

ADER 7.3.4 „ Introducerea și extinderea în cultură a speciei de sturion nord-american *Polyodon spathula*, recent aclimatizat în România pentru diversificarea și creșterea cantitativă, calitativă și ecologică a producției din acvacultură”

Faza 4 „ Experimentarea sistemelor și tehnologiilor de obținere a materialului de populare de diferite vârste ”

Termen de predare 30.06.2013

Obiectivul fazei a IV –a a constat în realizarea următoarelor activități:

Activitatea 4.1.

Determinarea parametrilor tehnologici realizați în procesul tehnologic de reproducere artificială ;

Activitatea 4.2.

Experimentarea tehnicilor și metodelor de crioconservare a spermei, în vederea gestionării și utilizării genofondului și a menținerii biodiversității

Activitatea 4.3.

Experimentarea sistemelor și a modelelor tehnologice experimentale de creștere până la vârsta de 6 luni; determinarea parametrilor tehnologici realizați în procesul tehnologic de creștere.

Rezumat fază

Din analiza stadiului actual al cunoștințelor și al rezultatelor obținute până în prezent, în cadrul acțiunii de aclimatizare a speciei *Polyodon spathula*, s-au evidențiat o serie de aspecte care trebuie luate în considerare la reproducerea și creșterea speciei, în vederea elaborării , optimizării și implementării tehnologiilor care să asigure extinderea ei în acvacultura din România. În ceea ce privește reproducerea speciei, aceasta se referă la: aprecierea stării fiziologice și a stadiului de dezvoltare a gonadelor, optimizarea schemelor de tratament hormonal, prelevarea produselor seminale, aprecierea calității acestora, controlul factorilor de mediu în perioada de incubație și de dezvoltare postembrionară, stabilirea tratamentelor și intervențiilor necesare, corelat cu cerințele fiziologice ale speciei.

În vederea optimizării tehnologiei de reproducere s-au urmărit principalele faze ale procesului de reproducere artificială : selectarea reproducătorilor, aprecierea stadiului de maturare al gonadelor prin metoda biopsiei (Kazanski 1956, Ginsburg et.al, 1993) aplicarea tratamentelor hormonale, colectarea gameților prin metoda MIST, fecundarea prin metoda umedă, descleierea, incubarea, descrierea stadiilor de dezvoltare embrionară și postembrionară.

În anul 2013, s-au realizat experimente de reproducere artificială a speciei *P. spathula*. Au fost constituite 3 loturi de reproducători formate din câte 5 masculi și 5 femele, și s-au realizat câte 3 variante experimentale. Studiile și cercetările privind reproducerea artificială precum și rezultatele obținute în cadrul acestei etape vor contribui la optimizarea tehnologiei de reproducere. Cunoașterea cerințelor ecofiziologice din procesul de reproducere artificială al speciei, demonstrează că, un anumit tip de comportament, este rezultanta interacțiunii mai multor factori: stadiul de maturare al reproducătorilor, temperatura apei, intensitatea luminii, tipul de hormon folosit la stimularea reproducătorilor, doza aplicată, etc.

Protocolul de lucru pentru realizarea reproducerii artificiale a speciei *Polyodon spathula*, în anul 2013, a constat în desășurarea următoarelor activități :

- pregătirea și verificarea instalațiilor din stația de incubație;
- selectarea reproducătorilor masculi și femele și efectuarea măsurătorilor specifice;
- determinarea coeficientului de polarizare al icrelor ;
- parcarea reproducătorilor separat pe sexe, în bazinele de prelată special pregătite și instalate în stația de reproducere artificială;

- stabilirea dozelor de hormon, în vederea stimulării corespunzătoare a reproducătorilor;
- administrarea tratamentului hormonal;
- recoltarea produselor seminale;
- fecundarea;
- descleierea icrelor fecundate;
- incubarea icrelor în incubatoare speciale;
- efectuarea tratamentelor anti fungice și antibacteriene a icrelor fecundate;
- prelevarea și numărarea larvelor eclozate și popularea lor în modulul pentru parcare a larvelor;
- evaluarea rezultatelor obținute la finalul procesului de reproducere artificială.

