

Nghiên cứu chuyển đổi giới tính và thử nghiệm sinh sản cá song chanh (*Epinephelus malabaricus* Bloch & Schneider, 1801) tại Cát Bà

Tóm tắt

Nghiên cứu nhằm xác định phương pháp sinh sản cá song chanh (*Epinephelus malabaricus*) tại Việt Nam. Các thí nghiệm được triển khai đã xác định được phương pháp nuôi vỗ thành thục đực cả bố mẹ khi sử dụng các loại thức ăn giàu dinh dưỡng khác nhau; xác định được 2 phương pháp cho sinh sản tự nhiên và sử dụng kết hợp hormone (liều lượng cá cái: 500UI HCG + 25 µg LHRH a3; liều lượng cho cá đực = 1/2 cá cái) đều cho tỷ lệ cá tham gia sinh sản (100%), tỷ lệ thụ tinh (57,6 - 87,5%), tỷ lệ nở (65,3 - 87,1%). Nghiên cứu cũng đã theo dõi và phân biệt được các giai đoạn phát triển của phôi cá song chanh.

Từ khóa: Cá song chanh, *Epinephelus malabaricus*, ấu trùng, sinh sản, tỷ lệ thụ tinh.

1. Đặt vấn đề

Cá song chanh (cá mú chấm đen) có tên tiếng anh là black spotted grouper, malabar grouper; tên khoa học *Epinephelus malabaricus* Bloch & Schneider, 1801 là loài cá rạn san hô. Do đặc điểm sinh trưởng nhanh, dễ thích ứng với điều kiện môi trường nuôi, thịt ngon nên cá song chanh là đối tượng cá biển nuôi quan trọng ở một số nước như: Đài Loan, Trung Quốc, Thái Lan, Việt Nam,...

Cũng giống với các đối tượng cá song (*Epinephelus* sp) khác, nghiên cứu sản xuất nhân tạo giống cá song chanh nói chung đều có các công đoạn khó khăn về công nghệ cần giải quyết: chuyển đổi giới tính (từ cá thành cá đực), kích thích sinh sản, ấu trùng phát triển trải qua nhiều giai đoạn và đặc biệt rất nhạy cảm với điều kiện môi trường.... Tại Việt Nam, cá song chanh (*E. malabaricus*) là đối tượng được quan tâm và đưa vào danh mục bảo tồn nguồn gen Thủy sản từ năm 2008. Bài báo cáo này trình bày một số kết quả ban đầu trong nghiên cứu chuyển đổi giới tính, sinh sản và theo dõi sự phát triển phôi cá song chanh (*Epinephelus malabaricus*) thuộc nghiệm vụ "Bảo tồn, lưu giữ nguồn gen và giống Thủy sản khu vực miền Bắc" được triển khai tại Cát Bà - Hải Phòng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và thời gian nghiên cứu
Vật liệu

* Cá song chanh (*Epinephelus malabaricus*); khối lượng 6,5 - 12,3 kg; độ tuổi: 5.

* Thiết bị, vật tư chính khác: Kính hiển vi, trục vi: Hund (Đức); Hormone (17a-MT, HCG, LHRH a3): Ningbo Shangsheng Pharmaceutical (Trung Quốc)

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 01 - 12/2014.
Địa điểm triển khai: Trung tâm Quốc gia Giống Hải sản miền Bắc - Viện nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản 1 (Cát Bà - Cát Hải - Hải Phòng)

Phương pháp nghiên cứu
Phương pháp nghiên cứu chuyển đổi giới tính

Phương pháp nuôi giữ, nuôi vỗ thành thục
+ Đùn cá song chanh được nuôi giữ, nuôi vỗ trong lồng (Việt Hải - Cát Bà).
+ Thức ăn được sử dụng là các loại cá, mực tươi, cá nham, cá nục, cá trích, mực, cua, ghẹ,... định kỳ 1 (tháng/lần) bổ sung Vitamin và khoáng chất.

