă de interes)

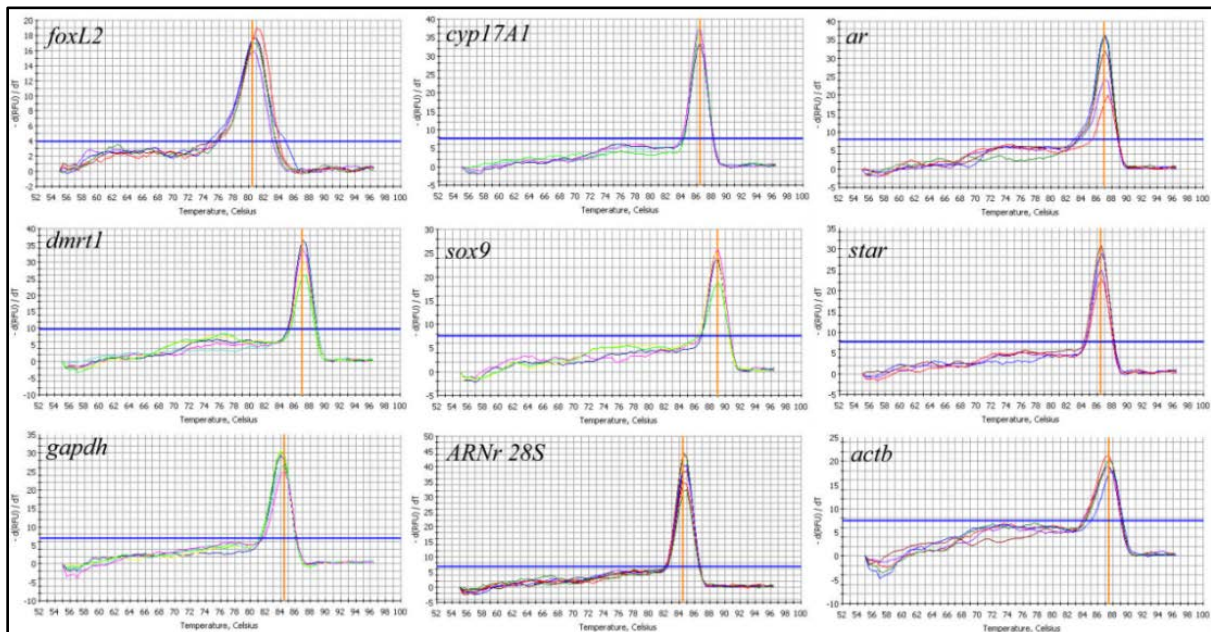
pentru tipul de distribuție folosind programul statistic IBM SPSS 19.0. Au fost observate rezultatele testului Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965; Razali & Wah, 2011) pentru tipul de distribuție al datelor. Rezultatele Cq pentru genele de referință au fost testate pentru stabilitate (expresie constitutivă în diferitele organe) folosind programele statistice geNorm 3 și NormFinder 20 (Andersen et al., 2004). Editarea și alinierea secvențelor catenelor sens și antisens se realizează cu programul BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.9 (Hall, 1999), în timp ce verificarea față de baze de date a fost realizată cu Blast NCBI.

**Valorile RIN.** Determinarea integrității ARN total este necesară în experimente de analiză a expresiei genice pentru verificarea calității matriței de ARN (Mueller et al., 2004). Valorile RIN pot varia între 1 (ARN degradat total) și 10 (ARN intact). O valoare bună pentru RIN este peste 7,5 ceea ce denotă integritate bună a moleculelor de ARN. Valorile RIN sunt calculate pe baza raportului între ARNr28S și ARNr18s, dar și pe baza întregii electroforegrame de ARN total (Mueller et al., 2004). Pentru toate probele extrase (gonade, mușchi alb, rinichi, înotătoare anală și ficat) s-au obținut valori RIN mai mari de 8.

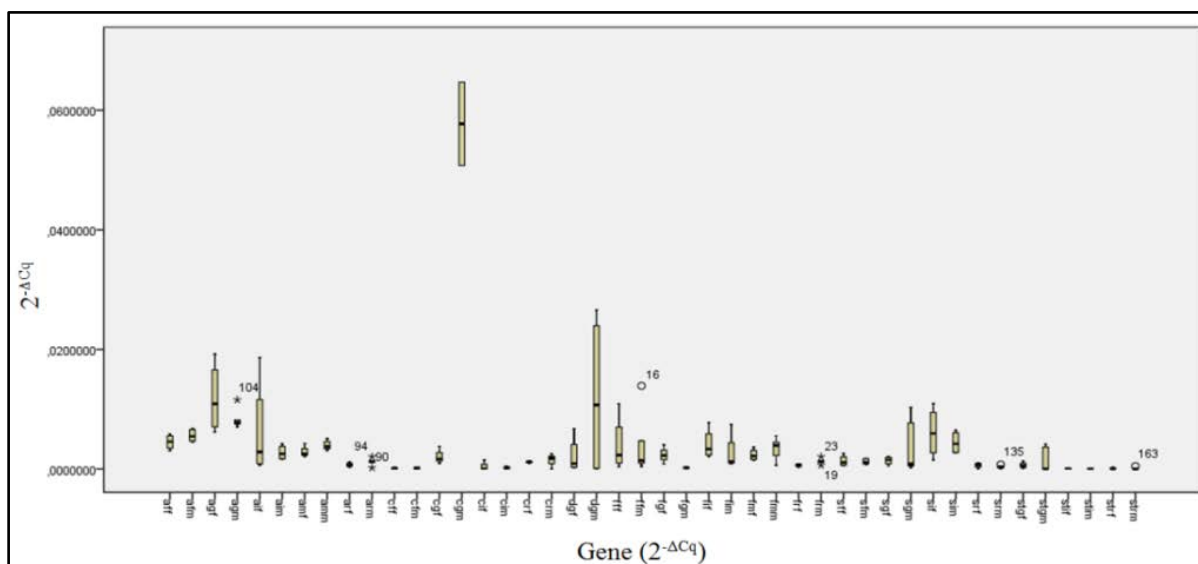
**Curba de topire.** Pentru verificarea specificității amplificării din timpul reacției de qPCR se poate observa curba de topire obținută pentru markerul de interes. Curba de topire este dată de modificarea în fluorescență ( $-\Delta F$ ) raportată la modificarea în temperatură ( $\Delta T$ ) pe ordonată și temperatură pe abscisă. În figura 1 se pot observa curbele de topire pentru markerii aleși pentru analiză: foxL2, ar, dmr1, sox9, cyp17A1, star, ARNr 28S,  $\beta$ -actin și gapdh. Toți aceștia prezintă amplificări specifice observându-se un singur semnal pe abscisă în dreptul temperaturii de topire.

