

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT SẢN XUẤT GIỐNG CÁ RÔ ĐỒNG (*Anabas testudineus*) TOÀN CÁI

Đặng Khánh Hồng¹, Đỗ Trung¹ và Nguyễn Tường Anh²

ABSTRACT

The study was conducted to produce XX off-springs of climbing perch, which are differentiated as all females. The crossing between ordinary XX females and XX males (neo-males, which are produced by androgenic masculinization of F1 generation) could produce all XX offspring F2. Two day-old off-springs of climbing perch were treated with 40, 60 and 80 ppm of 17 α -methyltestosterone (MT) in feeding diet for 14, 21 and 28 days. The results showed that at the treatment level of 40 ppm MT diet for 14 days produced 97,5 \pm 1,43% males. Progeny testing of 68 individuals of F2 generation revealed that there were 16 males that gave 78,9–95,1% females. These ratios are close to the theoretic of 100% females from XX males. The survival rate and environmental influences on sex differentiation of climbing perch will be discussed in the paper.

Keywords: Climbing perch, *Anabas testudineus*, methyltestosterone

Title: Study on the production of all-female climbing perch (*Anabas testudineus*)

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo thế hệ cá rô đồng con mang nhiễm sắc thể giới tính XX để biệt hóa thành cá cái qua kỹ thuật phối cá cái XX bình thường với cá đực XX (F1 được đực hóa bằng hormone androgen) để cho thế hệ cá con F2 toàn XX. Nghiên cứu được tiến hành bằng cách cho cá bột 2 ngày tuổi ăn thức ăn có trộn hormone 17 alpha-methyltestosterone (MT) với các mức 40, 60 và 80 mg/kg thức ăn trong 14, 21 và 28 ngày. Kết quả cho thấy ở mức 40 mg MT /kg thức ăn và sau 14 ngày cho ăn có đã tạo được 97,5 \pm 1,43% cá đực. Kết quả kiểm tra 68 đàn con F2 đã xác định được 16 cá đực F1 cho tỷ lệ cá cái bằng 78,9–95,1%, tỉ lệ gần với lý thuyết là 100% cá cái từ cá đực XX. Các nội dung về tỉ lệ sống và ảnh hưởng môi trường lên sự biệt hóa giới tính cá rô được thảo luận chi tiết trong bài viết.

Từ khóa Cá rô đồng, *Anabas testudineus* và methyltestosterone

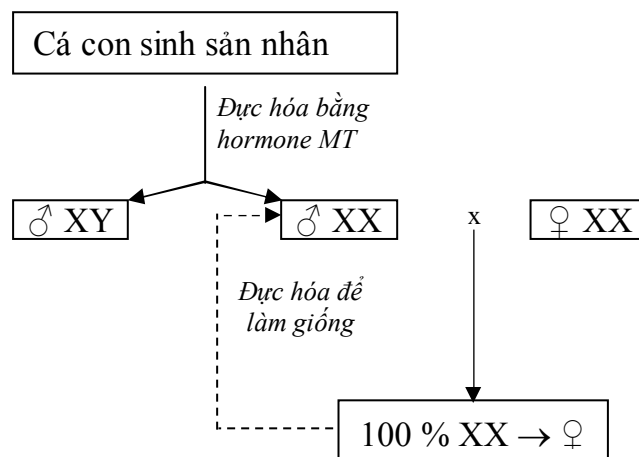
1 GIỚI THIỆU

Cá rô đồng là loài cá bản địa, cá có kích cỡ nhỏ và được ưa chuộng trên thị trường do chất lượng thịt cá ngon. Kể từ khi kỹ thuật sản xuất giống nhân tạo cá rô đồng được phát triển (Nguyễn Thành Trung, 2001) thì cá được nuôi khá phổ biến ở nhiều loại hình thủy vực như ruộng lúa, ao nhỏ, sông (nuôi trong lồng),... Tuy nhiên, trong nuôi cá rô đồng thường bắt gặp sự chênh lệch về sinh trưởng nên kích cỡ cá cái thường lớn hơn cá đực khi thu hoạch. Cá cái có thể đạt khối lượng từ 60–100 g/con trong khi cá đực chỉ đạt từ 30-50% khối lượng cá cái. Vì thế, trong nuôi cá rô đồng thương phẩm, nếu có được cá giống toàn cái hoặc đa số là cá cái thì sẽ nâng cao được năng suất nuôi và chất lượng sản phẩm.