Phương pháp chuyển đổi giới tính: bố trí 2 lô thí nghiệm:

+ Lô thí nghiệm 1 (ký hiệu HM): Số lượng 32 cá thể cái, sử dụng hormone 17a - Methyl testosterone (17a - MT), liều lượng và thời gian theo Bảng 1.

+ Lô đối chứng (ký hiệu DCHM): Số lượng 33 cá thể cái, không sử dụng hormone.

Phương pháp nghiên cứu kích thích sinh sản

Thời gian	Bảng 1. Liều lượng và tần suất sử dụng hormone 17a-MT			
	Cho ăn	Tần tiêm	Liều lượng	Tần suất
Tháng 1 - tháng 3	3,5 (mg/kg)	5 (ngày/lần)	1,0 (mg/kg)	20 (ngày/lần)
Tháng 4 - tháng 5	5 (mg/kg)	5 (ngày/lần)	1,0 (mg/kg)	20 (ngày/lần)

Kiểm tra chọn cá cho sinh sản: - cá cái: tham trực bằng ống kính silicon có đường kính trong = 800 µm, lựa chọn cá cái có trứng tròn đều, rói nhàu, đường kính > 500 µm;

- cá đực: lựa chọn cá có se đặc, trắng, tan nhanh trong môi trường nước biển.

- Cho đẻ trong các bể có thể tích 90m³, sâu 2,5m, kích thích sinh sản bằng cách tràn nhẹ dần bảo thủy 200 - 300 %.

+ Lô thí nghiệm cho sinh sản tự nhiên (ký hiệu SSNT): Cho nước chảy liên tục 24/24 giờ với tốc độ 20m³/giờ, sự thay đổi nước mới kết hợp dòng chảy sẽ kích thích cá đẻ trứng và phóng tinh.

+ Lô thí nghiệm sử dụng hormone HCG + LHRH-a3 (ký hiệu SSNT) với liều lượng như

sau: Cá cái: 500 UI HCG + 25µg LHRH-a3 /1kg; - Cá đực: 500 UI HCG + 15µg LHRH-a3/1kg.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu, đánh giá quá trình phát triển phôi

+ Tách trứng mỗi (trứng thụ tinh), xử lý bằng iodin 10 ppm/15 phút. Mặt đờ trứng áp khoảng 500 - 700 trứng/1. Sục khí nhẹ và có hệ thống nước chảy tràn đảm bảo thay tối thiểu 200% nước trong suốt thời gian ấp (khoảng 24h).

+ Định kỳ 15 phút/lần, theo dõi sự phát triển của phôi và chỉ tiêu khác

Phương pháp thu thập số liệu

- Tỷ lệ thành thục(%) = (số lượng cá đực, cá thành thục / tổng số cá nuôi vỗ) x 100%

- Tỷ lệ chuyển đổi giới tính (%) = (số cá đực / số cá theo dõi) x 100%

- Tỷ lệ thụ tinh (%) = (số trứng thụ tinh / tổng số trứng thu được) x100%

- Tỷ lệ nở (%) = (số lượng cá bột/số lượng trứng thụ tinh) x 100%

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

+ Phân tích sự phát triển của phôi cá song chanh theo phương pháp của Blaxter J.H.S (1969); Branko Glamuzija và cộng sự (2000); Nguyễn Mộng Hùng (1993).

+ Số liệu được so sánh và kiểm định bằng giá trị x² (mức ý nghĩa p<0,001); phân tích thống kê mô tả bằng phần mềm Microsoft office Excel 2007.

3. Kết quả và thảo luận

Kết quả chuyển đổi giới tính

Các loài cá thuộc họ *Serranidae*, đặc biệt là họ phụ *Epinephelinae* có đặc điểm chung là biến tính cá đ - đực. Giai đoạn đùn, hầu hết là con cái, rất ít cá thể tự chuyển đổi thành đực. Đến tuổi thứ 6 - 7, một số cá cái mới tự chuyển thành cá đực. Theo các tác giả Toledo (1993); Marte et al. (1999), đối với loài cá song chấm nâu (*E. coioides*), con cá thành thục khi trọng lượng 3 - 5kg, con đực từ 6 - 12 kg. Trong nghiên cứu sản xuất giống các loài cá song *Epinephelus*, việc chuyển đổi thành con cá đực là vấn đề quan trọng nhất trong sinh sản.