**Curba de calibrare.** În urma analizei graficelor de amplificare pentru markerii de interes și pentru genele de referință utilizate s-a observat o eficiență bună de amplificare (valori cuprinse între 90% și 110%) concomitent cu o liniaritate bună dată de coeficientul de regresie R2 care prezintă valori peste 0,98. Calculul eficienței s-a realizat deoarece pentru a utiliza metoda  $2^{-\Delta Cq}$  pentru verificarea expresiei genice este important ca genele de referință și genele de interes să prezinte eficiențe de amplificare similare (Bustin et al., 2009).

**Caracteristicile setului de date.** Pentru ca t-test sau one-way ANOVA să fie utilizate în diferențierea dintre nivelul de expresie al markerilor de interes de la masculi și de la femele, setul de date trebuie să prezinte distribuție normală. Pentru a verifica acest lucru s-a utilizat testul Shapiro-Wilk care arată dacă setul de date deviază semnificativ de la o distribuție normală (Razali și Wah, 2011; Shapiro și Wilk 1965).



**Figura 1.** Curba de topire pentru markerii analizați. Pe ordonată este fluorescența raportată la temperatură ( $-\text{d(RFU)}/\text{dT}$ ), iar pe abscisă este prezentată temperatura în grade Celsius.



**Figura 2.** Histograma seturilor de date.

În tabelul 3 sunt prezentate valorile testului Shapiro-Wilk. S-a observat că majoritatea grupurilor de date nu deviază de la distribuție normală, acestea fiind simetrice, prin urmare s-a utilizat în analiza statistică testul one-way ANOVA pentru foxL2, cyp17A1, ar, sox9 și star și t-test pentru dmrt1.

**Tabel 3.** Testul Shapiro-Wilk.

Set	Organ	Sex	Valoare p Shapiro-Wilk
<i>ar</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )	ficat	♀	0,773
	ficat	♂	0,352
	gonade	♀	0,612
	gonade	♂	0,044*
	înotătoare anală	♀	0,076
	înotătoare anală	♂	0,304
	mușchi alb	♀	0,095
	mușchi alb	♂	0,662
	rinichi	♀	0,942
	rinichi	♂	0,555
<i>cyp17A1</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )	ficat	♀	0,139
	ficat	♂	0,58
	gonade	♀	0,513
	gonade	♂	
	înotătoare anală	♀	0,002*
	înotătoare anală	♂	0,124
	rinichi	♀	0,929
	rinichi	♂	0,57
<i>dmrt1</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )	gonade	♀	0,059
	gonade	♂	0,122
<i>foxL2</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )	ficat	♀	0,165
	ficat	♂	0,043*
	gonade	♀	0,878
	gonade	♂	0,78
	înotătoare anală	♀	0,298
	înotătoare anală	♂	0,008*
	mușchi alb	♀	0,625
	mușchi alb	♂	0,814

Set	Organ	Sex	Valoare p Shapiro-Wilk
<i>sox9</i> (2 <sup>-ΔCq</sup> )	rinichi	♀	0,361
	rinichi	♂	0,624
	ficat	♀	0,379
	ficat	♂	0,422
	gonade	♀	0,632
	gonade	♂	0,069
	înotătoare anală	♀	0,836
	înotătoare anală	♂	0,203
<i>star</i> (2 <sup>-ΔCq</sup> )	rinichi	♀	0,637
	rinichi	♂	0,578
	gonade	♀	0,623
	gonade	♂	0,016*
	înotătoare anală	♀	0,079
	înotătoare anală	♂	0,242
	rinichi	♀	0,01*
	rinichi	♂	0,05

Evaluarea genelor de referință. Pentru testul de stabilitate, realizat utilizând NormFinder 20, gena de referință cu cel mai bun scor este *β-actină*, iar combinația cea mai bună de două gene este *gapdh - ARNr 28S*, aceasta având un scor de stabilitate mai bun decât gena *β-actină*. Pentru gene de referință s-a utilizat media aritmetică a tuturor celor trei investigate.

Validarea genelor prin secvențializare. Din secvențializarea markerilor investigați s-a observat obținerea unor secvențe similare cu cele deja introduse în bazele de date și corelate cu genele de interes. În tabelul 4 se observă o identitate bună și o acoperire de aproape 100% a secvenței markerilor pentru hibridul Best beluga față de secvențe deja existente în baze de date.

**Tabel 4.** Rezultatele interogării bazei de date GenBank pentru markerii utilizați în studiul hibridului Best beluga.

Marker	Amplicon	Specia	Identitate	GenBank
<i>ar</i>	197 pb	<i>Acipenser ruthenus x Huso huso</i>	99%	AB213020
<i>dmrt1</i>	129 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420684
<i>sox9</i>	115 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420685
<i>foxl2</i>	120 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420686
<i>cyp17a1</i>	134 pb	<i>Huso huso</i>	100%	KM280570
<i>star</i>	111 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420679
<i>ARNr 28S</i>	160 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420680
<i>β-actină</i>	161 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420681
<i>gapdh</i>	114 pb	<i>Acipenser stellatus</i>	100%	KX420682

Analiza rezultatelor: În cazul studiului efectuat, pentru mușchi alb se observă că nu a fost detectată expresia genelor *cyp17A1 star, dmrt1* și *sox9* în timp ce expresia genelor *foxL2* și *ar* este prezentă. Diferențele dintre expresiile genelor la masculi și femele în cazul acestui organ sunt ne semnificative statistic.

De asemenea, nu s-a detectat expresia genelor *foxL2, cyp17A1, ar* și *sox9* în cazul ficatului. Nu a fost detectată expresia genelor *dmrt1* și *star*. Nu au fost observate diferențe statistic semnificative între masculi și femele din punct de vedere al expresiei markerilor.

În cazul rinichiului s-a detectat expresia genelor *foxL2, cyp17A1, ar, sox9* și *star*, însă nu a fost detectată expresia genei *dmrt1*. Nu au fost observate diferențe statistic semnificative între masculi și femele din punct de vedere al expresiei markerilor.

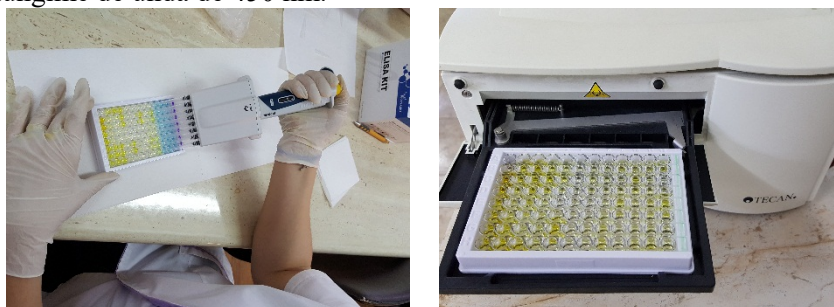
Pentru gonade se observă că gena *foxL2* nu prezintă diferențe semnificative între femele și masculi, la fel ca și pentru *ar, dmrt1, sox9* și *star* în timp ce pentru *cyp17A1* se observă diferențe semnificative, observându-se că în cazul masculilor expresia este mai ridicată. A fost observată expresia genelor *foxL2, cyp17A1, ar, sox9* și *star* în



cazul înotătoarei anale, dar nu și expresia genei dmrt1. Nu au fost observate diferențe statistic semnificative între masculi și femele din punct de vedere al expresiei markerilor.

