PN-III-P2-Parteneriate 16PED/2017 - Tehnologie de obținere a unui stoc valoros de lostriță pentru creșterea în acvacultură și reintroducerea în mediul natural
Acronim: ACVALOSTEH

Etapa II. Obținerea stocului de descendenți de lostriță cu parametri morfo-productivi superiori și elaborarea tehnologiei de creștere a acestora în condiții de acvacultură.
Activitatea II.1. Recoltarea, transportul și conservarea de probe biologice de la descendenții de lostriță obținuți în urma încrucișărilor selective.
Activitatea II.2. Obținerea primelor linii de descendenți de lostriță cu parametri morfo-productivi superiori utile atât pentru creșterea în acvacultură, cât și pentru activități de repopulare a habitatelor naturale.
Activitatea II.3. Caracterizarea genetică a descendenților de lostriță cu ajutorul markerilor moleculari.
Activitatea II.4. Selectarea descendenților având caracteristici morfo-productive superioare și grad ridicat de adaptabilitate în vederea obținerii unui stoc valoros de lostriță.
Activitatea II.5. Elaborarea unei noi tehnologii de reproducere și creștere a lostriței în condiții de acvacultură specifice țării noastre.
Activitatea II.6. Diseminarea rezultatelor prin prezentarea la conferințe naționale și/sau internaționale, publicarea de articole științifice și completarea paginii web a proiectului.

REZUMAT

Creșterea lostriței în captivitate a demarat inițial în ferme piscicole dedicate altor specii de salmonide, dar cu timpul, în urma acumulării graduale de experiență privind condițiile de creștere a lostriței, s-a demonstrat că este nevoie totuși de unele cerințe aparte, speciale pentru punerea în practică a unei tehnologii eficiente.
Metodele de identificare a variabilităţii genetice din cadrul populaţiilor de peşti au fost îmbunătăţite pe măsura înregistrării unor noi progrese în domeniul markerilor moleculari. În ultimii ani, datorită mai multor avantaje, markerii nucleari (diferite secvenţe repetitive, gene) au devenit markerii preferaţi pentru analiza variabilităţii genetice în cadrul speciilor şi/sau populaţiilor, respectiv în vederea evaluării caracterelor morfo-productive în cadrul stocurilor din acvacultură.
Descrierea morfologică şi analiza morfometrică au fost primele metode utilizate pentru a defini speciile, dar tehnicile de biochimie şi biologie moleculară şi-au găsit rapid locul în astfel de cercetări. Pe baza rezultatelor obținute, putem afirma că utilizarea markerilor moleculari în scopul evaluării și caracterizării structurii genetice a genitorilor și descendenților de lostriță din acvacultură este necesară deoarece este esențială obținerea unor linii de descendenți cu adaptabilitate şi caractere morfo-productive superioare, dacă intenționăm ca această specie fanion a fluviului Dunărea să nu dispară definitiv. Generațiile de descendenți selecționați pe criterii morfologice și genetice, cu caracteristici superioare, pot fi utilizate ulterior atât în acvacultură, pentru a reduce presiunea asupra populațiilor din sălbăticie, cât și pentru repopularea habitatelor naturale, ocupate tradițional de lostriță.
Tehnologia de reproducere artificială şi creştere a lostriței cuprinde mai multe etape, după cum urmează: selectarea unui lot de genitori caracterizați din punct de vedere morfologic și genetic, evaluarea stării reproductive a acestora, transportul, staționarea și creșterea genitorilor, recoltarea produselor sexuale (icre şi lapți), fecundarea, incubarea în incinte special amenajate și obținerea generațiilor de descendenți. În contextul perfecționării tehnologiilor de creștere intensive, actualul proiect a reușit să clarifice într-o anumită măsură numeroasele aspecte tehnologice legate de obținerea, adaptarea și creșterea lostriței în condiții de captivitate.

Activitatea II.1. Recoltarea, transportul şi conservarea de probe biologice de la descendenţii de lostriţă obţinuţi în urma încrucişărilor selective.

Pentru recoltarea probelor de ţesut de la descendenţii de lostriţă obţinuţi în prima generaţie se recoltează o porţiune mică din înotătoarea codală cu ajutorul unor foarfece sau a unui bisturiu. Persoana care colectează probele trebuie să poarte mănuşi care se dezinfectează cu spirt medicinal între două recoltări succesive. De asemenea, foarfecele trebuie să fie bine dezinfectat între două colectări. Mărimea porţiunii de înotătoare trebuie să fie foarte redusă, pentru a nu afecta exemplarele care sunt încă într-un stadiu incipient de viaţă şi nu au dimensiunile unor adulţi. Ulterior, fiecare probă de înotătoare va fi stocată separat în tuburi de centrifugă care conţin etanol de concentraţie superioară (96-100%). Întreaga porţiune de ţesut trebuie să fie complet imersată în alcool şi să nu fie expusă contactului cu aerul. Etanolul permite păstrarea ţesutului la temperatura camerei şi nu este necesar ca recipientul cu proba să fie refrigerat. Fiecare tub se etichetează corespunzător iar informaţiile trecute pe etichetă se referă la specia de la care s-a colectat proba, localitatea, numărul probei, data colectării probei. Depozitarea probelor se face la -20°C. Izolarea ADN genomic se realizează având la bază un procedeu clasic de extracţie care se desfăşoară în mai multe etape: i. omogenizarea ţesutului prin procedee chimice; ii. îndepărtarea membranelor lipidice utilizând detergenţi; iii. îndepărtarea proteinelor (cu proteaze şi prin precipitare cu solvenţi organici) şi ARN (cu ribonuclează); iv. precipitarea ADN în soluţie alcoolică concentrată (izopropanol).

Activitatea II.2. Obţinerea primelor linii de descendenţi de lostriţă cu parametri morfo-productivi superiori utile atât pentru creşterea în acvacultură, cât şi pentru activităţi de repopulare a habitatelor naturale. Activitatea II.3. Caracterizarea genetică a descendenţilor de lostriţă cu ajutorul markerilor moleculari. Activitatea II.4. Selectarea descendenţilor având caracteristici morfo-productive superioare şi grad ridicat de adaptabilitate în vederea obţinerii unui stoc valoros de lostriţă.

Genomul peştilor prezintă multe secvenţe genetice repetitive, dintre acestea microsateliţii prezentând cel mai mare interes pentru realizarea testelor pe bază de ADN. Microsateliţii sunt secvenţe repetitive scurte, de 2-9 pb, dispersate în întregul genom şi cu un înalt grad de polimorfism. Acesta din urmă reflectă moştenirea genetică şi permite detectarea diferenţelor între diferiţi indivizi. Analiza la nivel molecular a descendenţilor s-a realizat şi cu ajutorul markeri nucleari de tipul microsateliţilor. Astfel, în urma acestor analize, prin tehnica de genotiparea, este posibil să determinăm originea acestora, dar şi nivelul de heterozigoţie al liniilor/stocurilor de acvacultură şi distanţa genetică dintre acestea. Analiza markerilor microsateliţi s-a realizat în cazul tuturor descendenţilor viabili rezultaţi în urma încrucişărilor controlate a reproducătorilor de lostriţă.

După izolarea ADN genomic din fragmentele de înotătoare, puritatea şi concentraţia probelor ADN a fost verificată spectrofotometric prin citirea soluţiilor de ADN la un spectrofotometru de tip NanoDrop8000.

Microsateliţii au fost amplificaţi prin reacţii PCR multiplex, iar ulterior, analiza s-a realizat prin electroforeză capilară cu detecţie în fluorescenţă. Locii analizaţi au prezentat la toţi indivizii un profil diploid, ceea ce înseamnă că pentru fiecare individ analizat a fost obţinut un singur semnal (corespunzător pentru două alele identice - individ homozigot) sau două (corespunzătoare pentru două alele diferite-individ heterozigot). Mărimile alelelor obţinute după amplificare sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1. Locii analizați, secvența primerilor și mărimea alelelor obținute.

Locus	**Secvența primerilor (5'-->3')/ marcator fluorescent**	**Motiv repetitiv**	**Număr de alele**	**Mărimea alelelor (pb)**
GATA501	F: HEX-tgacccctcacaggcaaag R: gtactntattgtgattctgcgaatgcc	$(GACA)_6$	2	155–159
GACA448	F: HEX-gaactggtctactgaggaggtg R: gacgtattcaacttttccaaaccct	$(GACA)_{17}(CA)_8$	6	187–259
GACA142	F: HEX-gacgtattcaacttttccaaaccct R: ctccgttcaccgctatcag	$(GATT)_{10}$	3	275–287
GACA559	F: FAM-tgttttgtttggaccagtcaagtaacg R: aagtctgaatactcaataatcaattgcagg	$(TS)_{54}$	8	206–226
HLJZ023	F: FAM-caagaggctccgcaggtt R: ctggcagtttgctcagat	$(ACA)_{50}$	5	262–283
OMM1064	F: NED-agaatgctactggtggctgtattgtga R: tctgaaagacaggtggatggttcc	$(ACAG)_x(ACAG)_2(ACAAAC)(ACAG)_x$	5	147–231
GATA31	F: FAM-acagtgcatccctagccatc R: gaccaggacccatagggaat	$(GATA)_{18}$	3	216–234
TAR101	F: HEX-cagagcacaccaagcagag R: agggcaagtcattccagtc	$(CTTT)_{22}$	5	218–238
ONE2	F: FAM-ggtgccaaggttcagtttatgtt R: caggaatttacaggacccaggtt	$(GA)_{12}$	6	209–239

Locii cu aceeași temperatură de hibridizare au fost amplificați în aceeași reacție de tip PCR multiplex. Astfel, locii GATA501, GACA448, HLJZ023, OMM1064, TAR101și ONE2 au fost amplificați într-o reacție 6-plex, locii GACA142 și GACA559 au fost amplificați într-o reacție de tip 2-plex, iar locusul GATA31 a fost amplificat individual.

