

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



Etapa III. Validarea în mediul industrial a tehnologiei de selecție, creștere și ameliorare a unor linii de acvacultură cu caracteristici morfo-productive superioare.

Activitati etapa III:

Activitatea III.1 Recoltare, transport și stocare de probe biologice.

Activitatea III.2 Analiza expresiei genice la genele corelate cu producția de carne și calitatea superioară a cărnii la sturioni.

Activitatea III.3 Integrarea datelor moleculare și biochimice în vederea stabilirii unui protocol metodologic de sexare timpurie la sturioni.

Activitatea III.4. Estimarea condiției hibridului în raport cu măsurători fenotipice (geomorfometrie) pentru loturi crescute în diferite sisteme de producție (sistem deschis versus sistem recirculant).

Activitatea III.5. Monitorizarea creșterii și realizarea selecției indivizilor având performanțe de creștere superioare și carne de calitate superioară în vederea obținerii unui stoc valoros cu utilitate în acvacultură.

Activitatea III.6 Diseminarea rezultatelor prin prezentarea la conferințe naționale și/sau internaționale, publicarea de articole științifice și completarea paginii web a proiectului.

REZUMAT

Identificarea timpurie a sexului sturionilor prin metode moleculare poate avea o importanță economică foarte ridicată. Aflarea sexului indivizilor încă dintr-un stadiu incipient poate ajuta piscicultorii, aceștia putându-se concentra doar asupra producției de caviar ori doar asupra celei de carne, prin creșterea separată a femelelor față de masculi. În acest mod se pot evita costurile creșterii comune a acestora. O altă problemă de mare interes în acvacultură este și cea legată de calitatea produselor oferite pe piață. Selectarea indivizilor care posedă o producție de crescută de carne, dar mai ales o calitate superioară a acesteia, precum și dezvoltarea unor linii ameliorate, poate crește într-un mod semnificativ productivitatea și, implicit, profitabilitatea fermelor piscicole. Prin urmare, a fost selectat un panel optim de markeri corelați cu calitatea și cantitatea cărnii, respectiv cu sexarea timpurie în cazul hibridului Best Beluga: genele *ar*, *star*, *cyp17A1*, *dmrt1*, *foxL2*, *sox9,gh* și *iigf*. Toți markerii selectați au fost analizați prin metode moleculare în vederea stabilirii unor protocoale de sexarea timpurie, respectiv de selecție a indivizilor cu caracteristici morfo-productive superioare. Genele *dmrt1*, *cyp17A1* și *ar* par a avea o expresie specifică implicată în procesele de dezvoltare gonadală pentru hibridul Best Beluga. Totodată, au fost observate diferențe în expresia markerilor între femele și masculi doar pentru *genacyp17A1*, în cazul gonadelor. Nu au fost observate diferențe în expresia markerilor la femele și masculi pentru țesuturile prelevabile fără sacrificarea individului (mușchi alb și înotătoare anală) și nu au putut fi stabilite corelații certe între markerii moleculari selectați și calitatea cărnii indivizilor.

În ultimii ani au fost optimizate tehnologii specifice creșterii intensive a larvelor și puilor de sturioni până la talia de comercializare. Odată însă cu dezvoltarea tehnologiilor și sistemelor de creștere intensivă a sturionilor a apărut necesitatea obținerii unor linii de descendenți și/sau hibrizi, care vor moșteni caracterele pozitive de la părinții lor în vederea îmbunătățirii indicatorilor tehnologici în condiții intensive de exploatare. Actualmente cel mai popular hibrid, atât pe plan European cât și național, este reprezentat de bester, acesta având o serie de calități ce îl recomandă atât pentru producția de carne cât și de caviar. Prin retroincrucisarea femelelor de bester cu masculul de morun s-a obținut hibridul best beluga (BB) a caror trăsături morfometrice, productive și de plasticitate tehnologică au fost evaluate în cadrul prezentului proiect.

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

Pentru realizarea analizelor moleculare bazate pe ADN și ARN, au fost colectate de la indivizii selectați de Best Beluga (hibrid Bester (*Huso huso* ♀ X *Acipenser ruthenus* ♂) ♀ X *Huso huso* ♂), crescuți în