¹ Trung tâm Khuyến nông Kiên Giang

² Bộ môn SH&SLĐV, Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên TPHCM

Ngày nay người ta có thể sản xuất cá đực đơn tính nhờ cách xử lý trực tiếp bằng hormon sinh dục, hoặc áp dụng phương pháp gián tiếp thông qua cá đực XX, cá siêu đực YY, cá cái ZZ hay cá siêu cái WW, mà những cá này được tạo ra bằng hormon kết hợp với những cách lai tạo tương ứng (Pongthana *et al.*, 1999; Vera Cruz and Mair, 2000 và Hendry *et al.*, 2003). Tuy nhiên, người tiêu thụ cá không ưa chuộng cá đực xử lý bằng hormon steroid trực tiếp, đặc biệt là những hormon tổng hợp. Đối với những loài cá có nhiễm sắc thể qui định giới tính cá là XY như cá Mè vinh người ta có thể sản xuất cá giống toàn cái có nhiễm sắc thể giới tính là XX bằng cách mẫu sinh nhân tạo rồi đực hoá thể hệ con bằng androgen. Những cá đực XX (neo-males) sau đó khi phối với cá cái bình thường có thể cho ra thế hệ con toàn cái XX (Pongthana *et al.*, 1999). Phương pháp này được gọi là cách cái hoá gián tiếp. Giả định là cá rô có nhiễm sắc thể giới tính là XY thì cách tạo cá đực XX theo Hình 1.



Hình 1: Các bước tạo ra cá Rô đồng toàn cái

Theo phương pháp này sẽ tránh được việc mẫu sinh (Pongthana *et al.*, 1999) để lọc những con XX (thông thường thì cá mẫu sinh yếu và có tỷ lệ sống thấp) nhưng phải thêm công đoạn chọn những con cá đực XX. Trong điều kiện không thể phân biệt được con đực bình thường là con con đực XY với con đực XX theo ngoại hình trực tiếp, người ta phải phát hiện cá đực XX thông qua giới tính của thể hệ con (về lý thuyết sẽ là toàn cái vì mang các nhiễm sắc thể giới tính XX). Những cá đực XX tạo ra theo phương pháp này sẽ có sức sống cao hơn những con đực XX được tạo ra bằng phương pháp mẫu sinh.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại trại sản xuất giống cá Rô phi toàn đực ở Kinh 9, huyện Tân Hiệp, tỉnh Kiên Giang từ tháng 6 năm 2004.

2.2 Nuôi vỗ và kích thích sinh sản

Cá Rô đồng bố mẹ có kích cỡ 50-100 g được chọn nuôi vỗ và chọn cho đẻ dựa theo kỹ thuật mô tả của Nguyễn Thành Trung (2001). Cá đực kích thích sinh sản bằng phương pháp Linpe. Mỗi 1 kg cá cái sẽ được dùng một lượng kích dịch tổ

gồm 100 ug LH- RH a [D-Ala⁶, Pro⁹ Net]-mGnRH (Trung Quốc) kết hợp với 10 mg domperidon (Motilium – M, Janssen, Thái lan). Hai hoạt chất được hoà tan với nhau trong dung dịch nước muối sinh lý. Mỗi cá cái được tiêm một lượng dung dịch xấp xỉ 0,5 ml và liều tiêm cho cá đực bằng phân nửa liều tiêm cho cá cái. Cá sau khi được tiêm kích dục tố, cá đực cho đẻ thành từng cặp (gồm 1 đực và 1 cá cái) trong thau có đường kính 54cm và mực nước 20 cm. Cá bắt đầu đẻ khoảng 7 giờ từ khi thả cá vào thau.