Au fost stabilite genotipurile indvizilor analizați. Locusul cu cel mai ridicat grad de polimorfism a fost reprezentat de GACA559, cu opt alele identificate în lotul analizat, iar locusul cel mai puțin polimorf a fost GATA501, cu două alele. După stabilirea genotipurilor, pentru fiecare dintre indivizii analizați au fost calculați următorii parametri: frecvența alelică, indicele PIC (*Polymorphic Information Content*), heterozigoția observată (H_o), heterozigoția așteptată (H_e) (Tabel 2). Valorile PIC au fost calculate utilizând resursa online "PIC calculator" (https://www.liverpool.ac.uk/~kempsj/pic.html), în timp ce restul indicilor statistici au fost determinați cu ajutorul programului Genetix 4.05.2 (Belkhir et al., 2004).

Tabel 2. Indicii statistici care estimează variabilitatea genetică la descendenții analizați.

Locus	**Mărimea alelelor**	**Frecvența alelică**	**PIC**	**He**	**Ho**
GATA501	155	0,4402	0,3652	0,5087	0,5726
	159	0,5598			
GACA448	187	0,1350	0,7750	0,8158	0,9870
	199	0,1350			
	211	0,2300			
	217	0,0833			

	247	0,2500			
	259	0,1667			
GACA142	275	0,5000	0,4876	0,5897	0,6256
	279	0,2500			
	287	0,2500			
GACA559	206	0,0417	0,8254	0,8682	0,9866
	212	0,2500			
	214	0,1667			
	216	0,0833			
	218	0,0417			
	220	0,1667			
	222	0,1667			
	226	0,0833			
HLJZ023	262	0,2917	0,6987	0,7623	0,6123
	268	0,1667			
	271	0,2083			
	277	0,0833			
	283	0,2500			
OMM1064	147	0,2500	0,7454	0,7964	0,6118
	165	0,3333			
	181	0,1250			
	219	0,2083			
	231	0,0833			
GATA31	216	0,2500	0,5129	0,6058	0,5733
	228	0,2500			
	234	0,5000			
TAR101	218	0,1250	0,7214	0,8113	0,8857
	222	0,2500			
	226	0,1250			
	234	0,2917			
	238	0,2083			
ONE2	209	0,2500	0,8876	0,8439	0,7875
	215	0,1250			
	219	0,1250			
	231	0,1250			
	235	0,1250			
	239	0,2500			

Rezultatele obținute de noi pentru locii analizați demonstrează că acești markeri prezintă un grad semnificativ de polimorfism și pot fi utilizați pentru caracterizarea descendenților.

O parte a cercetărilor au urmărit aspecte morfologice ale creșterii indivizilor de lostriță. O nouă abordare în acest sens este studiul unor. Până în prezent, markeri moleculari asociați cu procesul de creștere nu au fost analizați la *Hucho hucho*, ci la alte specii din familia *Salmonidae* (*Salmo salar, Oncorhynchus mykiss*) (Fleming et al., 2002; Salem et al., 2012; Sun et al., 2012; Peñaloza

et al., 2013; Tsai et al., 2014; Nazari et al., 2016). Markerii vizați au fost molecule implicate în creștere: miostatina, hormonul de creștere sau factorul de creștere *insulin-like*. Rezultatele au arătat că mutații punctiforme de tip SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) în secvența nucleotidică a genelor ce codifică proteinele amintite pot fi corelate cu rata creșterii indivizilor analizați. Prin analogie, acești markeri pot fi studiați și pentru lostriță pentru a putea accelera ritmul de creștere și de dezvoltare a indivizilor în acvacultură.

Miostatina (MSTN), cunoscută și ca factorul de diferențiere a creșterii – 8 GDF-8, este exprimată la pești în diverse tipuri de țesuturi printre care mușchi scheletic, branhii, creier, ovar, având astfel funcții suplimentare, nu doar în procesul de creștere al mușchiului scheletic (Nazari et al., 2016). Miostatina are rol de reglator negativ în procesul de creștere, mutațiile punctiforme ducând la inactivarea proteinei prin modificarea procesului de expresie genică sau a splicingului (Rebhan și Funkenstein, 2008). Au fost descoperite mai multe variante ale genei *mstn* la pești, polimorfismele determinate la nivelul genei demonstrând variabilitatea genei. Această variație a nucleotidelor este asociată cu modificări ale procesului de creștere, ceea ce recomandă studiul acestui marker pentru îmbunătățirea creșterii în acvacultură (Nazari et al., 2016).

La vertebrate, hormonul reglator principal al creșterii este hormonul de creștere (GH – *Growth Hormone*), stimulând creșterea scheletică și a mușchilor (Fleming et al., 2002). Speciile de salmonide au dobândit în urma tetraploidizării (Allendorf și Thorgaard 1984), două gene diferite ce codifică pentru hormonul de creștere – GH1 și GH2 (Phillips et al., 2004). Studiile pe salmonide arată că GH stimulează acumularea de proteine și de lipide, ceea ce duce la o creștere rapidă. Cu toate acestea, nu a fost demonstrat că administrarea de GH speciilor din acvacultură conduce la schimbări ale procesului de creștere a acestora (Fleming et al., 2002). În ceea ce privește polimorfismele SNP în genele pentru GH, au fost identificate astfel de mutații corelate cu dezvoltarea indivizilor de salmonide la speciile *Salvelinus alpinus* (Tao et al., 2003), *Salmo salar* (Ryynanen și Primmer, 2004), *Oncorhynchus mykiss* (Gorji et al., 2016).

În ceea ce privește factorul de creștere *insulin-like* IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1), acesta este o proteină mediator a efectelor GH, producerea lor fiind stimulată de GH (Moriyama et al., 2000; Tsai et al., 2014). Gena IGF1 este conservată la salmonide cu o identitate de secvență de 93 – 98% și poate fi considerată un marker de creștere la pești datorită rolului său în sistemul de reglare GH (Moghadam et al., 2007; Tsai et al., 2014). Așadar, studiul IGF1 ar putea duce la îmbunătățirea performanțelor creșterii salmonidelor în acvacultură. În cadrul acestei gene au fost observate polimorfisme asociate creșterii la specia *Salmo salar* (Tsai et al., 2014).

Probele de înotătoare au fost prelevate de la juvenili de lostriță separați și crescuți în două loturi: Lotul 1 – indivizi cu o creștere lentă și Lotul 2 – indivizi cu o creștere rapidă. Au fost utilizate patru perechi de primeri pentru amplificarea unor fragmente genice posibil implicate în influențarea ratei de creștere.

Pentru regiunea SaMSTNb23 s-a observat amplificarea unui fragment de 600 pb, pentru regiunea SaMSTNb33 s-a obținut tot un fragment de 600 pb, pentru regiunea GH1_int1_3 s-a obținut un fragment de 900 pb, pentru regiunea IGF_Pex1 s-a obținut un fragment de 700 pb. Ampliconii au fost purificați cu protocolul kitului Wizard SV Gel (Promega) din produsul de PCR. Eluția fragmentelor s-a realizat în 50 µl apă ultrapură și ampliconii purificați au fost introduși în reacția de secvențiere. Secvențele obținute au fost editate manual cu BioEdit, verificate prin BLAST cu secvențe de referință și aliniate unele față de altele pentru a observa prezența unor posibile polimorfisme. După descărcarea secvențelor de referință identificate pentru fiecare fragment amplificat în parte, secvențele obținute în laborator au fost aliniate față de acestea pentru identificarea unor posibile polimorfisme de secvență la nivel inter-specific (Figurile 1-4).

Analizând aliniamentul secvențelor proprii amplificate cu SaMSTNb23 și SaMSTNb33, pot fi identificate următoarele mutații punctiforme: 3 T > A, 65 A > T, 101 G > T, 104 C > T, 114 G > A, 453 T > C și 492 C > G, în cadrul secvențelor amplificate cu SaMSTNb23, respectiv 491 A > G, în cadrul secvențelor amplificate cu SaMSTNb33. Aceste polimorfisme nu sunt caracteristice tuturor indivizilor dintr-un lot. Având în vedere aceste rezultate, polimorfismele evidențiate la nivelul genei pentru miostatină nu pot fi asociate cu creșterea indivizilor și dirijarea selecției în acvacultură. Deși lostrița face parte din aceeași familie cu specii precum *Salmo salar* sau *Oncorhynchus mykiss*, având o identitate de secvență în raportul BLAST pentru miostatină de 94–96% cu aceste două specii, se pare că semnalizarea creșterii este controlată diferit în cazul lostriței. Așadar, markerii SaMSTNb23 și SaMSTNb33 nu sunt adecvați pentru analiza genetică a creșterii diferențiate a lostriței. Analiza BLAST oferă informații cu privire la regiunile genice cu care secvențele studiate prezintă similaritate. Astfel, secvențele amplificate cu SaMSTNb23 au similaritate cu regiunea promotor a miostatinei 1b de la *Salmo salar*. Secvențele amplificate cu SaMSTNb33 au similaritate cu regiune reglatoare a secvenței JN990753.1 (*Salmo salar*), regiunea 3` a intronului 1 și regiunea 5` a exonului 2 ale secvenței AJ316006.2 (*Salmo salar*) și cu exonul 2 al secvenței DQ138300.1 (*Oncorhynchus mykiss*). Comparând secvențele analizate și cele de referință, regiunile identice numeroase confirmă identitatea secvențelor proprii cu grupul genelor pentru miostatină, dar polimorfismele observate nu oferă informații cu privire la diferențele între specii.

