

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG
-----oo0oo-----

NGUYỄN THỊ HẢI THANH

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC SINH SẢN VÀ THỬ
NGHIỆM SẢN XUẤT GIỐNG NHÂN TẠO CÁ KHOANG CỔ
YÊN NGỰA *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA – 2021

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

-----oo0oo-----

NGUYỄN THỊ HẢI THANH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC SINH SẢN VÀ THỬ
NGHIỆM SẢN XUẤT GIỐNG NHÂN TẠO CÁ KHOANG CỔ
YÊN NGỰA *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758)**

Chuyên ngành: Nuôi trồng thủy sản

Mã số: 9620301

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. TS. NGÔ ANH TUẤN**
- 2. TS. HUỖNH MINH SANG**

KHÁNH HÒA – 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Một số kết quả thu được trong luận án này là thành quả nghiên cứu của Đề tài Ủy ban Phối hợp: “**Nghiên cứu sinh sản nhân tạo cá khoang cổ *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758) trong điều kiện thí nghiệm tại Khánh Hòa**” do Phòng Sinh thái Nhiệt đới, Chi nhánh Ven biển, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga triển khai trong đó tôi là người thực hiện chính. Các tài liệu tham khảo trong luận án với mục đích tổng quan làm cơ sở lý luận, so sánh, phân tích và thảo luận đều được trích dẫn đầy đủ theo quy định. Toàn bộ nội dung và kết quả trong luận án đều đảm bảo tính tin cậy, không trùng lặp và đã được chính NCS công bố trên các tạp chí chuyên ngành.

Tôi xin cam đoan các kết quả, số liệu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào.

Khánh Hòa, 2021

NGHIÊN CỨU SINH

NGUYỄN THỊ HẢI THANH

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án Tiến sĩ này, trước hết nghiên cứu sinh xin chân thành cảm ơn TS. Ngô Anh Tuấn, TS. Huỳnh Minh Sang, những người đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ nghiên cứu sinh trong suốt thời gian thực hiện đề tài luận án.

Nghiên cứu sinh xin bày tỏ lời cảm ơn đến Ban Giám hiệu, Lãnh đạo Viện Nuôi trồng Thủy sản, Khoa Sau đại học, Phòng Khoa học Công nghệ Trường Đại học Nha Trang đã tạo điều kiện cho tôi được học tập tại trường.

Xin chân thành cảm ơn Ban Tổng Giám đốc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, Ban Giám đốc Chi nhánh Ven biển, Lãnh đạo, Chỉ huy các Phòng, Ban đặc biệt là tập thể đơn vị Phòng Sinh thái Nhiệt đới, chú Ngô Chí Thiện, em Nguyễn Văn Quang, em Võ Thị Hà cùng các cán bộ trong phòng đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, triển khai thực hiện, hỗ trợ phân tích mẫu và kinh phí để nghiên cứu sinh thực hiện nội dung của luận án.

Nghiên cứu sinh xin chân thành cảm ơn các thầy cô, PGS.TS (**Lại Văn Hùng**), TS. Hà Lê Thị Lộc, PGS.TS Đỗ Thị Hòa, Cô Lưu Thị Bích đã luôn giúp đỡ nghiên cứu sinh trong những nghiên cứu ban đầu và đồng hành, đồng viên nghiên cứu sinh trong quá trình thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh cảm ơn TS. Astakhov D. A. – Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học Nga, Liên bang Nga đã giúp đỡ, cung cấp nhiều số liệu, hình ảnh có giá trị của cá khoang cổ vùng biển Khánh Hòa và các kỹ thuật sinh sản nhân tạo cá cảnh biển trong đó có cá khoang cổ.

Nghiên cứu sinh trân trọng và cảm ơn TS. Saowapa Sawatpeera, TS. Vorathep Muthuwan cùng các cán bộ của Viện Nghiên cứu Khoa học Biển, Đại học Burapha (BIMS), Vương quốc Thái Lan, đã tạo điều kiện vật chất, hướng dẫn về kỹ thuật cho Nghiên cứu sinh trong thời gian thực tập sinh tại Viện.

Nghiên cứu sinh cảm ơn TS. Sadrin A. M., TS. Emelyanova N. G. - Trường đại học MGU, Liên bang Nga; PGS. TS Phạm Quốc Hùng–Viện NTTS Nha Trang, PGS. TS. Trương Quốc Phú- ĐH Cần Thơ đã giúp đỡ NCS trong việc xác định tổ chức mô phôi và các giai đoạn phát triển của trứng và cá con.

Nghiên cứu sinh trân trọng sự giúp đỡ nhiệt tình của các thầy, cô, các bạn của Viện Nuôi trồng Thủy sản, Đại học Nha Trang luôn đồng hành cùng Nghiên cứu sinh trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Cảm ơn các em Mạc Văn Huy, Trần Văn Dũng, Giáp Văn Thụ, kỹ thuật viên làm việc Trại thực nghiệm Sản xuất giống cá cảnh biển, tổ 13, khóm Đường Đệ, phường Vĩnh Hòa, và Phòng thí nghiệm Công nghệ Nuôi trồng, Viện Hải dương học đã hỗ trợ trong quá trình triển khai các nội dung của luận án.

Lời cảm ơn sâu sắc đến những người thân trong gia đình, đặc biệt là chồng, con trai Minh Sơn và em gái Thu Nga đã động viên, giúp đỡ, hy sinh nhiều thời gian cho tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Khánh Hòa, 2021

NGHIÊN CỨU SINH

NGUYỄN THỊ HẢI THANH

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	iii
LỜI CẢM ƠN	iv
MỤC LỤC	vi
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	viii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH	x
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	xii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CÁ KHOANG CỎ	4
1.1.1. Vị trí phân loại	4
1.1.2. Thành phần loài	5
1.1.3. Đặc điểm phân bố và sinh thái	6
1.1.4. Đặc điểm hình thái	9
1.1.5. Đặc điểm dinh dưỡng	10
1.1.6. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển	13
1.1.7. Đặc điểm sinh học sinh sản cá khoang cỏ	16
1.2. NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT GIỐNG NHÂN TẠO CÁ CẢNH BIỂN	23
1.2.1. Nghiên cứu sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển trên thế giới	23
1.2.2. Nghiên cứu sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển ở Việt Nam	26
1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển	29
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Thời gian, địa điểm, đối tượng nghiên cứu	40
2.2. Nội dung nghiên cứu	41
2.3. Phương pháp nghiên cứu	42
2.3.1. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản	42
2.3.2. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá KCYN	46
2.4. Phương pháp xử lý số liệu	59
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	60
3.1. Đặc điểm sinh học, sinh sản	60
3.1.1. Giới tính và tỷ lệ cá KCYN lưỡng tính	60
3.1.2. Các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục và tế bào trứng	63

3.1.3. Kích thước thành thực lần đầu.....	74
3.1.4. Hệ số thành thực và mùa vụ sinh sản.....	75
3.1.5. Sức sinh sản.....	77
3.1.6. Tương quan chiều dài và khối lượng.....	78
3.2. Nghiên cứu tập tính sinh sản, ấp nở, phát triển phôi và ấu trùng, cá con đến 15 ngày tuổi.....	80
3.2.1. Tập tính sinh sản, ấp nở.....	80
3.2.2. Các giai đoạn phát triển phôi, ấu trùng và cá con đến 15 ngày tuổi.....	81
3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và nhiệt độ đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN.....	93
3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn lên hiệu quả sinh sản.....	93
3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên hiệu quả sinh sản.....	95
3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên hiệu quả sinh sản.....	97
3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và mật độ đến hiệu quả ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 - 15 ngày tuổi.....	98
3.4.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng.....	98
3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng.....	102
3.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng.....	106
3.4.4. Thử nghiệm sản xuất giống và ương nuôi ấu trùng cá KCYN.....	109
3.5. Thảo luận.....	110
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	114
4.1. Kết luận.....	114
4.1.1. Một số kết quả đặc điểm sinh học sinh sản cá KCYN.....	114
4.1.2. Tập tính sinh sản, ấp nở, phát triển phôi và ấu trùng cá KCYN.....	114
4.1.3. Ảnh hưởng của thức ăn, nhiệt độ và độ mặn đến hiệu quả sinh sản.....	114
4.1.4. Hiệu quả ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 - 15 ngày tuổi chịu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và mật độ ương.....	115
4.1.5. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi ấu trùng cá KCYN tại cơ sở sản xuất.....	115
4.2. Đề xuất ý kiến.....	116
TÀI LIỆU THAM KHẢO	117
PHỤ LỤC	

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Viết đầy đủ
BW	Khối lượng thân cá
BW ₀	Khối lượng thân cá bỏ nội quan
Fa	Sức sinh sản tuyệt đối
GW	Khối lượng tuyến sinh dục
GSI	Hệ số thành thực sinh dục
GW _m	Khối lượng mẫu trứng được lấy ra đếm
KCYN	Khoang cổ yên ngựa
Max	Giá trị tối đa
Min	Giá trị tối thiểu
MS-222	Tricain methanesulfonate, chất gây mê
NT	Nghiệm thức
NC	Nghiên cứu
R ²	Hệ số giải thích
SD	Độ lệch chuẩn
SGR _L	Tốc độ tăng trưởng đặc trưng về chiều dài
SGR _w	Tốc độ tăng trưởng đặc trưng khối lượng
SR	Tỷ lệ sống
TA	Thức ăn
tbsd	Tế bào sinh dục
TL	Chiều dài toàn thân
‰	Phần nghìn
°C	Độ C
L	Lít
ppm	Tỷ lệ 1 phần triệu
♀	Cái
♂	Đực

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần loài cá khoang cổ.....	5
Bảng 1.2. Thành phần thức ăn một số loài cá khoang cổ tại Eniwetak Atoll.....	11
Bảng 1.3. Tốc độ tăng trưởng trung bình một số loài cá khoang cổ.....	15
Bảng 1.4. Hệ số thành thực của cá khoang cổ cam tại Andaman và Nicobar	17
Bảng 1.5. Sức sinh sản của cá khoang cổ	18
Bảng 1.6. Sức sinh sản và kích thước trứng, ấu trùng trong nuôi nhân tạo.....	19
Bảng 1.7. Thành phần cá họ Pomacentridae đã thử nghiệm sinh sản nhân tạo.....	25
Bảng 1.8. Một số loài cá cảnh biển sinh sản nhân tạo tại Việt Nam.....	28
Bảng 2.1. Kiểm tra các yếu tố môi trường nước bể nuôi	42
Bảng 2.2. Số lượng mẫu cá KCYN dùng cho phân tích sinh học sinh sản	42
Bảng 2.3. Thành phần và tỷ lệ phối trộn nguyên liệu của 5 thành phần dinh dưỡng nuôi sinh sản cá bố mẹ	50
Bảng 3.1. Kích thước và khối lượng cá KCYN vùng biển Khánh Hòa (n=1.158).....	60
Bảng 3.2. Các giai đoạn thành thực của trứng và tỷ lệ tế bào sinh dục đực và cái ở cá KCYN vùng biển Khánh Hòa (n=120).....	61
Bảng 3.3. Tỷ lệ thành thực của cá KCYN	76
Bảng 3.4. Sức sinh sản cá KCYN vùng biển Khánh Hòa (n=117).....	78
Bảng 3.5. Thời gian phát triển các giai đoạn phôi cá KCYN.....	90
Bảng 3.6. Hiệu quả nuôi vỗ cá bố mẹ bằng các loại thức ăn khác nhau	93
Bảng 3.7. Thành phần dinh dưỡng của các nghiệm thức thức ăn nuôi sinh sản.....	94
Bảng 3.8. Hiệu quả nuôi vỗ cá bố mẹ ở các mức độ mặn khác nhau	95
Bảng 3.9. Hiệu quả sinh sản cá bố mẹ ở các mức nhiệt độ khác nhau.....	97
Bảng 3.10. Tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN với các loại thức ăn khác nhau.....	100
Bảng 3.11. Tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN ở các mức độ mặn khác nhau.....	104
Bảng 3.12. Tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN ở các mật độ ương khác nhau.....	107
Bảng 3.13. Kích thước, khối lượng cá bố mẹ trong sản xuất giống nhân tạo (n=8).....	109
Bảng 3.14. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi ấu trùng cá KCYN.....	109

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Phân bố cá khoang cổ yên ngựa trên thế giới.....	7
Hình 1.2. Phân bố cá khoang cổ yên ngựa ven bờ tỉnh Khánh Hòa	8
Hình 1.3. Hình dạng ngoài cá khoang cổ yên ngựa	9
Hình 1.4. Vòng đời cá khoang cổ.....	14
Hình 1.5. Mô hình chuyển đổi giới tính của cá khoang cổ.....	20
Hình 1.6. Mô hình phát triển giới tính cá xương	22
Hình 2.1. Cá KCYN tại vịnh Nha Trang	40
Hình 2.2. Sơ đồ vận hành nguồn nước thí nghiệm.....	40
Hình 2.3. Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu	41
Hình 2.4. Vận chuyển cặp cá bố mẹ từ tự nhiên về nuôi trong bể thí nghiệm	47
Hình 2.5. Thu mẫu và quan sát phôi cá KCYN	48
Hình 2.6. Cá bố mẹ được tuyển chọn (a) và hệ thống nuôi thí nghiệm cá KCYN (b)....	49
Hình 2.7. Thí nghiệm các mức độ mặn lên hiệu quả sinh sản cá bố mẹ	52
Hình 2.8. Thí nghiệm các mức nhiệt độ lên hiệu quả sinh sản cá bố mẹ	52
Hình 2.9. Ương nuôi ấu trùng cá KCYN.....	54
Hình 2.10. Hệ thống nuôi cấy tảo.....	54
Hình 2.11. Bể nuôi sinh khối Rotifer và Copepoda	55
Hình 2.12. Thí nghiệm loại thức ăn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng	55
Hình 2.13. Thí nghiệm các mức độ mặn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng	56
Hình 2.14. Thí nghiệm mật độ nuôi lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng.....	57
Hình 3.1. Lỗ sinh dục cá KCYN khi cá đang đẻ và thụ tinh	64
Hình 3.2. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn I	65
Hình 3.3. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn II	66
Hình 3.4. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn III	67
Hình 3.5. Tuyến sinh dục cá KCYN giai đoạn IV	68
Hình 3.6. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn V	69
Hình 3.7. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn VI.....	69
Hình 3.8. Pha nhân – chất nhuộm sắc noãn bào cá KCYN	70

Hình 3.9. Pha tiền ngoại vi nhân noãn bào cá KCYN.....	71
Hình 3.10. Pha ngoại vi nhân noãn bào cá KCYN.....	71
Hình 3.11. Pha không bào hóa noãn bào cá KCYN.....	72
Hình 3.12. Pha thể noãn hoàng noãn bào cá KCYN.....	73
Hình 3.13. Pha thành thực noãn bào cá KCYN	73
Hình 3.14. Đồ thị tương quan giữa nhóm kích thước và $\ln((1-P)/P)K$	74
Hình 3.15. Biến động hệ số thành thực cá KCYN	75
Hình 3.16. Tần suất bắt gặp các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục trong năm.....	76
Hình 3.17. Mối tương quan giữa chiều dài và khối lượng	79
Hình 3.18. Cá KCYN bố mẹ đang đẻ trứng và thụ tinh	80
Hình 3.19. Các giai đoạn phát triển phôi (từ trứng vừa thụ tinh đến 1 tế bào).....	82
Hình 3.20. Các giai đoạn phát triển phôi (từ trứng 1 tế bào đến 16 tế bào)	83
Hình 3.21. Các giai đoạn phát triển phôi (từ trứng 32 tế bào đến 64 tế bào)	83
Hình 3.22. Các giai đoạn phát triển phôi nang cao	84
Hình 3.23. Các giai đoạn phát triển phôi nang thấp.....	84
Hình 3.24. Các giai đoạn phát triển phôi nang muộn.....	85
Hình 3.25. Các giai đoạn phát triển phôi vị	86
Hình 3.26. Các giai đoạn phát triển cơ quan ở phôi 2 ngày tuổi	87
Hình 3.27. Các giai đoạn phát triển cơ quan ở phôi 3 ngày tuổi	88
Hình 3.28. Các giai đoạn phát triển cơ quan ở phôi 4-7 ngày tuổi	89
Hình 3.29. Giai đoạn phôi nở, cá con thoát ra ngoài môi trường	89
Hình 3.30. Các giai đoạn phát triển cá con đến 15 ngày tuổi	92

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: Nghiên cứu đặc điểm sinh học sinh sản và thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758)

Chuyên ngành: Nuôi trồng thủy sản

Mã số: 9620301

Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Hải Thanh

Khóa: 2012

Người hướng dẫn: 1. TS. Ngô Anh Tuấn
2. TS. Huỳnh Minh Sang

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Tóm tắt những đóng góp mới về lý luận và học thuật của luận án:

Đề tài luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên về đặc điểm sinh học sinh sản và thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758) tại Việt Nam.

Nghiên cứu đã xác định được một số đặc điểm sinh học sinh sản của cá KCYN tại vùng biển Khánh Hòa như: đây là loài cá lưỡng tính trong đó tuyển sinh dục mang cả tế bào sinh dục đực và tế bào sinh dục cái, chưa đủ cơ sở để xác định có hiện tượng chuyển đổi giới tính; Cá KCYN là loài có tuyển sinh dục thành thực không đồng bộ, đẻ nhiều lần trong năm; Kích thước thành thực lần đầu của cá KCYN là 6,37 cm; Hệ số GSI của cá KCYN trong năm đạt giá trị cao nhất vào tháng 4 ($1,05 \pm 1,31$), thấp nhất vào tháng 10 ($0,28 \pm 0,34$). Mùa vụ sinh sản chính là tháng 3-5 và mùa phụ tháng 11-12. Tỷ lệ bắt gặp các cá thể thành thực cao nhất tháng 5 (73%), thấp nhất tháng 9 (40%); Sức sinh sản tuyệt đối trung bình của cá KCYN là $823,59 \pm 259,80$ (trứng/cá cái), dao động 306-1.830 (trứng/cá cái). Sức sinh sản tương đối $42,91 \pm 40,96$ trứng/g cá; dao động từ 10,42 - 316,16 trứng/g cá; Tập tính sinh sản đặc trưng của cá là kết cặp, làm tổ, đẻ trứng dính, thụ tinh và chăm sóc phôi đến ấu trùng nở kéo dài 6-8 ngày.

Nghiên cứu đã xác định được một số thông số kỹ thuật phù hợp để thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá KCYN như: sử dụng thức ăn viên tự phối trộn có hàm lượng Protein ~50% với các thành phần: bột cá, Cyclop – eeze, bột moi, bột mực, bột gạo, rong biển, Spirulina và men bánh mì, Vitamin premix, Vitamin C, Wheat Gluten và Astaxanthin là thức ăn tốt nhất cho nuôi sinh sản cá KCYN bố mẹ; Độ mặn 29 ‰ và 33 ‰ là phù hợp nhất cho nuôi thành thực và sinh sản của cá, cá có thể sinh sản ở độ mặn 37 ‰ song hiệu quả sinh sản thấp nhất; Trong điều kiện nhiệt độ 24, 27, 30, 33⁰C, hiệu quả sinh sản tốt nhất của cá bố mẹ ở nhiệt độ 27⁰C.

Một số thông số kỹ thuật phù hợp để thử nghiệm ương nuôi ấu trùng cá KCYN đến 15 ngày tuổi như: sử dụng phối hợp thức ăn sống gồm Rotifer (ngày 1-9), Artemia + Copepoda (ngày 7-15) cho hiệu quả ương nuôi tốt hơn so với việc sử dụng riêng lẻ từng loại thức ăn sống cho ấu trùng cá từ 1 đến 15 ngày tuổi. Thức ăn tổng hợp không phù hợp cho ương nuôi ấu trùng cá mới nở; Độ mặn từ 25-35 ‰ phù hợp với ương nuôi ấu trùng cá KCYN, trong đó độ mặn tốt nhất là 30‰. Mật độ ương nuôi ấu trùng cá KCYN từ 1-15 ngày tuổi phù hợp là 1, 3-5 con/L.

Ứng dụng các kết quả tốt nhất của các nghiên cứu thử nghiệm về thành phần thức ăn, độ mặn và nhiệt độ trên cá KCYN bố mẹ và ương nuôi ấu trùng cá đến 15 ngày tuổi với các nghiệm thức thức ăn, độ mặn và mật độ vào thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá KCYN tại trại giống cá cảnh biển tại Khánh Hòa. Cá KCYN đã sinh sản 11 đợt, cá đẻ được 6.240 trứng, có 3.542 ấu trùng đã được ấp nở và 1.990 cá KCYN giống 15 ngày tuổi đã được sản xuất.

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

TS. NGÔ ANH TUẤN TS. HUỖNH MINH SANG NGUYỄN THỊ HẢI THANH

MỞ ĐẦU

Thương mại toàn cầu của cá và sinh vật nuôi trong bể cá cảnh cùng thiết bị và phụ kiện kèm theo đã trở thành ngành công nghiệp trị giá hàng tỷ USD. Mặc dù các loài sinh vật biển chiếm chưa đến 10% tổng khối lượng buôn bán sinh vật cảnh, nhưng lại chiếm tỷ lệ phần trăm về giá trị cao hơn và tỷ trọng tăng dần lên trong những năm gần đây. Gần 2 triệu người trên thế giới nuôi cá cảnh biển trong nhà và giá trị buôn bán ước tính 200 đến 330 triệu USD/năm [176]. Nếu cá dùng thực phẩm có giá trị trung bình 6.000 USD/tấn thì cá cảnh biển có giá trị lên đến 496.000 USD/tấn. Một số loài có giá trị tăng lên nhiều lần khi được sử dụng làm vật nuôi cảnh thay vì làm thức ăn như nhóm cá hoàng đế, khi được bán làm thức ăn, giá trị chỉ khoảng 6-16,5 USD/kg song nuôi làm cảnh nó lại có giá trị từ 50 – 1.800 USD/kg [33, 149].

Cá cảnh biển được thu thập chủ yếu từ các quốc gia Đông Nam Á, vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, những nước có vùng biển ven bờ được rạn san hô che phủ với mật độ cao, phù hợp cho sự sinh trưởng của cá rạn san hô trong đó có Việt Nam. Các nước nhập khẩu cá cảnh biển chính là Bắc Mỹ, Nhật Bản và châu Âu, và trong thời gian gần đây còn có Trung Quốc. Hầu hết tất cả các loài cá rạn san hô có kích thước nhỏ, màu sắc đẹp hoặc hình dạng độc đáo đều được nuôi làm cảnh. Ước tính có khoảng 27 triệu con cá cảnh biển thuộc hơn 1.471 loài, tập trung vào 15 họ, trong đó riêng họ cá thiên thần Pomacanthidae (cá khoang cổ thuộc họ này), chiếm khoảng 50% số lượng cá giao dịch mỗi năm. Tuy chưa có số liệu thống kê đầy đủ về giá trị xuất khẩu, lượng người tiêu dùng của từng nhóm loài cá cảnh biển song việc tăng trưởng nhanh chóng tổng giá trị thương mại cũng như chi phí xuất nhập khẩu cá cảnh đã phần nào minh chứng lợi ích kinh tế của lĩnh vực cá cảnh. Tuy nhiên, chưa có số liệu thống kê đầy đủ về giá trị xuất khẩu, lượng người tiêu dùng của từng nhóm loài cá cảnh biển.

Cùng với những thay đổi về biến đổi khí hậu, sự tác động của con người, sự suy giảm của rạn san hô và các loài sinh vật phân bố ven bờ cũng như việc khai thác gần như hoàn toàn từ tự nhiên khiến cho nguồn lợi cá trong đó có nhóm cá cảnh biển suy giảm đáng kể. Mặc dù chưa có số liệu thống kê chính xác về sự suy giảm của các loài cá này cũng như các loài cá rạn san hô làm cảnh khác, nhưng theo số ước tính vào những năm 2002, mỗi tháng có khoảng 300.000 con cá cảnh biển được thu mua và xuất khẩu sang nước ngoài thì con số hiện nay khiêm tốn hơn rất nhiều, thậm chí một số loài còn hầu như không xuất hiện trong các khảo sát những năm gần đây từ Việt

Nam [5, 24, 46, 48]. Do vậy, việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học sinh sản, thử nghiệm sinh sản nhân tạo và sản xuất giống các đối tượng cá cảnh biển trong đó có loài khoang cổ yên ngựa là cần thiết nhằm giảm bớt áp lực khai thác và tiến tới phục hồi lại nguồn lợi chúng.

Cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (KCYN) là một loài phổ biến thuộc giống khoang cổ, có phân bố tự nhiên tương đối rộng tại một số vùng biển Thái Bình Dương. Đây là một trong sáu loài cá khoang cổ phân bố tự nhiên tại vùng biển Việt Nam. Cũng như các loài khoang cổ khác, cá KCYN bị khai thác từ tự nhiên cho mục đích xuất khẩu làm cảnh với mọi kích thước và không bị bất cứ giới hạn nào về số lượng hay mùa vụ khai thác. Giá trị kinh tế của cá phụ thuộc vào màu sắc, kích cỡ và hình dáng. Hiện nay, giá một con cá khoang cổ yên ngựa (giai đoạn cá giống) là khoảng 10 - 40 USD [181].

Với nhu cầu cao, sự thích nghi nhanh với môi trường sống nhân tạo, cá khoang cổ là một trong những nhóm cá cảnh biển được thử nghiệm sinh sản nhân tạo thành công đầu tiên trên thế giới vào những năm cuối thế kỷ XIX. Cho đến nay, nhiều nước đã sinh sản nhân tạo thành công các loài trong giống cá khoang cổ như Mỹ, Nga, Canada, Pháp, Đức, Indonesia, Thái Lan... Ở Việt Nam, cá khoang cổ là một trong những nhóm loài cá cảnh biển được thử nghiệm sinh sản thành công đầu tiên nhưng cũng chỉ được bắt đầu nghiên cứu khoảng trên 10 năm trở lại đây với một số thành công bước đầu trên các loài cá khoang cổ đỏ *A. frenatus*, khoang cổ đen đuôi vàng *A. clarkii*, cá khoang cổ nemo *A. ocellaris*, cá khoang cổ cam *A. percula* và bước đầu thử nghiệm sinh sản loài khoang cổ yên ngựa đã được thực hiện.

