CONSORȚIUL CEEX 140/2006

INVESTIGAȚII GENETICE PRIVIND TERMOREZISTENȚA LA PEȘTII GUPPY

ISBN 978-973-88929-0-3

BIOFLUX, CLUJ-NAPOCA
2008

Autori - colectivul restrâns al CEEX 140/2006

Ioan Valentin Petrescu-Mag
Doru C. Pamfil
Ruxandra Mălina Petrescu-Mag
Anca Mihaela Boaru
Laurențiu Radu Lozinsky
Cristian Sisea
Paul Raica
Miklos Botha
Lucian Dragoș Gorgan
Raluca Sorina Gherasim
Marian Bura
Ioan Bănăţean-Dunea
Cristina Muscalu-Nagy
Șteofil Creangă
Ioan Bud
Augustin Vlaic
Viorica Coşier
Radu Hărşan
Csép László
Dacinia Crina Petrescu
Rodica Pop
Réka Gyöngyi Ştefan
Ștefan Zamfirescu
Laura Buburuzan
Adrian Grozea
Radu Muscalu-Nagy
Benone Păsărin
Marius Giorgi Usturoi

Referenți științifici:

Conf. dr. Dana Pusta
Conf. dr. Ioan Bencsik

Director editură: **Ioan Valentin Petrescu-Mag**
Consilier editorial: **Ruxandra Mălina Petrescu-Mag**

Finanțator: **Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică**
Monitorizare: **Centrul Național de Management Programe – Biotech**

ISBN 978-973-88929-0-3

Cuprins

		Pagina
	Cuvânt înainte	5
Etapa I	.....	6
1.	Premisele ştiinţifice şi obiectivele generale ale proiectului CEEX 140/2006	8
2.	Obiectivele fazei I	9
2.1	Identificarea varietăţilor celor mai potrivite pentru generaţia genitoare	10
2.2	Obţinerea primelor serii de progenituri crescute în condiţii optime şi identice din care să fie aleşi randomic indivizii ce vor compune loturile experimentale	11
2.3	Modificarea procentului celor două sexe cu aproximativ 3%	11
2.4	Identificarea indivizilor sensibili la temperaturi joase prin scaderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentale	13
2.5	Identificarea indivizilor rezistenţi la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentale	15
2.6	Obţinerea probelor de ţesut pentru extracţia ADN a indivizilor luaţi în studiu	15
Etapa II	.....	18
1.	Obiectivele fazei de execuţie	19
2.	Introducere	20
3.	Izolarea automată a ADN genomic total	21
4.	Izolarea ADN genomic total din înotatoare de peşte – Metoda Coşier	22
5.	Cuantificarea ADN	23
6.	Amplificarea randomică	23
7.	Electroforeza în gel de agaroză	29
8.	Preluarea imaginilor	29
9.	Analiza imaginilor	29
10.	Rezultate	30
11.	Rezultate secundare	33
	Anexe	38
Etapa III	.....	48
1.	Obiectivele fazei de execuţie	50
2.	Introducere	50
3.	Pas I. Alegerea genitorilor de tip Half-Black XX şi Red Blond XY	52
4.	Pas II. Identificarea genitorilor criorezistenţi prin studiul fenotipului lor	52
5.	Pas III. Incrucişarea masculilor criorezistenti Red Blond identificati cu femele Half-Black	53
6.	Pas IV. Retroîncrucişarea femelelor criorezistente cu masculi Red Blond şi eliminarea alelelor recesive	55
Etapa IV.1	.....	61
1.	Obiectivul etapei IV	61
2.	Obiectivul activităţii IV.1	61
3.	Descrierea ştiinţifică şi tehnică a cercetărilor efectuate	61
4.	Protocolul de extracţie al ADN total – Ausubel et al (1995)	62

5. Izolarea ADN-ului din înotătoare de peşte …… 63
6. Extracţia automată a ADN ……..... 64
7. Cuantificarea ADN ……..... 65
8. Rezultate …….. 65
9. Concluzii ……... 66
Etapa IV.2 ……..... 68
1. Obiectivul etapei IV şi activităţile asociate acestuia ……..... 69
2. Introducere …… 71
3. Descrierea ştiinţifică şi tehnică …… 72
4. Perspective …… 82
5. Concluzii …….. 90
Etapa V …….. 95
1. Obiectivele ultimei faze a proiectului …….. 95
2. Brevetarea ……. 95
3. Diseminarea rezultatelor în cadrul unor simpozioane ştiinţifice ……... 95
4. Diseminarea rezultatelor sub formă de articole ştiinţifice ……. 96
5. Diseminarea rezultatelor cercetării sub formă de carte ştiinţifică ……. 96
6. Aportul diseminării online cu coduri ISSN şi ISBN …… 96
7. Alte forme de diseminare …….. 97
8. Lista completă a publicaţiilor care includ cel puţin parţial rezultate ale proiectului CEEX 140/2006 ……. 97
9. Produse şi tehnologii create prin prezentul proiect …….. 101
10. Dezvoltarea resursei umane …….. 101
11. Mulţumiri …… 102
Anexe …… 103

Cuvânt înainte

Scopul cărții de față este acela de a coagula și disemina rezultatele proiectului complex de cercetare-dezvoltare CEEX 140/2006 (Modulul 1), finanțat integral de către Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică și monitorizat de către Centrul Național de Management Programe – Biotech (secundar, au fost incluse anumite aspecte studiate în proiectul PN II 51-056). Proiectul s-a derulat pe o perioadă de doi ani de zile (15 septembrie 2006 – 15 septembrie 2008) și s-a finalizat cu atingerea obiectivelor propuse, prin cooperarea exemplară celor patru universități partenere.

Autorii acestei cărți sunt acei membri ai listei proiectului CEEX 140 care au adus contribuții tehnico-științifice semnificative, mai precis: COLECTIVUL RESTRÂNS AL CEEX 140 (în cadrul căruia au fost incluși și unii care au ajutat prin voluntariat).

În vederea elaborării cărții, s-a încercat redarea fidelă a etapelor/fazelor derulate într-o manieră cât mai apropiată de forma în care acestea au fost raportate, chiar dacă din această cauză lucrarea prezintă o oarecare redundanță. Noi sperăm că ea răspunde exigențelor cititorilor noștri care, în acest caz, sunt cercetătorii, acvacultorii, biologii, acvariștii și cei cu activități sau preocupări conexe acestora.

ETAPA I

Rezumat

Prima fază a proiectului CEEX 140/2006 prevedea un singur obiectiv general, obiectiv care se suprapune întru totul cu etapa I şi este definit prin acelaşi enunţ: Identificarea unor indivizi din specia *Poecilia reticulata* posesori ai genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute prin studiul fenotipului lor. Atingerea obiectivului principal al primei etape a presupus îndeplinirea a unei serii de obiective secundare, cum ar fi: identificarea varietăţilor cele mai potrivite pentru generaţia genitoare (P), obţinerea primelor serii de progenituri crescute în condiţii optime şi identice din care să fie aleşi randomic idivizii ce vor compune loturile experimentale, modificarea procentului celor două sexe cu aproximativ 3% în primele serii de progenituri în vederea evitării apariţiei rarelor cazuri de neomasculi spontani în populaţia genitorilor masculi sau a apariţiei femelelor false în populaţia genitorilor femeli, identificarea indivizilor sensibili la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentate, identificarea indivizilor rezistenţi la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentate, obţinerea probelor de ţesut pentru extracţia ADN a indivizilor luaţi în studiu.

Pentru genitorii (P) femeli s-a ales varietatea Half-Black Black iar pentru genitorii (P) masculi varietatea Red Blond, ambele varietăţi avute în biobaza proprie. Efectuarea studiilor în tandem pe aceste două varietăţi va permite o monitorizare a modului de transmitere a cromosomilor X şi totodată a genei rezistenţei la temperatură, utilizând ca marker gena *Nigrocaudatus* (*Ni*) din genomul varietăţii Half-Black Black, o genă puternic contrastantă cu cea sălbatică a aceluiaşi locus din genomul varietăţii Red Blond.

Prin tratarea populaţiei din care se urmărea alegerea genitorilor (P) masculi Red Blond cu 100 mg estradiol valerat/kg furaj şi prin tratarea populaţiei din care se urmărea alegerea genitorilor (P) femeli Half-Black Black cu 100 mg metiltestosteron/kg furaj, s-a reuşit o diferenţiere a loturilor genitoare cu 5,7%. Astfel, apariţia spontană a femelelor false (genotipic XY) respectiv a neomasculilor (XX) a fost evitată.

În aceste populaţii obţinute, nu există „contaminări” cromosomiale accidentale, adică aceste loturi femele sunt compuse din indivizi XX iar loturile mascule sunt compuse doar din indivizi genotipic XY. În cadrul acestor loturi s-au putut observa şi identifica indivizii purtători ai genei rezistenţei la temperaturi scăzute. Aceşti purtători ar putea fi genotipic,

pentru locusul acestei gene, de trei feluri: hemizigoţi (masculii), heterozigoţi sau homozigoţi (femelele).

Un lucru pe care îl ştim cert este acela că masculii Red Blond rezistenţi identificaţi nu pot fi decât hemizigoţi. Având în vedere linkajul acestei gene exclusiv cu cromosomul X, singurul cromosom X al acestor masculi posedă gena rezistenţei la temperaturi scăzute.

Loturile în cadrul cărora se avea în vedere identificarea indivizilor rezistenţi la frig au fost crescute în condiţii normale de temperatură (25ºC), iar la maturitate în condiţiile scăderii controlate a temperaturii. La fiecare două zile temperatura era scăzută cu 1ºC, după 32 de zile temperatura apei din bazinele de creştere ajungând la 9ºC. În fiecare lot experimental indivizii au dat semne de oboseală la aproximativ 14ºC, iar pierderile au început să apară cu precădere în loturile mascule la 12ºC.

Din fiecare lot mascul s-a recoltat ţesutul înotătoarelor caudale şi dorsale a primilor 10 indivizi pierduţi. Deşi pierderile au continuat şi după această cifră cei 10 indivizi au fost consideraţi „foarte probabil lipsiţi de gena rezistenţei la temperatură”, ei fiind hemi- sau homozigoţi recesivi la acel locus. Numărul de pierderi înregistrate a fost mai mare în cazul masculilor (Red Blond) decât în cazul femelelor (Half-Black Black). Deşi, făcând parte din varietăţi diferite, este firesc să existe diferenţe între aceste loturi, noi credem că mortalitatea diferită se datorează în primul rând sexului. Considerând şansa unui cromosom X de a deţine gena rezistenţei la temperatura cu R, atunci şansa femelei de a o deţine, conform legilor probabilităţii, este de $2R - R^2$. Masculul, fiind hemizigot, având doar un singur cromosom X va avea o probabilitate de a o deţine redusă la aproximativ jumătate, adică R. Aceasta, credem noi, este cauza diferenţelor în ceea ce priveşte numărul diferenţiat de pierderi: 100 masculi şi doar 23 femele.

Indivizii care au rămas în viaţă la 9ºC s-au departajat pe mai multe categorii. Indivizii care au rămas sănătoşi şi s-au dezvoltat normal prezentând totodată şi comportament de curtare (cei masculi) au fost selectaţi în număr de 10 pe fiecare lot. Masculilor li s-a decupat material biologic din înotătoarele dorsală, repectiv caudală şi au fost readuşi treptat la temperatura de confort (25ºC). Peştii rezistenţi au fost păstraţi pentru încrucişările ulterioare.

Recoltarea probelor de ţesut s-a făcut prin decupare cu ustensile sterile, iar acestea s-au conservat în ultrafrizer la -80ºC pentru următoarea activitate (extracţia ADN).

1. Premisele ştiinţifice şi obiectivele generale ale proiectului CEEX 140/2006

Peştele guppy (*Poecilia reticulata*) este o specie de interes economic, comercial şi ştiinţific. Importanţa lui se referă atât la numărul mare în care este cerut pe piaţa acvariofilă, cât şi la faptul că el este un organism model în ecologie, etologie, ecotoxicologie, filogenie şi genetică. „Peştele milionar", cum mai este numit, are un determinism al sexelor de tip *Drosophila* cu heterogameţie masculă (♂XY) şi homogameţie femelă (♀XX).

În 1990, Fujio et al a descoperit o genă X-linkată la guppy, genă responsabilă de rezistenţa la temperaturi scăzute a acestui peşte. În 2006, în urma rezultatelor cercetărilor publicate în lucrarea: *Effect of temperature on sex ratio in guppy Poecilia reticulata (Peters 1860)* – Efectul temperaturii asupra sex ratio la guppy *Poecilia reticulata* (Peters 1860), Karayücel et al emit ipoteza implicării aceleaşi gene X-linkate în existenţa indivizilor la temperaturi ridicate. În acel moment, gena în cauză devine una foarte importantă, atât pentru guppycultură, cât şi pentru posibilitatea extrapolării şi aplicării rezultatelor cercetărilor cu privire la această genă şi la alte specii de interes economic şi nu numai.

În prezentul proiect de cercetare, ne-am propus să testăm 150-175 amorse RAPD decamere şi să identificăm markerii asociaţi prezenţei genei pentru rezistenţă la temperaturi scăzute ale apei. Odată markerii identificaţi, se va efectua o selecţie a indivizilor de interes în vederea creării unei linii homozigote la locusul alelei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute. Întrucât gena de interes este X-linkată, va fi foarte uşor de eliminat neajunsul dominanţei markerilor RAPD prin efectuarea de retroîncrucişări cu masculii hemizigoţi posesori ai genei de interes, în vederea homozigotării alelei la femele. Monitorizarea genei rezistenţei la temperatură, mai precis a modului în care ea este transmisă descendenţilor, este facilitată de prezenţa unei gene *Nigrocaudatus* X-linkată (Lindholm & Breden 2002; Mag & Bud 2006; Petrescu & Mag 2006) care va servi drept genă de culoare marker. După obţinerea liniei homozigote pentru gena de interes, 100 de astfel de indivizi vor fi supuşi creşterii controlate treptate a temperaturii şi se vor compara rezultatele cu cele ale unei populaţii martor. Astfel, se va putea concluziona cert dacă aceeaşi genă a rezistenţei la temperaturi scăzute este implicată totodată şi în rezistenţa indivizilor la temperaturi ridicate. Rezumându-ne la obiectivele generale ale proiectului, acestea sunt următoarele:

- **Obiectiv I: Identificarea unor indivizi din specia *Poecilia reticulata*, posesori ai genei pentru rezistenţă la temperaturi scăzute;**

- **Obiectiv II: Identificarea unor markeri RADP asociaţi prezenţei genei rezistentă la temperaturi scăzute la specia *Poecilia reticulata;***
- **Obiectiv III: Eliminarea alelelor recesive de la locusul genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute din lotul experimentat;**
- **Obiectiv IV: Confirmarea/infirmarea ipotezei conform căreia gena responsabilă de rezistenţa la temperaturi scăzute ar fi implicată şi în rezistenţa indivizilor la temperaturi ridicate;**
- **Obiectiv V: Brevetarea markerilor genetici identificaţi şi/sau liniei rezistente la temperaturi scăzute şi/sau a procedeului de obţinere a acesteia (sau a altor rezultate inedite obţinute în prezentul proiect).**

2. Obiectivele fazei I

Prima fază a proiectului (15 septembrie - 5 decembrie 2006) prevede un singur obiectiv general, obiectiv care se suprapune întru totul cu etapa I şi este definit prin acelaşi enunţ: **Identificarea unor indivizi din specia *Poecilia reticulata* posesori ai genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute prin studiul fenotipului lor.** Atingerea acestui obiectiv principal a presupus îndeplinirea a unei serii de obiective secundare. Ele sunt următoarele:

- **Identificarea varietăţilor cele mai potrivite pentru generaţia genitoare (P);**
- **Obţinerea primelor serii de progenituri crescute în condiţii optime şi identice din care să fie aleşi randomic idivizii ce vor compune loturile experimentale;**
- **Modificarea procentului celor două sexe cu aproximativ 3% în primele serii de progenituri în vederea evitării apariţiei rarelor cazuri de neomasculi spontani în populaţia genitorilor masculi sau a apariţiei femelelor false în populaţia genitorilor femeli;**
- **Identificarea indivizilor sensibili la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentate;**
- **Identificarea indivizilor rezistenţi la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentate;**

- **Obţinerea probelor de ţesut pentru extracţia ADN a indivizilor luaţi în studiu.**

2.1. Identificarea varietăţilor celor mai potrivite pentru generaţia genitoare (P)

Indivizii rezistenţi la temperaturi scăzute, fie ei masculi, fie femele, pot fi din punctul de vedere al cromosomilor sexului avuţi în genom de trei feluri: XX, XY sau extrem de rar în mod spontan YY (Mag & Bud 2006; Petrescu & Mag 2006).

Pornind de la premisa că gena rezistenţei la temperaturi scăzute este X-linkată (Fujio et al 1990; Lindholm & Breden 2002; Mag & Bud 2006) şi având în vedere faptul că ea se exprimă atât la femele cât şi la masculi (Lindholm & Breden 2002) este lesne de înţeles că o identificare a unui cromosom X purtător al acestei gene într-un genom este foarte facilă la masculii XY, indiferent de varietatea lor. O dată cu încrucişarea acestor masculi cu femele XX ei vor transmite cromosomul Y masculilor şi cromosomul X femelelor. Din genomul acestor femele ale generaţiei F1, un cromosom X (cel puţin) este purtător al genei rezistenţei la temperaturi scăzute. Pentru distingerea mai uşoară a celor doi cromosomi în descendenţă este necesară utilizarea genei *Nigrocaudatus* (*Ni*) ca genă marker a cromosomului X. De aceea, noi am ales ca varietate pentru genitorii (P) femeli varietatea Half-Black Black.

Varietatea Half-Black Black se caracterizează prin coloritul hipermelanic al întregului corp, exceptând capul şi o mică parte a regiunii corporale anterioare. Este o varietate foarte omogenă fenotipic. Corpul negru este determinat de o genă dominantă *Ni,* X-linkată, care se exprimă atât la masculii hemizigoţi (*Ni 0*), cât şi la femelele homo- (*Ni Ni*) sau heterozigote (*Ni ni*). În populaţiile pure, femelele sunt în totalitate homozigote de tip *Ni Ni*. Aceste populaţii pure pot fi recunoscute uşor după frecvenţa apariţiei indivizilor fără corp negru în descendenţă, colorit determinat de homozigotarea pe bază de probabilitate a genei sălbatice recesive (*ni*) şi exprimarea ei în lipsa genei dominante (*Ni*). În populaţiile varietăţilor pure Half-Black, de regulă, nu apar astfel de indivizi în descendenţă.

Odată aleasă varietatea pentru genitorii (P) femeli, era necesară alegerea unei varietăţi pentru populaţia genitoare (P) masculă. Această varietate ar trebui să se caracterizeze printr-un cromosom X care să determine un colorit puternic contrastant cu cel al genei *Ni,* astfel că, varietatea Red Blond avută în biobaza proprie am considerat-o a fi cea mai potrivită pentru genitorii (P) masculi.

2.2. Obţinerea primelor serii de progenituri crescute în condiţii optime şi identice din care să fie aleşi randomic idivizii ce vor compune loturile experimentale

Material şi metodă

Cei 119 indivizi Red Blond (19 masculi şi 100 femele) şi cei 121 indivizi Half-Black Black (21 masculi şi 100 femele) avuţi în propria biobază au fost puşi la reproducere, femelele fiind amplasate în cuşti cu gratii (*netcages* - „maternităţi" pentru peşti ovovivipari). Prin ridicarea temperaturii apei s-a reuşit o scurtare a gestaţiei, deci, o grăbire a parturiţiei.

Rezultate

O parte dintre femelele Red Blond au „născut", rezultând un total de 1534 pui Red Blond, iar femelele Half-Black Black au produs 1246 pui. Acest puiet, de la ambele varietăţi, a fost crescut în condiţiile care vor fi descrise mai jos.

2.3. Modificarea procentului celor două sexe cu aproximativ 3% în primele serii de progenituri în vederea evitării apariţiei rarelor cazuri de neomasculi spontani în populaţia genitorilor masculi sau a apariţiei femelelor false în populaţia genitorilor femeli

Material şi metodă

Au fost alese 100 femele bine dezvoltate şi fecundate din varietatea Red Blond, precum şi 100 femele Half-Black Black. Acestea au dat naştere mai multor serii de indivizi de aceeaşi vârstă şi mărime, din care au fost alese 6 loturi experimentale a câte 200 indivizi: 3 loturi de masculi din varietatea Red Blond şi 3 loturi de femele din varietatea Half-Black Black. Loturile au fost crescute, la început în condiţii normale de temperatură (25ºC), iar la maturitate în condiţiile scăderii controlate a temperaturii, urmând apoi marcarea plus şi minus variantelor din punctul de vedere al rezistenţei la temperaturi scăzute.

Seriile de pui Red Blond care au constituit loturile experimentale au fost crescute în condiţii identice, după ce, în prealabil, toţi puii au fost trataţi cu estradiol valerat în primele trei zile de viaţă, prin administrarea orală a hormonului în concentraţie de 100 mg/kg furaj. Această activitate a avut ca scop evitarea apariţiei neomasculilor spontani (masculi XX).

Pentru experimente s-au păstrat masculii (genotipic XY). În mod similar s-a procedat pentru obţinerea loturilor de femele Half-Black Black XX. Pentru evitarea apariţiei spontane a femelelor false (genotipic XY) s-a recurs la tratarea hormonală a puietului în primele trei zile de viaţă cu metiltestosteron, 100 mg/kg furaj.

Rezultate

Populaţia din care s-au ales randomic masculii Red Blond a înregistrat un sex-ratio uşor modificat în favoarea femelelor: 863 femele/671 masculi. Acest raport nu s-a regăsit în cazul populaţiei Half-Black Black, unde s-a înregistrat un raport de 630 femele/616 masculi.

Discuţii

Se poate observa din raportul între sexe a celor două varietăţi că între puietul Red Blond s-au dezvoltat cu 5,7% mai puţini masculi decât în cazul puietului Half-Black Black, varietate care la maturitate s-a arătat a deţine un procentaj mai mic de femele decât varietatea Red Blond (a se vedea tabelul 1).

Tabelul 1

Modificarea uşoară a sex-ratio prin tratarea puietului cu estradiol valerat 100mg/kg furaj (la varietatea Red Blond), respectiv metiltestosteron 100mg/kg (la varietatea Half-Black Black)

Varietatea	*Nr. progenituri*	*Masculi*		*Femele*		♂:♀
		nr.	%	nr.	%	
Red Blond	1534	671	43,74	863	56,26	0,78
Half-Black Black	1246	616	49,44	630	50,56	0,98
Diferenţe procentaj	-	-	5,70	-	5,70	-

În aceste populaţii obţinute, nu există „contaminări” cromosomiale accidentale, adică loturile femele Half-Black Black sunt compuse exclusiv din indivizi XX iar loturile mascule Red Blond sunt compuse doar din indivizi genotipic XY. În aceste loturi s-au putut observa şi identifica indivizii purtători ai genei rezistenţei la temperaturi scăzute. Purtătorii ar putea fi genotipic, pentru locusul acestei gene, de trei feluri: hemizigoţi, heterozigoţi sau homozigoţi. Un lucru pe care îl ştim cu certitudine este acela că masculii Red Blond rezistenţi identificaţi

nu pot fi decât hemizigoţi. Având în vedere linkage-ul acestei gene exclusiv cu cromosomul X, singurul cromosom X al acestor masculi posedă gena rezistenţei la temperaturi scăzute.

2.4. Identificarea indivizilor sensibili la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentate

Material şi metodă

Cele 6 loturi (3 loturi Red Blond + 3 loturi Half-Black Black) în cadrul cărora se avea în vedere identificarea indivizilor rezistenţi la frig (a se vedea figura 1) au fost crescute în condiţii normale de temperatură (25ºC), iar la maturitate în condiţiile scăderii controlate a temperaturii. La fiecare două zile temperatura era scăzută cu 1ºC. Aceasta înseamnă că după 32 de zile temperatura apei din bazinele de creştere a coborât la 9ºC.

Loturile au fost crescute fiecare în bazine cu un volum de apă de 100 litri, la o valoare medie a pH-ului apei de 7,1. Reglarea temperaturii din bazine s-a realizat prin amplasarea lor în camere a căror temperatură varia între 7ºC şi 9ºC, pentru încălzirea lor recurgându-se la folosirea unor instalaţii pe bază de încălzitoare termostatate (precizie ±1ºC).

Rezultate şi discuţii

În fiecare lot experimental indivizii au dat semne de oboseală la aproximativ 14ºC, iar pierderile au început să apară cu precădere în loturile mascule la 12ºC (a se urmări tabelul 2). Din fiecare lot mascul s-a recoltat ţesutul înotătoarelor caudale şi dorsale a primilor 10 indivizi pierduţi. Deşi pierderile au continuat şi după acesată cifră cei 10 indivizi au fost consideraţi „foarte probabil lipsiţi de gena rezistenţei la temperatură”, ei fiind hemi- sau homozigoţi recesivi la acel locus. Numărul de pierderi înregistrate au fost mai mari în cazul masculilor (Red Blond) decât în cazul femelelor (Half-Black Black). Deşi, făcând parte din varietăţi diferite, este firesc să existe diferenţe între aceste loturi, noi credem că mortalitatea diferenţiată se datorează în primul rând sexului. Considerând şansa unui cromosom X de a deţine gena rezistenţei la temperatura cu R, atunci şansa femelei de a o deţine, conform legilor probabilităţii (având doi cromosomi X), este de $2R + R^2$ (unde, 2 reprezintă numărul de cromosomi X al unui organism diploid femel, iar R^2 este probabilitatea unui individ de a moşteni doi cromosomi X, ambii purtatori ai genei criorezistenţei). Masculul, fiind hemizigot,

având doar un singur cromosom X, el va avea o probabilitate de a deţine gena mult mai redusă, adică *R*. Ţinând seama de faptul că $0<R<1$, atunci este lesne de înţeles faptul că $2R + R^2>R$. Cu alte cuvinte, probabilitatea masculului de a moşteni gena criorezistenţei este mai mică decât cea a femelei, exceptând situaţia când R=1, adică situaţia când toţi cromosomii X au doar alela criorezistentă (frecvenţă de 100%), iar alela criosensibilă este absentă cu desăvârşire (frecvenţă de 0%) (situaţie diferită de cea reală). Aceasta, credem noi, este cauza diferenţelor în ceea ce priveşte numărul diferenţiat de pierderi: 100 masculi şi doar 23 femele (tabelul 2).

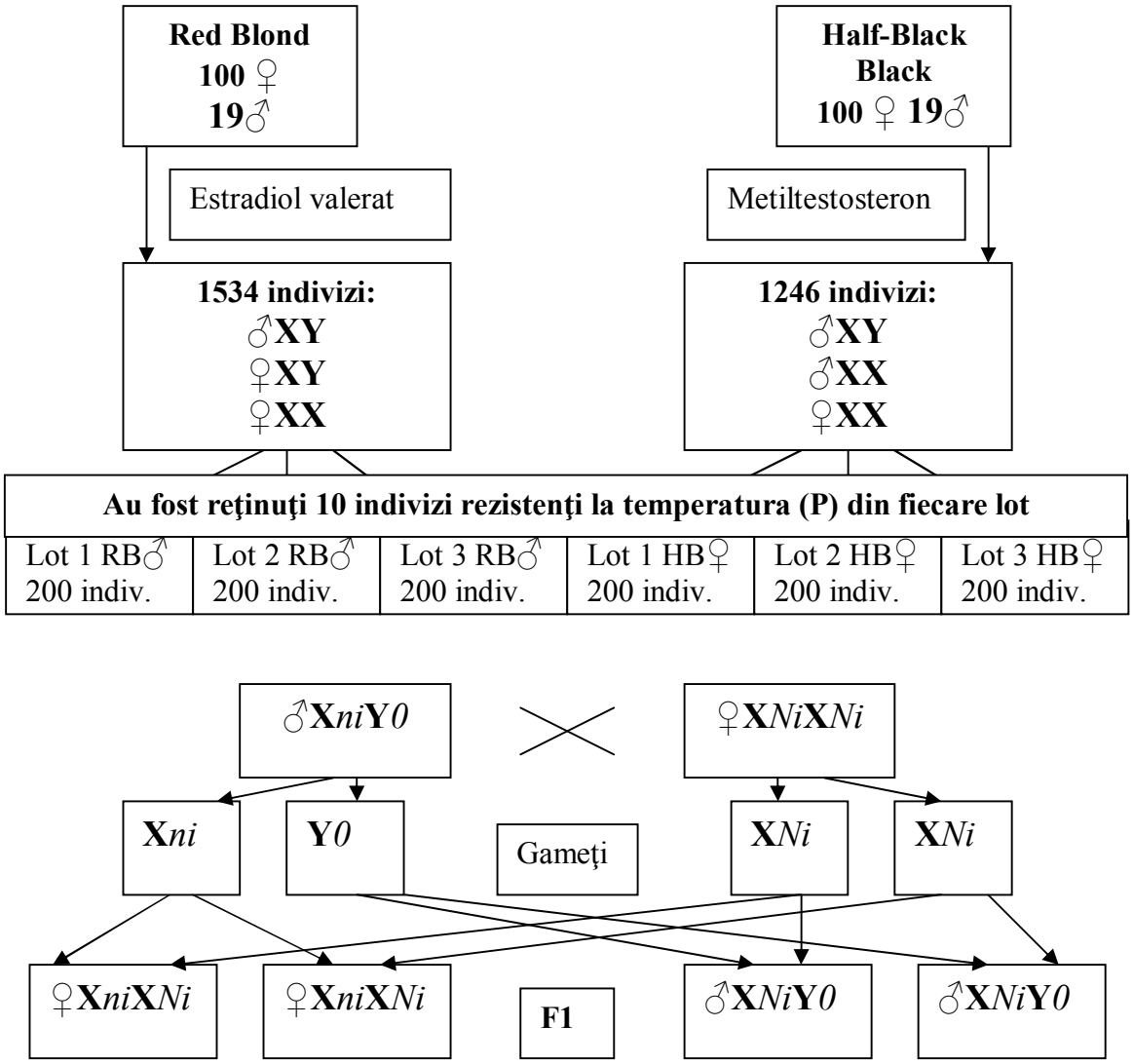


Figura 1. Schema desfăşurării primei etape şi felul în care vor fi încrucişaţi genitorii (P) rezistenţi la temperatură.

Tabelul 2

Număr indivizi pierduţi pe loturi experimentale

Lotul/Temperatura (ºC)	*20-25*	*15-20*	*12-15*	*10-12*	*9-10*
Lot 1 Red Blond ♂	0	0	0	2	15
Lot 2 Red Blond ♂	0	0	0	1	21
Lot 3 Red Blond ♂	0	0	0	3	58
Red Blond ♀	0	0	0	0	15
Lot 1 Half-Black Black ♀	0	0	0	0	3
Lot 2 Half-Black Black ♀	0	0	0	1	7
Lot 3 Half-Black Black ♀	0	0	0	0	12
Half-Black Black ♂	0	0	0	0	32

2.5. Identificarea indivizilor rezistenţi la temperaturi joase prin scăderea temperaturii apei bazinelor loturilor experimentale

Indivizii care au rămas în viaţă până la 9ºC s-au departajat pe mai multe categorii de sănătate şi formă fizică. Indivizii care au rămas sănătoşi şi s-au dezvoltat normal (unii masculi prezentând totodată şi comportament de curtare) au fost selectaţi în număr de 10 pe fiecare lot. Masculilor li s-a decupat material biologic din înotătoarele dorsală, respectiv caudală şi au fost readuşi treptat la temperatura de confort (25ºC). Peştii rezistenţi au fost păstraţi pentru încrucişările ulterioare.

2.6. Obţinerea probelor de ţesut pentru extracţia ADN a indivizilor luaţi în studiu

Recoltarea probelor s-a făcut prin decupare cu ustensile sterile, iar probele de ţesut s-au conservat în ultrafrizer la -80ºC pentru următoarea activitate (extracţia ADN).

Concluzii finale de etapă

Pentru genitorii (P) femeli s-a ales varietatea Half-Black Black iar pentru genitorii (P) masculi varietatea Red Blond, ambele varietăţi avute în biobaza proprie. Efectuarea studiilor în tandem pe aceste două varietăţi va permite o monitorizare a modului de transmitere a

cromosomilor X şi totodată a genei rezistenţei la temperatură, utilizând ca marker gena *Nigrocaudatus* (*Ni*) din genomul varietăţii Half-Black Black, o genă puternic contrastantă cu cea sălbatică a aceluiaşi locus din genomul varietăţii Red Blond.

Prin tratarea populaţiei din care se urmărea alegerea genitorilor (P) masculi Red Blond cu 100 mg estradiol valerat/kg furaj şi prin tratarea populaţiei din care se urmărea alegerea genitorilor (P) femeli Half-Black Black cu 100 mg metiltestosteron/kg furaj, s-a reuşit o diferenţiere a loturilor genitoare cu 5,7%. Astfel, apariţia spontană a femelelor false (genotipic XY) respectiv a neomasculilor (XX) a fost evitată.

În aceste populaţii obţinute, nu există „contaminări" cromosomiale accidentale, adică aceste loturi femele sunt compuse din indivizi XX iar loturile mascule sunt compuse doar din indivizi genotipic XY. În cadrul acestor loturi s-au putut observa şi identifica indivizii purtători ai genei rezistenţei la temperaturi scăzute. Aceşti purtători ar putea fi genotipic, pentru locusul acestei gene, de trei feluri: hemizigoţi (masculii), heterozigoţi sau homozigoţi (femelele).

Un lucru pe care îl ştim cu certitudine este acela că masculii Red Blond rezistenţi identificaţi nu pot fi decât hemizigoţi. Având în vedere linkage-ul acestei gene exclusiv cu cromosomul X, singurul cromosom X al acestor masculi posedă gena rezistenţei la temperaturi scăzute.

Loturile în cadrul cărora se avea în vedere identificarea indivizilor rezistenţi la frig au fost crescute în condiţii normale de temperatură (25ºC), iar la maturitate în condiţiile scăderii controlate a temperaturii. La fiecare două zile temperatura era scăzută cu 1ºC, după 32 de zile temperatura apei din bazinele de creştere ajungând la 9ºC. În fiecare lot experimental indivizii au dat semne de oboseală la aproximativ 14ºC, iar pierderile au început să apară cu precădere în loturile mascule la 12ºC.

Din fiecare lot mascul s-a recoltat ţesutul înotătoarelor caudale şi dorsale a primilor 10 indivizi pierduţi. Deşi pierderile au continuat şi după acesată cifră aceşti 10 indivizi au fost consideraţi „foarte probabil lipsiţi de gena rezistenţei la temperatură", ei fiind homozigoţi recesivi la acel locus. Numărul de pierderi înregistrate a fost mai mare în cazul masculilor (Red Blond) decât în cazul femelelor (Half-Black Black). Făcând parte din varietăţi diferite, este firesc să existe diferenţe între criorezistenţa acesteor loturi. Oricum, noi credem că mortalitatea diferenţiată se datorează în primul rând sexului. Considerând şansa unui cromosom X de a deţine gena rezistenţei la temperatura cu R, atunci şansa femelei de a o deţine, conform legilor probabilităţii, este de $2R - R^2$. Masculul, fiind hemizigot, având doar un singur cromosom X va avea o probabilitate de a o deţine redusă la aproximativ jumătate,

adică *R*. Aceasta, credem noi, este cauza diferenţelor în ceea ce priveşte numărul diferenţiat de pierderi: 100 masculi şi doar 23 femele.

Indivizii care au rămas în viaţă la 9ºC s-au departajat pe mai multe categorii. Indivizii care au rămas sănătoşi şi s-au dezvoltat normal prezentând totodată şi comportament de curtare (cei masculi) au fost selectaţi în număr de 10 pe fiecare lot. Masculilor li s-a decupat material biologic din înotătoarele dorsală, repectiv caudală şi au fost readuşi treptat la temperatura de confort (25ºC). Peştii rezistenţi au fost păstraţi pentru încrucişările ulterioare.

Recoltarea probelor de ţesut s-a făcut prin decupare cu ustensile sterile, iar acestea s-au conservat în ultracongelator la -80ºC pentru următoarea activitate planificată (extracţia ADN).

Bibliografie

Fujio Y., Nakajima M., Nagahama Y., 1990 Detection of a low temperature-resistant gene in guppy (*Poecilia reticulata*), with reference to sex-linked inheritance. Japanese Journal of Genetics 65:201-207.

Karayücel I., Ak O., Karayücel S., 2006 Effect of temperature on sex ratio. Aquaculture Research 37:139-150.

Lindholm A., Breden F., 2002 Sex chromosomes and sexual selection in Poeciliid fishes. Am Nat 160:S214-S224.

Mag I. V., Bud I., 2006 *Nigrocaudatus* – Marker genes on the X chromosome in the guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1859). Scientific Papers Animal Sciences and Biotechnologies / Lucrări ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii 39(1):77-82.

Petrescu R. M., Mag I. V., 2006 Expression of the Y-linked courtship behavior genes lacks in XY male to female sex reversed guppies. Lucrări ştiinţifice - seria zootehnie 49:1069-1075.

ETAPA II

Rezumat

Obiectivul principal al etapei a II-a este acela de a identifica unul sau mai mulţi markeri RAPD asociaţi prezenţei genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute, adică identificarea acelor amorse decamere cu a căror amplificare randomică a ADN-ului genomic total la guppy rezultă un polimorfism al fragmentelor migrate în gel de agaroză, în funcţie de caraterul lor fenotipic - criorezistent sau criosensibil. Scopul final al proiectului este acela de a elabora un procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti guppy prin tehnici moleculare (RAPD), tratare hormonală şi/sau prin metodele geneticii clasice (încrucişare, retroîncrucişare, segregare, analiză statistică).

În urma amplificării randomice a ADN-ului genomic la guppy cu 150 amorse diferite, utilizarea unui număr de 71 amorse nu au dus la amplificarea ADN genomic. Din cele 79 de amorse care au amplificat fragmente ADN din catenele matriţă, un numar de 35 nu au prezentat polimorfism, în ceea ce priveşte poziţia şi numărul fragmentelor migrate, între indivizi. În 44 dintre cazuri probele amplificate au prezentat polimorfism. Uneori, polimorfismul a fost unul redus, iar alteori gelurile au prezentat un polimorfism puternic. Cu toate că s-a obţinut un număr suficient de mare de geluri care prezentau polimorfisme puternice, aceste polimorfisme nu s-au dovedit a fi asociate cu criorezistenţa sau cu criosensibilitatea indivizilor studiaţi. Un singur caz de astfel de polimorfism asociat cu categoria fenotipică a fost observat în urma analizei gelurilor, din totalul de 150 de amorse testate. În cazul amorsei nr 77, la indivizii rezistenţi apare un fragment de 878 nucleotide lungime, fragment care la cei sensibili are o lungime de 839 nucleotide. Probabil că polimorfismul este asociat cu o mutaţie în cadrul secvenţei genei pentru criorezistenţă, mutaţie care duce la amplificarea unui fragment mai lung (în primul caz) şi respectiv mai scurt (în al doilea caz), prin tehnica RAPD.