Câteva exemple de astfel de polimorfisme ar fi: 14 T > C, 86 C > A, 93 G > T, 129 G > T, 135 C > T, 156 T > C, 162 A > T, 175 T > G, 176 G > C, 218 A > G, 252 T > C, 257 A > C, 271 A > G, 299 T > G, 305 T > A, 332 A > T, 380 G > C din secvența AJ316006.2, referință pentru SaMSTNb23, și 86 G > C (DQ138300.1), 99 T > A (DQ138300.1), 112 A > G (DQ138300.1), 65, 129, 135 A > T (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 132 G > T (DQ138300.1), 71, 135, 141 G > C (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 81, 145, 151 A > G (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 83, 147, 153 G > T (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 103, 173 C > A (AJ316006.2, JN990753.1), 110, 174, 180 T > A (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 114, 178, 184 T > G (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 180 T > C (DQ138300.1), 114, 214 A > G (AJ316006.2, JN990753.1), 160, 224, 230 A > C (AJ316006.2, DQ138300.1, JN990753.1), 181, 251 G > A (AJ316006.2, JN990753.1), 207, 277 C > G (AJ316006.2, JN990753.1), 304 C > G (DQ138300.1), 263, 333 G > C (AJ316006.2, JN990753.1), din cadrul secvențelor de referință pentru SaMSTNb33. Se poate observa că în cazul markerului SaMSTNb33, apar multe diferențe între secvențele proprii și cele de referință. Acestea ar putea sta la baza neconcordanței rezultatelor studiilor anterioare și rezultatele prezentate.

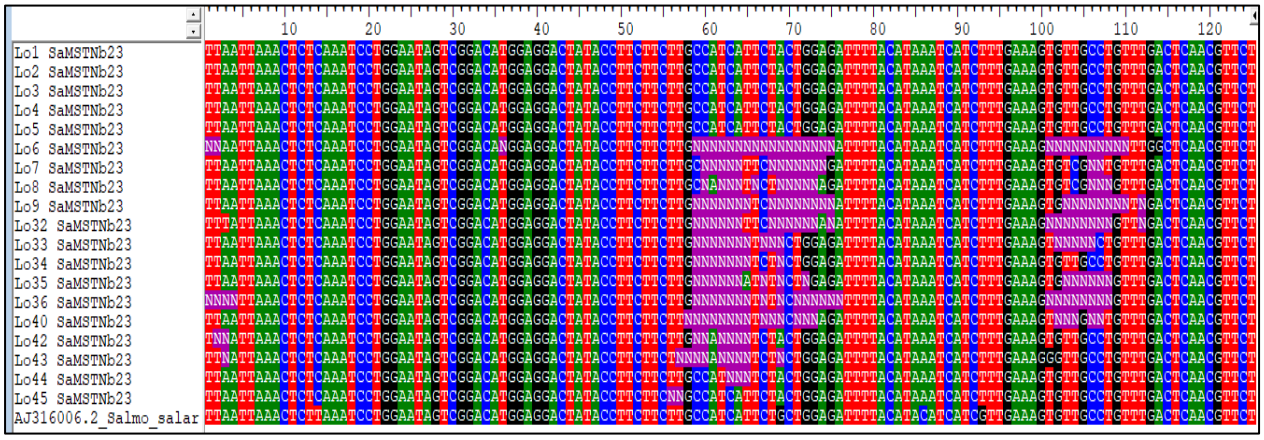
Aceleași perechi de primeri (SaMSTNb23 și SaMSTNb33) au fost folosite pentru prim dată de Peñaloza și colab. la specia *Salmo salar*, și au observat că polimorfismul 1086 C > T din regiunea reglatoare a miostatinei este asociat cu modificări în procesul de creștere. De asemenea, Salem et al., au realizat un studiu ce a presupus secvențierea transcriptomului țesutului muscular provenit de la indivizi din specia *Oncorhynchus mykiss* cu creștere rapidă și creștere lentă. Aceștia au observat că majoritatea polimorfismelor ce afectează creșterea se regăsesc în regiunea reglatoare. Astfel, se poate spune că localizarea polimorfismelor joacă un rol important în dezvoltarea indivizilor.

Analizând aliniamentul secvențelor proprii amplificate cu perechea ce primeri GH1_int1_3, au fost identificate următoarele polimorfisme: 56 G > T, 116 G > A, 165 T > A, 314 A > T, 419 C > T, 425 T > C, 467 C > T, 536 C > A, 558 C > T, 625 A > T, 644 A > T, 647 T > C, 655 T > C, 659 T > C, 660 C > G, 672 C > G, 734 T > G, 744 C > A, 751 T > A, 771 A > T, 771 C > T, 772

G > T, 772 A > T. Nici în acest caz nu se poate trage o concluzie cum că aceste polimorfisme ar fi implicate în procesul creșterii. Așadar, markerul GH1_int1_3 nu este unul potrivit pentru analiza diferențelor de creștere la specia *Hucho hucho*. În literatură, gena pentru hormonul de creștere GH1 a fost identificată la alte specii, în special *Salmo salar,* ca fiind un marker al creșterii prin detectarea polimorfismelor de secvență (Ryynanen și Primmer, 2004).

Raportul BLAST confirmă identitatea secvențelor studiate, acestea având similaritate cu secvența dintre regiunea 3` a intronului 1 și regiunea 5` a intronului 3 al genei pentru hormonul de creștere la speciile *Coregonus lavaretus* (AB001865.1) și *Salmo salar* (M21573.1). Comparând secvențele analizate și cele de referință au fost identificate o serie de polimorfisme: 5 A > T (AB001865.1), 7 A > G (AB001865.1), 50 G > T (M21573.1), 22 C > T (AB001865.1), 80 C > T (M21573.1), 64, 96 T >A (M21573.1, AB001865.1), 67, 99 G > A (M21573.1, AB001865.1), 100 T > G (AB001865.1), 109 T > C (AB001865.1), 187 T > C (M21573.1), 191 C > T (M21573.1), 168 C > T (AB001865.1), 169 A > C (AB001865.1), 182 A > G (AB001865.1), 218 T > A (M21573.1), 188 G > A (AB001865.1), 221 T > A (M21573.1), 205, 237 T > C(M21573.1, AB001865.1), 211 T > C (AB001865.1), 246 G > A (M21573.1), 249 G > T (M21573.1), 220 C > A (AB001865.1), 221 T > C (AB001865.1), 228 A > T (AB001865.1), 233, 265 T > G (M21573.1, AB001865.1), 272 A > T (M21573.1), 308 T > C (AB001865.1), 321 G > T (AB001865.1), 338 A > G (AB001865.1), 371, 391 C > T (M21573.1, AB001865.1), 394 G > A (M21573.1), 402 A > C (AB001865.1), 435 > 455 C > T (M21573.1, AB001865.1), 449 A > T (AB001865.1), 489 C > T (M21573.1), 502 C > G (M21573.1). Similitudinea de secvență este de 93% (M21573.1), respectiv 90% (AB001865.1), iar diferențele date de polimorfisme au un grad destul de ridicat.

În ceea ce privește analiza markerului IGF_Pex1, nu a fot determinat niciun polimorfism în cadrul secvențelor. Și în cazul său, analiza nu este una informativă cu privire la rata de creștere pentru lostriță, deși acest marker a fost folosit cu succes în alte studii. Tsai et al., au identificat 3 SNP: 5763G > T, în regiunea promotor, 7292 C > T, în intronul 1, 4671 A > C, în intronul 3, primul și ultimul fiind asociate cu creșterea și calitatea cărnii. Raportul BLAST, cu un scor de identitate de 99% (XM_021577177.1), respectiv 96% (AF063216.1), indică un grad ridicat de similitudine de secvență a factorului de creștere *insulin-like* între lostriță și speciile *Oncorhynchus mykiss*, respectiv *Oncorhynchus keta*.