Tuy nhiên, cá cảnh biển từ nguồn sinh sản nhân tạo cho mục đích nuôi cảnh chỉ đáp ứng được một lượng rất nhỏ so với nhu cầu thị trường và tiềm năng phát triển ở nước ta do thành phần loài còn hạn chế, số lượng cá con sản xuất ra còn giới hạn và một số tồn tại như nguồn cá bố mẹ chưa ổn định, kỹ thuật nuôi vỗ thành thực sinh dục ở các giai đoạn chưa được làm chủ hoàn toàn, kỹ thuật chăm sóc các giai đoạn cá giống còn nhiều tồn tại về thức ăn phù hợp, kỹ thuật chăm sóc ... Việc nghiên cứu các vấn đề liên quan đến sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển trong đó có cá khoang cổ yên ngựa làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện quy trình nuôi, nhằm cung cấp đàn cá với số lượng lớn, chủ động các giải pháp kỹ thuật sinh sản nhân tạo vừa để tái tạo nguồn lợi cá bằng cách thả ra biển giảm áp lực khai thác nguồn

lợi tự nhiên, đồng thời cung cấp nguồn cá cảnh biển cho thị trường xuất khẩu là nhu cầu cần thiết [39].

Xuất phát từ thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu đặc điểm sinh học sinh sản và thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758)**”

Mục tiêu của nghiên cứu: Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản và xác định một số giải pháp kỹ thuật phục vụ cho sản xuất giống nhân tạo cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758).

Nội dung nghiên cứu:

1. Xác định một số đặc điểm sinh học, sinh sản của cá khoang cổ yên ngựa (KCYN): giới tính và tỷ lệ cá lưỡng tính, các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục và tế bào trứng, kích thước thành thực sinh dục lần đầu, hệ số thành thực và mùa vụ sinh sản, sức sinh sản, mối tương quan giữa chiều dài, khối lượng và hệ số thành thực.
2. Nghiên cứu tập tính sinh sản, ấp nở, phát triển phôi và ấu trùng của cá KCYN.
3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và nhiệt độ đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN.
4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và mật độ đến hiệu quả ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 - 15 ngày tuổi.
5. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi ấu trùng cá KCYN trong điều kiện thí nghiệm.

Ý nghĩa của nghiên cứu:

Ý nghĩa khoa học: Nghiên cứu được thực hiện góp phần cung cấp những thông tin khoa học về đặc điểm sinh học, sinh sản của cá khoang cổ yên ngựa trong điều kiện tự nhiên và nuôi nhốt. Đây sẽ là một trong những nguồn tài liệu tham khảo có giá trị phục vụ công tác giảng dạy, nghiên cứu khoa học và người nuôi thủy sinh vật cảnh.

Ý nghĩa thực tiễn: Nghiên cứu nhằm xác định được các đặc điểm sinh học sinh sản, điều kiện nuôi vỗ, cho đẻ và ương nuôi ấu trùng làm cơ sở cho việc xây dựng quy trình sản xuất giống nhân tạo cá khoang cổ yên ngựa. Thành công của nghiên cứu góp phần cung cấp con giống cá khoang cổ yên ngựa cho nhu cầu thị trường, giảm áp lực khai thác lên nguồn lợi cá rạn tự nhiên, đa dạng hóa các đối tượng nuôi cảnh biển, một trong những ngành nuôi mới và tiềm năng hiện nay cho một đất nước có vùng biển ven bờ dài và có sự đa dạng sinh vật rạn san hô trong đó có cá rạn san hô thuộc nhóm những nước cao nhất trên thế giới như Việt Nam.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CÁ KHOANG CỎ

1.1.1. Vị trí phân loại

❖ Hệ thống phân loại [25, 36]

Cá khoang cỏ yên ngựa *Amphirprion polymnus* (Linnaeus, 1758) có hệ thống phân loại như sau:

Ngành: Chordata

Lớp: Actinopterygii

Bộ: Perciformes

Họ: Pomacentridae

Giống: *Amphirprion* (Bloch and Schneider, 1801)

Loài: *Amphirprion polymnus* (Linnaeus, 1758)

❖ Tên đồng vật

- *Amphirprion bifasciatus annamensis* Chevey, 1932
- *A. intermedius* Schlegel & Müller, 1839
- *A. laticlavus* Cuvier, 1830
- *A. polynemus* (Linnaeus, 1758)
- *A. trifasciatus* Cuvier, 1830
- *Anthias bifasciatus* Bloch, 1792
- *Coracinus unimaculata* Meuschen, 1781
- *Lutjanus jourdin* Lacepède, 1802

❖ Tên tiếng Anh

- Saddleback Anemonefish
- Saddleback Clownfish
- Brownsaddle Clownfish Panda Clownfish
- White-tipped Anemonefish

❖ Tên tiếng Việt

- Cá khoang cỏ yên ngựa
- Cá khoang cỏ lưng yên ngựa
- Cá khoang cỏ sọc
- Cá khoang cỏ hề

1.1.2. Thành phần loài

Cá khoang cổ thuộc bộ Perciformes, họ Pomacentridae, gồm hai giống *Amphiprion* và *Premnas*. Cho đến nay, trên thế giới và Việt Nam được ghi nhận có 29 loài cá trong đó có 28 loài thuộc giống *Amphiprion* và 1 loài giống *Premnas*. Gần đây, có hai loài cá khoang cổ được công bố là loài mới song việc xác thực là loài mới hoặc là loài lai giữa hai loài trong cùng giống cá chưa thuyết phục nên số lượng 29 loài cá khoang cổ được đa số tác giả ghi nhận.

Bảng 1.1. Thành phần loài cá khoang cổ [33, 38, 40]

TT	Tên khoa học	Tên tiếng Anh
1	<i>Amphiprion akallopisos</i> Bleeker, 1853	Skunk anemonefish
2	<i>Amphiprion akindynos</i> Allen, 1972	Barrier reef anemonefish
3	<i>Amphiprion allardi</i> Klauswitz, 1970	Twobar anemonefish
4	<i>Amphiprion barberi</i> Allen, Drew&Kaufman, 2008	Barber's anemonefish
5	<i>Amphiprion bicinctus</i> R��ppell, 1830	Twoband anemonefish
6	<i>Amphiprion chagosensis</i> Allen, 1972	Chagos anemonefish
7	<i>Amphiprion chrysogaster</i> Cuvier, 1830	Mauritian anemonefish
8	<i>Amphiprion chrysopterus</i> Cuvier, 1830	Orangefin anemonefish
9	<i>Amphiprion clarkii</i> (Bennett, 1830)*	Yellowtail anemonefish
10	<i>Amphiprion ephippium</i> (Bloch, 1790)	Saddle anemonefish
11	<i>Amphiprion frenatus</i> Brevoort, 1856*	Tomato anemonefish
12	<i>Amphiprion fuscocaudatus</i> Allen, 1972	Seychelles anemonefish
13	<i>Amphiprion latezonatus</i> Waite, 1900	Wide-band anemonefish
14	<i>Amphiprion latifasciatus</i> Allen, 1972	Madagascar anemonefish
15	<i>Amphiprion leucokranos</i> Allen, 1973	Whitebonnet anemonefish
16	<i>Amphiprion mccullochi</i> Whitley, 1929	Whitesnout anemonefish
17	<i>Amphiprion melanopus</i> Bleeker, 1852	Fire anemonefish
18	<i>Amphiprion nigripes</i> Regan, 1908	Maldivian anemonefish
19	<i>Amphiprion ocellaris</i> Cuvier, 1830*	Clown anemonefish
20	<i>Amphiprion omanensis</i> Allen & Mee, 1991	Oman anemonefish
21	<i>Amphiprion percula</i> (Lacep��de, 1802)	Orange anemonefish
22	<i>Amphiprion perideraion</i> Bleeker, 1855*	Pink anemonefish
23	<i>Amphiprion polymnus</i> (Linnaeus, 1758)*	Saddleback anemonefish
24	<i>Amphiprion rubrocinctus</i> Richardson, 1842	Red anemonefish
25	<i>Amphiprion sandaracinos</i> Allen, 1972*	Yellow anemonefish
26	<i>Amphiprion sebae</i> Bleeker, 1853	Sebae anemonefish
27	<i>Amphiprion thiellei</i> Burgess, 1981	Thielle's anemonefish
28	<i>Amphiprion tricinctus</i> Schultz&Welanders, 1953	Maroon anemonefish
29	<i>Premnas biaculeatus</i> (Bloch, 1790)	Spinecheek anemonefish

*** Thành phần loài cá khoang cổ tại Việt Nam:**

Nguyễn Hữu Phụng & cs (1995) công bố có 6 loài cá khoang cổ tại Việt Nam bao gồm: *A. bicinctus* (khoang cổ ba sọc); *A. melanopus* (khoang cổ vây đen); *A. percula* (khoang cổ cam); *A. polynus* (khoang cổ sọc); *A. sebae* (khoang cổ đuôi vàng) và *A. perideraion* (khoang cổ tím) [25]. Đào Tấn Hồ & cs (2000) đã điều tra và bổ sung 1 loài cá khoang cổ là *A. sandaracinos* [11]. Tuy nhiên, các khảo sát chi tiết bổ sung, hiệu đính của Hà Lê Thị Lộc (2005) và Astakhov D. A. (2012) và một số tác giả khác cho thấy có 6 loài cá khoang cổ phân bố tại Việt Nam là: *A. clarkii* (khoang cổ đen đuôi vàng); *A. frenatus* (khoang cổ đỏ); *A. ocellaris* (khoang cổ nemo); *A. perideraion* (khoang cổ tím); *A. polynus* (khoang cổ yên ngựa) và *A. sandaracinos* (khoang cổ vàng) [47]. Ghi nhận sự phân bố của cả 6 loài cá khoang cổ tại vùng biển Khánh Hòa, trong đó, vịnh Nha Trang có 5 loài và cá khoang cổ nemo được ghi nhận phân bố tại quần đảo Trường Sa, Khánh Hòa.

1.1.3. Đặc điểm phân bố và sinh thái

Cá khoang cổ phân bố ở các vùng nước ấm thuộc Thái Bình Dương và Ấn Độ Dương bao gồm Rạn san hô Great Barrier và Biển Đỏ trong đó phân bố nhiều ở các vùng biển nhiệt đới có rạn san hô như tây bắc Australia, Đông Nam Á, Nhật Bản và khu vực Ấn – Malaysia. Nhóm cá này sống ở rạn san hô nên chúng là những loài hẹp muối và hẹp nhiệt. Nhiệt độ nước ở vùng phân bố đo đạt được 26⁰C - 28⁰C, độ mặn dao động từ 32 – 35‰. Chất đáy vùng cá phân bố có đáy san hô, đá, cát hoặc sỏi cát, nơi có hải quỳ cư trú, độ sâu từ 1 -50m nước [35, 36].

Đa số các loài cá khoang cổ đều có vùng phân bố hẹp thậm chí là loài đặc hữu của một địa phương như cá khoang cổ *A. tricolor* chỉ được biết đến tại quần đảo Marshall, *A. chrysogaster* là loài đặc hữu của quốc đảo Mauritius, *A. chagosensis* chỉ phân bố tại quần đảo Chagos (một phần của Lãnh thổ Ấn Độ Dương thuộc Anh), loài *A. ankindynos* được xác nhận tại một số đảo thuộc vùng rạn san hô Great Barrier và một số đảo thuộc Tây Bắc Úc. Một số ít loài có vùng phân bố rộng như *A. ephippium* được tìm thấy tại quần đảo Andaman và Nicobar tới bờ biển phía tây Thái Lan, Malaysia, 2 đảo Sumatra và Java, loài *A. allardi* được phân bố ở phía tây Ấn Độ Dương, dọc theo vùng duyên hải Đông Phi, từ Durban đến Kenya, các đảo Europa, Comoros, Madagascar và quần đảo Mascarene [33, 42, 78].

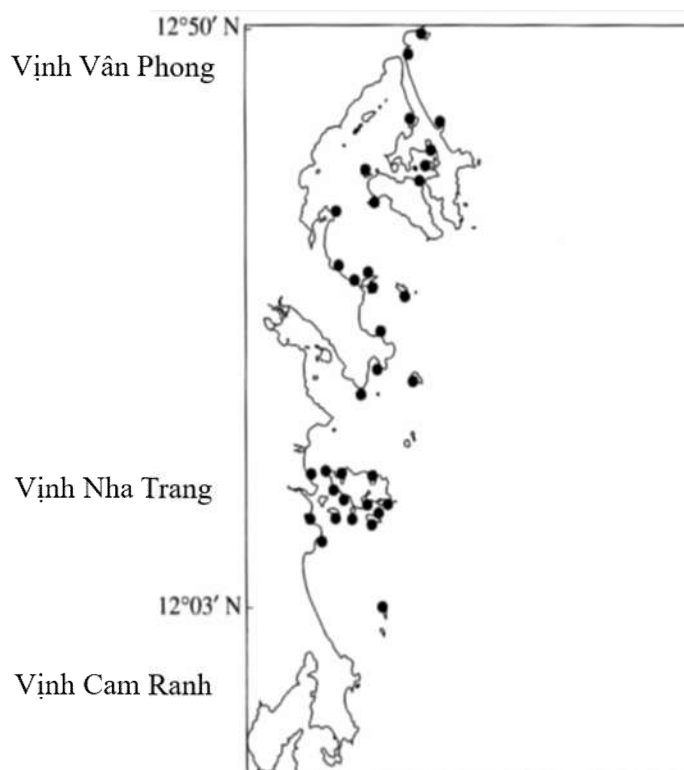


 : địa điểm cá KCYN phân bố

Hình 1.1 Phân bố cá khoang cổ yên ngựa trên thế giới [106]

Về mặt địa lý, cá KCYN có vùng phân bố rộng, từ 36°N - 33°S, 91°E - 164°E ở vùng biển Tây Thái Bình Dương trên toàn bộ vùng biển Ấn Độ - Malaysia. Ở phía đông, phạm vi phân bố của cá KCYN bị hạn chế bởi bờ biển phía đông Philippines, bờ biển phía bắc New Guinea và bờ biển phía đông của Quần đảo Solomon [35, 41]. Ở phía bắc, phạm vi phân bố của loài này bao gồm các đảo phía nam của Quần đảo Ryukyus [128]. Ở Biển Đông, loài này được ghi nhận từ vùng biển ven bờ của Trung Quốc, Đài Loan [138], Việt Nam, Singapore và Philippines [33].

Tại Việt Nam, cá KCYN phân bố dọc bờ biển Nam và Trung bộ Việt Nam, từ vùng biển Côn Đảo đến đảo Lý Sơn và Bạch Long Vĩ, đây là loài thường gặp tại vùng biển Khánh Hòa trong đó có vịnh Nha Trang, vịnh Vân Phong, vịnh Nha Phu, vịnh Cam Ranh và quần đảo Trường Sa. Tại Khánh Hòa, cá KCYN phân bố dọc theo bờ biển từ ở các điểm phía bắc, trung tâm thành phố Nha Trang và phía nam của vùng biển ven bờ, từ 12°03'N (Hòn Mỹ Giang, vịnh Vân Phong) đến 12°50'N (Cảng Hàng không quốc tế Cam Ranh, vịnh Cam Ranh). Trong đó, vùng được khảo sát và cá KCYN phân bố tập trung đó là rạn san hô vịnh Nha Trang [33, 46].



Hình 1.2 Phân bố cá khoang cổ yên ngựa ven bờ tỉnh Khánh Hòa [46]

Tại vùng biển Khánh Hòa, cá KCYN phân bố ở tất cả các dạng nền đáy bao gồm nền đáy san hô sống, nền san hô chết tảo-san hô, dốc đá ngầm, sườn bazan, nền cát – sét và các vùng rãnh giữa các dải đá ngầm có đáy trầm tích hoặc đá vụn, những nơi có các loài hải quỳ phù hợp với sự cộng sinh của loài phân bố. Có khoảng trên 1.000 loài hải quỳ, tuy nhiên mỗi loài cá khoang cổ chỉ cộng sinh được với một số loài hải quỳ nhất định và cộng sinh này là bắt buộc trong tự nhiên với cá khoang cổ. Tại Khánh Hòa, cá KCYN được ghi nhận cộng sinh với các loài hải quỳ: *Stichodactyla haddoni*, *Heteractis crispa*, *Macroductyla doreensis*, và *Entacmaea quadricolor* [46, 78].

Đặc điểm sinh sống của cá khoang cổ theo quần đàn nhỏ từ 2 con trở lên, nghiên cứu thử nghiệm xác định mối tương quan giữa kích thước của hải quỳ và số lượng cá khoang cổ sống cộng sinh song kết quả không có ý nghĩa thống kê. Trên thực tế, số lượng cá thường từ 4 đến 12 cá thể trong đó có 2 cá thể có kích thước lớn nhất đóng vai trò là cá bố mẹ, các con còn lại có thể không có quan hệ huyết thống với cặp bố mẹ [38, 39, 45, 46].

Do cơ thể cá nhỏ bé, màu sắc sặc sỡ nên dễ dàng làm mồi cho các sinh vật ăn thịt khác nếu thiếu hải quỳ, vì vậy, người ta còn gọi cá khoang cổ là cá hải quỳ. Cá khoang cổ là loài ăn tạp, chúng có thể ăn những thức ăn mà hải quỳ không thể tiêu

hoá, những xúc tu bị chết của hải quỳ cũng là thức ăn của cá. Ngược lại, khi cá tha thức ăn về tổ, những thức ăn rơi vãi sẽ là nguồn dinh dưỡng để hải quỳ tồn tại. Chưa có nghiên cứu nào phát hiện cá khoang cổ sống độc lập không có hải quỳ trong điều kiện tự nhiên mặc dù vẫn phát hiện ra nhiều cụm hải quỳ sống mà không có cá khoang cổ cộng sinh. Do đó có thể nói trong tự nhiên, đời sống của cá khoang cổ lệ thuộc vào hải quỳ nhiều hơn hải quỳ lệ thuộc vào cá khoang cổ [33, 81].

Trong điều kiện nhân tạo, khi không bị các nguy cơ cá dữ tấn công, cá khoang cổ sinh trưởng và phát triển bình thường mà không cần sự có mặt của hải quỳ. Chưa có ghi nhận nào về hiệu quả sinh sản của cá khoang cổ có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa nuôi cá khoang cổ và hải quỳ hay chỉ nuôi cá khoang cổ [43]. Vì vậy, đa số các thử nghiệm sinh sản cá khoang cổ hiện nay, chỉ có cá khoang cổ được nuôi dưỡng trong môi trường nhân tạo mà không có sự hiện diện của hải quỳ vẫn đạt được các kết quả khả quan [61, 174].

1.1.4. Đặc điểm hình thái

Cá KCYN có hình thái tia vây lưng D. X – XI, 12 – 16; tia hậu môn A. II - III, 11 – 12; vây bụng V. 1, 7; tia vây ngực P. 18 – 19; chiều dài thân bằng 3,0 – 3,5 chiều dài đầu; vây đường bên dao động từ 48 đến 55 hàng vây (thường từ 52-54 hàng vây); hàng vây ngang từ gốc của vây lưng đến đường bên là 4 -5 vây; từ đường bên đến gốc vây hậu môn là 17 – 21 vây; răng hình nón, số lượng khoảng từ 34 – 38 ở mỗi hàm [25, 33]



Hình 1.3 Hình dạng ngoài cá khoang cổ yên ngựa [181]

Cá KCYN là cá có kích thước lớn so với một số loài cá khoang cổ khác như khoang cổ nemo hay khoang cổ đỏ, kích thước tối đa của khoang cổ yên ngựa lên đến khoảng trên 14 cm. Cá KCYN giai đoạn nhỏ và giai đoạn trưởng thành có những khác biệt về màu sắc bên ngoài. Ấu trùng cá KCYN mới nở ra thường chưa có khoang, sau khi cá nở khoảng 5-7 ngày sẽ hình thành khoang thứ 1 sau đó sẽ hình thành khoang thứ hai sau 25-30 ngày nở và hai khoang trắng sẽ tồn tại suốt đời trên mình cá trong đó khoang thứ hai biến đổi thành hình yên ngựa. Cơ thể cá KCYN trưởng thành có màu đen tuyền, trên thân có hai khoang có màu trắng sáng trong đó khoang thứ nhất ở phần xương nắp mang, khoang thứ hai chỉ khoảng $\frac{1}{2}$ cơ thể và phình to ở giữa thân tạo thành hình như yên ngựa. Phần miệng cá thường có màu cam, các gốc vây có màu đen nhưng phần rìa vây lưng và vây đuôi có màu trắng [33, 37].

1.1.5. Đặc điểm dinh dưỡng

Thành phần thức ăn chính của cá khoang cổ là sinh vật phù du chủ yếu là chân mái chèo và rong tảo biển. Ngoài ra còn có các loại khác như thân mềm, trứng cá, giun... Thỉnh thoảng có cả trứng cá trong ruột những cá đang chăm sóc tổ, những trứng chết được nhả ra đều dẫn bởi cá bố mẹ và được tiêu hóa trong suốt quá trình ấp nở. Một số tác giả cho rằng trong điều kiện nuôi sinh sản nhân tạo, cá bố mẹ sẽ ăn trứng của chính mình đẻ ra nếu người nuôi không cách ly chúng khỏi ổ. Ấu trùng cá khoang cổ mới nở dinh dưỡng bằng noãn hoàng. Giai đoạn ấu trùng thức ăn chủ yếu là động vật phù du, khi cá lớn hơn bắt đầu ăn được các loài tôm, cua nhỏ, mảnh vụn hữu cơ và rong, tảo [34, 79].

Giáp xác chân chèo Copepoda là thức ăn chính của cả 4 loài cá khoang cổ *A. chrysopterus*, *A. melanopus*, *A. perideraion*, *A. tricinctus* khi khảo sát tại vùng rạn Eniwetak Atoll với tỷ lệ từ 25-40% thức ăn trong bụng cá, tương tự như kết quả quan sát thành phần thức ăn của cá khoang cổ tím, khoang cổ đỏ và khoang cổ đen đuôi vàng ở vịnh Nha Trang cũng cho thấy chân chèo chiếm tỷ lệ cao từ 35 – 41% trong thành phần thức ăn của cá. Sự khác biệt nằm ở tỷ lệ rong trong thành phần thức ăn của cá tại quần đảo Eniwetak Atoll chiếm từ 27-44% trong thành phần thức ăn của cá, thậm chí cao hơn cả giáp xác chân mái chèo, song tại vùng vịnh Nha Trang, các loại thức ăn chiếm tỷ lệ tiếp theo là động vật có bao (Oikopleura, Tunicata) chiếm 18%, nhóm có vỏ (Ostracoda) chiếm 9%, trứng 5,77% và rong biển chỉ chiếm khoảng 5%.

Ngoài ra một số loại thức ăn khác cũng có trong dạ dày cá khoang cổ gồm động vật thân mềm (Mollusca), giun (Nematoda), chân đều (Isopoda), bơi nghiêng (Amphipoda), râu nhánh (Cladocera), tôm cá (Mysidacea) [18, 19, 33]

Bảng 1.2 Thành phần thức ăn một số loài cá khoang cổ tại Eniwetak Atoll [33]

Tỷ lệ thức ăn (%)	<i>A. chrysopterus</i>	<i>A. melanopus</i>	<i>A. perideraion</i>	<i>A. tricinctus</i>
Copepoda	39,7	37,5	25,0	37,0
Rong	30,0	26,7	43,5	32,1
Worms	10,7	8,4	9,5	10,2
Tunicates	4,8	7,5	3,5	7,2
Bơi nghiêng (Amphipos)	3,3	0,2	3,5	5,0
Isopod	3,0	-	0,5	0,4
Thân mềm	3,4	11,6	7,5	1,8
Tôm	0,6	-	-	-
Cua	0,2	-	0,4	-
Giun	0,2	-	-	-
Ostracod	0,2	-	-	0,1
Nhiều tơ	0,1	0,2	-	-
Khác...	3,8	7,9	6,6	6,2

Khi kiểm tra thành phần thức ăn trong dạ dày cá khoang cổ, trứng cá khoang cổ thỉnh thoảng bắt gặp trong dạ dày của những cá bố mẹ đang chăm sóc ổ trứng của cá sống vùng Eniwetak Atoll và vịnh Nha Trang, có thể do tập tính chăm sóc trứng của cá bố mẹ đó chính là những trứng không nở hoặc phôi bị dị hình cá bố mẹ loại bỏ trong quá trình chăm sóc [18, 33].

Nhiều nghiên cứu trước đây của các nhà khoa học Pháp đã thử nghiệm nuôi cá *A. ocellaris* giai đoạn đầu bằng Rotifer *Brachionus plicatilis* và ấu trùng của *Artemia* đã cải thiện tỷ lệ sống của ấu trùng từ 5% lên 40% sau 30 ngày nuôi (Alayse, 1983). Tần xuất xuất hiện nhóm thức ăn trong dạ dày của khoang cổ đen đuôi vàng và khoang cổ đỏ ở vịnh Nha Trang gồm nhóm chân mái chèo Copepoda là cao nhất, chiếm tỷ lệ

xuất hiện lần lượt là 92,52% và 100%; tiếp theo là các nhóm thức ăn bao gồm có bao (Oikopleura, Tunicata) chiếm 58,88 và 43%; trứng cá và rong biển cũng là một loại thường xuyên xuất hiện trong dạ dày 2 loài cá này với tỷ lệ lần lượt 56,07 % và 55,14 % ở khoang cổ đen đuôi vàng và 40%, 46% ở khoang cổ đỏ. Ngoài ra các loài thức ăn khác cũng thường có trong thức ăn đó là nhóm động vật có vỏ, giáp xác vụn, tảo và ấu trùng động vật thân mềm, chân đều (Isopoda), bơi nghiêng (Amphipoda), tôm cám (Mysidacea) [18].

Nhiều nghiên cứu trước đây của các nhà khoa học Pháp đã thử nghiệm nuôi cá *A. ocellaris* giai đoạn đầu bằng Rotifer *B. plicatilis* và ấu trùng của *Artemia* đã cải thiện tỷ lệ sống của ấu trùng từ 5% lên 40% sau 30 ngày nuôi (Alayse, 1983). Trong khi các nhà khoa học Nga tiến hành nuôi khoang *A. ocellaris* giai đoạn đầu bằng Rotifer *B. plicatilis* kết quả cho tỷ lệ sống tăng từ 12,5% - 52,%. Một số nghiên cứu khác dùng rong *Caulerpa* trong hệ thống nuôi làm thức ăn cho cá con *Amphiprion* sp. trong khi cá con *A. akallopisos* được nuôi bằng nguyên sinh động vật có tiêm mao *Euplotes* và tảo xanh lục.

Kết quả của các khảo sát thành phần thức ăn trong ruột cá cho thấy, cá khoang cổ là nhóm ăn tạp, thức ăn chủ yếu có nguồn gốc động vật, phổ thức ăn tương đối rộng và chuỗi thức ăn ngắn nên năng lượng có ích là khá cao. Nghiên cứu về dinh dưỡng trên cá khoang cổ đen đuôi vàng cho thấy Copepoda là nhóm có tần số xuất hiện thức ăn gặp nhiều nhất so với các loại thức ăn khác (chiếm 92,52%), sau đó đến Tunicata (58,88%), trứng cá (56,07%), rong Enteromorpha (55,14%), Ostracoda và nhiều nhóm khác với tần số ít hơn. Kết quả cũng tương tự ở cá khoang cổ loài *A. frenatus* với thành phần xuất hiện Copepoda trong thức ăn chiếm 100% [126] .