acvacultură, următoarele tipuri de probe: mușchi alb, ficat, rinichi, gonade și înotătoare anală. Probele recoltate în vederea analizelor de ARN au fost prelevate în reactiv de stabilizare a ARN, RNAlater RNA (Qiagen), transportate la 4°C până în laborator, păstrate peste noapte la 4°C în frigider și apoi transferate la -80°C în congelator conform protocolului de păstrare pe termen lung. Probele recoltate pentru analizele de ADN au fost stocate în tuburi cu etanol absolut, la 4°C. Izolarea de ARN total pentru experimentele de expresie genică s-a realizat din fragmente de țesut de aproximativ folosind kitul RNeasy Mini Kit (Qiagen) și protocolul recomandat de producător 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 pe minicoloane utilizând kitul RNase-Free DNase Set (Qiagen). După izolare s-a utilizat spectrofotometrul BioSpec-Nano (Shimadzu) pentru determinarea concentrației și purității ARN total. Ulterior, ARN total a fost evaluat din punct de vedere al integrității folosind kitul RNA 6000 Nano Kit (Agilent) și aparatul 2100 Bioanalyzer (Agilent). Extracția și purificarea ADN genomic s-a realizat din fragmente de țesut prelevate din înotătoare anală de la hibridii de Best beluga. În acest scop, s-a utilizat protocolul clasic de izolare prin liză celulară cu pronază și sodiu dodecil sulfat, digestia ARN cu ribonuclează, precipitarea proteinelor cu amestec fenol-cloroform și precipitarea ADN cu etanol absolut. S-a evaluat concentrația și puritatea probelor ADN genomic obținute prin metoda spectrofotometrică.

Activitatea III.2 Analiza expresiei genice la genele corelate cu producția de carne și calitatea superioară a cărnii la sturioni. Activitatea III.3 Integrarea datelor moleculare și biochimice în vederea stabilirii unui protocol metodologic de sexare timpurie la sturioni.

Identificarea precoce a femelelor reprezintă o necesitate pentru crescătorii de sturioni, datorită scăderii costurilor asociate creșterii comune a indivizilor până la vârsta când identificarea sexului este posibilă. Sturionii nu prezintă dimorfism sexual în nici un stadiu al dezvoltării, ceea ce transformă identificarea precoce a sexelor într-o adevărată problemă specifică doar sturioniculturii. Pentru diferențierea precoce a sexelor au fost încercate mai multe metode.

Studiile citogenetice în cazul peștilor au arătat că în jur de 10%, din cele 176 de specii studiate, prezintă cromozomi de sex ce pot fi distinși pe baza cariotipului (Devlin și Nagahama, 2002). În cazul sturionilor nu s-au observat aceste tipuri de cromozomi, unul dintre motive fiind numărul mare de cromozomi din genomul acestora (Keyvanshokoo și Gharaei, 2010).

În cazul studiilor genetice au fost testate 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 et al., 2006; Keyvanshokoo et al., 2007; McCormick et al., 2008). A fost secvențializată gena *sox* pentru a se observa posibile diferențe între sexe (McCormick et al., 2008). De asemenea, s-au încercat tehnici substructive prin compararea secvențelor de la sexul homogamic cu cele de la sexul heterogamic în vederea observării posibilelor diferențe de secvență în zonele vecine regiunii ce determină sexul (Devlin și Nagahama, 2002; McCormick et al., 2008). Au fost testate și metode de proteomică pentru observarea diferențelor în expresia proteică dintre testicule și ovare (Keyvanshokoo et al., 2009). Studiul proteomului a arătat diferențe în expresia proteică, dar proteinele respective nu erau implicate în diferențierea sexuală.

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

- Gena *ar* (*androgen receptor*) are rol principal în diferențierea sexuală la masculi în cazul vertebratelor.
- Gena *dmrt1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) este posibil implicată în dezvoltarea sexuală a masculilor la sturioni.
- Gena *sox9* (*sex-determining region Y-box 9*) este implicată în cazul vertebratelor în diferențierea testiculelor.
- Gena *foxL2* (*forkhead box L2*) este exprimată în special în ovare și este implicată în sinteza de estrogeni.
- 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 *star* (*steroidogenic acute regulatory protein*).

În cazul markerilor ADN asociați cu calitatea cărnii, au fost identificați deja o serie de markeri corelați cu o creștere a producției, dar și cu fermitatea fileului: genele *myoD1*, *igf*, *mstn1a*, *mstn1b* și *gh* (Johansen și Overtuf, 2005; Chen et al., 2015).

Analiza markerilor

În vederea optimizării și analizei ulterioare a nivelurilor de expresie în cazul genelor asociate cu determinarea sexului în țesuturi cu origine embrionară diferită, la indivizi de Best beluga aparținând unor clase de vârstă diferite, după determinarea integrității ARN, a fost realizată reacția de reverstranscriere folosind kitul iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad). Numai probele de ARN având valoarea RIN (*RNA Integrity Number*) peste 8 au fost utilizate pentru reverstranscrierea în ADNc. Protocolul și volumele utilizate pentru reacția de reverstranscriere sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1. Reactivii și volumele necesare pentru reverstranscrierea ARN total în ADNc.