#### A.II.4 Analiza profilului hormonal prin determinarea cantitativă a steroizilor sexuali la hibridul monitorizat în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere

Determinările au fost realizate prin tehnica ELISA (engl. "Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay") care este o metodă de dozare imunoenzimatică ce permite detectarea prezentei unui anticorp sau a unui antigen dintr-o probă de analizat. În cazul studiului nostru, dozajul ELISA pentru ambii hormoni steroidieni a fost de tip competitiv între antigenul reprezentat de hormonul fixat în pereții godeurilor plăcii de microtitrare conjugat cu traserul enzimatic (peroxidaza HPR) și antigenul reprezentat de hormonul liber din probă (eșantioanele de analizat). Dozajul s-a realizat după parcurgerea următoarelor etape: interiorul godeurilor microplăcii este grefat cu o concentrație atent titrată de anticorpi cunoscuți (engl. "goat-anti rabbit antibody") pentru antigenul (Ag) de dozat; antigenii Ag din proba și Ag comercial marcat ("conjugată") cu enzimă HPR (engl. "horseradish peroxidase") concurează pentru numărul limitat de situsuri de anticorpi Ac imobilizați pe pereții godeurilor; după îndepărtarea conjugatului se adaugă substratul cromogen; produsul colorat rezultat în urma reacției este invers proporțional cu cantitatea de Ag din proba. Probele au fost analizate în duplicat. Reacția colorată, descrisă anterior, de la nivelul godeurilor plăcii este „tradusă” în densități optice (DO) la un lector de plăci automat, tip Sunrise Tecan (Figura 3). Absorbanta obținută este direct proporțională cu cantitatea de anticorp Ag grefat și invers proporțională cu Ag pe care vrem să îl dozăm (cu cât sunt mai multe molecule de Ag libere cu atât reacția va fi mai puțin colorată), deci colorația este invers proporțională cu cantitatea de Ag prezentă în eșantion. Citirea s-a făcut la o lungime de undă de 450 nm.



**Figura 3.** Opiria reacției enzimice și citirea plăcilor din dozajele ELISA pentru E2 și T, la lectorul de plăci Sunrise, Tecan (foto original)

Trasarea curbei etalon și calcularea concentrațiilor de hormoni s-a realizat după determinarea prin calcul a densităților optice citite pentru cele două duplicate ale probei pe godeurile probei și extragerea valorii mediei determinate pentru blankul de reacție din absorbantele celorlalte orificii. Curba etalon s-a trasat folosind softul "Curve Expert" 1.3 și softul Ms Office Excel. Folosind ecuația de regresie, extrapolăm calculul la celelalte valori de absorbantă citite și determinăm concentrațiile probelor pentru E2 (pg/mL) și T (ng/mL).

Datele obținute în studiul nostru, confirmă faptul că sturionii prezintă o plasticitate enormă în ceea ce privește determinarea și diferențierea sexuală, mai ales în prima perioadă de viață când gonada nu este clar diferențiată din punct de vedere morfologic într-un ovar sau testicul. Analizând exemplarele imature de hibridi (20 luni, respectiv 32 luni), se observă faptul că valorile pentru cei doi hormoni se încadrează în intervale de variație similare la cele două grupe de vârstă, observându-se doar o ușoară descreștere a valorii medii calculate la testosteron pentru grupul în vârstă de 32 luni. Comparând cu literatura de specialitate, valorile determinate se apropie de intervalul de variație găsit de Petoichi & all. (2011) la hibridul imatur (*A. naccarii x A. baerii*), Hurvitz & all., (2008) la imaturii de *A. gueldenstaedti* pentru E (pg/mL).

Se observă o mai mare similitudine în ceea ce privește concentrațiile înregistrate pentru testosteron în această etapă de viață, ecartul de variație fiind similar cu valorile găsite de Barannikova & all., 2008 la *Acipenser gueldenstaedti* (stadiile II de dezvoltare a gonade), Mola & all., 2015 pentru imaturii de *Huso huso*, Petoichi & all. (2011) la hibridul imatur (*A. naccarii x A. baerii*) și Hao Dua & all., 2017 la *Acipenser sinensis*.

În cazul loturilor de reproducători analizate de la nivelul fermei, estradiolul la femelele de bester a înregistrat valori în ecartul de variație  $319, 975 \div 1158, 235$  pg/mL, comparabile cu cele găsite de Amiri & all. (1999) la femelele mature de bester. Încurajator este faptul că și la celelalte specii din loturile partenerului industrial,

femelele prezintă o bună dinamică a acestui hormon, valoarea medie găsită la femelele de păstrugă 245,712±50,635 fiind apropiată limitei minime a valorilor raportate de Barannikova & all., 2002, Ceapa & all., 2002 la femelele speciei *A. stellatus* aflate, posibil, la începutul migrației de reproducere. În cazul probelor analizate la loturile de exemplare mature, se observă că testosteronul la masculul matur de bester are valori mai mici decât cele indicate de literatura de specialitate, apropiindu-se de pragul inferior al intervalului de variație găsit la specia *A. gueldenstaedtii* (Barannikova & all., 2003), respectiv la *A. stellatus* (Barannikova & all., 2002). Același profil descendent este înregistrat și la masculii de păstrugă și cegă, valori similare fiind totuși întâlnite la masculii maturi de *A. sinensis* (Hao Dua & all., 2017). Ținând cont de importanța hormonilor steroidieni în activitatea fiziologică a organismului, considerăm că dozarea acestor hormoni sexuali din plasma sanguină a sturionilor în cazul populațiilor ce fac obiectul programului de selecție în vederea ameliorării genetice ar permite realizarea unui tablou complex al însușirilor cu totul particulare grupului de pești pe care se focusează selecția.