Kết quả chuyển đổi giới tính cá song chanh (Bảng 2), tại lô thí nghiệm không sử dụng hormone (DCHM) chỉ có 1 cá thể cái tự chuyển giới tính thành cá đực, chiếm tỷ lệ 3,03%. Trong khi đó, 32 cá thể đực bổ sung 17a -

Bảng 2. Kết quả chuyển đổi giới tính cá song chanh

TT	Là thí nghiệm	Số lượng cá thí nghiệm (con)	Tuổi (tháng)	Số cá đực (con)	Tỷ lệ %
1	BCHM	33	>5	1	3,03
2	HM	32	>5	30	93,75

(Hiện định vị số khác 7 nghĩa là số đẻ chung (P&D,2011))

Methyltestosterone đã cho 30 cá thí nghiệm thành cá đực (93,75%). Kiểm định t₂ (p<0,001) đã cho thấy một quan hệ chặt chẽ giữa hormone với sự chuyển đổi giới tính cá song chanh.

Kết quả nghiên cứu cũng tương tự các kết quả chuyển đổi giới tính ở cá song chấm nâu (*E. coioides*) của tác giả Shin-Lih Yeh và cộng sự (2003): Nhóm tác giả đã sử dụng 170g -MT trộn vào thức ăn với liều lượng cao (1.000µg; 10.000 µg; 20.000 µg/kg trọng lượng cơ thể) kết quả sau 90 ngày 86 - 90% cá đã hoàn toàn chuyển thành con đực. Josefa và cộng sự (1993) đã thí nghiệm trên cá song E. sulius, tác giả đã tiêm 17 - MT với liều lượng 0 - 5 mg/kg khối lượng cơ thể, tần suất 15 ngày/lần. Thí nghiệm với liều lượng hormone 5,0 mg/kg, sau từ 6 lần tiêm (với cá có khối lượng 1,2 - 1,6 kg) và 12 lần tiêm (với cá có khối lượng 0,8 kg) (trong 3 - 6 tháng), kết quả là 100% số cá thí nghiệm đã chuyển hoàn toàn thành cá đực.

Kết quả nuôi thành thục

Kết quả của thí nghiệm nuôi vỗ ở giai đoạn IV đạt tỷ lệ 65,6%; cá đực (khả năng tham gia sinh sản) đạt 86,7%; (12,3% số cá đực còn lại tinh lỏng, tỷ lệ tinh trùng bất hoạt cao > 50% khi quan sát trên kính hiển vi). Kết quả nuôi thành thục là cao hơn kết quả nghiên cứu của Ruangsapit (1993), tác giả đã sử dụng cả môi trường, mực và khẩu phần ăn hàng ngày 1,2%/kg khối lượng cá, bổ sung vitamin C, Premix, vitamin E để thúc đẩy sự thành thục của cá song chanh bố mẹ, tỷ lệ thành thục chỉ đạt 56-72,1%.

Kết quả thí nghiệm sinh sản

Bảng 3. Kết quả thí nghiệm sinh sản cá song chanh năm 2014

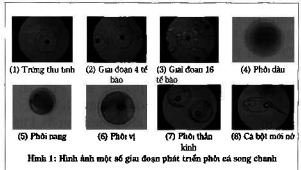
Chỉ tiêu theo dõi	Phương pháp sinh sản	
	SSTN	SSNT
Số lượng cá (con)	10	10
19 đực đực: cá:	1:1	1:1
7 đực lớn hơn cá (g)	85,2	87,5
19 trứng đẻ được 16 (trứng/cá)	2,1	2,7
60 trứng thành (0%)	81,2±4,5	59,8±7,5
74 trứng (0%)	87,1±5,8	85,2±6,6
79 cá (0%)	3,2±0,5	4,1±0,7
59 ngày sinh sản (đợt)	9	7*