Ở giai đoạn ương áp ấu trùng, thời gian cung cấp thức ăn, thành phần thức ăn cũng là một trong những yếu tố đầu tiên quyết định hiệu quả ương nuôi. Thức ăn là nguồn dinh dưỡng ngoài đầu tiên đưa vào cơ thể cá để duy trì sự sống thay thế cho nguồn dinh dưỡng từ noãn hoàng được sử dụng trong suốt quá trình ấp nở. Thử nghiệm trên cá khoang cổ đỏ cho thấy chế độ thức ăn có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống và sự tăng trưởng của cá dưới một tháng tuổi. Cá được ăn Rotifer *B. plicatilis* kết hợp với tảo tươi *Nannochloropsis oculata* từ một ngày tuổi và *Artemia* ở cá 3 ngày tuổi, có tỷ lệ sống 70,83 – 72,50%, cá cho ăn bằng *Artemia* chỉ đạt tỷ lệ sống từ 10,83 – 27,50%. Cá giống sử dụng Rotifer kết hợp với tảo tươi *N. oculata* và *Artemia*, sau 30

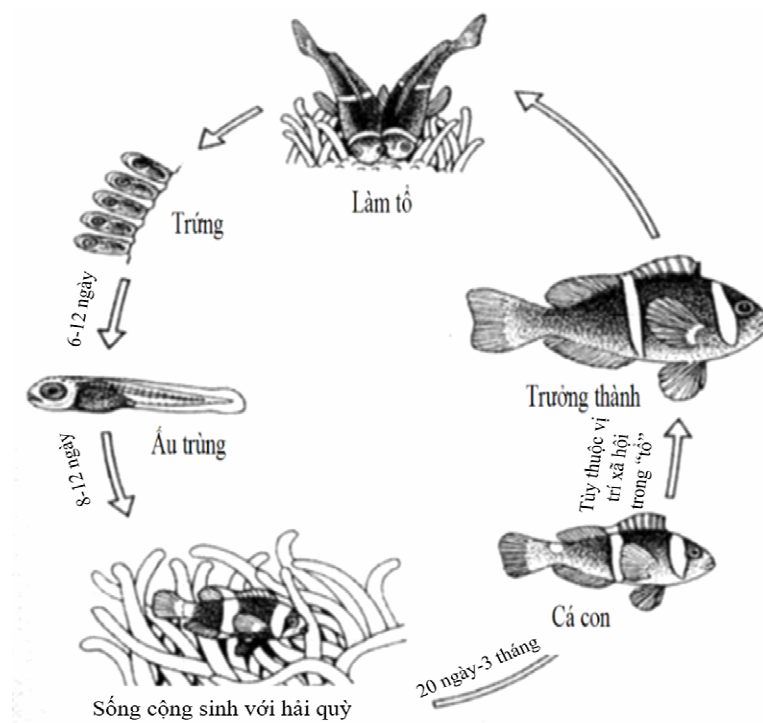
ngày tuổi có chiều dài trung bình là 19 mm cao hơn đáng kể so với cá sử dụng thức ăn tổng hợp Frippak 300 (14 mm) [21]. Khi cung cấp thức ăn sống trong quá trình ương ấp ấu trùng như tảo hay các động vật phù du, bên cạnh việc phụ thuộc vào thời tiết còn là chi phí nhân công và nguyên vật liệu... Vì vậy, thử nghiệm thức ăn công nghiệp được tiến hành nhằm xác định thời điểm thích hợp cá có thể thay thế thức ăn sống bằng thức ăn công nghiệp là mục đích của người nuôi.

Cá khoang cổ là loài ăn tạp, thức ăn chủ yếu có nguồn gốc sinh vật nổi, phổ thức ăn tương đối rộng và chuỗi thức ăn ngắn, đây là một trong những ưu điểm của đối tượng nuôi. Tùy vào mục đích của nuôi dưỡng cá, sử dụng các loại thức ăn khác nhau trong nuôi cá cảnh biển trong đó có cá khoang cổ. Tại Việt Nam, trong quá trình nuôi dưỡng cá khoang cổ các loại cho mục đích nuôi cảnh, người chơi thường sử dụng các loại thức ăn công nghiệp sử dụng cho cá biển nói chung được bán rộng rãi trên thị trường như Ocean Nutrition 2, 3. Một số loại thức ăn chế biến thường được sử dụng cho nuôi thuần dưỡng và thành thực, sinh sản cá biển trong đó có một số loài cá khoang cổ. Chưa có thành phần dinh dưỡng chế biến sử dụng cho cá khoang cổ tại Việt Nam, song trong thành phần thức ăn thường bao gồm thịt tôm, thịt động vật thân mềm, trứng gà, Nauplii của Artemia, Copepoda và thực vật như rong biển, vi tảo và một phần thức ăn tổng hợp... với nguồn gốc đa dạng, hàm lượng dinh dưỡng chưa được khống chế bằng công thức mà thường do kinh nghiệm và tham khảo tài liệu, kết quả thu được khả quan cho nuôi sinh sản cá khoang cổ nemo, khoang cổ đỏ và khoang cổ cam. Tuy nhiên, với mỗi loài cá, nhu cầu dinh dưỡng là không giống nhau, việc xác định thành phần thức ăn phù hợp cho cá KCYN là cần thiết nhằm thử nghiệm nuôi sinh sản cá trong điều kiện thí nghiệm [65, 165].

1.1.6. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển

Cá khoang cổ có tập tính vòng đời giống nhau và cùng sống cộng sinh với hải quỳ, đây là nhóm cá đẻ trứng dính với số lượng trứng thay đổi tùy loài và điều kiện dinh dưỡng. Trong quá trình phát triển của các loài cá khoang cổ có những thay đổi cụ thể khác nhau giữa các giai đoạn về tập tính sống và thức ăn, tuy nhiên có những giai đoạn cá có tập tính phát triển gần giống nhau như kết cặp, làm tổ, đến cá sinh sản trong các góc hải quỳ hoặc hốc đá, san hô và phát triển đến giai đoạn trưởng thành với cùng một vòng đời trong điều kiện tự nhiên. Cá khoang cổ thường đẻ ở các giá thể

cứng như đá tảng hoặc hốc san hô chết. Sau thời gian trung bình từ 6-8 ngày ở nhiệt độ 25-27⁰C, cá nở và sống trôi nổi trên bề mặt nước, di chuyển thụ động theo dòng hải lưu. Quá trình nở diễn ra vào ban đêm, cá con vừa nở ra chìm xuống đáy, sau vài phút, chúng bơi ngược lên. Kích thước ấu trùng dài khoảng từ 2–4 mm và toàn thân trong suốt ngoại trừ những điểm sắc tố trên thân, mắt và túi noãn hoàng.



Hình 1.4 Vòng đời cá khoang cổ [145]

Giai đoạn ấu trùng cá khoang cổ kéo dài từ 8 – 12 ngày. Suốt giai đoạn này, ấu trùng sống trôi nổi trong tầng mặt của biển và chúng được dòng chảy đưa đi. Kết thúc giai đoạn này khi ấu trùng cá xuống sống đáy và bắt đầu có màu sắc của cá con. Quan sát trong bể kính cho thấy quá trình biến thái diễn ra chỉ trong một vài ngày.

Ở giai đoạn này, điều cần thiết cho cá con là tìm một vật cộng sinh hải quỳ thích hợp hoặc sẽ bị địch hại ăn thịt. Khi chuyển sang giai đoạn cá giống, cá bắt đầu sống cộng sinh với hải quỳ, thời gian sống cộng sinh phụ thuộc vào việc cá con tìm được “tổ” hải quỳ thích hợp, thường từ 7-30 ngày, khi cá đã hoàn thiện hệ thống tiêu hóa và di chuyển chủ động. Cùng với sự phát triển về kích thước, cá phát triển thành cá con và tiền trưởng thành trong “tổ” với tốc độ nhanh, trung bình khoảng 2-3 tháng tuổi, sau đó tùy thuộc vào vị trí xã hội mà cá tiếp tục phát triển về kích thước và khối lượng đồng thời kết cặp để nở thành cá đực hoặc cái chức năng và đẻ trứng ở $\geq 1^+$ tuổi [35].

Theo lý thuyết, trong các nhóm xã hội, độ lệch sinh sản cao được dự đoán sẽ phát sinh khi sản lượng sinh sản của một nhóm bị hạn chế và các cá thể chi phối có thể ngăn chặn các nỗ lực sinh sản của cấp dưới. Ước chế sinh sản thường được cho là xảy ra thông qua sự gây hấn quá mức hoặc đe dọa trực xuất ra khỏi cụm hải quỳ. Một thí nghiệm kiểm tra giả định ở cá khoang cổ cam *A. percula* để kiểm tra xem “cấp trội” bố mẹ có đuổi được cặp cá khác có khả năng tranh giành “tổ” hay không, điều này sẽ tạo ra động lực cho “cấp dưới” từ bỏ sinh sản. Thí nghiệm cho thấy rằng “cấp dưới” có kích thước lớn bằng cặp trội “bố mẹ”, có khả năng bị đuổi ra khỏi “tổ” cao gấp 7 lần so với cấp dưới chưa trưởng thành có kích thước nhỏ hơn. Thí nghiệm cũng cho thấy, kích thước cá nhỏ bằng khoảng 80% so với cặp cá bố mẹ, chúng ít có nguy cơ bị đuổi ra khỏi đàn [151]. Vì vậy, kích thước và khối lượng cá khoang cổ phụ thuộc chính vào vị trí xã hội của nó trong “tổ”.

Bảng 1.3 Tốc độ tăng trưởng trung bình một số loài cá khoang cổ [33, 79, 96, 166]

Loài	Tốc độ tăng trưởng (mm/tháng)	Tham khảo	Giai đoạn phát triển
<i>A. percula</i>	11,6	Verwey, 1930	GĐ con non
<i>A. perideraion</i>	2,9-11,6	Allen, 1972	GĐ con non & trưởng thành
<i>A. chrysopterus</i>	2,8-7,0	Helfrich, 1958	GĐ trưởng thành
<i>A. tricolor</i>	2,3-3,6	Allen, 1972	GĐ trưởng thành
<i>A. melanopus</i>	1,9-2,6	Helfrich, 1958	GĐ trưởng thành
<i>A. chrysopterus</i>	0,7-7,0	Allen, 1972	GĐ trưởng thành

Sự sinh trưởng của cá khoang cổ khác nhau tùy từng loài, nhưng ngay những cá thể cùng loài cũng có sự khác biệt. Giai đoạn con non và tiền trưởng thành, cá có tốc độ tăng trưởng nhanh nhất ở đa số các loài khoang cổ, có thể lên đến trên 11 mm/tháng. Tốc độ này giảm đi nhiều ở giai đoạn cá trưởng thành, tùy từng tháng và loài cá mà tốc độ tăng trưởng trung bình có thể từ 0,7-7 mm/tháng. Thí nghiệm của Allen (1972) thấy rằng trong một đàn cá nuôi, những cá lớn sẽ tăng trưởng nhanh hơn những cá nhỏ trong cùng một đàn do chúng cạnh tranh thức ăn mạnh mẽ hơn. Trên cơ sở tính toán chiều dài nội suy, Hà Lê Thị Lộc (2005) ước tính được mức sinh trưởng chiều dài trung bình của các nhóm tuổi của cá khoang cổ đỏ, trong đó ở giai đoạn con non, cá phát triển nhanh gấp hai lần mức tăng trưởng ở giai đoạn 2⁺ tuổi. Giai đoạn 1⁺ tuổi, sinh trưởng chiều dài của cá khoang cổ đỏ là 46,42 mm, đến giai đoạn 2⁺ tuổi, chiều dài

thân cá tăng 26,64 mm, mức tăng trưởng tương ứng là 53,08%. Từ 3⁺ -4⁺ tuổi, sinh trưởng chiều dài cá chậm lại, cá chỉ tăng từ 17,7 mm đến 11,78 mm, tương ứng mức tăng trưởng chiều dài là 24,91% và 13,27% [20, 21].

Cá KCYN có kích thước cơ thể nhỏ, cá trưởng thành có chiều dài tối đa 14 – 15 cm. Tuổi thọ trung bình của cá khoang cổ ngoài tự nhiên được xác định từ 6 - 10 tuổi, nhưng trong nuôi nhốt chúng có thể sống trên 18 – 30 năm do tránh được các điều kiện tự nhiên không thuận lợi hoặc các bị loài cá dữ tấn công [49].

1.1.7. Đặc điểm sinh học sinh sản cá khoang cổ

1.1.7.1. Mùa vụ sinh sản

Mùa vụ sinh sản là hiện tượng có tính chu kỳ và mang tính thích nghi loài với môi trường sống. Mùa vụ sinh sản thường diễn ra vào thời điểm thuận lợi cho sự phát triển của trứng và cá con sau khi đẻ. Đa số cá đều chịu tác động của các yếu tố ngoại cảnh có tính chu kỳ như nhiệt độ, ánh sáng, dòng chảy, thủy triều, thức ăn .. đến mùa vụ sinh sản. Ở vùng nhiệt đới, nhiều tác giả cho rằng các loài cá khoang cổ có khả năng sinh sản quanh năm. Vùng biển cận nhiệt đới, sự sinh sản thường diễn ra vào mùa xuân và mùa hè khi nhiệt độ nước lên cao nhất. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng đưa ra giả thuyết, sự đẻ trứng của cá khoang cổ chịu ảnh hưởng trực tiếp của chu kỳ trăng. Tại vùng rạn san hô Enewetak Atoll (trung tâm Thái Bình Dương), sự đẻ trứng của cá chịu ảnh hưởng trực tiếp của chu kỳ trăng, hầu hết tổ được làm khi trăng tròn hoặc khi gần tròn. Theo Allen (1972) và Ochi (1985), sự sinh sản của cá khoang cổ thường diễn ra trong khoảng thời gian 6 ngày trước hoặc sau kỳ trăng tròn. Ánh sáng trăng có thể là một tín hiệu đến kỳ sinh sản của cá. Ngoài ra, vì ấu trùng mới nở có tính hướng quang nên ánh sáng trăng có lẽ hướng chúng bơi lên bề mặt nước, từ đó chúng có thể phát tán đi bởi sóng và dòng chảy khi triều lên [33, 68, 80, 139].

Theo Madhu (2006, 2012), hoạt động sinh sản của cá khoang cổ *A. percula* và *A. sandaracinos* diễn ra quanh năm, giảm nhẹ vào thời kỳ gió mùa Tây Nam. Kích cỡ cá bố mẹ hay nhiệt độ nước không ảnh hưởng đến hệ số thành thực; ngược lại, chu kỳ trăng lại ảnh hưởng đáng kể với xu hướng hệ số thành thực cao hơn vào tuần thứ nhất (trăng tròn) và thứ ba (trăng non) của chu kỳ so với tuần thứ hai và tuần thứ bốn trong tháng. Ở cả đực và cái, hệ số thành thực thấp từ tháng 6 – 9 và tăng trở lại sau đó. Tuy nhiên, giả định này thường được kiểm chứng với cá tự nhiên còn trong điều kiện nhân tạo, chưa có cơ sở nào khẳng định giả thuyết này [122, 123, 125].

Các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm cho thấy sự sinh sản của cá khoang cổ không bị ảnh hưởng của kỳ trăng tròn. Một cặp cá bố mẹ có thể tham gia sinh sản liên tục. Mỗi đợt sinh sản cách nhau từ 11 đến 14 ngày trong điều kiện cặp cá đó được chăm sóc tốt và môi trường nuôi ổn định. Trong đó *A. frenatus* có thể tham gia sinh sản quanh năm nhưng tỷ lệ tập trung từ tháng 01 đến tháng 08 trong năm. Đỉnh cao nhất là tháng 03 và 05 với tỷ lệ cá tham gia sinh sản tương ứng theo tháng là 69,70% và 72,73% [123-125].

1.1.7.2. Hệ số thành thực

Khối lượng tuyến sinh dục là một trong những chỉ tiêu thiết yếu để giải thích mức độ chín muồi của các sản phẩm sinh dục và hệ số thành thực (GSI) thường được sử dụng nhiều trong các công trình nghiên cứu hiện nay. Hệ số thành thực cho phép theo dõi quá trình chín của các sản phẩm sinh dục. Tuy nhiên, nó không phản ánh đầy đủ trạng thái thực của các sản phẩm sinh dục. Mặc dầu đại lượng của hệ số này là đại lượng biến thiên theo cá thể, nhưng dù sao nó cũng có thể là đặc trưng cho quá trình phát triển của các sản phẩm sinh dục, mà quá trình này lại là thuộc tính của từng loài.

Bảng 1.4 Hệ số thành thực của cá khoang cổ cam tại Andaman và Nicobar [123]

Tháng	Số mẫu		Khối lượng cá (g)		Khối lượng buồng trứng và tinh sào (g)		GSI	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
1	58	55	13,19	6,79	0,30	0,1	2,28	1,64
2	59	55	13,46	6,83	0,30	0,11	2,23	1,62
3	54	67	13,25	7,04	0,30	0,12	2,25	1,63
4	59	68	13,86	6,94	0,30	0,1	2,15	1,41
5	67	56	13,8	6,73	0,29	0,06	2,10	0,92
6	60	68	12,83	5,32	0,23	0,03	1,80	0,62
7	60	54	12,53	5,41	0,22	0,05	1,74	0,82
8	53	53	12,23	6,00	0,23	0,07	1,86	1,00
9	62	55	12,00	6,07	0,23	0,07	2,00	1,20
10	50	55	11,55	7,23	0,24	0,1	2,10	1,44
11	51	48	13,75	7,15	0,30	0,1	2,19	1,46
12	62	60	14,0	6,19	0,30	0,1	2,17	1,58

Theo nghiên cứu trên 695 con cái và 694 con đực cá khoang cổ cam tại đảo Andaman và Nicobar (Ấn Độ), cho thấy khối lượng trung bình cá cái gần gấp đôi cá đực với giá trị lần lượt là 13,03 g và 6,48 g; GSI trung bình của cá cái 2,07 và đạt 1,27 ở cá đực. Cá khoang cổ cam có hệ số thành thực sinh dục (GSI) dao động từ 1,74 - 2,28 ở con cái và 0,62 - 1,64 ở con đực với đỉnh cao vào tháng 1 trong năm.

Ở cả hai loài khoang cổ *A. nigripes* và *A. percular* đều cho thấy, hệ số thành thực đực, cái riêng biệt và giá trị của hệ số thành thực con cái luôn cao hơn con đực [122]. Yếu tố có tính chất quyết định với sự phát triển của tuyến sinh dục cá và hệ số thành thực chính là điều kiện dinh dưỡng, đặc biệt trong điều kiện nuôi nhân tạo [123-125].

1.1.7.3. Sức sinh sản và chu kỳ sinh sản

Cá khoang cổ có tốc độ sinh trưởng chậm, là nhóm cá rạn có kích thước nhỏ phù hợp với nuôi cảnh, là loài cá đẻ trứng dính nghĩa là cá bố mẹ có tập tính chăm sóc trứng từ giai đoạn ấu trùng đến khi cá nở, kích thước tế bào trứng lớn nên sức sinh sản thường thấp hơn so với các loài cá đẻ trứng nổi hoặc bán trôi nổi. Chưa có sự so sánh về sức sinh sản tuyệt đối, tương đối của nhiều loài cá khoang cổ trong tự nhiên và trong nuôi nhân tạo [33, 53, 150].

Bảng 1.5 Sức sinh sản của cá khoang cổ [33, 53, 150]

TT	Tên khoa học	Số lần đẻ/năm	Số trứng/tổ	Số trứng trung bình/cặp	Tác giả
<i>Trong tự nhiên</i>					
1	<i>A. akindynos</i>	6,7	700-5.025	2.810-26.890	Richardson et al (1997)
2	<i>A. chrysogaster</i>	8,5	400	3.000-5.000	Allen (1972)
3	<i>A. clarkii</i>	7	1.000-2.500	8.000-17.500	Bell (1976)
4	<i>A. clarkii</i>	5,5	1.600-5.400	11.000-15.000	Ochi (1985, 1989)
5	<i>A. latezonatus</i>	8	800-3.870	10.470-33.140	Richardson et al (1997)
6	<i>A. melanopus</i>	19,8	200-400	7.200	Rose (1978)
7	<i>A. perideraion</i>	8,5	300-700	2.400-4.000	Allen (1972)
<i>Trong nhân tạo</i>					
8	<i>A. clarkii</i>	34,6	-	5.220-11.772	Hof (1996)
9	<i>A. frenatus</i>	27,2	309-551	3.708-6.612	Hof (1996)
10	<i>A. melanopus</i>	21,3	172-339	2.064-4.068	Hof (1996)
11	<i>A. ocellaris</i>	24,8	168-313	2.016-3.756	Hof (1996)
12	<i>A. percula</i>	14	67-640	804-7788	Hof (1996)
13	<i>A. sebae</i>	30	105-289	1.200-3.468	Hof (1996)
14	<i>P. biaculeatus</i>	20,7	146-986	1.752-11.832	Allen (1995)

Số lượng trứng mỗi lần đẻ của nhóm cá khoang cổ nói chung dao động từ vài trăm đến vài ngàn trứng tùy thuộc vào kích cỡ cá bố mẹ, tình trạng dinh dưỡng của cá, số lần tham gia sinh sản. So sánh giữa cá đẻ tự nhiên và trong điều kiện nhân tạo nhận thấy các loài cá khác nhau có số lần đẻ không giống nhau 2 điều kiện trên và có xu

hướng có số lần đẻ trong điều kiện nhân tạo cao hơn so với cá đẻ tự nhiên. Cao nhất là cá *A. clarkia* có số lần đẻ gần 3 lần/tháng, tổng số 34,6 lần đẻ/năm trong điều kiện nuôi nhân tạo. Tuy nhiên, số trứng/ tổ và số trứng trung bình/cặp của cá đẻ trong tự nhiên lại có xu hướng cao hơn trong điều kiện nhân tạo trong cùng loài, cá *A. clarkii* có từ 1.000- 5.400 trứng/tổ và 8.000-17.500 trứng trung bình/cặp trong tự nhiên và 435 – 981 trứng/tổ, 5220 -11.772 trứng trung bình/cặp trong điều kiện nuôi nhân tạo [33, 53, 150]. Số lần đẻ của *A. clarkii* trong tự nhiên thấp hơn so với cá trong điều kiện nuôi nhốt (lần lượt là 5.5-7 lần và 34,6 lần) [98].

Trứng cá thường có hình elip, có cuống ngắn dính vào giá thể, kích thước trứng dao động từ 2,2 - 3,9 mm, cao nhất ở *A. melanopus* và thấp nhất ở *A. nigripes*. Ổ trứng có đường kính từ 5,2 - 14,3 cm chiều dài và 4,8 - 11,5 cm chiều rộng tùy thuộc vào số lượng và kích thước của trứng [159].

Bảng 1.6 Sức sinh sản và kích thước trứng, ấu trùng trong nuôi nhân tạo [159]

Loài	Số lần đẻ/năm	Kích thước trứng (mm)	Kích thước ấu trùng (mm)
<i>A. ocellaris</i>	18	2,4	3,8
<i>A. nigripes</i>	16	2,2	3,7
<i>A. melanopus</i>	14	3,1	4,7
<i>A. clarkii</i>	17	3,0	4,4
<i>A. percula</i>	17	2,6	4,1

Theo Hà Lê Thị Lộc (2005), sức sinh sản tuyệt đối của *A. clarkii* trong điều kiện nhân tạo dao động từ 33.651-158,137 trứng/cá thể cái, sức sinh sản tương đối từ 2.506-3.970 trứng/g khối lượng cá thể cái, trung bình là 3,006 trứng/g khối lượng cá thể cái. Ở *A. frenatus*, sức sinh sản tuyệt đối cao hơn, có giá trị gần gấp đôi *A. clarkii*, từ 45.496 – 583.641 trứng/cá thể cái, trung bình là 211.850 trứng/cá thể cái và có xu hướng tăng dần khi kích thước cơ thể cá tăng lên đạt cao nhất, nên sức sinh sản cao nhất ở nhóm cá có chiều dài toàn thân từ 130-139 mm, nhưng lại giảm ở nhóm cá có kích thước lớn hơn 140 mm. Sức sinh sản tương đối của *A. frenatus* từ 3.494-13.830 trứng/g khối lượng cá thể cái, trung bình là 6,874 trứng/g khối lượng cơ thể cái [13, 17].

1.1.7.4. Giới tính, sự chuyển đổi giới tính và tỷ lệ đực cái

Đa số các loài động vật trong đó có cá xương, trong quá trình phát triển cá thể, khoang tuyến sinh dục được hình thành nhưng chưa biệt hóa, sau đó được phát triển

thành buồng trứng hoặc tinh hoàn, bao gồm một quá trình được gọi là xác định giới tính hoặc biệt hóa giới tính [1].

Cá khoang cổ được biết đến là một trong những ví dụ nổi bật nhất của loài lưỡng tính tuần tự với tính đực chín trước sau đó chuyển thành cá cái. Những con cá này sống tại một cụm hải quỳ trong hầu hết phần đời của chúng với một cấu trúc phân cấp, trong đó con cái duy nhất và lớn nhất, còn lại tất cả là con đực trong đó con có kích thước lớn nhất trong nhóm còn lại sẽ có chức năng con đực và 2 cá thể đó tạo thành cặp có vai trò “bố mẹ” trong “tổ”. Cũng như với các loài lưỡng tính đồng thời, chiến lược giao phối này của cá khoang cổ thuận lợi cho sinh sản, đặc biệt nhóm cá này không bao giờ sống xa vị trí “tổ” của chúng. Hiện tượng lưỡng tính với sự thay đổi giới tính, từ cá đực chưa trưởng thành, thành con đực hoặc cá cái chức năng phụ thuộc vào môi trường xã hội này của cá khoang cổ được gọi là thuyết lưỡng tính tuần tự. Đây là một yếu tố quan trọng trong nghiên cứu sinh học sinh sản cá khoang cổ vì không nhất định phải xác định giới tính, các thể lớn bắt buộc phải trở thành con cái và con đực sinh sản. Vì vậy, trong sinh sản nhân tạo, để tạo cặp cá bố mẹ trong các thí nghiệm và trong công nghệ sản xuất giống, chỉ cần chọn 2 cá thể với kích thước đực cái chênh lệch đáng kể là cá tự kết cặp và phát triển thành con đực và cá cái chức năng [59, 94, 171].