#### **A.II.6 Analiza calitativa a cărnii la hibridul monitorizat în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere (P2).**

Creșterea peștilor poate fi influențată de numeroși factori printre care se numără hrana, spațiul tehnologic, temperatura, salinitatea, activitatea fizică, etc. Peștii sunt animale poichiloterme și, din acest motiv, fiziologia lor este direct influențată de modificările factorilor mediali (Weatherly și Gill, 1987 citați de Pennell și Barton, 1996). Dinamica creșterii peștilor este condiționată de o serie de variabile ce pot induce modificări de lungime sau modificări ale altor dimensiuni fizice, incluzând volumul, masa sau chiar structura diferitelor organe și țesuturi și, nu în ultimul rând, conținutul de proteine, lipide sau alți constituenți chimici. De asemenea, creșterea poate fi corelată cu modificările numerice la nivelul populației (Weatherly și Gill, 1987 citați de Pennell și Barton, 1996). Compoziția biochimică este, în general, un bun indicator al stării fiziologice a peștilor. Parametrii biochimici ușor cuantificabili ce reflectă starea fiziologică a peștilor sunt reprezentați de: conținutul în proteine, conținutul în lipide, umiditatea și conținutul în minerale (cenușa). Carbohidrații și compușii neproteici se găsesc în cantități neglijabile și sunt ignorați în analiza stării de întreținere (Cui și Wootton, 1988 citat de Ali M. și col., 2005). Conținutul de apă este de obicei cel mai bun indicator al conținutului energetic, un procent ridicat al umidității fiind corelat cu o mai proastă stare de întreținere și, deci un procent mai mic de proteine și lipide (Dempson, 2004).

Pentru a caracteriza starea de întreținere a hibridilor au fost efectuate analize biochimice la carnea hibridului Best beluga (tabelul 5). Așa cum se poate observa, cu excepția lipidelor, nu au fost găsite diferențe semnificative în ce ce privește conținutul de proteine, apa sau substanța uscată între masculii și femele. Astfel, valoarea medie a lipidelor a fost de 6,21 ±1,20 pentru masculii și de 7,41 ±1,73 pentru femele.

**Tabel 5 . Compoziția biochimică la hibridul Best beluga**

<i>Sex</i>	<i>Media</i>	<i>Lt (cm)</i>	<i>Masa (g)</i>	<i>Apa</i>	<i>Cenușa</i>	<i>Lipide</i>	<i>Proteina/uscat</i>	<i>SU</i>
<i>Masculi</i>	<i>Media</i>	56,80	873,00	74,81	1,05	6,21*	17,78	25,19
	<i>STD</i>	2,32	69,60	0,90	0,03	1,20	0,53	0,90
<i>Femele</i>	<i>Media</i>	55,20	812,50	74,06	1,00	7,41*	17,79	25,94
	<i>STD</i>	1,69	134,67	1,78	0,06	1,73	0,83	1,78

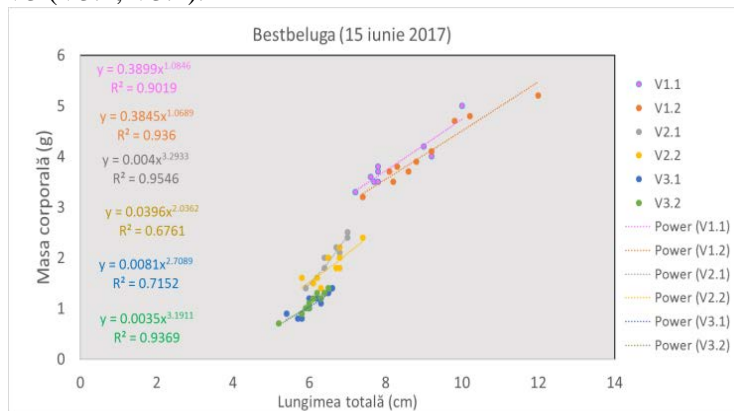
Valori asemănătoare au fost găsite de Wedekind (2002) care a găsit în în carnea de bester (3,5 kg) un conținut lipidic de 6,3% și proteina de 18,3%. Wedekind nu a găsit nici o relație între sex și compoziția și calitatea cărnii. Badiani și colab. (1996; 1997) a găsit o compoziția apropiată a cărnii și la alte specii de sturioni crescuți în condiții de acvacultura (*A. transmontanus*, *A. naccarii* și *A. baerii*). Astfel, conținutul de proteine, lipide și cenușă (pe 100 g greutate umedă) a fost de 19,2 g, 7,6 g și 1,1 g, nefiind raportate diferențe între cele trei specii. Greutatea corporală a acestor pești era de peste patru kg. Jankowska et al. (2002) au descoperit niveluri mai mari de lipide (9,5%) în carnea de sturion siberian decât în hibridii acestuia (6,4%). Conținutul mai scăzut de lipide a fost compensat de un conținut mai mare de apă (77,4%) și proteine (15,2%).

**A.II.8 Analiza performanțelor productive în raport cu ipotezele asumate privind condițiile de creștere a hibridului. A.II.9 Selecția reproducătorilor cu performanțe de creștere și adaptare superioare, din specia hibridă necesari pentru obținerea noilor loturi experimentale. A.II.10 Realizarea reproducerii în vederea obținerii unui nou lot de Best beluga. A.II.11 Monitorizarea pe toată perioada de dezvoltare larvară și de creștere a parametrilor bioproductivi ai exponenților loturilor experimentale.**

Campania de reproducere artificială a debutat la începutul lunii aprilie 2017 și s-a desfășurat în cadrul fermei sturionice din localitatea Horia (Danube Research Consulting SRL). Exemplarele utilizate la reproducere, femele (bester, cega) și masculi (bester, morun), au fost sănătoase, bine dezvoltate și fără nici un fel de traumatisme, cu un dimorfism sexual bine exprimat ce indică diferențierea sexuală, sugerând faptul că sunt apte pentru a fi utilizate la reproducere. P

La 7 zile după eclozare, aproximativ 50% din larve au început să înoată activ, moment în care s-a început administrarea hranei. Pentru ca adaptarea la furaje prestarter, cu un conținut ridicat de proteină, să se facă cu pierderi minime, s-a aplicat un protocol de hranire progresiv ce a urmărit trecerea treptată de la hrănirea exclusiv cu zooplantacton (în primele 5 zile când s-a administrat 40% BW1/zi la dieta formulată) la hrănire mixtă de zooplantacton și organisme bentonice -tubifex (în următoarele 4 zile) și exclusiv tubifex până la 12 zile. Din a 13-a zi s-a introdus treptat furajul, inițial în proporție de 3%, la fiecare 3 zile dublând proporția în detrimentul hranei naturale. Astfel la 45 de zile puii de bester și cei de Best beluga au fost trecuți exclusiv pe furaj. Pe perioada organogenezei, și deci a dezvoltării larvare pierderile au fost de aproximativ 15%.