Dendrograma polimorfismului rezultat prin amplificarea cu amorsa 77 întocmită prin pachetul de metode UPGMA, pe baza matricei binare şi a matricei de distanţă, arată clar împărţirea celor 20 indivizi analizaţi în doua categorii distincte, adică indivizi criosensibili şi indivizi criorezistenţi. Oricum, numărul de markeri identificaţi pentru această genă este redus, cum era de aşteptat - având în vedere că s-a folosit în amplificare ADN genomic care conţine ADN necodificator în proporţie mare. Totuşi, simplitatea tehnicii RAPD permite testarea unui număr mare de amorse pe unitatea de timp, ceea ce ne-a îndemnat să o folosim în aceste

studii. Viabilitatea şi repetitivitatea tehnicii RAPD în acest demers ştiintific rămâne să fie stabilită în etapa următoare prin analiza indivizilor din generaţia F1.

Pe lângă obiectivele propuse şi atinse, accidental, au fost obţinute rezultate inedite şi brevetabile cu privire la creşterea artificială a dimensiunilor corporale ale masculilor speciei studiate, *Poecilia reticulata.* Procedeul elaborat se bazează pe inhibarea temporară şi amânarea diferenţierii sexuale a masculilor. Ele au pornit de la rezultatele secundare ale activităţilor etapei anterioare care au iscat interes şi au fost continuate în această etapă prin tatonări succesive. Utilizarea reţetei stabilite, îmbogăţită cu 400 mg/kg estradiol valerat, administrate în anumite perioade ale ontogeniei masculilor, duce la: întârzierea diferenţierii sexuale, dezvoltarea somatică a indivizilor după specificul femel şi creşterea dimensiunilor corporale cu 30-40%. Specificăm ca dimensiunea corporală redusă a masculilor este unul din principalele neajunsuri ale guppyculturii.

1. Obiectivele fazei de execuţie

Obiectivul etapei a II-a (a se vedea Obiectivul II) este acela de a identifica unul sau mai mulţi markeri RAPD asociaţi prezenţei genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute, adică identificarea acelor amorse decamere cu a căror amplificare randomică a ADN-ului genomic total la guppy rezultă un polimorfism al fragmentelor migrate în gel de agaroză, în funcţie de caracterul lor fenotipic - criorezistent sau criosensibil. Acestui obiectiv îi corespund mai multe activităţi prevăzute în planul de realizare al proiectului:

- Testarea protocolului de extracţie ADN din înotătoare şi tesut muscular striat de peşte;
- Izolarea ADN din ţesuturile peştilor anterior identificaţi ca fiind rezistenţi, respectiv sensibili la temperaturi scăzute ale apei;
- Amplificarea ADN cu 150 amorse randomice de zece baze lungime şi migrarea fragmentelor în gel de agaroză;
- Fotografierea şi observarea benzilor rezultate;
- Analizarea statistică a fotografiilor obţinute;
- Identificarea similitudinilor, respectiv a disimilitudinilor înregistrate între cele două categorii de indivizi (rezistenţi şi sensibili);
- Interpretarea scrisă a rezultatelor activităţii de cercetare din cadrul etapei a II-a.

2. Introducere

Problema rezistenţei la temperaturi, fie ele scăzute sau ridicate, este una de o însemnătate deosebită atât în cadrul regnului animal cât şi în cadrul regnului vegetal. Deşi, această rezistenţă poate fi, în anumite situaţii şi între anumite limite, dobândită în timp (determinată de factorii de mediu), ea este de cele mai multe ori codificată genetic. Prin transcripţia informaţiei genetice, codificate de una sau mai multe gene, rezultă una sau mai multe catene polipeptidice prin a căror asamblare se formează anumite enzime cheie sau şaperoane moleculare care permit buna funcţionare a organismului în situaţii de stres termic (frig sau căldură excesivă).

O dovadă a faptului că rezistenţa la temperaturi prezintă un deosebit interes pe plan mondial este faptul că tot mai multe astfel de gene sunt secvenţiate nucleotidic şi exportate în bazele de date genomice, de unde cercetătorii pot folosi informaţiile în scop ştiinţific. La guppy (*Poecilia reticulata*), recent, a fost secvenţiată gena proteinei HspB1 (*Heat shock protein beta-1*), numită şi Hsp27 (*Heat shock 27kDa protein*), iar secvenţa nucleotidică se găseşte în Genbank (NCBI, ES385844, cDNA, autori: Dreyer & Hoffmann 2007). Proteinele HSP sunt şaperoane moleculare ce permit buna funcţionare a activităţii celulare în condiţii de stres fizic sau chimic (Iwama et al 1999) şi au fost studiate la o serie de alte specii precum: ricketsia *Piscirickettsia salmonis* (Wilhelm et al 2003), crustaceul *Penaeus monodon* (Lo et al 2004), caras *Carassius auratus* (Kondo et al 2004), tilapia *Oreochromis mossambicus* (Molina et al 2001), păstrăv *Oncorhynchus mykiss* (Mosser at al 1986), peştele antigel *Trematomus bernachii* (Hofmann et al 2000; Buckley et al 2004), peştele de deşert *Poecilopsis lucida* (Norris et al 1997), zebrafish *Danio rerio* (Makino et al 2005), om *Homo sapiens sapiens* (Rabindran et al 1991) şi altele.

Gena criorezistenţei la guppy îi permite acestuia supravieţuirea la temperaturi de 15˚C, iar pe termen scurt la temperaturi de 6-7˚C (Mag et al 2006; Pasarin et al 2007). Deşi a fost descrisă iniţial ca o genă a rezistenţei la temperaturi scăzute (Fujio et al 1990), ea pare a fi implicată şi în rezistenţa speciei la temperaturi ridicate (Karayucel et al 2006; Petrescu-Mag et al 2007). La finele acestor cercetări se va cunoaşte cu certitudine dacă această genă a criorezistenţei este în realitate totodată responsabilă şi de rezistenţa la temperaturi ridicate. Nu se cunoaşte dacă gena criorezistenţei este una din grupul HSP sau este una diferită structural şi ca origine, dar studiul grupului HSP constituie una din problemele ridicate în cadrul unei noi propuneri de proiect de cercetare (Bud et al 2007 - PN II, Parteneriate, ctr 51-056).

Obiectivul principal al etapei a II-a este acela de a identifica unul sau mai mulţi markeri RAPD asociaţi prezenţei genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute, adică identificarea acelor amorse decamere cu a căror amplificare randomică a ADN-ului genomic la guppy rezultă un polimorfism al fragmentelor migrate în gel de agaroză, în funcţie de caraterul lor fenotipic - criorezistent sau criosensibil. Scopul final al proiectului este acela de a întocmi un procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti guppy prin tehnici moleculare (RAPD), tratare hormonală şi/sau prin metodele geneticii clasice încrucişare, retroîncrucişare, segregare, analiză statistică.

În etapa anterioară a proiectului CEEX 140/2006 (etapa I) au fost identificaţi indivizii rezistenţi şi cei sensibili la temperaturi scăzute din varietatea Red Blond (Anexele F şi G) şi Half-Black Black (Anexele H şi I). Masculii Red Blond, identificaţi în prealabil ca fiind criorezistenţi sau criosensibili, aveau sa fie folosiţi ca donatori de ADN pentru loturile etapei următoare. Pentru a se avea certitudinea că cele două categorii au fost determinate corect fenotipic, au fost reţinuţi pentru operaţiunea de extracţie ADN doar primele 10 plus-variante (rezistenţi la temperaturi scăzute cu siguranţa) şi ultimele 10 minus-variante (sensibili la temperaturi scăzute cu siguranţă).

3. Izolarea automată a ADN genomic total

Extracţia ADN s-a realizat cu ajutorul unui robot extractor de acizi nucleici - MagNA Pure LC, (pentru extracţia ADN din ţesut animal, uman, vegetal şi din microorganisme, *Roche Applied Sciences,* Versiunea Decembrie 2005, 192 izolări). Funcţionarea extractorului de ADN se bazează pe tehnologia unor bile magnetice (eng. *magnetic-bead technology*) din sticlă/silica cu proprietăţi speciale. Probele de ţesut sunt lizate prin incubarea lor în prezenţa unui tampon ce conţine săruri chemotropice şi proteinaza K. Aparatul efectuează automat toate operaţiunile: liză celulară, legarea ADN-ului de bilele magnetice, spălarea repetată şi eluţia, după ce în prealabil s-au făcut setările de la calculatorul de comandă şi control. Softul aparatului de extracţie calculează automat cantităţile necesare de reactivi, îndrumă utilizatorul în vederea efectuării setărilor necesare şi monitorizează toate operaţiunile desfăşurate sau aflate în curs, existând posibilitatea stocării tuturor informaţiilor cu privire la procesul de izolare a acizilor nucleici.

Dupa izolarea ADN genomic total, a fost necesară o verificare a integrităţii lui prin migrarea acestuia într-un gel de agaroză de 1%, colorat cu bromură de etidiu, alături de un

marker de greutate moleculară. Extracţia acizilor dezoxiribonucleici s-a repetat în situaţiile când integritatea ADN-ului a fost afectată de nucleaze. În aceste situaţii sau atunci când cantitatea de ADN obţinută a fost insuficientă, iar numărul de probe necesar de repetat era prea mic pentru extracţia automată, izolarea ADN s-a realizat manual prin metoda Coşier redată mai jos.

4. Izolarea ADN genomic total din înotătoare de peşte – metoda Coşier

Literatura de specialitate nu pune la dispoziţia cercetătorului metode de izolare a ADN-ului din ţesuturi pornind de la ideea păstrării animalului în viaţă. În acest sens s-a trecut la optimizarea unui protocol de extracţie a ADN-ului cu proteinază K, protocol îmbunătăţit în mai multe etape de către unul din membrii colectivului nostru de cercetare – conf. dr. ing. Coşier Viorica. Specificăm că protocolul utilizat nu este unul omologat, dar singurul care a permis la acea dată extracţia ADN fără sacrificarea peştilor criorezistenţi, necesari în etapele ulterioare. Prezentăm, în continuare, protocolul de extracţie.

O bucata de 1 cm^2 din înotătoare se incubează peste noapte (10 ore) cu proteinază K la 55^oC. Fragmentele de ţesut se introduc într-un tub Eppendorf de 1,5 ml care conţine 500 µl tampon de liză şi 10 µl proteinază K (echivalentul a 200 µg dintr-o soluţie stoc de 10 mg/ml care este preparată şi congelată la – 20^oC).

Tamponul de liză: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 2.5 mM $MgCl_2$; Tween 20

După incubare, fiecărei probe i se adaugă 600 µl soluţie fenol.

Tuburile se omogenizează prin inversie timp de 15 minute după care sunt supuse unei centrifugări 8000 rpm/4 minute. În timpul centrifugării se etichetează noi tuburi Eppendorf de 1,5 ml. La sfârşitul centrifugării tuburile prezintă o fază inferioară gălbuie care conţine solventul organic, o fază superioară care conţine ADN-ul şi o fază intermediară unde sunt depozitate proteinele.

Se separă faza superioară a fiecărui tub (cca 700 µl) peste care se adaugă 550 µl fenol:cloroform. Se agită tuburile 30-60 secunde apoi se centrifughează timp de 3 minute, etichetându-se şi noile tuburi. Se mai efectuează o ultimă extracţie numai cu cloroform.

ADN-ul se precipită cu etanol 70% răcit în prealabil la -20^oC (2 volume) inversând tuburile de câteva ori şi efectuând o centrifugare la 10000 rpm. ADN-ul precipitat se usca la

aer şi se resuspendă în TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8). După dizolvarea completă a ADN-ului acesta se stochează la -20°C.

Integritatea ADN-ului este verificată prin migrarea acestuia într-un gel de agaroză de 1% colorat cu bromură de etidiu, alături de un marker de greutate moleculară.

5. Cuantificarea ADN

După extracţia ADN-ului, probele au fost cuantificate spectofotometric cu ajutorul aparatului BioPhotometer Eppendorf. Metoda spectofotometrică se bazează pe faptul că majoritatea substanţelor biologice au o rată de absorbţie caracteristică în domeniul radiaţiilor ultraviolete. Astfel, rata de absorbţie de 260 nm corespunde acizilor nucleici, cea de 280 nm proteinelor, iar 230 nm diferiţilor contaminanţi. Densitatea optică a fost măsurată la rata de absorbţie A 260 nm şi A 280 nm, făcând raportul dintre cele două absorbţii. În general, ADN-ul este considerat suficient de pur, dacă raportul celor două citiri, respectiv A_{260}/A_{280}, are valori cuprinse între 1,7 şi 2,0. Valorile mai mici de 1,7 indică impurificări cu proteine, iar cele mai mari de 2,0 impurificări cu alţi contaminanţi. Aparatul BioPhotometer Eppendorf redă atât concentraţia ADN-ului, cât şi cantitatea de ADN exprimată în ng/µl sau µg/ml.

În cadrul experimentelor noastre, puritatea medie a ADN-ului obţinut a fost de 1,8, iar concentraţia lui medie a fost de 50 ng/µl.

6. Amplificarea randomică

Pentru amplificarea ADN prin tehnica RAPD s-au utilizat 150 amorse decamere (Biosearch Technologies, Inc.). Secvenţa acestor amorse a fost aleasa la întâmplare, avându-se în vedere ca ei sa conţină guanină şi citozină pentru o ataşare fidelă a acestora de matriţa ADN. S-a ţinut cont de secvenţa nucleotidică a acestora pentru a se evita fenomenul PRIMER-DIMER şi amplificarea inadecvată a fragmentelor. Iată secvenţele amorselor utilizate care au avut ca rezultat cel puţin un produs de amplificare:

1. 5 ' d(AATTCACTGG) 3'

2. 5 ' d(AGGCTTCCAG) 3'

3. 5 ' d(AACAGTGTAG) 3'

4. 5 ' d(AGTCTGAACG) 3'

5. 5 ' d(GGTGCGCGCT) 3'

6. 5 ' d(CTGCTGTATT) 3'

7. 5 ' d(TAAAGGGCGA) 3'

8. 5 ' d(AAGAGAGACC) 3'

9. 5 ' d(GCAGAGACAC) 3'

10. 5 ' d(TCAACCGAAC) 3'

11. 5 ' d(AGAAGCGACT) 3'

12. 5 ' d(TGACAAAGAA) 3'

13. 5 ' d(GAAAAGAGCA) 3'

14. 5 ' d(GCCTGACAGG) 3'

15. 5' d(ACTTTTTCCC) 3'

16. 5 ' d(CGACGAGGTG) 3'

17. 5 ' d(TTTATTCGCT) 3'

18. 5 ' d(CTATTTAAGA) 3'

19. 5 ' d(ATATACTGTA) 3'

20. 5 ' d(AGGTAAGTCT) 3'

21. 5 ' d(TAATATATTT) 3'

22. 5 ' d(TACTCTATTG) 3'

23. 5 ' d(ACTAATCAAA) 3'

24. 5 ' d(ATTATATAGA) 3'

25. 5 ' d(GATTATGTAC) 3'

26. 5 ' d(TTAATGTCAA) 3'

27. 5 ' d(TAAATCAACT) 3'

28. 5 ' d(TTGTAGGCTA) 3'

29. 5 ' d(TATGTAATCT) 3'

30. 5 ' d(TTTTACATGT) 3'

31. 5 ' d(CGACTGCCTA) 3'

32. 5 ' d(TGTTCATCTT) 3'

33. 5 ' d(ATTTTTGGTT) 3'

34. 5 ' d(TACTAGAAAA) 3'

35. 5 ' d(TTATATTTCC) 3'

36. 5 ' d(CGTTTTCACA) 3'

37. 5 ' d(ATAAGGATAA) 3'

38. 5 ' d(AAAAAGCAAC) 3'

39. 5 ' d(GAACAGACTG) 3'

40. 5 ' d(GTATTTACTT) 3'

41. 5 ' d(TATGTTGCTG) 3'

42. 5 ' d(ACATTATTAT) 3'

43. 5 ' d(ATGTGAGCAT) 3'

44. 5 ' d(AATAACCATA) 3'

45. 5 ' d(AATACTAGCA) 3'

46. 5 ' d(AATGTCCTAA) 3'

47. 5 ' d(ATGAATTTGT) 3'

48. 5 ' d(GTTAATGTTT) 3'

49. 5 ' d(TCTACAAAAG) 3'

50. 5 ' d(AAAAGAAAAT) 3'

51. 5 ' d(TAGCGTTTTA) 3'

52. 5 ' d(CTTGTACAAC) 3'

53. 5 ' d(TACTAATAAC) 3'

54. 5 ' d(TTAGTTATTT) 3'

55. 5 ' d(AGAGAATTTC) 3'

56. 5 ' d(ACTTGTTGAC) 3'

57. 5 ' d(TAGTAAAATC) 3'

58. 5 ' d(ATTTAAAAAT) 3'

59. 5 ' d(GAAATAATTG) 3'

60. 5 ' d(CACGATAATT) 3'

61. 5 ' d(TGTATGAATA) 3'

62. 5 ' d(TGAAATTAAT) 3'

63. 5 ' d(TCTAATTGTT) 3'

64. 5 ' d(TTTTTGTTTT) 3'

65. 5 ' d(TTTCCTGCAG) 3'

66. 5 ' d(TTTCTTGAAA) 3'

67. 5 ' d(TCAGTCATGT) 3'

68. 5 ' d(CTTCTCCAAA) 3'

69. 5 ' d(AGGAATCGCT) 3'

70. 5 ' d(ATTGGCATTG) 3'

71. 5 ' d(ACCTGGGCAC) 3'

72. 5 ' d(CACCTACTCC) 3'

73. 5 ' d(TGTGTGGGGG) 3'

74. 5 ' d(TGTTTCAGCA) 3'

75. 5 ' d(TGGAAAAGTG) 3'

76. 5 ' d(GAGATCATCG) 3'

77. 5 ' d(CCAACGACCA) 3'

78. 5 ' d(GGGCAACAGA) 3'

79. 5 ' d(TGGGCGGAGG) 3'

Amplificările cu amorsele de interes au fost repetate de 2-3 ori. Concentraţia ADN matriţă trebuie să fie în general, cuprinsă între 5-500 ng/50 µl volum de reacţie, cu un optim între 10-50 ng/50 µl volum de reacţie. Pentru obţinerea soluţiei de ADN de lucru cu această concentraţie, ADN-ul a fost diluat cu TE (Tris HCl – EDTA).

Amestecul de reacţie RAPD a avut un volum de 25 µl/tub Eppendorf, cu următoarea compoziţie:

- 50 ng ADN
- 200 µM amestec dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
- 0,2 µM primer
- 2,5 mM $MgCl_2$
- 2,5 mM 10 x buffer
- Go Taq DNA Polymerase Green (Promega)
- 2% PVP (Sigma)
- apă bidistilată sterilă

Prepararea amestecului de reacţie s-a realizat în hota cu flux laminar, în condiţii sterile. Proba martor (control) conţine toate componentele amestecului de reacţie cu excepţia ADN-ului.

Amplificarea probelor s-a realizat în aparatul Eppendorf Mastercycler gradient programat astfel:

- 3 minute la 95^0C – predenaturare, urmată de 45 de cicluri cu următorul profil de temperatură :
    1. 1 minut la 93^0C – denaturare
    2. 1 minut la 34^0C – fixarea primerilor
    3. 1 minut la 72^0C – extensie
    4. extensia finală 10 minute la 72^0C.

7. Electroforeza în gel de agaroză

Produşii de amplificare au fost separaţi prin electroforeză în gel de agaroză (Promega) 1,4%.

Gelurile de agaroză au fost migrate orizontal. Soluţia tampon de electroforeză utilizată a fost Tris-borat 0,5x (TBE).

Probele de ADN amplificate au fost preparate în tampon de încărcare colorat cu albastru de bromfenol. În fiecare tub eppendorf s-a adăugat câte 5 µg de colorant. În fiecare godeu al gelului s-au pipetat câte 12 µl din produsul de amplificare. Primul godeu de obicei a fost încărcat cu un marker ADN standard (100 pb DNA Step Ladder, Promega).

Sursa de putere a fost programată la 70 V (3,5 V/cm), iar durata de migrare a fost de 2,30 ore.

Gelurile au fost colorate după migrarea benzilor în câmp electric. Astfel, după migrare, gelul a fost imersat în 150 ml 0,5x TBE la care s-a adăugat o soluţie de bromură de etidiu 0,5 µg/ml. În această soluţie gelul a fost menţinut pe o platformă agitatoare, un timp de 20 de minute.

8. Preluarea imaginilor

Bromura de etidiu îşi pierde relativ repede fluorescenţa în UV, astfel că gelurile impregnate cu acest marker nu se pot păstra; fotografierea gelului expus la UV se face imediat după migrare.

Vizualizarea produşilor de amplificare s-a realizat în lumină UV transmisă, imaginea gelurilor fiind preluată cu un sistem de achiziţie a imaginilor UVP.

9. Analiza imaginilor

În analiza statistică s-au inclus doar benzile cu o intensitate luminoasă mare. Benzile au fost detectate automat cu ajutorul programului Total Lab 120. Acest program stabileşte mărimea fragmentelor de ADN prin compararea acestora cu un ADN standard (Ladder ADN

100 pb). ADN-ul standard utilizat constă în 40 de fragmente cuprinse între 100 si 4000 pb. În urma comparării cu ADN-ul standard s-a putut stabili mărimea fiecărui fragment amplificat. Prezenţa benzii cu aceeaşi mărime a fost notată cu 1, iar absenţa ei s-a notat cu 0. Analiza gelurilor s-a făcut cu ajutorul programului Total Lab 120, obţinându-se matricea binară.

10. Rezultate

În urma amplificării randomice a ADN-ului genomic total la guppy cu 150 amorse decamere RAPD, un număr de 71 amorse nu au dus la amplificarea vreunui fragment de ADN genomic. Din cele 79 de amorse care au amplificat fragmente ADN din catenele matriţă, un număr de 35 nu au prezentat polimorfism (Anexele A si B), în ceea ce priveşte poziţia şi numărul fragmentelor migrate între indivizi. În 44 dintre cazuri probele amplificate au prezentat polimorfism. Uneori, polimorfismul a fost unul redus (Anexa C), iar alteori gelurile au prezentat un polimorfism semnificativ (figura 1).

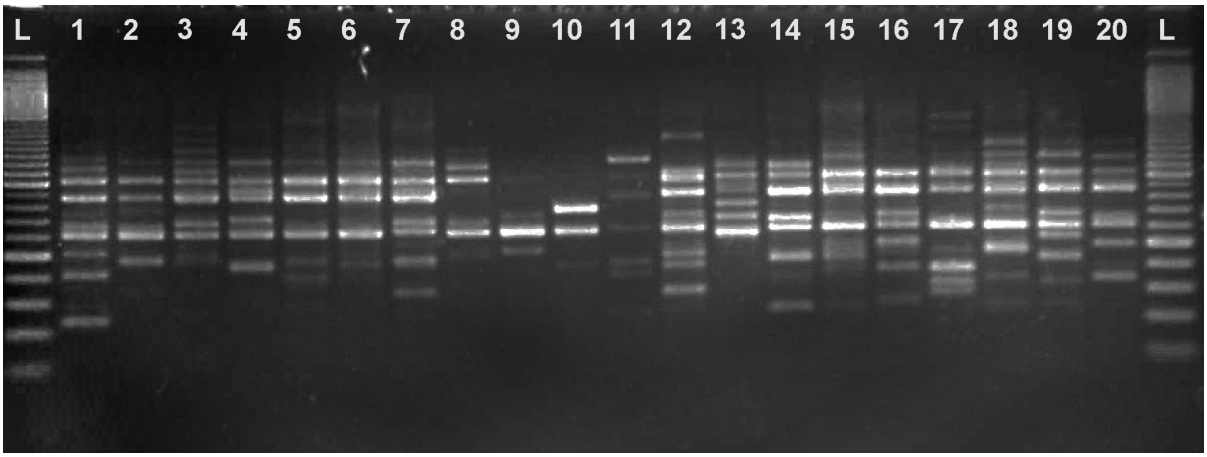


Figura 1. Benzile de migrare şi polimorfismul obţinut în urma amplificării ADN genomic cu primerul nr 72.

Cu toate ca s-a obţinut un număr suficient de mare de geluri care prezentau polimorfism semnificativ, acest polimorfism nu s-a dovedit a fi asociat cu criorezistenţa sau cu

criosensibilitatea indivizilor studiaţi (figura 1), repartiţia benzilor fiind aleatorie. Un singur caz de astfel de polimorfism asociat cu categoria fenotipică a fost observat în urma analizei gelurilor (figura 2), din totalul de 150 de amorse testate.

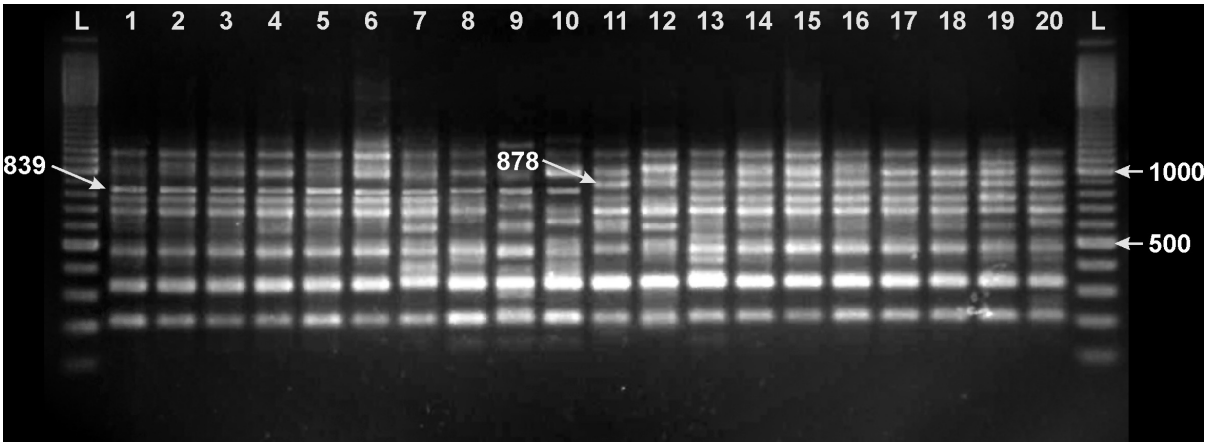


Figura 2. Polimorfismul obţinut cu amorsa 77, polimorfism asociat cu criorezistenţa (fragment de 878 baze suplimentar) şi cu criosensibilitatea (fragment de 839 baze suplimentar); indivizi criorezistenţi 11-20, indivizi criosensibili 1-10.

În cazul amorsei nr 77, la indivizii rezistenţi (11-20) apare un fragment de 878 nucleotide lungime, fragment care la cei sensibili (1-10) are o lungime de 839 nucleotide. Probabil că polimorfismul este asociat cu o mutaţie în cadrul secvenţei genei pentru criorezistenţă, mutaţie care duce la amplificarea unui fragment mai lung (în primul caz) şi respectiv mai scurt (în al doilea caz), prin tehnica RAPD. Rezultatele au fost interpretate statistic prin metoda statistică UPGMA (figura 3), după calcularea prealabilă a matricei binare şi a matricei de distanţă. Rezultatele analizei arată clar împărţirea celor 20 de indivizi în două categorii distincte (1-10 şi 11-20), adică indivizi rezistenţi şi indivizi sensibili (figura 3).

Metoda folosită - UPGMA (engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) este mai degrabă un pachet de metode ce implică analiza grupărilor (engl. *Clustering Methods*) şi indică relaţiile de înrudire dintre unităţile taxonomice operaţionale (OTU – engl. *Operational Taxonomic Units*) prin determinarea asemănărilor (similarităţii) sau a diferenţelor (disimilarităţii) dintre toate perechile posibile ale unui set dat (Dragoş 2003). Metoda UPGMA elaborată de Sokal & Micherner (1958) a fost îmbunătăţită de Sneath & Sokal (Numerical Taxonomy, 1973) şi este în general utilizată în genomică, taxonomie şi filogenie

(Dragoş 2003). Utilizarea ei aici se justifică prin necesitatea indicării unor similarităţi sau disimilarităţi între indivizii criorezistenţi şi cei criosensibili. Arborele construit prin metoda UPGMA este adesea denumit fenogramă, dendrogramă sau cladogramă.

Numărul de markeri identificaţi (1) pentru această genă este redus, lucru care era de aşteptat având în vedere că s-a folosit în amplificare ADN genomic total care conţine ADN necodificator în proporţie mare. Totuşi, simplitatea tehnicii RAPD permite testarea unui număr mare de amorse pe unitatea de timp, ceea ce ne-a îndemnat sa o folosim în aceste studii. Viabilitatea şi repetitivitatea tehnicii RAPD în acest demers ştiinţific rămâne să fie stabilită în etapa următoare prin analiza indivizilor din generaţia F1.

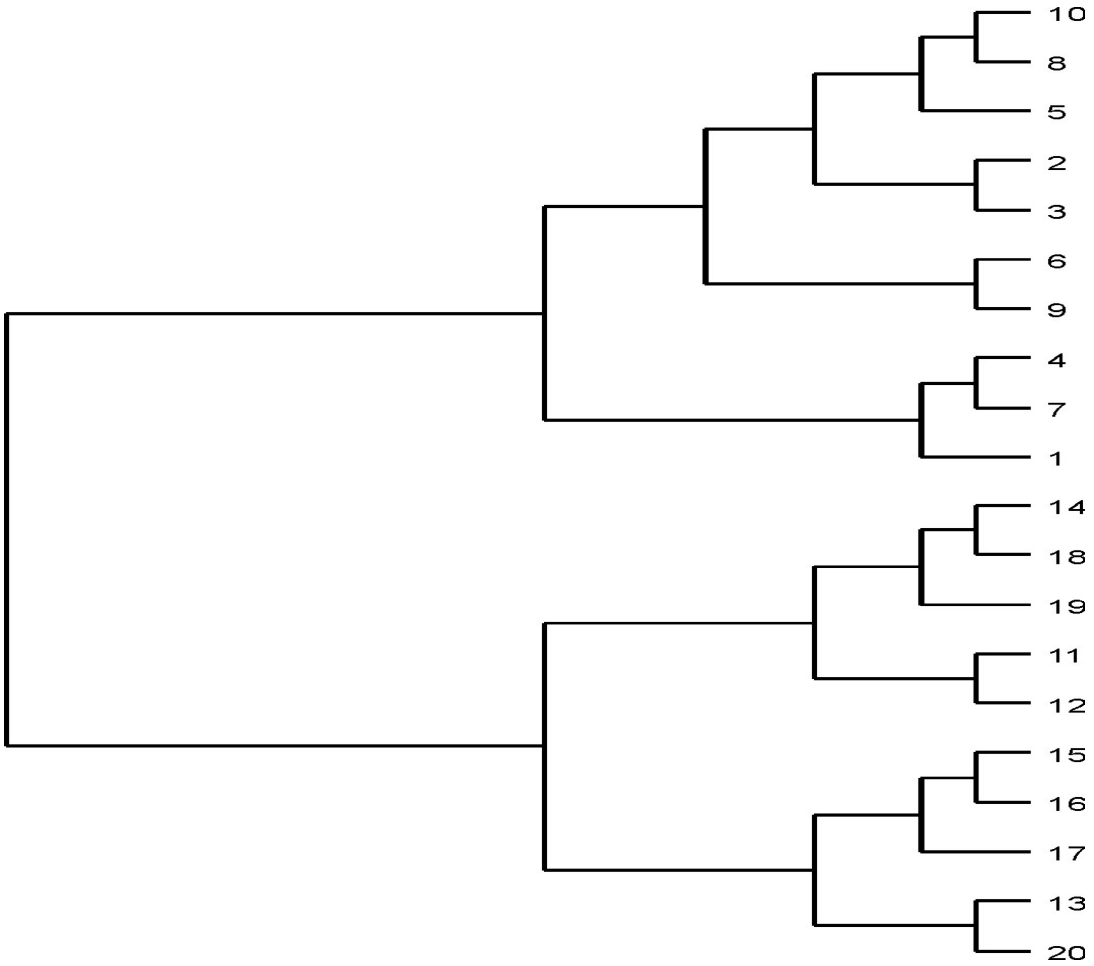


Figura 3. Dendrograma benzilor de migrare obţinute prin amplificarea ADN cu amorsa 77, realizată prin metoda UPGMA, care arată clar împărţirea celor 20 indivizi în două categorii distincte (1-10 şi 11-20) (dendrogramă realizată după calcularea prealabilă a matricei binare şi a matricei de distanţă).

11. Rezultate secundare

Pe lângă obiectivele propuse şi atinse, accidental au fost obţinute rezultate inedite şi brevetabile cu privire la creşterea artificială a dimensiunilor corporale ale masculilor speciei studiate, *Poecilia reticulata.* Procedeul elaborat se bazează pe inhibarea temporară şi amânarea diferenţierii sexuale a masculilor. Ele au pornit de la rezultatele secundare ale activităţilor etapei anterioare care au iscat interes şi au fost continuate în această etapă prin tatonări succesive. Astfel, în Etapa I, pentru evitarea apariţiei rarelor cazuri de neomasculi spontani în populaţia genitorilor masculi sau a apariţiei femelelor false în populaţia genitorilor femeli, s-a impus modificarea procentului celor două sexe cu aproximativ 3%. Această modificare uşoară s-a realizat prin administrarea orală a hormonului (metiltestosteron, respectiv estradiol valerat) în concentraţie de 100 mg/kg furaj. Pe lângă rezultatele urmărite, s-a observat o întârziere a diferenţierii sexuale şi o dezvoltare corporală accentuată a indivizilor masculi în loturile tratate cu estradiol valerat. În contrast cu acestea, masculii loturilor tratate cu metiltestosteron au dezvoltat un colorit şi o maturizare precoce, detrimentală însa dezvoltării corporale. Aceşti masculi trataţi cu metiltestosteron, deşi au prezentat un colorit intens, au manifestat întârziere în creştere (atât în lungime, cât şi în robusteţe).

Rezultatele obţinute şi micile diferenţe obţinute între loturile tratate cu cele două tipuri de hormoni sexuali ne-au determinat să continuăm studiile prin tatonări succesive cu concentraţii de 200, 300 şi 400 mg estradiol valerat/kg furaj (pentru produsul utilizat, a se vedea Anexa E).

Prepararea furajului tratat cu hormon. Se pun 2 ml alcool etilic 96% într-un mojar la care se adaugă cantitatea de estradiol valerat cantărită. În cazul în care hormonul folosit se află sub formă de tablete sau drajeuri, acestea se mojarează cu atenţie, ca bucăţile să nu sară din mojar în timpul zdrobirii lor. Se mojarează repede, pentru evitarea evaporării alcoolului, până la obţinerea unui lichid omogen lăptos, la care se adaugă încă 2 ml alcool 96%, cu care se spală pereţii mojarului. Se adaugă 20 g furaj de bună calitate, mărunt granulat (diametrul granulelor trebuie să fie mai mic de 1 mm), în mojar şi se omogenizează cu pistilul. Se goleşte conţinutul din mojar pe o hârtie de filtru dublă şi se lasă să se evapore alcoolul timp de 3 ore. Hrana astfel impregnată cu hormon se împachetează şi se păstrează la loc uscat, răcoros şi ferit de lumina solară. Pentru obţinerea unor cantităţi mai mari de furaj tratat cu hormon, se

utilizează 100 ml etanol, cantitatea de hormon şi 1 kg furaj de bună calitate, mărunt granulat şi un mojar adecvat.

Rezultatele observate la concentraţii de 400 mg estradiol valerat/kg furaj sunt spectaculoase. Diferenţierea sexuală a masculilor poate fi amânată cu mai mult de o lună de zile, perioada în care ei se dezvoltă somatic după caracteristicile sexului femel. Utilizarea reţetei stabilite, îmbogăţită cu 400 mg/kg estradiol valerat, administrate în anumite perioade ale ontogeniei masculilor, duce la creşterea dimensiunilor corporale cu 30-40%. Specificăm faptul că dimensiunea redusă a masculilor este unul din principalele neajunsuri ale creşterii peştilor guppy în scopuri de producţie pentru piaţa acvariofilă. Deşi, aplicarea procedeului pentru piaţa acvariofilă ar prezenta inconvenientul creşterii procentajului de femele per ansamblu, procedeul este extrem de util guppycultorilor care urmăresc producerea de indivizi cu caracteristici excepţionale pentru competiţii, expoziţii şi acvarii de lux. Rezultatele obţinute sunt brevetabile, iar primele demersuri în acest sens au fost deja efectuate.