Reactiv	Volum
5X iScript Reaction Mix	4 μl
ReverstranscriptazăiScript	1 μl
ARN total (circa 100 ng/μl)	1 μl
H ₂ O ultra-purăliberă deribonucleaze	14 μl
Volum final	20 μl

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.

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

Datele, reprezentate de valorile Cq (Threshold Cycle) au fost obținute cu ajutorul software-ului aparatului iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Pentru calcularea nivelului de expresie s-a utilizat media aritmetică a replicatelor tehnice și a celor biologice (Cq). Pentru normalizarea datelor s-a scăzut Cq genă de referință (toate cele trei gene de referință *actb*, *gapdh* și *ARNr 28S*) din Cq genă de interes (Vandesompele et al., 2002). Pentru testele statistice de diferențiere s-a utilizat one-way ANOVA cu corecția Tukey pentru comparații multiple în cazul markerilor *foxL2*, *cyp17A1*, *ar*, *sox9* și *star*, în timp ce pentru *dmrt1* s-a utilizat t-test deoarece se exprimă doar în gonade.

Tabel 2. Programul reacției Real-Time PCR.

Denaturare	Denaturare	Hibridizare	Extindere	ect are dat	Curba de topire
95°C	95°C	58°C	72°C		53-98°C

5 minute	30 secunde	30 secunde	30 secunde	Creștere de 0,5°C la 10 secunde
	36de cicluri			

În cazul studiului realizat în 2012 de Berbejillo et al., autorii observă că în probele de la *Acipenser baerii* din stadiu imatur (3 ani) are loc expresia genelor *dmrt1* și *cyp17A1* dar la nivel mai mic în creier, mușchi, ficat, branhii și rinichi decât genele *sox9*, *lh* și *ar*. Autorii prezintă expresia genei *igf1* ca fiind ridicată în ficat în timp ce expresia genei *star* era ridicată în rinichi. În cazul studiului nostru, pentru mușchi alb, 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. În studiul publicat de Leng et al.(2016), autorii observă expresia genei *dmrt1* în mușchi, la *Acipenser sinensis*, atât la femele, cât și la masculi, lucru pe care noi nu l-am observat în cazul hibridilor Best Beluga.

Expresia genelor *foxL2*, *cyp17A1*, *ar* și *sox9* apare în cazul ficatului, în schimb 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 apare expresia genelor *foxL2*, *cyp17A1*, *ar*, *sox9* și *star*, în schimb 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 s-a observat că gena *foxL2* nu prezintă diferențe semnificative între femele și masculi, la fel ca și *ar*, *dmrt1*, *sox9* și *star*, în timp ce pentru *cyp17A1* s-au observat diferențe semnificative. Pentru aceasta, în cazul masculilor, expresia este mai ridicată. Berbejillo et al.(2012), într-un studiu pe sturionul siberian, observă că pentru gonade, următoarele gene au avut expresie mai ridicată în cazul masculilor: *dmrt1*, *cyp17A1*, *star*, *ar*, *lh* și *igf1*. Autorii nu au observat diferențe statistic semnificative pentru gena *sox9* ceea ce a fost observat și în analizele noastre.

În 2013, Berbejillo et al., au testat genele *dmrt1* și *sox9* pentru a observa dacă există dimorfism între expresia de la femele și cea de la masculi și au semnalat că gena *dmrt1* se exprimă statistic semnificativ mai mult în cazul masculilor speciei *Acipenser baerii*, la indivizi de trei ani, în timp ce gena *sox9* nu prezintă diferențe între femele și masculi. Leng et al., 2016, observă în cazul speciei *Acipenser sinensis* că expresia genei *dmrt1* este mai ridicată în cazul testiculelor față de ovare, mai ales la indivizi de trei și patru ani. Fajkowska et al., 2016, observă o expresie statistic semnificativă mai ridicată în cazul genei *dmrt1* de la masculi față de femele pentru nisetrul. Prin studii de secvențializare de nouă generație, Hagihara et al., 2014, observă în cazul speciei *Acipenser gueldenstaedtii*, o expresie semnificativ diferită pentru indivizii prezumtiv masculi față de indivizii prezumtiv femele, în cazul genelor *gsdf* (*Gonadal Somatic Cell Derived Factor*), *foxL2*, *hsd17B1* (*Hydroxysteroid (17-β) Dehydrogenase 1*) și *cyp19A1a* (*Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1a*), în timp ce pentru genele *dmrt1*, *lh*, *igf1*, *star*, *cyp17A1* și *ar* nu observă diferențe în cazul juvenililor de nouă luni. Yue et al., 2015, observă că în gonadele de la indivizi din specia *Acipenser sinensis* la vârsta de trei ani nu există diferențe între expresia genelor *dmrt1*, *sox9* și *gsdf*. În cazul înotătoarei anale, s-a observat expresia genelor *foxL2*, *cyp17A1*, *ar*, *sox9* și *star*, dar nu și expresia genei *dmrt1*. Nu au fost observate diferențe statistic semnificative între masculi și femele din punct de vedere al expresiei markerilor. Analiza înotătoarei anale avea în vedere posibila discriminare dintre femele și masculi fără sacrificarea acestora. Din păcate, în stadiul de juvenil nu se observă diferențe de expresie.