**Creșterea în sistem închis.** Pentru determinarea performanței de creștere și a eficienței productive a hibridului BB – Best beluga (Huso huso x Bester (Huso huso x A. ruthenus)) în primele stadii de creștere, în data de 16 iunie 2017, a fost demarat un studiu experimental în care s-au utilizat 219 exemplare hibridizate cu masa individuală cuprinsă între 0,7 – 5,2 g/ex. Studiul a fost realizat în cadrul unui sistem recirculant pilot ce a asigurat satisfacerea cerințelor mediale specifice sturionilor. La începutul perioadei experimentale, materialul biologic a fost sortat în funcție de valoarea masei corporale individuale, în trei clase de marime, astfel: V1 (3,2 – 5,2g), V2 (1,4 – 2,5g) și respectiv, V3 (0,7-1,4g). Fiecare clasă de marime a fost divizată în două loturi experimentale omogene ( $p > 0,05$ ), asigurându-se astfel un design experimental în duplicat V1 (V1.1., V1.2), V2 (V2.1, V2.2) și V3 (V3.1, V3.2).



**Figura 6.** Regresii lungime-greutate pentru diferitele clase de marimi la începutul experimentului

Pentru a minimaliza efectele induse de creșterea gradului de heterogenitate în rândul exemplarelor de Best beluga, după o perioadă de 20 zile de la începutul experimentului biomasa piscicolă este regrădată pe două clase de mărimi (VA: 25,8 – 32,8g, respectiv VB: 7,3 – 16,8g) și drept urmare, un număr de 183 exemplare best beluga se redistribuie în cadrul a două variante experimentale, în triplicat (Tab. 1), astfel: VA (VA1, VA2, VA3) și VB (VB1, VB2, VB3). De-a lungul celor 28 zile ale perioadei experimentale, exemplarele au fost hrănite ad libitum, cu furaj de granulație 0,5mm, 56% proteină brută, 15% lipide (primele 20 zile), respectiv 1mm, 54%

proteină brută, 20% lipide (ultimele 8 zile). Performanța creșterii hibridului Best beluga este succint prezentată prin intermediul indicatorilor tehnologici sumarizați în tabelul 7. Astfel, atât la inițierea experimentului, cât și după redistribuire, nu s-au înregistrat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între duplicatele/triplicatele fiecăreia din cele trei (V1, V2, V3) / două (VA, VB) variante experimentale, în ceea ce privește masa și lungimea corporală a exemplarelor de bestbeluga, omogenitatea loturilor formate fiind probată din punct de vedere statistic (testul Levene: -  $p > 0,05$ ). Verificarea reprezentativității mediei variabilelor analizate s-a realizat prin intermediul coeficientului de variație. Coeficientul de variație a masei corporale (CVM) are un grad de semnificație însemnat în cadrul analizei gradului de omogenitate/heterogenitate la nivelul populației piscicole. Astfel, luând în

<sup>1</sup> BW- Greutate corporala (Body Weight)

considerare prima parte a perioadei experimentale (primele 20 zile), se observă o evoluție descendentă a CVM în cazul fiecărei din cele trei variante (V1, V2, V3), fapt ce denotă o creștere a omogenității loturilor experimentale, urmare a capacității ridicate de recuperare nutrițională a indivizilor cu biomasă corporală situată sub media grupului. De asemenea, la finalul primelor 20 zile ale perioadei experimentale se constată o relație inversă între biomasa individuală medie a materialului biologic din cadrul variantelor testate și heterogenitatea lotului de hibrizi din cadrul acestora.

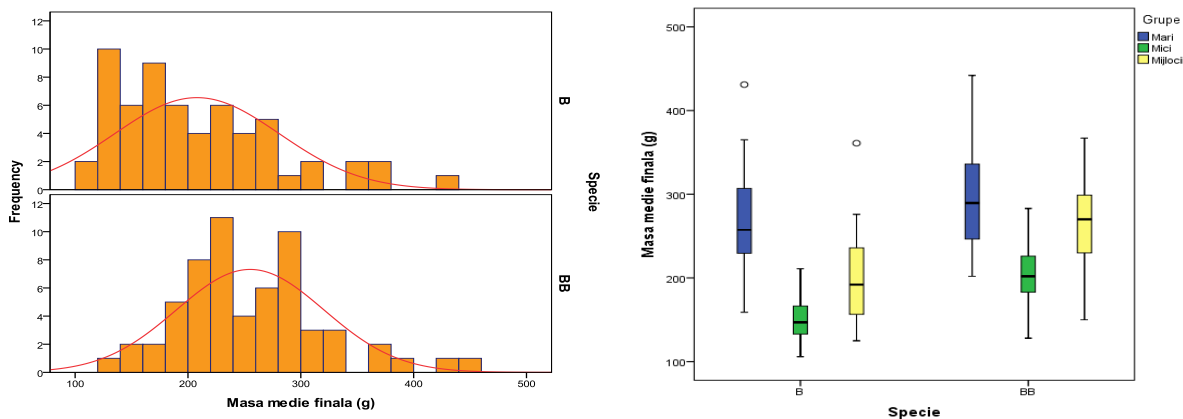
Drept urmare, odată cu creșterea în biomasă a hibrizilor, are loc o intensificare a competiției între indivizii aceluiși lot, în vederea consumului de hrană. Acest lucru este confirmat în partea a doua a experimentului (ultimele 8 zile), unde se observă o creștere însemnată a valorilor CVM în cazul variantei cu cea mai mare medie a biomasei individuale a exemplarelor (VA). Tabloul sintetic al indicatorilor de performanță a creșterii indică rezultate mai bune ale sporului individual de creștere în dreptul V1, comparativ cu V2 și V3. În condițiile în care diferențele în ceea ce privește valorile ratei relative de creștere (RGR), asociată fiecăreia dintre cele trei variante amintite anterior, sunt foarte apropiate, valorile superioare ale sporului individual de creștere din dreptul V1 sunt argumentate de biomasa individuală superioară a exemplarelor acestei variante în momentul începerii perioadei experimentale.

După cea de-a doua parte a perioadei experimentale, valorile sporului individual de creștere înregistrat în dreptul fiecăreia din cele două variante experimentale (VA, respectiv VB) au fost apropiate, însă valorile superioare ale RGR din dreptul VB evidențiază o performanță de creștere superioară pentru exemplarele acestei variante, fapt justificat de activitatea metabolică superioară a acestora, indusă de necesitatea de recuperare nutrițională. Randamentul utilizării hranei, exprimat prin factorul de conversie a furajului (FCR), este mai bun în cazul variantei experimentale V3, fiind urmată de V2 și V1. Se observă același randament superior de utilizare a hranei, aferent variantele cu biomasă individuală mai mică, și în cazul celei de-a doua părți a perioadei experimentale, unde valori mai mari ale FCR sunt înregistrate în dreptul VA, comparativ cu VB.

În cazul prezentului experiment, starea de condiție a biomasei sturionice a fost evaluată cu ajutorul factorului alometric de condiție  $F$  ( $F=W/L^b$ , unde „b” este un exponent alometric determinat experimental). Se constată valori ale exponentului alometric „b” mai mici de 3 unități, fapt ce indică o creștere alometrică negativă, mai rapidă în lungime a materialului sturionicol, decât cea în masa.