Concluzii

- În urma amplificării randomice a ADN-ului genomic la guppy cu 150 amorse decamere diferite, un număr de 71 amorse nu au dus la amplificarea ADN genomic;
- Din cele 79 de amorse care au amplificat fragmente ADN din catenele matriţă, un număr de 35 nu au prezentat polimorfism, în ceea ce priveşte poziţia şi numărul fragmentelor migrate, între indivizi;
- În 44 dintre cazuri, probele amplificate au prezentat polimorfism. Uneori, polimorfismul a fost unul redus, iar alteori gelurile au prezentat un polimorfism semnificativ;
- Cu toate că s-au obţinut un număr suficient de mare de geluri care prezentau polimorfism semnificativ, aceste polimorfisme nu s-au dovedit a fi asociate cu criorezistenţa sau cu criosensibilitatea indivizilor studiaţi;
- Un singur caz de astfel de polimorfism asociat cu categoria fenotipică a fost observat în urma analizei gelurilor, din totalul de 150 de amorse testate;
- În cazul amorsei nr 77, la indivizii rezistenţi apare un fragment de 878 nucleotide lungime, fragment care la cei sensibili are o lungime de 839 nucleotide. Probabil că polimorfismul este asociat cu o mutaţie în cadrul secvenţei genei pentru criorezistenţă,

mutaţie care duce la amplificarea unui fragment mai lung (în primul caz) şi respectiv mai scurt (în al doilea caz), prin tehnica RAPD;

- Dendrograma rezultată în urma analizei fragmentelor amplificate de amorsa nr 77 întocmită prin metoda UPGMA, pe baza matricei binare şi a matricei de distanţă, arată clar împărţirea celor 20 indivizi analizaţi în două categorii distincte (1-10 şi 11-20), adică indivizi criosensibili şi indivizi criorezistenţi;
- Oricum, numărul de markeri identificaţi pentru această genă (1) este redus, cum era de aşteptat - având în vedere că s-a folosit în amplificare ADN genomic, care conţine secvenţe necodante în proporţie mare. Totuşi, simplitatea tehnicii RAPD permite testarea unui număr mare de amorse per unitatea de timp, ceea ce ne-a îndemnat să o folosim în aceste studii;
- Viabilitatea şi repetitivitatea tehnicii RAPD în acest demers ştiinţific rămâne să fie stabilită în etapa următoare prin analiza indivizilor din generaţia F1;
- Pe lângă obiectivele propuse şi atinse, accidental au fost obţinute rezultate inedite şi brevetabile cu privire la creşterea artificială a dimensiunilor corporale ale masculilor speciei *Poecilia reticulata.* Procedeul elaborat se bazează pe inhibarea temporară şi amânarea diferenţierii sexuale a masculilor. Ele au pornit de la rezultatele secundare ale activităţilor etapei anterioare care au iscat interes şi au fost continuate în această etapă prin tatonări succesive.
- Utilizarea reţetei stabilite, îmbogăţită cu 400 mg/kg estradiol valerat, administrate în anumite perioade ale ontogeniei masculilor, duce la creşterea dimensiunilor corporale cu 30-40%;
- Specificăm faptul că dimensiunea redusă a masculilor este unul din principalele neajunsuri ale creşterii peştilor guppy în scopuri de producţie pentru piaţa acvariofilă. Deşi, aplicarea procedeului pentru piaţa acvariofilă ar prezenta inconvenientul creşterii procentajului de femele per ansamblu, procedeul este extrem de util guppycultorilor care urmăresc producerea de indivizi cu caracteristici excepţionale pentru competiţii, expoziţii şi acvarii de lux.

Mulţumiri

Adresăm mulţumiri pentru informaţii şi ajutorul acordat, domnilor prof. dr. biol. Dragoş Nicolae şi biol. drd. Jakab Endre de la Universitatea Babes-Bolyai Cluj-Napoca.

Bibliografie

Buckley B. A., Place S. P., Hofmann G. E., 2004 Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. The Journal of Experimental Biology 207:3649-3656.

Bud I., Petrescu-Mag I. V., Pamfil D. C., Boaru A., Coşier V., Vlaic A., Pusta D., Ladoşi D., Vlădău V., Pop S. N., Sisea C., Botha M., Bâlteanu V., Pop R., Ştefan R. G., Odagiu A., Petrescu D. C., Huşovschi A., Hărşan R., Cocan D., Csép L., Vanea C., Maxim E., Popescu O., Dragoş N., Coman N., Dordea., Keul A., Petrescu-Mag R. M., Damert A., Lupan I., Kelemen B. S., Ferencz B. K., Herlea O. M., Băcilă I., Chilici A. M., Jakab E., Şuteu D. C., Basangiu F. B., Bucs S. L., Nagy C. I., Balint M., Demeter J. S., Chira S., Csorba K. M., Marosi B., Gal F., Gorgan L., Câmpeanu M. M., Surugiu V., Zamfirescu S., Buburzan L., Gherasim S. R., Neagu A., 2007 Proiect PN II, nr 51-056, Studiul genelor HSP în cadrul unor specii de peşti cu o deosebită valoare economică în vederea ameliorării lor. Planul Naţional de Cercetare Dezvoltare şi Inovare II, Organizat de Autoritatea Naţională pentru Cercetare Ştiinţifică şi Centrul Naţional de Management Programe.

Dragoş N., 2003 Structura şi evoluţia genomului. Note de curs. Universitatea Babes-Bolyai, Facultatea de Biologie şi Geologie, Cluj-Napoca.

Dreyer C., M. Hofmann 2007 Expressed sequence tags (ESTs) of the guppy, *Poecilia reticulata.* BMC Genomics 8:269.

Fujio Y., Nakajima M., Nagahama Y., 1990 Detection of a low temperature-resistant gene in the guppy (*Poecilia reticulata*), with reference to sex-linked inheritance. The Japanese Journal of Genetics 65(4):201-207.

Hofmann G. E., Buckley B. A., Airaksinen S., Keen J. E., Somero G. N., 2000 Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Family Nototheniidae). The Journal of Experimental Biology 203:2331-2339.

Iwama G. K., Wijayan M. M., Forsyth R. B., Ackerman P. A., 1999a Heat shock proteins and physiological stress in fish. Amer Zool 39:901-909.

Karayücel I., Ak O., Karayücel S., 2006 Effect of temperature on sex ratio in guppy *Poecilia reticulata* (Peters 1860) Aquaculture Research 37:139–150.

Kondo H., Harano R., Nakaya M., Watabe S., 2004 Characterization of goldfish heat shock protein-30 induced upon severe heat shock in cultured cells. Cell Stress & Chaperones 9(4):350-358.

Lo W.-Y., Liu K.-F., Liao I.-C., Song Y.-L., 2004 Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Cell Stress & Chaperones 9(4):332-343.

Mag I. V., Bud I., Petrescu R. M., 2006 Sex-dependent mortality in the guppyfish. Acta Ichtiologica Romanica 1:153-164.

Makino S., Whitehead G. G., Lien C.-L., Kim S., Jhawar P., Kono A., Kawata Y., Keating M. T., 2005 Heat-shock protein 60 is required for blastema formation and maintenance during regeneration. PNAS 102(41):14599-14604.

Molina A., Di Martino E., Martial J. A., Muller M., 2001 Heat shock stimulation of a tilapia heat shock protein 70 promoter is mediated by a distal element. Biochem J 356:353-359.

Mosser D. D., Heikkila J. J., Bols N. C., 1986 Temperature ranges over which rainbow trout fibroblasts survive and synthesize heat-shock proteins. J Cell Physiol 128:432-440.

Norris C. E., Brown M. A., Hickey E., Weber L. A., Hightower L. E., 1997 Low-molecular-weight heat shock proteins in a desert fish (*Poeciliopsis lucida*): homologs of human HSP27 and *Xenopus* HSP30. Mol Biol Evol 14(10):1050-1061.

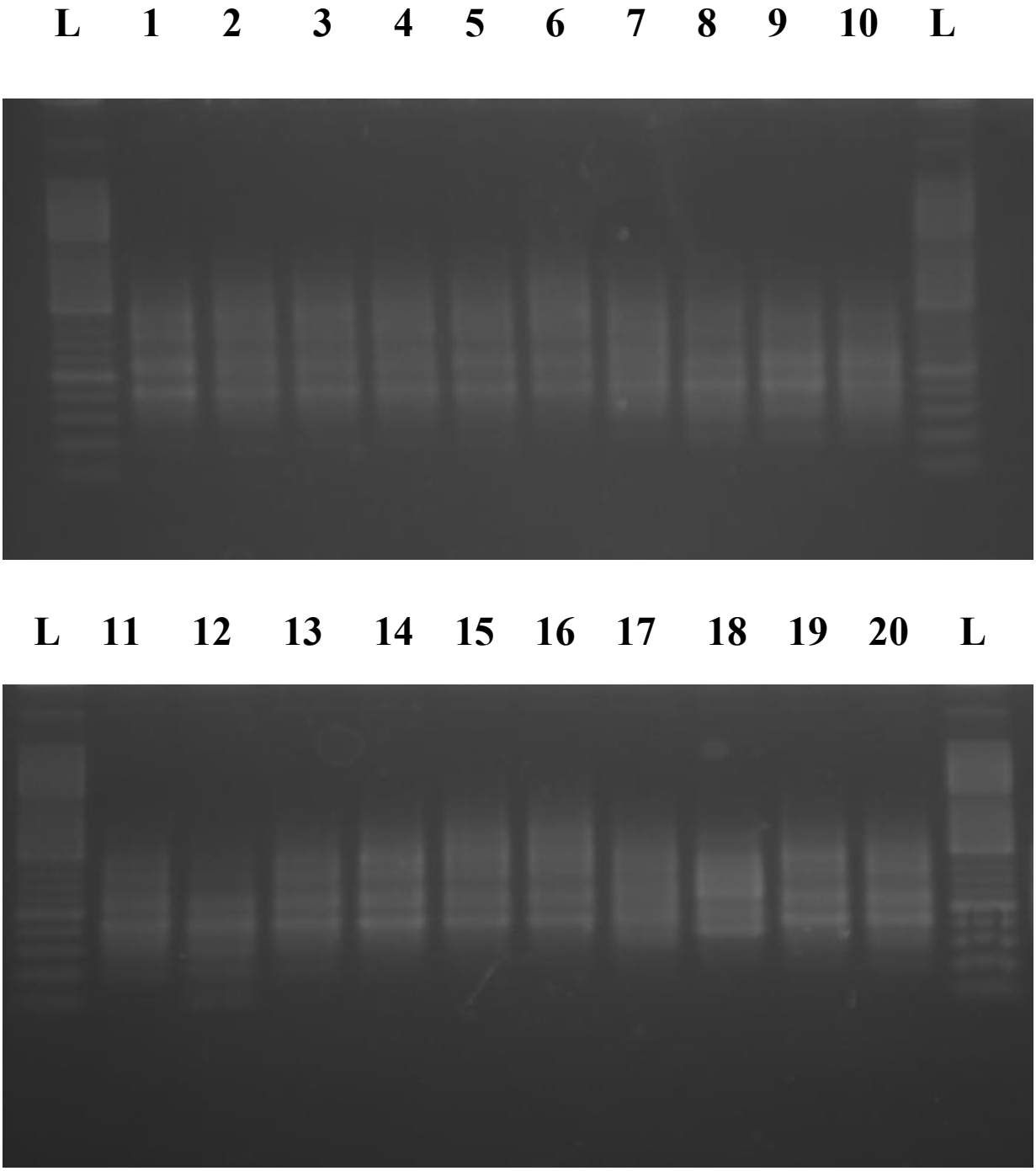
Păsărin B., Gorgan L., Bura M., Botha M., Petrescu-Mag I. V., 2007 The invazive potenţial of the exotic guppyfish (Poecilia reticulata Peters 1859) in temperate zone. Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Ambientum 1-2:179-187.

Petrescu-Mag, I. V., Bud I., Păsărin B., Bura M., Gorgan L., Petrescu-Mag R. M., Coşier V., Botha M., 2007 Rezistenţa la temperaturi scăzute ale apei la guppy (*Poecilia reticulata* Peters 1859). In: Lucrările simpozionului Realizări în cercetarea ştiinţifică din biotehnologie obţinute prin Programul CEEX – Modulul 1, Biotech p.32, ISBN 978-973-667-251-4, Editura CERMI, Iaşi.

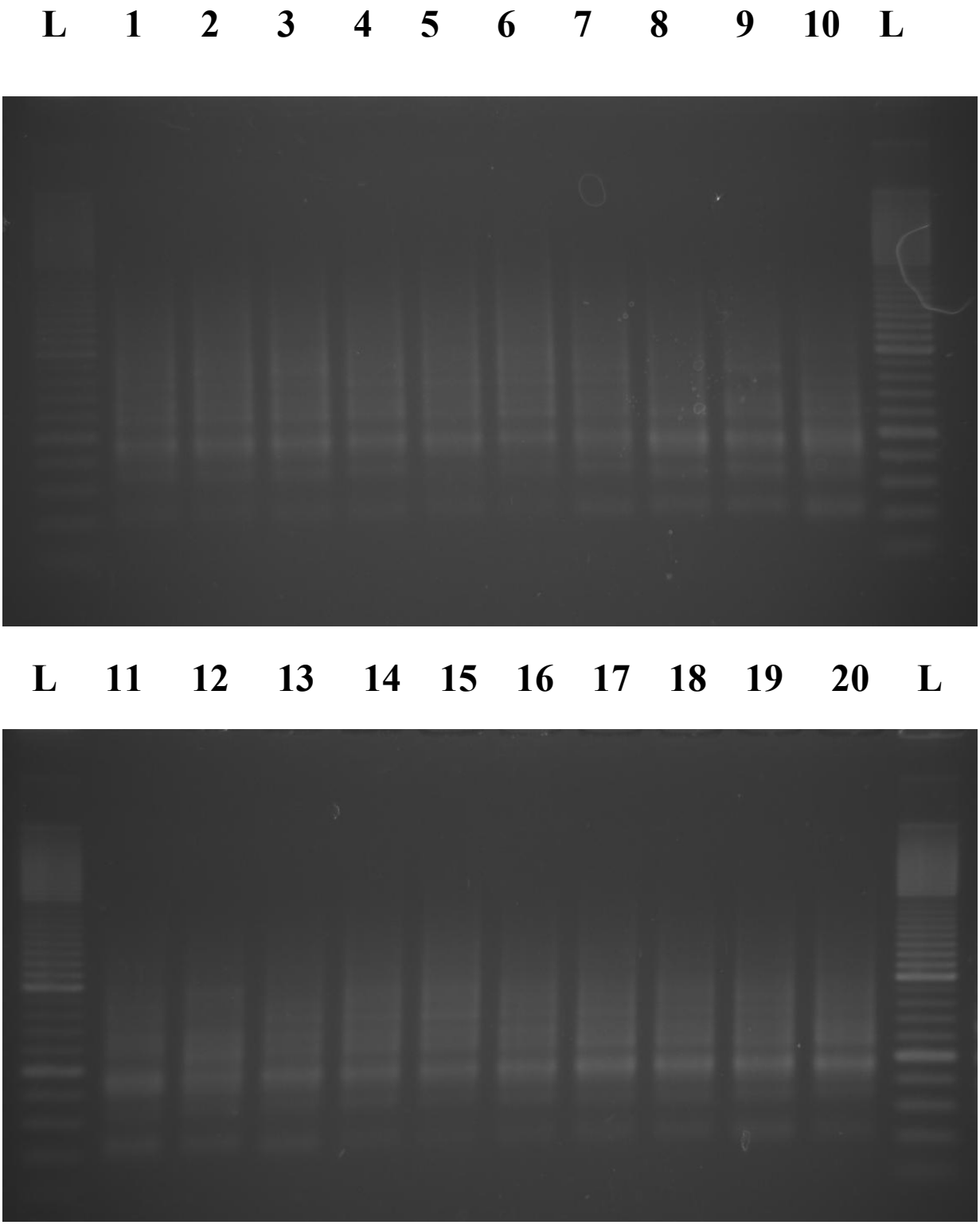
Rabindran S. K., Giorgi G., Clos J., Wu C., Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. Proc Natl Acad Sci USA 88:6906-6910.

Wilhelm V., Huaracán B., Martínez R., Rosemblatt M., Burzio L. O., Valenzuela P. D. T., 2003 Cloning and expression of the coding regions of the heat shock proteins HSP10 and HSP16 from *Piscirickettsia salmonis*. Biol Res 36:421-428.

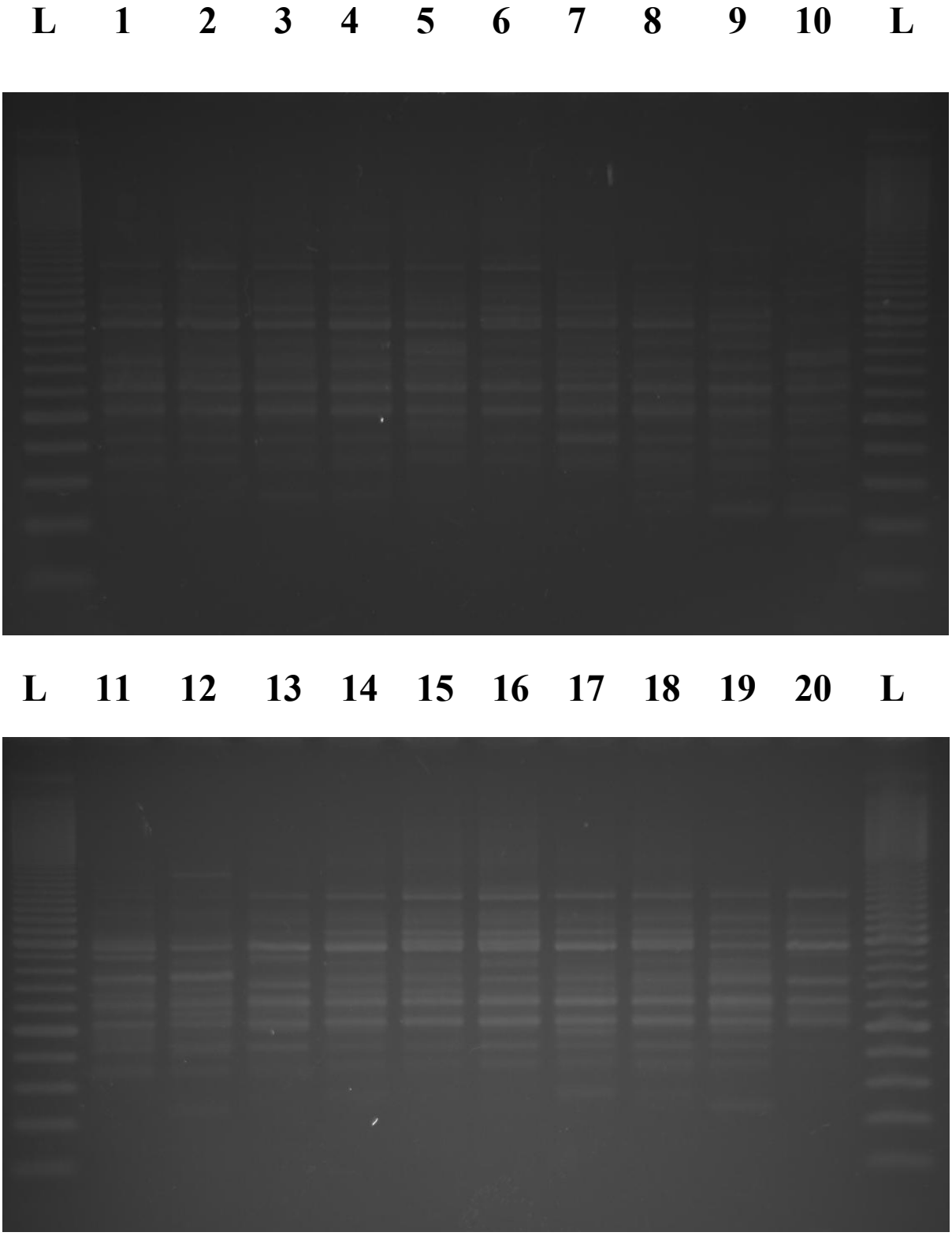
Anexe



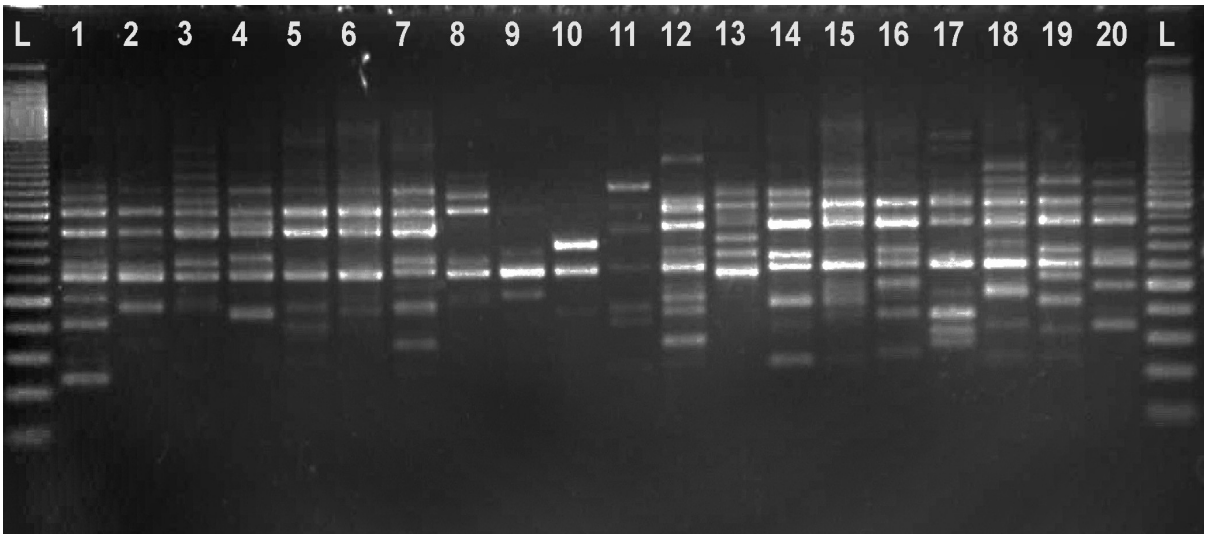
Anexa A. Rezultatele amplificării RAPD cu amorsa 79. Exemplu de produs de amplificare fără polimorfism între indivizi (1-10 sensibili, 11-20 rezistenţi).

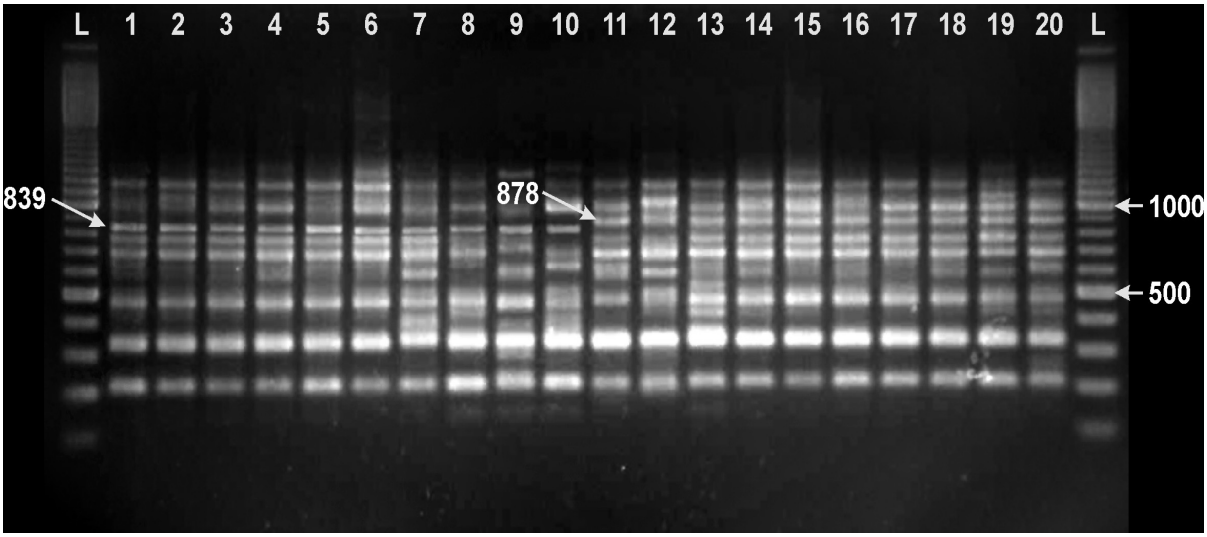


Anexa B. Rezultatele amplificării RAPD cu amorsa 9. Exemplu de produs de amplificare fără polimorfism între indivizi (1-10 sensibili, 11-20 rezistenţi).

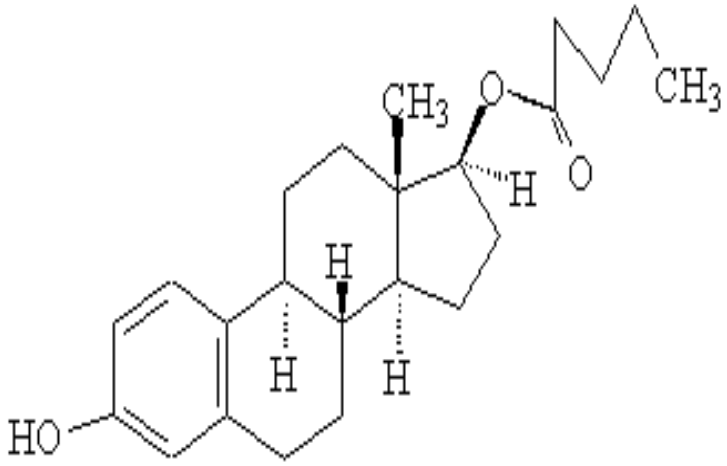


Anexa C. Rezultatele amplificării RAPD cu amorsa nr 5. Exemplu de polimorfism slab între indivizi (1-10 sensibili, 11-20 rezistenţi).





Anexa D. Exemple de polimorfism puternic între indivizi (sus, amplificare cu amorsa 72 – fără relevanţă din punctul de vedere al rezistenţei la temperaturi scăzute; jos, amplificare cu amorsa 77 – benzi asociate cu criorezistenţa, fragment de 878 pb suplimentar, respectiv criosensibilitatea, fragment de 839 pb suplimentar); indivizi criorezistenţi 11-20, indivizi criosensibili 1-10.



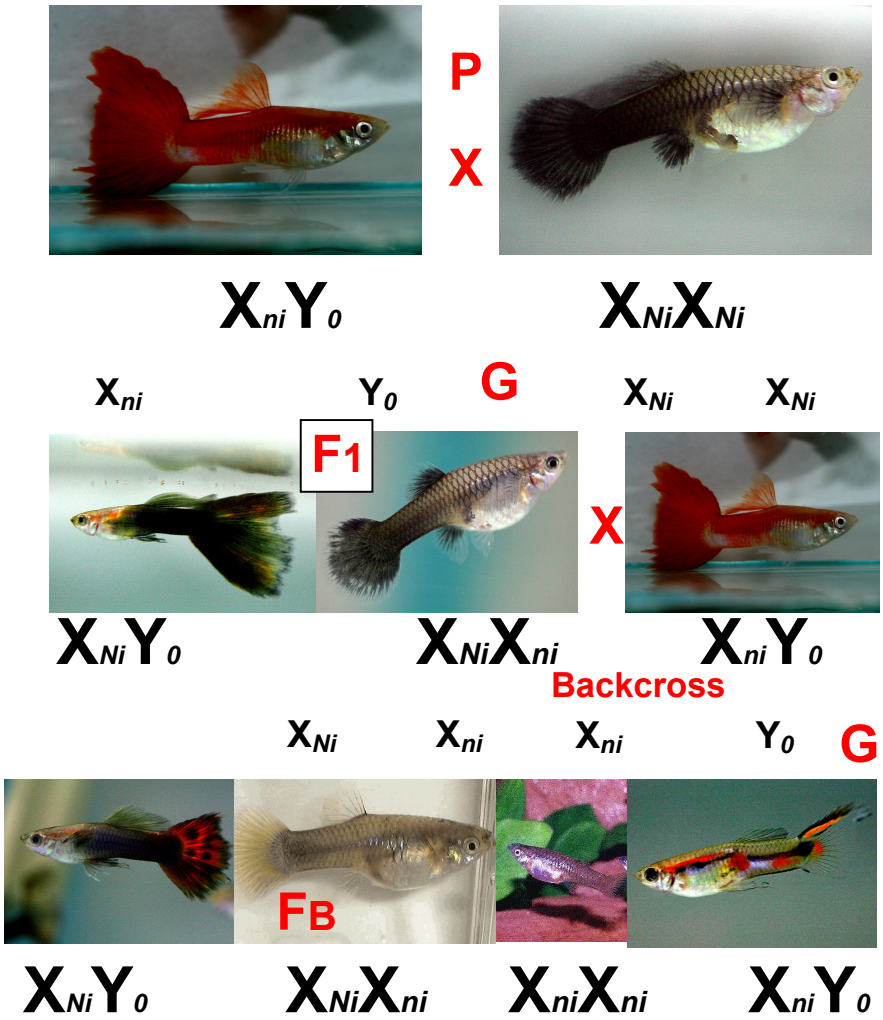
Anexa E. Substanţa activă utilizată - estradiol valerat (sus) şi produsul farmaceutic Cyclo-Progynova®; s-au utilizat drajeurile albe, care conţin doar estrogenul; drajeurile roşii conţin în plus derivaţi ai progesteronilor.

Anexa F. *Poecilia reticulata*, mascul din varietatea Red Blond (utilizat în programul de ameliorare propus prin proiectul CEEX 140/2006).

Anexa G. *Poecilia reticulata*, femelă din varietatea Red Blond (utilizată în programul de ameliorare propus prin proiectul CEEX 140/2006).

Anexa H. *Poecilia reticulata*, mascul din varietatea Half-Black Black (utilizat în programul de ameliorare propus prin proiectul CEEX 140/2006).

Anexa I. *Poecilia reticulata*, femelă din varietatea Half-Black Black (utilizată în programul de ameliorare propus prin proiectul CEEX 140/2006).



Anexa J. Redare schematică a programului de ameliorare al speciei *Poecilia reticulata*, propus prin proiectul CEEX 140/2006.

ETAPA III

Rezumat

Obiectivul etapei a III-a a fost eliminarea alelelor recesive de la locusul genei pentru criorezistenţă. Acestui obiectiv îi corespund mai multe activităţi prevazute în planul de realizare al proiectului sau neprevăzute dar necesare demersurilor noastre ştiinţifice în proiect. Activităţile desfăşurate au fost după cum urmează. Încrucişarea masculilor Red Blond criorezistenţi cu femele Half-Black homozigote pentru gena *Nigrocaudatus,* criorezistente, în vederea obţinerii de femele Half-Black criorezistente şi heterozigote pentru gena *Nigrocaudatus*. Creşterea alevnilor din generaţia F1, rezultaţi în urma încrucişării mai sus menţionate. Efectuarea unor încrucişări de tip backcross ale femelelor obţinute în F1 cu masculii iniţiali Red Blond în vederea homozigotării în generaţia Fb a genei *Nigrocaudatus* – genă marker a cromosomului X (cromosom posesor al genei de interes). Creşterea progeniturii rezultate în generaţia Fb, mai ales a femelelor homozigote pentru gena criorezistenţei şi a masculilor hemizigoţi criorezistenţi. Crearea unui nucleu în vederea închegării unei populaţii ameliorate criorezistente de guppy, al cărei genofond să nu includă alela recesivă, genă care nu conferă criorezistenţă. Bineînţeles, la sfârşitul etapei a fost necesară verificarea performanţelor şi a calităţii liniei criorezistente de peşti guppy create.

Analiza frecvenţelor fenotipurilor din generaţia F_B prin testul χ^2 indică faptul că ipoteza de la care s-a pornit este reală, iar procedeul elaborat este viabil, repetabil, brevetabil şi aplicabil. Au fost obţinuţi în generaţia F_B un număr de 158 masculi hemizigoţi la locusul criorezistenţei şi 167 femele homozigte la acelaşi locus. Femelele şi masculii criorezistenţi identificaţi prin *linkage* după culoarea corpului, produc prin împerechere produc un număr consistent de indivizi care constituie o linie pură de guppy criorezistent.

Exploatarea liniei criorezistente în crescătorii aduce beneficii producătorilor de peşti guppy odată cu scăderea costurilor de încălzire a apei şi previne mortalitatea în masă cauzată de răcirea exagerată a apei în timpul transportului peştilor. Precizăm că linia criorezistentă nu întâmpină dificultăţi de creştere sau reproducere nici la temperaturi ridicate precum 28ºC şi se adaptează bine la variaţia valorii temperaturii între limite largi. Până în momentul de faţă, nu exista nici un procedeu biotehnologic de ameliorare a peştilor guppy pentru rezistenţa la temperaturi scăzute ale apei. Varietatea Red Blond din programul nostru poate fi, în lipsă,

înlocuită cu orice varietate care nu prezintă caracterul fenotipic Half-Black. Varietatea Half-Black Black nu este nici ea obligatorie spre utilizat în procedeu, dar este obligatoriu ca varietatea care o înlocuieşte să prezinte caracterul Half-Black, adică una din genele *Nigrocaudatus* I sau *Nigrocaudatus* II (exemple de astfel de varietăţi: Half-Black Red, Half-Black Blue, Half-Black Yellow, Half-Black White).

Linia criorezistentă, obţinută de noi folosind ca genitori varietăţile Red Blond şi Half-Black Black se caracterizează prin următoarele trăsături coloristice mascule: are corpul de tip sălbatic, colorat normal, incluzând cel mai frecvent nuanţe de roşu, albastru iridescent, galben, verde, negru şi uneori alb metalizat. Acesta aduce mult cu tiparele coloristice observate la guppy sălbatic. Înotătoarele caudală şi dorsală sunt puternic pigmentate şi au o culoare roşie-cărămizie. Corpul masculilor are o lungime standard (SL) medie de 26 mm, iar înotătoarele caudală şi dorsală au o lungime caracteristică varietăţilor ornamentale, prima reprezentând la maturitate 8/10 din lungimea standard a corpului. Femelele prezintă un colorit de tip sălbatic şi o dimensiune corporală (SL) la maturitate de 50 mm. Cele mai importante trăsături ale liniei sunt aspectele legate de toleranţa la frig, astfel: linia este homozigotă la locusul pentru criorezistenţă, se dezvoltă şi se înmulţeşte fără probleme la temperaturi cuprinse de între 17 şi 19ºC, supravieţuieşte câteva ore la 10-12ºC şi câteva zile la 14-16ºC. De asemenea, ea se adaptează bine la variaţii în limite largi ale temperaturii apei, neîtâmpinând probleme de creştere sau reproducere la 28ºC sau nici la valori mai ridicate. Dacă formele parentale, crescute la 22-24ºC ating dimensiunea de vânzare (1,8-2,0 SL masculii şi 2,5-3,0 SL femelele) la vârsta de 61-62 zile, linia criorezistentă crescută la 17-19ºC atinge aceeaşi dimensiune de vânzare la vârsta de 65-67 zile. Specificăm că efectul heterozis se observă la indivizii din F_B doar dacă îi comparăm cu formele parentale pure iniţiale şi nu dacă se compară cu femelele mame din generaţia F_1. Restul caracteristicilor nu diferă faţă de majoritatea varietăţilor comune de peşti guppy, aşa cum nici cerinţele lor faţă de parametrii optimi de creştere nu diferă.

Mai trebuie menţionat faptul că temperatura apei trebuie ridicată obligatoriu la 28ºC în situaţiile când apar boli cauzate de agenţi patogeni precum *Saprolegnia spp* (saprolegniaza) sau *Ichthyophtirius multifilis* (ichtioftiriaza). Pe lângă terapia prin hipertermie mai trebuie aplicată şi unele cu sare de bucătărie, verde de malachit, albastru de metilen sau tripafavin.

1. Obiectivele fazei de execuţie

Obiectivul etapei a III-a (a se vedea Obiectivul III) a fost eliminarea alelelor recesive de la locusul genei pentru criorezistenţă. Acestui obiectiv îi corespund mai multe activităţi prevăzute în planul de realizare al proiectului sau neprevăzute dar necesare demersurilor noastre ştiinţifice în proiect:

- Încrucişarea masculilor Red Blond criorezistenţi cu femele Half-Black homozigote pentru gena *Nigrocaudatus*, criorezistente, în vederea obţinerii de femele Half-Black criorezistente şi heterozigote pentru gena *Nigrocaudatus*;
- Creşterea alevinilor din generaţia F1, rezultaţi în urma încrucişării mai sus menţionate;
- Efectuarea unor încrucişări de tip backcross ale femelelor obţinute în F1 cu masculii iniţiali Red Blond în vederea homozigotării în generaţia Fb a genei *Nigrocaudatus* – genă marker a cromosomului X (cromosom posesor al genei de interes);
- Creşterea progeniturii rezultate în generaţia Fb, mai ales a femelelor homozigote pentru gena criorezistenţei şi a masculilor hemizigoţi criorezistenţi;
- Crearea unui nucleu în vederea închegării unei populaţii ameliorate criorezistente de guppy, al cărei genofond să nu includă alela recesivă, genă care nu conferă criorezistenţă;
- Verificarea performanţelor şi calităţii liniei criorezistente de peşti ornamentali guppy.

2. Introducere

Procedeul de ameliorare genetică a peştelui guppy (*Poecilia reticulata*) elaborat şi testat în prezentul proiect se bazează pe sex-likage, tratamente hormonale, încrucişare şi retroîncrucişare. Guppy este o specie de interes economic, comercial şi ştiinţific. Importanţa lui se referă atât la numărul mare în care este cerut pe piaţa acvariofilă, cât şi la faptul că el este un organism model în ecologie, etologie, ecotoxicologie, filogenie şi genetică. Procedeul

prezentat în cele ce urmează poate fi folosit cu succes pentru obţinerea unei linii de guppy rezistente la temperaturi scăzute ale apei în doar două generaţii, fiind util crescătorilor de peşti ornamentali pentru reducerea costurilor de creştere şi întreţinere a stocurilor cu destinaţie acvariofilă.

„Peştele milionar", cum mai este numit guppy, are un determinism al sexelor de tip *Drosophila* (Winge 1922a, 1922b) cu heterogameţie masculă (♂XY) şi homogameţie femelă (♀XX). Acelaşi autor a arătat că, rareori, apar în populaţie masculi falşi (♂XX) sau femele false (♀XY). Majoritatea genelor de culoare sunt localizate pe cromosomii sexului la guppy, asfel încât cele mai multe tipare coloristice sunt sex-linkate (Lindholm & Breden 2002). Totuşi, Winge (1922b) a constatat multe cazuri de recombinare genetică prin crossing-over între cei doi heterosomi. Mai mult decât atât, frecvenţa recombinării de pe X pe Y diferă semnificativ de cele mai multe ori faţă de cea de pe Y pe X.

În 1947, Nybelin descria gena *Nigrocaudatus* I ca fiind o genă mutantă, X-linkată, dominantă, care determină un melanism intens în regiunea posterioară a corpului. Această descriere a rămas valabilă până azi în ciuda unor păreri conform cărora gena ar trebui să existe şi în formă Y-linkată (Lindholm & Breden 2002). O altă formă a genei, numită şi *Nigrocaudatus* II, mult mai frecventă astăzi decât prima, a fost descrisă pentru prima dată de Dzwillo (1959). Ea era descrisă tot ca o genă dominantă şi X-linkată. Ulterior, Nayudu (1979) constată că gena *Nigrocaudatus* II poate exista şi în formă Y-linkată, dar că ea este semiletală, determinând o mortalitate ridicată şi o rată de creştere foarte slabă. Totuşi, din rezultatele acestor autori rezultă o frecvenţă de recombinare de pe Y pe X de 4,00%, iar de pe X pe Y de 0,00%, ceea ce denotă faptul că gena poate fi folosită pentru markarea cromosomului X – lucru confirmat de cercetările noastre ulterioare (Petrescu-Mag 2007). Pe lângă observaţiile lui Nybelin, s-au mai constatat încă două caractere exclusiv X-linkate la guppy şi anume: *Lineatus* (un alt tipar coloristic, Winge 1927) şi o genă a rezistenţei la temperaturi scăzute ale apei (Fujio et al 1990).