Nghiên cứu thí nghiệm phương pháp kích thích sinh sản với cá 20 cặp cá bố mẹ (chối lượng 6,5 - 9,7kg) theo 2 phương pháp: cho đẻ tự nhiên (SSTN) và sinh sản nhân tạo (SSNT). Phân tích kết quả tại Bảng 3, cả 2 phương pháp đều cho tỷ lệ 100% số cá tham gia sinh sản. Số sinh trứng số trứng sinh sản, lượng trứng thu được từ SSNT cao hơn SSNT. Sức sinh sản thực tế của cá song chanh khi được tiêm hormone là cao hơn (2,7/2,1). Tuy nhiên, khi đánh giá các chỉ tiêu tỷ lệ thụ tinh,

tỷ lệ nở, là thí nghiệm SSNT đạt lần lượt (trong các lần đẻ) là 79,5 - 87,5% (trung bình 81,3 ± 4,5%) cao hơn so với SSNT là 57,6 - 65,8% (trung bình 59,8 ± 7,5%). Tỷ lệ đẻ bình của lần trung cá song chanh nở tự phương pháp SSNT trung bình đạt 3,2±0,5 cũng thấp hơn so với SSNT (4,1±0,7%).

Nghiên cứu cũng đã xác định mùa vụ sinh sản chính của cá song chanh tại miền Bắc Việt Nam trong khoảng 2 tháng (từ tháng 6 - 7); có một số khác biệt với Ruangsapit (1993), tác giả đã cho sinh sản tự nhiên cá song chanh với 6 cá cái (3,5 - 5,0 kg) và 4 cá đực (7 - 12 kg) thành trứng trong bể 50 m³, kết quả đã cho đẻ thành công từ 5 - 17 lần/tháng trong 10 tháng năm 1991 (trừ tháng 11,12). Sự sai khác này có thể do điều kiện thời tiết tại Thái Lan là ổn định hơn khu vực nghiên cứu của nhiệm vụ tại Cát Bà.

Quá trình phát triển phôi



Hình 1: Hình ảnh một số giai đoạn phát triển phôi cá song chanh

Quan sát quá trình phát triển phôi cá song chấm nâu cơ bản tương tự các giai đoạn phát triển chính như phôi của các đối tượng cá song khác như: cá song mõ (*E. taivana*) (Hussain N.A. & Higuchi M., 1980), cá song E. microdon (Tawada S.,1989b); cá song E. costae (Branko Glumazija et al., 2000).... Trường tự tính cá song chanh phát triển bình thường cũng trải qua các giai đoạn: thụ tinh, phân cắt tế bào, phôi đầu, phôi nang, phôi vị, phôi đầu tiên và nở thành cá bột (Bảng 4, Hình 1).

Thời gian phát triển phôi, tỷ lệ nở, tỷ lệ dị hình của ấu trùng phụ thuộc vào nhiệt độ và độ mặn. Qua các thí nghiệm, nhóm nghiên cứu đã xác định được tài điều kiện tối ưu cho ấp nở trứng thụ tinh là: độ mặn: 28 - 30‰, nhiệt độ: 27 - 29°C, mật độ: 500 - 700 trứng/lít nước, nếu chấy trần với tỷ lệ thay đạt 300%/chu kỳ ấp nở tốt, thời gian nở thành ấu trùng trung bình 22 ± 0,5 giờ.

Bảng 4. Thời gian phát triển của phôi cá song chanh

Chuẩn đoán	Thời gian	Giới định	Thời gian
2 tế bào	16 - 18 phút	Phôi đầu	20-30 phút
4 tế bào	25 - 30 phút	Phôi nang	3,5-4,5 giờ
8 tế bào	40 - 45 phút	Phôi vị	5 - 6 giờ
16 tế bào	55 - 60 phút	Phôi thào	10 - 12 giờ
32 tế bào	80 - 90 phút	Ấu trùng	20 - 21 giờ

* 70% số cá bột thành trong thí nghiệm

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với một số tác giả khác: Theo Duray và đồng tác giả (1997), phôi cá song chấm nâu (*E. coioides*) nở sau thụ tinh 18 - 20 giờ (nhiệt độ

28 - 30°C). Phôi cá song chanh (*E. malabaricus*) nở thành ấu trùng trong thời gian 17 - 19 giờ tại nhiệt độ 26 - 29°C (Ruangsapit, 1993). Với cá song chẫu (Cromileptes altivelis), quá trình phát triển phôi trong khoảng thời gian sau 20 giờ tại nhiệt độ 28 - 29°C (Sugama et al., 2001).