În urma analizei comparative a variantelor experimentale corespunzătoare lotului de hibrizi Best belugase constată o valoare medie a factorului alometric de condiție, superioară în cazul VB, comparativ cu VA, sugerând o creștere izometrică în cazul variantei VB și o creștere alometrică negativă în cazul VA. Starea de condiție inițială mai bună, consemnată astfel în varianta VB, coroborat cu talia inițială mai mică, a reprezentat un argument pentru rezultatele mai bune obținute în cazul tuturor indicatorilor tehnologici înregistrați. Așadar, se poate semnala o robustețe apreciabilă în cazul exemplarelor variantei VB, comparativ cu VA, ceea ce confirmă influența pozitivă a sortării și respectiv, redistribuirii materialului biologic, asupra capacității acestuia de a recupera deficitul de biomasă. Totodată, s-a observat că, la talii mai mari, competiția la hrană este mai accentuată, fapt ce induce o heterogenitate intragrup mai pronunțată, și deci segregarea în cohorte performante din punct de vedere tehnologic (30% din populație) și subclase mai puțin competitive, ceea ce, impune separarea lor din lot, ca condiție de recuperare a unui număr cât mai mare de indivizi.

**Cresterea în sistem deschis.** În paralel cu experimentul de creștere a hibridului BB în sistem recirculant a fost demarat un experiment de creștere în sistem deschis a hibrizilor bester și BB. Astfel, în bazine din PP cu volumul de 400 l, au fost populate, în câte 3 variante experimentale (3 clase de marimi: CM1, CM2 și CM3), în duplicat, câte 50 ex./bazin cu masa medie de 40,06 ±1,29 g; 22,58±1,35g, respectiv 4,14±0,77 g pentru hibridul bester și masa medie de 43,4±1,02g/ex, 19,72±0,71 g/ex, respectiv 3,05±0,77g/ex. pentru hibridul bestbeluga. Experimentul a fost derulat în perioada 4.07-12.09.2017 timp în care s-a administrat 2 tipuri de furaje comerciale cu 50% proteina (1-1,5mm) și 40% proteina (2mm). La finalul experimentului pestii au fost cântăriți și măsurați în vederea cuantificării performanței tehnologice. De asemenea, au fost recoltate probe de sânge pentru evaluarea stării de sănătate.



**Figura 7.** Distribuția pentru diferitele clase de marimi la finalul experimentului (stânga – histograme reprezentând distribuția greutății pentru cele două specii; dreapta – grafic de tip ”box and whiskers” reprezentând distribuția pentru toate variantele experimentale)

După 70 de zile experimentale se poate concluziona că hibridii de Best beluga au performat ușor mai bine decât cei de bester în special pentru clasele mici de talie. Astfel masa medie finală pentru hibridul bester a fost de  $272,00 \pm 67,14$ ;  $201,25 \pm 59,48$  g/ex, respectiv  $150,70 \pm 27,51$  g/ex., pentru CM1, CM2, respectiv CM3 în timp ce, pentru Best beluga s-a înregistrat mase medii de  $298,25 \pm 67,72$  g/ex.,  $262,90 \pm 49,87$  g/ex., respectiv  $204,20 \pm 38,29$  g/ex. pentru CM1, CM2, respectiv CM3. Variabilitatea în cadrul loturilor a fost ușor mai mare pentru bestbeluga, coeficientul de variație a masei individuale (CVM) înregistrând valori cuprinse între 16-22% (valorile mai mari fiind observate pentru loturile din CM1), în timp ce, pentru bester CVM a înregistrat valori de până la 29% , pentru CM1. Distribuția valorilor maselor individuale finale se poate observa și din graficele din figura 7.

În ceea ce privește performanța tehnologică a celor doi hibridi, în condițiile creșterii în sistem deschis de tip ”flow-through”, se poate spune că nu au fost observate diferențe notabile între valorile SGR pentru loturile CM1, fiind însă remarcate valori ușor superioare ale acestor indicatori pentru clasele mici și intermediare. Valorile DGR, pentru CM1, au fost de 2,87 și 2,09 g/kg/zi pentru bestbeluga, respectiv bester, valorile pentru CM2 au fost de 3,47 pentru Best beluga și 2,55 g/kgcorp/zi pentru bester în timp ce, pentru clasa CM3 valorile DGR au fost de 2,87 g/kg/zi pentru Best beluga și 2,09 g/kg/zi pentru bester. Se observă, de asemenea, faptul că, în cazul hibridilor Best beluga indicatorii de eficiență nutrițională (factorul de conversie a hranei-FCR și raportul de eficiență proteică-PER) au înregistrat valori mai bune decât în cazul hibridilor bester.

Prin prelevarea probelor de sânge s-a urmărit aprecierea stării de sănătate exprimată prin indicii hematologici pentru diferitele clase de mărime a puietului de bester și bestbeluga, crescut în condițiile unui sistem de producție deschis. Prelevarea sângelui s-a realizat prin metoda puncției din vena caudală, care constă în introducerea acului seringii pe direcția situată în spatele înotătoarei caudale. Anterior recoltării probelor de sânge s-a procedat la anestezierea peștilor, cu soluție de 2-fenoxietanol (1mL la trei litri de apă) (Svoboda și colab.,1999).Sângele recoltat (1 mL) a fost distribuit în tuburi Ependorf hepariante în prealabil, pentru determinarea indicilor hematologici și a constantelor eritrocitare. Astfel, numărul de eritrocite s-a determinat prin diluția probelor cu lichid vulpian și numărarea cu hemocitometrul Neubauer, hemoglobina s-a determinat prin metoda colorimetrică cu reactiv Drabkin și citirea la spectrofotometru la o lungime de undă de 540 nm, iar hematocritul s-a determinat prin centrifugarea probelor de sânge timp de 5 minute la 12000 rotații/min, în tuburi microcapilare heparinizate. Volumul mediu corporal (MCV,  $\mu\text{m}^3$ ) hemoglobina medie (MCH, pg) și hemoglobina corporală medie (MCHC, g dL<sup>-1</sup>) au fost calculate în conformitate cu Ghergariu și colab., 1985 și Svobodova, 2001.