Verificarea expresiei markerilor între organe

Pentru toți indivizii selectați, au fost analizate și diferențele de expresie genică între diferitele organe studiate cu scopul de a observa dacă expresia genelor este specifică în gonade sau dacă este ubicuitară.

S-a observat că gena *dmrt1* se exprimă doar în cazul gonadelor, atât pentru femele, cât și pentru masculi, iar gena *foxL2* este exprimată în toate organele investigate, atât pentru femele, cât și pentru masculi, fără o diferență semnificativă de expresie între gonade și celelalte organe. Pentru gena *cyp17A1* se observă diferențe semnificative în cazul masculilor, între expresia din gonade și cea din celelalte organe, expresia fiind mai ridicată în cazul gonadelor. Pentru femele expresia *cyp17A1* nu diferă între organele investigate.

În cazul genei *ar* se observă, pentru masculi, o expresie semnificativ diferită între testicule și rinichi, dar nu și între testicule și celelalte țesuturi. Pentru femele, expresia *ar* este semnificativ mai mare între ovare și rinichi, respectiv între ovare și mușchiul alb.

În cazul genelor *sox9* și *star* nu se observă diferențe semnificative între expresia din gonade și expresia din celelalte organe.

Analiza genelor corelate cu producția superioară de carne

În cazul unor specii cu importanță economică ridicată (salmonide, ciprinide), au fost deja stabiliți o serie de markeri moleculari corelați cu productivitatea și calitatea cărnii. Identificarea unor polimorfisme mononucleotidice (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) la nivelul acestor markeri a putut fi corelată cu o serie de caractere productive, printre care și fermitatea fileului.

În vederea analizei propriu-zise, 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. După etapa de optimizare a temperaturii de hibridizare a primerilor, au fost selectați pentru reacția de secvențiere primerii GH 2 (amplicon de 200 pb), IGF1B (amplicon de 382 pb) și IGF 2 (amplicon 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 X Terminator (Life Technologies). Nu au fost identificate polimorfisme concludente care să poată fi asociate cu calitatea și cantitatea de carne în cazul hibridilor analizați.

Activitatea III.4. Estimarea condiției hibridului în raport cu măsurători fenotipice (geomorfometrie) pentru loturi crescute în diferite sisteme de producție (sistem deschis versus sistem recirculant).

Activitatea III.5. Monitorizarea creșterii și realizarea selecției indivizilor având performanțe de creștere superioare și carne de calitate superioară în vederea obținerii unui stoc valoros cu utilitate în acvacultură.

Pentru compararea trasaturilor morfologice s-au selectat loturi de hibridi (bester și bestbeluga), cega și morun ce au fost crescute în sistem recirculant evaluarea fenotipică făcându-se după aproximativ 6 luni din momentul populării sistemului (masa medie la populare a fost de 10 g) În ceea ce privește descrierea morfometrică pentru diferitele specii de sturioni, literatura de specialitate oferă informații modeste, studiile care urmăresc modul cum anumite caractere sunt transmise descendenților fiind extrem de restrânse. 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 și linii genetice de sturioni.

Tabel 3. Valorile absolute pentru caractere biometrice¹ cuantificate la hibridi si speciile parentale

Nr. crt.		BB		BESTER		CEGA		MORUN	
		Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
1	Ls/L	0.89 ^a	0.28	0.78 ^b	0.03	0.77 ^b	0.04	0.76 ^b	0.01
2	Lf/L	0.91	0.14	0.87	0.05	0.87	0.03	0.86	0.02
3	Lra/L	0.59 ^b	0.10	0.73 ^a	0.03	0.58 ^b	0.06	0.58 ^b	0.01
4	Lrad/L	0.62 ^b	0.09	0.76 ^a	0.03	0.59 ^b	0.01	0.60 ^b	0.01
5	Lrap/L	0.26 ^b	0.04	0.30 ^a	0.02	0.35 ^a	0.48	0.24 ^b	0.01
6	LC/L	0.24 ^b	0.04	0.28 ^a	0.02	0.29 ^a	0.01	0.23 ^b	0.00
7	Dpo/LC	0.53 ^a	0.03	0.53 ^a	0.04	0.56 ^b	0.08	0.49 ^c	0.02
8	Lp/L	0.11 ^a	0.02	0.18 ^b	0.02	0.13 ^a	0.01	0.19 ^b	0.01
9	Do/LC	0.28 ^b	0.02	0.33 ^a	0.06	0.29 ^b	0.05	0.26 ^c	0.03
10	IC/C	0.52 ^b	0.03	0.50 ^b	0.05	0.44 ^a	0.08	0.51 ^b	0.02
11	Lg/C	0.32 ^c	0.02	0.28 ^b	0.04	0.17 ^a	0.02	0.37 ^c	0.02
12	ICg/C	0.41 ^a	0.02	0.38 ^b	0.05	0.33 ^c	0.02	0.43 ^a	0.01
13	ICm/C	0.26	0.02	0.27	0.29	0.25	0.02	0.29	0.02
14	lpo/C	0.52 ^a	0.03	0.59 ^b	0.06	0.58 ^b	0.03	0.43 ^c	0.02
15	lm/C	0.22 ^b	0.02	0.21 ^b	0.03	0.17 ^a	0.02	0.21 ^b	0.02