2.3 Áp, ương và cho cá ăn thức ăn có trộn methyltestosterone (MT)

Trứng cá được ấp trong các thau với mật độ khoảng 2000 trứng/lít nước. Cá bắt sau khi nở 1 ngày được đưa xuống giai ương (1 x 1 x 1 m). Thí nghiệm được bố trí gồm 2 nhân tố là nồng độ MT xử lý (40, 60 và 80 mg/kg thức ăn) và 3 mức thời gian xử lý cho mỗi nồng độ MT (14, 21 và 28 ngày) và 1 nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức được lập lại 4 lần. Mỗi giai thả 10.000 cá bột (xác định bằng phương pháp thể tích).

Mười ngày đầu cho cá bột ăn thức ăn “milkfish - sữa cá” (sản phẩm thương mại của Nutrimaster, Cty Thịnh Phát, Thành phố Hồ Chí Minh) có trộn MT (Sigma). Hormon MT được hoà tan trong cồn (240 ml cồn 95% với hàm lượng MT theo từng nghiệm thức cho 1 kg thức ăn), sau khi trộn MT với “milkfish” thì trộn thêm 10g Vitamin C. Từ ngày 11 đến 14 thì thức ăn dùng cho cá được giống như 10 ngày đầu nhưng thay 50% lượng “milkfish” bằng bột cá lạt nghiền mịn và rây qua rây bột nhiều lần. Từ ngày thứ 15 trở đi thì thay hoàn toàn milkfish bằng bột cá sau khi rây kỹ. Cá được cho ăn 5 lần/ngày vào các thời gian 7:30, 10:00, 12:30, 15:00 và 17:30. Lượng thức ăn hàng ngày cho 5 ngày đầu là 10–15 g/10.000 cá bột (giai); 5 ngày tiếp theo dùng 20–25 g; ngày thứ 11–15 dùng 30–50 g; ngày thứ 16–21 dùng 60–70 g và ngày thứ 22–28 dùng 70–100 g. Khẩu phần ăn hàng ngày tùy thuộc vào sức ăn của chúng.

Ngày thứ 30 thì chuyển cá từ mỗi giai nhỏ sang giai lớn hơn (3x2x1,2 m). Mực nước trong giai thấp nhất là 1 m. Trong tháng thứ 2 cá được cho ăn bột cá có trộn thêm 3 g Vitamin C và 100 g premix dùng cho cá. Khẩu phần cho cá trong mỗi giai tăng dần từ 100 đến 250 g. Từ tháng thứ 3 cá được ăn thức ăn viên có kích thước thích hợp và bổ sung bột cá.

2.4 Kiểm tra giới tính đàn cá F1

Sau 3 tháng ương, cá được kiểm tra giới tính bằng cách mổ lấy tuyến sinh dục để nhuộm aceto-carmin và xem dưới kính hiển vi có độ phóng đại nhỏ theo Guerrero & Shelton (1974). Mỗi mẫu cá F1 được kiểm tra 30 cá thể. Nhiễm sắc thể giới tính của 1 số cá đực F1 còn sống được kiểm tra giới tính ở thế hệ F2. Tất cả cá trong các đàn F2 đều được kiểm tra giới tính.