Phân tích về sự biến đổi tổ chức học, tuyến sinh dục của một số loài cá khoang cổ đã được đề cập, song vẫn còn nhiều vấn đề chưa có tính thống nhất cao trong các nghiên cứu của các tác giả ở tất cả các loài trong nhóm cá này. Một trong những đặc điểm sinh sản mang tính phổ biến của nhiều loài trong nhóm cá này được xác định đó là sự lưỡng tính tuần tự trong đó tính đực xuất hiện trước và sau đó cá chuyển sang tính cái (protandry) trong đó có cá khoang cổ đỏ và cá KCYN được mô tả theo các chiều hướng khác nhau [110, 113, 122].

Sự chuyển đổi giới tính của cá khoang cổ diễn tiến theo ba chiều hướng sau:

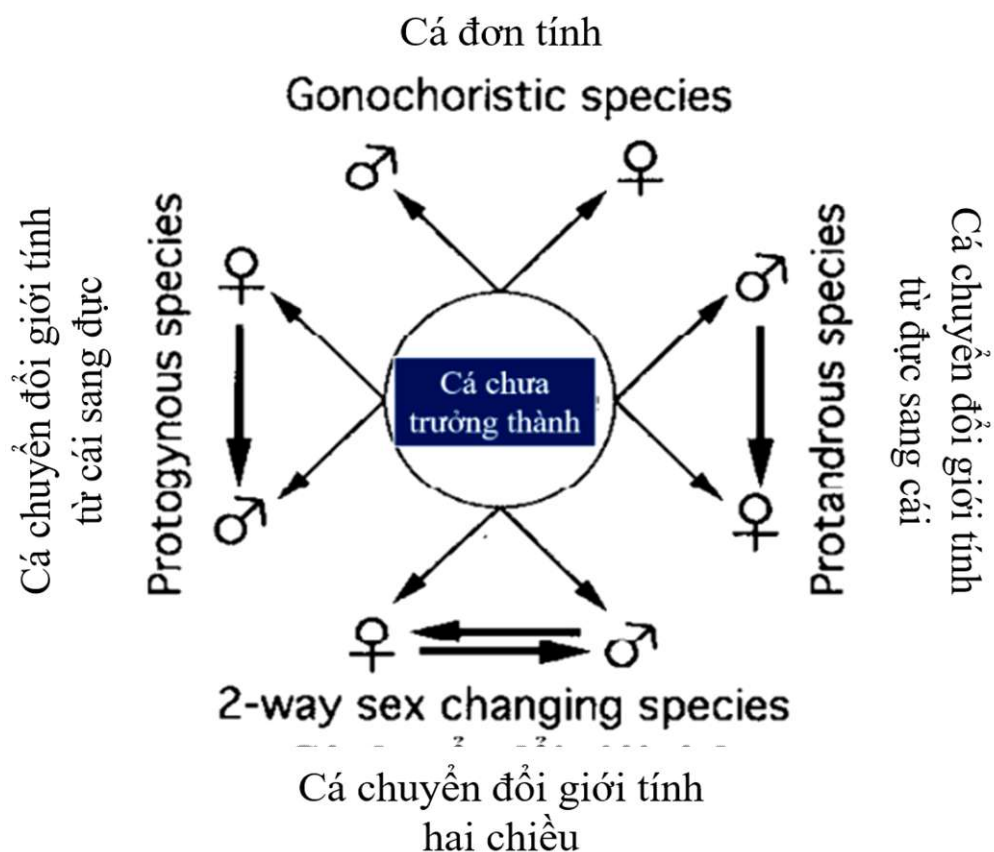
- (1) Con đực chưa trưởng thành $\longrightarrow$ con cái chưa trưởng thành $\longrightarrow$ con cái trưởng thành.
- (2) Con đực chưa trưởng thành $\longrightarrow$ con đực trưởng thành $\longrightarrow$ con cái trưởng thành.
- (3) Con đực chưa trưởng thành $\longrightarrow$ con đực trưởng thành.

Hình 1.5 Mô hình chuyển đổi giới tính của cá khoang cổ [33]

Mỗi nhóm 2 cá thể trở lên trong đó 2 con có kích thước lớn nhất tạo thành một cặp đôi đực cái cùng sinh trưởng, phát triển và sinh sản, các con khác trong nhóm đều là cá đực chưa trưởng thành. Trong cặp bố mẹ đó, kích thước và khối lượng cá khoảng cổ đực bao giờ cũng nhỏ hơn cá cái. Trường hợp con cái chết, con đực cặp đôi với một con cái khác hoặc con đực khác, khi đó một trong hai con đực có khả năng chuyển đổi thành con cái và làm nhiệm vụ sinh trứng [33].

Cấu trúc quần thể và mô học tuyến sinh dục đã được nghiên cứu ở sáu loài thuộc giống cá khoang cổ Amphiprion xảy ra ở vùng biển Nhật Bản bao gồm *A. frenatus*, *A. clarkii*, *A. polymnus*, *A. perideraion*, *A. sandracinos* và *A. ocellaris*. Tất cả các loài đều sống quanh cụm hải quỳ trong các “tổ” nhỏ bao gồm một cặp cá trưởng thành có chức năng tình dục đơn thuần (đơn tính) đó chính là hai con cá kích thước lớn nhất (con cá lớn nhất luôn là con cái và con cá lớn thứ hai luôn là con đực chức năng). Kiểm tra mô học của tuyến sinh dục chỉ ra rằng tất cả các cá thể của cả sáu loài đều là lưỡng tính ở giai đoạn cá con. Lúc đầu chỉ có mô tinh hoàn trưởng thành. Trong những điều kiện nhất định, những thứ này sau đó có thể bị thoái hóa và tuyến sinh dục thay đổi thành buồng trứng. Nghiên cứu thực địa hỗ trợ kết quả mô học cho thấy một hệ thống phân cấp thống trị nghiêm ngặt tồn tại trong mỗi “tổ” trong đó 2 con đực chức năng của cá khoang cổ đen đuôi vàng đã chuyển đổi thành con cái sau khi mất bạn tình trước đó. Qua các thực nghiệm cho thấy sáu loài cá khoang cổ ở Nhật Bản chính là các ví dụ thực tế về chuyển đổi giới tính có kiểm soát xã hội [18, 70, 130, 132].

Tuy nhiên, ở một số loài cá có sự linh hoạt giới tính mà cá có thể thay đổi giới tính trong quá trình phát triển phôi hoặc ấu trùng thậm chí ngay cả khi cá đã trưởng thành. Một số loài hoặc là lưỡng tính đồng thời nghĩa là cá có cả mô buồng trứng và tinh hoàn chức năng trong cùng thời điểm hoặc lưỡng tính tuần tự. Các loài lưỡng tính có thể được chia thành ba nhóm: lưỡng tính với tính cái chín trước (protogyny), nhóm các loài có đặc điểm sinh học sinh sản là tính đực chín trước (protandry) và nhóm một số ít loài có thể thay đổi giới tính của chúng (2-way sex change). Hiểu biết sự đa dạng về giới tính linh hoạt này chỉ duy nhất xuất hiện ở cá và như vậy, cung cấp các hệ thống mô hình tuyệt vời để điều tra các cơ chế xác định giới tính và sự khác biệt ở động vật có xương sống [113].



Hình 1.6 Mô hình phát triển giới tính cá xương [113]

Một số yếu tố về tỷ lệ đực cái ở cá khoang cổ còn có những kết luận chưa thực sự rõ ràng. Qua các nghiên cứu cho thấy, cá khoang cổ nói chung là nhóm cá đơn giao, do đó, vào mùa sinh sản tỷ lệ đực cái luôn luôn là 1:1. Tuy nhiên, kết quả thu mẫu của các nhóm cá khoang cổ từ tự nhiên cho thấy tỷ lệ cá thể đực cao hơn nhiều so với cá thể cái, lý giải vấn đề này, Hà Lê Thị Lộc (2005) cho rằng cá khoang cổ ở giai đoạn con non và tiền trưởng thành, tất cả đều là cá đực. Kết quả thu mẫu cá khoang cổ đỏ *A. frenatus* tại vùng biển Khánh Hòa đều cho tỷ lệ con đực cao hơn so với con cái trong đó vào tháng 4/2001, tỷ lệ con cái là 17%, con đực là 35% còn lại là con non. [18].

1.1.7.5. Các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục cá khoang cổ

Cơ quan sinh sản của cá xương thường gồm buồng trứng ở cá cái và túi tinh ở cá đực với những loài cá đơn tính, nghĩa là đực cái riêng biệt [1].

Tuy nhiên, cá khoang cổ là nhóm chuyển đổi giới tính với tính đực có trước và tất cả các con cá nhỏ đều là đực, tính cái sau đó tùy thuộc vào kích thước cơ thể và vị

trí xã hội trong một quần đàn, đến một kích thước và điều kiện thích hợp thì một số cá thể đực sẽ chuyển sang cái. Vì vậy, các nghiên cứu đều thống nhất là cơ quan sinh sản cá khoang cổ đực bao gồm tinh sào và noãn bào (ovotestes), trong khi đó con cái chỉ có mô buồng trứng (ovarian tissue). Trong một đàn cá, cá thể lớn nhất là cá cái có buồng trứng gồm các noãn bào và một số mô của tinh sào đã bị thoái hóa. Làm rõ sự sắp xếp phân loại giới tính của cá khoang cổ theo giả thuyết này, một số tác giả đã mô tả sự phát triển tuyến sinh dục cá khoang cổ được chia thành 6 giai đoạn bao gồm: giai đoạn chưa trưởng thành, giai đoạn đực tiền chín muồi đực, giai đoạn đực thành thực, giai đoạn chuyển tiếp, giai đoạn cái tiền chín muồi và giai đoạn cá cái thành thực [163].

Mô tả các giai đoạn phát triển của buồng trứng cá khoang cổ đỏ, Hà Lê Thị Lộc (2005) chia thành 6 giai đoạn theo thang 6 bậc của Sakun và Buskaia trong đó có sự phân biệt giữa tuyến sinh dục đực và tuyến sinh dục cái. Ở giai đoạn I, hình dạng ngoài của tuyến sinh dục không thể phân biệt được đực cái, nhưng ở giai đoạn II của tinh bào thì tế bào sinh dục đực đã phát triển thành tinh trùng, nghĩa là đã có khả năng thụ tinh. Trong tuyến sinh dục cái luôn tồn tại các noãn bào ở những giai đoạn phát triển khác nhau và việc mô tả buồng trứng các giai đoạn dựa vào sự phát triển của tế bào trứng và cơ quan sinh sản được gọi là buồng trứng. Tuy nhiên, nhóm tác giả chỉ dừng ở mô tả và minh họa các giai đoạn tuyến sinh dục ở cá khoang cổ đỏ cái giai đoạn III, IV và V mà chưa có các mô tả chi tiết cho noãn sào cá các giai đoạn phát triển tương ứng [18].

1.2. NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT GIỐNG NHÂN TẠO CÁ CẢNH BIỂN

1.2.1. Nghiên cứu sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển trên thế giới

Nghề nuôi cá cảnh có nguồn gốc khá lâu đời, từ thế kỷ thứ X, cá cảnh được lưu giữ tại châu Á, sau đó, đến thế kỷ XVI phát triển sang châu Âu và Mỹ. Tuy nhiên, nghề nuôi cá cảnh biển mới chỉ bắt đầu trong vài chục năm trở lại đây, tập trung vào các đối tượng như cá ngựa, cá bống, cá khoang cổ và cá chìa vôi. Cho đến nay, nhiều đối tượng cá cảnh biển đã được nghiên cứu, sản xuất giống nhân tạo thành công nhưng vẫn chiếm tỷ lệ rất khiêm tốn so với cá cảnh nước ngọt [61].

Nguồn cá cảnh biển hầu hết được thu gom từ tự nhiên bằng nhiều phương pháp khác nhau. Ngay từ những năm 80, Daigle (1978) đã đưa ra các phương pháp khai thác và vận chuyển cá cảnh biển một cách chi tiết, nhất là ở Hawaii [69]. Các phương pháp được sử dụng phổ biến hiện nay gồm lặn bắt, bẫy, lưới tay hoặc lưới chắn ít ảnh hưởng đến đối tượng nuôi và môi trường. Tuy nhiên, các phương pháp khai thác bằng thuốc nổ, chất độc gây nhiều tác động đến toàn bộ hệ sinh thái vùng rạn, và cần được loại bỏ, nhất là tại khu vực Đông Nam Á. Sau khi khai thác, cá cảnh được thuần dưỡng, nuôi vỗ, cho đẻ; ấu trùng được ương đến giai đoạn trưởng thành, tạo đàn cá bố mẹ, khép kín vòng đời độc lập với môi trường tự nhiên. Chưa thể đánh giá mức độ đáp ứng của sản xuất nhân tạo cá cảnh biển với thị trường cá cảnh nói chung trên thế giới, tuy nhiên số lượng này là rất ít so với nhu cầu thị trường thể hiện ở sản lượng cá cảnh khai thác và thành phần loài cá cảnh đang được người chơi sưu tầm, nuôi dưỡng [84].

Trong các loài cá cảnh biển nhiệt đới, cá khoang cổ là một trong những nhóm được ưa chuộng và nuôi phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới bắt đầu từ năm 1881. Từ đó, nhiều quốc gia ở Châu Âu đã nghiên cứu và cho sinh sản nhân tạo thành công cá khoang cổ. Cá khoang cổ ngày càng trở thành đối tượng nghiên cứu lý tưởng trong phòng thí nghiệm nhờ thích ứng tốt với điều kiện nuôi nhốt, chu kỳ sinh sản ngắn, ương nuôi đơn giản, sinh trưởng nhanh, bộ gen đã được giải mã và lưu giữ đầy đủ, thích hợp cho nghiên cứu về sinh lý, sinh thái, di truyền. Đức đã cho sinh sản nhân tạo thành công 5 loài trong điều kiện không có hải quỳ [115, 137]. Ở Pháp, từ năm 1983, người ta cũng đã cho sinh sản nhân tạo thành công và ương nuôi cá khoang cổ nemo giai đoạn giống bằng Rotifer và Artemia đạt tỷ lệ sống từ 5 - 40% [32, 43].

Theo thống kê chưa đầy đủ về thành phần loài cá và số lượng mỗi loài cá cảnh biển đã sinh sản nhân tạo thành công và đưa vào hệ thống kinh doanh thương mại, thành phần loài cá được nuôi nhốt nhằm mục đích thử nghiệm sinh sản nhân tạo gồm 85 loài đã được nuôi thử nghiệm và chiếm nhiều nhất là 26 loài thuộc họ Pomacentridae trong đó có 19 loài là cá khoang cổ với thành công ở những khía cạnh nhất định trong thử nghiệm sinh sản nhân tạo trong đó có cá KCYN.

Bảng 1.7. Thành phần cá họ Pomacentridae đã thử nghiệm sinh sản nhân tạo [44]

TT	Tên khoa học	Tham khảo
1	<i>Amphiprion akallopisos</i>	Moe 1992
2	<i>A. allardi</i>	Terver 1975
3	<i>A. akindynos</i>	Fisher (pers. com.)
4	<i>A. bicinctus</i>	Young 1990
5	<i>A. chrysogaster</i>	Moe 1992
6	<i>A. clarkii</i>	Miyagawa 1989; Moe 1992; Wilkerson 1992
7	<i>A. ephippium</i>	Moe 1992; Gardner 1997;
8	<i>A. frenatus</i>	Miyagawa 1989; Juhl 1992; Moe 1992; Gardner 1997
9	<i>A. latezonatus</i>	Moe 1992;
10	<i>A. leucokranos</i>	Moe 1992;
11	<i>A. melanopus</i>	Moe 1992; Gardner 1997; Job et al. 1997
12	<i>A. ocellaris</i>	Miyagawa 1989; Juhl 1992; Moe 1992; Arvedlund and Juhl 1992;
13	<i>A. percula</i>	Moe 1992; Gardner 1997; Job et al. 1997
14	<i>A. perideraion</i>	Miyagawa 1989; Moe 1992; Gardner 1997
15	<i>A. polymnus</i>	Terver 1971; Moe 1992
16	<i>A. rubrocinctus</i>	Moe 1992;
17	<i>A. sandaracinos</i>	Miyagawa 1989;
18	<i>A. tricinctus</i>	Moe 1992;
19	<i>Premnas biaculatus</i>	Moe 1992; Gardner 1997; Job et al. 1997
20	<i>Abudefduf saxatilis</i>	Moe 1992
21	<i>Dascyllus albisella</i>	Danilowicz and Brown 1992
22	<i>D. aruanus</i>	Danilowicz and Brown 1992
23	<i>Hypsypops rubicundus</i>	Moe 1992
24	<i>Microspathodon chrysurus</i>	Moe 1992
25	<i>Neopomacentrus bankieri</i>	Job et al. 1997
26	<i>Pomacentrus amboinensis</i>	Job et al. 1997

Bỉ và Nga cho sinh sản thành công lần lượt 4 và 5 loài cá khoang cổ [46], Thái Lan cũng sản xuất giống thành công 7 loài cá khoang cổ. Bên cạnh đó, cá thia biển cũng là nhóm cá được nghiên cứu sinh sản thành công ở nhiều quốc gia như Ấn Độ, Nhật Bản, Pháp và Mỹ từ những năm 80 của thế kỷ XX cho đến nay. Ấn Độ cũng đã sinh sản một số loài cá thia như *Dascyllus flavicaudus*, *D. carneus*, *D. albisella*, *D. trimaculatus* và *D. aruanus*. Các loài này đồng thời được cho sinh sản nhân tạo ở Nhật, Pháp và Mỹ [61].

Tuy nhiên, trong sinh sản nhân tạo cá cảnh biển nói chung còn tồn tại rất nhiều vấn đề tiếp tục được quan tâm như: cá bố mẹ, con giống, thức ăn, nuôi dưỡng [44].

1.2.2. Nghiên cứu sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển ở Việt Nam

Nghiên cứu về cá cảnh tại Việt Nam ở cá rạn san hô chủ yếu vào nghiên cứu về thành phần loài, sinh thái và phân bố. Những nghiên cứu thử nghiệm sinh sản nhân tạo cá cảnh tại Việt Nam được bắt đầu từ đầu những năm 2000 trên đối tượng cá khoang cổ và một số loài cá khác song về mặt thành phần loài còn rất hạn chế so với các nước khác cũng như so với tiềm năng và số lượng loài cá cảnh biển được thu gom và xuất khẩu làm cảnh từ vùng biển Việt Nam. Ngoài ra, quy trình công nghệ nuôi thuần dưỡng, nuôi sinh sản và sản xuất giống cũng như các kỹ thuật ấp nở, ương nuôi và nuôi thương phẩm cá cảnh biển đã được đề cập song còn ở những giai đoạn ban đầu và chưa tương xứng với tiềm năng phát triển nghề nuôi cá cảnh biển của nước ta.

Hà Lê Thị Lộc (2005) đã thử nghiệm sinh sản thành công loài cá khoang cổ đỏ thu được tại vịnh Nha Trang. Năm 2006 – 2008, Viện Hải dương học Nha Trang triển khai đề tài *Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất giống và nuôi thương phẩm loài cá khoang cổ đỏ*. Kết quả đã sản xuất được hơn 10.000 con cá khoang cổ đỏ xuất khẩu sang Châu Âu và thả phục hồi nguồn lợi tại địa phương. Viện Hải dương học (2008) đã sinh sản nhân tạo thành công loài cá khoang cổ nemo cung cấp cho thị trường cá cảnh trong nước và xuất khẩu và thả phục hồi tại khu vực bảo tồn nguồn lợi tự nhiên đảo Hòn Mun, tỉnh Khánh Hòa [8].

Nghiên cứu về đặc điểm sinh học sinh sản của cá rạn san hô hiện tại Chi nhánh Ven biển, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga trên các loài cá thia đồng tiền ba chấm, cá đuôi gai nâu hồng *Zebrasoma scoas*, cá rô thia 6 sọc trong đó chú trọng về mô tả cơ quan sinh dục của cá đực, cá cái; các giai đoạn phát triển trứng và tinh trùng và liều lượng hormone sinh dục sử dụng phù hợp nhằm kích thích sinh sản trên mỗi loài [75].

Cá khoang cổ cam và cá hồng y Banggai không phải là đối tượng có phân bố trong tự nhiên tại Việt Nam mà được nhập khẩu từ nước khác đã nghiên cứu sản xuất giống thành công và bước đầu làm chủ quy trình sản xuất giống nhân tạo. Cá hồng y Banggai thích ứng và sinh sản tốt trong hệ thống tuần hoàn với tỷ lệ sống đạt 80-93,3%, tỷ lệ cá tham gia sinh sản 40-66,6%, sức sinh sản đạt 40 trứng/con, tỷ lệ thụ tinh đạt 45,8-90,4%, tỷ lệ nở đạt gần 10%, tỷ lệ sống của cá giống 30 ngày tuổi đạt 91,1-96,7%. Đề tài: “*Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá khoang cổ cam A. percula*”. đã đạt được một số kết quả trong đó có đã xây dựng quy trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá khoang cổ cam đồng thời cung cấp 3.000 con cá giống trên 1,5 cm cho thị trường [5, 28].

Hà Lê Thị Lộc (2005) đã nghiên cứu cơ sở sinh học, sinh thái phục vụ cho sinh sản nhân tạo cá khoang cổ, và đã thử nghiệm và hoàn thiện công nghệ sản xuất giống thành công cá khoang cổ đỏ sau đó tiếp tục thử nghiệm và đạt một số kết quả với cá khoang cổ nemo. Ở cá khoang cổ tím mới là những nghiên cứu bước đầu về đặc điểm sinh học sinh sản [11, 17, 20].

Quy trình sản xuất giống cá khoang cổ nemo đã dần được hoàn thiện bằng việc nghiên cứu bổ sung các chất vi lượng như Vitamin E, Selenium và Astaxanthin nhằm chủ động trong việc sản xuất giống cũng như nâng cao tỷ lệ sống, chất lượng con giống trên đối tượng này. Thí nghiệm bổ sung các hàm lượng vitamin E (0, 125, 250, 375 và 500 mg/kg thức ăn) vào thức ăn cá khoang cổ nemo bố mẹ cho thấy thời gian tái thành thực và sinh sản, tần suất sinh sản, sức sinh sản thực tế, đường kính trứng và kích thước ấu trùng không bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn bổ sung vitamin E ở các mức khác nhau. Tuy nhiên, chế độ ăn có bổ sung vitamin E lại ảnh hưởng tích cực đến tỷ lệ hao hụt của trứng, tỷ lệ trứng nở và tỷ lệ sống của ấu trùng 3 ngày tuổi. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng nhu cầu vitamin E tối ưu của cá khoang cổ Nemo đạt được hiệu quả sinh sản là 375 mg vitamin E/kg thức ăn. Nghiên cứu ảnh hưởng của Astaxanthin bổ sung trong thức ăn của cá khoang cổ Nemo cho thấy Astaxanthin làm tăng màu sắc da của cá nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa về tăng trưởng và tỷ lệ sống khi thay đổi hàm lượng Astaxanthin từ 0 – 200mg/kg thức ăn ($P > 0,05$).

Phối hợp nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá thia đồng tiền ba chấm được thực hiện 2007-2010 giữa Viện Hải dương học Nha Trang, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, Viện NCNTTS III,

Trường Đại học Cần Thơ và Hội cá cảnh Thành phố Hồ Chí Minh đưa đến một số kết quả khả ban đầu trên các đối tượng này. Đã thử nghiệm sinh sản nhân tạo thành công và sản xuất ra 5.000 con cá thia đồng tiền ba chấm giai đoạn giống.

Bảng 1.8. Một số loài cá cảnh biển sinh sản nhân tạo tại Việt Nam

TT	Tên khoa học	Tên tiếng Việt	Tác giả
1	<i>Amphiprion frenatus</i>	cá khoang cổ đỏ	Hà Lê Thị Lộc, 2008
2	<i>A. percula</i>	cá khoang cổ cam	Trần Thị Lê Trang, 2013; Nguyễn Văn Dũng, 2017
3	<i>A. polymnus</i>	cá khoang cổ yên ngựa	Nguyễn Thị Mỹ Ngân et al, 2007
4	<i>A. ocellaris</i>	cá khoang cổ nemô	Hà Lê Thị Lộc, 2011 Hồ Sơn Lâm, 2018
5	<i>Dascyllus trimaculatus</i>	cá thia đồng tiền ba chấm	Pavlov D. A. et al, 2012
6	<i>Zebrasoma scopas</i>	cá đuôi gai nâu hồng	Pavlov D. A. et al, 2012
7	<i>Abudefduf sexfasciatus</i>	cá rô thia 6 sọc	Pavlov D. A. et al, 2012
8	<i>Hippocampus kuda</i>	cá ngựa đen	Trương Sĩ Kỳ, 2006
9	<i>H. kelloggi</i>	cá ngựa thân trắng	Hồ Thị Hoa, 2015
10	<i>Paracanthurus hepatus</i>	cá bấp nẻ xanh	Huỳnh Minh Sang, 2017

Việc nghiên cứu đánh giá khả năng sinh sản nhân tạo của cá bấp nẻ xanh cho thấy tỷ lệ đực cái của cá bấp nẻ xanh ở vùng biển Khánh Hòa là 1:1; Buồng trứng và tinh sào trải qua 5 giai đoạn phát triển. Kích thước thành thực lần đầu là 149,2 mm. Cá bấp nẻ xanh là loài đẻ quanh năm. Mùa sinh sản tập trung của cá bấp nẻ xanh kéo dài từ tháng 3 đến tháng 8. Sức sinh sản tuyệt đối trung bình của là 9.983 ± 6.026 trứng/cá cái (1.527 – 20.618 trứng/cá cái). Sức sinh sản tương đối trung bình của cá bấp nẻ xanh ở vùng biển Khánh Hòa là 67 ± 19 trứng/g cá cái. Nghiên cứu cũng xác định việc sử dụng kích dục tố chưa đem lại hiệu quả sinh sản ở cá bấp nẻ xanh [156].

Nghiên cứu sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá ngựa trong đó có cá ngựa đen và cá ngựa gai phục vụ nuôi cá cảnh và làm dược liệu cũng được thực hiện từ những năm 2000 và đã đạt được nhiều thành công nổi bật. Hiện tại, nỗ lực hoàn thiện quy trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm các cá ngựa, khép kín vòng đời nhằm hoàn thiện quy trình nuôi và khép kín vòng đời đang là một trong những hướng nghiên cứu được quan tâm [14].