Analizând valorile obținute la finalul perioadei experimentale s-au constatat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,026$ ) au fost înregistrate în ceea ce privește *concentrația de hemoglobină*, valorile medii obținute pentru besterul de talie mare ( $7,72 \pm 1,33$ g/dl) fiind semnificativ mai ridicate față de cantitatea de hemoglobină înregistrată pentru bestebeluga ( $6,60 \pm 0,74$  g/dl) de talie mare; în ceea ce privește talia mijlocie și talia mică de bester și Best beluga nu au fost evidențiate diferențe semnificative ale concentrației de hemoglobină ( $p > 0,05$ ;  $p = 0,429$ ). *Hematocritului* nu a înregistrat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) pentru talia mare, mijlocie sau mică ( $p = 0,321$ ;  $p = 0,60$ ;  $p = 0,08$ ), observându-se totuși valori ușor mai scăzute în cazul taliei mici de bester ( $18,59 \pm 3,09\%$ ). În ceea ce privește *numărul de eritrocite* nu au fost evidențiate modificări semnificative

( $p > 0,05$ ) pentru talia mare, mijlocie sau mică ( $p = 0,909$ ;  $p = 0,07$ ;  $p = 0,296$ ). Cu toate acestea, valori ușor mai scăzute au fost înregistrate în cazul taliei mici de bester ( $0,46 \pm 0,21 \times 10^6 / \mu\text{l}$  sânge), acestea fiind ușor sub ecartul optim pentru sturioni. De asemenea, *volumul eritrocitar mediu (VEM)* nu a înregistrat modificări semnificative ( $p > 0,05$ ) pentru talia mare, mijlocie sau mică de bester, Best beluga și nisteru ( $p = 0,743$ ;  $p = 0,590$ ;  $p = 0,308$ ), valori ușor mai crescute fiind obținute pentru talia mică de bester ( $559,57 \pm 244,89 \mu\text{m}^3$ ). *Valorile hemoglobinei eritrocitare medii (HEM)*, care reprezintă conținutul mediu de hemoglobină pe eritrocit, precum și *valorile concentrației eritrocitare medii de hemoglobină (CHEM)*, ce măsoară raportul dintre masa de hemoglobină și volumul de eritrocite, nu au înregistrat modificări semnificative ( $p > 0,05$ ) pentru talia mare, mijlocie sau mică de bester și bestbeluga.

**Activitatea II.12 Diseminarea rezultatelor prin prezentarea la conferințe naționale și/sau internaționale, publicarea de articole științifice și completarea paginii web a proiectului.**

**Cărți la edituri naționale**

1. Biologia și genetica sturionilor de Dunăre: aplicații în acvacultură și conservare, Coordonatori: M. Costache și V. Cristea, Editura Universității din București, București, România, 2017, ISBN 978-606-16-0857-7.

**Capitole de carte la edituri naționale**

1. Biologia și genetica sturionilor, A. Dudu, M. Maoreanu, S.E. Georgescu, p. 11-68, În "Biologia și genetica sturionilor de Dunăre: aplicații în acvacultură și conservare", Editura Universității din București, 2017, ISBN 978-606-16-0857-7.

2. Filogenia și istoria evolutivă a sturionilor, A. Dudu, M. Costache, S.E. Georgescu, p. 69-92, În "Biologia și genetica sturionilor de Dunăre: aplicații în acvacultură și conservare", Editura Univ. din București, 2017, ISBN 978-606-16-0857-7.

3. Analize moleculare la speciile de sturioni din Dunăre, A. Dudu, M. Costache, S.E. Georgescu, p. 93-156, În "Biologia și genetica sturionilor de Dunăre: aplicații în acvacultură și conservare", Editura Universității din București, 2017, ISBN 978-606-16-0857-7.

4. Tehnologii generale de creștere și reproducere a sturionilor, L. Dediu, M. Maoreanu, p. 157-198, În "Biologia și genetica sturionilor de Dunăre: aplicații în acvacultură și conservare", Editura Univ. din București, 2017, ISBN 978-606-16-0857-7.

5. Aspecte privind hematologia speciilor de sturioni din Dunăre, A. Docan, p. 199-250, În "Biologia și genetica sturionilor de Dunăre: aplicații în acvacultură și conservare", Editura Universității din București, 2017, ISBN 978-606-16-0857-7.

**Articole în reviste cotate ISI**

1. A. Burcea, G.O. Popa, I.E. Florescu, A. Dudu, S.E. Georgescu, M. Costache, 2017. Genetic profile analysis of aquaculture Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) – implications for restocking measures, Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 63(3):361–376. (IF 0.520; AIS 0.170)

2. G.O. Popa, A. Dudu, D. Bănăduc, A. Curtean-Bănăduc, T. Barbălată, A. Burcea, I.E. (Gune) Florescu, S.E. Georgescu, M. Costache, 2017. Use of DNA barcoding in the assignment of commercially valuable fish species from Romania, Aquatic Living Resources, 30, 20. (IF 0.448; AIS 0.500)

**Articole în reviste cotate BDI**

Guriencu R., Cristea V., Dediu L., Crețu M., Docan A., 2017. Morphometric characteristics and length-weight relation-ship of russian sturgeon juveniles under different feeding ratio- Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies 74(2):119-126.

**Participări la conferințe internaționale organizate în România**

1. Burcea A., Popa G.O., Florescu (Gune) I.E., Dudu A., Georgescu S.E., Costache M. - Genetic diversity of five aquaculture strains of Russian sturgeon from Romania, Book of abstracts, Deltas and Wetlands, the 25th Scientific Symposium, Tulcea, Romania, 18-21 May 2017, p. 13.

2. A. Burcea, G.O. Popa, I.E. Florescu, A. Dudu, S.E. Georgescu, M. Costache, The expression of sexual development genes in Best beluga hybrid individuals, Proceedings of the 6th Aquatic Biodiversity International Conference, Sibiu, Romania, 27-30 September 2017, p. 9.

3. I.E. Florescu (Gune), A. Burcea, G.O. Popa, S.E. Georgescu, I. Grecu, L. Dediu, A. Docan, M. Costache, Effects of starvation and refeeding on growth performance of *Acipenser stellatus* under aquaculture conditions,

Proceedings of the 6th Aquatic Biodiversity International Conference, Sibiu, Romania, 27-30 September 2017, p. 52.

4. A. Burcea, G.O. Popa, S. Gharbia, I.E. Florescu (Gune), A. Dudu, S.E. Georgescu, A. Hermenean, M. Costache, Insight in the gonad development of best beluga sturgeon hybrid individuals through histology and immunohistochemistry, Book of abstracts of Symposium „Ecology and protection of ecosystems”, The XIIth Edition, Bacau, Romania, 2-4 November 2017, p. 127.

5. Guriencu R., Cristea V., Dediu L., Crețu M., Docan A., Morphometric characteristics and length-weight relation-ship of russian sturgeon juveniles under different feeding ratio, Book of abstracts of The 16th International Symposium Prospects for the 3rd millennium agriculture, 28–30 September, 2017, Cluj-Napoca, Romania.

6. Guriencu R., Cristea V., Dediu L., Crețu M., Docan A., Growth performance and food conversion efficiency of juvenile russian sturgeon at different feeding frequencies, Book of abstracts of The 16th International Symposium Prospects for the 3rd millennium agriculture, 28–30 September, 2017, Cluj-Napoca, Romania.