2.5 Kiểm tra giới tính đàn cá F2

Những cá đực được hóa bằng MT trong thế hệ đầu tiên được gọi là cá đực F1. Hai trăm cá F1 ba tháng tuổi ứng với mỗi nghiệm thức được nuôi tiếp trong giai. Một số cá đực F1 sinh trưởng vượt trội được giữ lại nuôi vỗ làm cá bố để tạo thế hệ F2. Ứng với mỗi đàn con từ một cặp bố mẹ, cá đực F1 được giữ lại cho đến khi đàn con được kiểm tra về tỷ lệ giới tính. Những cá đực F1 cho đàn con F2 có trên 82%

là cái (12 con) được giả định là có bộ nhiễm sắc thể giới tính là XX và được giữ lại làm cá bố để sản xuất cá con mà đa số là cái.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tỷ lệ sống của cá sau 1 tháng tuổi

Tỷ lệ sống của cá rô đồng sau 1 tháng tuổi ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều thấp, dao động từ 3,06-5,24%, trong đó lô đối chứng là 4,95%. Nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ sống thấp là cá sau khi sử dụng hết noãn hoàn chưa thể ăn thức ăn nhân tạo tốt. Sau 14 ngày thí nghiệm thì tỷ lệ sống của cá cho ăn thức ăn có trộn MT 40 và 60 mg MT/kg thức ăn gần nhau giữa (5,24 và 5,17%), nhưng tỷ lệ sống của cá ở nghiệm thức 80 mg MT/kg thức ăn đạt thấp nhất (4,60%) (Bảng 1). Khi so sánh trong cùng một nghiệm thức thí nghiệm thì tỷ lệ sống cá của giảm dần theo thời gian, tuy nhiên điểm quan trọng là tỷ lệ sống của cá không giảm nhiều sau 14 ngày tuổi (Bảng 1). Nhìn chung, tỷ lệ sống của cá giảm khi tăng hàm lượng MT trong thức ăn.

Bảng 1: Tỷ lệ sống (%) của cá F1 một tháng tuổi được cho ăn thức ăn có hormon MT

Thời gian xử lý (ngày)	Liều MT dùng trong thức ăn (mg/kg)			
	0	40	60	80
14	0	5,24±0,11	5,17±0,11	4,60±0,10
21	0	4,43±0,11	4,03±0,10	3,43±0,09
28	4,95±0,11	3,74±0,09	3,32±0,09	3,06±0,09

Kết quả trong bảng là số trung bình trong 4 giai, mỗi giai 30 con.

3.2 Tỷ lệ sống và tỉ đực hoá của cá rô đồng sau 3 và 7 tháng tuổi

Tỷ lệ cá đực khi cho cá ăn hormone MT đạt xấp xỉ 100% kể cả ở liều MT là 40 mg/kg sau thời gian cho ăn 14 ngày (Bảng 2). Nếu trừ đi số cá XY là 50% của quần đàn (theo lý thuyết) thì tỷ lệ cá XX đực hóa đạt thấp nhất là 95% (47,5% so với 50% của nghiệm thức 40 mg MT/kg thức ăn sau 14 ngày). Như vậy, nếu cho cá ăn thức ăn có 40 mg MT/kg sau 14 ngày (kể từ ngày thứ hai sau khi nở) sẽ đạt tỷ lệ đực hóa cao.

Bảng 2: Tỷ lệ (%) cá đực trong đàn F1 được xử lý bằng MT sau 3 tháng nuôi từ cá 1 tháng tuổi

Thời gian xử lý (ngày)	Liều MT dùng trong thức ăn (mg/kg)		
	40	60	80
14	97,5±1,43	99,2±0,83	99,2±0,83
21	99,2±0,83	100	99,2±0,83
28	100	99,2±0,83	100

Kết quả trong bảng là số trung bình trong 4 giai, mỗi giai 30 con.

Ở tháng tuổi thứ 7 những cá F1 được xử lý hormone MT đã thành thục. Tuy nhiên, tỷ lệ sống của cá giữa các nghiệm thức có sự chênh lệch lớn (dao động trong khoảng 25,5–89,0%, n=200). Tỷ lệ đực đạt rất cao: 93,1–99,4%. Song, kết quả trình bày ở bảng 3 không thể hiện qui luật nào về tỷ lệ sống giữa của cá, mà có sự biến động lớn giữa các nghiệm thức và trong cùng một nghiệm thức thí nghiệm.