Một số nghiên cứu trong thử nghiệm nhân tạo cá KCYN đã được thực hiện tại Việt Nam tuy nhiên mức độ nghiên cứu chưa có những nghiên cứu về đặc điểm sinh học, sinh sản, cũng như chưa chủ động trong sinh sản nhân tạo do cá đẻ tự nhiên trong bể, tỷ lệ sống của cá bột và cá giống thấp. Nguyễn Thị Mỹ Ngân và cs (2007) đã có những ghi nhận đầu tiên về sự sinh sản tự nhiên của cá KCYN trong điều kiện nhân tạo, xác nhận hiện tượng cá đẻ tự nhiên 01 đợt trứng trong quá trình nuôi nhốt trong bể tại Viện Hải dương học Nha Trang, nhóm tác giả đã nuôi thử nghiệm thành công cá KCYN sau 4 tháng nuôi, kích thước trung bình của cá đạt 35 mm và tỷ lệ sống là 24%. Tuy nhiên, nghiên cứu là kết quả ghi nhận của hiện tượng tự đẻ và ấp trứng, chưa được lặp lại để kiểm chứng [23].

1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển

1.2.3.1. Điều kiện chăm sóc, quản lý cá bố mẹ

Các đặc điểm sinh học cơ bản trong đó có xác định đặc điểm sinh sản loài là vô cùng cần thiết làm cơ sở cho việc đánh giá các yếu tố về giới tính, mùa vụ, hệ số thành thực, sức sinh sản ... để thiết kế các thí nghiệm sinh sản nhân tạo làm cơ sở cho sản xuất giống nhân tạo loài trong đó có cá KCYN.

Hầu hết nguồn cá cảnh biển bố mẹ được khai thác từ tự nhiên dẫn đến khó khăn trong việc thuần dưỡng, nuôi vỗ và cho đẻ trong điều kiện nuôi nhốt. Nguồn cung cá cảnh thường không ổn định do chịu ảnh hưởng bởi mùa vụ, thu hẹp rạn san hô và thiết lập các khu bảo tồn, xung đột lợi ích với các hoạt động kinh tế biển, tranh chấp lãnh hải giữa các nước. Hiện nay, sản lượng cá cảnh khai thác có xu hướng giảm mạnh, số lượng ngư dân tham gia khai thác ngày càng ít, sử dụng các phương tiện khai thác mang tính hủy diệt có xu hướng gia tăng gây cạn kiệt nguồn lợi. Do sự khác biệt về môi trường sống, cá đưa vào nuôi nhốt thường bị stress, hao hụt lớn, khó thành thực và đẻ trứng, nhất là với các cặp không ghép đôi tự nhiên [5, 19, 54, 55]. Cá cảnh biển hầu hết có kích thước nhỏ, việc sử dụng kích dục tố nhất là bằng cách tiêm tử ra kém hiệu quả. Các sinh vật sống cộng sinh, như hải quỳ và san hô, được khuyến cáo bổ sung vào hệ thống nuôi; tuy nhiên, kết quả thu được cũng không ổn định [61]. Chính vì vậy tuyển chọn cá bố mẹ cùng các biện pháp kỹ thuật trong nuôi vỗ, chăm sóc và quản lý cá cần được quan tâm. Thí nghiệm trên nhiều loài cá khoang cổ cho thấy, việc nuôi dưỡng cá khoang cổ bố mẹ trong điều kiện nuôi nhốt có hoặc không có hải quỳ ảnh

hưởng đến hiệu quả sinh sản của cá bố mẹ không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, hiện nay, trong nuôi thử nghiệm sinh sản nhân tạo cá khoang cổ nói chung, các tác giả đều không sử dụng nuôi ghép cá khoang cổ và hải quỳ mà lựa chọn việc nuôi cá khoang cổ với giá thể nhân tạo như ống nước, lọ hoa, gạch men [18, 39, 61].

Xác định giới tính, cơ chế chuyển đổi giới tính, phương pháp đánh giá sự thành thực sinh dục ở cá cảnh biển cũng gặp rất nhiều khó khăn do hình thái ngoài của cá KCYN đực và cái rất giống nhau nên khó phân biệt đực cái bằng mắt thường ngay cả trong mùa vụ sinh sản. Yếu tố lưỡng tính tiềm sinh với tập tính chuyển đổi giới tính với cơ chế rất phức tạp liên quan đến kích thước và cấu trúc thứ bậc của quần đàn, cơ chế sâu xa về phân tử, hormone của quá trình này vẫn đang trong quá trình nghiên cứu và chưa thật sự sáng tỏ. Việc đánh giá sự thành thực sinh dục của cá bố mẹ dựa trên các đặc điểm hình thái ngoài không chính xác như ở một số nhóm loài khác và sự phức tạp trong cơ chế chuyển đổi giới tính đã gây ra nhiều khó khăn trong sinh sản nhân tạo nhóm cá này [62, 83, 136].

Dinh dưỡng là một trong những yếu tố quyết định trong vòng đời của cá khoang cổ. Trong tự nhiên, cá KC dành phần lớn thời gian để tìm kiếm các loại thức ăn có sẵn phù hợp với nhu cầu sinh trưởng và sinh sản. Tuy nhiên, trong điều kiện nuôi nhốt, cá hoàn toàn phụ thuộc vào nguồn thức ăn được cung cấp, nguồn thức ăn này thường là thức ăn tươi, thức ăn chế biến, thức ăn công nghiệp cho cá cảnh biển. Chế độ dinh dưỡng không phù hợp là nguyên nhân trực tiếp kéo dài thời gian thành thực, giảm sức sinh sản, chất lượng sản phẩm sinh dục, giảm tỷ lệ nở, tỷ lệ sống và gia tăng tỷ lệ dị hình của ấu trùng. Mặc dù dinh dưỡng ảnh hưởng rất lớn đến kết quả sinh sản nhân tạo ở cá cảnh biển, các nghiên cứu về vấn đề này còn rất hạn chế cả trong và ngoài nước. Thực tế hiện nay, trong sinh sản nhân tạo cá cảnh biển trong đó có cá khoang cổ cá bố mẹ thường sử dụng thức ăn kết hợp giữa thức ăn tươi sống, thức ăn chế biến và một phần thức ăn công nghiệp nuôi cá biển.

Các nghiên cứu về nhu cầu dinh dưỡng và sản xuất thức ăn công nghiệp cho cá cảnh biển còn ở giai đoạn ban đầu. Mặc dù đã có một số nghiên cứu về lĩnh vực này nhưng các thông tin chưa mang tính hệ thống và đầy đủ, theo đặc điểm dinh dưỡng loài như một số loài cá biển kinh tế khác. Trong nuôi vỗ, để khắc phục nhược điểm của mỗi loại thức ăn, cá cảnh biển được cho ăn kết hợp thức ăn tươi sống và thức ăn chế biến (tôm, mực, cá, hàu, Artemia, tảo) đồng thời bổ sung một số thành phần dinh

đường như axit béo không no, vitamin và khoáng chất. Một số loài cá như cá ngựa và cá chìa vôi (*Syngnathidae*) lại bắt buộc sử dụng nguồn thức ăn sống như ngoài tự nhiên hoặc kết hợp một phần với thức ăn nhân tạo [143, 167, 168].

Thức ăn cho cá khoang cổ bố mẹ nói chung ít phức tạp hơn so với một số đối tượng nuôi cảnh sinh sản nhân tạo khác do cá có thể ăn thức ăn tươi, đông lạnh cá và tôm đông lạnh, tôm *Mysida* hoặc *Artemia* và cả thức ăn công nghiệp. Người nuôi có thể cho cá ăn thức ăn tươi trực tiếp hoặc phối trộn nhiều loại thức ăn khác nhau. Khẩu phần cho cá ăn là từ một đến vài lần trong ngày gần với mức tiêu thụ thực phẩm tự nhiên của chúng giúp cá tiêu hóa tốt hơn và đồng hóa một lượng nhỏ thức ăn trong mỗi lần cho ăn. Thức ăn tươi sống như tôm, mực là những loại thức ăn cung cấp tương đối đủ thành phần các chất dinh dưỡng cần thiết cho cá khoang cổ với hàm lượng protein và hàm lượng các acid béo ít nổi trội cao nên thường được sử dụng làm thức ăn để kích thích quá trình thành thực sinh dục của cá khoang cổ. Các loại thức ăn chế biến cũng được sử dụng trong nuôi cá cảnh biển bao gồm: thịt bò, tuyến sinh dục của động vật thân mềm, trứng gà, dầu cá... được trộn lẫn để chế biến thức ăn cho cá khoang cổ nuôi phát dục [16, 18, 74, 98].

Tại Việt Nam, đa số người chơi cá cảnh lựa chọn các loại thức ăn tổng hợp của một số công ty như CP, Nutrition Ornamental... cho quá trình chăm sóc, nuôi dưỡng cá do khẩu phần thức ăn không quá lớn, giá thành thức ăn không quá cao và tính tiện lợi của thức ăn công nghiệp. Tuy nhiên, với các loại thức ăn này, ghi nhận hiện tượng cá đẻ tự nhiên trong môi trường nhân tạo còn hạn chế và dinh dưỡng chưa phù hợp cho cá có thể là một trong những nguyên nhân cho việc thành thực sinh dục cá. Ở các trại giống và cơ sở nghiên cứu về nuôi trồng thủy sản, việc chế biến thức ăn phù hợp cho sinh sản nhân tạo cá là yếu tố được đặt ra khi xác định đối tượng thử nghiệm sinh sản. Viện Hải dương học Nha Trang đã thử nghiệm một số loại thức ăn trong nuôi sinh sản nhân tạo cá cảnh biển trong đó có cá khoang cổ đỏ, khoang cổ đen đuôi vàng, khoang cổ tím và một số loài khác. Công thức thành phần thức ăn dần được hoàn thiện từ việc ban đầu chỉ là việc phối trộn một số loại như tôm và động vật thân mềm, đến việc bổ sung một số chất dinh dưỡng cho một số loài cá cảnh và cá khoang cổ thường được sử dụng là tôm, nhuyễn thể hoặc trộn lẫn tôm và nhuyễn thể cùng một số loại như: dầu, bột cá, bột mì... vào làm thức ăn chế biến. Ngoài thức ăn sống như Copepoda, *Artemia*, các loại thức ăn khác cũng được sử dụng khá phổ biến trong sản xuất giống

cá khoang cổ như thức ăn tươi, thức ăn chế biến và thức ăn tổng hợp, nhất là các giai đoạn sau. Các loại thức ăn tươi phổ biến là thịt tôm, mực, hàu, cầu gai, tim, gan lợn... có vai trò rất quan trọng trong nuôi vỗ thành thực cá khoang cổ bố mẹ. Thức ăn chế biến thường là hỗn hợp nhiều thành phần như bột cá, bột ngũ cốc, trứng, thức ăn tổng hợp, thịt tôm, mực, tảo khô, dầu, astaxanthin, vitamin và khoáng chất... được phối trộn, bảo quản trong tủ lạnh cho cá ăn dần [10, 27]

Việc sử dụng các loại thức ăn tươi, sống tồn tại nhiều nhược điểm như khó đánh giá chất lượng dinh dưỡng, làm suy giảm chất lượng nước, tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm mầm bệnh, tốn nhiều công chăm sóc, quản lý (siphon, thay nước). Các loại thức ăn tổng hợp khắc phục được hầu hết các nhược điểm trên nhưng hiện nay vẫn chưa sẵn có cho ương, nuôi cá khoang cổ. Người nuôi vẫn phải tận dụng thức ăn công nghiệp của cá cảnh nước ngọt và cá biển để thay thế nhằm tận dụng ưu điểm của loại thức ăn này [101].

Khi chưa có thức ăn tổng hợp, việc kiểm soát và đảm bảo nhu cầu dinh dưỡng cho cá cảnh biển bố mẹ và ấu trùng thường là một trong những hạn chế của quy trình nuôi. Các loại thức ăn sống như tảo, Rotifer, Copepoda và Artemia cần được chuẩn bị đầy đủ. Tuy nhiên, việc chủ động cung cấp đầy đủ cả về số lượng và chất lượng dinh dưỡng của các loại thức ăn này là vấn đề khó khăn, nhất là trong điều kiện nuôi với mật độ cao, vì vậy nhu cầu sản xuất thức ăn tổng hợp công nghiệp cho cá khoang cổ là vô cùng cần thiết.

Quá trình thành thực sinh dục của cá khoang cổ phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó thành phần thức ăn, hàm lượng dinh dưỡng là một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình này. Trong điều kiện nhân tạo, các nghiên cứu tập trung vào việc xác định các nhu cầu dinh dưỡng về protein, Lipid và các loại acid amin, vitamin C, acid béo, carotenoid... nhằm cung cấp đúng và đủ thành phần và tỷ lệ các chất cần thiết với mục đích cá có thời gian thành thực nhanh nhất, chất lượng trứng tốt, tỷ lệ nở cao, cá ít bị dị hình và đặc biệt thời gian tái phát dục.

Ngoài khối lượng và tần suất cho ăn, hàm lượng chất dinh dưỡng trong thức ăn đầy đủ bao gồm protein, lipid, khoáng chất và các nguyên tố vi lượng... rất quan trọng cho hoạt động trao đổi chất và sinh sản của cá. Protein rất cần thiết trong chế độ ăn của cá biển vì chúng cung cấp các axit amin thiết yếu mà cá không thể tổng hợp được [92, 120]. Nhu cầu protein không chỉ thay đổi theo loài cá mà còn khác ở các giai đoạn khác nhau trong vòng đời và cần những nghiên cứu xác định cho mỗi đối tượng. Hàm

lượng thức ăn của cá biển nói chung được khuyến cáo có chứa hàm lượng protein khoảng 25% - 50% [121].

1.2.3.3. Dinh dưỡng của cá ở giai đoạn ấu trùng và con non

Ở giai đoạn đầu, ấu trùng thường sinh trưởng và phát triển khá nhanh, các cơ quan đang trong quá trình hình thành, hoàn thiện về cấu trúc và chức năng. Khi bắt đầu sử dụng thức ăn ngoài, hệ thống tiêu hóa của cá còn chưa hoàn thiện, khả năng sử dụng, hấp thụ thức ăn còn hạn chế; do đó, nguồn thức ăn cung cấp cần phải đảm bảo vừa thỏa mãn nhu cầu dinh dưỡng vừa dễ tiêu hóa và hấp thu. Hiểu biết về cơ chế tiêu hóa và hấp thu của ấu trùng kể từ khi sử dụng thức ăn ngoài là cơ sở để lựa chọn loại thức ăn phù hợp, nhất là thức ăn tổng hợp, nhằm giảm sự phụ thuộc vào thức ăn sống. Thành phần thức ăn có trong ống tiêu hóa của ấu trùng cá cảnh biển tự nhiên gồm Copepoda, tảo sợi và ấu trùng các sinh vật biển. Trong điều kiện nuôi nhân tạo, ấu trùng thường được cho ăn hai loại thức ăn phổ biến là Rotifer và Artemia. Tuy nhiên, đây không phải là thức ăn ngoài tự nhiên của ấu trùng cá cảnh biển, nhất là các loài cá rạn san hô. Ngoài ra, do cỡ miệng nhỏ và hệ tiêu hóa kém phát triển, Rotifer siêu nhỏ được khuyến cáo sử dụng giai đoạn bắt đầu ăn thức ăn ngoài [51, 73, 100].

Nhu cầu sử dụng các loại thức ăn tổng hợp để thay thế hoàn toàn Artemia cho cá giai đoạn lớn hơn cũng thu hút được sự quan tâm. Ưu điểm của loại thức ăn này là cung cấp đầy đủ dinh dưỡng, kích cỡ phù hợp, chủ động cung cấp, hạn chế ô nhiễm môi trường, lây lan mầm bệnh, dễ sử dụng và bảo quản. Thức ăn tổng hợp là yêu cầu cũng như xu hướng tất yếu trong ương nuôi cá cảnh biển nói chung, nhất là ở quy mô thương mại [98, 116]. Mặc dù vậy, loại thức ăn này lại tồn tại một số hạn chế như kém ổn định, độ nổi thấp, kém dẫn dụ, thiếu các enzyme tiêu hóa ngoại bào cho ấu trùng cá, nhất là giai đoạn đầu đời [90, 114]. Việc sử dụng hoàn toàn hay kết hợp một phần loại thức ăn này đã mang lại một số thành công nhất định trong ương nuôi cá cảnh biển. Ấu trùng *A. percula* có thể sử dụng thức ăn tổng hợp từ ngày ương thứ 7 – 9 mà không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống so với thức ăn sống. Các nỗ lực thay thế thức ăn sống bằng thức ăn tổng hợp vẫn đang được thực hiện nhằm tăng hiệu quả kinh tế, kỹ thuật và đơn giản hóa quy trình sản xuất giống và nuôi cá cảnh biển [60, 61].

Chế độ thức ăn có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống và sự tăng trưởng chiều dài của cá khoang cổ đỏ *A. frenatus* dưới một tháng tuổi. Cá được ăn Rotifer *B. plicatilis* kết hợp với tảo tươi *N. oculata* ngay từ một ngày tuổi và Artemia khi cá 3 ngày tuổi có tỷ

lệ sống từ 70,83 – 72,50%, cao hơn đáng kể so với cá sử dụng Artemia thay vì Rotifer chỉ đạt tỷ lệ sống từ 10,83 – 27,50%. Cá được ăn Rotifer kết hợp với tảo tươi *N. oculata* và Artemia, sau 30 ngày tuổi có chiều dài trung bình là 19 mm, cao hơn đáng kể so với cá sử dụng thức ăn tổng hợp Frippak 300 thay vì Artemia, trung bình là 14 mm. Đồng thời, cá được cho ăn Rotifer ngay từ 1 ngày tuổi ít bị phân đàn hơn so cá sử dụng Artemia [21].

Dựa vào đặc điểm dinh dưỡng của cá trong tự nhiên cho thấy có thể ương ấu trùng cá khoang cổ từ giai đoạn mới nở đến con giống bằng cách kết hợp nhiều loại thức ăn như Rotifer, Copepoda, thức ăn khô hạt nhỏ, Artemia và động vật thân mềm. Việc sử dụng đơn lẻ mỗi loại thức ăn trên thường tỏ ra kém hiệu quả, bị động trong việc cung cấp, không thỏa mãn nhu cầu dinh dưỡng của ấu trùng, gia tăng chi phí sản xuất... Do đó, để thuận tiện trong quá trình sản xuất, người ta thường sử dụng kết hợp Rotifer, Artemia và thức ăn tổng hợp để ương ấu trùng mà vẫn đảm bảo tốc độ tăng trưởng, tỷ lệ sống, màu sắc tương tự như các loại thức ăn ngoài tự nhiên.

Luân trùng *Brachionus* spp., với kích thước 100 - 340 μm , cũng là nguồn thức ăn không thể thiếu được trong ương ấu trùng cá biển nói chung và cá khoang cổ nói riêng. Mặc dù loài động vật phù du này thường thiếu hụt các axit béo không no, axit amin nhưng điều này có thể được cải thiện bằng cách sử dụng các sản phẩm làm giàu thương mại hay các loài vi tảo giàu dinh dưỡng. Ấu trùng cá khoang cổ nói chung có tập tính chuyển đổi thức ăn trong quá trình phát triển, từ Rotifer đến Copepoda, Artemia và thức ăn tổng hợp. Khẩu phần thức ăn chỉ chứa Rotifer không giúp ấu trùng cá khoang cổ hoàn tất biến thái nhưng việc sử dụng chúng ở giai đoạn đầu là bắt buộc trước khi chuyển sang các loại thức ăn có kích thước lớn hơn [77, 98, 108].

Copepoda là loài động vật phù du rất giàu các axit béo không no, chất tạo sắc tố, chống oxy hóa, các loại vitamin... được sử dụng phổ biến cho ương ấu trùng cá khoang cổ cũng như nhiều loài cá biển khác. Copepoda có kích cỡ đa dạng thỏa mãn hầu hết các giai đoạn phát triển của ấu trùng gồm nauplius (80 - 250 μm), Copepoda tiền trưởng thành (80 - 350 μm) và Copepoda trưởng thành (250 - 600 μm). Tuy nhiên, việc nuôi các loài Copepoda gặp rất nhiều khó khăn do những hạn chế về khả năng cung cấp thức ăn và sự giới hạn về mật độ trong nuôi sinh khối. Sử dụng Copepoda trong ương ấu trùng cá khoang cổ góp phần đáng kể trong việc cải thiện tốc độ tăng

trưởng, tỷ lệ sống, rút ngắn thời gian ương, cải thiện sắc màu sắc của cá so với các loại thức ăn khác kể cả Artemia [140, 141].

Artemia ngày càng được sử dụng phổ biến trong ương nuôi ấu trùng các loài cá cảnh biển mặc dù loài động vật phù du này không phải là thức ăn ngoài tự nhiên của chúng. Artemia là có giá trị dinh dưỡng cao, sẵn có và tiện lợi trong quá trình sử dụng và bảo quản, thời gian ấp nở bào xác chỉ từ 14 - 24 giờ. Nauplius mới nở có chiều dài 422 - 517 μm rất thích hợp cho ương ấu trùng cá khoang cổ sau khi ăn Rotifer. Artemia cũng có thể được sử dụng để cải thiện dinh dưỡng của ấu trùng thông qua kỹ thuật làm giàu. Artemia còn được sử dụng cho các giai đoạn cá con và cá bố mẹ trong nuôi cá khoang cổ [61, 152].

Vi tảo được sử dụng phổ biến trong ương ấu trùng cá cảnh biển với vai trò làm thức ăn gián tiếp cho các động vật phù du làm thức ăn cho ấu trùng và ổn định chất lượng nước. Ngoài ra, vi tảo còn kích thích sản sinh ra các enzyme tiêu hóa, cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột của ấu trùng; kích thích ấu trùng bắt mồi, bài tiết các vitamin, chất kích thích sinh trưởng và kháng sinh... Các loài tảo biển còn chứa nhiều axit béo không no đóng vai trò thiết yếu đối với quá trình hình thành, phát triển và hoàn thiện cấu trúc cũng như chức năng của nhiều cơ quan của ấu trùng, nhất là giai đoạn đầu của quá trình phát triển [51].

Trong quá trình phát triển, ấu trùng có sự chuyển đổi thức ăn nhằm thỏa mãn nhu cầu dinh dưỡng và kích cỡ mồi phù hợp, thường từ thức ăn sống (Rotifer, Copepoda và Artemia) sang thức ăn tổng hợp. Xác định thời điểm chuyển đổi thức ăn thích hợp có ý nghĩa lớn trong việc đơn giản hóa quy trình nuôi do giảm sự phụ thuộc vào nguồn thức ăn sống; ngược lại, sẽ ảnh hưởng đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng [61, 88].

Thời gian phát triển phôi trong điều kiện thí nghiệm và thực tiễn sản xuất có thể có những khác biệt nhất định do nguyên nhân khách quan và chủ quan. Do cá được thụ tinh cho trứng ngay sau khi cá thể cái đẻ nên thời gian thụ tinh ít nhiều có sự khác biệt giữa các trứng trong cùng một ổ. Sự khác biệt này được mô tả chi tiết trên loài cá khoang cổ *A. chrysopterus* quan sát được trong điều kiện tự nhiên [33]. Sau khi quá trình thụ tinh kết thúc, ổ trứng chứa những trứng được thụ tinh vào những thời điểm khác nhau. Việc lấy mẫu trứng để xác định chính xác thời điểm thụ tinh lúc này có sự khác biệt nhất định. Bên cạnh đó, tốc độ phát triển phôi sẽ phụ thuộc vào sự khác biệt

về nhiệt độ, độ mặn và hàm lượng oxy hòa tan...giữa mẫu trứng quan sát và ô trứng được ấp trong bể đẻ [30, 161].

Nuôi dưỡng Copepoda cung cấp thức ăn sống trong quá trình ương nuôi cá là một hạn chế cho người nuôi do các yếu tố khách quan như nhiệt độ, ánh sáng, dinh dưỡng ... Vì vậy, nhu cầu bảo quản Copepoda đông lạnh thay thế cho Copepoda sống là cần thiết mặc dù có thể lưu trữ trứng Copepoda trong thời gian dài lên đến 17 tháng nhưng để đảm bảo chất lượng thức ăn cho ương ấu trùng cá biển là vấn đề cần quan tâm. Sử dụng Copepoda *Acartia tonsa* sống và *A. tonsa* đông lạnh (6 tháng) để ương nuôi ấu trùng cá cho thấy, *A. tonsa* đông lạnh không đảm bảo dinh dưỡng cho ấu trùng cá khoảng cổ đen đuôi vàng phát triển, hiệu suất sinh trưởng và tỷ lệ sống thấp hơn. Nguyên nhân là phôi copepod được bảo quản lạnh ở điều kiện tối ưu vẫn phát triển và duy trì hoạt động sinh lý do đó giá trị dinh dưỡng của chúng có thể thay đổi theo thời gian bảo quản, với những thay đổi này ảnh hưởng đến cả chất lượng trứng và sự sống và phát triển của cá ấu trùng liên quan đến sự thay đổi và giảm hàm lượng axit béo. Vai trò của axit béo trong sự phát triển của ấu trùng cá đặc biệt là EPA (20: 5n 3) và DHA (22: 6n 3), được biết là rất cần thiết cho sự sống và phát triển của ấu trùng cá [158]. Sự thiếu hụt trong các axit béo này có thể gây ra sự suy giảm chung về sức khỏe của ấu trùng, tăng trưởng kém, hiệu quả thức ăn thấp và tỷ lệ tử vong cao [140, 141].

Đánh giá tác động của chế độ ăn uống tiêu chuẩn và chế độ làm giàu của HUFA đối với ấu trùng cá khoảng cổ nemo đã chứng minh rằng việc sử dụng HUFA bổ sung vào thức ăn cho ấu trùng cá giúp cải thiện sự phát triển của ấu trùng thông qua sự hiện diện của ty thể có cấu trúc tốt hơn và tổng hợp cao hơn các hợp chất năng lượng và coenzyme có vị trí trung tâm trong quá trình trao đổi chất. Ở *A. ocellaris*, việc bổ sung HUFA đặc biệt quan trọng trong tuần đầu tiên. Tình trạng năng lượng cao hơn này giúp cá sự tăng trưởng nhanh chóng, giai đoạn ấu trùng ngắn hơn và tỷ lệ tử vong thấp hơn, làm cơ sở cho vai trò có lợi của HUFA đối với sự sống sót của loài này. Ngoài ra HUFA có thể là một phương pháp quan trọng để giảm sắc tố dị thường của cá như thiếu một phần hoặc toàn bộ khoang trắng trên cơ thể [50].

Kết quả thử nghiệm thời gian chuyển đổi thức ăn của ấu trùng cá khoảng cổ cam cho thấy ở ngày thứ 4-5 bắt đầu cho ăn ấu trùng *Artemia*, tỷ lệ sống của cá là 40 - 48,9%, nếu cho ăn ngay ở những ngày đầu tiên, tỷ lệ sống của ấu trùng chỉ ở 11,1 ± 9,6%. Với ấu trùng khoảng cổ đỏ, khi bổ sung thêm axit acobic vào Rotifer làm thức

ăn cho cá hàm lượng 150, 300, 450 và 600 mg/l cho thấy tỷ lệ sống của ấu trùng cao nhất ở hàm lượng 600 mg/l là $77,8 \pm 3,85\%$ [74].