Pentru evaluarea morfometrică au fost măsurate 16 caractere biometrice și 3 caractere meristice cuantificate pentru ambele părți ale corpului în vederea evaluării ulterioare a gradului de asimetrie. Toate măsurătorile au fost efectuate *in vivo* după ce peștii au fost aneșteziți cu MS222. Valorile medii relative pentru caractere biometrice cuantificate la hibridii bester și bestbeluga sunt redată în tabelul 4. Caracterele măsurabile la nivelul corpului s-au exprimat în procente din lungimea totală a corpului (L), în timp ce caracterele măsurabile la nivelul capului au fost exprimate în procente din lungimea capului (LC). S-au observat diferențe semnificative statistic între valorile relative ale majorității caracterelor măsurabile pentru cei doi hibridi și speciile parentale (Tabelul 3). Cele mai mari diferențe s-au observat în caracterele capului. Lungimea relativă a capului a fost mai mare cu 4% la BB față de bester, rostrul acestor pești a fost mai scurt cu aproximativ 7%, iar lățimea capului la nivelul gurii a fost mai mare cu 3% față de hibridul bester.

Morfologic, hibridul Best Beluga seamănă destul de bine cu hibridul bester iar în cazul de față majoritatea caracterelor meristice, demonstrează moștenirea patroclinală și apropierea de morun (Tabelul 4).

Tabel 4. Valorile medii ale caracterelor meristice evaluate pentru hibridii best și Best Beluga

Caractere meristice	Bester		BestBeluga	
	Min-max	Media±SD	Min-max	Media±SD
Numarul de scuturi dorsale	10-11	10.8±0.44	10-13	11.33±0.98
Numarul de placi laterale stanga	36-40	38.4±1.51	33-46	39.91±3.60
Numarul de placi laterale dreapta	37-41	39.2±1.48	35-45	39.83±2.72
Numarul de scuturi ventrolateral stanga	9-11	9.8±0.83	8-11	9.75±1.05
Numarul de scuturi ventrolateral dreapta	9-10	9.4±0.54	9-11	9.91±0.90

¹L-Lungimea totală; Ls - Lungime standard; Lf - Lungimea la furca; Lra - Lungimea de la vârful rostrului până la marginea anterioară a anusului; Lrad - Lungimea de la vârful rostrului până la marginea anterioară a dorsalei; Lrap - Lungimea de la vârful rostrului până la marginea anterioară a pectoralei; LC - Lungimea capului; Dpo - Distanța preorbitală; Lp - Lungimea înotătoarei pectoral; Do - Distanța între ochi, IC - Lățimea maximă a capului, Lg - Lungimea gurii, ICg - Lățimea capului la nivelul gurii; ICm - Lățimea capului la baza mustaților; lpo - Lungime preorală, lm - Lungime mustați, Sd - Numărul de scuturi dorsal.

Nivelul de similitudine al hibridizorcu speciile parentale a fost estimat pe bazavalorile indicelui hibrid (HI) determinat deecuația sugerată de Verigin și Makeeva (1972): $HI = 2 [100 (Mh - Mf) / (Mm - Mf) - 50]$,unde Mh este valoarea medie a unui caracter la forma hibridă, Mf este valoarea sa medie la specia maternă șiMm este valoarea sa medie la specia paternă. Valori negative ale HI indică faptul că hibridul a deviat sprespecia maternă și valoarea pozitivă indică deviatia spre specia paternă. Astfel, daca pentru bester proportiile Lrap/L, Lp/L, LC/L, ICg/Csunt mostenite de la mama, in cazul hibridului Best Belugasunt mai degraba mostenite de la tata (la morun si BB pectoralele sunt mai lungi, capul mai scurt si mai lat la nivelul gurii).