Bảng 3: Tỷ lệ (%) sống & tỷ lệ cá đực trong đàn F1 được xử lý hormone MT sau 7 tháng nuôi (n=200)

Thời gian xử lý (ngày)	Liều MT dùng trong thức ăn (mg/kg)					
	40		60		80	
	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ đực	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ đực	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ đực
14	71,5	93,0	57,5	96,5	57,0	95,6
21	25,5	96,2	32,0	96,9	89,0	96,6
28	67,0	98,5	61,5	99,2	80,0	99,4

Bảng 4 trình bày kết quả về tỉ lệ cá cái trong đàn con của từng cá đực F1 đã được đực hóa bằng MT. Về lý thuyết, nếu nhiễm sắc thể giới tính của cá Rô đồng là XY thì có 2 trường hợp đối với cá F1 đã được đực hóa là 50%? và 100%?. Tuy nhiên, tỉ lệ cái trong các đàn cá F2 (được giải phẫu toàn bộ) rất biến động, từ 1,18 đến 95,12%. Những đàn có tỷ lệ cái từ 38,5 đến 62,8% (có 25 cá đực F1 từ số 12 đến số 36) (Bảng 4) có thể xem như gần với tỷ lệ cái lý thuyết là 50% và những đàn cá F2 có tỷ lệ cái từ 78,9 đến 95,1% (của 16 cá đực F1) (Bảng 4) gần với tỷ lệ cái lý thuyết 100%. Như vậy còn 2 nhóm cá đực F1 từ số 1 đến số 11 và từ con số 37 đến con số 52 (16 con) không thể đưa vào trường hợp nào của bộ nhiễm sắc thể giới tính của cá đực F1 là XY hay XX. Rất có thể ngoài các nhiễm sắc thể XY, còn có ảnh hưởng của các yếu tố môi trường trong sự định giới tính của cá Rô đồng. Người ta đã chứng minh được nhiệt độ trong khi ương hoặc ấp trứng có ý nghĩa đối với sự hình thành giới tính một cách tương ứng của cá và bò sát là những động vật biến nhiệt (Baroiller *et al.*, 1999; Nguyễn Tường Anh, 1999; Kalthoff, 2001; và Devlin và Nagahama, 2002). Trong thí nghiệm của Pongthana *et al.*, (1999) trên cá mè vinh thì một con cá đực giả định là XX khi phối với 2 cá cái khác nhau về nguồn gốc đã cho tỷ lệ cá cái trong thế hệ con khác rất xa nhau (97,3% và 37,1%).

Ngoài ra, 5 đàn cá Rô đồng khác nhau cũng được cho sinh sản nhân tạo và kiểm tra giới tính. Khi trưởng thành tỷ lệ cá đực trong khoảng 54,5–69,7%, trung bình là 60,9%. Như vậy, có thể nhận xét là trong quần thể cá Rô đồng bình thường có sự khác nhau về tỉ lệ giới tính và trong trường hợp này là tỉ lệ đực cao hơn cá cái mà nguyên nhân có thể là tỷ lệ sống giữa 2 giới tính của cá Rô đồng khác nhau trong quá trình sinh trưởng.

Mặt khác, nếu giả định bộ nhiễm sắc thể giới tính của cá Rô đồng là ZW – điều rất có thể xảy ra khi người ta đã chứng minh một số loài cá sặc, thuộc họ Belontiidae rất gần với họ cá rô Anabantidae, có bộ nhiễm sắc thể giới tính là ZW hoặc ZO (Rishi, 1975 và 1976), thì thế hệ F2 của những con đực F1 đã đực hoá sẽ phân hoá theo 2 trường hợp lý thuyết là (i) 50% cái WZ + 50% đực ZZ; và (ii) 25% đực ZZ + 50% cái ZW và + 25% cái WW (siêu cái). Chúng tôi sẽ phân tích khả năng này sau một thời gian theo dõi tiếp. Hiện những cá đực F1 cho đàn con F2 trên 82% là cá cái (12) đã được giữ lại để sản xuất cá con gồm đa số cái.