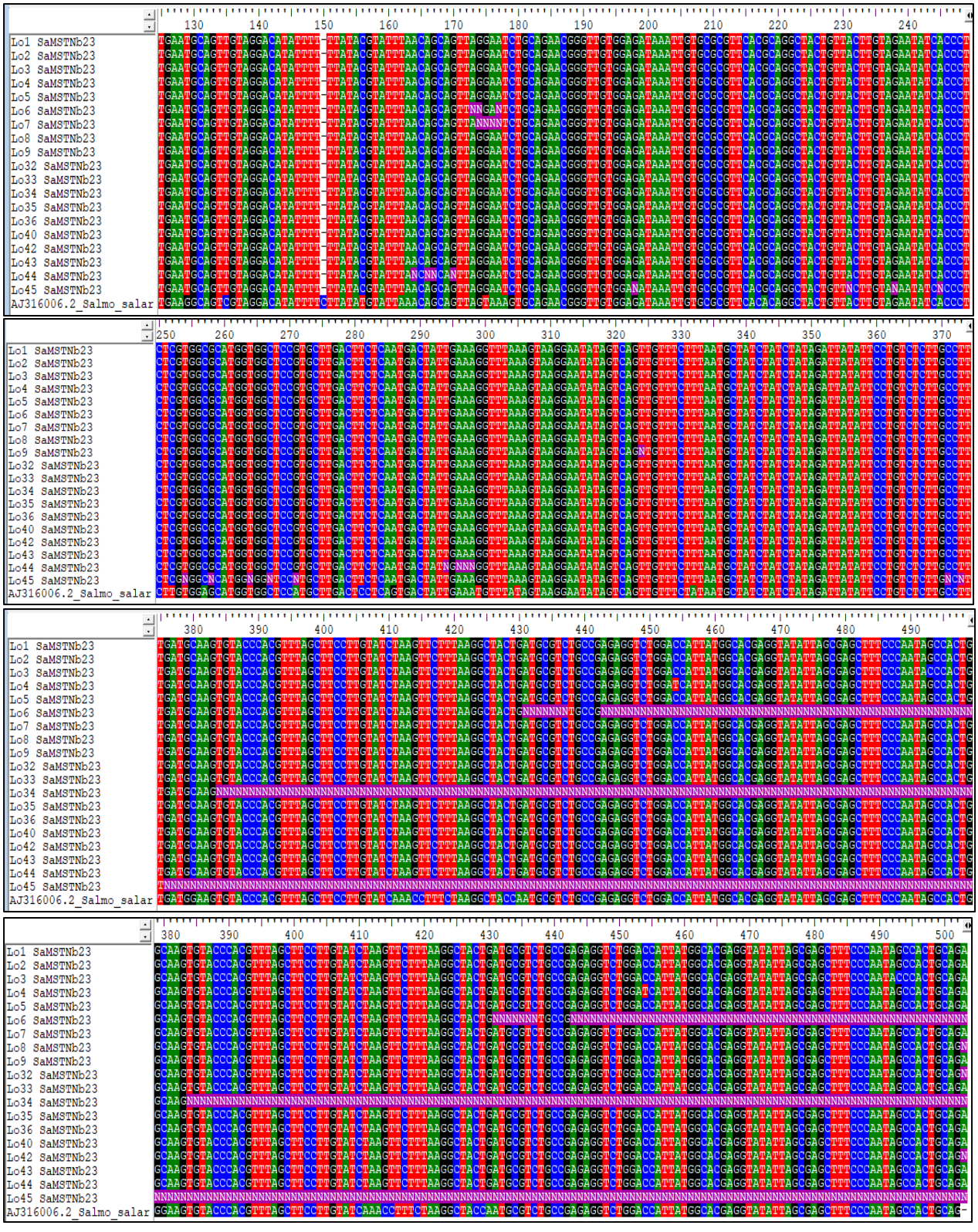
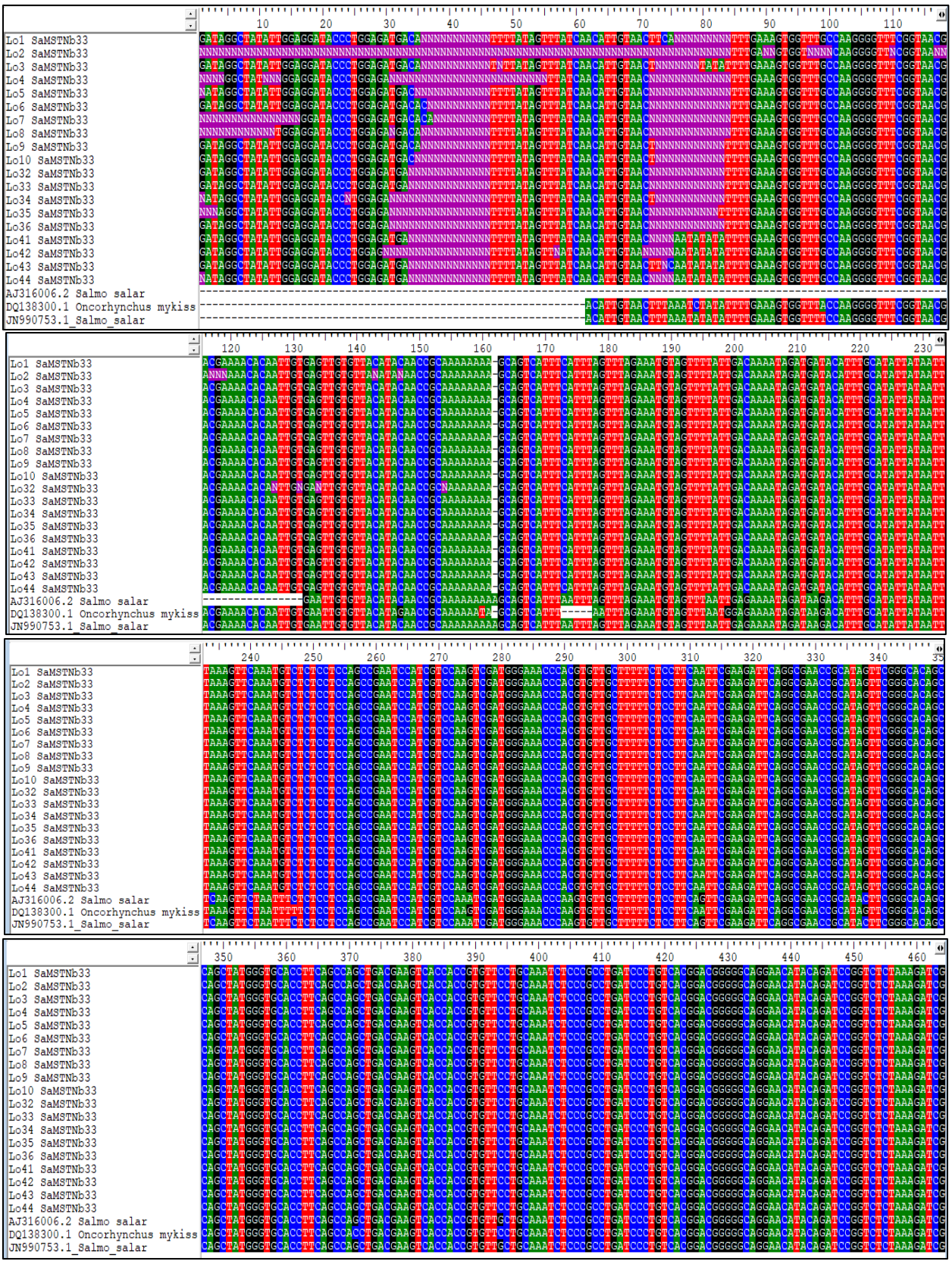


Figura 1. Aliniament pentru fragmentul genic SaMSTNb23.


Lo1 SaMSTNb33
Lo2 SaMSTNb33
Lo3 SaMSTNb33
Lo4 SaMSTNb33
Lo5 SaMSTNb33
Lo6 SaMSTNb33
Lo7 SaMSTNb33
Lo8 SaMSTNb33
Lo9 SaMSTNb33
Lo10 SaMSTNb33
Lo32 SaMSTNb33
Lo33 SaMSTNb33
Lo34 SaMSTNb33
Lo35 SaMSTNb33
Lo36 SaMSTNb33
Lo41 SaMSTNb33
Lo42 SaMSTNb33
Lo43 SaMSTNb33
Lo44 SaMSTNb33
AJ316006.2 Salmo salar
DQ138300.1 Oncorhynchus mykiss
JN990753.1_Salmo_salar