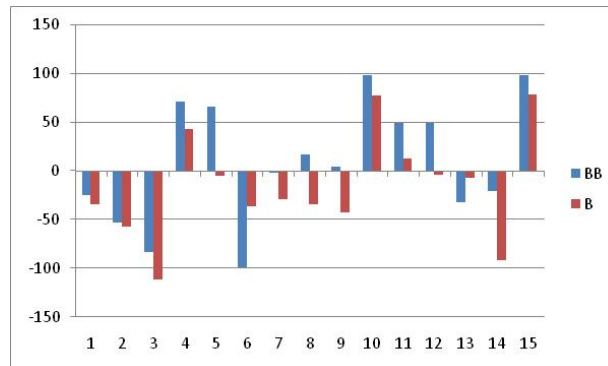


Figura 1. Diagrama distributiei indexului hibrid (pe abscisa (X), caracterele; pe ordonata (Y), valorile corespunzatoare indexului hibrid)

Pentru evaluarea performantelor tehnologice s-au comparat cele doua linii hibride in conditiile cresterii atat in sisteme recirculante cat si in sistem deschis. Astfel, in conditiile cresterii in sistem deschis, in primele 70 de zile de crestere, hibridii Best Beluga au prezentat rate de crestere zilnice usor superioare hibridului bester, pentru toate clasele de talie testate.

Tabel 5. Indicatori de performanta tehnologica pentru hibridii bester si Best Beluga, diferite clase de talie, crescuti in sisteme deschise

	CM1-BB	CM2-BB	CM3-BB	CM1-B	CM2-B	CM3-B
<i>Greutatea initiala medie (g/ex)</i>	40.80	19.72	3.05	40.06	22.58	4.14
<i>Greutatea finala medie (g/ex)</i>	253.50	227.08	85.41	244.63	216.41	78.76
<i>SGR (% BW/zi)</i>	2.61	3.49	4.76	2.58	3.29	4.27
<i>Rata zilnica de crestere - (g/kg/zi)</i>	3.04	2.96	1.18	2.92	2.91	1.02
<i>FCR (g/g)</i>	0.61	0.58	0.61	0.62	0.58	0.77

Apoi, rata de crestere a hibridilor bester a încetinit, iar până la vârsta de 9 luni,diferența de greutate dintre speciile de sturioni Best Beluga și besters-au ridicat la peste 23% (Tabelul 6) in ambele variante de densitate testate (D1-10kg/m³ si D2 -20 kg/m³).

Tabel 6. Indicatori de performanta tehnologica pentru hibridii bester si Best Beluga in diferite densitati de stocare in conditiile cresterii in sisteme deschise

	BB		B	
	D1	D2	D1	D2
<i>Masamedieinitiala (g)</i>	161.56	165.50	180.11	183.86
<i>Masamediefinala (g)</i>	466.20	405.63	351.33	314.95
<i>Spor individual de crestere(g)</i>	304.64	240.13	171.22	131.09
<i>Rata de crestere (%)</i>	188.56	145.09	95.06	71.29
<i>SGR (% BW/zi)</i>	2.789	2.614	1.758	1.416
<i>Rata conversieFCR (g/g)</i>	0.737	0.723	0.842	0.850
<i>Densitatea de stocare (kg/m2)</i>	10.36	20.69	10.74	20.55

Monitorizarea creșterii hibridului BB în sisteme recirculante a evidențiat un ritm de creștere ușor accelerat pentru hibridul BB, după 9 luni de creștere masa medie a acestuia depășind 600 g pentru densitatea de 18 kg/m² (Tabel 7).

Tabel 7. Indicatori de performanță tehnologică pentru hibridul Best Beluga în diferite densități de stocare în condițiile creșterii în sisteme recirculante

Variante experimentale	D1	D2	D3	D4
Indicatori de creștere	3 luni		6 luni	
Masa medie inițială (g)	10.00	30.00	22.00	41.00
Masa medie finală (g)	22.00	41.00	224.00	310.00
Spor individual de creștere (g)	12.00	11.00	202.00	269.00
Rata de creștere (%)	120.00	36.67	918.18	656.10
Rata conversie FCR (g/g)	0.78	0.60	0.75	0.90
Densitatea de stocare (kg/m ²)	1.00	2.40	21.00	36.00
	9 luni			
Masa medie inițială (g)	335.21	334.73	333.93	337.12
Masa medie finală (g)	613.46	556.09	541.82	544.97
Spor individual de creștere (g)	278.25	221.36	207.89	207.85
SGR (% BW/zi)	1.59	1.34	1.27	2.26
Rata conversie FCR (g/g)	0.85	0.91	0.97	0.97
Densitatea de stocare (kg/m ²)	8	12	15	18