Parametrii tehnologici realizați în procesul tehnologic de reproducere artificială:

- procent de maturare al femelelor 80 – 90 %;
- cantitatea de icre / kg femelă matură 100 – 150 g/kg;
- procent de fecundare 90 %;
- procent de eclozare 70 %;
- număr larve obținute / kg femelă 7500 – 12000.

Experimentarea tehnicilor și metodelor de crioconservare a spermei în vederea gestionării și utilizării genofondului și a menținerii diversității a constituit un alt obiectiv important propus a se realiza în această etapă. Crioconservarea spermei este una dintre cele mai moderne biotehnologii din acvacultură, utilizată atât pentru protejarea și conservarea resurselor genetice, crearea unor bănci de gene pentru speciile în declin, refacerea unor populații, dar și pentru aplicații tehnologice și economice.

Băncile de gene pentru pești oferă stațiilor de incubatie din sector mari beneficii prin marea variabilitate genetica de care dispune (Munkittrick & Moccia, 1984; Chao & Liao, 2001). Utilizarea de sperma congelată în programele de reproducere la pești oferă un mijloc sigur de extindere, în continuare, a bazei genetice pentru specia vizată. Îmbunătățirea calitatilor genetice ale genitorilor cum ar fi rezistența la boli, o rată de creștere rapidă, toleranța la salinitate, etc., ar putea face, de asemenea, posibil, constituirea unor bănci de sperma crioconservată. Importanța utilizării spermei crioconservate în acvacultură a fost, de asemenea, menționată de Mongkonpunya et al. (2000). Acesta arată că, în cazul unor specii de pești, masculi și femele, care ajung la maturitate în perioade diferite de timp, materialul seminal crioconservat ar putea facilita procesul de reproducere artificială cu obținerea de rezultate sigure în producție (Tiersch, 2000). În plus, sperma crioconservată este mai ușor de transportat decât reproducătorii vii. Acesta este un argument prin care se arată importanța eliminării factorului stress pentru pești. Un alt argument este dat de faptul că prin utilizarea materialului seminal crioconservat se reduce riscul de transmitere al bolilor. Crioconservarea spermei poate fi utilizată pentru a reduce numărul de masculi în crescătorii, permițând astfel ca mai multe resurse să fie destinate reproducătorilor femele și descendenților. Un obstacol real în reproducerea indusă a sturionilor îl reprezintă maturarea asincronă a acestora (DiLauro și Krise, 1994). Realizarea unei bănci de spermă de sturioni ar permite reproducerea artificială ori de câte ori sunt disponibile icre contribuind astfel la dezvoltarea acvaculturii comerciale a sturionilor. Elaborarea metodelor de crioconservare a spermei, pe lângă asigurarea conservării și dezvoltării biodiversității zootehnice, oferă avantajul tehnologic și economic al creșterii unor populații constituite preponderent din femele pentru producerea de caviar. La specia *Polyodon spathula* caracterele de dimorfism sexual, fac posibilă separarea pe sexe de la vârsta de 3-4 ani, făcând astfel posibilă creșterea femelelor care, înregistrează un ritm mai bun, au talie mai mare și în plus produc icrele negre. Utilizarea procedeelelor de crioconservare reduce considerabil numărul de masculi folosiți la reproducerea artificială, fapt care oferă efecte economice semnificative.

Pentru elaborarea metodelor și tehnicilor de crioconservare a spermei la specia *Polyodon spathula*, în perioada aprilie – mai 2013, la S.C.D.P. Nucet, au fost întreprinse o serie de experimente. La începutul sezonului de reproducere pentru specia *P. spathula* au fost selectați reproducătorii, masculi și femele, în vederea constituirii loturilor de reproducere.