În piscicultura ornamentală, o problemă importantă o constituie relaţia dintre cheltuielile de întreţinere şi randamentul la vânzare, deoarece de acestea două depinde profitul unei crescătorii. Creşterea peştilor guppy în condiţii optime se face la temperaturi cuprinse între 22 şi 26ºC (72-78ºF). Loturile obţinute prin procedeul descris aici de noi face posibilă obţinerea aceloraşi performanţe de creştere la 17-19ºC ca şi la 22-24ºC fără ca mortalitatea şi rata de creştere dintre acestea să difere semnificativ. Astfel, se poate economisi energie prin reducerea cheltuielilor de curent electric sau gaz în crescătorii.

Pentru ca planul propus să poată fi desfăşurat, a fost nevoie ca indivizii folosiţi să aibă genotipuri ♀XX sau ♂XY cunoscute, să aparţină la două linii diferite - una dintre ele cu un colorit corporal de tip tuxedo (Half-Black sau *Nigrocaudatus*) iar cealaltă de tip hipomelanic. Bineînţeles, loturile iniţiale trebuie să nu fie exagerat de consangvinizate pentru a se avea certitudinea că gena criorezistenţei există în genofondul populaţei măcar cu o frecvenţă redusă. Astfel, în prima fază a proiectului am ales ca sursă de părinţi masculi varietatea Red Blond (varietate hipomelanică ce prezintă un colorit roşu, relativ uniform, pe corp şi pe înotătoare; melanina este aproape absentă în melanocitele de pe suprafaţa corpului şi este vizibilă doar la ochi şi rareori la caudală), iar ca sursă de părinţi femeli am folosit varietatea Half-Black Black (o varietate hipermelanică, aproape complet neagră atât datorită genei *Nigrocaudatus* II, cât şi datorită unor poligene sau a genei Bcp – Black caudal peduncle). Monitorizarea genei criorezistenţei, mai precis a modului în care ea este transmisă descendenţilor, este facilitată de prezenţa genei *Nigrocaudatus* II (*Ni*), genă X-linkată care va servi drept genă de culoare marker. Procedeul elaborat prevede un număr de patru paşi.

3. Pas I - Alegerea genitorilor de tip Half-Black ♀XX şi Red Blond ♂XY.

Pentru a se avea certitudinea că femelele false nu vor apărea în lotul genitorilor Half-Black şi că masculii falşi nu vor apărea în lotul genitorilor Red Blond s-a efectuat o deviere intenţionată cu aproximativ 3% de la procentajele normale ale celor două sexe prin tratamente hormonale uşoare. Nu vom detalia aceste activităţi întrucât ele au fost raportate în prima fază a prezentului proiect.

4. Pas II – Identificarea genitorilor criorezistenţi prin studiul fenotipului lor.

Lotul de masculi Red Blond s-a supus scăderii treptate a temperaturii apei (2-4ºC/zi). Aceasta s-a continuat până când indivizii criosensibili au manifestat semne de „oboseală”, moment în care ei au fost mutaţi într-un alt bazin în care valoarea temperaturii s-a crescut treptat până la cea de comfort. Ultimii 10% din indivizii luaţi în studiu au fost consideraţi criorezistenţi si au fost readuşi treptat la temperatura de confort. Deşi nu este necesară, operaţiunea descrisă s-a aplicat şi femelelor Half-Black Black pentru o şi mai mare precizie a tehnicii de lucru. Nici aici nu vom intra în amănunte deoarece si aceasta etapa a fost depăşită şi raportată.

5. Pas III – Încrucişarea masculilor criorezistenţi Red Blond identificaţi cu femele Half-Black.

Această etapă se înscrie în prezenta fază de raportare. Masculii criorezistenţi Red Blond $X_{ni}Y_0$ au fost încrucişaţi cu femelele Half-Black $X_{Ni}X_{Ni}$. În urma acestei încrucişări, conform legilor mendeliene, au rezultat din punct de vedere coloristic indivizi cu un singur fenotip: Half-Black (sau tuxedo; figura 1) - aproximativ jumătate fiind masculi (criorezistenţi sau criosensibili) şi cealaltă jumătate fiind femele cu cel puţin un exemplar al alelei criorezistenţei.

Încrucişările au pornit cu indivizii criorezistenţi identificaţi şi raportaţi în prima fază de raportare. Deşi, lotul iniţial de reproducători a fost mai mare, din aceste loturi de indivizi am reuşit să păstrăm în bune condiţii de sănătate şi aspect comercial un număr de 21 masculi Red Blond şi 43 femele Half-Black Black. Întreţinerea loturilor în bune condiţii s-a făcut prin hrănirea de trei ori pe zi *ad libitum* cu hrană vie (*Artemia spp*, *Tubifex spp*) şi furaj de bună calitate - Tetra Rubin şi Tetra Discus. Iluminarea s-a făcut după modelul ciclului noapte-zi, aproximativ jumătate din 24 ore bazinele fiind iluminate cu lămpi din gama Glo. Bazinele de întreţinere au fost plantate cu *Cryptocorine spp* iar calitatea apei a fost monitorizată prin verificarea parametrilor la fiecare 3-4 zile şi schimbarea periodică a apei. Apa folosită a fost cea de la reţeaua de apă potabilă a municipiului Cluj-Napoca. De cele mai multe ori, apa a fost păstrată în tancuri de maturare pentru evitarea intoxicării peştilor cu oxigen activ, clor sau alţi dezinfectanţi utilizaţi.

Încrucişarea s-a făcut simultan şi panmictic pe cale naturală, prin păstrarea în acelaşi bazin de creştere a tuturor indivizilor Red Blond masculi şi Haf-Black Black femeli din cele două loturi de reproducători. După 28-30 zile de la împreunarea lor au apărut relativ sincron primele serii de pui hibrizi, primul val însumând un număr de 546 indivizi care prezentau de la naştere binecunoscutul caracter denumit de diferiţi autori ca *Nigrocaudatus* II, Half-Black sau tuxedo. Acest caracter este probabil singurul care îşi face apariţia de la faza de puiet, restul apărând mult mai târziu în ontogenia indivizilor la peştii guppy.

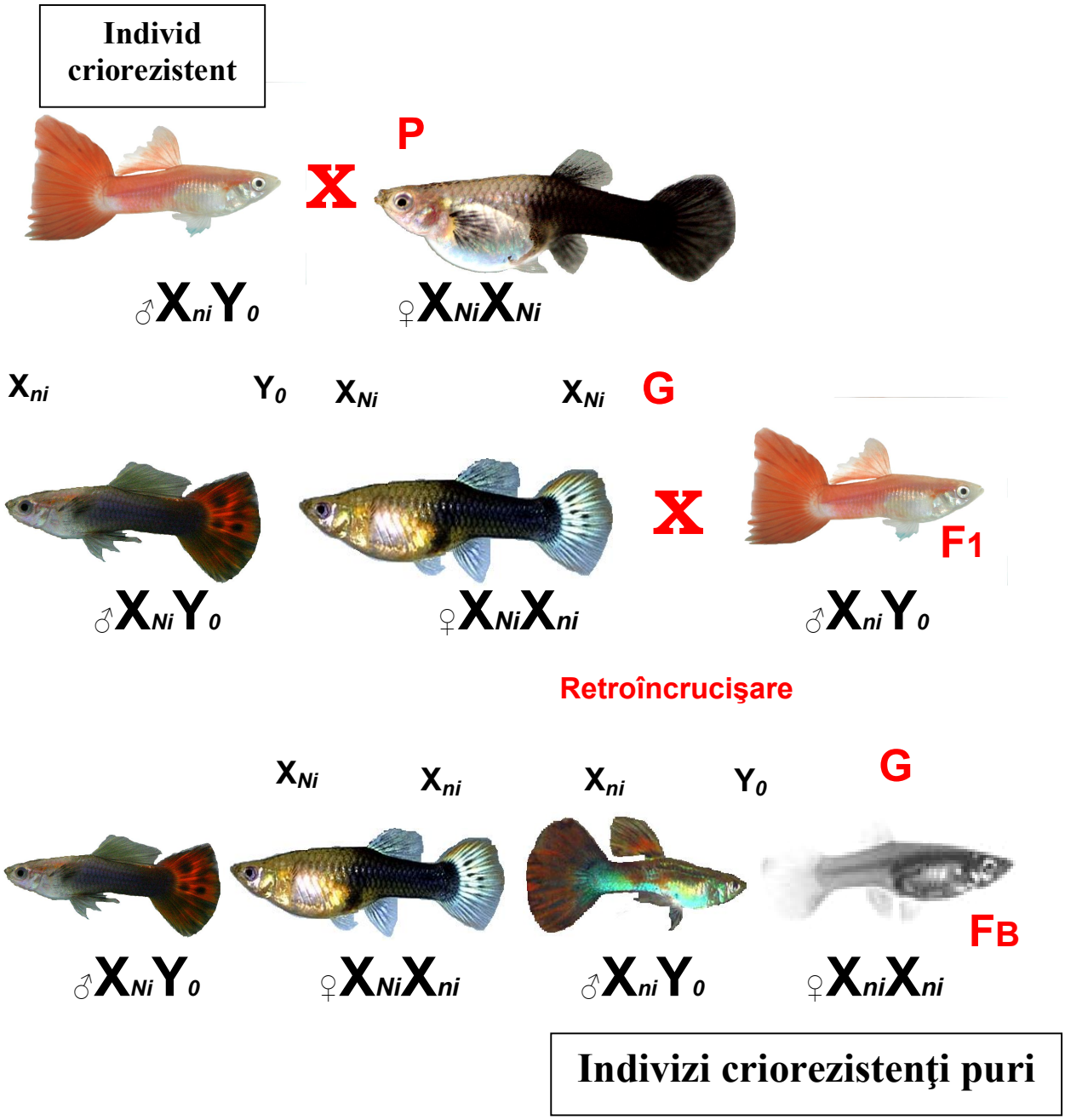


Figura 1. Schema obţinerii liniei criorezistente de peşti guppy (*Poecilia reticulata*).

Indivizii au fost crescuţi în aceleaşi condiţii de viaţă precum au fost descris mai sus pentru generaţia parentală, cu mici deosebiri legate de dimensiunea particulelor de hrană (tubifexul a fost tocat şi spălat, furajul a fost măcinat mai mărunt etc). Dimensiunea bazinelor de creştere (200 litri) au conferit peştilor spaţiu la discreţie şi un volum mare de apă/individ. Dezvoltarea lor a evoluat repede atingând maturitatea la aproximativ 60 zile de la naştere/eclozare. Indivizii au fost sexaţi timpuriu, imediat ce caracterele sexuale secundare şi-au făcut apariţia. Masculii au fost scoşi unul câte unul în fiecare zi pentru evitarea fecundării femelelor de către alţi masculi decât cei prevăzuţi de programul de ameliorare. Fecundarea întâmplătoare a femelelor ar fi dus la imposibilitatea utilizării lor în etapa următoare.

6. Pas IV – Retroîncrucişarea femelelor criorezistente cu masculii Red Blond şi eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenţei.

Această etapă are ca scop homozigotarea alelei criorezistenţei la indivizii femeli $X_{ni}X_{ni}$ ai generaţiei F_B şi obţinerea unui lot nou de masculi criorezistenţi hemizigoţi $X_{ni}Y_0$ (figura 1). Din generaţia F1 s-a ales un număr de 40 femele virgine pentru încrucişarea cu forma parentală de masculi Red Blond (20 indivizi). Întreţinerea şi împerecherea s-a desfăşurat conform celor descrise la încrucişarea iniţială. În urma retroîncrucişării au rezultat în primul val un număr de 632 indivizi, prezentând două fenotipuri coloristice diferite, dar patru fenotipuri diferite dacă ţinem cont şi de sexul indivizilor, respectiv de dimorfismul sexual al acestora. Repartiţia indivizilor pe fenotipuri au indicat o segregare conform legilor mendeliene şi a confirmat valabilitatea proiectului de procedeu propus în cadrul acestui program de ameliorare. Asfel, 150 indivizi masculi au prezentat un colorit al corpului de tip tuxedo, 158 indivizi masculi au prezentat un colorit al corpului de tip sălbatic, 157 indivizi femeli au prezentat un colorit corporal de tip tuxedo, iar 167 indivizi femeli au manifestat un colorit şters de tip sălbatic. Modul de segregare a fost verificat prin testul χ^2 (tabelul 1). Pentru χ^2=0,924, la 4-1=3 grade libertate, valoarea P arata că diferenţele dintre frecvenţele calculate şi cele observate sunt nesemnificative (0,90>P>0,80), deci modul ipotetic de segregare 1:1:1:1 este real.

Tabelul 1

Utilizarea testului χ^2 pentru verificarea ipotezei modului de transmitere ereditară a caracterului tuxedo

Fenotipuri	*Observate experimental (o)*	*Calculate/ aşteptate (e)*	*Deviaţia (d =o-e)*	d^2	d^2/e
Masculi tuxedo	150	158	-8	64	0,405
Masculi cu colorit sălbatic	158	158	0	0	0
Femele tuxedo	157	158	-1	1	0,006
Femele cu colorit sălbatic	167	158	9	81	0,513
Pentru χ^2=0,924, la 3 grade libertate, valoarea P arata că diferenţele sunt nesemnificative (0,90>P>0,80)					

Femelele şi masculii criorezistenţi identificaţi prin *linkage* după culoarea corpului, produc prin împerechere un număr consistent de indivizi care constituie o linie pură de guppy criorezistent.

Exploatarea liniei criorezistente în crescătorii aduce beneficii producătorilor de peşti guppy odată cu scăderea costurilor de încălzire a apei şi previne mortalitatea în masă cauzată de răcirea exagerată a apei în timpul transportului peştilor. Precizăm că linia criorezistentă nu întâmpină dificultăţi de creştere sau reproducere nici la temperaturi ridicate precum 28ºC şi se adaptează bine la variaţia valorii temperaturii între limite largi.

Până în momentul de faţă, nu se cunoaşte nici un procedeu biotehnologic de ameliorare a peştilor guppy pentru rezistenţa la temperaturi scăzute ale apei. Varietatea Red Blond din descrierea noastră poate fi, în lipsă, înlocuită cu orice varietate care nu prezintă caracterul Half-Black. Varietatea Half-Black Black nu este nici ea obligatorie de utilizat în procedeu, dar este obligatoriu ca varietatea care o înlocuieşte să prezinte caracterul Half-Black, adică una

din genele *Nigrocaudatus* (exemple de varietăţi: Half-Black Red, Half-Black Blue, Half-Black Yellow, Half-Black White).

Procedeul elaborat de noi este redat schematic în figura 1, unde: P = părinţi, G = gameţi, F_1 = prima generaţie rezultată în urma încrucişării, F_B = generaţie rezultată în urma retroîncrucişării.

Linia criorezistentă obţinută de noi folosind ca genitori varietăţile Red Blond şi Half-Black Black se caracterizează prin următoarele trăsături coloristice mascule: are corpul de tip sălbatic, colorat normal, incluzând cel mai frecvent nuanţe de roşu, albastru iridescent, galben, verde, negru şi uneori alb metalizat. Acesta aduce mult cu tiparele coloristice observate la guppy sălbatic. Înotătoarele caudală şi dorsală sunt puternic pigmentate şi au o culoare roşie-cărămizie. Corpul masculilor are o lungime standard (SL) medie de 26 mm, iar înotătoarele caudală şi dorsală au o lungime caracteristică varietăţilor ornamentale, prima reprezentând la maturitate 8/10 din lungimea standard a corpului. Femelele prezintă un colorit de tip sălbatic şi o dimensiune corporală (SL) la maturitate de 50 mm.

Cele mai importante trăsături ale liniei sunt aspectele legate de toleranţa la frig, astfel: linia este homozigotă la locusul pentru criorezistenţă, se dezvoltă şi se înmulţeşte fără probleme la temperatura medie de 17-19ºC, supravieţuieşte câteva ore la 10-12ºC şi câteva zile la 14-16ºC. De asemenea, ea se adaptează bine la variaţii în limite largi ale temperaturii apei, neîtâmpinând probleme de creştere sau reproducere la temperaturi de 28ºC sau chiar mai ridicate.

Dacă formele parentale, crescute la 22-24ºC ating dimensiunea de vânzare (1,8-2,0 SL masculii şi 2,5-3,0 SL femelele) la vârsta de 61-62 zile, linia criorezistentă crescută la 17-19ºC atinge aceeaşi dimensiune de vânzare la vârsta de 65-67 zile. Specificăm că efectul heterozis se observă la indivizii din F_B doar dacă îi comparăm cu formele parentale pure iniţiale şi nu dacă se compară cu femelele mame din generaţia F_1. Restul caracteristicilor nu diferă faţă de majoritatea varietăţilor comune de peşti guppy, aşa cum nici cerinţele lor faţă de parametrii optimi de creştere nu diferă.

Trebuie menţionat că temperatura apei trebuie ridicată obligatoriu la 28ºC în situaţiile când apar boli cauzate de agenţi patogeni precum *Saprolegnia spp* (saprolegniaza) sau *Ichthyophtirius multifilis* (ichtioftiriaza). Pe lângă terapia prin hipertermie mai trebuie aplicată în situaţia îmbolnăvirii şi unele tratamente cu sare de bucătărie, verde de malachit, albastru de metilen sau tripafavin.

Concluzii

- Analiza frecvenţelor fenotipurilor din generaţia F_B prin testul χ^2 indică faptul că ipoteza de la care s-a pornit este reală, iar procedeul elaborat este viabil, repetabil, brevetabil şi aplicabil;
- Au fost obţinuţi în generaţia F_B un număr de 158 masculi hemizigoţi la locusul criorezistenţei şi 167 femele homozigote la acelaşi locus;
- Femelele şi masculii criorezistenţi identificaţi prin *linkage* după culoarea corpului, produc prin împerechere un număr consistent de indivizi care constituie o linie pură de guppy criorezistent;
- Exploatarea liniei criorezistente în crescătorii aduce beneficii producătorilor de peşti guppy odată cu scăderea costurilor de încălzire a apei şi previne mortalitatea în masă cauzată de răcirea exagerată a apei în timpul transportului peştilor. Precizăm că linia criorezistentă nu întâmpină dificultăţi de creştere sau reproducere nici la temperaturi ridicate precum 28ºC şi se adaptează bine la variaţia valorii temperaturii între limite largi;
- Până în momentul de faţă, nu exista nici un procedeu biotehnologic de ameliorare a peştilor guppy pentru rezistenţa la temperaturi scăzute ale apei;
- Varietatea Red Blond din programul nostru poate fi, în lipsă, înlocuită cu orice varietate care nu prezintă caracterul fenotipic Half-Black. Varietatea Half-Black Black nu este nici ea obligatorie de utilizat în procedeu, dar este obligatoriu ca varietatea care o înlocuieşte să prezinte caracterul Half-Black, adică una din genele *Nigrocaudatus* I sau *Nigrocaudatus* II (exemple de astfel de varietăţi: Half-Black Red, Half-Black Blue, Half-Black Yellow, Half-Black White);
- Linia criorezistentă obţinută de noi folosind ca genitori varietăţile Red Blond şi Half-Black Black se caracterizează prin următoarele trăsături coloristice mascule: are corpul de tip sălbatic, colorat normal, incluzând cel mai frecvent nuanţe de roşu, albastru iridescent, galben, verde, negru şi uneori alb metalizat. Acesta aduce mult cu tiparele coloristice observate la guppy sălbatic. Înotătoarele caudală şi dorsală sunt puternic pigmentate şi au o culoare roşie-cărămizie. Corpul masculilor are o lungime standard (SL) medie de 26 mm, iar înotătoarele caudală şi dorsală au o lungime caracteristică varietăţilor ornamentale, prima reprezentând la maturitate 8/10 din lungimea standard a

corpului. Femelele prezintă un colorit de tip sălbatic şi o dimensiune corporală (SL) la maturitate de 50 mm;

- Cele mai importante trăsături ale liniei sunt aspectele legate de toleranţa la frig, astfel: linia este homozigotă la locusul pentru criorezistenţă, se dezvoltă şi se înmulţeşte fără probleme la temperaturi cuprinse de între 17 şi 19ºC, supravieţuieşte câteva ore la 10-12ºC şi câteva zile la 14-16ºC. De asemenea, ea se adaptează bine la variaţii în limite largi ale temperaturii apei, neîtâmpinând probleme de creştere sau reproducere la 28ºC sau nici la valori mai ridicate;
- Dacă formele parentale, crescute la 22-24ºC ating dimensiunea de vânzare (1,8-2,0 SL masculii şi 2,5-3,0 SL femelele) la vârsta de 61-62 zile, linia criorezistentă crescută la 17-19ºC atinge aceeaşi dimensiune de vânzare la vârsta de 65-67 zile. Specificăm că efectul heterozis se observă la indivizii din F_B doar dacă îi comparăm cu formele parentale pure iniţiale şi nu dacă se compară cu femelele mame din generaţia F_1. Restul caracteristicilor nu diferă faţă de majoritatea varietăţilor comune de peşti guppy, aşa cum nici cerinţele lor faţă de parametrii optimi de creştere nu diferă;
- Trebuie menţionat că temperatura apei trebuie ridicată obligatoriu la 28ºC în situaţiile când apar boli cauzate de agenţi patogeni precum *Saprolegnia spp* (saprolegniaza) sau *Ichthyophtirius multifilis* (ichtioftiriaza). Pe lângă terapia prin hipertermie mai trebuie aplicată şi unele cu sare de bucătărie, verde de malachit, albastru de metilen sau tripafavin.

Bibliografie

Dzwillo M., 1959 Genetische Untersuchungen an domestizierten Stämmen von *Lebistes reticulatus* (*Peters*). Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut 57:143-186.

Fujio Y., Nakajima M., Nagahama Y., 1990 Detection of a low temperature-resistant gene in guppy (*Poecilia reticulata*), with reference to sex-linked inheritance. Japanese Journal of Genetics 65:201-207.

Lindholm A., Breden F., 2002 Sex chromosomes and sexual selection in Poeciliid fishes. Am Nat 160:S214-S224.

Nayudu P. L., 1979 Genetic studies of melanic color patterns and atypical sex determination in the guppy, *Poecilia reticulata*. Copeia 1979:225-231.

Nybelin O., 1947 Ett fall av X-bunden nedärvning hos *Lebistes reticulatus* (Peters). Zoologiska Bidrag fran Uppsala 25:448-454.

Petrescu-Mag I. V., 2007 Cercetări privind posibilităţile de dirijare a reproducţiei în vederea modificării raportului dintre sexe la varietăţile speciei *Lebistes reticulata* (*Poecilia reticulata*). Teză de doctorat. Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca.

Winge Ö., 1922a A peculiar mode of inheritance and its cytological explanation. J. Genet. 12:137-144.

Winge Ö., 1922b Crossing over between the X- and the Y-chromosome in *Lebistes.* Comptes rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 14(20):1-20.

Winge Ö., 1927 The location of eighteen genes in Lebistes reticulatus. Journal of Genetics 18:1-43.

ETAPA IV.1

Rezumat

Până în etapele trecute, izolarea ADN era realizată automat, cu ajutorul unui robot extractor de ADN. Metoda Coşier de izolare a ADN genomic total era alternativa pentru situaţiile în care procesul de extracţie eşua. Odată cu această fază, adăugăm zestrei pregătirii tehnologice a echipei o altă metodă eficientă de extracţie a ADN total, descrisă de Ausubel et al 1995. Izolarea ADN a fost una reuşită, rezultând o puritate medie de 1,8 şi o concentraţie medie a ADN de 55 ng/µl. Activităţile imediat următoare ale aceleiaşi etape vor confirma sau vor infirma ipoteza conform căreia gena responsabilă de rezistenţa la temperaturi scăzute ar fi implicată totodata în rezistenţa la temperaturi ridicate. Pe de altă parte, se va verifica repetabilitatea şi valabilitatea markerului RAPD identificat în etapele anterioare (I-III).

1. Obiectivul etapei IV

Confirmarea sau infirmarea ipotezei conform careia gena responsabilă de rezistenţa la temperaturi scăzute ar fi implicată şi în rezistenţa indivizilor la temperaturi ridicate.

2. Obiectivul activitatii IV.1

Izolarea ADN la un număr de 100 indivizi din linia nou obţinută, linie rezistentă la temperaturi scăzute.

3. Descrierea ştiinţifică şi tehnică a cercetărilor efectuate

Cercetările prezentate aici reprezintă o fracţiune din etapa nr IV, etapă planificată iniţial integral pentru anul 2008 şi desfăşurată în avans în cadrul anului 2007, conform actului adiţional la contract CEEX 140-2006 încheiat cu CNMP la începutul anului 2007. Această fracţiune de etapă propriuzisă cuprinde o singură activitate, prevăzută ca Activitatea IV.1: 1 noiembrie – 5 decembrie. Ea includea subactivităţile: IV.1. USAMV Cluj, IV.1. UAIC Iaşi, IV.1. USAMVB Timişoara, IV.1. USAMV Iaşi şi prevedea reunirea celor patru colective de cercetători la Cluj-Napoca, unde s-a desfăşurat extracţia ADN total la un lot foarte mare de

indivizi (100) din linia criorezistentă nou obţinută prin procedeul în curs de brevetare şi aflat sub depozit la OSIM (A/00774/09.11.2007).

Linia criorezistentă obţinută de noi folosind ca genitori varietăţile Red Blond şi Half-Black Black se caracterizează prin următoarele trăsături coloristice mascule: are corpul de tip sălbatic, colorat normal, incluzând cel mai frecvent nuanţe de roşu, albastru iridescent, galben, verde, negru şi uneori alb metalizat. Acesta aduce mult cu tiparele coloristice observate la guppy sălbatic. Înotătoarele caudală şi dorsală sunt puternic pigmentate şi au o culoare roşie-cărămizie. Corpul masculilor are o lungime standard (SL) medie de 26 mm, iar înotătoarele caudală şi dorsală au o lungime caracteristică varietăţilor ornamentale, prima reprezentând la maturitate 8/10 din lungimea standard a corpului. Femelele prezintă un colorit de tip sălbatic şi o dimensiune corporală (SL) la maturitate de 50 mm.

Cele mai importante trăsături ale liniei sunt aspectele legate de toleranţa la frig, astfel: linia este homozigotă la locusul pentru criorezistenţă, se dezvoltă şi se înmulţeşte fără probleme la temperatura medie de 17-19ºC, supravieţuieşte câteva ore la 10-12ºC şi câteva zile la 14-16ºC. De asemenea, ea se adaptează bine la variaţii în limite largi ale temperaturii apei, neîtâmpinând probleme de creştere sau reproducere la temperaturi de 28ºC sau chiar mai ridicate.

Pe lângă cele doua protocoale de izolare a ADN genomic total la guppy utilizate în etapele trecute, acum, a fost testat un nou protocol de izolare a acizilor dezoxiribonucleici totali, graţie experienţei tehnice a domnului Dr. Lucian Dragoş Gorgan de la USAMV Iaşi. În cele ce urmează vom descrie cele trei protocoale de lucru prin care s-a obţinut ADN-ul celor 100 indivizi din specia *Poecilia reticulata*, iar apoi modul de cuantificare spectrofotometrică a probelor.

4. Protocolul de extracţie al ADN total – Ausubel et al (1995)

Tehnica este folosită pentru extragerea ADN total din ţesuturi proaspete, congelate sau păstrate în etanol.

Modul de lucru:

Se etichetează tuburi Eppendorf de 1,5 ml autoclavate, în care se introduc câte 500 µl soluţie tampon (tampon pentru liză). Se utilizează între 20 – 200 mg de ţesut muscular proaspăt, congelat sau conservat în alcool etilic 95%.

Se introduc fragmentele de ţesut în tubul Eppendorf (de 1,5 ml) corespunzător, care conţine 500 µl soluţie tampon pentru liză. În fiecare tub, se adaugă câte 10 µl proteinază K (10 µl reprezintă echivalentul a 200 µg proteinază dintr-o soluţie stoc 20 mg/ml care este preparată şi congelată la -20ºC). Se agită fiecare probă pe un vortex şi se păstrează peste noapte în etuvă la 37ºC.

Ulterior, în fiecare tub de 1,5 ml se adaugă 600 µl de soluţie fenol : cloroform : alcool izoamilic (25 : 24 : 1), până la semnul superior al tubului. Se agită tuburile timp de 30–60 secunde, apoi se centrifughează (utilizând o centrifugă de masă), la o turaţie 8000 rotaţii/minut, timp de 4 minute.

Se extrage faza superioară din fiecare tub menţinându-le deschise sub nişă, iar la sfârşit, se adaugă câte 550 µl cloroform. Se agită tuburile timp de 30–60 secunde, apoi se centrifughează la 8000 rotaţii/minut, timp de 3 minute.

Se separă fazele superioare rezultate în urma centrifugării şi se adaugă 1ml etanol rece 95% (păstrat la -20ºC). Se agită tuburile şi se lasă la temperatura de -20ºC, timp de 30–60 minute.

După precipitarea ADN, se centrifughează tuburile la 10.000 rotaţii/minut, timp de 5 minute, pentru sedimentare. Se elimină supernatantul şi se aşează tuburile deasupra unei hârtii de filtru, astfel încât să se scurgă ultimele picături de alcool.

După uscarea peletelor, se adaugă în fiecare tub câte 200 µl soluţie TE (pH=8,0) şi se resuspendă manual sau pipetând de câteva ori.

5. Izolarea ADN-ului din înotătoare de peşte – metoda Coşier

O bucată de 1 cm^2 din înotătoare se incubează peste noapte (10 h) cu proteinază K la 55°C. Fragmentele de ţesut se introduc într-un tub Eppendorf de 1,5 ml care conţine 500 µl tampon de liză şi 10 µl proteinază K (echivalentul a 200 µg dintr-o soluţie stoc de 10 mg/ml care este preparată şi congelată la – 20°C).

Tamponul de liză: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 2.5 mM $MgCl_2$; Tween 20

După incubare, fiecărei probe i se adaugă 600 µl soluţie fenol.

Tuburile se omogenizează prin inversie timp de 15 minute după care sunt supuse unei centrifugări 8000 rpm/4 minute. În timpul centrifugării se etichetează noi tuburi Eppendorf de 1,5 ml. La sfârşitul centrifugării tuburile prezintă o fază inferioară gălbuie care conţine solventul organic, o fază superioară care conţine ADN-ul şi o fază intermediară unde sunt depozitate proteinele.

Se separă faza superioară a fiecărui tub (cca. 700 µl) peste care se adaugă 550 µl fenol : cloroform. Se agită tuburile 30-60 secunde apoi se centrifughează timp de 3 minute, etichetându-se şi noile tuburi. Se mai efectuează o ultimă extracţie numai cu cloroform.

ADN-ul se precipită cu etanol 70% răcit în prealabil la - 20°C (2 volume) inversând tuburile de câteva ori şi efectuând o centrifugare la 10000 rpm. ADN-ul precipitat se usucă la aer şi se resuspendă în TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8). După dizolvarea completă a ADN-ului acesta se stochează la - 20°C.

Integritatea ADN-ului este verificată prin migrarea acestuia într-un gel de agaroză de 1% colorat cu bromură de etidiu, alături de un marker de greutate moleculară.

6. Extracţia automată a ADN

Extracţia ADN s-a realizat şi cu ajutorul unui robot extractor de acizi nucleici – MagNA Pure LC, (pentru extracţia ADN din ţesut animal, uman, vegetal şi din microorganisme, *Roche Applied Sciences,* Versiunea Decembrie 2005, 192 izolări). Funcţionarea extractorului de ADN se bazează pe tehnologia unor bile magnetice (eng. *Magnetic-bead technology*) din sticlă/silica cu proprietăţi speciale. Probele de ţesut sunt lizate prin incubarea lor în prezenţa unui tampon ce conţine săruri chemotropice şi proteinaza K. Aparatul efectuează automat toate operaţiunile: liză celulară, legarea ADN-ului de bilele magnetice, spălarea repetată şi eluţia, după ce în prealabil s-au facut setările de la calculatorul de comanda şi control. Softul aparatului de extracţie calculează automat cantităţile necesare de reactivi, îndrumă utilizatorul în vederea efectuării setărilor necesare şi monitorizează toate operaţiunile desfăşurate sau în derulare, existând posibilitatea stocării tuturor informaţiilor cu privire la procesul de izolare a acizilor nucleici.

După izolarea ADN a fost necesară o verificare a integrităţii lui prin migrarea acestuia într-un gel de agaroză de 1%, colorat cu bromură de etidiu, alături de un marker de greutate moleculară. Extracţia acizilor dezoxiribonucleici s-a repetat în situaţiile când integritatea ADN-ului a fost afectată de nucleaze. În aceste situaţii sau atunci când cantitatea de ADN obţinută a fost insuficientă, iar numărul de probe necesar de repetat era prea mic pentru extracţia automată, izolarea ADN s-a realizat manual prin metoda Coşier sau prin metoda Ausubel et al 1995 (ambele descrise anterior).

7. Cuantificarea ADN

După extracţia ADN-ului, probele au fost cuantificate spectofotometric cu ajutorul aparatului BioPhotometer Eppendorf. Metoda spectofotometrică se bazează pe faptul că majoritatea substanţelor biologice au o rată de absorbţie caracteristică în domeniul radiaţiilor ultraviolete. Astfel, rata de absorbţie de 260 nm corespunde acizilor nucleici, cea de 280 nm proteinelor, iar 230 nm diferiţilor contaminanţi. Densitatea optică a fost măsurată la rata de absorbţie A 260 nm şi A 280 nm, făcând raportul dintre cele două absorbţii.

In general, ADN-ul este considerat suficient de pur, dacă raportul celor două citiri, respectiv A_{260}/A_{280}, are valori cuprinse între 1,7 şi 2,0. Valorile mai mici de 1,7 indică impurificări cu proteine, iar cele mai mari de 2,0 impurificări cu alţi contaminanţi. Aparatul BioPhotometer Eppendorf redă atât concentraţia ADN-ului, cât şi cantitatea de ADN exprimată în ng/µl sau µg/ml.

8. Rezultate

De cele mai multe ori (mai precis în 86 cazuri din totalul de 100) izolarea ADN din întotătoare a fost posibilă, iar probele au întrunit caracteristicile standard necesare. În cadrul celorlalte 14 cazuri unde, fie puritatea probelor, fie concentraţia lor, au fost afectate, extracţia s-a realizat din ţesut muscular dorsal.

În cadrul experimentelor noastre, puritatea medie a ADN-ului obţinut a fost de 1,8 (variind între valorile 1,7 şi 2,0), iar concentraţia lui medie a fost de 55 ng/µl (valorile variind între 50 şi 60 ng/µl). Aceste valori se încadreaza între limitele standard.

Probele au fost supuse păstrării în laboratorul de biotehnologii a USAMV Cluj pentru activităţile următoare, activităţi în cadrul cărora ADN-ul va fi amplificat folosind amorsa şi respectiv markerul identificat în cadrul etapelor anterioare. În urma migrării în gel de agaroză a fragmentelor amplificate se vor obţine spectre de benzi care pot fi analizate comparativ cu cele observate în etapa anterioară. Rezultatele vor clarifica numeroasele controverse cu privire la repetabilitatea rezultatelor obţinute prin utilizarea tehnicii PCR-RAPD.

9. Concluzii

- Utilizarea alternativă a celor 3 metode de extracţie au permis optimizarea procesului de izolare a ADN la specia de peşti *Poecilia reticulata;*
- Analiza spectrofotometrică a arătat o puritate a probelor de 1,8 şi o concentraţie medie de 55 ng/µl;
- Activităţile imediat următoare ale aceleiaşi etape vor confirma sau vor infirma ipoteza conform căreia gena responsabilă de rezistenţa la temperaturi scăzute ar fi implicată totodată în rezistenţa la temperaturi ridicate;
- Pe de altă parte, se va verifica repetabilitatea şi valabilitatea markerului RAPD identificat anterior.

Bibliografie

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., 1992 Short protocols in molecular biology, 3-rd Edition, Cap. 2 – Preparation and analysis of DNA, Ed. By John Wiley & Sons, Inc., p. 2-3 – 2-5.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., 1995 Current protocols in molecular biology, Vol. 1, Cap. 2 – Preparation and analysis

of DNA. Phenol extraction and etanol precipitation of DNA, Ed. By John Wiley & Sons, Inc., p. 2.1.1-2.1.3.

Gorgan L. D., 2007 Filogenie Moleculară în cadrul genurilor *Cyprinus* şi *Carassius.* Editura Universităţii Alexandru Ioan Cuza Iaşi.

Petrescu-Mag I. V., Bud I., Petrescu-Mag R. M., Sisea C., Bura M., Grozea A., Botha M., Coşier V., 2007 Procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*) cu aplicabilitate în guppycultură. Cerere Brevet Invenţie – OSIM A/00774 din 09.11.2007.

ETAPA IV.2

Rezumat

Aşa cum s-a specificat, prezenta fază (IV.2) continuă activitatea fazei IV.I în cadrul căreia s-a realizat, printr-o combinaţie de tehnici de extracţie, purificare şi cuantificare, izolarea ADN la un număr de 100 indivizi din linia rezistentă la temperaturi scazute, obţinută în etapele anterioare ale prezentului proiect. Izolarea lui a fost necesară pentru a se retesta markerul, identificat în fazele incipiente ale proiectului, pe linia criorezistentă şi pentru a se verifica universalitatea utilităţii lui la această specie. Mai amintim că, anterior, amorsa numărul 77 s-a demonstrat utilă în identificarea indivizilor criorezistenţi din varietatea Red Blond, iar universalitatea lui în cadrul speciei de peşti *Poecilia reticulata* rămâne încă incertă până la testarea markerului pe linia homozigotă pentru gena criorezistenţei.