5. Kết luận

- Sử dụng hormone 17 -MT (tiêm kết hợp cho ăn) trong chủ động chuyển đổi giới tính cá song chanh (*Epinephelus malabaricus*); tỷ lệ cá chuyển thành đực đạt 93,75%.
- Phương pháp SSNT đạt tỷ lệ thụ tinh (79,5-87,5%), tỷ lệ nở trung bình đạt 87,1%; cao hơn phương pháp SSNT: (57,6-65,8%; 65,3%).
- Phôi cá song chanh phát triển qua các giai đoạn giống sự phát triển phôi của một số loài cá song (*Epinephelus* sp) khác.

HOÀNG THỊ SON, TRẦN THẾ MƯU
(Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Blaxter J H S (1969). Development: eggs and larvae. In: W.S. Hoar and D.J. Randall (Editors). Fish physiology. Vol. 11. Academic Press, San Diego CA. 1-58.
- Branko Glumazija, Niska Glavic, Peter Tutman, Valter Kazal and Iliovko Skaravica (2000). Egg and early larval development of laboratory reared goldfish carp, *Epinephelus castos* (Steindachner, 1878). *Sci Mar*, 64(3), 341 - 345.
- Duray M.M., Khatu H., (1990). The relationship between spawning and larval length to prey size in three marine fish species. *Philipp J. Sci.* 119, 237-245
- Hussain N.A. & Higuchi M. (1980). Larval rearing and development of the brown-spotted grouper, *Epinephelus taivana* (Forsk.). *Aquaculture* 19, 339-356
- Josefa D. Tin-Fernan, Luis Mares B. Garcia and Antonio R. Castillo, Jr. (1994). Induction of sex inversion in juvenile Groupers, *Epinephelus sulius*, (Teleostei) by injectors of 17 α -Methyltestosterone. *Japan J. Ichthyol* 40 (4), 413-420
- Marte C.L. (2003). *Livaculture of marine species in Southeast Asia: current research and industry prospects*. *Aquaculture* 227 (2003): 293-304
- Nguyễn Hồng Hùng (1993). Bồi giống sinh học và phát triển. NXB Khoa học và kỹ thuật.
- Ruangsapit M., Boonlittanont P. & Kongkumnerd J (1993). Progress in the propagation and larval rearing of the grouper *Epinephelus malabaricus*. In: the *Groupers Culture, The Proceedings of Groupers Culture*, pp. 32-44
- Shim - Yun Yeh, Quan - Chai Dai, Young - Tong Chiu, Cheng - Ming Ku, Yun - Yuan Tang, Chen - Fang Cheng. (2003). Induced sex change, spawning and larviculture of patino grouper, *Epinephelus tukala* *Aquaculture* 228, 371 - 381.
- Sugama K., Aridoka, Ryo Slemet, Suko Ismi, En Sefendi and Shogo Kawahara (2001). Larval rearing of brood stock of the groupers *Cromileptes altivelis*. *Gondoli Research Institute For Mariculture (Indonesia)*
- Tawada S. (1989a). Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper *Epinephelus microdon* (Bleeker) reared using the hatchery *Saitanzoshoku* H1, 99-103 (In Japanese)
- Tawada S. (1989b). Spawning of brood stock of the grouper *Epinephelus microdon* (Bleeker). *Saitanzoshoku* H1, 105-108 (In Japanese)
- Toledo L.D. (1993). Successive spawning of groupers, *E. sulius* in a tank and a floating net cage. *Aquaculture*, 115, p 361-367.