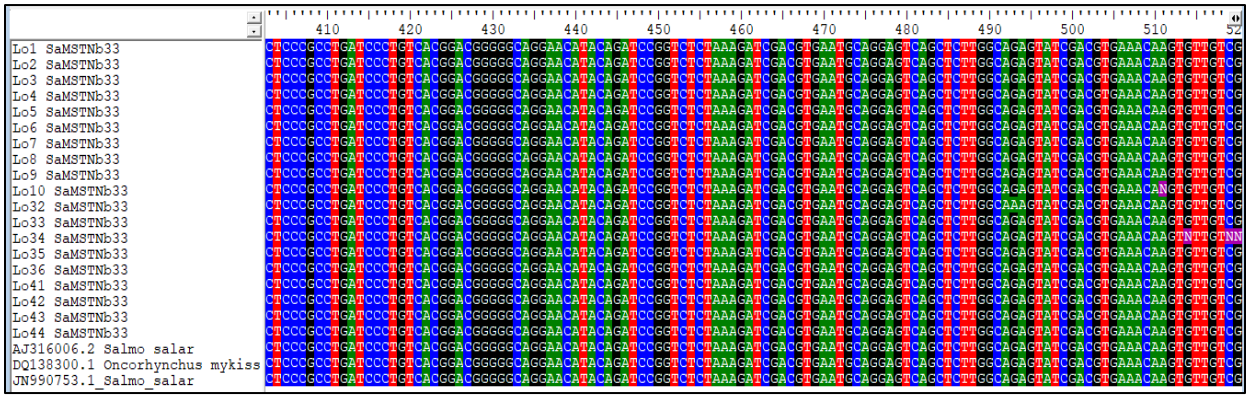
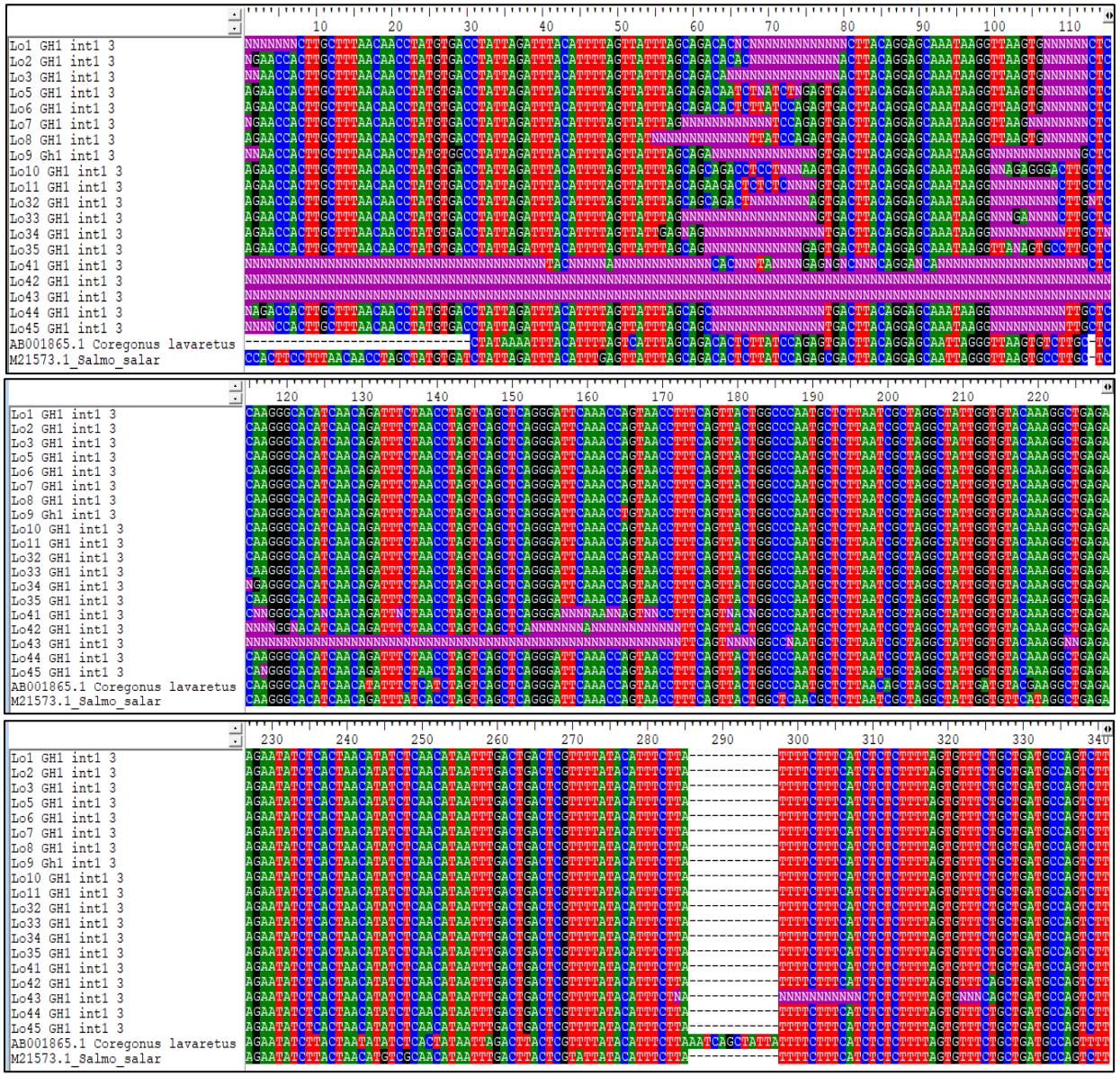
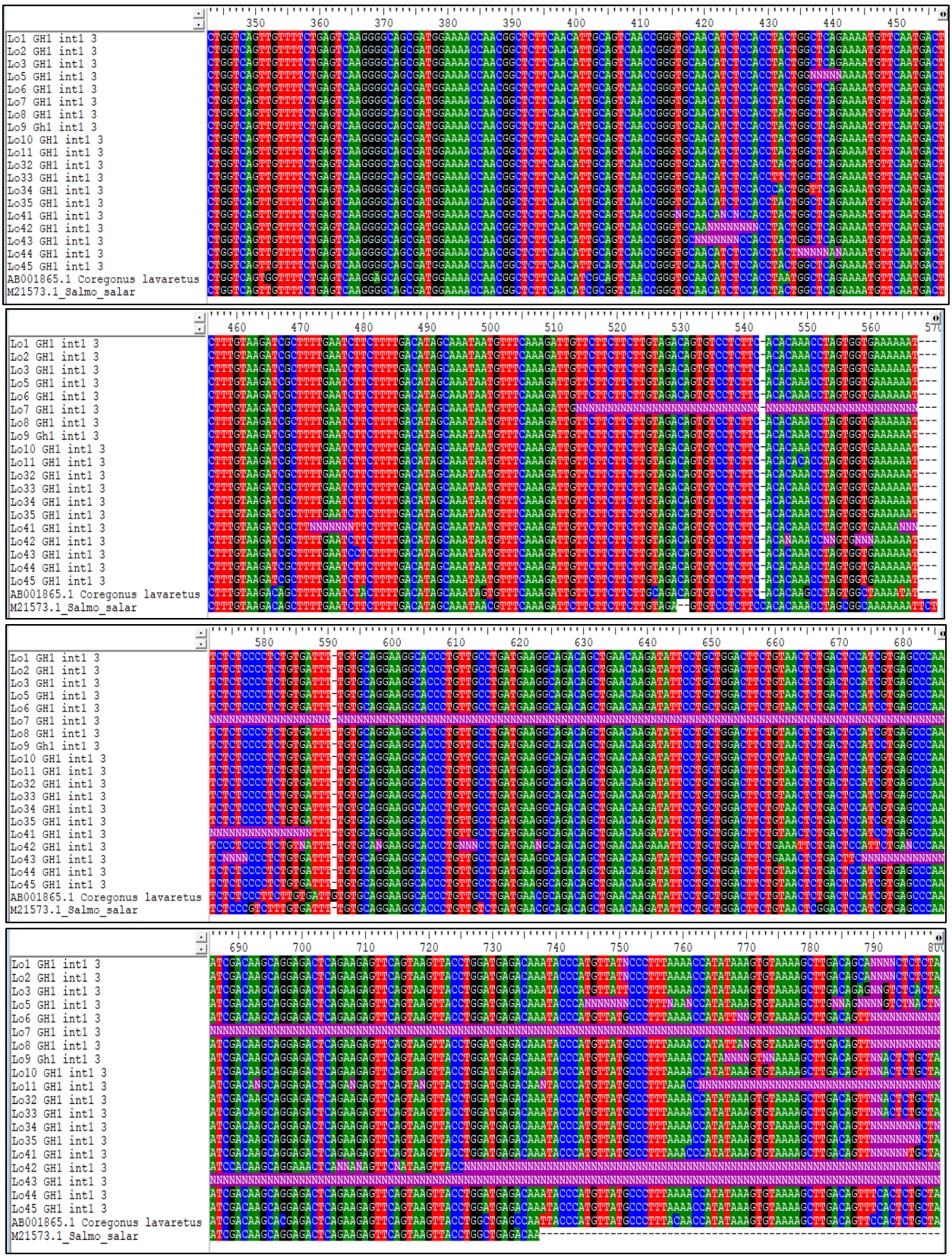


Figura 2. Aliniament pentru fragmentul genic SaMSTNb33.