În urma fotografierii gelurilor de migrare a fragmentelor ADN şi a tipăririi materialelor, s-a efectuat o examinare atentă a acestora, deducându-se ineficacitatea distingerii indivizilor criorezistenţi de cei normali în funcţie de benzile migrate în gel prin amplificarea unor fragmente cu amorsa numărul 77. Corelaţiile dintre benzi par mai degrabă a fi asociate cu setul de indivizi pe care s-a lucrat simultan decât cu o anume categorie fenotipică, deşi, în etapele anterioare, aceeaşi amorsă s-a dovedit perfect viabilă în cadrul varietăţii Red Blond din generaţia parentală. Deşi, markerii RAPD pot fi folosiţi pentru a discrimina specii, varietăţi, secvenţe sex-specifice, sau alte secvenţe nucleotidice, se pare că repetabilitatea redusă a acestor tehnici între diferite etape experimentale este principalul inconvenient şi probabil motivul pentru care această tehnică va fi utilizată tot mai puţin pe viitor. Desigur, markerul sau, mai bine zis, produsul de amplificare prin amorsa numărul 77 din setul de amorse testate este viabil şi aplicabil în cazul liniei consangvine din varietatea Red Blond, dar testarea a zeci de amorse pentru fiecare linie în parte înseamnă risipă de efort, de aceea utilizarea procedeului bazat pe sex-linkage, dezvoltat de noi în prezentul proiect (CEEX 140/2006) şi aflat în curs de brevetare, este indicat, preferat şi recomandat de noi pentru obţinerea unor linii criorezistente de peşti guppy.

Rezultatele înregistrate în urma testării celor două populaţii, prin două căi de testare din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie: 1. supunere la creştere treptată a valorii temperaturii şi 2. supunere la şoc termic, au arătat faptul că loturile studiate s-au comportat diferit de cele martor în ambele situaţii experimentale (creştere treptată şi şoc termic). Cu

ajutorul testului χ^2 s-a putut vedea faptul că loturile experimentale diferă statistic foarte semnificativ din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie faţă de loturile martor, care sunt vizibil mai sensibile. Toate aceste rezultate susţin ipoteza colectivului de cercetători din Turcia (Karayucel et al 2006), aceeaşi genă care conferă indivizilor criorezistenţa fiind implicată şi în adaptarea peştilor guppy la hipertermie şi, mai mult decât atât, această genă X-linkată îşi dezvăluie identitatea ca o genă care conferă rezistenţă la şoc termic, fiind deci responsabilă de codificarea unei HSP (proteină de şoc termic = *heat shock protein*) sau a unei catene polipeptidice din componenţa acesteia. Oricum, valorile obţinute arată clar că, pe lângă gena majoră în cauză, termorezistenţa pare să fie un caracter fenotipic determinat şi de alţi factori genetici, fie ei cu implicaţii minore, lucru observat şi în activităţile anterioare, atunci când peştii au fost trataţi prin hipotermie.

Rezultatele deosebite obţinute până în această etapă sunt deja în curs de brevetare şi acceptate spre publicare în Buletinul OSIM - BOPI 5709/29.05.09. Ele au fost promovate/făcute cunoscute cercetătorilor, acvacultorilor şi acvariştilor prin includerea lor în trei cărţi ştiinţifice şi aplicative care au fost diseminate gratuit. Rezultatele anterioare CEEX 140/2006 vor fi reunite cu alte informaţii, deţinute din proiectul CNCSIS Td 200/2005, cu rezultatele recente din CEEX 140/2006 şi cu rezultate ale echipei de cercetători de la Bioflux SRL, care împreună vor constitui obiectul unei noi cereri de brevet invenţie. Acestea, vor fi realizate în ultima etapă/fază a proiectului.

Identitatea comună a genei studiate cu una din HSP-urile care conferă rezistenţa la diferite forme de stres, printre care şi la cel termic, face trecerea colectivului nostru spre un alt proiect de cercetare-dezvoltare, PN II 51-056/2006, în cadrul cărora genele de şoc termic vor fi secvenţiate nucleotidic şi identificate din punctul de vedere al secvenţei de aminoacizi din cadrul proteinelor codificate. De asemenea, în proiectul menţionat se va studia rolul tipurilor de proteine HSP, fiecare în parte, la guppy (*P. reticulata*), crap (*Cyprinus carpio*) şi păstrăv (*Oncorhynchus mykiss*).

1. Obiectivul etapei IV şi activităţile asociate acestuia

Obiectivul fazei de execuţie este: **confirmarea sau infirmarea ipotezei conform căreia gena responsabilă de criorezistenţă ar fi implicată şi în rezistenţa indivizilor la temperaturi ridicate**.

Activităţi desfăşurate în cadrul fazei de execuţie:

a) **Amplificarea ADN-ului genomic total de la linia criorezistentă cu amorsa numărul 77**, generatoare a benzilor marker identificate în etapa numărul II (activitate comună cu echipele de la Universitatea Alexandru Ioan Cuza – Iaşi, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară a Banatului – Timişoara, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară din Iaşi);

b) **Compararea rezultatelor obţinute cu cele anterioare şi cu cele aşteptate** (Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca);

c) **Expunerea indivizilor anterior analizaţi la temperaturi controlate în creştere treptată, compararea rezultatelor cu un lot martor şi concluzionarea cu privire la implicarea aceleiaşi gene atât în criorezistenţă, cât şi în rezistenţa la hipertermie** (Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca);

d) **Efectuarea unor demersuri manageriale care să faciliteze în etapa următoare participarea unui IMM** (potenţial partener în viitoarele proiecte pe teme similare) care să conştientizeze utilitatea cercetării ştiinţifice în exploatarea resurselor biologice, care să poată fi un viitor cofinanţator al cercetărilor finanţate din bugetul de stat şi care să fie un potenţial valorificator direct al rezultatelor cercetărilor din acest proiect sau al rezultatelor unor cercetări care le continuă sau se suprapun parţial cu acestea (activitate a USAMV Cluj);

e) **Efectuarea unor demersuri editoriale, premergătoare celor de valorificare şi diseminare** (care vor urma în ultima etapă). S-a pregătit o relaţie de cooperare cu un terţ care să faciliteze diseminarea rezultatelor prin postarea rezultatelor cercetării pe un website ştiinţific cu specific acvacol, piscicol, guppycol etc, (website care să implice contactul cu lumea ştiinţifică de profil din întreaga lume) (toţi partenerii au fost implicaţi în această activitate, dar mai cu seamă coordonatorul);

f)**Activităţi de raportare şi autoevaluare** (efectuate de toţi partenerii implicaţi şi care s-au finalizat la 30 iunie 2008).

2. Introducere

Cercetările proiectului CEEX 140/2006 au ca specie de studiu peştele guppy (*Poecilia reticulata*), specie importantă pentru piscicultura ornamentală (Shaddock 2008), dar şi ca organism model pentru: genetica clasică (Winge 1922, 1927, 1934) sau moleculară (Dreyer et al 2006), etologie (Houde 1997), ecotoxicologie (Gorman & Breden 2007), ecologie (Hughes et al 1999), anatomie (Jalabert & Billard 1969), fiziologie animală [mai cu seamă pentru neurologie - procese cognitive (Griffiths & Magurran 1999; Hain & Neff 2007), ochiul complex şi vederea în culori (Hoffmann et al 2007; Weadick & Chang 2007), endocrinologie (Venkatesh et al 1990, 1991, 1992a, 1992b, 1992c)], embriologie (Martyn et al 2006) şi evoluţionism (Lindholm & Breden 2002). Obiectul studiului îl reprezintă adaptarea organismului la condiţii de stress, în principal criorezistenţa şi cu potenţial de abordare a termorezistenţei, cât şi sudierea bazei genetice a acestora la peştii guppy.

Întrucât în anul 2005 când acest proiect a fost elaborat, în cercetarea ştiinţifică naţională, dar chiar şi în cea internaţională, se punea mare bază pe tehnici moleculare simple şi rapide de tipul RAPD (Bardakci & Skibinski 1999; Ahmed et al 2004; Oroian 2005, 2006), RFLP (Bâlteanu 2005) sau, mai apoi, de tipul microsateliţilor (Dragoş 2006; Shen et al 2007). Desigur tehnicile de analiza moleculară au evoluat de atunci şi, dintre toate acestea, secvenţierea nucleotidică sau a aminoacizilor ce compun proteinele sunt astăzi cele mai eficiente, cele mai precise (Popescu 2008) şi - de ce sa nu recunoaştem – astăzi, la îndemâna oricărui laborator de biologie moleculară cu experienţă, cu dotare corespunzătoare şi cu resurse materiale suficiente. Totuşi, proiectul de faţă are menirea, pe lângă validarea sau invalidarea unei tehnici moleculare (cum este RAPD-ul) utilizate cu un anume scop, de a elabora un program (format din mai multe procedee) de ameliorare a speciei în vederea aplicării lui în guppycultură.

Aşa cum s-a specificat în planul de realizare al proiectului, în actele adiţionale şi în rapoartele anterioare, prezenta fază (IV.2) continuă activitatea fazei IV.1 în cadrul căreia s-a realizat, printr-o combinaţie de tehnici de extracţie, purificare şi cuantificare, izolarea ADN la un număr de 100 indivizi din linia rezistentă la temperaturi scazute, obţinută în etapele anterioare ale prezentului proiect. Izolarea lui a fost necesară pentru a retesta markerul, identificat în fazele incipiente ale proiectului, pe linia criorezistentă şi pentru a verifica lărgimea utilităţii lui la această specie. Mai amintim că, anterior, amorsa numărul 77 s-a demonstrat utilă în identificarea indivizilor criorezistenţi din varietatea Red Blond, iar

universalitatea lui în cadrul speciei de peşti *Poecilia reticulata* rămâne încă incertă până la testarea markerului pe linia homozigotă pentru gena criorezistenţei.

Aşa cum se poate deduce din enunţul obiectivului, esenţa acestei etape este verificarea toleranţei la hipertermie a lotului criorezistent şi compararea rezultatelor cu un lot martor.

3. Descrierea ştiinţifică şi tehnică

Material şi metodă

Amplificarile ADN cu amorsa 77 [având secvenţa 5 ' d(GGGCAACAGA) 3'] a fost repetată de 2 ori. Concentraţia ADN matriţă trebuie să fie în general, cuprinsă între 5-500 ng/50 µl volum de reacţie, cu un optim între 10-50 ng/50 µl volum de reacţie. Pentru obţinerea soluţiei de ADN de lucru cu această concentraţie, ADN-ul a fost diluat cu TE (Tris HCl – EDTA).

Amestecul de reacţie RAPD a avut un volum de 25 µl/tub, cu următoarea compoziţie:

- 50 ng ADN
- 200 µM amestec dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
- 0,2 µM primer
- 2,5 mM $MgCl_2$
- 2,5 mM 10 x buffer
- Go Taq DNA Polymerase Green (Promega)
- 2% PVP (Sigma)
- apă bidistilată sterilă

Prepararea amestecului de reacţie s-a realizat în hota cu flux laminar vertical, în condiţii sterile de lucru. Proba martor (control) conţine toate componentele amestecului de reacţie cu excepţia ADN-ului.

Amplificarea probelor s-a realizat în aparatul Thermocycler Palmcycler (cu gradient de temperatură), programat astfel:

- 3 minute la 95^0C – predenaturare, urmată de 45 de cicluri cu următorul profil de temperatură :

1. 1 minut la 93^0C – denaturare
2. 1 minut la 34^0C – fixarea amorselor
3. 1 minut la 72^0C – extensie
4. extensia finală 10 minute la 72^0C.

Electoforeza în gel de agaroză. Produşii de amplificare au fost separaţi prin electroforeză în gel de agaroză (Promega) 1,4%. Gelurile de agaroză au fost migrate orizontal. Soluţia tampon de electroforeză utilizată a fost Tris-borat 0,5x (TBE). Probele de ADN amplificate au fost preparate în tampon de încărcare colorat cu albastru de bromfenol. In fiecare tub eppendorf s-a adăugat câte 5 µg de colorant. În fiecare godeu al gelului s-au pipetat câte 12 µl din produsul de amplificare. Unul sau două godeuri au fost încărcate cu un marker ADN standard. Sursa de putere, necesară migrării fragmentelor amplificate, a fost programată la 70 V (3,5 V/cm), iar durata de migrare a fost de 2,30 ore. Gelurile au fost colorate după migrarea benzilor în câmp electric. Astfel, după migrare, gelul a fost imersat în 150 ml 0,5x TBE la care s-a adăugat o soluţie de bromură de etidiu 0,5 µg/ml. În această soluţie gelul a fost menţinut pe o platformă agitatoare, un timp de 20 de minute.

Preluarea imaginilor. Bromura de etidiu îşi pierde relativ repede fluorescenţa în UV, astfel că gelurile impregnate cu acest marker nu se pot păstra; fotografierea gelului expus la UV se face imediat după migrare. Vizualizarea produşilor de amplificare s-a realizat în lumină UV transmisă, imaginea gelurilor fiind preluată cu un sistem de fotodocumentare Viber-Lourmant.

Compararea rezultatelor cu cele obţinute în etapa II. Fotografiile gelurilor au fost analizate direct (macroscopic/ocular), întrucât nu existau rezultate care să necesite analiza lor cu ajutorul unor softuri speciale.

Expunerea indivizilor criorezistenţi la hipertermie. Managementul cercetării ştiinţifice şi programul de cercetare al prezentului proiect a ţinut cont de reglementările actuale privitoare la deontologia cercetării ştiinţifice şi de normele de bioetică (Pop & Mag 2005; Pisoschi & Ardelean 2008), chiar dacă peştii nu sunt vertebrate superioare conştiente de propria lor existenţă, aşa cum sunt unele mamifere. S-a evitat, pe cât s-a putut, supunerea peştilor la suferinţă exagerată ca intensitate sau prelungită ca durată. Hipertermia s-a aplicat unui număr minim posibil de indivizi, dar care să asigure statistic rezultatele ştiinţifice şi pe o durată de timp bine calculată, pentru a se evita chinurile prelugite sau decimarea efectivelor.

Indivizii a căror stare de sănătate a fost afectată ireversibil au fost sacrificaţi prin decapitare, după ce în prealabil au fost anesteziaţi cu soluţie de tricaină 0,05%.

În vederea testării rezistenţei la hipertermie a liniei criorezistente de guppy creeate, s-au luat spre comparare două populaţii distincte, dar asemănătoare din punct de vedere coloristic, ca formă şi ca origini, ambele fiind rezultatul metisării dintre varietăţile de guppy Red Blond (75%) şi Half-Black Black (25%). Diferenţa principală dintre cele două populaţii a fost aceea că: cea din care s-au recoltat randomic loturile martor nu a fost ameliorată prin selecţie la locusul criorezistenţei. Populaţia criorezistentă din biobaza USAMV este homozigotă la acest locus, fapt reuşit în etapele anterioare datorită linkajului genei criorezistenţei cu o genă marker, de culoare - *Ni* II (*Nigrocaudatus* II). Lotul martor a fost recoltat randomic de la Acvariul USAMV dintre indivizii cu colorit de tip sălbatic, rezultaţi în urma segregării mendeliene după 2 generaţii a metişilor descendenţi din Red Blond şi Half-Black Black.

Experimentul în sine a durat un număr de 19 zile şi s-a bazat atât pe creşterea treptată a temperaturii, cât şi pe tratamente aplicate sub formă de şoc termic. Numărul indivizilor pe fiecare lot testat a fost de 30 (15 masculi şi 15 femele), fiecare dintre aceştia fiind în prealabil acomodaţi la 28ºC. Între fiecare două etape de testare s-a păstrat un interval de două zile de pauză, la 28ºC, pentru a se putea utiliza acelaşi lot experimental în fiecare etapă de testare până la apariţia primelor pierderi de efectiv, când din fiecare lot (atât din cel experimental cât şi din cel martor) s-a eliminat un număr egal de indivizi şi s-a completat cu indivizi noi din acelaşi sex. Diferenţele de temperatură dintre valoarea de început a tratamentului termic (28 ºC) şi cea de final a tratamentului au fost reduse în primele faze experimentale (32-28=4ºC), iar acestea au crescut treptat (34-28=6ºC, 36-28=8ºC, 38-28=10ºC, 40-28=12ºC, 41-28=13ºC şi respectiv 42-28=14ºC în ultima fază de testare), pentru a se putea identifica valorile minime de diferenţă ale temperaturii care pot conferi răspunsul dorit la problema ridicată de activitatea propusă şi atingerea obiectivului. Acest program de testare s-a aplicat în două variante: prin creştere treptată şi prin şoc termic. În cazul testării prin şoc termic, s-a recurs la transvazare dintr-un bazin experimental în altul, ambele bazine cu apă fiind termostatate (±1ºC eroare). În cazul testării prin creştere controlată a temperaturii, s-a recurs la ridicarea valorii temperaturii de la 28ºC până la 32, 34, 36, 38, 40, 41 sau 42ºC într-un interval de 60-200 minute, peştii fiind păstraţi la valoarea finală aproximativ 10 minute. În această, a doua, variantă experimentală, pe lângă bazinele de tratament şi instalaţia de termostatare (±1ºC eroare), s-a utilizat un data logger Dickson HT 100 cu soft special, conectabil la computer,

care a permis monitorizarea valorii temperaturii apei prin întregistrarea ei la fiecare 30 secunde şi întocmirea unui grafic de evoluţie a acesteia (figura 1). Instrumentele şi echipamentele folosite în cadrul experimentelor au fost: 8 bazine de creştere (400 litri), 20 bacuri de tratament (50 litri) 30 încălzitoare termostatate (50-200 W), 10 termometre de minim şi maxim, 10 termometre de precizie, 1 termometru pentru analiza temperaturii apei, 2 termometre de cameră, 20 bacuri de sticlă - pentru transvazarea, acomodarea termică şi reanimarea indivizilor afectaţi, container biohazard, pH-metru şi multimetru pentru monitorizarea parametrilor fizico-chimci ai apei bazinelor, 20 filtre interioare pentru acvarii, 1 compresor pentru aerare şi un sistem de dehumidificare a aerului din laborator pentru protecţia aparaturii şi echipamentelor împotriva coroziunii, a stării de sănătate a personalului de cercetare şi a pereţilor laboratorului.

Rezultate şi discuţii

În urma fotografierii gelurilor şi tipăririi materialelor, s-a efectuat o examinare oculară a acestora. Analiza lor atentă arată clar ineficacitatea distingerii indivizilor criorezistenţi (7-106) de cei normali (1-6) prin amplificarea unor fragmente cu amorsa numărul 77 în funcţie de benzile migrate în gel (figura 2). De fapt, corelaţiile par mai degrabă a fi asociate cu setul de indivizi pe care s-a lucrat simultan (1-14, 15-23, 24-36, 37-45, 46-55, 56-66, 67-77, 78-88, 89-93, 94-106) decât cu o anume categorie fenotipică, deşi, în etapele anterioare, aceeaşi amorsă s-a dovedit perfect viabilă în cadrul varietăţii Red Blond din generaţia parentală. Acest lucru este atât de vizibil încât nu se impune analiza statistică a gelurilor prin softuri speciale. Deşi, markerii RAPD pot fi folosiţi pentru a discrimina specii, varietăţi, secvenţe sex-specifice sau alte secvenţe nucleotidice, se pare că repetabilitatea redusă a acestor tehnici între diferite etape experimentale este principalul inconvenient şi probabil motivul pentru care această tehnică va fi utilizată tot mai puţin pe viitor. Desigur, markerul sau, mai bine zis, produsul de amplificare prin amorsa numărul 77 din setul de amorse testate este viabil şi aplicabil în cazul liniei consangvine din varietatea Red Blond, dar testarea a zeci de amorse pentru fiecare linie în parte înseamnă risipă de efort, de aceea utilizarea procedeului bazat pe sex-linkage, dezvoltat de noi în prezentul proiect şi aflat în curs de brevetare, este indicat, preferat şi recomandat de noi pentru obţinerea unor linii criorezistente de peşti guppy.

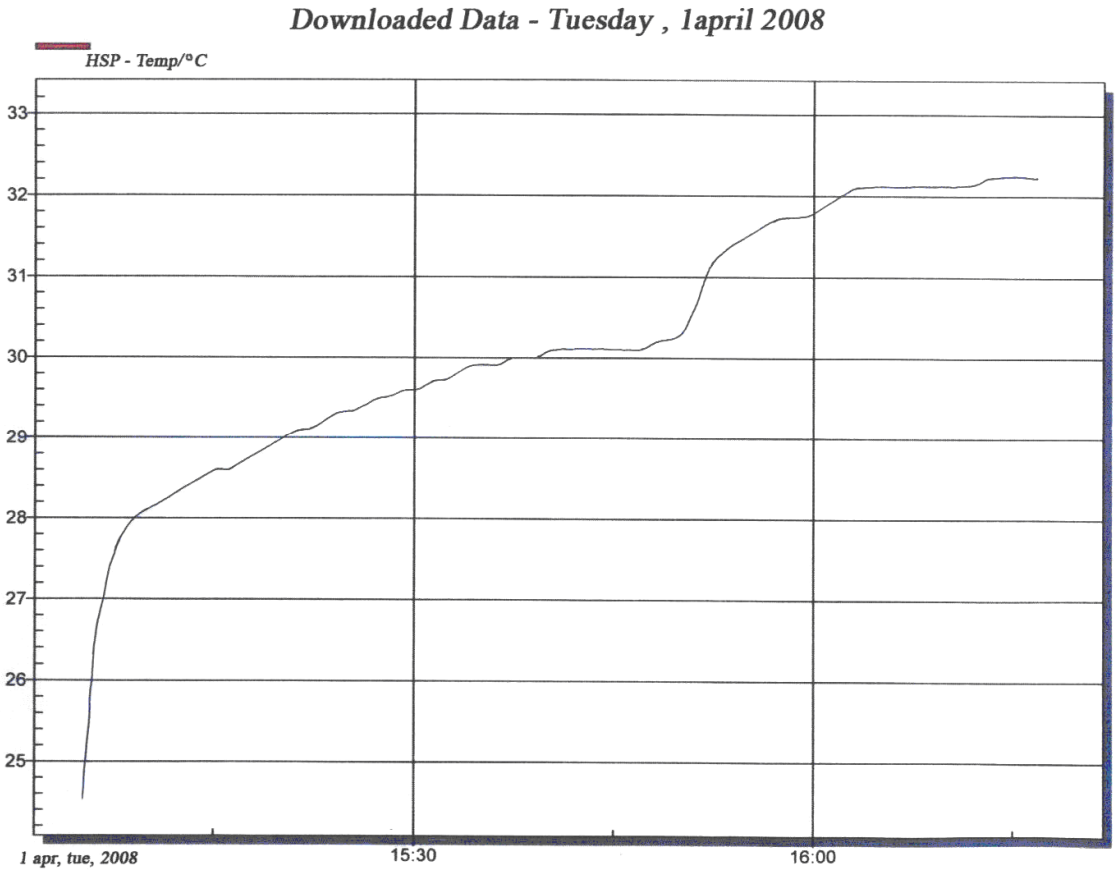


Figura 1. Grafic întocmit cu ajutorul Data-logger-ului Dickson HT 100 cu soft special, care indică evoluţia temperaturii în timpul unei etape de testare.

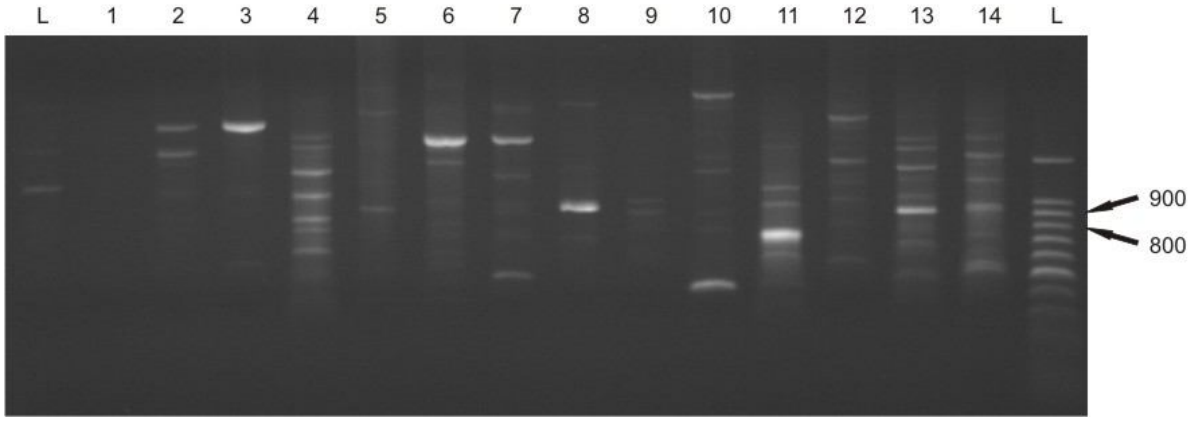


Figura 2. Gelurile cu benzile de migrare a fragmentelor amplificate cu amorsa 77 în cazul indivizilor criorezistenţi (7-106) şi normali (1-6); L (marker etalon); figura se continuă pe paginile următoare.

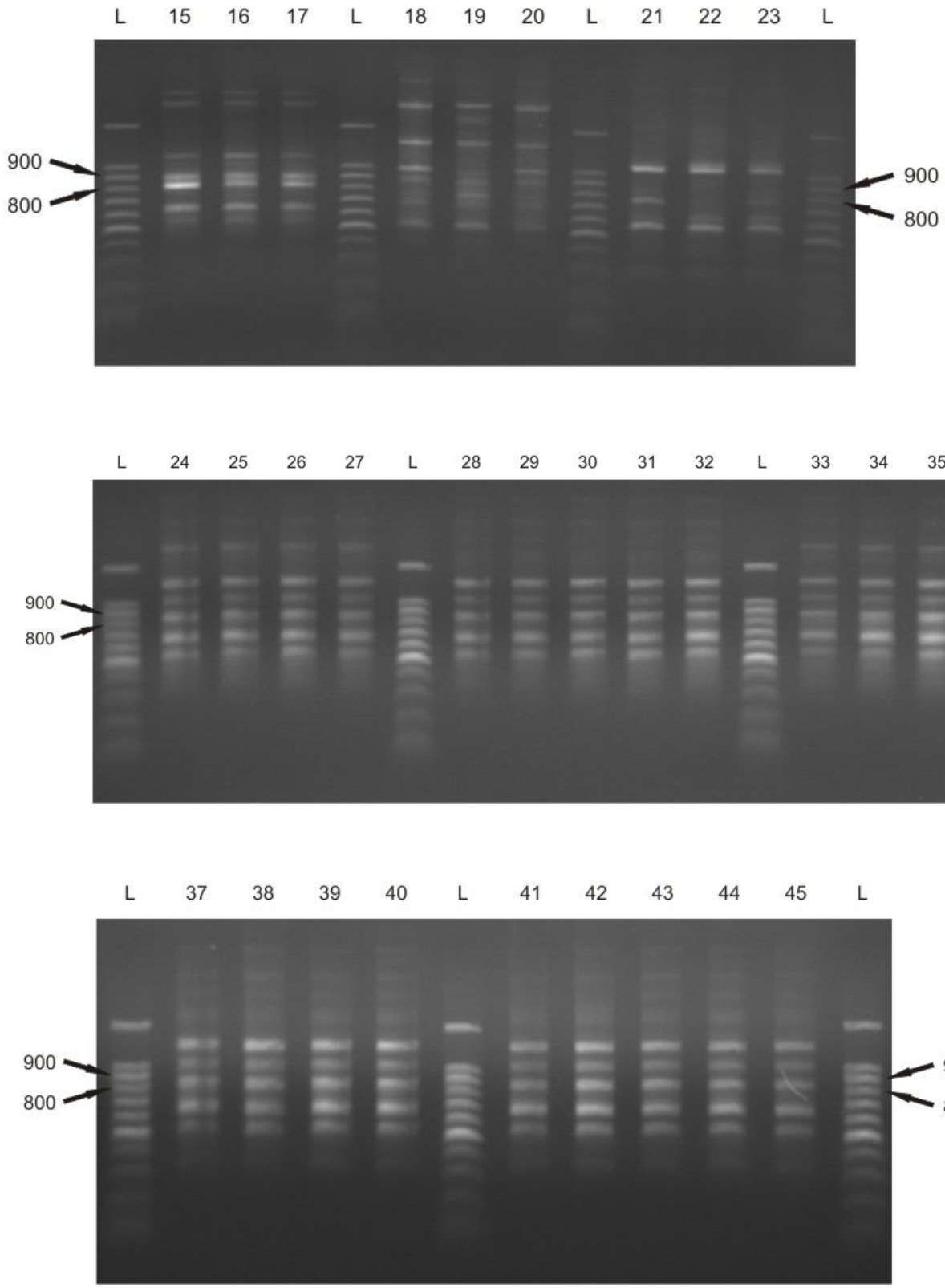


Figura 2. Gelurile cu benzile de migrare a fragmentelor amplificate cu amorsa 77 în cazul indivizilor criorezistenţi (7-106) şi normali (1-6); L (marker etalon); continuare.

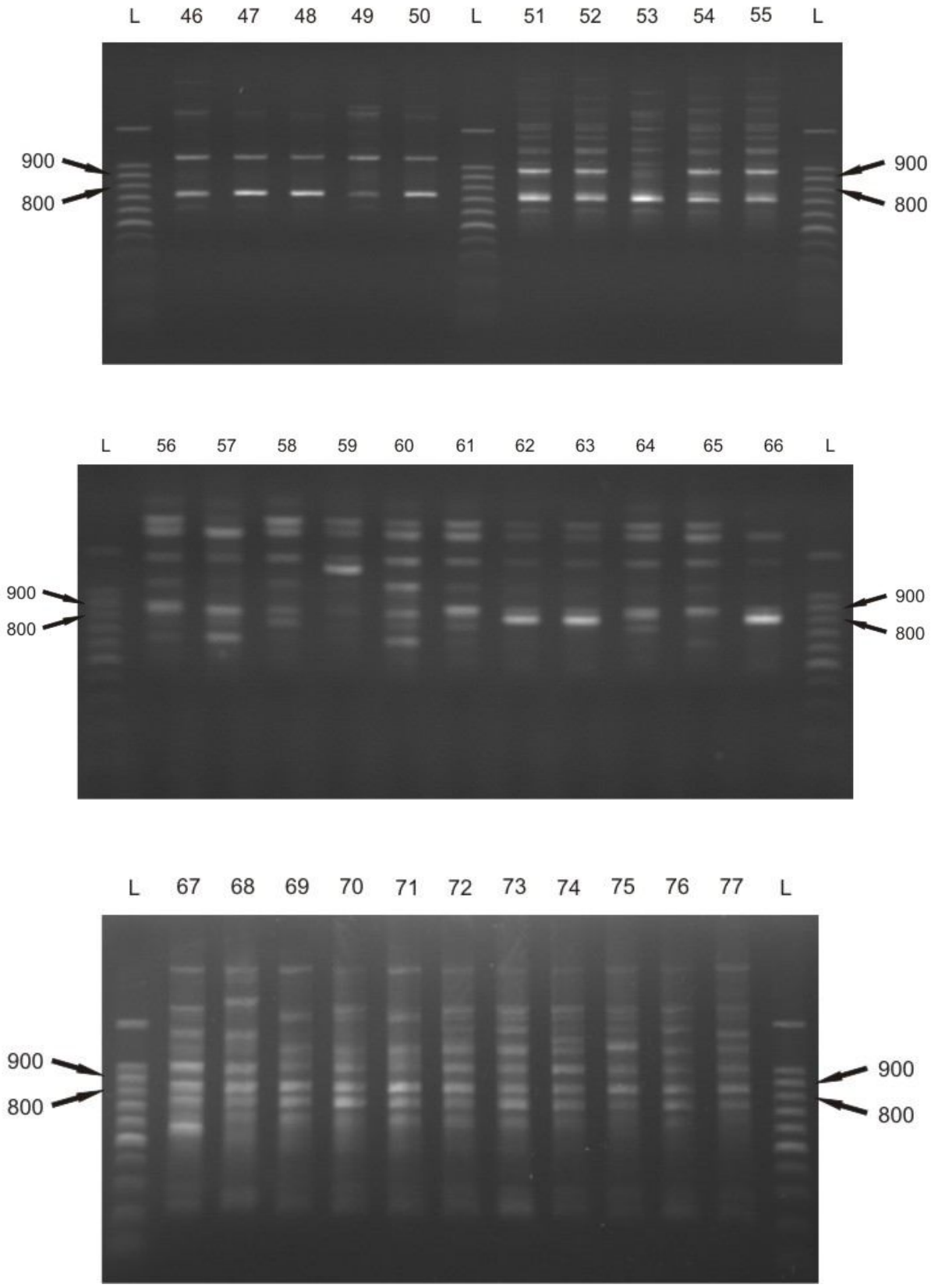


Figura 2. Gelurile cu benzile de migrare a fragmentelor amplificate cu amorsa 77 în cazul indivizilor criorezistenţi (7-106) şi normali (1-6); L (marker etalon); continuare.

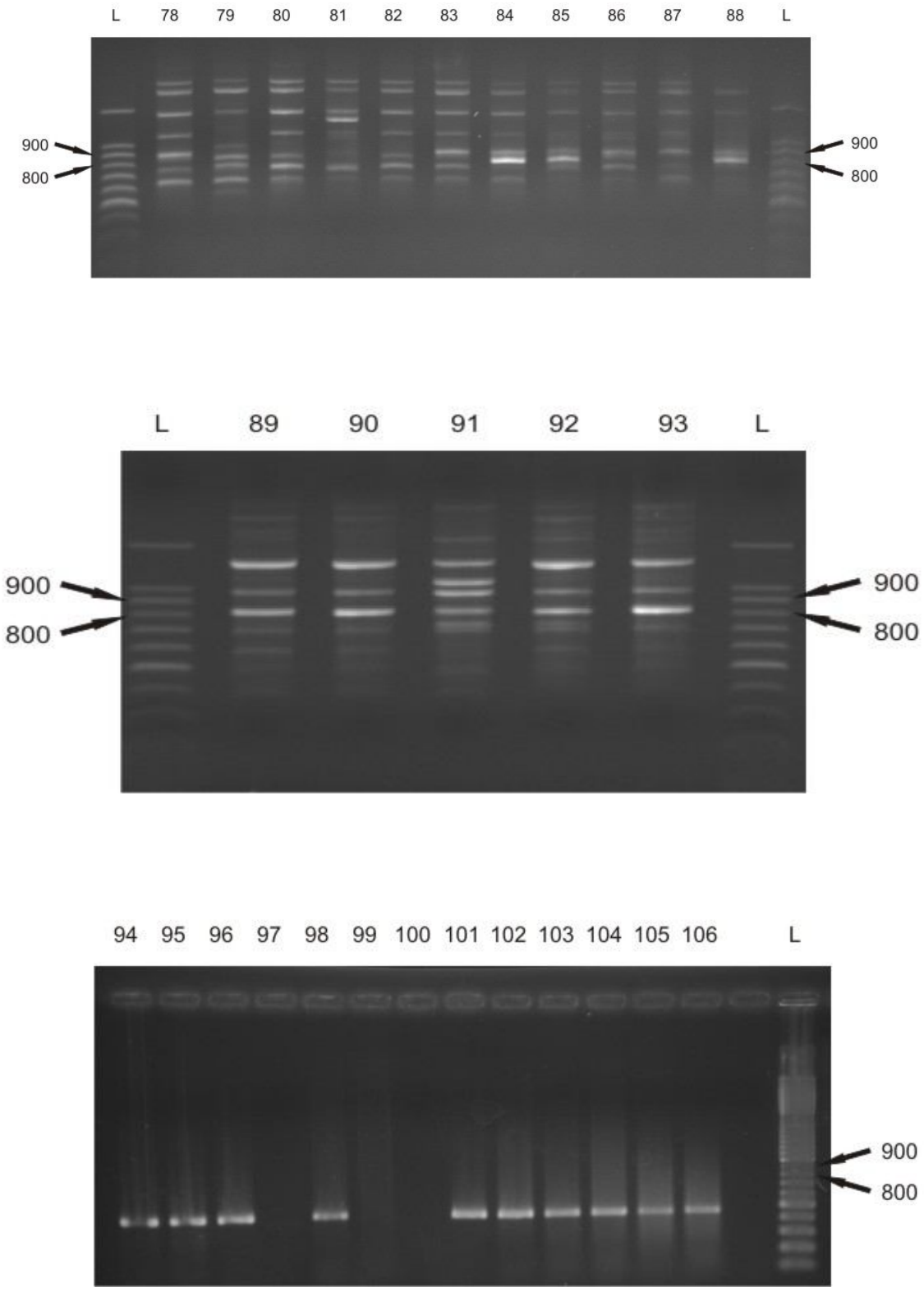


Figura 2. Gelurile cu benzile de migrare a fragmentelor amplificate cu amorsa 77 în cazul indivizilor criorezistenţi (7-106) şi normali (1-6); L (marker etalon); continuare.

Rezultatele înregistrate în urma testării celor două populaţii, prin cele două căi de testare din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie: 1. supunere la creştere treptată a valorii temperaturii şi 2. supunere la şoc termic, au fost incluse într-un tabel în vederea analizei ulterioare din punct de vedere statistic (tabelele 1 şi 2).

Tabelul 1

Tabelul cu evidenţa testării liniei criorezistente de guppy la hipertermie prin creşterea treptată a valorii temperaturii

Ziua nr.	*Nr. indivizi testaţi*		*Intervalul temperaturii de testare*	*Indivizi grav afectaţi comportamental şi fiziologic*		*Indivizi pierduţi*	
	Criorezistenţi	Martor		Criorezistenţi	Martor	Criorezistenţi	Martor
1	30	30	28-32ºC	0	0	0	0
4	30	30	28-34ºC	0	0	0	0
7	30	30	28-36ºC	0	0	0	0
10	30	30	28-38ºC	0	2	0	0
13	30	30	28-40ºC	1	5	0	0
16	30	30	28-41ºC	1	6	0	1
19	30	30	28-42ºC	2	9	0	3

Tabelul 2

Tabelul cu evidenţa testării liniei criorezistente de guppy la hipertermie prin supunere la şoc termic

Ziua nr.	*Nr. indivizi testaţi*		*Intervalul temperaturii de testare*	*Indivizi grav afectaţi comportamental şi fiziologic*		*Indivizi pierduţi*	
	Criorezistenţi	Martor		Criorezistenţi	Martor	Criorezistenţi	Martor
2	30	30	28-32ºC	0	0	0	0
5	30	30	28-34ºC	0	1	0	0
8	30	30	28-36ºC	0	2	0	0
11	30	30	28-38ºC	1	5	0	1

Se pot observa, din rezultatele prezentate în tabelele 1 şi 2, faptul că loturile studiate s-au comportat diferit de cele martor în ambele situaţii experimentale (creştere treptată şi şoc termic). Acolo unde valorile observate au fost diferite de 0 şi analiza statistică a fost posibilă, s-a aplicat testul χ^2 (a se vedea în tabelul 3) pentru compararea valorilor observate experimental (loturi criorezistente expuse la hipertermie) cu cele aşteptate (loturile martor expuse la hipertermie în aceleaşi condiţii). Cu ajutorul acestui model de calcul statistic s-a putut vedea faptul că loturile experimentale diferă statistic foarte semnificativ din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie faţă de loturile martor care sunt vizibil mai sensibile.