Nghiên cứu về các giai đoạn phát triển phôi và ấu trùng của KCYN trên thế giới đưa ra một số kết quả về đặc điểm phân bố, sinh thái của chúng ngoài tự nhiên, một số tác giả đã đề cập đến việc sinh sản nhân tạo loài cá này trong điều kiện phòng thí nghiệm có hoặc không có hải quỳ song các số liệu đưa ra chưa tập trung và đầy đủ, đặc biệt tại vùng biển Việt Nam.

1.2.3.4. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường và mật độ đến sinh trưởng cá

a. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ mặn, nồng độ oxy, photoperiod và pH... đều được biết là có tác động đáng kể đến hiệu suất của cá và ấu trùng cá như sự sống sót, tăng trưởng, thành thực và quá trình biến thái. Nhiệt độ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng ấu trùng và cá con của các loài cá biển từ đó ảnh hưởng đến hiệu suất sinh lý của chúng, như sự tăng trưởng, phát triển và hành vi. Nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến cá biển chủ yếu tập trung vào các loài có giá trị kinh tế như cá mú, cá chẽm, cá bớp và cá hồng bạc.. mà chưa được đề cập nhiều các đối tượng cá cảnh biển.

Mối quan hệ giữa nhiệt độ và tốc độ tăng trưởng của cá *Clarias gariepinus* và *Cichlasoma urophthalmus* giai đoạn cá thịt là có mối tương quan thuận và hệ số tương quan chặt chẽ, trong điều kiện nhiệt độ thích hợp, nhiệt độ tăng thì tốc độ tăng trưởng của cá tăng [66, 95]. Những kết quả này cho thấy tốc độ tăng trưởng tăng với nhiệt độ lên đến mức tối đa từng loài, sau đó giảm xuống khi nhiệt độ tăng cao gây hạn chế về mặt sinh lý cho cá [95]. Tuy nhiên, ở cá khoang cổ *A. melanopus* thương phẩm khi nuôi ở nhiệt độ nước thấp không cho thấy khả năng vận động tốt hơn những con được nuôi ở nhiệt độ cao hơn nhưng thời gian nở của cá lại có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ở khoảng nhiệt độ là 25°C và 28°C là 12 ngày và 9 ngày [10].

Ở các loài cá khác nhau, nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng và phát triển không đồng nhất. Nhiệt độ điều tiết các đặc tính xúc tác của enzyme ở cá, nhiệt độ thay đổi dẫn đến sự thay đổi tỷ lệ tương đối của hai hoặc nhiều đồng phân enzyme sao cho hoạt động của enzyme được tối ưu hóa tùy thuộc vào nhiệt độ môi trường [111]. Cơ chế này phát triển nhằm giảm khả năng hạn chế hoạt động enzyme ở nhiệt độ vượt quá

giới hạn của phạm vi nhiệt độ tự nhiên. Do đó, rõ ràng là nhiệt độ ảnh hưởng đáng kể đến sinh lý và tăng trưởng của cá. Điều quan trọng là nhiệt độ cho sự tăng trưởng tối đa là xác định cho từng loài và chưa có suy luận xác thực về giả thuyết các loài tương tự phân bố tự nhiên hoặc các loài có phân bố tự nhiên rộng nhiệt và phạm vi nhiệt độ thay đổi cao hơn so với các loài có phân bố hẹp nhiệt [91, 178].

b. Ảnh hưởng của độ mặn

Độ mặn của môi trường nuôi là yếu tố phi sinh học quan trọng ảnh hưởng đến trứng cá biển và sinh lý ấu trùng và có ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển, tăng trưởng và sinh tồn của chúng. Bằng cách ảnh hưởng đến nhu cầu năng lượng cho quá trình thẩm thấu, độ mặn ảnh hưởng trực tiếp đến kích thước noãn hoàng, sự phát triển của ấu trùng và tỷ lệ sống. Do đó, khả năng chịu mặn của một loài là một yếu tố quan trọng trong nuôi các sinh vật biển và nước ngọt vì nó cung cấp thông tin về các yêu cầu môi trường cơ bản cần thiết cho loài phát triển trong điều kiện nuôi nhốt.

Các yếu tố môi trường là một trong những yếu tố tác động quyết định đến tỷ lệ sống, sinh trưởng và phát triển của đối tượng nuôi. Cá khoang cổ là một loài cá nước mặn sống thường trú tại các vùng biển có rạn san hô và hải quỳ, vì vậy, biên độ mặn của chúng thường hẹp quanh giá trị 33‰. Tuy nhiên, trong môi trường nhân tạo với sự kết hợp độc đáo của nhiều sinh vật cũng đòi hỏi các chế độ chăm sóc khác nhau cùng với các tác động rất lớn của biến đổi khí hậu đến môi trường tự nhiên. Việc tìm hiểu về giá trị độ mặn trong môi trường nuôi nhân tạo của cá là việc làm cần thiết.

Có những loài cá, ngưỡng độ mặn rất hẹp, ở cá song hồ *Epinephelus fuscoguttatus*, thí nghiệm về nhiệt độ và độ mặn chỉ ra khoảng nhiệt độ thích hợp là 30°C và độ mặn thích hợp cho ấp nở từ 32 - 35 ‰, đạt các tỷ lệ nở từ 83,4-85,6% với tỷ lệ dị hình thấp 1,79 - 1,85 % cao hơn đáng kể so với các nghiệm thức nhiệt độ ≤ 30°C và > 32°C, độ mặn từ 23-29 ‰ không phù hợp cho ấp nở cá, giảm tỷ lệ nở và tăng tỷ lệ dị hình ($P<0,05$). Độ mặn ảnh hưởng đến tỷ lệ nở và tỷ lệ dị hình đặc biệt ở giai đoạn ấp nở ấu trùng. Mô tả chi tiết về sự phát triển phôi của cá bơn đuôi vàng *Limanda ferruginea* để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ và độ mặn đến tốc độ phát triển và khả năng sống sót trong cho thấy tỷ lệ nở của phôi cá bị ảnh hưởng tương tác bởi nhiệt độ (20, 25, 30°C) và độ mặn (10, 20, 30 ‰). Kết quả cho thấy tỷ lệ sống thấp (10-30 %) ở độ mặn thấp (10, 20 ‰) kết hợp với nhiệt độ thấp (20°C) và cao (30°C), và tỷ lệ sống cao (70-90 %) ở nhiệt độ 25°C và độ mặn 30 ‰. Kích thước khi ấu trùng nở, mức độ dị hình của

cá tỷ lệ nghịch hai chiều, ở nhiệt độ 25⁰C và độ mặn 30 ‰ và ấu trùng có kích thước khi nở lớn nhất, tỷ lệ dị hình thấp (<10%) ở giá trị nhiệt độ và độ mặn này [118].

c. Mật độ nuôi

Một trong những vấn đề tồn tại hiện nay khi ương nuôi các loài cá là việc xác định mật độ nuôi phù hợp. Khi nuôi cá ở mật độ nuôi hợp lý sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng của cá tiết kiệm được chi phí sản xuất giảm công chăm sóc quản lý. Mật độ thả tối đa để nuôi một loài cá mà không ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng là quan trọng đối với bất kỳ nhà sản xuất cá nhằm đưa đến lợi nhuận cao nhất. Với cá nuôi kinh tế (sử dụng làm thực phẩm), đây là một trong những mối quan tâm hàng đầu của nhà sản xuất. Một số nghiên cứu cho thấy mối tương quan tiêu cực hoặc tích cực giữa tăng trưởng và tăng mật độ thả tùy thuộc vào loài. Vì vậy, đa số các tác giả đều thống nhất rằng mối tương quan giữa mật độ và tốc độ phát triển của cá mang tính đặc trưng loài.

Nhìn chung, nhiều nghiên cứu đều nhận thấy, sự gia tăng mật độ nuôi ở một mức độ nhất định tỷ lệ nghịch với tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá [127]. Ở cá khoang cổ nemo *A. frenatus* trưởng thành, tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá tỷ lệ nghịch với sự gia tăng của mật độ nuôi từ 1 - 4 con/L. Cá khoang cổ cam *A. percula* được ương ở mật độ 0,5 con/L cho tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống cao hơn so với các mật độ 1, 2 và 3 con/L [30, 64]. Mật độ ương cũng là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất. Gia tăng mật độ nuôi giúp tăng năng suất, sản lượng nhưng cũng làm giảm tốc độ sinh trưởng và tỷ lệ sống của cá. Nguyên nhân được cho là, mật độ cao ảnh hưởng đến không gian sống, hiệu quả sử dụng thức ăn, môi trường sống, các quá trình sinh lý của đối tượng nuôi.

Thành công trong sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển ở nước ta còn rất khiêm tốn mới chỉ tập trung ở một số loài như cá khoang cổ và cá ngựa, cá hồng y.... Cá bố mẹ được thu gom từ ngoài tự nhiên, thuần dưỡng, nuôi vỗ và cho đẻ trong hệ thống tuần hoàn. Cá được cho ăn bằng các loại thức ăn tươi và chế biến, với các thành phần như thịt mực, tôm, hàu, bột cá, bột mì, thức ăn công nghiệp, tảo khô, vitamin, khoáng tổng hợp... Tuy nhiên, hiện tại có rất ít loài cá cảnh biển được nghiên cứu hoàn thiện quy trình và chủ động trong sản xuất giống nhân tạo, quy mô sản xuất nhỏ, còn nhiều giải pháp kỹ thuật cần tiếp tục nghiên cứu cải tiến nhằm làm chủ quy trình cũng như những việc nghiên cứu đặc điểm sinh học cơ bản của cá làm cơ sở cho các nghiên cứu trên còn rất hạn chế về số lượng loài và kết quả công bố tại Việt Nam.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian, địa điểm, đối tượng nghiên cứu

- **Đối tượng nghiên cứu:** Cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758)



Hình 2.1. Cá KCYN tại vịnh Nha Trang

- **Thời gian:** Từ tháng 1/2013 - 12/2018.

- **Địa điểm nghiên cứu:**

+ Phòng Thí nghiệm Sinh thái Nhiệt đới, Chi nhánh Ven biển, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga.

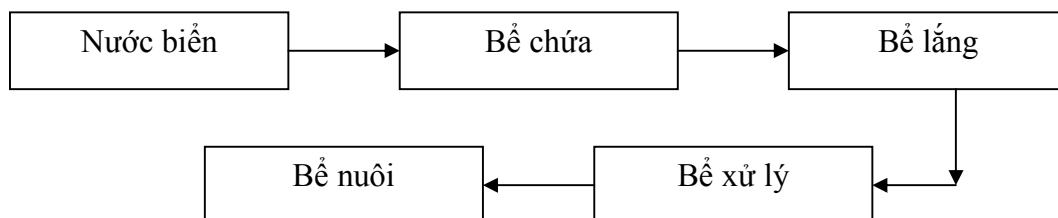
+ Trạm nghiên cứu thử nghiệm biển Đầm Báy, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga

+ Phòng Công nghệ nuôi trồng, Viện Hải Dương học Nha Trang.

+ Trại thực nghiệm sản xuất giống cá, tổ 13, khóm Đường Đệ, phường Vĩnh Hòa.

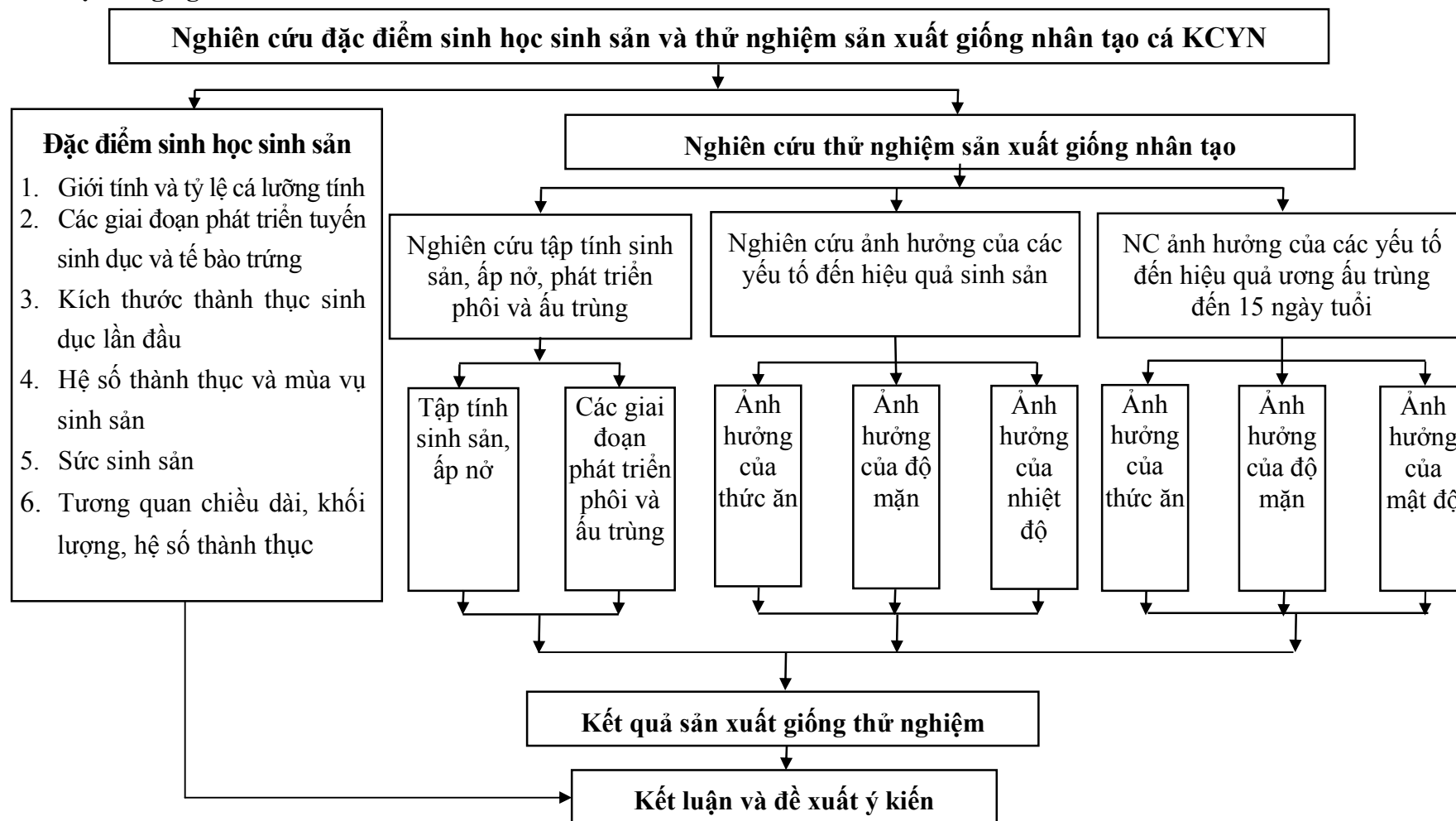
- Địa điểm thu mẫu: các vịnh Nha Trang, Nha Phu, Vân Phong, Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa.

- **Chuẩn bị nước:** nước biển được đưa qua hệ thống lọc, lắng, bằng cát và san hô được đưa sang bể xử lý bằng thuốc tím KMnO_4 sục khí 24/24 sau đó đưa vào bể nuôi. Nước cấp cho bể nuôi được thu gom tại vị trí cuối bể, lọc qua bông và chảy vào bể lọc sinh học. Hệ thống lọc sinh học được bố trí với ba bể composite trong đó hai bể đầu sử dụng san hô và bioball nối tiếp nhau. Sau đó được chuyển vào bể chứa và bơm trở lại hệ thống bể nuôi. Lưu tốc nước chảy nhẹ đảm bảo tỷ lệ thay nước ~ 400% nước bể nuôi/ngày.



Hình 2.2. Sơ đồ vận hành nguồn nước thí nghiệm

2.2. Nội dung nghiên cứu



Hình 2.3. Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu

- Một số chỉ tiêu môi trường nước theo dõi thể hiện qua bảng 2.1.

Bảng 2.1. Kiểm tra các yếu tố môi trường nước bể nuôi

Thông số đo	Tần suất đo	Thiết bị đo	Độ chính xác
Nhiệt độ (°C)	2 lần/ngày (6h00; 14h00)	Nhiệt kế thủy ngân	1°C
Độ mặn (‰)	1 lần/ngày	Khúc xạ kế, Nhật	1‰
pH	1 lần/ngày	pH meter	0,1 đơn vị
Oxy hòa tan (mg/L)	1 lần/ngày	Test kit Sera, Đức	0,1 mg/L
NH ₄ ⁺ /NH ₃ -TAN (mg/L)	1 lần/ngày (hoặc khi cần)	Test kit Sera, Đức	0,05 mg/L

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản

2.3.1.1. Phương pháp thu mẫu nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản

Tiến hành thu mẫu cá KCYN trong vùng biển Khánh Hòa từ đặt ngư dân khai thác bằng lặn bắt ngẫu nhiên, trực tiếp và vận chuyển bằng phương pháp vận chuyển hờ đưa về phòng thí nghiệm.

Quá trình thu mẫu lặn bắt vào ban đêm khó thu hơn so với ban ngày, số lượng cá trong tự nhiên không nhiều đồng thời chi phí cho mỗi chuyến lặn cao nên số lượng mẫu thu được là toàn bộ số cá ngư dân thu được trong mỗi chuyến lặn. Định kỳ thu mẫu 1-2 lần/ tháng (đêm tối trời không trăng). Cá được vận chuyển sống bằng phương pháp vận chuyển hờ về phòng thí nghiệm. Tổng số mẫu thu được từ 2014-2018 là 1.406 con, được thể hiện ở Bảng 2.1.

Bảng 2.2. Số lượng mẫu cá KCYN dùng cho phân tích sinh học sinh sản

Đơn vị tính: con

Năm	Tháng												Tổng số
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
2014			32	30	32	18		17				18	147
2015	30	22	24	25									101
2016	36	30	30	31	33	32	31	30	36	30	30	30	379
2017	31	32	34	30	30	31	30	34	30	30	33	31	376
2018	30	32	30	31	32	36	38	30	30	32	35	47	403
	127	116	150	147	127	117	99	111	96	92	98	126	1406

Do một số hạn chế khách quan và chủ quan, việc thu bắt cá phụ thuộc vào thời tiết (mùa mưa cơ sở kinh doanh không lưu giữ, thu mua cá) nên số lượng cá thu mua chưa được thực hiện trong tất cả các mùa trong năm. Vì vậy, số liệu 248 con cá thu được trong các năm 2014, 2015 chỉ mang tính chất tham khảo.

Các số liệu được thống kê và sử dụng trong báo cáo từ 1.158 mẫu thu được trong các năm từ 2016-2018. Định kỳ thu mẫu 1-2 lần/ tháng với số lượng mẫu từ 30 mẫu trở lên/tháng. Đặc điểm phân bố trong tự nhiên cá sống theo “tổ”, số lượng cá có kích thước nhỏ thường cao, để nâng cao hiệu quả thống kê, chúng tôi tiến hành thu mẫu trong 36 tháng sau đó cộng số mẫu trong 3 năm của mỗi tháng sử dụng để phân tích các đặc điểm sinh học sinh sản.

2.3.1.2. Phương pháp phân tích mẫu đặc điểm sinh học sinh sản

- Quan sát kỹ hình thái bên ngoài: theo mô tả đặc điểm, định loại của Allen (1972) [33]; Nguyễn Hữu Phụng và cs (1995) [25]; Đào Tấn Hồ (2001) [11]; Astakhov D. A. (2002) [46].

- Đo chiều dài, cân khối lượng và mổ cá để thu tuyến sinh dục.

a. Xác định chiều dài và khối lượng cá

Chiều dài cá được xác định bằng thước kẹp điện tử Mitutoyo 500-173 (0-300mm) có độ chính xác 0,01 (mm), soi mẫu dưới kính lúp để bàn. Chiều dài toàn thân (TL) của cá được đo từ mút mõm đến hết vây đuôi dài nhất.

Khối lượng cá (BW), cá đã bỏ nội quan (BW₀) xác định bằng cân điện tử Shimadzu UX6200H của Nhật có độ chính xác 0,01 (g); khối lượng tuyến sinh dục (GW) được xác định bằng cân điện tử Shimadzu ATX124 của Nhật có độ chính xác 0,0001 (g).

b. Phân tích tuyến sinh dục

Phương pháp xác định giới tính và mô tả các giai đoạn của tuyến sinh dục và tế bào sinh dục

Các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục cá thường được xác định dựa vào tổ chức mô học của tuyến sinh dục được mô tả Xakun và Buskaia (1968) [22] và hoàn thiện của Nguyễn Tường Anh (1996, 1999) [1, 2]. Tuy nhiên, cá KCYN là cá lưỡng tính tiềm sinh, sản phẩm sinh dục đực và cái đồng thời, trong đó kích thước trứng lớn hơn gấp nhiều lần tinh trùng nên chúng tôi quy ước việc xác định mức độ thành thực tuyến sinh dục cá dựa trên sự phát triển các thời kỳ phát triển tế bào trứng ở các giai đoạn giống như cá đơn tính và được gọi chung là tuyến sinh dục.

Phương pháp làm tiêu bản trên tổ chức mô học tuyến sinh dục

Tiêu bản mô học tuyến sinh dục được tiến hành theo phương pháp của Patki và cs (1989) [144], gồm các bước chính lần lượt sau: cố định mẫu tuyến sinh dục, chuẩn bị mẫu, đúc paraffin, cắt lát mẫu, nhuộm Hematoxylin và Eosin và làm trong mẫu.

Mỗi giai đoạn của tuyển sinh dục được làm 10 tiêu bản trở lên, tổng số tiêu bản các giai đoạn là 120 (10 tiêu bản/tháng năm 2017 được cất mẫu ngẫu nhiên). Tiêu bản cá và tuyển sinh dục được chụp bằng máy ảnh Canon EOS 650D. Đọc mẫu tiêu bản mô học theo thang 6 bậc của Xakun và Buskaia (1968).

c. Xác định kích thước và số lượng trứng

Kích thước trứng qua các giai đoạn được đo bằng kính hiển vi Olympus CX51. Mỗi giai đoạn đo 50 trứng trở lên. Giai đoạn I, II được quan sát dưới vật kính x10 và thị kính x10. Giai đoạn III, IV và V được đo quan sát dưới vật kính x4 và thị kính x10.

Các tiêu bản tuyển sinh dục được quan sát dưới trên kính hiển vi Olympus CX51 (độ phóng đại tối đa 1000x) và được chụp bằng với phần mềm đo vẽ LC30 kết nối với kính soi nổi, kính hiển vi với máy tính (sai số 0.01 μ m) và phần mềm "ImageJ" chụp ảnh.

2.3.1.3. Phương pháp xử lý số liệu đặc điểm sinh học sinh sản

a. Giới tính và tỷ lệ cá KCYN mang tế bào sinh dục đực, cái

Quan sát xác định giới tính và sự xuất hiện giới tính hai chiều ở 120 mẫu mô học tuyển sinh dục cá cá KCYN được thực hiện.

Xác định tỷ lệ cá lưỡng tính (có cả sản phẩm sinh dục đực và sản phẩm sinh dục cái) theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ cá thể có tế bào sinh dục đực/cái} = (a/b) * 100(\%)$$

Trong đó: a: Số cá thể có tuyển sinh dục chứa tế bào sinh dục đực/cái.

b: Tổng số mẫu tuyển sinh dục của cá.

b. Kích thước thành thực lần đầu (tế bào sinh dục cái)

Phương pháp xác định kích thước thành thực lần đầu theo phương pháp của King (2001) [109]. Giải phẫu để thu mẫu tuyển sinh dục và xác định ở tất cả 1.158 mẫu cá được phân tích. Kích thước thành thực lần đầu là kích thước tại đó, có ít nhất 50% cá thể thành thực sinh dục trong mùa sinh sản. Trong khuôn khổ của đề tài, chỉ xác định kích thước thành thực lần đầu trên tế bào sinh dục cái.

c. Hệ số thành thực và mùa vụ sinh sản

Hệ số thành thực

Xác định theo phương pháp của Qasim (1973) và King (1990) [147]. Hệ số thành thực là tỷ lệ phần trăm của khối lượng tuyển sinh dục trên khối lượng thân cá bỏ nội quan. Hệ số thành thực được tính theo công thức:

$$GSI = GW / BW_0 * 100\%$$

Trong đó:

GSI: Hệ số thành thực.

GW: Khối lượng tinh sào và buồng trứng (g).

BW₀: Khối lượng thân cá bỏ nội quan (g).

Tỷ lệ thành thực theo tháng: là tỷ lệ phần trăm cá thành thực tính trên tổng số cá phân tích (theo tháng).

$$\text{Tỷ lệ thành thực sinh dục} = (P/T) * 100(\%)$$

Trong đó: P: Số cá thể có tuyến sinh dục có tuyến sinh dục giai đoạn III, IV, V.

b: Tổng số mẫu tuyến sinh dục của cá

Cá thành thực (cá trưởng thành) được xác định là những cá thể có tuyến sinh dục giai đoạn III, IV, V (Qasim *and* Qayyum, 1962; Smida *et al.*, 2014).

Mùa vụ sinh sản: Theo phương pháp của Chung Lân (1969), mùa vụ sinh sản của cá là thời điểm mà đa số cá có tuyến sinh dục ở giai đoạn thành thực IV, V. Tuy nhiên, cá khoang cổ là loài cá đẻ nhiều lần trong năm, tần suất đẻ tương đối dày (khoảng cổ nemô tái sinh sản 10 ngày sau khi đẻ đợt trước trong điều kiện nuôi thí nghiệm tại Viện Hải Dương học). Ở cá KCYN, sau khi đẻ xong, ngoài các sản phẩm còn lại của quá trình đẻ trước, trong tuyến sinh dục cá còn trứng ở các giai đoạn khác nhau trong đó có giai đoạn III, IV để sẵn sàng cho lần đẻ tiếp theo. Vì vậy, xác định theo mùa vụ sinh sản của cá KCYN là thời điểm mà cá có tuyến sinh dục giai đoạn III, IV, V theo phương pháp của Qasim *and* Qayyum, 1962; Smida *et al.*, 2014 được lựa chọn. Trong đó mùa vụ sinh sản cá KCYN là thời điểm mà đa số cá có tuyến sinh dục thành thực giai đoạn III, IV, V.

d. Sức sinh sản

Xác định 117 buồng trứng ở các giai đoạn III, IV, V (buồng trứng giai đoạn VI được tính như cá giai đoạn III) bằng kính soi nổi Olympus SZ51. Xác định số lượng trứng bằng cách lấy 3 mẫu ở 3 phần khác nhau (đầu, giữa, cuối) của buồng trứng với khối lượng ≤ 0,1 g/mẫu. Tách trứng ở 3 mẫu sau đó hòa chung 3 mẫu vào 10ml nước muối sinh lý, khuấy đều mẫu, đảo và bỏ vào buồng đếm. Kết quả này dùng để tính sức sinh sản tuyệt đối và tương đối.