Lo1 GH1 int1 3
Lo2 GH1 int1 3
Lo3 GH1 int1 3
Lo5 GH1 int1 3
Lo6 GH1 int1 3
Lo7 GH1 int1 3
Lo8 GH1 int1 3
Lo9 Gh1 int1 3
Lo10 GH1 int1 3
Lo11 GH1 int1 3
Lo32 GH1 int1 3
Lo33 GH1 int1 3
Lo34 GH1 int1 3
Lo35 GH1 int1 3
Lo41 GH1 int1 3
Lo42 GH1 int1 3
Lo43 GH1 int1 3
Lo44 GH1 int1 3
Lo45 GH1 int1 3
AB001865.1 Coregonus lavaretus
M21573.1_Salmo_salar

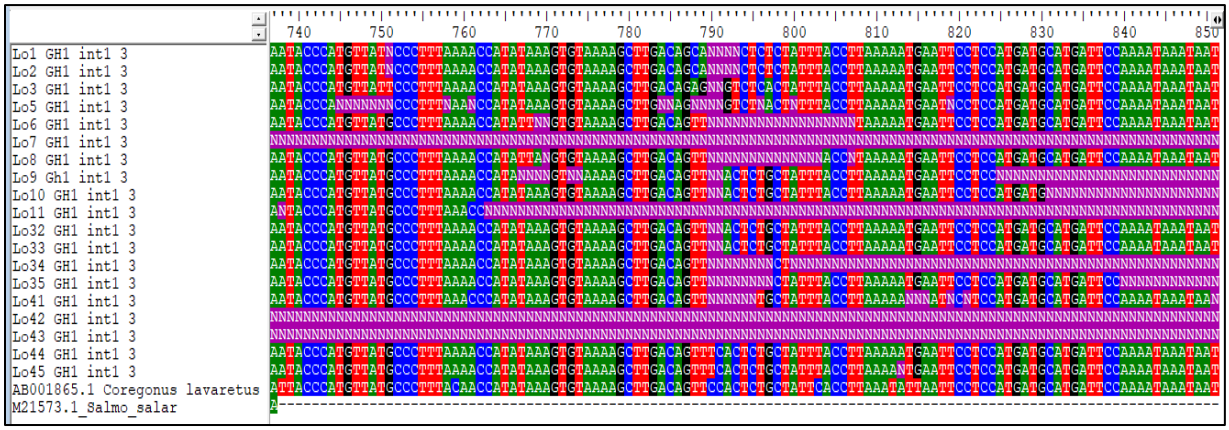
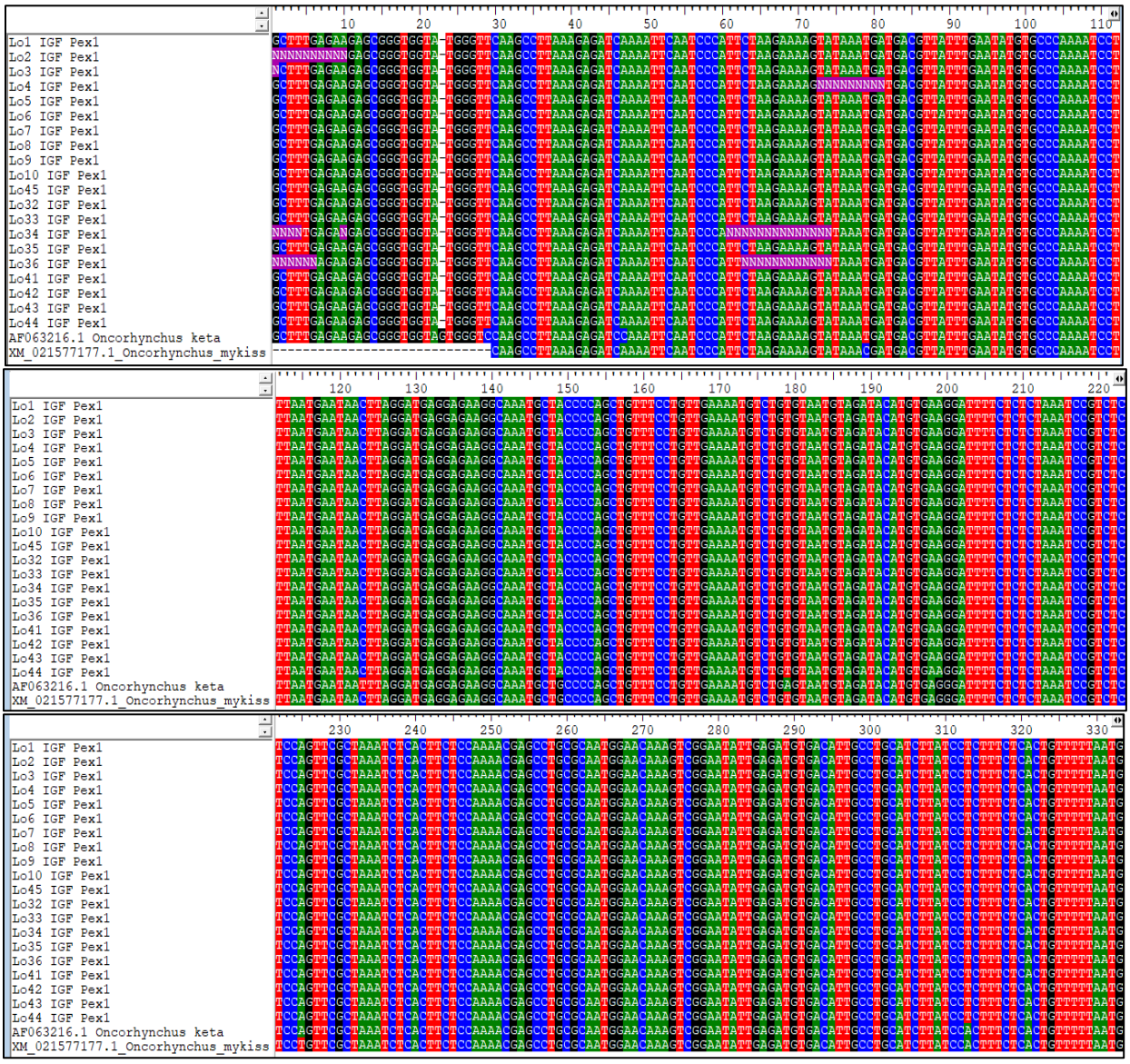


Figura 3. Aliniament pentru fragmentul genic GH1_int1_3.



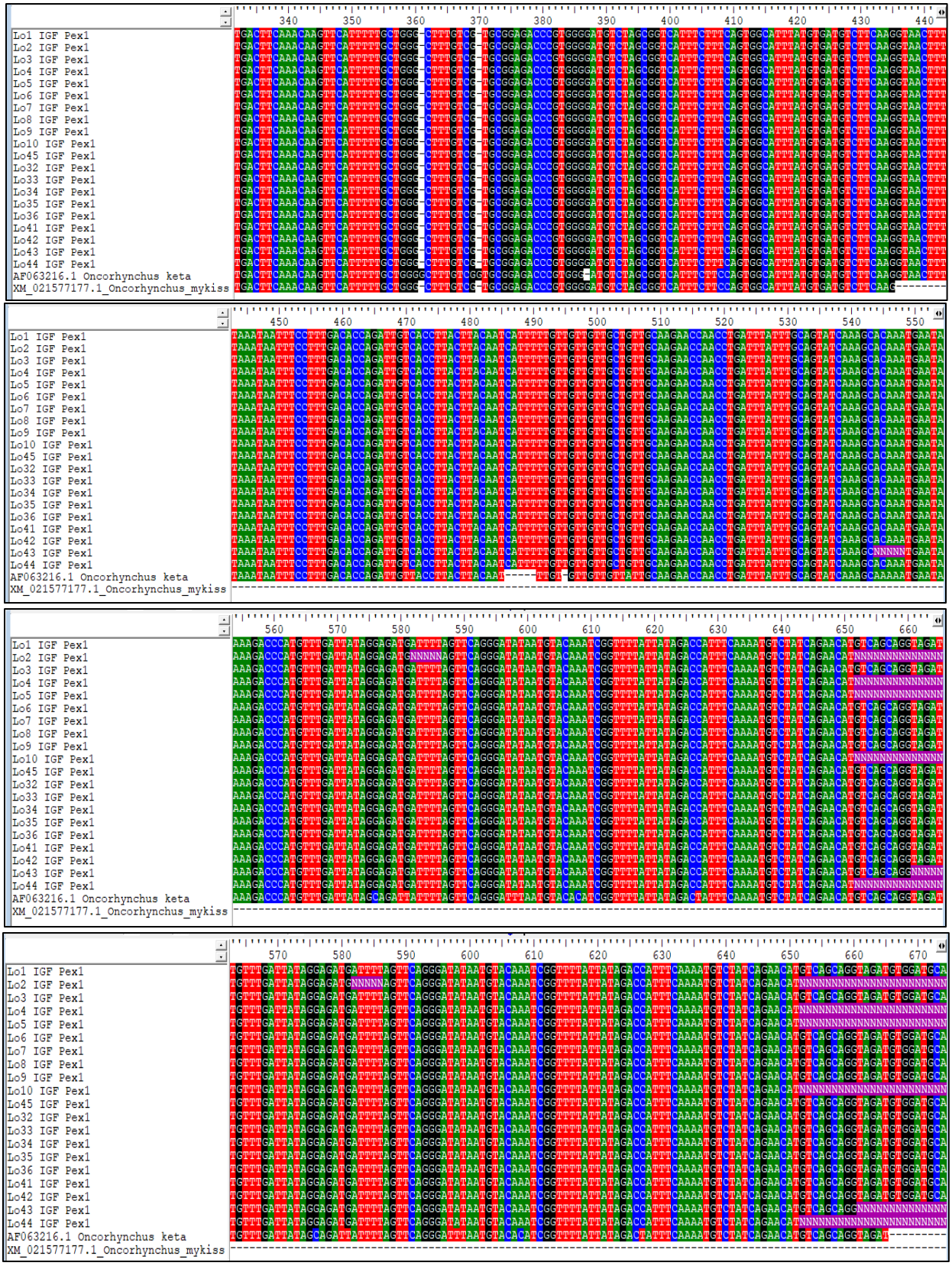


Figura 4. Aliniament pentru fragmentul genic IGF_Pex1.