Pe lângă evaluarea performanței tehnologice la hibridii bester (B) și Best Beluga (BB), în condițiile creșterii în diferite densități de stocare s-a evaluat, prin cuantificarea parametrilor biochimici și a markerilor specifici, și răspunsul fiziologic la stresul acestora. Astfel, pentru BB s-au testat densități cuprinse între 8 și 18 Kg/m² (pentru talia de 335g/ex). La finalul studiului în care s-a urmărit influența densității de stocare asupra indicatorilor de creștere, inclusiv greutatea medie finală, creșterea în greutate și rata de creștere specifică au prezentat valori mai bune la densități mai mici; cu toate acestea, eficiența hranei, raportul de eficiență a proteinelor, indicele hepato-somatic și indicele viscero-somatic nu au diferit în mod semnificativ între densitățile testate ($p > 0,05$). Stresul s-a manifestat prin creșterea hemoglobinei și a numărului de eritrocite stocurile menținute la densitate ridicată. Nivelul MDA (malondialdehidă, marker de stres oxidativ) și al cortizolului nu a fost semnificativ ($p < 0,05$) diferit între densitățile testate. Pentru compararea performanței de creștere și a răspunsului fiziologic la stres a celor doi hibridi s-a realizat un experiment în care s-au testat 2 densități de stocare anume, 20 kg/m² și 30 kg/m² (Tabel 8 și Tabel 9). Evaluarea rezultatelor a evidențiat faptul că hibridii B au avut un nivel sensibil mai mare al cortizolului comparativ cu hibridii BB, în ambele densități. De asemenea, în ceea ce privește performanța de creștere putem spune că hibridul BB a avut o performanță mai bună decât hibridul B și, în ceea ce privește răspunsul la stres, hibridul BB a avut o toleranță ușor mai mare la densitatea de stocare (Tabel 9).

Tabel 8. Indicatori tehnologici pentru evaluarea performanței de creștere a hibridilor bester și Best Beluga la diferite densități în sisteme recirculante

	BB		B	
	D1	D2	D1	D2
Greutatea inițială medie (g/ex)	493.38	948.18	488.43	941.18
Greutatea finală medie (g/ex)	746.15	1295.82	724.85	1209.55
SGR (% BW/zi)	0.92	0.69	0.88	0.56
FCR (g/g)	1.41	1.84	1.85	2.37
PER	1.45	1.11	1.10	0.86
Productia kg/m²	21.56	31.68	20.94	29.57

Tabel 9. Indicatori hematologici și biochimici pentru evaluarea răspunsului fiziologic la stresul de densitate a hibridilor bester și Best Beluga în condițiile creșterii în sisteme recirculante

	BB		B		BB		B	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Nr. Eritr. (eritr./ μ l sangeX 106)	0.62	0.14	0.44	0.06	0.43	0.10	0.58	0.13
Hematocrit (%)	20.87	3.30	22.52	3.90	29.16	3.12	29.10	2.09
Hemoglobina (g/dL)	5.86	0.51	5.96	0.98	6.57	0.57	6.17	0.60
VEM (μ m)	351.07	85.35	524.56	114.93	707.65	136.77	520.59	94.39
HEM (pg)	98.12	16.00	139.14	29.59	159.39	29.31	110.29	21.17
CHEM (g/dL)	28.55	3.27	26.63	2.56	22.68	2.43	21.18	0.79
MDA (g/dL)	1.13	0.70	1.35	0.16	1.77	0.48	1.87	0.49
Proteine (g/dLser)	3.39	0.31	3.60	0.25	4.00	0.24	3.86	0.34
Glucoza (mg/dLser)	88.93	1.74	86.06	2.62	88.78	0.97	91.07	1.66
Lizozim (U/mL)	7.12	0.77	7.49	0.71	8.45	0.61	8.38	0.71
Cortizol (ng/mL)	43.18	0.49	43.59	0.54	43.89	0.49	44.30	0.55

În condițiile creșterii industriale a hibridului Best Beluga în regim de temperatură optimă, rata de supraviețuire din momentul ecolzării până la juvenili de 5-10 g este de aproximativ 50-55%. Indicele creșterii în greutate a hibridurilor BB a fost mai mare decât cel al hibridurilor cu medie de 22%. La vârsta de 1,5 ani media greutății hibridului BB a fost de 2673.33 kg în timp ce media greutății hibridului B a fost de 2081.5. În cazul hibridului BB însă variabilitatea a fost considerabil mai mare (CV=30.4%) față de hibridul bester (CV a fost de numai 18.6%).

În ceea ce privește talia maximă BB a ajuns la 4,5 kg până la vârsta de 1,5 ani față de numai 3 kg pentru bester la aceeași vârstă.

Hibridizarea dintre speciile anadrome și potamodrome sugerează un efect considerabil de heteroză în prima generație (bester F1). Retroincrușarea acestuia cu specia parentală *Huso huso* (mascul) demonstrează o rată de creștere mai mare decât cea a hibridului bester. Prin urmare, hibridul Best Beluga poate fi evaluat ca un hibrid promițător pentru industria sturionicolă.