Tabelul 3

Tabel de calcul a valorilor χ^2 şi a semnificaţiei lui

Fenotipuri	*Valori obsevate* (f_0)	*Valori aşteptate* (f_a)	*Deviaţia (d) sau* (f_0-f_a)	d^2	d^2/f_a	χ^2	*P şi semnificaţia*
S40cl	3,3333	16,6667	-13,3334	177,7796	161,1129	Σ	P>>0,001
R40cl	96,6667	83,3333	13,3334	177,7796	94,4463	255,5592	***
S41cl	3,3333	20,0000	-16,6667	277,7789	13,8889	Σ	P>>0,001
R41cl	96,6667	80,0000	16,6667	277,7789	3,4722	17,3611	***
S42cl	06,6667	30,0000	-23,3333	544,4429	18,1481	Σ	P>>0,001
R42cl	93,3333	70,0000	23,3333	544,4429	7,7778	25,9259	***
S38cl	3,3333	16,6667	-13,3334	177,7796	161,1129	Σ	P>>0,001
R38cl	96,6667	83,3333	13,3334	177,7796	94,4463	255,5592	***

Explicaţiile aferente abrevierilor din tabel:

S40cl – Sensibili la 40ºC prin creştere lentă a temperaturii;

R40cl - Rezistenţi la 40ºC prin creştere lentă a temperaturii;

S41cl – Sensibili la 41ºC prin creştere lentă a temperaturii;

R41cl - Rezistenţi la 41ºC prin creştere lentă a temperaturii;

S42cl – Sensibili la 42ºC prin creştere lentă a temperaturii;

R42cl - Rezistenţi la 42ºC prin creştere lentă a temperaturii;

S38cl – Sensibili la 38ºC prin şoc termic;

R38cl - Rezistenţi la 38ºC prin şoc termic;

*** - Diferenţă foarte semnificativă.

Toate aceste rezultate susţin ipoteza colectivului de cercetători din Turcia (Karayucel et al 2006), aceeaşi genă care conferă indivizilor criorezistenţa fiind implicată şi în adaptarea peştilor guppy la hipertermie şi, mai mult decât atât, această genă X-linkată îşi dezvăluie identitatea ca o genă care conferă rezistenţă la şoc termic, fiind deci responsabilă de codificarea unei HSP (proteină de şoc termic = *heat shock protein*) sau a unei catene polipeptidice din componenţa acesteia. Oricum, valorile obţinute arată clar că, pe lângă gena majoră în cauză, termorezistenţa pare să fie un caracter fenotipic determinat şi de alţi factori genetici, fie ei cu implicaţii minore, lucru observat şi în activităţile anterioare, atunci când peştii au fost trataţi prin hipotermie.

4. Perspective

Rezultatele deosebite obţinute până în această etapă sunt deja în curs de brevetare şi acceptate spre publicare în Buletinul OSIM - BOPI 5709/29.05.09 (a se vedea anexele 1-4). Ele au fost promovate/făcute cunoscute cercetătorilor şi acvariştilor prin includerea lor în trei cărţi ştiinţifice şi aplicative (Petrescu-Mag 2007abc) care au fost diseminate gratuit pe scară largă. Rezultatele anterioare din proiectul CEEX 140/2006 vor fi reunite cu alte informaţii, deţinute din proiectul CNCSIS Td 200/2005, cu rezultatele recente din CEEX 140/2006 şi cu rezultate ale echipei de cercetători de la SC Bioflux SRL (firmă privată cu activitate principală de cercetare-dezvoltare-inovare), care împreună vor constitui obiectul unei noi cereri de brevet invenţie OSIM.

Identitatea comună a genei studiate cu una din proteinele de HSP care conferă rezistenţa la diferite forme de stres, printre care şi la cel termic, face trecerea colectivului nostru spre un alt proiect de cercetare-dezvoltare, PN II 51-056/2006, în cadrul căruia genele de şoc termic vor fi secvenţiate nucleotidic, iar proteinele studiate din punctul de vedere al secvenţei de aminoacizi. De asemenea, în proiectul de continuare a cercetărilor, 51-056, se va studia rolul tipurilor de proteine HSP, fiecare în parte, la guppy, crap şi păstrăv (Parteneri: Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca şi Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iaşi).

Studierea calităţii liniilor de peşti din punctul de vedere al rezistenţei, productivităţii, a valorii estetice şi economice a fost propusă spre continuare, prin hibridare interspecifică, în cadrul proiectului PN II 2732/2008 (coordonator UBB Cluj), în cadrul căruia s-au constituit noi parteneriate ale USAMV Cluj cu universităţi precum Universitatea de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară Bucureşti şi Universitatea "Dunărea de Jos" Galaţi şi o firmă privată

cu activitate în piscicultură (care cofinanţează activităţile şi valorifică rezultatele cercetării în cazul finanţării lor – firma SC 3M AGC SRL). Proiectul a fost evaluat sub punctajul de finanţare.

Oricum, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, îşi continuă activitatea de cercetare în domeniul acvacol prin proiectul PN II, ctr. nr. 52-150/2008, cu titlul „Dezvoltarea acvaculturii organice a salmonidelor în sisteme recirculante biosecurizate" în colaborare cu Univeristatea Dunarea de Jos Galati, Institutul de Cercetări şi Amenajări Silvice din Bucuresti, Institutul de Cercetare - Dezvoltare pentru Ecologie Acvatică, Pescuit şi Acvacultură din Galaţi, Centrul de Cercetare-Dezvoltare pentru Piscicultură – Nucet, unde va aplica şi valorifica printre altele şi experienţa acumulată prin prezentul proiect.

OSIM

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Strada Ion Ghica nr.5, Sector 3, Bucureşti - Cod 030044 - ROMÂNIA
Telefon: *315.19.65; 315.19.66; 314.59.65; 314.59.66;*
Telefon Director: *315.90.66*
e-mail: office@osim.ro
Fax: 312.36.19

O.S.I.M.
REGISTRATURA GENERALĂ
25. FEB. 2008
Nr.: 1 010955

Către,

UNIVERSITATEA DE ŞTIINŢE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂŞTUR NR.3-5, COD 400372, RO

NOTIFICARE

Vă transmitem în anexă rezumatul invenţiei(ilor) care face (fac) obiectul(ele) cererii de brevet de invenţie nr **a 2007 00775**, cu dată de depozit din **09.11.2007**, şi cu titlul **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE CREŞTERE A DIMENSIUNILOR CORPORALE LA MASCULII SPECIEI DE PEŞTI ORNAMENTALI GUPPY (POECILIA RETICULATA)**, reformulat de către OSIM, care urmează să fie publicat în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială-Secţiunea Invenţii **Nr.5** din **29.05.2009**, conform art.23 * alin.1 sau alin.2; descrierea, revendicările şi, dacă este cazul, desenele sunt puse la dispoziţia publicului la sediul OSIM începând cu data de **29.05.2009**.

Vă rugăm să îl consultaţi şi, în cazul în care sunteţi de acord cu conţinutul şi forma de redactare propuse, să îl semnaţi şi să-l transmiteţi la OSIM în termen de 30 de zile de la data prezentei sau, în caz contrar, să ne trimiteţi în acelaşi termen rezumatul cu conţinutul care doriţi să fie făcut public.

În situaţia în care nu se primeşte răspuns în termenul acordat sau dacă notificarea este returnată la OSIM, rezumatul se va publica în forma propusă de OSIM.

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
SERVICIUL EXAMINARE PRELIMINARĂ
ROMANIA

ŞEF SERVICIU EXAMINARE PRELIMINARĂ,
Ing. Pordea Viorel

EXAMINATOR,
NIŢĂ IULIA MĂDĂLINA

Anexă: 1 filă rezumat

* Legea nr. 64/1991 republicată în temeiul art.III din Legea nr.203/2002 pentru modificarea şi completarea Legii nr.64/1991 privind brevetele de invenţie, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr.340 din 22 mai 2002, dându-se textelor o nouă numerotare.
** Legea nr.381/2005 pentru modificarea şi completarea Ordonanţei Guvernului nr.41/1998 privind taxele în domeniul protecţiei proprietăţii industriale şi regimul de utilizare a acestora.

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
ROMÂNIA

(51) Int.Cl.
C07G 15/00 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)
A01K 61/00 (2006.01);

(12) CERERE DE BREVET DE INVENŢIE

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecţia conferită potrivit dispoziţiilor art.33 din Legea nr.64/1991 republicată în temeiul art.III din Legea nr.203/2002, cu excepţia cazurilor în care cererea de brevet de invenţie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecţiei conferite de cererea de brevet de invenţie este determinată de revendicările conţinute în cererea publicată în conformitate cu art.23.

(21) Nr. cerere: **a 2007 00775**

(22) Data de depozit: **09.11.2007**

(30) Prioritate:

(66) Prioritate internă:

(41) Data publicării cererii: BOPI 5/09 29.05.09

(61) Perfecţionare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internaţională PCT:
Nr.

(87) Publicare internaţională:
Nr.

(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE ŞTIINŢE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂŞTUR NR.3-5, COD 400372, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO

(72) Inventatori: PETRESCU-MAG IOAN VALENTIN, STR.CEAHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; BUD IOAN, STR.MOGOŞOAIA NR.7, SC.5, AP.45, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; PETRESCU-MAG RUXANDRA MĂLINA, STR.CEAHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; PAMFIL DORU, STR.BISERICII ORTODOXE NR.12, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; GORGAN DRAGOŞ LUCIAN, STR.ANA IPĂTESCU NR.6, BL.A14, SC.D, AP.78, PIATRA NEAMŢ, JUDEŢUL NEAMŢ, RO; PĂSĂRIN BENONE, ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR.8, IAŞI, JUDEŢUL IAŞI, RO; ŞTEFAN REKA, STR.POET GRIGORE ALEXANDRESCU NR.17, BL.T3, AP.9, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO

(74) Mandatar:

(54) PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE CREŞTERE A DIMENSIUNILOR CORPORALE LA MASCULII SPECIEI DE PEŞTI ORNAMENTALI GUPPY (POECILIA RETICULATA)

(57) Rezumat: Invenţia se referă la un procedeu pentru creşterea dimensiunilor corporale la masculii speciei de peşti ornamentali guppy **(Poecilia reticulata)** prin utilizarea valeratului de estradiol ca hormon fertilizant. Loturile de masculi corpolenţi din specia Poecilia reticulata obţinute prin procedeul conform invenţiei au dimensiuni corporale care le depăşesc cu 20...40% pe cele ale masculilor din loturile martor, netratate hormonal, în primele 2...3 luni de viaţă se dezvoltă morfologic macroscopic asemenea femelelor, iar momentul diferenţierii sexuale, mai precis colorarea intensă, apariţia gonopodium-ului şi comportamentului de curtare pot fi hotărâte de crescător, acestea trei din urmă manifestându-se la masculii trataţi în circa 8...20 de zile de la încetarea tratamentului hormonal, indiferent de varietatea sau linia

UTILIZATOR = (8914), intrare CS: 21.02.2008 ora:10:37:35 prelucrare WP: 21 February 2008

lor încep a se diferenția sexual la vârste ontogenice târzii, adică la 2,5...3,5 luni, fapt care permite dezvoltarea unei jumătăți posterioare a corpului şi a unui peduncul caudal robust, specific femelelor, cu 30...40% mai groase decât în cazul loturilor netratate hormonal.

Revendicări: 4
Figuri: 1

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ŞI MĂRCI
Strada Ion Ghica nr.5, Sector 3, Bucureşti - Cod 030044 - ROMÂNIA
Telefon: *315.19.65; 315.19.66; 314.59.65; 314.59.66;*
Telefon Director: *315.90.66*
e-mail: office@osim.ro
Fax: 312.38.19

REGISTRATURA GENERAL
26 FEB 2008
Nr.: 010954

Nr. Dvs. _____/_____ Nr. OSIM_____

Către,

UNIVERSITATEA DE ŞTIINȚE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂŞTUR NR.3-5, COD 400372, RO

NOTIFICARE

Vă transmitem în anexă rezumatul invenției(ilor) care face (fac) obiectul(ele) cererii de brevet de invenție nr **a 2007 00774**, cu dată de depozit din **09.11.2007**, şi cu titlul **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNEI LINII CRIOREZISTENTE DE PEŞTI ORNAMENTALI GUPPY(POECILIA RETICULATA) CU APLICABILITATE ÎN GUPPYCULTURĂ** , reformulat de către OSIM, care urmează să fie publicat în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială-Secțiunea Invenții Nr. **5** din **29.05.2009**, conform art.23 * alin.1 sau alin.2; descrierea, revendicările şi, dacă este cazul, desenele sunt puse la dispoziția publicului la sediul OSIM începând cu data de **29.05.2009**.

Vă rugăm să îl consultați şi, în cazul în care sunteți de acord cu conținutul şi forma de redactare propuse, să îl semnați şi să-l transmiteți la OSIM în termen de 30 de zile de la data prezentei sau, în caz contrar, să ne trimiteți în acelaşi termen rezumatul cu conținutul care doriți să fie făcut public.

În situația în care nu se primeşte răspuns în termenul acordat sau dacă notificarea este returnată la OSIM, rezumatul se va publica în forma propusă de OSIM.

ŞEF SERVICIU EXAMINARE PRELIMINARĂ,
Ing. Pordea Viorel
SERVICIUL EXAMINARE PRELIMINARĂ ROMANIA

EXAMINATOR,
NIȚĂ IULIA MĂDĂLINA

Anexă: 1 filă rezumat

* Legea nr. 64/1991 republicată în temeiul art.III din Legea nr.203/2002 pentru modificarea şi completarea Legii nr.64/1991 privind brevetele de invenție, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr.340 din 22 mai 2002, dându-se textelor o nouă numerotare.
** Legea nr.381/2005 pentru modificarea şi completarea Ordonanței Guvernului nr.41/1998 privind taxele în domeniul protecției proprietății industriale şi regimul de utilizare a acestora.

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
ROMÂNIA

(51) Int.Cl.
C07G 15/00 (2006.01)
A01K 67/00 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01);

(12) **CERERE DE BREVET DE INVENŢIE**

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecţia conferită potrivit dispoziţiilor art.33 din Legea nr.64/1991 republicată în temeiul art.III din Legea nr.203/2002, cu excepţia cazurilor în care cererea de brevet de invenţie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecţiei conferite de cererea de brevet de invenţie este determinată de revendicările conţinute în cererea publicată în conformitate cu art.23.

(21) Nr. cerere: **a 2007 00774**

(22) Data de depozit: **09.11.2007**

(30) Prioritate:

(66) Prioritate internă:

(41) Data publicării cererii: BOPI 5709 29.05.09

(61) Perfecţionare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internaţională PCT:
Nr.

(87) Publicare internaţională:
Nr.

(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE ŞTIINŢE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂŞTUR NR.3-5, COD 400372, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO

(72) Inventatori: PETRESCU-MAG IOAN VALENTIN, STR.CEAHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; BUD IOAN, STR.MOGOŞOAIA NR.7, SC.5, AP.45, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; PETRESCU-MAG RUXANDRA MĂLINA, STR.CEAHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; SISEA CRISTIAN, STR.LUPTEI NR.29, SIBIU, JUDEŢUL SIBIU, RO; BURA MARIAN, STR.CIRCUMVALAŢIUNII NR.28, AP.18, TIMIŞOARA, JUDEŢUL TIMIŞ, RO; GROZEA ADRIAN, ALEEA BAGHETEI NR.7, BL.A8, SC.B, AP.3, TIMIŞOARA, JUDEŢUL TIMIŞ, RO; BOTHA MIKLOS, STR.MEHEDINŢI NR.47-49, AP.14, SC.1, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO; COŞIER VIORICA, STR.IEZER NR.4, BL.L3, AP.21, CLUJ-NAPOCA, JUDEŢUL CLUJ, RO

(74) Mandatar:

(54) PROCEDEU DE OBŢINERE A UNEI LINII CRIOREZISTENTE DE PEŞTI ORNAMENTALI GUPPY(POECILIA RETICULATA) CU APLICABILITATE ÎN GUPPYCULTURĂ

(57) Rezumat: Invenţia se referă la un procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti ornamentali guppy **(Poecilia reticulata)**, această specie de peşte fiind utilă în crescătoriile de peşti ornamentali pentru reducerea costurilor de creştere şi întreţinere a stocurilor cu destinaţie acvariofilă. Femelele criorezistente de peşti guppy obţinute prin procedeul conform invenţiei ating dimensiunea de vânzare de 2,5...3,0 cm SL la vârsta de 65...67 zile dacă sunt crescute la 17...19^{0}C, supravieţuiesc câteva ore la 10...12^{0}C, câteva zile la 14...16 zile şi sunt tolerante la variaţia temperaturii, iar masculii criorezistenţi hemizigoţi de peşti guppy obţinuţi prin acelaşi procedeu ating dimensiunea de vânzare de 1,8...2,0 cm SL la vârsta de 65...67

zile dacă sunt crescuți la 17...19^{0}C, supraviețuiesc câteva ore la 10...12^{0}C, câteva zile la 14...16^0 şi sunt toleranți la variația temperaturii, linia de peşti guppy formată din aceste femele şi masculi pot da naştere unei descendențe criorezistente pure din punct de vedere genetic.

Revendicări: 3
Figuri: 1

5. Concluzii

În urma fotografierii gelurilor de migrare a ADN şi a tipăririi lor, s-a efectuat o examinare atentă a acestora, deducându-se ineficacitatea distingerii indivizilor criorezistenţi de cei normali în funcţie de benzile migrate în gel prin amplificarea unor fragmente cu amorsa numărul 77. Corelaţiile dintre benzi par mai degrabă a fi asociate cu setul de indivizi pe care s-a lucrat simultan decât cu o anume categorie fenotipică, deşi, în etapele anterioare, aceeaşi amorsă s-a dovedit perfect viabilă în cadrul varietăţii Red Blond din generaţia parentală. Cu toate că markerii RAPD pot fi folosiţi pentru a discrimina specii, varietăţi, secvenţe sex-specifice, sau alte secvenţe nucleotidice, se pare că repetabilitatea redusă a acestor tehnici între diferite etape experimentale este principalul inconvenient şi probabil motivul pentru care această tehnică va fi utilizată tot mai puţin pe viitor. Desigur, markerul sau, mai bine zis, produsul de amplificare prin amorsa numărul 77 din setul de amorse testate este viabil şi aplicabil în cazul liniei consangvine din varietatea Red Blond, dar testarea a zeci de amorse pentru fiecare linie în parte înseamnă risipă de efort, de aceea utilizarea procedeului bazat pe sex-linkage, dezvoltat de noi în prezentul proiect (CEEX 140/2006) şi aflat în curs de brevetare, este indicat, preferat şi recomandat de noi pentru obţinerea unor linii criorezistente de peşti guppy.

Rezultatele înregistrate în urma testării celor două populaţii, prin cele două căi de testare din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie: 1. supunere la creştere treptată a valorii temperaturii şi 2. supunere la şoc termic, au arătat faptul că loturile studiate s-au comportat diferit comparative cu cele martor în ambele situaţii experimentale. Cu ajutorul testului statistic χ^2 s-a putut constata faptul că loturile experimentale diferă statistic foarte semnificativ din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie faţă de loturile martor, loturi martor care sunt vizibil mai sensibile. Toate aceste rezultate susţin ipoteza colectivului Karayücel et al (2006), aceeaşi genă care conferă indivizilor criorezistenţa fiind implicată totodată şi în adaptarea peştilor guppy la hipertermie şi, mai mult decât atât, această genă X-linkată îşi dezvăluie identitatea ca o genă care conferă rezistenţă la şoc termic, fiind deci responsabilă de codificarea unei HSP (proteină de şoc termic = *heat shock protein*) sau a unei catene polipeptidice din componenţa acesteia. Oricum, valorile obţinute arată clar că, pe lângă gena majoră în cauză, termorezistenţa pare să fie un caracter fenotipic determinat şi de alţi factori genetici, fie ei cu implicaţii minore, lucru observat şi în activităţile anterioare, atunci când peştii au fost trataţi prin hipotermie.

Rezultatele deosebite obţinute până în această etapă sunt deja în curs de brevetare şi acceptate spre publicare în Buletinul OSIM - BOPI 5709/29.05.09. Ele au fost promovate prin includerea lor în trei cărţi ştiinţifice şi practice care au fost diseminate gratuit publicului interesat (cercetători, acvarişti, acvacultori).

Identitatea comună a genei studiate cu una din HSP-urile care conferă rezistenţa la diferite forme de stres, printre care şi la cel termic, face trecerea colectivului nostru spre un alt proiect de cercetare-dezvoltare, PN II 51-056/2006, în cadrul cărora genele de şoc termic vor fi secvenţiate nucleotidic şi din punct de vedere a secvenţei de aminoacizi din cadrul proteinelor codificate. De asemenea, în proiectul 51-056, se va studia rolul diferitelor tipuri de proteine HSP la trei specii de peşti: *Poecilia reticulata*, *Cyprinus carpio* şi *Oncorhynchus mykiss*.

Bibliografie

Ahmed M. M. M., Ali B. A., EI-Zaeem S. Y., 2004 Application of RAPD markers in fish: Part I – some genera (*Tilapia, Sarotherodon* and *Oreochromis*) and species (*Oreochromis aureus* and *Oreochromis niloticus*) of Tilapia. International Journal of Biotechnology 6(1):86 - 93.

Bardakci F., Skibinski D. O. F., 1999 A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia (Pisces: Cichlidae). Animal Genetics 30(1):78-79.

Bâlteanu V., 2005 Utilizarea selecţiei asistate de markeri genetici (MAS) la taurinele din Romania, în scopul creşterii conţinutului de cazeină şi randamentului de transformare al laptelui în brânzeturi. Proiect de cercetare ştiinţifică CNCSIS TD 2005.

Bud I., Petrescu-Mag I. V., Pamfil D. C., Boaru A., Coşier V., Vlaic A., Pusta D., Ladoşi D., Vlădău V., Pop S. N., Sisea C., Botha M., Bâlteanu V., Pop R., Ştefan R. G., Odagiu A., Petrescu D. C., Huşovschi A., Hărşan R., Cocan D., Csép L., Vanea C., Maxim E., Popescu O., Dragoş N., Coman N., Dordea., Keul A., Petrescu-Mag R. M., Damert A., Lupan I., Kelemen B. S., Ferencz B. K., Herlea O. M., Băcilă I., Chilici A. M., Jakab E., Şuteu D. C., Basangiu F. B., Bucs S. L., Nagy C. I., Balint M., Demeter J. S., Chira S., Csorba K. M., Marosi B., Gal F., Gorgan L., Câmpeanu M. M., Surugiu V., Zamfirescu

S., Buburzan L., Gherasim S. R., Neagu A., 2007 Studiul genelor HSP în cadrul unor specii de peşti cu o deosebită valoare economică în vederea ameliorării lor. Proiect PN II 51-056.

Cristea V., et al, 2008 Dezvoltarea acvaculturii organice a salmonidelor în sisteme recirculante biosecurizate. Proiect PN II 52-150.

Dragoş N., 2006 Biologie celulară şi moleculară. Note de curs. Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca.

Dreyer C., Hoffmann M., Lanz C., Willing E. M., Riester M., Warthmann N., Sprecher A., Tripathi N., Henz S., Weigel D., 2007 ESTs and EST-linked polymorphisms for genetic mapping and phylogenetic reconstruction in the guppy, *Poecilia reticulata*. BMC Genomics (1):269. Published online 2007 August 8. doi:10.1186/1471-2164-8-269.

Gorman K. F., Breden F., 2007 Teleosts as models for human vertebral stability and deformity. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 145:28-38.

Griffiths S. W., Magurran A. E., 1999 Schooling decisions in guppies (*Poecilia reticulata*) are based on familiarity rather than kin recognition by phenotype matching. Behavioral Ecology and Sociobiology 45(6):437-443.

Hain T. J. A., Neff B. D., 2007 Multiple paternity and kin recognition mechanisms in a guppy population. Molecular Ecology 16: 3938-3946.

Hoffmann M., Tripathi N., Henz S., Lindholm A., Weigel D, Breden F., Dreyer C., 2007 Opsin gene duplication and diversification in the guppy, a model for sexual selection. Proc. R. Soc. B 274: 33-42.

Houde A. E., 1997 Sex, color, and mate choice in guppies. Princeton University Press, New Jersey.

Hughes K. A., Du L., Rodd F. H., Reznick D. N., 1999 Familiarity leads to female mate preference for novel males in the guppy, *Poecilia reticulata*. Animal Behaviour 58:907-916.

Jalabert B., Billard R., 1969 Étude ultrastructurale du site de conservation des spermatozoïdes dans l'ovaire de *Poecilia reticulata* (Poisson Téléostéen). Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 9(2):273-280.

Karayücel I., Ak O., Karayücel S., 2006 Effect of temperature on sex ratio. Aquaculture Research 37:139-150.

Lindholm A., Breden F., 2002 Sex chromosomes and sexual selection in Poeciliid fishes. The american Naturalist 160:S214-S224.

Mag-Mureşan I. V., 2005 Cercetări privind posibilităţile de dirijare a reproducţiei în vederea modificării raportului dintre sexe la varietăţile speciei *Lebistes reticulata* (*Poecilia reticulata*). Proiect de cercetare ştiinţifică CNCSIS TD 200.

Martin U., Weigel D., Dreyer C., 2006. In vitro culture of embryos of the guppy, *Poecilia reticulata.* Developmental dynamics 235:617-622.

Oroian E. T., 2005 Studiul variabilităţii genetice pentru crearea de linii în populaţiile de ciprinide din nord-vestul Transilvaniei prin utilizarea markerilor genetici şi a biotehnologiilor asociate pentru conservarea durabilă a genofondului. Proiect finanţat prin Programul Cercetare de Excelenţă – Modulul 1.

Oroian E. T., 2006 Selecţia asistată de markeri la crap. Editura Risoprint. Cluj-Napoca.

Petrescu-Mag I. V., Bud I., Petrescu-Mag R. M., Sisea C., Bura M., Grozea A., Botha M., Coşier V., 2007 Procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*) cu aplicabilitate în guppycultură. Cerere Brevet Invenţie – OSIM A/00774 din 09.11.2007.

Petrescu-Mag I. V., Bud I., Petrescu-Mag R. M., Pamfil D. C., Gorgan L. D., Păsărin B., Ştefan R. G., 2007 Procedeu biotehnologic de creştere a dimensiunilor corporale la masculii speciei de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*). Cerere Brevet Inventie – OSIM A/00775 din 09.11.2007.

Petrescu-Mag I. V., Bud I., Pamfil D. C., Petrescu-Mag R. M., Grozea A., Bura M., Gorgan D. L., Păsărin B., Bănăţean-Dunea I., Lozinsky L. R., Hărşan R., Csèp L., Sisea C., Coşier V., Botha M., Petrescu D. C., 2008 Procedeu de obţinere a unei linii de peşti ornamentali guppy, rezistentă la hipertermie. Cerere Brevet Invenţie OSIM: A/00814 din 14.10.2008.

Petrescu-Mag R. M., et al, 2008 Hibridarea interspecifică – o alternativă nepoluantă de diversificare a producţiei piscicole. Proiect PN II 2732.

Pisoschi A., Ardelean A., 2007 Aspecte metodologice în cercetarea ştiinţifică. Editura Academiei Române, Bucureşti.

Pop I., Mag I. V., 2005 Probleme actuale de bioetică animală şi reglementări ale legislaţiei europene privind protecţia animalelor. Lucrări ştiinţifice – seria Zootehnie şi Biotehnologii 48:961-967.

Popescu O., 2008 Tehnologia ADN recombinat. Note de curs. Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca.

Shaddock P., 2008 Guppy color bank. Electronic edition, March 2008, available at www.guppydesigner.com

Shen X., Yang G., Liu Y., Liao M., Wang X., Zhu M., Song W., Zou G., Wei Q., Wang D., Chen D., 2007 Construction of genetic linkage maps of guppy (*Poecilia reticulata*) based on AFLP and microsatellite DNA markers. Aquaculture 271(1-4):178-187.

Venkatesh B., Tan C. H., Lam T. J., 1990 Steroid hormone profile during gestation and parturition of the guppy (*Poecilia reticulata*).Gen. Comp. Endocrinol. 77(3):476-83.

Venkatesh B., Tan C. H., Lam T. J., 1991 Progestins and cortisol delay while estradiol-17 beta induces early parturition in the guppy, *Poecilia reticulata*. Gen. Comp. Endocrinol. 83(2):297-305.

Venkatesh B., Tan C. H., Lam T. J., 1992a Effects of neurohypophyseal and adenohypophyseal hormones, steroids, eicosanoids, and extrafollicular tissue on ovulation in vitro of guppy (*Poecilia reticulata*) embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 87(1):20-7.

Venkatesh B., Tan C. H., Kime D. E., Loy G. L., Lam T. J., 1992b Steroid metabolism by ovarian follicles and extrafollicular tissue of the guppy (*Poecilia reticulata*) during oocyte growth and gestation. Gen. Comp. Endocrinol. 86(3):378-94.

Venkatesh B., Tan C. H., Lam T. J., 1992c Steroid production by ovarian follicles of the viviparous guppy (*Poecilia reticulata*) and its regulation by precursor substrates, dibutyryl cAMP and forskolin. Gen. Comp. Endocrinol. 85(3):450-61.

Weadick C. J., Chang B. S. W., 2007 Long-wavelength sensitive visual pigments of the guppy (*Poecilia reticulata*): six opsins expressed in a single individual. BMC Evolutionary Biology 7(Suppl 1):S11.

Winge O., 1922 Apeculiar mode of inheritance and its cytological explanation. J. Genet. 12:137-144.

Winge O., 1927 The location of eighteen genes in *Lebistes reticulatus*. Journal of Genetics 18:1-43.

Winge O., 1934. The experimental alteration of sex chromosomes into autosomes and vice versa, as ilustrated by *Lebistes*. Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 21:1-49.

ETAPA V

Rezumat

Ultima fază a proiectului CEEX 140/2006 este una de diseminare şi valorificare a rezultatelor cercetării şi de evaluare a produselor şi tehnologiilor. Diseminarea s-a făcut prin publicarea de articole ştiinţifice în reviste, participare activă la simpozion şi prin prezenta carte. Valorificarea/protejarea informaţiilor s-a făcut prin brevetarea procedeului tehnologic.

1. Obiectivele ultimei faze a proiectului

Acestea se referă la brevetarea rezultatelor cercetării şi diseminarea lor sub formă de carte ştiinţifică (plus alte forme de valorificare sau diseminare).

2. Brevetarea

În perioada iunie-septembrie 2008 a fost elaborată cea de-a treia cerere de brevet invenţie, ea fiind înregistrată la OSIM la data de 14.10.2008 cu numărul A/00814. Aflat sub incidenţa dreptului de proprietate intelectuală, el poate fi şi este acum descris aici în extenso (a se vedea Anexa 1).

3. Diseminarea rezultatelor în cadrul unor simpozioane ştiinţifice

Deşi, o astfel de diseminare s-a efectuat după aproape fiecare fază de execuţie (de două ori, în cadrul unor manifestări ştiinţifice naţionale organizate de către Centrul Naţional de Management Programe), în această ultimă etapă rezultatele au fost prezentate şi în cadrul unui simpozion de ştiinţa mediului, unde, de asemenea, şi-au găsit aplicabilitatea. Lucrarea s-a intitulat „Peştii de laborator şi poluarea apei. Linkajul sexual şi expresia genelor de culoare – elemente importante pentru detecţia disruptorilor endocrini" şi a fost prezentată în cadrul simpozionului naţional cu participare internaţională: „Contribuţii ştiinţifice în tehnologii şi echipamente pentru evaluarea şi protecţia mediului", în septembrie, 2008 (a se vedea Anexa 2). Articolul are ca şi contribuţii originale utilizarea linkajului sexual şi pune accent pe crearea de loturi de peşti caracterizate printr-o serie de elemente de culoare care fac mai uşoară cuantificarea nivelului de disruptori endocrini din apă. Elementele originale au fost elaborate graţie studiilor genetice la guppy, finanţate de către ANCS prin CEEX-Biotech 140/2006 şi adaptate pentru monitorizarea apei de către SC Bioflux SRL. O parte din aceste proiecte tehnologice se află

sub incidenţa dreptului de proprietate intelectuală şi aparţin în exclusivitate Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca (ca titular), dar aparţin totodată unor participanţi în proiect de la UAIC Iaşi, USAMVB Timişoara şi USAMV Iaşi (ca autori).

4. Diseminarea rezultatelor sub formă de articole ştiinţifice

În această ultimă etapă, s-au publicat trei articole ştiinţifice care înglobează parţial sau integral anumite rezultate ştiinţifice obţinute prin activităţile desfăşurate în cadrul proiectului CEEX 140/2006. Două articole s-au publicat într-o revistă de impact internaţional prin intermediul Editurii Bioflux şi a bordului ştiinţific internaţional al AACL Bioflux, în cadrul căruia consorţiul CEEX 140 a constituit nucleul debutului editorial al revistei Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation (o cooperare a cercetătorilor din mai multe zeci de instituţii, 15 ţări de pe 4 continente).

Jurnalul internaţional mai sus menţionat, AACL Bioflux, publică articole ştiinţifice din întreaga lume în limba engleză (abstract în trei limbi diferite), are o apariţie de două ori pe an, diseminarea se face preponderent online-gratuit. Indexarea Thomson Reuters - ISI este obiectivul principal propus de bordul editorial şi, având în vedere raritatea revistelor ISI de acvacultură şi acvaristică în estul Europei şi inexistenţa vreuneia în România, avem toate şansele să îl atingem. Jurnalul este în prezent indexat în ULRICH'S PERIODICALS DIRECTORY, SOCOLAR şi GOOGLE SCHOLAR, acceptat în bazele de date EBSCO, SCIRUS şi ICAAP. În această revistă, rezultatele cercetărilor efectuate la peştele guppy ar avea cea mai ridicată vizibilitate internaţională (exceptând revistele cu factor de impact).

5. Diseminarea rezultatelor cercetării sub formă de carte ştiinţifică

Prezenta carte a fost editată în vederea coagulării tuturor rezultatelor proiectului CEEX 140/2006. Distribuţia ei se va face gratuit, în forma printată dar şi online în biblioteca virtuală a editurii bioflux (www.editura.bioflux.com.ro). Lista completă a cărţilor în care au fost publicate rezultate ale CEEX 140/2006 este redată mai jos.

6. Aportul diseminării online cu coduri ISSN şi ISBN

Diseminarea online face posibil accesul la informaţie din toate colţurile lumii, rapid şi eficient, cu posibilităţi inepuizabile de multiplicare fără costuri deosebite. Pe de altă parte, publicarea rezultatelor alături de alte informaţii ştiiinţifice de acelaşi fel, de interes

international, în locuri vizitate frecvent de cercetători, studenţi, doctoranzi, cadre universitare etc accelerează sau facilitează procesul de diseminare a rezultatelor publicate. Publicarea online poate facilita uneori şi încălcarea drepturilor de proprietate intelectuală (lucru nedorit), de aceea, pentru recunoaşterea lor ştiinţifică şi pentru identificarea publicaţiilor (a datei publicării, a autorilor etc), acestora li s-au alocat coduri ISSN şi respectiv ISBN. Datele generale despre proiectul CEEX 140/2006 au fost postate la adresele:

http://www.usamvcluj.ro/CEEX%20140/

http://www.bioflux.com.ro/ro/ceex-140/ şi

http://www.bioflux.com.ro/ceex-140/ (în limba engleză).

Ultimele două adrese vor fi accesibile cel puţin pe parcursul a următorilor cinci ani (până în 2012 cel mai devreme, conform garantării din partea SC Bioflux SRL).

Două lucrări au fost incluse, în această ultimă etapă, în revista online AACL Bioflux, ele fiind următoarele:

Petrescu-Mag I. V., Boaru M. A., Hărşan R., Petrescu-Mag R. M., 2008 Genetic basis of resistance to stress in fishes. Molecular and classical investigations in a few model organisms. AACL Bioflux 1:99-110. Electronic version available at:

http://www.bioflux.com.ro/docs/vol1/2008.1.99-110.pdf

Petrescu-Mag I. V., Bourne G. R., 2008 Crossing-over between Y chromosomes: another possible source of phenotypic variability in the guppy, *Poecilia reticulata* Peters. AACL Bioflux 1:1-10. Electronic version available at:

http://www.bioflux.com.ro/docs/vol1/2008.1.1-10.pdf

7. Alte forme de diseminare

Pe lângă cele prezentate mai sus, rezultatele au fost diseminate suplimentar în cadrul unor expoziţii şi saloane ale cercetării. Primele două procedee elaborate în prezentul proiect au fost premiate în cadrul salonului internaţional de inventică Pro Invent (Diploma de Excelenţă şi medalia de bronz – a se vedea Anexa 3).

8. Lista completă a publicaţiilor care includ cel puţin parţial rezultate ale proiectului CEEX 140/2006

Articole ştiinţifice publicate:

Ioan Valentin Mag, Ruxandra Mălina Petrescu 2006 Evolution of the heteromorphic sex chromosomes in fish species. Lucrări Ştiinţifice- seria Zootehnie 49:1076-1081. Editura Ion Ionescu de la Brad, Iaşi ISSN 1454-7368.

Ioan Valentin Mag, Ioan Bud, Ruxandra Mălina Petrescu 2006 Sex dependant mortality in the guppyfish (*Poecilia reticulata* Peters, 1859). Acta Ichtyologica Romanica 1:163-153. Editată de SIR, Sibiu, ISSN 1843-72-49.

Benone Păsărin, Lucian Dragoş Gorgan, Marian Bura, Miklos Botha, Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 The invasive potential of the exotic guppyfish (*Poecilia reticulata* Peters 1859) in temperate zone. Studia Ambientum 1-2:179-187, EFES, Cluj-Napoca, ISSN 1843-3855.

Florin Molnar, M. I. Molnar, Coord: Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 Heredity of color patterns in the red tuxedo variety of guppy (*Poecilia reticulata* Peters 1859). Agricultura Număr special 2007:104. AcademicPres, Cluj-Napoca.

Florin Molnar, Radu Hărşan, Coord: Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 Phenotypical characterization of guppy varieties from Romania. Agricultura Numar special 2007:103. AcademicPres, Cluj-Napoca.

Ioan Valentin Petrescu-Mag, Anca Mihaela Boaru, Radu Hărşan, Ruxandra Malina Petrescu-Mag 2008 Genetic basis of resistance to stress in fishes. Molecular and classical investigations in a few model organisms. AACL Bioflux 1:99-110. Editura Bioflux, Cluj-Napoca, pISSN 1844-8143, eISSN 1844-9166.