7. Dediu L., Mogodan A., Docan A., Cretu M., Maereanu M., Comparative Study of Haematological and Biochemical Parameters at Juveniles of *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser ruthenus* and Hybrid Sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* x *Acipenser ruthenus*, 8th International Euroalimnet Symposium Mutatis Mutandis in Foods, 7–8 September 2017, Galati, Romania.

8. M. Samu, R. Nechifor, G.O. Popa, S.E. Georgescu, M. Costache, A. Dudu, Identification of sturgeon species and interspecies hybrids using RP1S7 nuclear marker, Book of abstracts, The 9th International Zoological Congress of "Grigore Antipa" Museum, Bucuresti, Romania 22-25 November 2017, p. 164.

9. A. Burcea, G.O. Popa, S. Gharbia, I.E. Florescu (Gune), A. Dudu, S.E. Georgescu, A. Hermenean, M. Costache, The qPCR expression of genes possibly involved in the sexual development of individuals from two sturgeon species, Book of abstracts, The 9th International Zoological Congress of "Grigore Antipa" Museum, Bucuresti, Romania, 22-25 November 2017, p. 85.

#### **Participări la conferințe internaționale organizate în străinătate**

1. A. Dudu, A. Burcea, I.E. Florescu, G.O. Popa, M. Costache, S.E. Georgescu – “The assessment of genetic diversity in sturgeons aiming at aquaculture stocks improvement”, Book of abstract of “The 68th Annual meeting of the European Federation of Animal Science – Patterns of Livestock Production in the Development of Bioeconomy”, Tallinn, Estonia, 28 August – 01 September 2017, p. 317.

2. I.E. Florescu (Gune), M. Balas, A. Dudu, L. Dediu, A. Dinischiotu, M. Costache, S.E. Georgescu - “The effects of starving-refeeding diet on oxidative stress in sturgeons under aquaculture conditions”, Book of abstract of “The 68th Annual meeting of the European Federation of Animal Science – Patterns of Livestock Production in the Development of Bioeconomy”, Tallinn, Estonia, 28 August – 01 September 2017, p. 391.

3. M. Crețu, L. Dediu, A. Docan, M. Maereanu, A. Mogodan – “Inter- and intraspecific variation of morphological characters of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*), Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) and their hybrid”, Book of abstract of VIII International Scientific Agriculture Symposium - AGROSYM 2017, Jahorina, Bosnia-Hertzegovina, 05–08 October 2017, p. 1196

4. Dediu L., Docan A., Crețu M., Maereanu M., Coadă M. – „Evaluation of phenotypic traits, variability and growth performance of hybrids between sterlet sturgeon and russian sturgeon compared with pure parental species”, Book of abstracts of 8th International Symposium on Sturgeons, 10-16 September 2017 Vienna, Austria.

#### **BIBLIOGRAFIE**

Amberg J., Goforth R., Stefanavage T., Sepulveda M.S. (2010) Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*). Fish physiology and biochemistry 36(4):923-932.

Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer research 64(15): 5245-5250.

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. (2013) Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish physiology and biochemistry* 39(1): 91-94.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4):611-622.
- Chen W.X., Ma Y., Liu K.H. (2015) Association of *MyoD1a* and *MyoD1b* gene polymorphisms and meat quality traits in rainbow trout. *Genetics and Molecular Research*, 14(3):9034-44.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- 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.
- Johansen K.A. & Overturf K. (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*, 7:576–587.
- 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.
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A. (2004) RNA integrity number (RIN)–standardization of RNA quality control. *Agilent application note, publication*, pp.1-8.
- Razali N.M., Wah Y.B. (2011) Power of comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*. 2(1): 21-33.
- Shapiro S.S., Wilk M.B. (1965) An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, 52(3/4):591-611.
- 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.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7):1-12.
- Hurvitz Avshalom, Karen Jackson, Svetlana Yom-Din, Gad Degani, Berta Levavi-Sivan. (2008) Sexual development in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture.
- Petochi T., P. Di Marco, V. Donadelli, A. Longobardi, I. Corsalini, D. Bertotto, M.G. Finoia and G. Marino. J. (2011) Sex and reproductive stage identification of sturgeon hybrids (*Acipenser naccarii* x *Acipenser baerii*) using different tools: ultrasounds, histology and sex steroids. *J. Appl. Ichthyol.* 27: 637–642
- Mola Abbas Esmaili & Hrachya G. Hovannisyan (2015) Measurements of serum steroid hormones (testosterone, 11-ketotestosterone, and 17β-estradiol) in farmed great sturgeon *Comp Clin Pathol* 24:509–513
- Barannikova I. A., L. V. Bayunova, T. B. Semenkova and I. V. Trenkler (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*, Vol. 48, No. 5, pp. 402–407. ISSN 0032-9452,.
- Barannikova I. A., V. P. Dyubin, L. V. Bayunova, and T. B. Semenkova (2002). Steroids in the Control of Reproductive Function in Fish. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 32, No. 2:141-148
- Hao Dua, Xiaoyan Zhang, Xiaoqian Leng, Shuhuan Zhang, Jiang Luo, Zhigang Liu, Xingmei Qiao, Boyd Kynard, Qiwei Wei (2017) Gender and gonadal maturity stage identification of captive Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using ultrasound imagery and sex steroids. *Gen Comp Endocrinol.*; 245:36-43.
- Ceapa C., P. Williot, F. Le Menn and B. Davail-Cuisset (2002) Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during spawning migration in the Danube River. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 391–396
- Amiri B. M., M. Maebayashi, S. Adachi, G. P. Moberg, S. I. Doroshov and K. Yamauchi (1999) In vitro steroidogenesis by testicular fragments and ovarian follicles in a hybrid sturgeon, Bester. *Fish Physiology and Biochemistry* 21: 1–14
- Wedekind, H., 2002: Chemical composition and processability of farmed sturgeon hybrids with special emphasis on bester. *Internat.Rev.Hydrobiol.* 87(5-6), 621-627
- Badiani, A.; Anfossi, P.; Fiorentini, L.; Gatta, P.P.; Manfredini, M.; Nanni, N.; Stipa, S.; Tolomelli, B., 1996: Nutritional composition of cultured sturgeon (*Acipenser* spp.). *J. Food Composition & Analysis*. 9(2), 171-190.



Badiani, A.; Stipa, S.; Nanni, N.; Gatta, P.P.; Manfredini, M., 1997: Physical indices, processing yields, compositional parameters and fatty acid profile of three species of cultured sturgeon (Genus *Acipenser*). *J. Sci. Food Agric*, 74, 257-264.

Jankowska, B.; Kwiatkowska, A.; Kolman, R.; Szczepkowska, B., 2002: A comparison of certain characteristics of meat of the Siberian sturgeon (*A.baerii* Brandt) and that of its hybrids with the green sturgeon (*A. medirostris* Ayers). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. Volume 5, Issue 1