Bảng 4 : Kết quả kiểm tra giới tính đàn con (% cá cái) F2 của những cá F1 đã được đực hoá bằng hormone MT

Cá bố	N	Tỉ lệ cá	Cá bố	n	Tỉ lệ cá	Cá bố	n	Tỉ lệ cá	Cá bố	n	Tỉ lệ cá
1	85	1,18	18	16	43,8	35	30	60,0	52	70	78,6
2	18	5,56	19	32	43,8	36	43	62,8	53	19	78,9
3	23	8,70	20	34	44,1	37	63	63,5	54	29	79,3
4	35	25,7	21	29	44,8	38	23	65,2	55	15	80,0
5	32	28,1	22	24	45,8	39	46	67,4	56	36	80,6
6	37	29,7	23	52	46,2	40	31	67,7	57	28	82,1
7	33	30,3	24	32	46,9	41	16	68,8	58	18	83,3
8	33	33,3	25	63	49,2	42	29	68,9	59	50	84,0
9	50	34,0	26	36	50,0	43	27	70,4	60	32	84,4
10	31	35,5	27	34	50,0	44	28	71,4	61	46	84,8
11	84	38,1	28	39	51,3	45	51	72,6	62	22	86,4
12	39	38,5	29	21	52,4	46	70	72,9	63	44	88,6
13	33	39,4	30	27	55,6	47	28	75,0	64	19	89,5
14	33	39,4	31	28	57,1	48	41	75,6	65	32	90,6
15	32	40,6	32	29	58,6	49	50	78,0	66	43	93,0
16	31	41,9	33	32	59,4	50	32	78,1	67	16	93,9
17	19	42,1	34	30	60,0	51	65	78,5	68	41	95,1

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Tường Anh (1999). Vấn đề điều khiển giới tính ở động vật và sinh con trai hay con gái theo ý muốn. Nhà XB TRẺ, 147 trang.

Baroiller J.F., Guiguen Y. , Fostier A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910-931.

Devlin R.H. and Nagahama Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.

Guerrero R.D. and Shelton W.L. (1974). An aceto-carmin squash method of sexing juvenile fishes. *Prog. Fish Cult.* 36 (1): 56

Hendry C.I, Martin-Robichaud D.J, Benfey T.J (2003). Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hyppoglossus hypoglossus* L.) *Aquaculture* 219: 769-781

Kalthoff K. (2001). Environmental sex determination. *In* Analysis of Biological development. McGrawHill 790 pp. pp: 692-694

Pongthana N., Penman D.J., Baoprasertkul P., Hussain M.G, Islam M.S, Powell S.F., McAndrew B. (1999). Monosex female production in the silver barb (*Puntius gonionotus*, Bleeker). *Aquaculture* 173:247-256.

Rishi KK (1975). Somatic and meiotic chromosomes of *Trichogaster fasciatus* Bl and Sch.) (Teleostei, Perciformes: Osphronemidae). *Genen Phaenen* 18: 49-53.

Rishi KK (1976). Karyotypic studies on four species of fish. *Nucleus* (Calcutta) 19: 95-98.

Nguyễn Thành Trung (2001). Kỹ thuật nuôi cá rô đồng. Hội Nghề Cá Việt Nam, 26 trang.

Vera Cruz and Mair G.C. (2000). Optimization of feminization of *Oreochromis niloticus* L. by oral administration of diethylstilbestrol (DES): The effects of stocking density, treatment duration and environment. *Asian Fisheries Science* 13: 39-48