Ioan Valentin Petrescu-Mag, Godfrey Roderick Bourne 2008 Crossing-over between Y chromosomes: another possible source of phenotypic variability in the guppy, *Poecilia reticulata* Peters. AACL Bioflux 1:1-10. Editura Bioflux, Cluj-Napoca, pISSN 1844-8143, eISSN 1844-9166.

Ioan Valentin Petrescu-Mag, Laurenţiu Radu Lozinsky 2008 Peştii de laborator şi poluarea apei. Linkajul sexual şi expresia genelor de culoare – elemente importante pentru detecţia disruptorilor endocrini. Environment & Progress, in press, ISSN 1584-6733.

Cărţi ştiinţifice publicate:

Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 Manipularea sexelor în guppycultură. AcademicPres, Cluj-Napoca, ISBN-978-973-744-094-5.

Ioan Valentin Petrescu-Mag (Ed.) 2007 Ecologie aplicată. AcademicPres, Cluj-Napoca, ISBN-978-973-744-0969.

Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 Cercetări privind posibilităţile de dirijare a reproducţiei în vederea modificării raportului dintre sexe la varietăţile speciei *Lebistes reticulata (Poecilia reticulata).* AcademicPres, Cluj-Napoca, ISBN 978-973-744-095-2.

Consorţiul CEEX 140-2006 2007 Investigaţii genetice privind termorezistenţa la peştii guppy. Editura Bioflux, Cluj-Napoca, pISBN 978-973-88929-1-0, eISBN 978-973-88929-0-3.

Simpozioane şi sesiuni de comunicări ştiinţifice:

Simpozionul naţional cu participare internaţională „Contribuţii ştiinţifice în tehnologii şi echipamente pentru evaluarea mediului (Ediţia a IV-a, Arcalia)". Autori: Ioan Valentin Petrescu-Mag, Laurenţiu Radu Lozinsky 2008 Peştii de laborator si poluarea apei. Linkajul sexual şi expresia genelor de culoare – elemente importante pentru detecţia disruptorilor endocrini.

Sesiunea de comunicări ştiinţifice studenţeşti a Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Autori: Florin Molnar, F. P. Şerban, Coord: Ioan Bud, Ioan Valentin Mag 2006 Linkage-ul genelor Nigrocaudatus cu cromosomul X la guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1859).

Sesiunea de comunicări ştiinţifice studenţeşti a Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Autori: Florin Molnar, Iulian Roman, Coord: Ioan Bud, Ioan Valentin Mag 2006 Efectul tratării pe termen lung cu estradiol valerat asupra femelelor adulte de guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1859).

Sesiunea de comunicari ştiinţifice studenteşti a Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Autori: Florin Molnar, M. I. Molnar, Coord: Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 Heredity of color patterns in the red tuxedo variety of guppy (*Poecilia reticulata* Peters 1859).

Sesiunea de comunicări ştiinţifice studenţeşti a Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Autori: Florin Molnar, Radu Hărşan, Coord: Ioan Valentin Petrescu-Mag 2007 Phenotypical characterization of guppy varieties from Romania.

Simpozionul Realizări în cercetarea ştiinţifică din biotehnologie obţinute prin Programul CEEX -Modulul 1, Biotech. Autori: Ioan Valentin Petrescu-Mag, Ioan Bud, Benone Păsărin, Marian Bura, Lucian Dragoş Gorgan, Ruxandra Mălina Petrescu-Mag, Viorica Coşier, Miklos Botha 2007 Rezistenţa la temperaturi scăzute ale apei la guppy (*Poecilia reticulata* Peters 1859).

Simpozionul Perspective în biotehnologia românească susţinute prin rezultatele obţinute în cadrul Programului CEEX-Modulul 1, Biotech. Autori: Ioan Valentin Petrescu-Mag, Ioan Bud, Cristian Sisea, Paul Raica 2007 Realizări de ultimă ora în ameliorarea peştilor guppy (*Poecilia reticulata* Peters 1859).

Saloane ale cercetării/ Saloane de inventică:

Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Salonul Cercetării 2007 Organizat de Autoritatea Naţională pentru Cercetare Ştiinţifică. Autori: Petrescu-Mag Ioan Valentin 2007, cu: Rezultate ale proiectului CEEX 140/2006

Universitatea de Ştiinte Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, Salonul Internaţional de Inventică Pro Invent, Ediţia A VI-a 2008, Cluj-Napoca. USAMV Cluj-Napoca Grup de invenţii - Premiat cu Diploma de Excelenţă şi Medalia de Bronz.

Cereri Brevet Invenţie:

Ioan Valentin Petrescu-Mag, Ioan Bud, Ruxandra Mălina Petrescu-Mag, Cristian Sisea, Marian Bura, Adrian Grozea, Miklos Botha, Viorica Coşier 2007 Procedeu de obţinere a unei

linii criorezistente de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*) cu aplicabilitate în guppycultură. OSIM A/00774 din 09.11.2007.

Ioan Valentin Petrescu-Mag, Ioan Bud, Ruxandra Mălina Petrescu-Mag, Doru C. Pamfil, Lucian Dragoş Gorgan, Benone Păsărin, Reka G. Ştefan 2007 Procedeu biotehnologic de creştere a dimensiunilor corporale la masculii speciei de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*). OSIM A/00775 din 09.11.2007

Ioan Valentin Petrescu-Mag, Ioan Bud, Doru C. Pamfil, Ruxandra Mălina Petrescu-Mag, Adrian Grozea, Marian Bura, Lucian Dragoş Gorgan, Benone Păsărin, Ioan Bănăţean-Dunea, Laurenţiu Radu Lozinsky, Radu Hărşan, Laszlo Csep, Cristian Sisea, Viorica Coşier, Miklos Botha, Dacinia Crina Petrescu 2008 Procedeu de obţinere a unei linii de peşti ornamentali guppy, rezistentă la hipertermie. OSIM A/00814 din 14/10/2008.

9. Produse şi tehnologii create prin prezentul proiect

- Marker RAPD asociat prezenţei genei criorezistenţei la guppy în cazul varietăţii Red Blond.
- Procedeu biotehnologic de creştere a dimensiunilor corporale la masculii speciei de peşti ornamentali guppy (conform cererii brevet OSIM A/00775 din 09.11.2007).
- Procedeu de obţinere a unei linii termorezistente de peşti ornamentali guppy (conform OSIM A/00774 din 09.11.2007 şi OSIM A/00814 din 14/10/2008).
- Procedeu bazat pe sex-linkaj pentru identificarea genotipurilor la guppy (util în ecotoxicologie, la ameliorarea varietăţilor pentru acvariu şi pentru producerea de linii de laborator).

10. Dezvoltarea resursei umane

Au participat activ în proiect mai mulţi studenţi, masteranzi şi doctoranzi, care, de-a lungul derulării proiectului, au participat la simpozioane, sesiuni de comunicări ştiinţifice, au publicat articole sau cereri de brevet invenţie, şi-au finalizat lucrările de licenţă, masterat sau

doctorat, ei contribuind semnificativ la atingerea obiectivelor şi devenind autori la prezenta carte ştiinţifică. O astfel de implicare constituie debutul unei cariere în cercetarea ştiinţifică.

11. Mulțumiri

Prezentul proiect de cercetare (CEEX 140/2006) a fost finanțat de către ANCS (Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică) și monitorizat de către CNMP (Centrul Național de Management Programme - Biotech). Mulțumesc domnilor rectori ai universitatilor partenere, pentru cooperarea fructuoasă și pentru promptitudinea de care au dat dovadă în demersurile manageriale ale proiectului CEEX 140/2006. Nu în ultimul rând, doresc sa mulțumesc domnișoarei biolog Dr. Beatrice Kelemen de la Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca pentru suportul științific oferit colectivului nostru.

CERERE DE BREVET DE INVENŢIE

OSIM

Nr. Referinţă solicitant/mandatar	Registratura OSIM (numărul şi data primirii): A/00814 14-10-2008

Se completează de către OSIM	
Numărul cererii de brevet de invenţie	
Data primirii la Registratura Generală a OSIM	
Data de depozit	
Data primirii părţii lipsă la Registratura Generală a OSIM	
Data de depozit după primirea părţii lipsă la Registratura Generală a OSIM	
Data primirii cererii de retragere a partii lipsă la Registratura Generală a OSIM	
Data de depozit atribuită cererii de brevet	

1. Solicitanţi (nume şi prenume /denumire, adresă/sediu, telefon, fax , e-mail)

Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj-Napoca, Calea Manastur nr 3-5, 400372, Cluj-Napoca, Judetul Cluj, Romania, telefon 0264596384, fax 0264593792, cod fiscal 4288381 (denumirea abreviata : USAMV Cluj), e-mail institutie : rector@usamvcluj.ro

e-mail contact pentru corespondenta : zoobiomag2004@yahoo.com

2. Solicităm în baza Legii nr. 64/1991 privind brevetele de invenţie, republicată acordarea unui brevet de invenţie pentru invenţia cu titlul: **Procedeu de obtinere a unei linii de pesti ornamentali guppy, rezistenta la hipertermie.**

2.1. Referinţa la o cerere anterioară (număr, data de depozit, tara/oficiul): A/00774 din 09.11.2007 OSIM

☐ 2.2. Circumstanţele creării invenţiei conform declaraţiei anexate **Proiect CEEX140/2006**

3. Declarăm că inventatorii sunt:

☐ **3.1 aceiaşi cu solicitanţii** (nume, prenume şi loc de muncă la data creării invenţiei)

X **3.2 Persoanele din "Declaraţia privind desemnarea inventatorilor" care se anexează**

4. Declarăm că invenţia conţine informaţii care au fost clasificate de către (denumirea, data şi nivelul clasificării):

5. Rezumatul invenţiei se publică împreună cu figura numărul: 1

6. Revendicăm prioritatea convenţională (stat, număr, data depozit):

7. Revendicăm prioritatea internă (număr cerere de brevet, data depozit):

1/4

FORM. B 01 - citiţi Ghidul de completare

Declarație

conținând desemnarea inventatorilor invenției cu titlul:

Procedeu de obtinere a unei linii de pesti ornamentali guppy, rezistenta la hipertermie

conform rubricii 3.2.

Această declaratie este facută în conformitate cu prevederile art. 14 alin. 2 şi Art. 26** şi trebuie depusă la OSIM în termen de 18 luni de la data solicitarii examinarii în fond a cererii de brevet de invenție*

Nume şi prenume: Petrescu-Mag Ioan Valentin

Adresa: Str. Ceahlau, nr 54, cod postal 400488, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj; SC Bioflux SRL.

Nume şi prenume: Bud Ioan

Adresa: Str. Mogosoaia, nr 7, sc 5, ap 45, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume şi prenume: Pamfil Doru C.

Adresa: Str. Bisericii Ortodoxe, nr 12, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume şi prenume: Petrescu-Mag Ruxandra Malina

Adresa: Str. Ceahlau, nr 54, cod postal 400488, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj; UBB Cluj; SC Bioflux SRL

Nume şi prenume: Grozea Adrian

Adresa: Aleea Baghetei, nr 7, bloc A8, Sc B, Ap 3, Timisoara, Jud Timis, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMVB Timisoara

Nume şi prenume: Bura Marian

Adresa: Str Circumvalatiunii, nr 28, Ap 18, Timisoara, Jud Timis, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMVB Timisoara

Nume şi prenume: Gorgan Dragos Lucian

Adresa: Str Ana Ipatescu, nr 6, Bl A14, sc D, Ap 78, Piatra-Neamt, Jud Neamt, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: Univ. Alexandru Ioan Cuza - Iasi

Nume şi prenume: Pasarin Benone

Adresa: Aleea Mihail Sadoveanu, nr 8, Iasi, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Iasi

Alti inventatori sunt înscrisi în pagina următoare

☒

Semnătura solicitantului sau a mandatarului autorizat *(numele şi prenumele precum şi calitatea persoanei cu capacitate de reprezentare a solicitantului sau a mandatarului autorizat):*

_____

_____

_____

*Semnătura:*_____ *Data:*_____

L.S. _____

* Legea nr. 64/1991 privind brevetele de invenție republicată

* * Hotărîrea de Guvern nr. 547 din 21 mai 2008 pentru aprobarea Regulamentului de aplicare a Legii nr. 64/1991 privind brevetele de invenție.

Declarație

conținând desemnarea inventatorilor invenției cu titlul:

Procedeu de obtinere a unei linii de pesti ornamentali guppy, rezistenta la hipertermie

conform rubricii 3.2.

Această declaratie este facută în conformitate cu prevederile art. 14 alin. 2 și Art. 26** și trebuie depusă la OSIM în termen de 18 luni de la data solicitarii examinarii în fond a cererii de brevet de invenție*

Nume și prenume: Banatean-Dunea Ioan

Adresa: Localitatea Jdioara, nr 244, cod postal 307133, Jud Timis, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMVB Timisoara

Nume și prenume: Lozinsky Laurentiu Radu

Adresa: Str. Poet Gr. Alexandrescu, nr 45, Bl F2, Ap 8, 400529, Cluj-Napoca, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: SC Bioflux SRL, student USAMV Cluj

Nume și prenume: Harsan Radu

Adresa: Str. Parang, nr 5, Ap 9, cod postal 400552, Cluj-Napoca, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume și prenume: Csep Laszlo

Adresa: Str. Iugoslaviei, nr 66, Bl B1, Sc 4, et 3, Ap 43, 400423, Cluj-Napoca, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume și prenume: Sisea Cristian

Adresa: Str. Luptei, nr 29, Sibiu, Jud Sibiu, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume și prenume: Cosier Viorica

Adresa: Str. Iezer, nr 4, Bl L3, Ap 21, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume și prenume: Botha Miklos

Adresa: Str. Mehedinti, nr 47-49, Ap 14, Sc 1, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: USAMV Cluj

Nume și prenume: Petrescu Dacinia Crina

Adresa: Str. Ceahlau, nr 56, cod postal 400488, Cluj-Napoca, Jud Cluj, Romania, EU.

Locul de muncă la data creării invenției: UBB Cluj

Alti inventatori sunt înscrisi în pagina următoare

☐

Semnătura solicitantului sau a mandatarului autorizat *(numele și prenumele precum și calitatea persoanei cu capacitate de reprezentare a solicitantului sau a mandatarului autorizat):*

_____

_____

_____

*Semnătura:*_____ *Data:*_____

L.S. _____

* Legea nr. 64/1991 privind brevetele de invenție republicată

** Hotărîrea de Guvern nr. 547 din 21 mai 2008 pentru aprobarea Regulamentului de aplicare a Legii nr. 64/1991 privind brevetele de invenție.

Rezumat

Cererea de brevet invenţie se referă la un procedeu biotehnologic de obţinere a unei (unor) linii de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*) termorezistenţi, adică criorezistenţi şi totodată rezistenţi la hipertermie, această din urmă calitate manifestându-se prin toleranţa la temperaturi de 38ºC pentru o durată de câteva ore, la temperaturi uşor peste 30ºC pentru o durată de câteva zile şi prin dezvoltarea normală a indivizilor la temperaturi de 30ºC. Peştii termorezistenţi astfel creeaţi, aflaţi în stare de sănătate corespunzătoare, suportă şocuri termice pozitive de până la 8ºC peste valorile optime de viaţă, fără a înregistra mortalităţi semnificative. De asemenea, ei pot fi crescuţi în condiţii mai vitrege de temperatură, la valori suboptimale şi supraoptimale, peştii putând fi vindecaţi de unele boli, provocate de unii agenţi patogeni, prin expunere la hipertermie şi care tolerează mai bine stresul termic şi oscilaţiile de temperatură din timpul transportului pe durată lungă.

Procedeu de obţinere a unei linii de peşti ornamentali guppy, rezistentă la hipertermie

Invenţia se referă la un procedeu de ameliorare genetică a peştelui guppy (*Poecilia reticulata*), bazat pe linkaj sexual, tratamente hormonale, încrucişare şi retroîncrucişare. Peştele guppy, sau „peştele milionar", este o specie de interes economic, comercial şi ştiinţific. Procedeul prezentat aici, poate fi folosit cu succes pentru obţinerea unei linii de guppy rezistente la temperaturi ridicate ale apei (dar şi la cele scăzute, sau şoc termic) în doar două generaţii, el fiind util acvariştilor profesionişti pentru crearea unor loturi curabile prin hipermermie în caz de îmbolnăvire cu unii agenţi patogeni, dar totodată mult mai tolerante la variaţii bruşte şi în limite largi ale temperaturii.

Poecilia reticulata are un determinism al sexelor de tip *Drosophila* (Winge 1922a, 1922b) cu masculul heterogametic (♂XY) şi femela homogametică (♀XX). Acelaşi autor a arătat că, uneori, apar în populaţie pseudomasculi (♂XX) sau pseudofemele (♀XY). Majoritatea genelor de culoare observate la guppy sunt localizate pe heterosomi, asfel încât cele mai multe tipare coloristice sunt sex-linkate (Lindholm & Breden 2002). Totuşi, Winge (1922b) a constatat multe cazuri de recombinare genetică prin crossing-over între cei doi cromosomi ai sexului. Mai mult, frecvenţa recombinării de pe X pe Y diferă semnificativ de cele mai multe ori faţă de cea reciprocă, de pe Y pe X (Winge 1922b; Lindholm & Breden 2002).

În anul 1947, Nybelin relata pentru prima dată despre gena *Nigrocaudatus* I ca fiind o genă mutantă, X-linkată, dominantă, care determină un melanism intens în jumătatea posterioară a corpului. Această descriere a rămas valabilă până în zilele noastre în ciuda unor păreri conform cărora gena ar trebui să existe şi în formă Y-linkată (Lindholm & Breden 2002). O altă formă a genei menţionate, numită *Nigrocaudatus* II, mult mai frecventă azi decât prima, a fost descrisă pentru prima dată de către Dzwillo, în 1959. Ea era descrisă tot ca o genă dominantă şi X-linkată. Mai târziu, Nayudu (în 1979) a concluzionat că gena *Nigrocaudatus* II poate exista şi în formă Y-linkată, dar că ea este semiletală, determinând o mortalitate ridicată şi o rată de creştere foarte redusă. Cu toate acestea, din datele autorilor menţionaţi rezultă o frecvenţă de recombinare de pe Y pe X de 4,00%, iar de pe X pe Y de 0,00%, ceea ce denotă faptul că gena poate fi folosită pentru markarea cromosomului X – lucru confirmat de cercetările noastre ulterioare (Petrescu-Mag et al 2007). Pe lângă gena şi respectiv caracterul X-linkat al lui Nybelin, s-au mai relatat ulterior încă două caractere exclusiv X-linkate la guppy şi anume: *Lineatus* (Winge 1927) şi o genă a rezistenţei la temperaturi scăzute ale apei (Fujio et al 1990). În 2006, Karayücel et al emit ipoteza că

aceeaşi genă ar putea fi implicată şi în rezistenţa la hipertermie. Acesta a fost punctul de plecare a proiectului nostru de cercetare CEEX 140/2006, iar în 2007 a fost produsă prima linie homozigotă (pură din punct de vedere genetic) la locusul genei pentru rezistenţa la temperaturi scăzute (Petrescu-Mag et al 2007; a se vedea descrierea şi revendicările Cererii de Brevet OSIM A/00774 din 09.11.2007).

Conform descrierii din Petrescu-Mag et al (2007), o astfel de linie poate fi creată pornind de la multe varietăţi de guppy cu condiţia să se folosească în programul de încrucişări genotipurile specificate la locusul *Ni*. Prin deducţie, numărul de variante coloristice de linii criorezistente care ar putea rezulta este unul foarte mare. De aceea autorii invenţiei au revendicat produsul (Petrescu-Mag et al 2007) şi nu procedeul (produsul nostru nu este nici un soi de plantă, nici o rasa de animale). Un lucru nu se ştia atunci cu certitudine şi nici nu a fost revendicat în acea Cerere de Brevet: dacă este aceeaşi genă implicată în rezistenţa la hipertermie şi implicit, dacă o linie criorezistentă astfel creată este mai tolerantă la temperaturi ridicate decât majoritatea peştilor guppy. Acest aspect acum îl cunoaştem, iar prezenta Cerere de Brevet vine spre a completa vechea cerere, revendicând consecinţele identităţii comune a genei criorezistenţei cu cea care conferă rezistenţa la hipertermie. În continuare vom prezenta acelaşi procedeu descris în cererea noastră anterioară, la care vom adăuga metoda prin care s-a constatat la linia criorezistentă noua calitate de linie rezistentă la hipertermie şi respectiv la şoc termic.

În acvaristică, o problemă deosebit de importantă o constituie relaţia dintre cheltuielile de întreţinere şi randamentul la vânzare, deoarece de aceste două aspecte depinde profitul unei ferme piscicole. Creşterea speciei *Poecilia reticulata* în condiţii optime se face la temperaturi cuprinse între 22 şi 26ºC (72-78ºF). Procedeul descris aici de noi (acum, dar mai întâi în Petrescu-Mag et al 2007) face posibilă creşterea loturilor la 17-19ºC ca şi la 22-24ºC fără ca mortalitatea şi rata de creştere dintre acestea să difere semnificativ. În acest fel, se poate economisi energie prin reducerea costurilor (curent electric sau gaz) în crescătorii.

În cadrul proiectului CEEX 140/2006 (finanţat de ANCS, monitorizat de CNMP-Biotech) am desfăşurat activităţi planificate în vederea obţinerii unei linii criorezistente de guppy homozigote la locusul genei pentru rezistenţă la temperaturi scăzute ale apei. A fost nevoie, pentru aceasta, ca indivizii folosiţi să aibă genotipuri ♀XX sau ♂XY cunoscute în prealabil, să aparţină la două linii diferite coloristic: una dintre ele cu un colorit corporal de tip Half-Black (jumătatea posterioară a corpului neagră) iar cealaltă de tip hipomelanic. Desigur, loturile iniţiale trebuie să nu fie exagerat de consangvine pentru a se avea certitudinea că gena criorezistenţei există în genofondul populaţei măcar cu o frecvenţă redusă. Astfel, s-a ales ca

sursă de părinţi masculi varietatea Red Blond (varietate hipomelanică ce prezintă un colorit roşu, relativ uniform, pe corp şi pe înotătoare; melanina este aproape absentă de pe suprafaţa corpului şi este vizibilă doar la ochi şi rareori la înotătoarea caudală), iar ca sursă de părinţi femeli am folosit varietatea Half-Black Black (o varietate hipermelanică, aproape complet neagră atât datorită genei *Nigrocaudatus* II, cât şi datorită unor poligene şi/sau a genei Bcp – Black caudal peduncle).

Pentru a se avea siguranţa că pseudofemelele nu vor apărea în lotul genitorilor Half-Black Black şi că pseudomasculii nu vor apărea în lotul genitorilor Red Blond s-a efectuat o deviere intenţionată cu aproximativ 3% de la procentajele normale ale celor două sexe prin tratamente hormonale uşoare. A urmat apoi identificarea genitorilor criorezistenţi prin studiul fenotipului lor. Lotul de masculi Red Blond s-a supus scăderii treptate a temperaturii apei (2-4ºC/zi). Aceasta a continuat până când indivizii criosensibili au manifestat semne de „oboseală", moment în care ei au fost mutaţi într-un alt bazin în care valoarea temperaturii s-a crescut treptat până la cea de comfort termic specific. Ultimii 10% din indivizii luaţi în studiu au fost consideraţi criorezistenţi si au fost readuşi treptat la temperatura de confort. Deşi nu este necesară, operaţiunea de identificare s-a aplicat şi femelelor Half-Black Black pentru o şi mai mare precizie a tehnicii de lucru.

Masculii identificaţi ca fiind criorezistenţi, Red Blond $X_{ni}Y_0$, au fost încrucişaţi cu femelele Half-Black $X_{Ni}X_{Ni}$. În urma acestei încrucişări, conform legilor mendeliene, au rezultat din punct de vedere coloristic indivizi cu un singur fenotip: Half-Black (figura 1) - aproximativ jumătate fiind masculi (criorezistenţi sau criosensibili) şi cealaltă jumătate fiind femele cu cel puţin o copie a alelei criorezistenţei.

Încrucişările au pornit cu indivizii criorezistenţi anterior identificaţi. Deşi lotul iniţial de reproducători a fost mai mare, din aceste loturi de indivizi am ales indivizii aflaţi în cele mai bune condiţii de sănătate şi aspect comercial, mai precis: un număr de 21 masculi Red Blond şi 43 femele Half-Black Black. Întreţinerea loturilor în bune condiţii s-a făcut prin hrănirea de trei ori pe zi *ad libitum* cu hrană vie (*Artemia spp*, *Tubifex spp*) şi furaj de bună calitate - Tetra Rubin şi Tetra Discus. Iluminarea s-a făcut după modelul ciclului noapte-zi, aproximativ jumătate din 24 ore bazinele fiind iluminate cu lămpi din gama comercială Glo. Bazinele de întreţinere au fost plantate cu *Cryptocorine spp* iar calitatea apei a fost monitorizată prin verificarea parametrilor la fiecare 3-4 zile şi schimbarea periodică a apei. Apa folosită a fost cea de la reţeaua de apă potabilă a Municipiului Cluj-Napoca. De cele mai multe ori apa a fost păstrată în tancuri de maturare pentru evitatea intoxicării peştilor cu oxigen activ, clor sau alţi dezinfectanţi utilizaţi.

Încrucişarea s-a făcut simultan şi panmictic pe cale naturală, prin păstrarea în acelaşi bazin de creştere a tuturor indivizilor Red Blond masculi şi Haf-Black Black femeli din cele două loturi de reproducători. După 28-30 zile de la împreunarea lor au apărut relativ sincron primele serii de pui hibrizi, primul val însumând un număr de 546 indivizi care prezentau de la naştere binecunoscutul caracter denumit de diferiţi autori ca *Nigrocaudatus* II, Half-Black sau tuxedo. Acest caracter este foarte probabil singurul care îşi face apariţia încă de la faza de puiet, restul caracterelor de culoare apărând mult mai târziu în ontogenia peştilor guppy.

Puietul din generaţia F_1 a fost crescut în aceleaşi condiţii de viaţă care au fost descrise mai sus pentru generaţia parentală, cu mici deosebiri legate de dimensiunea particulelor de hrană (tubifexul a fost tocat şi spălat, furajul a fost măcinat mai mărunt, etc). Dimensiunea bazinelor de creştere (200 litri) au conferit peştilor spaţiu la discreţie şi un volum mare de apă/individ. Dezvoltarea lor a fost rapidă, atingând maturitatea la aproximativ 60 zile de la naştere/eclozare. Indivizii au fost sexaţi timpuriu, imediat ce caracterele sexuale secundare şi-au făcut apariţia. Masculii au fost scoşi unul câte unul în fiecare zi pentru evitarea fecundării femelelor de către alţi masculi decât cei prevăzuţi de programul de ameliorare. Fecundarea întâmplătoare a femelelor ar fi dus la imposibilitatea utilizării lor în etapa următoare.

Următorul pas a fost retroîncrucişarea femelelor criorezistente cu masculii Red Blond şi eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenţei. Această etapă a avut ca scop homozigotarea alelei criorezistenţei la indivizii femeli $X_{ni}X_{ni}$ ai generaţiei F_B şi obţinerea unui lot nou de masculi criorezistenţi hemizigoţi $X_{ni}Y_0$ (figura1).

Din generaţia F1 s-a ales un număr de 40 femele virgine pentru încrucişarea cu forma parentală de masculi Red Blond (20 indivizi). Întreţinerea şi împerecherea s-a desfăşurat conform celor descrise la încrucişarea iniţială. În urma retroîncrucişării (backcross) au rezultat în primul val un număr de 632 indivizi, prezentând două fenotipuri coloristice diferite, dar patru fenotipuri diferite dacă ţinem cont şi de sexul indivizilor, respectiv de dimorfismul sexual al acestora. Repartiţia indivizilor pe fenotipuri au indicat o segregare conform legilor mendeliene şi a confirmat valabilitatea proiectului de procedeu propus în cadrul acestui program de ameliorare. Asfel, 150 indivizi masculi au prezentat un colorit al corpului de tip tuxedo, 158 indivizi masculi au prezentat un colorit al corpului de tip sălbatic, 157 indivizi femeli au prezentat un colorit corporal de tip tuxedo, iar 167 indivizi femeli au manifestat un colorit şters de tip sălbatic. Modul de segregare a fost verificat prin testul χ^2 (tabelul 1). Pentru χ^2=0,924, la 4-1=3 grade libertate, valoarea P arata că diferenţele dintre frecvenţele calculate şi cele observate sunt nesemnificative (0,90>P>0,80), deci modul ipotetic de segregare 1:1:1:1 este real.

Tabelul 1

Utilizarea testului χ^2 pentru verificarea ipotezei modului de transmitere ereditară a tiparului coloristic Half-Black

Fenotipuri	Observate experimental (o)	Calculate/ aşteptate (e)	Deviaţia (d =o-e)	d^2	d^2/e
Masculi tuxedo	150	158	-8	64	0,405
Masculi cu colorit sălbatic	158	158	0	0	0
Femele tuxedo	157	158	-1	1	0,006
Femele cu colorit sălbatic	167	158	9	81	0,513
Pentru χ^2=0,924, la 3 grade libertate, valoarea P arata că diferenţele sunt nesemnificative (0,90>P>0,80)					

Deci monitorizarea genei criorezistenţei, mai precis a modului în care ea este transmisă descendenţilor, este facilitată de prezenţa genei *Nigrocaudatus* II (*Ni*), genă X-linkată care va servi drept genă de culoare marker. Procedeul elaborat prevede un număr de patru etape, descrise în cele ce urmează.

Etapa I - Alegerea genitorilor de tip Half-Black ♀XX şi Red Blond ♂XY. Pentru a se avea certitudinea că femelele false nu vor apărea în lotul genitorilor Half-Black şi că masculii falşi nu vor apărea în lotul genitorilor Red Blond se va efectua o deviere intenţionată cu aproximativ 3% de la procentajele normale ale celor două sexe prin tratamente hormonale uşoare. Astfel, puietul de o zi din varietatea Half-Black va fi tratat oral în primele trei zile de viaţă cu 17α-metiltestosteron (Sigma), de trei ori pe zi *ad libitum* după care se creşte în condiţii standard pînă la vârsta adultă. La fel se procedează cu puietul de o zi al varietăţii Red Blond, cu deosebirea că tratamentul hormonal se face cu valerat de estradiol - Cyclo-Progynova® (Schering AG, Germania; doar drajeurile albe). Doza/concentraţia aplicată în cazul ambilor hormoni este de 100 mg valerat de estradiol/kg furaj (adică 100 mg kg^{-1}).

Reţeta de preparare şi administrare a furajului tratat cu hormon este redată în paragraful următor.

Se pun 2 ml alcool etilic 96% într-un mojar de sticlă la care se adaugă cantitatea corespunzătoare cântărită de hormon pur. În cazul în care hormonul folosit se află sub formă de tablete sau drajeuri, acestea se mojarează cu atenţie ca bucăţile să nu sară din mojar în timpul zdrobirii lor. Se mojarează repede, pentru evitarea evaporării alcoolului, până la obţinerea unui lichid omogen lăptos, la care se adaugă încă 2 ml alcool 96%, cu care se spală pereţii mojarului. Se adaugă 20 g furaj de bună calitate, mărunt granulat, (diametrul granulelor trebuie sa fie mai mic sau egal cu 1 mm) în mojar şi se omogenizează cu pistilul. Se goleşte conţinutul din mojar pe o hârtie de filtru dublă şi se lasă să se evapore alcoolul timp de 3 ore. Hrana astfel impregnată cu hormon se împachetează şi se păstrează la loc uscat, răcoros şi ferit de lumina solară. Pentru obţinerea unor cantităţi mai mari de furaj tratat cu hormon, se utilizează 100 ml etanol, cantitatea corespunzătoare de hormon şi 1 kg furaj de bună calitate (mărunt granulat) şi un mojar de sticlă de dimensiuni adecvate. Hrănirea se va face *ad libitum* de trei ori pe zi, fără administrarea altor tipuri de furaj, suplimente sau orice fel de hrană vie. Nu se amplasează în acvariile de creştere plante de consistenţă moale care pot servi peştilor ca hrană alternativă şi care pot diminua efectul tratamentului.

Astfel procedând, în loturile de interes nu vor exista „contaminări cromosomiale", puţinii indivizi labili sexual fiind împinşi spre sexul care nu va servi ca genitor pentru obţinerea generaţiei F_1. Ca urmare: toţi masculii Red Blond obţinuţi sunt de tip XY şi toate femelele Half-Black obţinute sunt de tip XX. Acestea din urmă trebuie ferite de masculi şi păstrate în stare virgină deoarece o singură inseminare poate face femela inutilizabilă pentru încrucişare datorită stocării spermatozoizilor în *receptaculum seminis*.

Etapa II – Identificarea genitorilor criorezistenţi prin studiul fenotipului lor. Lotul de masculi Red Blond se supune scăderii treptate a temperaturii apei (2-4ºC/zi). Aceasta se va continua până când indivizii criosensibili vor manifesta semne de „oboseală", moment în care ei vor fi mutaţi într-un alt bazin în care valoarea temperaturii se va creşte treptat până la cea de comfort. Ultimii 10% din cel puţin 40-50 indivizi luaţi în studiu, care obligatoriu trebuie să reziste câteva ore la 10-12ºC, pot fi consideraţi criorezistenţi şi vor fi readuşi treptat la temperatura de confort. Deşi nu este necesară, operaţiunea se poate aplica şi femelelor Half-Black Black pentru o şi mai mare precizie în munca de ameliorare.

Purtătorii genei de interes ar putea fi, în general, din punct de vedere genotipic, de trei feluri: homozigoţi, heterozigoţi şi hemizigoţi. Un lucru pe care îl ştim cert este acela că masculii criorezistenţi identificaţi nu pot fi decât hemizigoţi. Având în vedere linkajul acestei

gene exclusiv cu cromosomul X, singurul cromosom X al acestor masculi posedă gena criorezistenţei.

Etapa III – Încrucişarea masculilor criorezistenţi Red Blond identificaţi cu femele Half-Black. În această etapă, masculii criorezistenţi Red Blond $X_{ni}Y_0$ vor fi încrucişaţi cu femelele Half-Black $X_{Ni}X_{Ni}$. În urma acestei încrucişări vor rezulta din punct de vedere coloristic indivizi cu un singur fenotip: Half-Black (figura 1) - aproximativ jumătate fiind masculi (criorezistenţi sau criosensibili) şi cealaltă jumătate fiind femele cu cel puţin un exemplar al alelei criorezistenţei.

Etapa IV – Retroîncrucişarea femelelor criorezistente cu masculii Red Blond şi eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenţei. Această etapă are ca scop homozigotarea alelei criorezistenţei la indivizii femeli $X_{ni}X_{ni}$ ai generaţiei F_B şi obţinerea unui lot nou de masculi criorezistenţi hemizigoţi $X_{ni}Y_0$ în F_B (figura 1). Femelele utilizate în retroîncrucişare trebuie să fie în mod obligatoriu virgine. Indivizii femeli homozigoţi criorezistenţi şi masculii hemizigoţi criorezistenţi prin împerechere liberă produc un număr consistent de indivizi care constituie o linie pură de guppy criorezistent. Exploatarea liniei criorezistente în crescătorii aduce beneficii producătorilor de peşti guppy odată cu scăderea costurilor de încălzire a apei şi previne mortalitatea în masă cauzată de răcirea exagerată a apei în timpul transportului peştilor.

După obţinerea liniei criorezistente, conform activităţilor proiectului de cercetare CEEX 140/2006, s-a recurs la **testarea ei pentru rezistenţa la hipertermie**. Managementul cercetării a ţinut cont de reglementările actuale privitoare la deontologia cercetării ştiinţifice şi de normele de bioetică, chiar dacă peştii nu sunt vertebrate superioare conştiente de propria lor existenţă, aşa cum sunt unele mamifere. S-a evitat, pe cât s-a putut, supunerea peştilor la suferinţă exagerată ca intensitate sau prelungită ca durată. Hipertermia s-a aplicat unui număr minim posibil de indivizi, dar care să asigure statistic rezultatele ştiinţifice şi pe o durată de timp bine calculată, pentru a se evita chinurile prelugite sau decimarea efectivelor. Indivizii a căror stare de sănătate a fost afectată ireversibil au fost sacrificaţi prin decapitare, după ce în prealabil au fost anesteziaţi cu soluţie de tricaină 0,05%.

În vederea testării rezistenţei la hipertermie a liniei criorezistente de guppy create, s-au luat spre comparare două populaţii distincte, dar asemănătoare din punct de vedere coloristic, ca formă şi ca origini, ambele fiind rezultatul metisării dintre varietăţile de guppy Red Blond (75%) şi Half-Black Black (25%). Diferenţa principală dintre cele două populaţii a fost aceea că: cea din care s-au recoltat randomic loturile martor nu a fost ameliorată prin selecţie la locusul criorezistenţei. Lotul martor a fost recoltat randomic de la Acvariul USAMV dintre

indivizii cu colorit de tip sălbatic, rezultaţi în urma segregării mendeliene după două generaţii a metişilor descendenţi din Red Blond şi Half-Black Black.