Sức sinh sản tuyệt đối: là tổng số trứng ở giai đoạn thành thực trong tuyến sinh dục của cá, xác định theo phương pháp Laurence & Briand (1990) [117], được tính theo công thức:

$$Fa = (n * GW) / GW_m \text{ (trứng/cá thể)}$$

Trong đó: Fa: Sức sinh sản tuyệt đối
 GW: Khối lượng tuyến sinh dục (g)
 GW_m: Khối lượng mẫu trứng được lấy ra đếm (g)
 n: Số trứng của mẫu trứng được lấy ra đếm.

Sức sinh sản tương đối: được tính theo phương pháp của King (1990) [147]. Sức sinh sản tương đối là số lượng trứng trên một đơn vị khối lượng cá, được tính theo công thức:

$$Fr = Fa / BW_0$$

Trong đó: Fr: Sức sinh sản tương đối (số lượng trứng/g khối lượng thân cá)
 Fa: Sức sinh sản tuyệt đối
 BW₀: Khối lượng thân cá bỏ nội quan (g)

e. Tương quan chiều dài, khối lượng

Dựa vào số đo về chiều dài, khối lượng để xác định tương quan chiều dài – khối lượng theo phân tích hồi quy tuyến tính đơn biến (Mono Linear Regression) để xác định mối quan hệ giữa chiều dài, khối lượng của cá KCYN [29].

Xác định tương quan chiều dài – khối lượng, hệ số thành thực của cá KCYN sử dụng hệ số Pearson (Pearson correlation coefficient) và phân tích hồi quy tuyến tính đa biến (Multi Linear Regression) để xác định mối quan hệ giữa chiều dài, khối lượng và hệ số thành thực tuyến sinh dục của cá KCYN [29].

2.3.2. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá KCYN

2.3.2.1. Tập tính sinh sản cá bố mẹ, các giai đoạn phát triển phôi và biến thái ấu trùng

a. Vật liệu nghiên cứu

Chọn cá: thuê ngư dân lặn bắt có chủ đích từng cặp cá KCYN (2 con cá KCYN có kích thước lớn nhất trong tổ hải quỳ ngoài tự nhiên) được vận chuyển theo cặp về phòng thí nghiệm. Cá được bắt vào ban đêm và tách riêng từng cặp trong mỗi tổ bằng cách bỏ từng cặp cá ở mỗi tổ vào các lọ nhựa 1,5L (có đục các lỗ), sau đó đặt lọ chứa cá vào các xô nhựa 30L và vận chuyển hồ có sục khí về địa điểm thí nghiệm. Cá được xác định kích thước, khối lượng, tắm nước ngọt trước khi đưa vào nuôi thử nghiệm.



Hình 2.4 Vận chuyển cặp cá bố mẹ từ tự nhiên về nuôi trong bể thí nghiệm

Quan sát tập tính sinh sản, các giai đoạn phát triển phôi, ấu trùng được ghi nhận từ 3 cặp cá bố mẹ từ tự nhiên được đưa vào nuôi thuần dưỡng và sinh sản nhân tạo trong từng bể kính theo từng cặp, các bể có hệ thống lọc sinh học tuần hoàn. Trong các bể có đặt các giá thể dùng làm tổ cho cá sinh sản (lọ hoa, viên gạch, san hô chết, vỏ ốc ...) có thể tích bể 120L/bể.

Quan sát quá trình phát triển phôi bằng cách thu ngẫu nhiên 10 trứng/lần, đưa vào phòng thí nghiệm đặt trong một cốc thủy tinh có sục khí. Trứng được quan sát từ thụ tinh đến khi nở. Ở trứng tiếp tục được các cặp cá bố mẹ chăm sóc cho đến khi nở thành cá con và là nguồn cung cấp bổ sung phôi trong quá trình quan sát.

b. Phương pháp nghiên cứu tập tính sinh sản cá bố mẹ

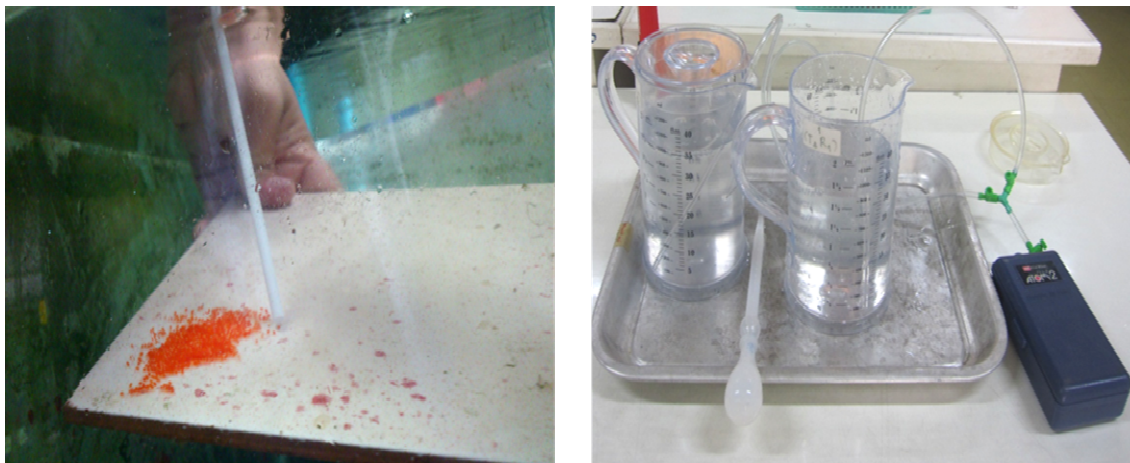
Mô tả quá trình kết cặp, đẻ trứng, ấp nở của cá bố mẹ trong thời gian từ khi đưa cá vào bể nuôi đến khi cá đẻ, chăm sóc phôi, ấu trùng đến trước thời gian trứng nở khoảng 12-24h.

Quan sát tập tính sinh sản bằng mắt thường và quay phim, chụp ảnh bằng máy Canon Power Shot SD960 IS và mô tả quá trình kết cặp, đẻ trứng, ấp nở của cá bố mẹ.

c. Phương pháp nghiên cứu các giai đoạn phát triển phôi và biến thái ấu trùng

Tiến hành lựa chọn 3 ổ trứng từ các cặp cá bố mẹ để theo dõi quá trình phát triển phôi, số liệu thu được là số trung bình các lần quan sát. Phôi được quan sát ngay khi cá bố mẹ đẻ và thụ tinh trong các bể thí nghiệm có giá thể. Nhấc các giá thể được cá đẻ trứng vào đưa nhẹ lên phía gần trên mặt. Sử dụng dao lam khẽ tách các phôi ra khỏi giá thể; sử dụng pipet nhựa đưa phôi vào trong các cốc thủy tinh và quan sát trong phòng thí nghiệm.

Phôi luôn đặt trong cốc thủy tinh thể tích 2L được sục khí 24/24 và quan sát, mô tả quá trình phát triển phôi và ấu trùng. Đặt phôi trên đĩa cầu lõm hoặc lam kính và quan sát dưới các loại kính phù hợp. Lần lượt quan sát, xác định thời gian, đặt phôi lại trong cốc thủy tinh để tiếp tục sử dụng cho những lần quan sát sau.



Hình 2.5 Thu mẫu và quan sát phôi cá KCYN

Cá KCLYN là loài đẻ trứng dính, và cá bố mẹ có tập tính chăm sóc phôi và ấu trùng trong suốt giai đoạn ấp trứng. Vì vậy, thường xuyên loại bỏ các phôi quan sát trong điều kiện phôi bị chết hoặc dị hình bằng cách thu phôi đang được cá bố mẹ ấp trong bể kính để tiếp tục xác định quá trình phát triển của phôi và ấu trùng.

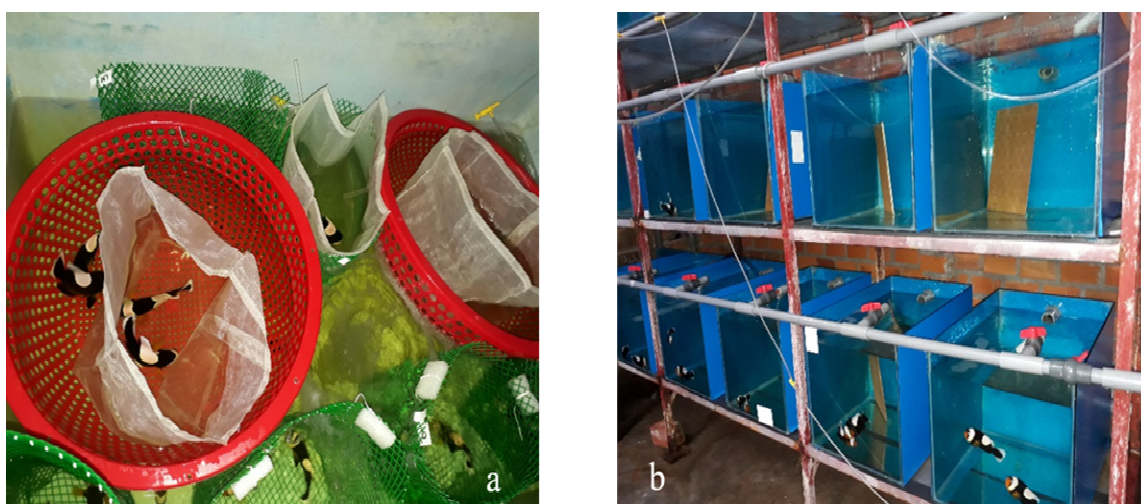
Hình ảnh về sự phát triển phôi cá được thực hiện trong khoảng thời gian 5 phút trong 24 giờ đầu tiên, vào khoảng thời gian 10-15 phút vào ngày thứ 2, thứ 3 sau khi thụ tinh và khoảng 30 phút cho đến khi trứng nở. Việc phân chia các giai đoạn phát triển phôi, ấu trùng dựa trên sự phân chia các giai đoạn phát triển cá xương của Nguyễn Tường Anh (1996) [1], Lê Hoàng Mỹ Dung và cs (2015) [3], Lưu Thị Dung và cs (2005) [4] và cá KCYN của Rattanayuvakorn và cs (2005) [148], khoang cổ nemo của Yasin (2007) [177].

Phôi cá được quan sát bằng kính soi nổi Olympus SZ61 có độ phóng đại tối đa: 14 đến 90 lần, kính hiển vi soi ngược CKX41. Chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số Canon EOS 650D. Quá trình phát triển phôi diễn ra hoàn toàn trong màng phôi, kích thước phôi không đổi trong suốt quá trình phát triển cho đến khi cá con nở, vì vậy chỉ cần đo kích thước khi bắt đầu quan sát. Đo kích thước phôi bằng thước vi thị kính có độ chính xác 1 μ m.

2.3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và nhiệt độ đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN

a. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn lên hiệu quả sinh sản

Cá thí nghiệm: phương pháp chọn cá tương tự trong thí nghiệm nghiên cứu về tập tính sinh sản cá bố mẹ, các giai đoạn phát triển phôi và biến thái ấu trùng. Chọn 20 cặp cá KCYN (40 con) trong số 36 cặp cá được thu mua từ các ghe lặn bắt theo cặp từ tháng 1 năm 2017. Cá được xử lý trong nước ngọt 15 phút sau đó nuôi thuần dưỡng trong các bể riêng trong 2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Trong quá trình thuần dưỡng, cá được cho ăn tôm, cá xay nhuyễn trộn với tảo spirulina với tỷ lệ cho ăn 5% khối lượng thân.



Hình 2.6. Cá bố mẹ được tuyển chọn (a) và hệ thống nuôi thí nghiệm cá KCYN (b)

Bố trí thí nghiệm: Mỗi bể nuôi có 1 cặp cá KCYN bố mẹ. Thí nghiệm lặp lại 4 lần. Tổng cá sử dụng là: 20 cặp (1 cặp x 5 nghiệm thức x 4 lần lặp). Thí nghiệm được thực hiện trong 6 tháng với 20 bể kính có thể tích 100 lít có lọc sinh học tuần hoàn khép kín cho toàn bộ hệ thống. Giá thể cho bể nuôi là san hô và gạch men.

Chăm sóc, quản lý: Cá được cho ăn 2 lần/ngày vào các thời điểm 8 h và 17 h. Chế độ cho ăn: cho cá ăn đến no. Thức ăn thừa và chất thải trong bể nuôi sẽ được siphon sau khi cho ăn khoảng 1h. Bể nuôi được vệ sinh và thay 20 - 30% nước hàng ngày (đã qua lắng, lọc sinh học và sục khí) để duy trì độ mặn (khoảng 32–34‰), các yếu tố thủy lý, thủy hóa ổn định trong suốt thời gian thí nghiệm.

Thí nghiệm loại thức ăn: nguyên liệu phối trộn 4 thành phần dinh dưỡng và 1 loại thức ăn tổng hợp Ocean Nutrition, sử dụng trong nuôi phát dục cá KCYN tương ứng với 5 nghiệm thức được thể hiện ở Bảng 2.2

Bảng 2.3. Thành phần và tỷ lệ phối trộn nguyên liệu của 5 thành phần dinh dưỡng nuôi sinh sản cá bố mẹ

Công thức 1 (NT 1)		Công thức 2 (NT 2)		Công thức 3 (NT 3)		Công thức 4 (NT 4)		Công thức 5 (NT 5)	
Thành phần	Hàm lượng (g)	Thành phần	Hàm lượng (g)	Thành phần	Hàm lượng (g)	Thành phần	Hàm lượng (g)	Thành phần	Hàm lượng (g)
Thức ăn tổng hợp	1.000	Tôm	600	Tôm	112	Bột cá	500	Tôm	200
		Mực	100	Bột cá	371	Bột mực	45	Mực	150
		Thức ăn Tổng hợp	250	Sò điệp	371	Cyclop – eeze	100	Marinara	646
		Spirulina	40	Tảo Spirulina	12	Spirulina	30	Tảo	1
		Vitamin	10	Lòng đỏ Trứng gà	22	Vitamin Premix	5	Vitamin tổng hợp	1
				Cải bó xôi	112	Bột moi	130	Tỏi	2
						Bột gạo	42	Dầu cá	0,6
						Rong biển	86		
						Men bánh mì	30		
						Wheat	22		
						Gluten			
						Vitamin C	5		
						Astaxanthin	5		

Ghi chú: NT1: Thành phần dinh dưỡng cá đang được sử dụng của người nuôi cá cảnh biển; NT2: Thành phần dinh dưỡng cá đang được sử dụng cho cá nemo của Viện HDH [155]; NT3: Thành phần dinh dưỡng cá đã được sử dụng cho cá khoang cổ đỏ của Viện HDH [21]; NT4: Thành phần thức ăn tham khảo thông tin về thành phần thức ăn nuôi cá khoang cổ của Trường Đại học Burapha, Viện Khoa học biển (BIMS); NT5: Thành phần dinh dưỡng nuôi cá khoang cổ cam của Viện NTTS, Đại học Nha Trang [28].

Chuẩn bị thức ăn

Thức ăn tổng hợp (Công thức 1): thức ăn tổng hợp cho cá biển Ocean Nutrition (sản phẩm Formula Two 100g dạng hạt).

Thức ăn tươi (Công thức 2, 3, 5): Thức ăn được chuẩn bị theo cùng một cách đó là bóc vỏ, rửa sạch các loại nguyên liệu tươi, sau đó trộn đều và xay nhuyễn [19]. Cho

thức ăn đã phối trộn vào hấp và đóng thành bánh, bỏ vào túi nhựa ép chặt thành miếng và đóng kín miệng túi. Thức ăn được bảo quản ở -4°C và sử dụng trong 1 tháng. Khi cho ăn, thức ăn sẽ được bẻ ra thành miếng nhỏ, rã đông ở nhiệt độ phòng và dùng thìa cắt thành từng miếng nhỏ cho cá ăn.

Thức ăn chế biến (Công thức 4): Toàn bộ các nguyên liệu đều được làm sạch và sấy khô ở nhiệt độ bán ẩm (khoảng 45°C), sau đó xay mịn các loại nguyên liệu ở dạng bột và đưa vào trộn đều với các tỷ lệ như công thức. Đưa nguyên liệu vào máy ép thức ăn bán nổi 3A5Kw dạng sợi, sau đó cho vào máy xay tạo thành hạt có đường kính $\sim 0,3\text{mm}$. Cho thức ăn dạng hạt vào túi nilon và đóng kín miệng túi. Thức ăn được bảo quản ở -4°C và sử dụng trong 1 tháng. Khi sử dụng, tách riêng lượng nhỏ thức ăn và rã đông ở nhiệt độ phòng cho cá ăn. Thành phần dinh dưỡng cơ bản (5 yếu tố: Protein (Đạm), Lipid (Béo), Moisture (Độ ẩm), Ash (tro) và NFE (Chiết xuất không đạm) của 4 nghiệm thức thức ăn 2, 3, 4, 5 được xác định tại Phòng Phân tích, Viện Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang, nghiệm thức 1: theo công bố của nhà sản xuất.

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên hiệu quả sinh sản

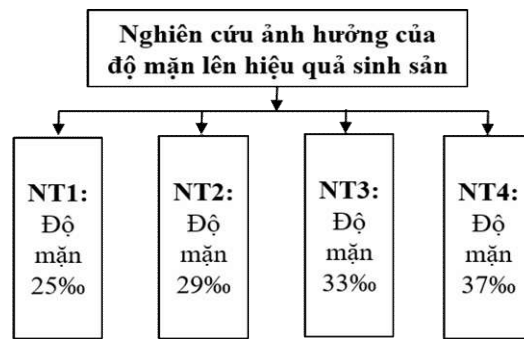
Các kỹ thuật chọn cá, thuần dưỡng, cho ăn và chăm sóc, quản lý tương tự như ở thí nghiệm ảnh hưởng các loại thức ăn. Thức ăn sử dụng cho cá ăn là thức ăn chế biến (công thức 4) trong đó yếu tố thay đổi đó là các giá trị độ mặn khác nhau.

Cá thí nghiệm: Chọn 16 cặp cá KCYN (32 con) trong số 20 cặp cá được thu mua từ các ghe lặn bắt theo cặp từ tháng 7 năm 2017 và phân bố ngẫu nhiên vào các bể. Cá có chiều dài $\geq 11,10\text{-}13,7\text{ cm}$, khối lượng $22,3\text{-}46,4\text{ g}$.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi bể nuôi có 1 cặp cá KCYN bố mẹ. Thí nghiệm lặp lại 4 lần. Tổng cá sử dụng là: 16 cặp (1 cặp x 4 nghiệm thức x 4 lần lặp). Thí nghiệm được thực hiện trong 6 tháng với 16 bể kính có thể tích 100 lít có lọc sinh học riêng lẻ cho từng bể. Giá thể cho bể nuôi là san hô và gạch men.

Thí nghiệm độ mặn: Độ mặn ban đầu ở tất cả các nghiệm thức là 30-33‰ (nước biển), sau đó được điều chỉnh ở mức tăng hoặc giảm ở 2‰- 4‰/ngày cho đến khi đạt độ mặn tương ứng với các nghiệm thức thí nghiệm và duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm. Độ mặn được điều chỉnh bằng cách thêm nước ngọt hoặc nước ót.

Các chế độ độ mặn sử dụng trong thí nghiệm tương ứng với 4 nghiệm thức được thể hiện ở hình 2.10



Hình 2.7. Thí nghiệm các mức độ mặn lên hiệu quả sinh sản cá bố mẹ

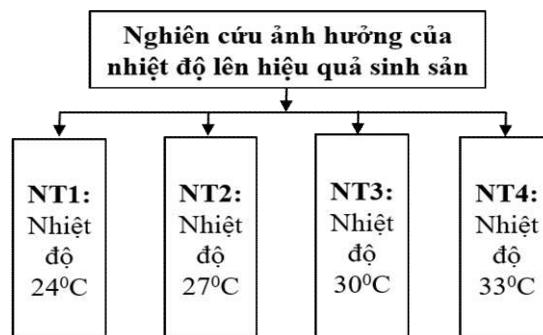
c. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên hiệu quả sinh sản

Các kỹ thuật chọn cá, thuần dưỡng, cho ăn và chăm sóc, quản lý tương tự như ở thí nghiệm ảnh hưởng các loại thức ăn. Thức ăn sử dụng cho cá ăn là thức ăn chế biến (công thức 4), độ mặn nước biển tự nhiên trong đó yếu tố thay đổi đó là các giá trị nhiệt độ khác nhau.

Cá thí nghiệm: Chọn 16 cặp cá KCYN trong số 22 cặp cá được thu mua từ các ghe lặn bắt theo cặp từ tháng 7 năm 2017 và phân bố ngẫu nhiên vào các bể. Cá có chiều dài 12,34-13,65 cm, khối lượng 31,25-66,28 g.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi bể nuôi có 1 cặp cá KCYN bố mẹ. Thí nghiệm lặp lại 4 lần. Tổng cá sử dụng là: 16 cặp (1 cặp x 4 nghiệm thức x 4 lần lặp). Thí nghiệm được thực hiện trong 6 tháng với 16 bể kính có thể tích 100 lít có lọc sinh học riêng lẻ cho từng bể. Giá thể cho bể nuôi là san hô và gạch men.

Thí nghiệm nhiệt độ: Nhiệt độ được điều chỉnh bằng cách sử dụng đồng hồ điều khiển nhiệt Elitech STC 1000 đặt ngoài hệ thống. Các chế độ nhiệt độ sử dụng trong thí nghiệm tương ứng với 4 nghiệm thức được thể hiện ở hình 2.11



Hình 2.8. Thí nghiệm các mức nhiệt độ lên hiệu quả sinh sản cá bố mẹ

d. Thu thập và xử lý số liệu các chỉ số hiệu quả sinh sản

Cách thí nghiệm về nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và nhiệt độ đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN được thu thập qua một số chỉ số sau nhằm xác định loại thức ăn, độ mặn, nhiệt độ phù hợp nhất của cá trong các nghiệm thức thí nghiệm.

Tần suất sinh sản của cá (lần/tháng) = Số lần cá sinh sản trong toàn bộ thời gian thí nghiệm (6 tháng)/6.

Sức sinh sản thực tế (Số lượng trứng/cá cái): Tổng số trứng cá vừa mới đẻ sẽ được đếm trực tiếp bằng mắt thường thông qua hình ảnh phóng to chụp toàn bộ ổ trứng bằng máy ảnh Canon powershot A2200HD 14.1 mega pixels.

Kích thước trứng (μm): Sau khi cá đẻ từ 40–60 phút, dùng dao lam tách ngẫu nhiên 30 trứng/1 tổ trứng cho vào ống có chứa dung dịch cố định formol 4%. Kích thước (chiều dài trứng) được xác định bằng thước đo trắc vi thị kính gắn trong kính hiển vi Olympus CX51, vật kính x 4 và thị kính x10. Kích thước trứng là số đo trung bình của 30 trứng thu được.

Tỷ lệ trứng hao hụt (%) = Số trứng sau khi ấp/số trứng cá đẻ ngày đầu $\times 100$.

Tổng số trứng cá tại thời điểm trước khi nở sẽ được đếm trực tiếp bằng mắt thường thông qua hình ảnh phóng to chụp lại toàn bộ ổ trứng bằng máy ảnh Canon powershot A2200HD 14.1 mega pixel.

Tỷ lệ nở của trứng (%) = Số cá nở/ số trứng thụ tinh $\times 100$

Trứng trước khi nở sẽ được chuyển sang bể riêng (12-24h trước khi nở). Thời điểm chuyển bể phụ thuộc vào nhiệt độ, thông thường vào chiều ngày thứ 7 ngày sau khi cá đẻ. Cá thường nở vào buổi tối từ 20–24 h. Tổng số trứng còn lại trước khi chuyển bể được mô tả ở phần tỷ lệ trứng hao hụt. Số cá mới nở được đếm trong ngày đầu tiên khi cá vừa nở ra.

Kích thước ấu trùng (mm): Sau khi trứng nở thành ấu trùng, kiểm tra kích thước (chiều dài) ấu trùng vào ngày tuổi đầu tiên. Dùng ca nhựa vớt ngẫu nhiên 5 con cá/1 đợt nở cho vào ống nhựa có chứa dung dịch cố định formol 4%. Kích thước (chiều dài ấu trùng) được xác định bằng thước đo trắc vi thị kính gắn trong kính soi nổi Olympus SZ61. Kích thước ấu trùng là số đo trung bình của 30 ấu trùng thu được.

Thời gian nở (ngày): tính từ ngày cá bố mẹ đẻ đến ngày cá nở thành cá con.

2.3.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và mật độ đến hiệu quả ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 - 15 ngày tuổi

a. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

Cá thí nghiệm: cá con mới nở (~ 1 ngày tuổi) trong từng đợt ấp nở được chia ngẫu nhiên vào các bể thí nghiệm cho cùng 1 nghiệm thức.

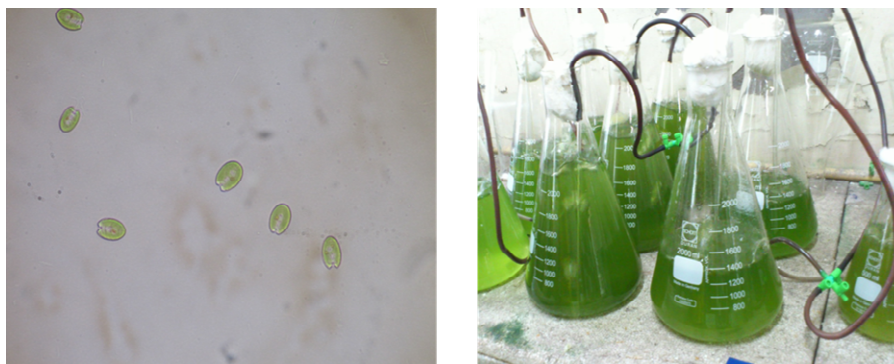


Hình 2.9. Ương nuôi ấu trùng cá KCYN

Chăm sóc, quản lý: Cá được cho ăn 3 lần/ngày vào các thời điểm 8 h, 11 và 16 h. Khẩu phần thức ăn cho cá ăn đến no. Bổ sung vi tảo *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* tỷ lệ 1:1, mật độ $5-8 \times 10^4$ tế bào/mL. Các bể ương nuôi riêng lẻ có sục khí 24/24; thức ăn thừa và chất thải trong bể nuôi sẽ được siphon và thay 70 - 80% nước hàng ngày sau khi cho ăn khoảng 1h.