Pentru buna desfășurare a experimentarilor privind metode și tehnici de crioconservare a spermei s-a stabilit un protocol de lucru în care a fost cuprins un necesar de materiale și metode. Reproducătorii masculii de *P.spathula* din care s-au constituit cele 3 loturi de reproducători au avut vârste cuprinse între 8 și 11 ani. Au fost recoltate serii de probe de material seminal pentru realizarea experimentelor privind crioconservarea spermei asupra cărora s-au făcut aprecieri privind aspectul calitativ al materialului seminal. Materialul seminal a fost examinat atât macroscopic: aprecieri asupra aspectului general (culoare, miros, volum, consistența, etc., cât și microscopic (densitate, mobilitate, concentrație, etc.). S-a avut în vedere stabilirea de variante experimentale privind testarea și alegerea diluantului corespunzător pentru obținerea unor rezultate cât mai bune în ce privește motilitatea și fecunditatea spermei atât înainte cât și după crioconservarea acesteia. În acest sens au fost pregătite trei soluții de diluare. Verificarea eficienței acestora, s-a făcut prin determinări ale mobilității spermatozoidelor și a capacității de fecunditate la intervale de 2, respectiv 7 zile, timp de 22 de zile.

S-au făcut determinări ale numărului de spermatozoizi la fiecare dintre cei 13 masculi de *P.spathula* obținându-se o medie de $2,08 \times 10^9 \pm 0,95 \times 10^9$ spermatozoizi / ml (medie \pm SD). Pentru fiecare mascul care a fost utilizat în procesul de reproducere artificială, în campania din anul 2013 (3 loturi experimentale) s-a întocmit o spermogramă uzuală. De asemenea, imediat după recoltarea spermei, s-a procedat la aprecierea calității acesteia prin determinarea pH-ului. În urma citirilor realizate s-a înregistrat un pH a cărui valoare medie a fost de 8.02 upH, intervalul pH-ului a fost cuprins între 7.60 și 8.40.

Activitatea 4.3. a cuprins experimentările privind sistemele și modelele tehnologice de creștere până la vârsta de 6 luni cu determinarea parametrilor tehnologici realizați în procesul tehnologic de creștere.

Cei mai importanți factori care determină creșterea și supraviețuirea, sunt calitatea apei și abundența hranei vii (zooplancton). Când densitatea zooplanctonului este mare, dezvoltarea este rapidă, rata zilnică a creșterii este de 2 – 4mm./zi (Michaletz et al., 1982); după aproximativ 140 zile puii pot atinge dimensiuni de 25 – 30cm. TL.

Protejarea heleșteelor prin acoperirea acestora cu plasă limitează atacul păsărilor acvatice (stârci și cormorani) asupra puilor. Semmens K.J. and W. L. Shelton, 1986, susțin că, *Polyodon spathula* are potențial în acvacultura intensivă deoarece se integrează bine în primul an, în producția de somn. Puii de poliodon cu dimensiuni de 7 - 10cm, pot fi crescuți pentru o perioadă în bazinele de dezvoltare postembrionară a somnului.

Modelul tehnologic pentru creșterea puilor de poliodon până la vârsta de 6 luni a fost constituit din 4 bazine experimentale cu suprafața de 0,5 ha fiecare echipate cu instalații de alimentare și evacuare a apei tehnologice, precum și instalații de protecție împotriva păsărilor ihtiofage și a mamiferelor acvatice (împrejmuirea din plasă de sârmă și rețea de sfori deasupra suprafeței apei). Bazinele sunt independente unul față de celălalt. Alimentarea cu apa a bazinelor se face gravitațional și permanent.