Activitatea III.6 Diseminarea rezultatelor prin prezentarea la conferințe naționale și/sau internaționale, publicarea de articole științifice și completarea paginii web a proiectului.

Articole în reviste cotate ISI

A. Burcea, G.O. Popa, I.E. Florescu (Gune), M. Maoreanu, A. Dudu, S.E. Georgescu, M. Costache 2018. Expression Characterization of Six Genes Possibly Involved in Gonad Development for Stellate Sturgeon Individuals (*Acipenser stellatus*, Pallas 1771), International Journal of Genomics, volume 2018, article ID 7835637, 10 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/7835637>.

Articole în ISI Proceedings

Dediu Lorena, Andrei (Guriencu) Raluca Cristina, Cristea Victor, Crețu Mirela, Docan Angelica, Mogodan Alina, Grecu Iulia, 2018. Effect of body mass on the standard metabolic rate (SMR) and routine metabolic rate (RMR) of young of the year of sterlet sturgeon and bestbeluga hybrid. Published in ISI Proceedings of International Conference on Life Sciences, IBN: 978-88-85813-24-3, Filodiritto Publisher.

Articole în reviste indexate BDI

Popa G.O., Samu M., Nechifor R., Dudu A., Georgescu S.E., 2018. RP1S7 – A Possible Marker for Sturgeon Hybrids Identification, Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 51(1):102-105.

Burcea A., Florescu (Gune) I.E., Popa G.O., Maoreanu M., Dudu A., Costache M., Georgescu S.E., 2018. Dmrt1 and Cyp17a1 Protein Detection and Relative Quantification in Best Beluga Hybrid Sturgeon Gonads, Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 51(1):78-81.

Andrei Guriencu, R.C., Cristea, V., Crețu, M., Dediu, L., Docan, A.I., The effect of feeding rate on growth performance and body composition of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) juveniles, (2018) AACL Bioflux, 11 (3), pp. 645-652.

Raluca-Cristina Andrei (Guriencu), Victor Cristea, Mirela Crețu, Lorena Dediu and Alina Mogodan. The effect of temperature on the standard and routine metabolic rates of young of the year Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). AACL Bioflux, 201X, Volume X, Issue X. [HTTP://WWW.BIOFLUX.COM.RO/AACL](http://WWW.BIOFLUX.COM.RO/AACL) (accepted, in press)

Participări la conferințe internaționale

1. Popa G.O., Samu M., Nechifor R., Dudu A., Georgescu S.E., RP1S7 – A Possible Marker for Sturgeon Hybrids Identification, Book of abstracts, International Conference on Life Science „Bioengineering of Animal Resources”, Timișoara, 24-25 May 2018, p. 24.
2. Burcea A., Florescu (Gune) I.E., Popa G.O., Maoreanu M., Dudu A., Costache M., Georgescu S.E., 2018. Dmrt1 and Cyp17a1 Protein Detection and Relative Quantification in Best Beluga Hybrid Sturgeon Gonads, Book of abstracts, International Conference on Life Science „Bioengineering of Animal Resources”, Timișoara, 24-25 May 2018, p. 72.
3. DEDIU Lorena, ANDREI (GURIENCU) Raluca Cristina, CRISTEA Victor, CREȚU Mirela, DOCAN Angelica, MOGODAN Alina, GRECU Iulia. Effect of body mass on the standard metabolic rate (SMR) and routine metabolic rate (RMR) of young of the year of sterlet sturgeon and bestbeluga hybrid. The 1st International Conference on Life Sciences, Timisoara 2018.
4. Lorena Dediu, Mirela Crețu, Angelica Docan, Stefan Petrea, Marian Coada. Growth performance and variability of two sturgeon hybrids. 8th INTERNATIONAL CONFERENCE “WATER & FISH” CONFERENCE, Serbia June, 13 – 15. 2018. (Abstract in proceedings).
5. Lorena Dediu, Raluca Cristina Andrei (Guriencu), Victor, Cristea, Mogodan Alina, Angelica Docan, Iulia Grecu . Comparison of swimming capacity of *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser ruthenus* and hybrid sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* x *Acipenser ruthenus*). FITFISH ANNUAL CONFERENCE, 20th April 2018, Porto, Portugal.

BIBLIOGRAFIE

- 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.
- 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.
- Devlin R.H., Nagahama Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208(3-4):191-364.
- 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* 89:1441–1449.
- 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.
- 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.
- 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
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yue H, Li C., Du H., Zhang S., Wei Q. (2015) Sequencing and De Novo Assembly of the Gonadal Transcriptome of the Endangered Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*). *PLoS One* 10(6): e0127332.
- 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.