Mutațiile punctiforme prezente nu oferă informații cu privire la modificările din secvența lostriței ce duc la apariția diferențelor de creștere: 47 C > A (AF063216.1), 50 C > T (XM_021577177.1), 123 T > C (AF063216.1), 149, 120 G > A (AF063216.1, XM_021577177.1), 179 A > T (AF063216.1), 199, 170 G > A (AF063216.1, XM_021577177.1), 196 T > A (XM_021577177.1), 313, 284 A > T (AF063216.1, XM_021577177.1), 407, 377 C > T (AF063216.1, XM_021577177.1), 470 T > C (AF063216.1), 498 A > G (AF063216.1), 538 A > C (AF063216.1), 569 C > G (AF063216.1), 574 T > G (AF063216.1), 591 T > A (AF063216.1), 601 C > A (AF063216.1), 620 T > C (AF063216.1).

Activitatea II.5. Elaborarea unei noi tehnologii de reproducere și creștere a lostriței în condiții de acvacultură specifice țării noastre.

Creșterea lostriței în captivitate a demarat inițial în ferme piscicole dedicate altor specii de salmonide, dar cu timpul, în urma acumulării graduale de experiență privind condițiile de creștere a lostriței, s-a demonstrat că este nevoie totuși de unele cerințe aparte, speciale pentru punerea în practică a unei tehnologii eficiente. Conform lui Georgescu et al., 2018, creșterea în captivitate a lostriței trebuie să respecte o serie întreagă de cerințe, după cum urmează:

Condiții climaterice și hidrologice

Alegerea corectă a amplasamentului de construcție pentru ferma piscicolă este un factor decisiv care influențează mult rata de succes în creșterea lostriței. Pentru lostriță, regiunile cele mai propice sunt acelea unde oscilațiile puternice ale temperaturii apei, în special în timpul primăverii, sunt minore sau lipsesc. De asemenea, sunt de preferat zone în care temperaturile din sezonul rece să fie blânde, cu valori minime ale apei de aproximativ de 1°C, deoarece ele pot afecta comportamentul de hrănire al indivizilor și gradul de utilizare a hranei. Este foarte important ca temperatura apei să nu scadă sub valori de 4-5°C în special în lunile martie-aprilie pentru că ar putea cauza un nivel ridicat de mortalitate în cazul puietului. În ceea ce privește condițiile hidrologice, sursa de apă trebuie să prezinte un debit constant, o calitate superioară și să fie lipsită de contaminanți, deoarece este bine cunoscut faptul că apa și calitatea ei reprezintă factorii decisivi în succesul sau eșecul reproducerii salmonidelor, în general. Apa din fermă trebuie să conțină o concentrație cât mai scăzută de compuși organici, care pot avea un efect negativ în procesul de dezvoltare a icrelor și în etapa de eclozare a puietului (Georgescu et al., 2018).

Amplasamentul crescătoriei

Este ideal ca o viitoare crescătorie de lostriță să fie amplasată pe un teren plan sau cu un unghi de înclinare foarte redus și să asigure o concentrare bună a bazinelor și elementelor constituente ale acesteia. Terenul crescătoriei trebuie să fie impermeabil pentru a permite construirea bazinelor naturale, mai eficiente din punct de vedere economic și biologic (Georgescu et al., 2018).

Componentele crescătoriilor de lostriță

Pentru a beneficia de o funcționalitate normală, orice fermă de creștere a salmonidelor, inclusiv crescătoria de lostriță, are nevoie de o serie de instalații: priza de apă, canalul de alimentare, canalul de evacuare sau de drenare a apei, casa incubatoarelor, bazinele de distribuție și decantare a apei, diversele bazine de creștere, sistemul de reglare a apei și diversele spații de depozitare. În cazul fermelor mixte, pe lângă elementele enumerate mai sus, este nevoie și de alte instalații auxiliare cum ar fi spațiul de pregătirea hranei sau instalația frigorifică (Georgescu et al., 2018).

Hrănirea lostriței în crescătorie

Produsele folosite la hrănire precum și modul de hrănire sunt factori decisivi în privința succesului și a calității acvaculturii lostriței. Produsele utilizate în hrănirea lostriței sunt:
- produsele secundare rezultate din procesul de abatorizare.
- sângele (se poate utiliza proaspăt sau conservat, în amestec cu splina sau ficatul, în special pentru hrana puietului).
- peștele (se administrează fie întreg, pentru reproducători și adulți, fie tocat mărunt și amestecat cu deșeuri de carne și făinuri vegetale, pentru puieți. Peștii vii constituie unul din cele mai valoroase alimente pentru lostrițele de peste doi ani care se hrănesc aproape exclusiv cu pește. Dintre speciile utilizate în acest scop se numără obletele, boișteanul, scobarul etc.
- făina de carne și făina de pește (conțin aproape în întregime substanțele necesare creșterii, fiind alimente complexe mai ales atunci când se prepară din materii prime proaspete).
- făinurile vegetale: servesc de obicei ca liant pentru alte alimente cu care se administrează în amestec.
- hrana granulată (se utilizează doar ca supliment în primii ani de viață ai lostriței).
În procesul de hrănire pot fi utilizate furaje suplimentare (pește tocat) în timpul primului și celui de-al doilea an de viață, dar, odată cu cel de-al doilea an, este necesară hrana vie. Frecvența de hrănire trebuie să fie calculată astfel încât să furnizeze lostrițelor cantitatea maximă posibilă de alimente pe care acestea sunt capabile să le consume. De asemenea, în procesul de hrănire pot fi utilizate atât automate, cât și hrănirea manuală. Cantitatea de hrană trebuie calculată în funcție de temperatura apei și de numărul, respectiv vârsta peștilor din bazine (Georgescu et al., 2018).

Cauzele mortalității lostriței în captivitate

Primele pierderi apar încă din timpul timpul incubării, chiar dacă procesul de fertilizare a avut loc cu succes. Pentru a minimiza pierderile din această perioadă este important ca temperatura apei din incubator să fie strict controlată, variațiile mari cauzând rate superioare ale pierderilor.
Mortalitatea ulterioară are loc între perioada de incubație și momentul în care modalitatea de nutriție devine exogenă. În această perioadă, atât posibilele boli, cât și calitatea apei sunt factori decisivi. Pierderile suferite în timpul recrutării indivizilor pentru creștere și, mai târziu pentru reproducere, sunt reduse și prin urmare, neglijabile (Georgescu et al., 2018).

Selecția și sortarea indivizilor pentru creștere

Selectarea exemplarelor pentru creștere este un proces foarte important căruia îi trebuie acordat maximum de atenție din moment ce tocmai acești indivizi vor forma baza viitorului stoc de genitori și, prin urmare, reprezintă condiția de bază pentru o crescătorie de lostriță de succes. În afară de ritmul de creștere, în procesul de selecție sunt de asemenea importante aspectul exterior general precum și forma corporală a peștilor. Indivizii care prezintă anomalii sunt excluși. Principalele criterii de selecție a exemplarelor rămân prin urmare mărimea, greutatea și ritmul de creștere (Georgescu et al., 2018).

Transportul lostrițelor

În momentul transportului lostrițelor trebuie respectate câteva principii de bază, indiferent de vârsta sau mărimea exemplarelor. Transportul fără pierderi este condiționat de următorii factori: i. starea de sănătate a peștilor; ii. statusul nutrițional; iii. distanța pe care vor fi transportați; iv. mărimea și tipul containerelor de transport; v. calitatea și puritatea apei.
Transportul icrelor se poate realiza imediat după inseminare folosind recipiente speciale cu vacuum sau tăvi de transportare. Alevinii de lostriță pot fi transportați în relativă siguranță doar după ce au absorbit conținutul sacului embrionar și sunt capabili să se ridice la suprafață și să înoate. Pentru transportul puieților se utilizează containere fabricate din fibre speciale prevăzute cu mijloace de aerare și oxigenare. Se recomandă ca puietul să fie transportat pe întuneric pentru a preveni canibalismul și pentru a limita mișcarea exemplarelor (Georgescu et al., 2018).

Reproducerea artificială

În crescătorii, cel mai bun mod de a verifica dacă peștii au ajuns la maturitate constă în aplicarea unei presiuni ușoare pe cavitatea abdominală. Dacă aceasta conduce la o eliberare de produși sexuali înseamnă că exemplarele sunt gata pentru reproducere și, implicit, pentru recoltarea icrelor sau lapților. Când gradul de maturizare este determinat corect, produșii sexuali pot fi obținuți de la toți peștii încă de la prima prelevare manuală. Procesul de prelevare manuală a produselor sexuale trebuie organizat și realizat cât mai atent deoarece lostrița este un pește masiv, dar foarte sensibil la mânuire (Georgescu et al., 2018). Icrele sănătoase, viabile, sunt galben-portocalii, ușor lipicioase, translucide și nu își schimbă aspectul, cu excepția măririi volumului atunci când au fost fertilizate. Materialul seminal ”sănătos” seamănă ca aspect și consistență cu o cremă subțire, are culoare albă și o consistență vâscoasă. Lapții care coagulează imediat după prelevare, fie conțin urme de sânge, fie nu sunt suficient maturizați, prin urmare sunt nepotriviți pentru fertilizare și pot fi aruncați. Lapții nematurați se extrag greu, iar procentul de fecundare a icrelor de către aceștia este foarte redus (Georgescu et al., 2018).