Acestea au următoarele caracteristici:

- suprafața 0,5 ha;
- forma bazinelor: dreptunghiulară cu raportul L/l de 2/1.
- adâncimea apei: 1,5 – 1,7 m la alimentare - 2,0 – 2,5 m la evacuare (adâncimea maximă a bazinului);

Pentru realizarea experimentului s-au constituit două variante de creștere, până la vârsta de 6 luni, în care au fost testate densități de populare ale puilor de 5000 și respectiv 10000 ex/ha. Bazinele au fost populate pe data de 01 iunie 2012, iar experimentul de creștere s-a desfășurat pe o perioadă de 140 zile. Materialul biologic folosit în experiment a fost reprezentat de puii de *Polyodon spathula* în vârstă de 40 zile, proveniți de la baza experimentală a S.C.D.P. Nucet: varianta I - poliodon 0+ - 5000 ex/ha; varianta II - poliodon 0+ - 10000 ex/ha. Pe parcursul celor 140 de zile s-a urmărit să se asigure hrana specifică în cantități suficiente, astfel încât greutatea medie individuală la finele sezonului de creștere să fie de 200-250 g/ex. De asemenea s-au monitorizat parametrii fizico-chimici ai apei pe întreg sezonul și s-au efectuat pescuiri de control.

Rezultatele experiențelor, au evidențiat faptul că, după o perioadă de 6 luni, poliiodonul a înregistrat valori ale greutateii medii cuprinse între 225 – 315 g/ex. Cele mai bune rezultate din punct de vedere al producției totale s-au înregistrat în bazinele în care densitatea de populare a fost cea mai mare, respectiv BR3N și BR4N (varianta II).

Un aspect foarte important al tehnologiei îl constituie pregătirea bazinelor de creștere în vederea asigurării hranei naturale, respectiv zooplancton, atât prin inoculare cât și prin stimularea dezvoltării acesteia pe întreg sezonul de creștere. Se poate spune că, greutatea medii de peste 300 g/ex (310 – 315 g/ex), realizate în condiții de densitate redusă exprimă potențialul de creștere al speciei *Polyodon spathula* pentru această vârstă. Rata de supraviețuire s-a încadrat în intervalul 71 – 82 %, valori considerate foarte bune în condițiile de creștere în bazine de pământ. Ritmul specific de creștere a indicat faptul că poliiodonul a înregistrat cele mai bune rezultate în varianta de densitate mai mică (2,77 – 2,81). Valorile SGR înregistrate în varianta de densitate mare (2,64 – 2,66) demonstrează că, atât pregătirea corespunzătoare a bazinelor înainte de momentul populării cu poliiodon cât și stimularea dezvoltării hranei naturale pe toată perioada de creștere asigură obținerea unor rezultate bune de supraviețuire și creștere în condiții de densitate sporită.

Analiza indicatorilor fizico-chimici de calitate a apei din bazinele experimentale s-a realizat pe tot parcursul desfășurării experimentelor, variația acestora s-a încadrat, în general, în normele de calitate privind apele de categoria a IIa. Pentru analiză s-au folosit ca valori de referință valorile cuprinse în Ordinul Ministerului Mediului și Gospodăririi Apelor nr. 161/2006, privind calitatea apelor de suprafață, și valorile maxime admise din literatura de specialitate pentru ape piscicole.

Stadiul realizărilor din etapa a IV –a :

- s-au experimentat modelele tehnologice de reproducere a speciei *P. spathula* în vederea elaborării unei tehnologii optimizate de reproducere a speciei *P. spathula* ;
- s-au testat diferite metode și tehnici de crioconservare a spermei pentru specia *P. spathula*;
- s-au realizat modelele tehnologice pentru creșterea speciei până la vârsta de 6 luni; variantele experimentale au constatat în testarea creșterii speciei în densități diferite de 5000 și respectiv 10000 ex/ha;

Materialul biologic produs în procesul de reproducere artificială (icre embrionate, larve, pui predezvoltați) a contribuit la asigurarea bazei de material de populare necesar extinderii speciei în cultură.