Experimentul în sine a durat un număr de 19 zile şi s-a bazat atât pe creşterea treptată a temperaturii, cât şi pe tratamente aplicate sub formă de şoc termic. Numărul indivizilor pe fiecare lot testat a fost de 30 (15 masculi şi 15 femele), fiecare dintre aceştia fiind în prealabil acomodaţi la 28ºC. Între fiecare două etape de testare s-a păstrat un interval de două zile de pauză, la 28ºC, pentru a se putea utiliza acelaşi lot experimental în fiecare etapă de testare până la apariţia primelor pierderi de efectiv, când din fiecare lot (atât din cel experimental cât şi din cel martor) s-a eliminat un număr egal de indivizi şi s-a completat cu indivizi noi din acelaşi sex. Diferenţele de temperatură dintre valoarea de început a tratamentului termic (28 ºC) şi cea de final a tratamentului au fost reduse în primele faze experimentale (32-28=4ºC), iar acestea au crescut treptat (34-28=6ºC, 36-28=8ºC, 38-28=10ºC, 40-28=12ºC, 41-28=13ºC şi respectiv 42-28=14ºC în ultima fază de testare), pentru a se putea identifica valorile minime de diferenţă ale temperaturii care pot conferi răspunsul dorit la problema ridicată de activitatea propusă şi atingerea obiectivului. Acest program de testare s-a aplicat în două variante: prin creştere treptată şi prin şoc termic. În cazul testării prin şoc termic, s-a recurs la transvazare dintr-un bazin experimental în altul, ambele bazine cu apă fiind termostatate (±1ºC eroare). În cazul testării prin creştere controlată a temperaturii, s-a recurs la ridicarea valorii temperaturii de la 28ºC până la 32, 34, 36, 38, 40, 41 sau 42ºC într-un interval de 60-200 minute, peştii fiind păstraţi la valoarea finală aproximativ 10 minute. În această, a doua, variantă experimentală, pe lângă bazinele de tratament şi instalaţia de termostatare (±1ºC eroare), s-a utilizat un data logger Dickson HT 100 cu soft special, conectabil la computer, care a permis monitorizarea valorii temperaturii apei prin întregistrarea ei la fiecare 30 secunde şi întocmirea unui grafic de evoluţie a acesteia. Instrumentele şi echipamentele folosite în cadrul experimentelor au fost: 8 bazine de creştere (400 litri), 20 bacuri de tratament (50 litri) 30 încălzitoare termostatate (50-200 W), 10 termometre de minim şi maxim, 10 termometre de precizie, 1 termometru pentru analiza temperaturii apei, 2 termometre de cameră, 20 bacuri de sticlă - pentru transvazarea, acomodarea termică şi reanimarea indivizilor afectaţi, container biohazard, pH-metru şi multimetru pentru monitorizarea parametrilor fizico-chimci ai apei bazinelor, 20 filtre interioare pentru acvarii, 1 compresor pentru aerare şi un sistem de dehumidificare a aerului din laborator pentru protecţia aparaturii şi echipamentelor împotriva coroziunii, a stării de sănătate a personalului de cercetare şi a pereţilor laboratorului.

Rezultatele înregistrate în urma testării celor două populaţii, prin cele două căi de testare din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie: 1. supunere la creştere treptată a valorii temperaturii şi 2. supunere la şoc termic, au fost incluse într-un tabel în vederea analizei ulterioare din punct de vedere statistic (tabelele 2 şi 3).

Tabelul 2

Tabelul cu evidenţa testării liniei criorezistente de guppy la hipertermie prin creşterea treptată a valorii temperaturii

Ziua nr.	Nr. indivizi testaţi		Intervalul temperaturii de testare	Indivizi grav afectaţi comportamental şi fiziologic		Indivizi pierduţi	
	Criorezistenţi	Martor		Criorezistenţi	Martor	Criorezistenţi	Martor
1	30	30	28-32ºC	0	0	0	0
4	30	30	28-34ºC	0	0	0	0
7	30	30	28-36ºC	0	0	0	0
10	30	30	28-38ºC	0	2	0	0
13	30	30	28-40ºC	1	5	0	0
16	30	30	28-41ºC	1	6	0	1
19	30	30	28-42ºC	2	9	0	3

Tabelul 3

Tabelul cu evidenţa testării liniei criorezistente de guppy la hipertermie prin supunere la şoc termic

Ziua nr.	Nr. indivizi testaţi		Intervalul temperaturii de testare	Indivizi grav afectaţi comportamental şi fiziologic		Indivizi pierduţi	
	Criorezistenţi	Martor		Criorezistenţi	Martor	Criorezistenţi	Martor
2	30	30	28-32ºC	0	0	0	0
5	30	30	28-34ºC	0	1	0	0
8	30	30	28-36ºC	0	2	0	0
11	30	30	28-38ºC	1	5	0	1

Se pot observa, din rezultatele prezentate în tabelele 2 şi 3, faptul că loturile studiate s-au comportat diferit de cele martor în ambele situaţii experimentale (creştere treptată şi şoc

termic). Acolo unde valorile observate au fost diferite de 0 şi analiza statistică a fost posibilă, s-a aplicat testul χ^2 (a se vedea în tabelul 4) pentru compararea valorilor observate experimental (loturi criorezistente expuse la hipertermie) cu cele aşteptate (loturile martor expuse la hipertermie în aceleaşi condiţii). Cu ajutorul acestui model de calcul statistic s-a putut vedea faptul că loturile experimentale diferă statistic foarte semnificativ din punctul de vedere al rezistenţei la hipertermie faţă de loturile martor care sunt vizibil mai sensibile.

Tabelul 4

Tabel de calcul a valorilor χ^2 şi a semnificaţiei lui

Fenotipuri	Valori obsevate (f_0)	Valori aşteptate (f_a)	Deviaţia (d) sau (f_0-f_a)	d^2	d^2/f_a	χ^2	P şi semnificaţia
S40cl	3,3333	16,6667	-13,3334	177,7796	161,1129	Σ 255,5592	P>>0,001 ***
R40cl	96,6667	83,3333	13,3334	177,7796	94,4463		
S41cl	3,3333	20,0000	-16,6667	277,7789	13,8889	Σ 17,3611	P>>0,001 ***
R41cl	96,6667	80,0000	16,6667	277,7789	3,4722		
S42cl	06,6667	30,0000	-23,3333	544,4429	18,1481	Σ 25,9259	P>>0,001 ***
R42cl	93,3333	70,0000	23,3333	544,4429	7,7778		
S38cl	3,3333	16,6667	-13,3334	177,7796	161,1129	Σ 255,5592	P>>0,001 ***
R38cl	96,6667	83,3333	13,3334	177,7796	94,4463		

Explicaţiile aferente abrevierilor din tabel: S40cl – Sensibili la 40ºC prin creştere lentă a temperaturii; R40cl - Rezistenţi la 40ºC prin creştere lentă a temperaturii; S41cl – Sensibili la 41ºC prin creştere lentă a temperaturii; R41cl - Rezistenţi la 41ºC prin creştere lentă a temperaturii; S42cl – Sensibili la 42ºC prin creştere lentă a temperaturii; R42cl - Rezistenţi la 42ºC prin creştere lentă a temperaturii; S38cl – Sensibili la 38ºC prin şoc termic; R38cl - Rezistenţi la 38ºC prin şoc termic; *** - Diferenţă foarte semnificativă.

Toate aceste rezultate susţin ipoteza colectivului de cercetători din Turcia (Karayücel et al 2006), aceeaşi genă care conferă indivizilor criorezistenţa fiind implicată şi în adaptarea peştilor guppy la hipertermie şi, mai mult decât atât, această genă X-linkată îşi dezvăluie identitatea ca o genă care conferă rezistenţă la şoc termic, fiind deci responsabilă de codificarea unei HSP (proteină de şoc termic = *heat shock protein*) sau a unei catene polipeptidice din componenţa acesteia. Oricum, valorile obţinute arată clar că, pe lângă gena majoră în cauză, termorezistenţa pare să fie un caracter fenotipic determinat şi de alţi factori

genetici, fie ei cu implicaţii minore, lucru observat şi în activităţile anterioare, atunci când peştii au fost trataţi prin hipotermie.

Varietatea Red Blond din descrierea noastră, utilizată ca genitor (părinte) în procedeul de ameliorare poate fi, în lipsă, înlocuită cu orice varietate care nu prezintă caracterul Half-Black. Varietatea Half-Black Black nu este nici ea obligatorie spre utilizat în procedeu, dar este obligatoriu ca varietatea care o înlocuieşte să prezinte caracterul Half-Black, adică una din genele *Nigrocaudatus* (exemple de varietăţi: Half-Black Red, Half-Black Blue, Half-Black Yellow, Half-Black White). Procedeul elaborat de noi este redat schematic în figura 1, unde: P = părinţi, G = gameţi, F_1 = prima generaţie rezultată în urma încrucişării, F_B = generaţie rezultată în urma retroîncrucişării.

Linia rezistentă la hipertermie obţinută de noi (caz particular) folosind ca genitori varietăţile Red Blond şi Half-Black Black se caracterizează prin următoarele trăsături coloristice mascule: are corpul de tip sălbatic, colorat normal, incluzând cel mai frecvent nuanţe de roşu, albastru iridescent, galben, verde, negru şi uneori alb metalizat. Acesta aduce mult cu tiparele coloristice observate la guppy sălbatic. Înotătoarele caudală şi dorsală sunt puternic pigmentate şi au o culoare roşie-cărămizie. Corpul masculilor are o lungime standard (SL) medie de 2,6 cm, iar înotătoarele caudală şi dorsală au o lungime caracteristică varietăţilor ornamentale, prima reprezentând la maturitate 8/10 din lungimea standard a corpului. Femelele prezintă un colorit de tip sălbatic şi o dimensiune corporală (SL) la maturitate de 5,0 cm.

Cele mai importante trăsături ale liniei termorezistente (adică criorezistente + hipertermorezistente) sunt aspectele legate de toleranţa simultană la frig şi hipertermie. Referitor la toleranţa la frig: linia este homozigotă la locusul pentru criorezistenţă, se dezvoltă şi se înmulţeşte fără probleme la temperaturi de 17-19ºC, supravieţuieşte câteva ore la 10-12ºC şi câteva zile la 14-16ºC. Referitor la toleranţa la temperaturi ridicate: linia rezistă la peste 30ºC câteva zile, iar la 38ºC câteva ore. Peştii sănătoşi dintr-o astfel de linie suportă un şoc termic de 8ºC peste valorile optimale de creştere fără a înregistra mortalităţi.

Dacă formele parentale, crescute la 22-24ºC ating dimensiunea de vânzare (1,8-2,0 cm SL masculii şi 2,5-3,0 cm SL femelele) la vârsta de 61-62 zile, linia termorezistentă atinge aceeaşi dimensiune de vânzare la vârsta de 65-67 zile dacă este crescută la 17-19ºC şi la 58-60 zile dacă este crescută la 30ºC. Specificăm că efectul heterozis se observă la indivizii din F_B doar dacă îi comparăm cu formele parentale pure iniţiale şi nu dacă se compară cu femelele mame din generaţia F_1. Restul caracteristicilor nu diferă faţă de majoritatea varietăţilor

comune de peşti guppy, aşa cum nici cerinţele lor faţă de parametri optimi de creştere nu diferă.

Revendicări

1. Procedeu biotehnologic de obţinere a unei (unor) linii de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*) termorezistenţi, adică criorezistenţi şi totodată rezistenţi la hipertermie, această din urmă calitate manifestându-se prin toleranţa la temperaturi de 38ºC pentru o durată de câteva ore, la temperaturi uşor peste 30ºC pentru o durată de câteva zile şi prin dezvoltarea normală a indivizilor la temperaturi de 30ºC.
2. Procedeu biotehnologic de obţinere a unei (unor) linii de peşti guppy conform revendicării 1 care, aflată (aflate) în stare de sănătate corespunzătoare, suportă şocuri termice pozitive de până la 8ºC peste valorile optime de viaţă, fără a înregistra mortalităţi semnificative.
3. Procedeu biotehnologic de ameliorare a peştilor guppy şi de producere a unei (unor) linii de peşti conform revendicărilor 1 şi 2, care pot fi crescuţi în condiţii mai vitrege de temperatură decât cei obişnuiţi, la valori suboptimale şi supraoptimale, peştii fiind curabili de unele boli prin expunere la hipertermie şi tolerând mai bine stresul termic şi oscilaţiile de temperatură din timpul transportului pe lungă durată.

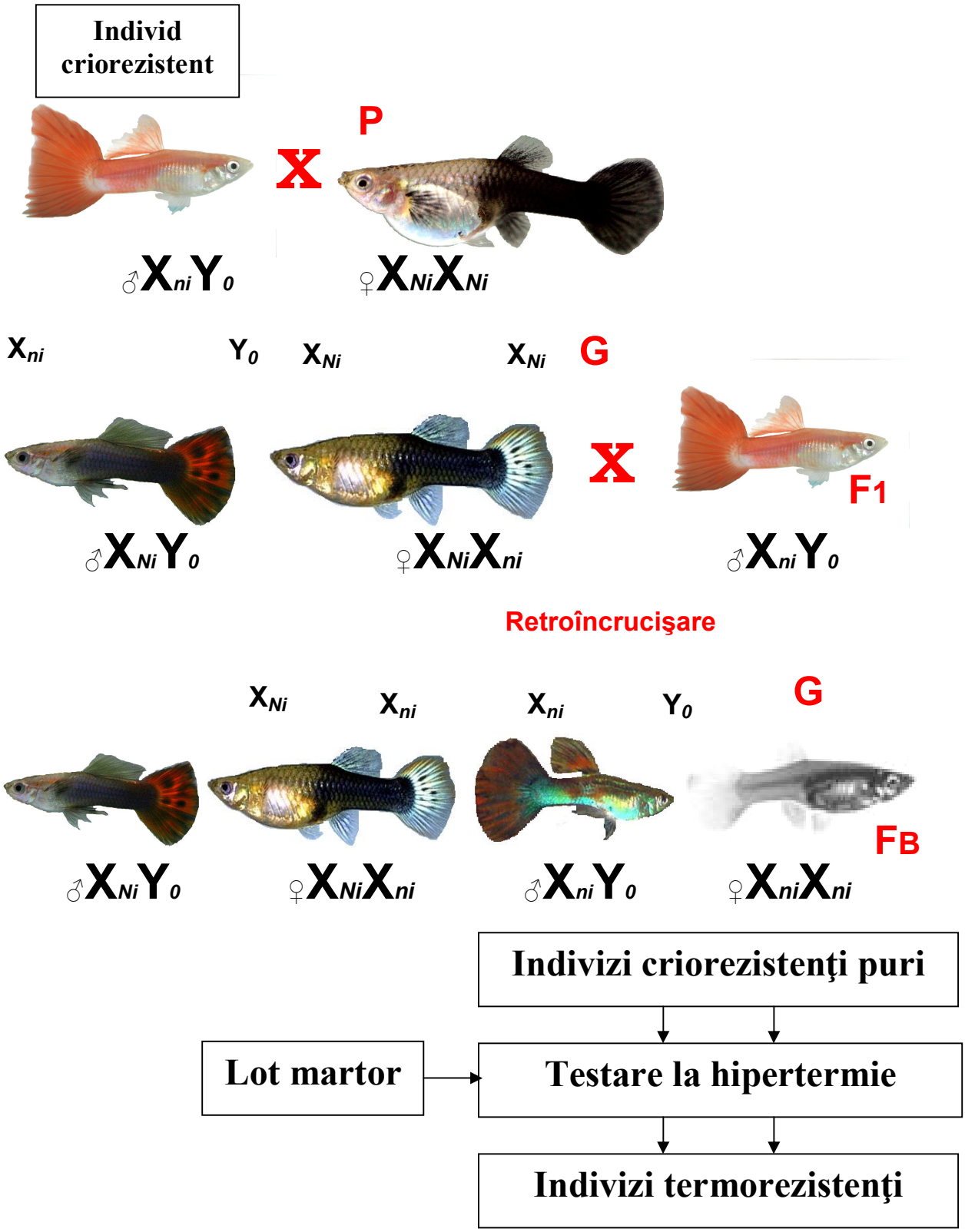


Figura 1. Schema obţinerii şi testării liniei termorezistente de peşti guppy.

Referinţe bibliografice

DZWILLO, M. 1959 Genetische Untersuchungen an domestizierten Stämmen von *Lebistes reticulatus* (*Peters*). Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut 57:143-186.

FUJIO, Y. et al 1990 Detection of a low temperature-resistant gene in the guppy (*Poecilia reticulata*), with reference to sex-linked inheritance. Japanese Journal of Genetics 65:201-207.

KARAYÜCEL, Ismihan et al 2006 Effect of temperature on sex-ratio. Aquaculture Research 37:139-150.

LINDHOLM, Anna & F. BREDEN 2002 Sex chromosomes and sexual selection in Poeciliid Fishes. Am. Nat 160:S214-S224.

NAYUDU, P. L. 1979 Genetic studies of melanic color patterns and atypical sex determination in the guppy, *Poecilia reticulata*. Copeia 1979:225-231.

NYBELIN, O. 1947 Ett fall av X-bunden nedärvning hos *Lebistes reticulatus* (Peters). Zoologiska Bidrag fran Uppsala 25:448-454.

PETRESCU-MAG, I. V. et al 2007 Procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*) cu aplicabilitate în guppycultură. Cerere Brevet Invenţie – OSIM A/00774 din 09.11.2007.

WINGE, Ö. 1922a A peculiar mode of inheritance and its cytological explanation. J. Genet. 12:137-144.

WINGE, Ö. 1922b Crossing over between the X- and the Y-chromosome in *Lebistes.* Comptes rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 14(20):1-20.

WINGE, Ö. 1927 The location of eighteen genes in *Lebistes reticulatus*. Journal of Genetics 18:1-43.

Anexa 2

PEŞTII DE LABORATOR ŞI POLUAREA APEI. LINKAJUL SEXUAL ŞI EXPRESIA GENELOR DE CULOARE – ELEMENTE IMPORTANTE PENTRU DETECŢIA DISRUPTORILOR ENDOCRINI

Ioan Valentin PETRESCU-MAG[1,2], Laurenţiu Radu LOZINSKY[1,2]

[1]*Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca*
[2]*SC Bioflux SRL*

Abstract: Laboratory fish and water pollution. The sex-linkage and color gene expression – important emements for endocrine disruptors detection. In the paper, authors debate and describe fish strains, possible crosses and color traits, whose manipulation can offer detection of the endocrine disruptors (ED) from waters. A breeding program based on sex-linkage is presented as an easier method for genotype identification in the experimental guppy lots.

Keywords: xenoestrogen, guppy, *Poecilia reticulata*, endocrine disruptors.

Introducere

Lucrarea prezintă linii de peşti, posibile încrucişări şi o serie de caractere de culoare, prin a căror manipulare se optimizează detecţia disruptorilor endocrini (ED) din apă. ED sunt poluanţi de natură chimică ce au potenţialul de a juca parţial rolul unor hormoni steroidici în organismul animal. Originea ED este multiplă dar, în toate cazurile, aceştia sunt rezultaţi ca urmare a activităţilor antropice. Dintre precursorii ED amintim: pesticidele, erbicidele, fungicidele, combinaţii ale acestora, gaze de eşapament şi alte emisii de gaze. Doi dintre ED cei mai cunoscuţi sunt dioxina şi vinclozolinul. Ei au un efect similar administrării de estrogeni, de aceea această categorie de substanţe poartă denumirea de xenoestrogeni (Toft & Guillette 2004).

Peştele guppy ca organism model

O specie foarte frecvent utilizată ca bioindicator sau biomonitor al calităţii apei este, după cum menţionam mai sus, peştele guppy (*Poecilia reticulata*) numit şi peştele milionar, originar din Trinidad, Barbados, Guyana, Venezuela şi nordul Braziliei (Bud 2002). Această specie, datorită dimorfismului său sexual pronunţat (Winge & Ditlevsen 1947; Lindholm & Breden 2002; Petrescu-Mag & Bourne 2008), poate fi utilizată în mod special, pentru detecţia unor ED din mediul acvatic (Baatrup & Junge 2002; Kristensen et al 2005). La guppy, masculul prezintă ornamentaţii şi un colorit viu, spre deosebire de individul femel care este foarte puţin colorat şi prezintă o altă formă a corpului. Reproducerea este bazată pe o fecundaţie internă a icrelor (Winge 1937), masculii prezentând un organ copulator cu ajutorul căruia depun spermatoforii în orificiul genital al femelelor. ED intervin în dezvoltarea normală a peştilor, perturbând diferenţierea sexuală (Baatrup & Junge 2002) şi coloritul normal al peştilor (Kristensen et al 2005), indicele gonopodial şi gonosomatic (Toft & Guillette 2004), numărul spermatoforilor (Toft & Guillette 2004), frecvenţa secvenţelor de curtare (Baatrup & Junge 2002; Kristensen et al 2005), sau provoacă malformaţii somatice progeniturii (Petrescu-Mag 2007).

Varietăţi şi linii ideale pentru cuantificarea efectului disruptiv

Există o multitudine de varietăţi de culoare la peştele guppy şi un număr aproape inepuizabil de linii consangvine create pentru deliciul acvariofililor, pentru cercetarea fundamentală sau pentru piaţa acvariofilă. Cunoaşterea geneticii şi a numeroşilor factori care interacţionează cu genele în dezvoltarea ontogenetică a acestor peşti, face posibilă crearea de loturi caracterizate printr-o serie de elemente de culoare care înlesnesc cuantificarea nivelului de ED din apă sau, mai bine zis, a intensităţii efectului disruptiv. Efectuarea unor studii de ecotoxicologie presupun deţinerea unor linii foarte omogene genotipic şi fenotipic. Posesia acestor linii, creşterea şi reproducerea lor, păstrarea nealterată a caracterelor coloristice şi a omogenităţii lor depind de cunoaşterea câtorva elemente de genetică şi a unor legi care guvernează expresia şi transmiterea ereditară a caracterelor de culoare importante în cuantificarea intensităţii factorului disruptiv. Vom prezenta în continuare câteva varietăţi din care se pot creea sau păstra linii ideale pentru studiile de ecotoxicologie.

Varietatea de guppy Red Blond (varietatea roşie) este cea mai potrivită din punctul de vedere al posibilităţii cuantificării suprafeţelor pigmentate cu roşu (*Orange area*, Houde 1992) de pe corpul peştilor. Cuantificarea se poate face digital pe fotografii, iar corelarea mărimii suprafeţelor roşii cu prezenţa hormonilor androgeni se bazează pe faptul că testosteronul este un reglator cheie al sintezei de pteridină roşie (Jayasooriya et al 2002; Rodd et al 2002). Varietatea se caracterizează prin homozigoţie la locusul autosomal *blond* (bb; Goodrich et al 1944) şi caracterul cantitativ Y-linkat *Orange area.* Prezenţa xenoestrogenilor împiedică sau întârzie masculinizarea şi implicit colorarea specifică a masculilor, cu atât mai mult cu cât efectul disruptiv este mai puternic, sau cu cât ED este mai abundent.

Varietăţile de tip sălbatic (cu condiţia ca lotul să fie omogen) prezintă avantajul posibilităţii cuantificării mărimii, intensităţii şi numărului petelor negre de pe corp, care vor fi corelate cu vigoarea masculilor. Masculii care exprimă caracterele în doze reduse sunt catalogaţi ca maturizaţi sexual cu întârziere sau feminizaţi din cauza efectului ED. Neajunsul acestor linii este acela că petele negre maschează petele roşii, care nu mai pot fi cuantificate corect.

Varietatea Blue Metallic se caracterizează printr-un corp albastru iridescent. Coloritul corpului se datorează caracterului determinat poligenic (Y-linkat) *Iridescent area* (Brooks & Endler 2001) şi gena autosomală *blue,* care poate fi de două tipuri: european blue (r_1r_1) sau (r_2r_2).

Varietatea Half-black Black se caracterizează printr-un corp negru aproape complet. Hipermelanismul este determinat de prezenţa genei dominante *Nigrocaudatus* I (Nybelin 1947) sau *Nigrocaudatus* II (Dzwillo 1959). Ambele sunt sex-linkate şi de obicei apar pe cromosomul X. Negrul acestor gene este intensificat şi extins de poligene melanistice şi de gena *Bcp* (*Black caudal peduncle*). La această varietate, în procesul de selecţie a genitorilor, trebuie avut în vedere faptul că femelele heterozigote $X_{ni}X_{Ni}$ pot impurifica linia.

Varietatea Micariff este complet galbenă. Coloritul sa datorează genei autosomale *golden* (Goodrich et al 1944) şi caracterului cantitativ *Iridescent area* (Brooks & Endler 2001).

Identificarea sexului genetic folosind gene marker

Lucrarea are ca şi contribuţii originale utilizarea şi aplicarea linkajului sexual în vederea identificării sexului genotipic la peştii guppy atunci când intervin factorii perturbatori ai dezvoltării somatice şi diferenţierii sexuale (ED). În unele cazuri, ED nu doar că reduc intensitatea coloritului şi masculinitatea, ci feminizează complet o parte din indivizii masculi, iar raportul dintre sexe în loturile experimentale este un alt indicator care ne poate furniza

informaţii despre intensitatea efectului disruptiv al ED sau despre concentraţia lui. Genele marker *Ni* I şi *Ni* II (lat. *Nigrocaudatus*) ne pot informa concret despre sexul fiecărui individ în parte, în loturile experimentale, deoarece genele *Ni* se exprimă atât la masculi cât şi la femele (figura 1; Petrescu-Mag et al 2008).

Elementele originale au fost elaborate graţie studiilor genetice la guppy, finanţate de către ANCS prin CEEX-Biotech 140/2006 şi adaptate pentru monitorizarea apei de către SC Bioflux SRL. O parte din aceste proiecte tehnologice sunt sub incidenţa dreptului de proprietate intelectuală şi aparţin în exclusivitate Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca (Petrescu-Mag et al 2007).

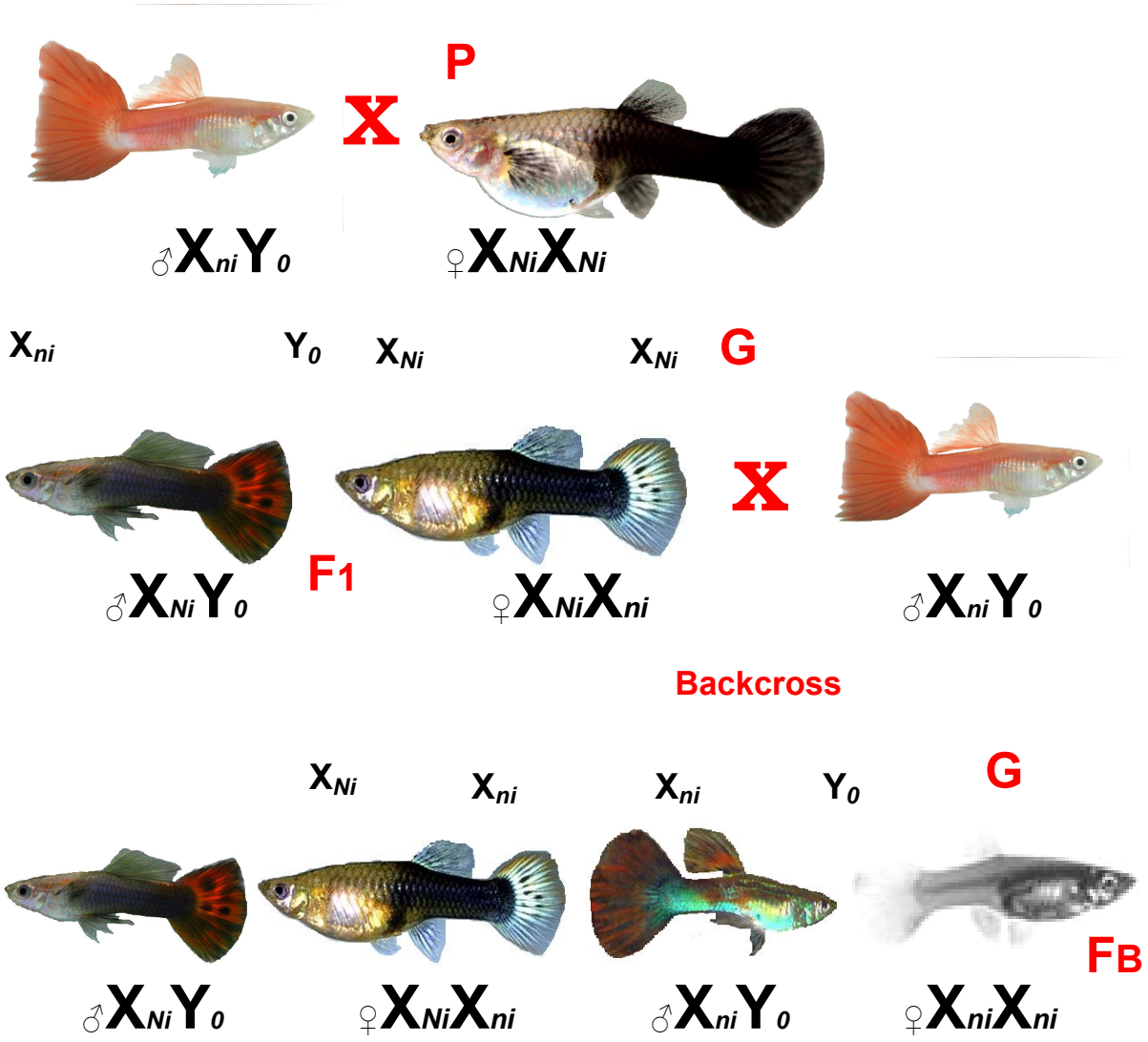


Figure 3. Procedeul de identificare a genotipurilor prin sex-linkage (CEEX 140/2006) (P – părinţi; G – gameţi; F1 – prima generaţie după încrucişarea părinţilor; F_B – prima generaţie după retroâncrucişare; X şi Y – cromosomii sexului; *Ni* – gena mutantă dominantă; *ni* – alela sălbatică de la locusul *Ni*).

Alte specii bioindicatoare de peşti

Tot în ecotoxicologie, sunt utilizate şi alte specii de poeciliizi precum *Xiphophorus helerii* şi gambuziile (*Gambusia holbrooki, G. affinis*). La fel de bine ar putea fi utilizate alte trei specii ale genului *Poecilia*: *P. parae* (Bourne & Sammons 2008), *P. wingei* şi *P. picta*, cu condiţia ca ele să fie reproduse în acvarii pentru obţinerea loturilor necesare (întrucât sunt mai puţin frecvente). Ele prezintă polimorfism coloristic puternic, apropiat de cel al peştilor guppy.

Referinţe bibliografice

Baatrup E., Junge M., 2002 *Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characters in the adult male guppy (Poecilia reticulata)*. Environmental Health Perspectives 109(10):1063-1070.

Bourne G. R., Sammons A. J., 2008 *Boldness, agression and exploration: evidence for a behavioural syndrome in male pentamorphic livebearing fish, Poecilia parae*. AACL Bioflux 1:39-49.

Brooks R., Endler J. A., 2001 *Direct and indirect sexual selection and quantitative genetics of male traits in guppies (Poecilia reticulata)*. Evolution 55:1002-1015.

Bud I., 2002 *Acvaristica. Piscicultura ornamentală*. Editura Academicpres, Cluj-Napoca.

Dzwillo M., 1959 *Genetische Untersuchungen an domestizierten Stammen von Lebistes reticulatus (Peters)*. Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut 57:143-186.

Goodrich H. B., Josephson N. D., Thinkhaus J. P., Slate J. M., *The cellular expression and genetics of two new genes in Lebistes reticulatus*. Genetics 29:584-592.

Houde A. E., 1992 *Sex-linked heritability of a sexually selected character in a natural population of Poecilia reticulata (Pisces: Poeciliidae) (guppies)*. Heredity 69:229-235.

Jayasooriya A. P., Weisinger R. S., Weisinger H. S., Mathai M. L., Sinclair A. J., Grether G. F., Hughes K. A., Rodd F. H., 2002 *Attraction to orange: sexiness not gluttony*. Science 5569-847-848.

Kristensen T., Baatrup E., Bayley M., 2005 *17α-Ethinylestradiol reduces the competitive reproductive fitness of the male guppy*. Biology of reproduction 72:150-156.

Lindholm A., Breden F., 2002 *Sex chromosomes and sexual selection Poeciliid fishes*. Am Nat 160:S214-S224.

Nybelin O., 1947 *Ett fall av X-bunden nedarvning hos Lebistes reticulatus (Peters)*. Zoologiska Bidrag fran Uppsala 25:448-454.

Petrescu-Mag I. V., 2007 *Manipularea sexelor în guppycultură*. Editura Academicpres, Cluj-Napoca.

Petrescu-Mag I. V., Bud I., Petrescu-Mag R. M., Sisea C., Bura M., Grozea A., Botha M., Coşier V., 2007 *Procedeu de obţinere a unei linii criorezistente de peşti ornamentali guppy (Poecilia reticulata) cu aplicabilitate în guppycultură*. Cerere brevet invenţie – OSIM A/00774 din 09.11.2007.

Petrescu-Mag I. V., Boaru M. A., Hărşan R., Petrescu-Mag R. M., 2008 *Genetic basis of resistance to stress in fishes. Molecular and classical investigations in a few model organisms*. AACL Bioflux 1:99-110.

Petrescu-Mag I. V., Bourne G. R., 2008 *Crossing-over between Y chromosomes: another possible source of phenotypic variability in the guppy, Poecilia reticulata Peters.* AACL Bioflux 1:1-10.

Rodd F. H., Hughes K. A., Grether G. F., Baril C. T., 2002 *A possible non-sexual origin of mate preference: are male guppies mimicking fruit?* Proc R Soc Lond 269:475-481.

Toft G., Guillette Jr. L. J., 2004 *Decreased sperm count and sexual behavior in mosquitofish sxposed to water from a pesicide-contaminated lake.* Ecotoxicology and Environmental Safety 60:15-20.

Winge O., 1937 *Succession of broods in Lebistes*. Nature 140:467.

Winge O., Ditlevsen E., 1947 *Colour inheritance and sex determination in Lebistes*. Heredity 1:65-83.

LABORATORY FISH AND WATER POLLUTION. THE SEX-LINKAGE AND COLOR GENE EXPRESSION – IMPORTANT EMEMENTS FOR ENDOCRINE DISRUPTORS DETECTION (Summary)

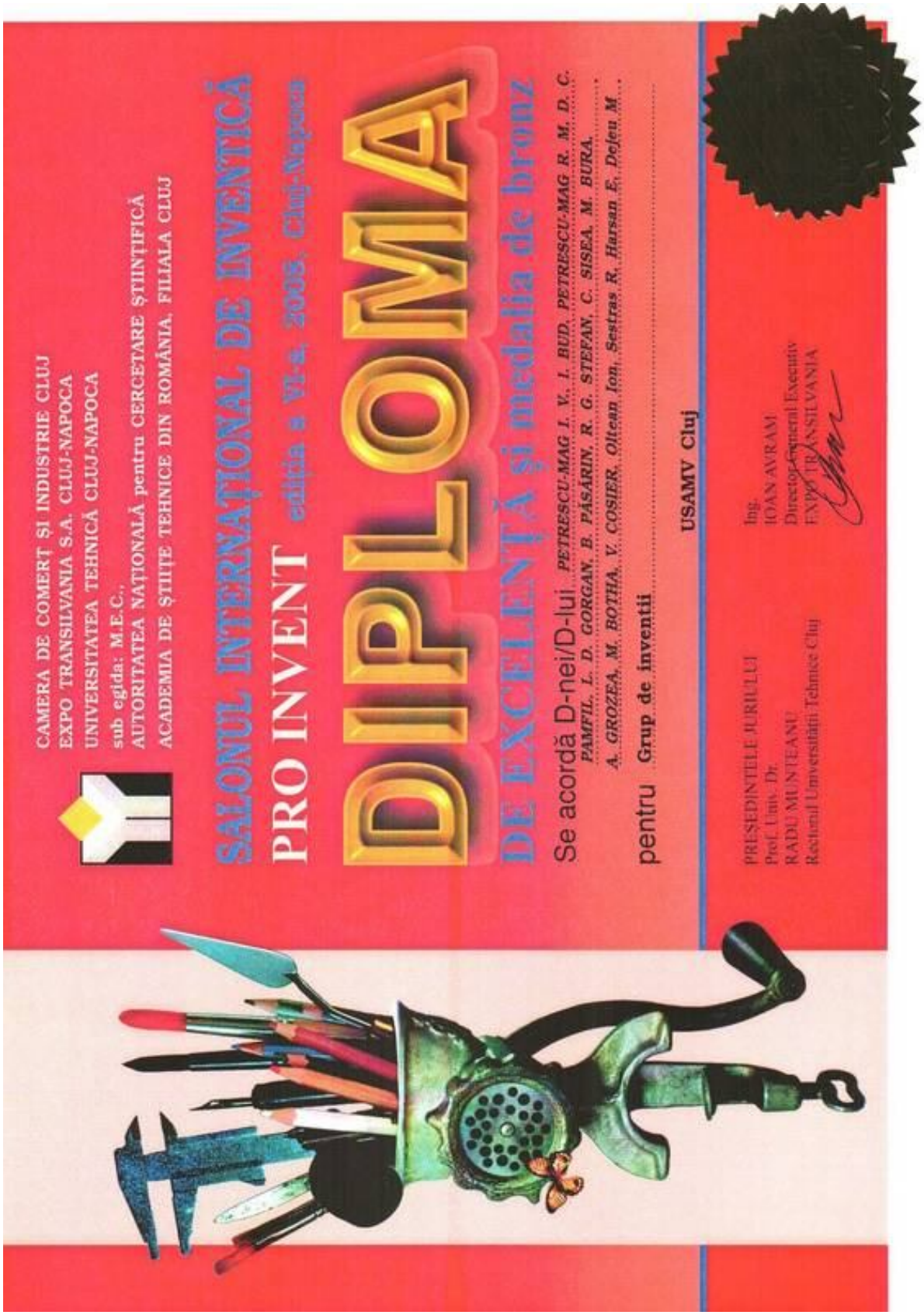
Since the early part of this century, the millionfish (*Poecilia reticulata*) has been the subject of scientific inquiry in several disciplines, and ecotoxicology is one of them.

Endocrine disruptors are chemicals from different sources but all of them are resulted from the anthropic activity (e.g. pesticides, herbicides, gases of combustion, and so forth). Most important endocrine disruptors are so called xenoestrogens (antiandrogenic disruptors).

Authors debate and describe fish strains, possible crosses and color traits, whose manipulation can offer detection of the endocrine disruptors from waters. A breeding program based on sex-linkage is presented as an easier method for genotype identification in the experimental guppy lots. The breeding program of the research was based on a Red Blond male x Half-Black Black female cross, followed by a backcross of F1 females with the initial Red Blond male.

The present study was funded by ANCS and monitorized by CNMP – Biotech (2006-2008).

Anexa 3



CAMERA DE COMERȚ ȘI INDUSTRIE CLUJ
EXPO TRANSILVANIA S.A. CLUJ-NAPOCA
UNIVERSITATEA TEHNICĂ CLUJ-NAPOCA
sub egida: M.E.C.,
AUTORITATEA NAȚIONALĂ pentru CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ
ACADEMIA DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENTICĂ
PRO INVENT ediția a VI-a, 2005, Cluj-Napoca

DIPLOMA
DE EXCELENȚĂ și medalia de bronz

Se acordă D-nei/D-lui PETRESCU-MAG I. V., I. BUD, PETRESCU-MAG R. M. D. C. PAMFIL, L. D. GORGAN, B. PĂSARIN, R. G. STEFAN, C. SISEA, M. BURA, A. GROZEA, M. BOTHA, V. COSIER, Oltean Ion, Sestras R., Harsan E., Dejeu M.

pentru Grup de inventii

USAMV Cluj

PREȘEDINTELE JURIULUI
Prof. Univ. Dr.
RADU MUNTEANU
Rectorul Universității Tehnice Cluj

Ing.
IOAN AVRAM
Director General Executiv
EXPO TRANSILVANIA