După ce icrele au fost amestecate cu materialul seminal, o cantitate mică de apă este adăugată deasupra pentru a accelera fertilizarea și pentru a induce dilatarea lor. Această umflare este destul de rapidă și intensă. Icrele fertilizate se întăresc iar suprafața lor devine elastică și fermă. După un scurt repaos, ele trebuie curățate de resturile de lapți prin clătire ușoară cu apă, li se măsoară diametrul, volumul și numărul, iar apoi sunt plasate în incubator (Georgescu et al., 2018). Icrele fecundate și spălate bine cu apă sunt plasate în incubatoare, la nivelul tăvilor de eclozare. Icrele provenite de la femele de lostriță având diferite dimensiuni au diametre destul de diferite, iar de aceea este recomandat să nu se amestece între ele și să se incubeze separat. La fel ca și incubarea, eclozarea este de asemenea influențată de temperatura apei. De obicei, eclozarea decurge cel mai intens în primele trei zile, restul de ovocite eclozând în decursul altor trei zile. La timpul respectiv este necesar să se îndepărteze nu doar ovocitele sterile, dar și învelișurile icrelor eclozate, pentru a preveni blocajul fluxului de apă. Un factor vital pentru succesul procesului de eclozare îl reprezintă aprovizionarea suficientă cu apă de bună calitate (Georgescu et al., 2018).

Creșterea juvenililor de lostriță

Imediat după procesul de eclozare a icrelor fecundate, alevinii rezultați trebuie separați astfel încât să nu depășească numărul de 7000 pentru fiecare incubator în parte. Puieții vor fi menținuți de preferat în apă de izvor, iar punga vitelină se resoarbe într-un timp mult mai scurt decât la păstrăvul indigen sau curcubeu, indivizii începând să-și caute hrana mai repede. Ulterior, jgheaburile sunt folosite pentru creșterea alevinilor până la dimensiuni de 9-10 cm lungime. Apoi se trece la creșterea acestora în bazine speciale. În cazul creșterii în bazine, succesul depinde de calitatea, cantitatea și disponibilitatea hranei naturale (Georgescu et al., 2018).

Obținerea și creșterea genitorilor de lostriță

Un număr suficient de mare de genitori sănătoși reprezintă baza unei pisciculturi reușite. Pentru o fermă piscicolă, cel mai avantajos este să își crească la un moment dat proprii genitori direct din juvenilii aflați la dispoziție. Pentru o selecție de bună calitate sunt necesari inițial cel puțin câteva zeci de juvenili pentru a selecta un genitor corespunzător. Accentul se pune pe selectarea în scopuri reproductive a indivizilor cu cea mai mare rată de creștere și cea mai bună formă fiziologică. De asemenea, selecția trebuie făcută pentru fiecare generație în parte, astfel încât să se creeze grupuri de genitori care să nu difere prea mult în dimensiuni. Peștii cu ritm de creștere rapid sunt transferați în bazine separate (Georgescu et al., 2018).

Pentru reproducere este avantajos să se folosească genitorii care prezintă cel mai ridicat potențial de furnizare a unor produse sexuale de cea mai înaltă calitate. Acești pești sunt cuprinși în grupa de vârstă 6-12 ani, în cazul masculilor, respectiv 7-14 ani în cazul femelelor. Calitatea produselor

sexuale furnizate poate fi verificată microscopic, iar genitorii necorespunzători trebuie eliminați din timp. În condițiile în care spațiul de creștere și hrănirea genitorilor nu reprezintă o problemă, este ideal un raport între sexe de 1:1, dar în condițiile unei ferme piscicole moderne, axate pe profit, ar trebui menținut un raport de 1:2 în favoarea femelelor (Georgescu et al., 2018).

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

Cărți

1. Georgescu S.E., Dudu A., Maereanu M., 2018. Lostrița, somonul Dunării – acvacultură și conservare, Editura Universităţii din Bucureşti, București, România, ISBN 978-606-16-0968-0.

Articole BDI

1. Popa G.O., Nechifor R., Burcea A., Samu M., Dudu A., Costache M., Maereanu M., Georgescu S.E., 2018, ***IN PRESS,*** SaMSTNb23 and SaMSTNb33: Emerging Markers for Growth Traits in Huchen (*Hucho hucho*, Linnaeus, 1758), Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 51(2).

Prezentări la conferințe

1. Popa G.O., Nechifor R., Burcea A., Samu M., Dudu A., Costache M., Maereanu M., Georgescu S.E., SaMSTNb23 and SaMSTNb33: Emerging Markers for Growth Traits in Huchen (Hucho hucho, Linnaeus, 1758), Book of abstracts, International Conference on Life Science „Bioengineering of Animal Resources", Timișoara, 24-25 May 2018, p. 25.

Site web: http://www.old.unibuc.ro/n/cercetare/proiecte/16PED2017_.php

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Allendorf F.W., Thorgaard G.H., 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: Evolutionary Biology of Fishes, Turner B.J. (ed.), Plenum Publishing Co., 1–53.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., 2002. Genetix 4.05.2, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Genome Population, Interactions: CNRS UMR 5000. University of Montpellier, France.

Fleming I.A., Augtsson T., Finstad B., Johnsson J.I., Bjrnsson B.T., 2002. Effects of domestication on growth physiology and endocrinology of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 1323-1330.

Freyhof J., Weiss S., Adrović A., Ćaleta M., Duplić A., Hrašovec B., Kalamujić B., Marčić Z., Milošević D., Marakovčić M., Mardak D., Piria M., Simonović P., Šlujka S., Tomljanović T., Zabric, D., 2015. The Huchen Hucho hucho in the Balkan region: Distribution and future impacts by hydropower development. RiverWatch & EuroNatur 30pp.

Geist, J., Kolasha, M., Gum, B., Kuehn, R., 2009. The importance of genetic cluster recognition for the conservation of migratory fish species: the example of the endangered European huchen *Hucho hucho* (L.). J. Fish Biol. 75, 1063-1078.

Georgescu S.E., Dudu A., Maereanu M., 2018. Lostrița, somonul Dunării – acvacultură și conservare, Editura Universităţii din Bucureşti, București, România, ISBN 978-606-16-0968-0.

Gorji A.E., Rahmani H., Miyanji G.R., 2016. Growth parameters evaluation and identification of growth hormone receptor gene polymorphism in various strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Aquac. Res. Development 7, 435.

Holcik J., Hensel K., Nieslanik J., Skacel S., 1988. The Eurasian Huchen, Hucho hucho. Largest salmon of the world, Dr. W. Junk Publishers, Dotrecht, Netherlands.
Holčík J., 1990. Conservation of the huchen, *Hucho hucho* (L.), (*Salmonidae*) with special reference to Slovakian rivers. J. Fish Biol. 37, 113–121.
Ihuț A., Zitek A., Weiss S., Ratschan C., Holzer G., Kaufmann T., Cocan D., Constantinescu R., Mireșan V., 2014. Danube Salmon (*Hucho hucho*) in Central and South Eastern Europe: A Review for the Development of an International Program for the Rehabilitation and Conservation of Danube Salmon Populations. Bulletin UASVM Agriculture 7, 86-101.
Moghadam H.K., Ferguson M.M., Rexroad C.E. III, Coulibaly I., Danzmann R.G., 2007. Genomic organization of the IGF1, IGF2, MYF5, MYF6 and GRF/PACAP genes across *Salmoninae* genera. Anim. Genet. 38, 527–32.
Moriyama S., Ayson F.G., Kawauchi H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1553–62.
Nazari S., Jafari V., Pourkazemi M., Miandare H.K., Abdolhay H.A., 2016. Association between myostatin gene (MSTN-1) polymorphism and growth traits in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Agri Gene 1, 109-115.
Peñaloza, C., Hamilton A., Guy D.R., Bishop S.C., Houston R.D., 2013. A SNP in the 5′ flanking region of the myostatin-1b gene is associated with harvest traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Genet. 14, 112-118.
Phillips R.B., Makoto P., Matsuoka P., Konkol N.R., McKay S., 2004. Molecular systematics and evolution of the growth hormone introns in the *Salmoninae*. Environ. Biol. Fish. 69, 433–440.
Rebhan Y., Funkenstein B., 2008. Inhibition of fish myostatin activity by recombinant fish follistatin and myostatin prodomain: Potential implications for enhancing muscle growth in farmed fish. Aquaculture 284, 231-238.
Ryynanen H.J., Primmer C.R., 2004. Primers for sequence characterization and polymorphism detection in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth hormone 1 (GH1) gene. Mol. Ecol. Notes 4, 664–667.
Salem M., Vallejo R.L., Leeds T.D., Palti Y., Liu S., Sabbagh A., Rexroad C.E., Yao J., 2012. RNA-Seq Identifies SNP Markers for Growth Traits in Rainbow Trout. PLoS ONE doi:10.1371/journal.pone.0036264.
Sun Y., Yu X., Tong J., 2012. Polymorphisms in Myostatin Gene and Associations with Growth Traits in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Int. J. Mol. Sci. 13, 14956-14961.
Tao W.J., Boulding E.G., 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Heredity 91, 60–69.
Tsai H.Y., Hamilton A., Guy D.R., Houston R.D., 2014. Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene are associated with growth-related traits in farmed Atlantic salmon. Anim. Genet. 45, 709-715.