Nuôi và chuẩn bị thức ăn:

+ **Nuôi sinh khối tảo:** Tảo giống gồm hai loài vi tảo *N. oculata* và *I. galbana* được lưu giữ ở thể tích 1 – 2 lít trong phòng thí nghiệm với cường độ ánh sáng 3000 lux, 16h/ngày, sau đó được chuyển tăng dần khối lượng sang các bình tam giác và nhân lên theo quy tắc tăng thể tích 2 lần/24h. Nuôi sinh khối tảo trong các túi nilông (1,3 x 0,5 m) treo trên giá hoặc các bể composite 2 m³ trong điều kiện ánh sáng tự nhiên có mái che. Mật độ cấy tảo ban đầu là $0,5 \times 10^6$ tế bào/mL. Các yếu tố môi trường nước nuôi: pH 7,8 – 8,5; nhiệt độ nước: 28 - 30°C; độ mặn 33 - 35‰. Thời gian thu hoạch sau 4 - 5 ngày khi mật độ tảo đạt từ $6-7 \times 10^6$ tế bào/L. Môi trường nuôi tảo là Guillard f/2 pha sẵn (tỷ lệ 1 ml: 10 lít nước nuôi).

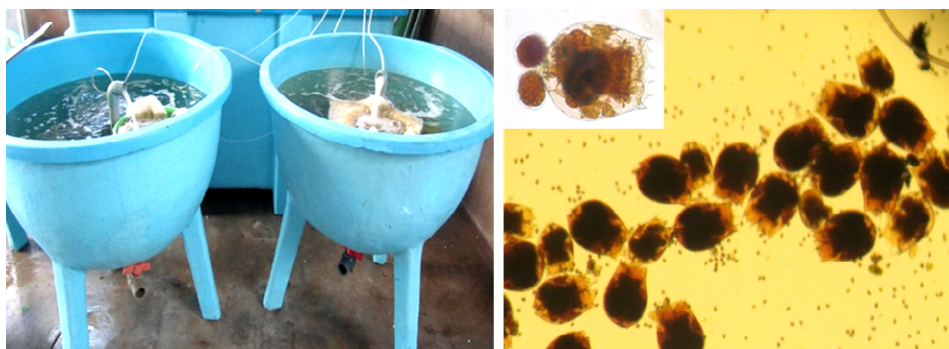


Hình 2.10. Hệ thống nuôi cấy tảo

+ **Nuôi sinh khối Rotifer và Copepoda:** Rotifer giống là loài *Brachionus plicatilis* và Copepoda được mua từ các trại nuôi cá biển ở Nha Trang. Nuôi sinh khối từng loài trong các bể composite hoặc xô nhựa 120 lít theo phương pháp thu hoạch bán

liên tục. Mật độ ban đầu 50 – 100 con/ml. Rotifer và Copepoda được cho ăn bằng hỗn hợp tảo *N. oculata* và *I. galbana*. Tảo được cho ăn với mật độ 1.000.000– 2.000.000 tế bào/mL. Từ ngày nuôi thứ ba trở đi, khi mật độ Rotifer đạt trên 200 - 300 con/mL, tiến hành thu hoạch 30 - 50% đồng thời cấp tảo để duy trì mật độ thức ăn và thể tích nước (Hình 2.14).

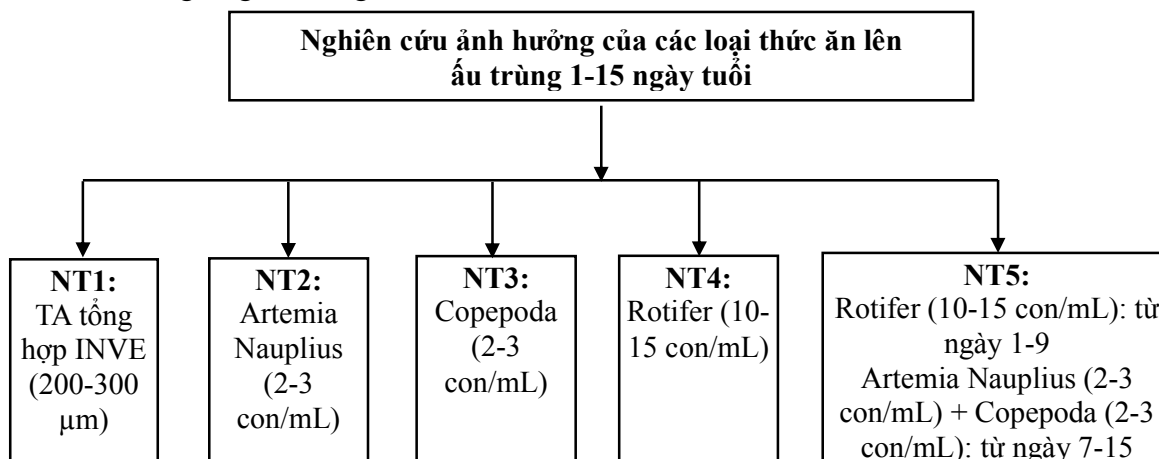
+ *Ấp nở nauplius Artemia*: Artemia là nguồn *Artemia franciscana* (Century - Mỹ). Artemia được rửa nước ngọt rồi ấp trong xô hoặc bình vikoda với mật độ 2 - 3 g trứng/lít nước, kèm sục khí mạnh liên tục trong khoảng 24 giờ trong nước biển có độ mặn 33 ‰ và nhiệt độ tự nhiên tại trại. Dựa vào tính hướng quang của Artemia để thu hoạch, Artemia nauplius được thu hoạch bằng cách chiếu sáng bằng đèn pin hoặc ánh sáng mặt trời kết hợp che túi nylon đen.



Hình 2.11. Bể nuôi sinh khối Rotifer và Copepoda

Bố trí thí nghiệm: Số lượng cá nuôi trong mỗi bể là 20 con/bể. Bể ương thí nghiệm có lượng nước là 10 lít/bể tương ứng với mật độ 2 con/L. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 5 lần lặp. Thời gian thí nghiệm là 15 ngày.

Thí nghiệm thức ăn: Các chế độ thức ăn sử dụng trong ương nuôi ấu trùng cá KCYN tương ứng với 5 nghiệm thức được thể hiện ở hình 2.15



Hình 2.12. Thí nghiệm loại thức ăn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

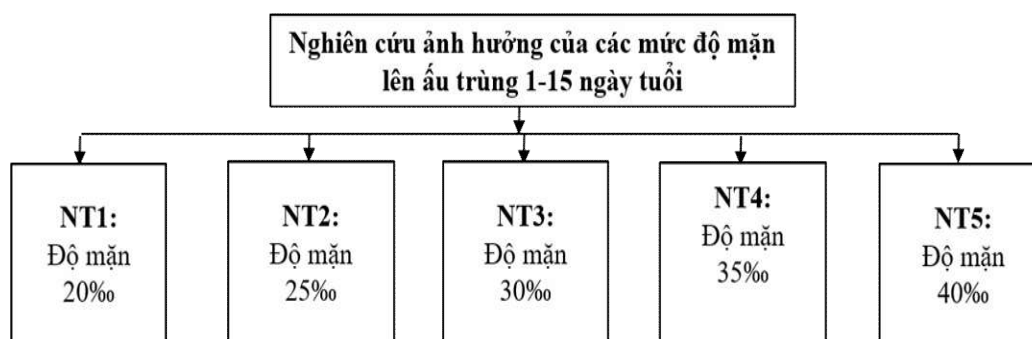
b. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

Cá thí nghiệm, Chăm sóc, quản lý: tương tự cá nuôi ở nghiệm thức thử nghiệm thức ăn. Thức ăn sử dụng là nghiệm thức 5: Rotifer+Artemia Nauplius + Copepoda.

Thuần hóa độ mặn: Độ mặn trong hệ thống nuôi ấp nở ở mức 33‰, sau đó được điều chỉnh ở mức $\pm 3\text{-}5\text{‰}$ /ngày cho đến khi đạt độ mặn tương ứng với các nghiệm thức thí nghiệm. Phương pháp điều chỉnh độ mặn tương tự ở cá bố mẹ.

Bố trí thí nghiệm: Số lượng cá nuôi trong mỗi bể là 20 con/bể. Bể ương thí nghiệm có lượng nước là 10 lít/bể tương ứng với mật độ 2 con/L. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 5 lần lặp. Thời gian thí nghiệm là 15 ngày.

Thí nghiệm độ mặn: Các mức độ mặn sử dụng trong ương nuôi ấu trùng cá KCYN tương ứng với 5 nghiệm thức được thể hiện ở hình 2.16



Hình 2.13. Thí nghiệm các mức độ mặn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

c. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

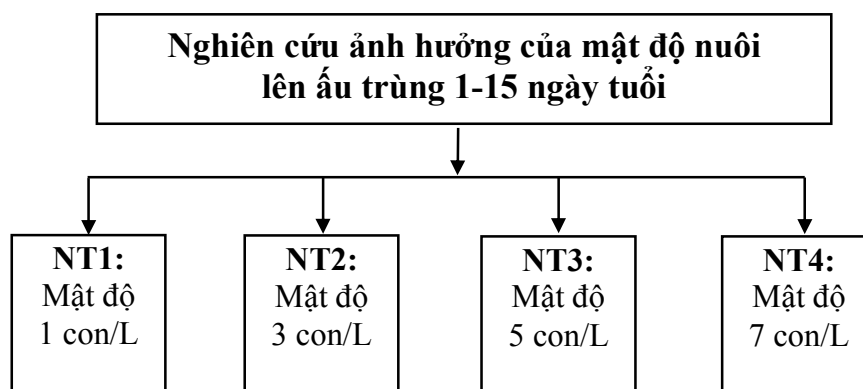
Cá thí nghiệm: tương tự trong thí nghiệm loại thức ăn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng cá.

Chăm sóc, quản lý: loại thức ăn sử dụng là nghiệm thức 5 ở thí nghiệm thức ăn, độ mặn 32-33‰.

Nuôi và chuẩn bị thức ăn: tương tự trong thí nghiệm loại thức ăn.

Bố trí thí nghiệm: Số lượng cá nuôi trong mỗi bể là 20 con/bể. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 5 lần lặp. Thời gian thí nghiệm là 15 ngày.

Thí nghiệm mật độ: Các mật độ nuôi trong ương nuôi ấu trùng cá KCYN tương ứng với 4 nghiệm thức được thể hiện ở hình 2.17



Hình 2.14. Thí nghiệm mật độ nuôi lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

d. Thu thập và xử lý số liệu các chỉ số hiệu quả ương nuôi ấu trùng

Sử dụng chất gây mê cho động vật là dầu đinh hương MS 22 của Nga với nồng độ 1ppm trong 2-3 phút trước khi xác định các chỉ số chiều dài, khối lượng của cá ở thời điểm đầu (T1) trước thí nghiệm và cuối thí nghiệm (T2) kết thúc thí nghiệm.

Chiều dài đầu, cuối: xác định bằng thước kẹp điện tử Mitutoyo 500-173 (0-300mm) có độ chính xác đến 0,01 (mm). Giá trị chiều dài cá là giá trị chiều dài trung bình của cá tại thời điểm đầu và cuối.

Khối lượng đầu, cuối: Khối lượng cá được xác định bằng cân điện tử Atago của Nhật có độ chính xác đến 0,0001 (g). Xác định khối lượng cá thời điểm ban đầu (T1) và thời điểm kết thúc thí nghiệm sau 15 ngày nuôi (T2). Giá trị khối lượng cá là giá trị khối lượng trung bình của cá tại thời điểm đầu và cuối.

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng về chiều dài (SGR_L)

$$SGR_L (\%/ngày) = [(\ln L_2 - \ln L_1) / (T_2 - T_1)] \times 100$$

Trong đó: L1: chiều dài toàn thân cá ở thời điểm T1 (mm);

L2 : chiều dài toàn thân cá ở thời điểm T2 (mm).

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng khối lượng

$$SGR_W(\%/ngày) = [(\ln W_2 - \ln W_1) / (T_2 - T_1)] \times 100$$

Trong đó : W1: khối lượng cá ở thời điểm T1 (mg);

W2: khối lượng cá ở thời điểm T2 (mg).

Tỷ lệ sống (%): $SR (\%) = (S_e / S_i) \times 100$

Trong đó: S_e : số cá còn lại ở thời điểm T2 (con).

S_i : số cá ở thời điểm T1 (con).

2.3.2.4. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi ấu trùng cá KCYN tại cơ sở sản xuất

a) Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá KCYN

Trên cơ sở phân tích những kết quả thích hợp trong các thí nghiệm nuôi vỗ, cho đẻ, ương ấu trùng và tham khảo các quy trình sản xuất giống các loài cá khoang cổ khác trong và ngoài nước, tiến hành sản xuất giống thử nghiệm cá KCYN. Quy trình chuẩn bị hệ thống, thức ăn, chăm sóc quản lý tương tự các thí nghiệm trên.

* *Chọn cá bố mẹ*: Chọn 4 cặp cá KCYN bố mẹ thu được từ kết quả nuôi sinh sản bằng các loại thức ăn có kết quả tốt nhất đang được nuôi tại trại thử nghiệm và tiếp tục sử dụng thức ăn phối trộn dạng viên theo nghiệm thức 4 (bột cá, Cyclop – eeze, bột moi, bột mực, bột gạo, rong biển, Spirulina, men bánh mì, Vitamin Premix, Vitamin C, Wheat Gluten, Astaxanthin) Cá được kiểm tra khối lượng, chiều dài trước khi đưa vào bể đẻ.

* *Chăm sóc và quản lý cá thí nghiệm*: Mỗi ngày cho ăn 2 lần, 8 h và 14 h, khẩu phần cho cá ăn đến no.

* *Nguồn nước*: nuôi tuần hoàn cá trong hệ thống bể có nước biển đã được xử lý, chiếu sáng tự nhiên. Hàng ngày siphon loại bỏ thức ăn thừa và chất thải và bổ sung lượng nước hao hụt, thay nước 50-60%/tuần. Các yếu tố môi trường được theo dõi và duy trì trong phạm vi thích hợp: Nhiệt độ nước 24-30⁰C; độ mặn 29-33‰; pH 7,5-8,1; Oxy hòa tan 5-6mg/L; $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 \leq 0,1\text{mg/L}$.

* *Cá đẻ*: Hằng ngày quan sát tập tính sinh sản của cá, biết thời điểm cá đẻ để theo dõi. Sau khi cá đẻ, theo dõi sự phát triển phôi, màu sắc phôi để chuyển sang bể ấp, cá nở sau 7 - 8 ngày tùy thuộc nhiệt độ (28 - 30⁰C). Trong thời gian cá ấp trứng, hạn chế tối đa các tác động đột ngột như âm thanh, ánh sáng.

* *Phòng trị bệnh*: Khi cá bị nhiễm bệnh, có thể tắm bằng nước ngọt hoặc formol 25 ppm hoặc CuSO_4 0,5 ppm, trong khoảng 5 phút, 3 - 5 ngày liên tục. Nhìn chung, việc trị bệnh trên cá khoang cổ còn hạn chế, do đó, cần tăng cường các biện pháp phòng trị bệnh tổng hợp như quản lý tốt chất lượng nước, cho ăn đúng liều lượng, thời gian, xiphong thường xuyên....

b) Thử nghiệm ương nuôi ấu trùng cá KCYN

Trên cơ sở phân tích những kết quả thích hợp trong các thí nghiệm ương nuôi ấu trùng, tiến hành nuôi thử nghiệm ấu trùng cá KCYN đến 15 ngày tuổi. Quy trình chuẩn bị hệ thống, chăm sóc quản lý tương tự các thí nghiệm nuôi ấu trùng ở trên.

* *Ấp nở trứng*: Chuyển giá thể chứa phôi (lúc chiều tối) vào bể ấp có thể tích 100 lít (cấp khoảng 20-25L/bể vừa ngập giá thể chứa phôi), sục khí nhẹ gần giá thể, các yếu tố môi trường tương đương bể cá bố mẹ. Bể ấp nở được che kín bằng nilong đen nhằm hạn chế tác động của ánh sáng. Cá nở từ khoảng 19h đến 4h sáng hôm sau tùy vào chất lượng ổ trứng. Sau khi nở, nhấc giá thể ra khỏi bể và tiến hành ương nuôi ấu trùng.

* *Chăm sóc và quản lý*: Cá được ương trong cá bể kính ấp nở có thể tích nước khoảng 25-30L/bể và nâng dần mức nước theo ngày tuổi của ấu trùng trong khoảng 5%/ngày tùy số lượng cá, si phong và thay nước hàng ngày khoảng 80%/ngày, sục khí nhẹ liên tục 24/24h. Cá được ương với mật độ 3 - 5 con/L. Các yếu tố môi trường nước như nhiệt độ, pH, oxy hoà tan, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ và N-NO_2 được kiểm tra và duy trì ổn định, thích hợp (Nhiệt độ 28 - 30°C, độ mặn 30 - 33‰; pH 7,8 - 8,2; oxy hòa tan > 5 mg/l; $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 < 0,1$ mg/l; $\text{N-NO}_2 < 0,02$ mg/l).

* *Thức ăn và kỹ thuật cho ăn*: Trong 9 ngày đầu, cá được cho ăn bằng Rotifer 10 - 20 con/ml; từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 15, cá được cho ăn nauplius Artemia 2 - 3 con/ml và Copepoda tỷ lệ 1:1. Cá được cho ăn 3 lần/ngày vào lúc 6 và 11 và 15 giờ. Vi tảo *N. oculata* và *I. galbana* được cấp vào bể ương 1 lần/ngày (8h00), mật độ $5-8 \times 10^4$ tế bào/mL.

* *Thu hoạch*: Khi cá đạt 15 ngày tuổi, có thể tiến hành thu hoạch chuyển sang bể tiếp tục nuôi lớn (sau 2 tháng nuôi, cá đạt 1,5-2cm). Để thu hoạch, sử dụng ca nhựa, vớt cá sang các bể trong hệ thống nuôi tuần hoàn.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Excel 2010 được sử dụng thiết lập cơ sở dữ liệu đầu, vẽ biểu đồ, xử lý số liệu vào làm cơ sở dữ liệu đầu vào cho các phần mềm SPSS, SPSS Station 16.0 for window và R để tính hệ số Pearson (Pearson correlation coefficient) và phân tích hồi quy tuyến tính đa biến (Multi Linear Regression) xác định mối quan hệ giữa chiều dài, khối lượng và hệ số thành thực tuyến sinh dục. Sử dụng hàm phân tích phương sai một nhân tố (oneway – ANOVA) và Duncan test để kiểm định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) của các thông số một biến giữa các nghiệm thức trong từng thí nghiệm.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học, sinh sản

Thu và phân tích sinh học sinh sản của 1.158 con cá KCYN thu ngẫu nhiên từ vùng biển Khánh Hòa với số mẫu từ 30 con/tháng trở lên trong thời gian từ 2016-2018. Cá có chiều dài trung bình $7,58 \pm 2,89$ cm trong khoảng chiều dài khai thác từ 2,5 -14,54 cm. Khối lượng cá trung bình $14,18 \pm 13,97$ g trong khoảng khai thác từ 0,72 -62,59 g. Kết quả kích thước và khối lượng mẫu thể hiện qua Bảng 3.1.

Bảng 3.1 Kích thước và khối lượng cá KCYN vùng biển Khánh Hòa (n=1.158)

Giá trị	TL (cm)	SL (cm)	BW (g)	BW ₀ (g)
Trung bình $\pm$ SD	7,58 $\pm$ 2,89	6,40 $\pm$ 2,42	14,18 $\pm$ 13,97	13,19 $\pm$ 13,27
Min - Max	2,50-14,54	2,07-12,10	0,93-66,26	0,72-62,59

Cá KCYN là loài có kích thước tương đối nhỏ so với các loài cá rạn san hô như cá nạng đào, cá mao tiên, cá hoàng đế. Tuy nhiên có kích thước tương tự các loài khoang cổ khác. Hà Lê Thị Lộc (2005) đã xác định kích thước khai thác của cá khoang cổ đen đuôi vàng tại vùng biển Khánh Hòa tối đa là 13,3 cm và khoang cổ đỏ là 12,2 cm. Nguyễn Hữu Phụng (1996) xác định kích thước tối đa của KCYN là 12,5 cm. Tuy nhiên, trong thời gian từ 2016-2018, kết quả cho thấy kích thước lớn nhất trong số 1.158 mẫu cá KCYN thu được là 14,54 cm. Khối lượng tối đa của cá là 66,26 g, giá trị này tương tự cá khoang cổ đen đuôi vàng (66 g) và cao hơn so với khoang cổ đỏ (54,6 g) [17, 25].

3.1.1. Giới tính và tỷ lệ cá KCYN lưỡng tính

Việc xác định giới tính cho cá khoang cổ dựa trên đặc điểm hình thái ngoài là khó khăn, chưa có cơ sở khoa học cho việc phân biệt giới tính của cá khoang cổ qua các dấu hiệu hình thái bên ngoài mà thường trên các gợi ý về đặc điểm chuyển đổi giới tính trong đó với cá có kích thước nhỏ hơn thường là cá đực hoặc đực tiền trưởng thành, còn các con có kích thước lớn nhất trong “tổ” là cá cái. Với cá KCYN, các đặc điểm xác định giới tính là chưa rõ ràng. Vì vậy, tổng số 120 mẫu tuyến sinh dục cá KCYN đã được thu thập và xác định giới tính qua việc xác định sản phẩm sinh dục đó chính là các tế bào sinh dục đực và cái. Tuyến sinh dục của cá có xuất hiện cả sản phẩm sinh dục đực và cái ở các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục từ I – V có tỷ lệ

là 100%. Qua kết quả này cho thấy chưa đủ cơ sở để xác định loài KCYN có hiện tượng chuyển đổi giới tính. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.2

Bảng 3.2 Các giai đoạn thành thực của trứng và tỷ lệ tế bào sinh dục đực và cái ở cá KCYN vùng biển Khánh Hòa (n=120)

Giai đoạn	Tháng												Số mẫu	Tbsd	Tbsd	Ghi chú
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		♀ (%)	♂ (%)	
I	6	2	0	0	5	0	2	2	0	6	0	2	25	100	100	Hình 3.2
II	0	4	2	2	0	3	2	0	0	2	6	0	21	100	100	Hình 3.3
III	0	2	0	3	2	2	0	0	8	0	4	5	26	100	100	Hình 3.4
IV	1	2	3	4	0	0	5	6	0	0	0	0	21	100	100	Hình 3.5
V	2	1	3	0	1	6	1	0	0	0	4	9	27	100	100	Hình 3.6
Tổng	9	11	8	9	8	11	10	8	8	8	14	16	120			

Bên cạnh hiện tượng phân tính, nghĩa là trong một quần thể có cả con đực và con cái thường thấy ở sinh vật trong đó có cá, thuyết lưỡng tính bao gồm lưỡng tính đồng thời, lưỡng tính kế tiếp hay lưỡng tính tuần tự, lưỡng tính đực trước hay lưỡng tính cái trước đã được ghi nhận ở khoảng 6% tổng số loài cá (27 họ trong số 448 họ cá). Tuy nhiên, cơ chế sinh học chính xác kích thích sự thay đổi giới tính vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Mô hình lợi thế kích thước là một lý thuyết được chấp nhận rộng rãi để giải thích tầm quan trọng thích nghi của sự thay đổi giới tính ở những loài lưỡng tính tuần tự mà đại diện thường được nhắc đến đặc trưng là cá khoang cổ [76, 87, 129, 170]. Kết quả nghiên cứu trên KCYN vùng biển Khánh Hòa ở cá khoang cổ đỏ, khoang cổ đen đuôi vàng của Hà Lê Thị Lộc (2005) đều có tỷ lệ đực cái là 1:1 và có hiện tượng chuyển đổi giới tính với tuyến sinh dục đực cái phân biệt theo kích thước cá trong đó toàn bộ cá đực đều là con có kích thước nhỏ hơn, con cái là con có kích thước lớn nhất trong “tổ [18].

Trong khi nhiều loài cá khoang cổ là lưỡng tính đực trước, thì loài cá bàng chài *Labroides dimidiatus* ở Thái Bình dương lại là loài cá lưỡng tính cái trước: trong một

nhóm chừng mười cá thể, con lớn nhất cũng là già nhất là con đực duy nhất. Khi nó chết hoặc bị bắt đi trong thí nghiệm thì con cái lớn nhất đổi giới tính thành con đực.

Trong các loài cá biển được gia hóa hiện nay thì cá chẽm (*Lates calcarifer*) là lưỡng tính đực trước. Còn các loài cá mú (*Epinephilus spp.*) Là cá lưỡng tính cái trước. Trong các loài cá nước ngọt thì cá chọi (*Betta splendens*) và lươn (*Monopterus albus*) là cá lưỡng tính cái trước. Nói chung, hiện tượng lưỡng tính ở lớp cá không hiếm gặp nhưng việc nghiên cứu và giải thích chưa đầy đủ.

Lưỡng tính đồng thời (*Synchronous hermaphroditism*) là hiện tượng cá thể trưởng thành có cả tinh sào và buồng trứng cùng hoạt động. Hiện tượng này thường gặp ở các loài cá biển họ Serranidae và Gobiidae. Nghiên cứu phân tích mô học tuyến sinh dục của cá mú *Serranus cabrilla* (Linnaeus, 1758) tại quần đảo Canary (1992) xác định rằng đây là loài cá lưỡng tính đồng thời trong đó tuyến sinh dục bao gồm cả mô tinh hoàn và mô buồng trứng [86].

Trong sinh học cơ bản, chúng ta biết rằng giới tính được quy định bởi nhiễm sắc thể giới tính X và Y trong đó con cái có 2 nhiễm sắc thể X và con đực có 1 nhiễm sắc thể X và 1 nhiễm sắc thể Y (hoặc một số ít sinh vật thì ngược lại). Tuy nhiên, một khái niệm về giới tính của sinh vật được nhiều nhà khoa học chấp nhận đó là việc xác định giới tính sinh vật bằng sản phẩm sinh dục (giao tử) mà nó sản sinh trong đó sinh vật có giới tính đực sinh ra các giao tử đực (tinh trùng); còn sinh vật có giới tính cái sinh ra những giao tử cái (tế bào trứng). Các cá thể sinh vật sản sinh ra cả giao tử đực và cái được gọi là sinh vật lưỡng tính. Hiện tượng “lưỡng tính” không phải là hiện tượng bất thường điển hình trong thế giới sinh vật trong đó bao gồm cả con người. Rất nhiều bằng chứng cho thấy có nhiều yếu tố quyết định giới tính sinh vật không chỉ là do gen và nhiễm sắc thể mà đôi khi còn do cả yếu tố môi trường [135].

Ở một số loài cá có sự linh hoạt giới tính hay còn gọi là sự mềm dẻo (plastic) giới tính trong quá trình phát triển. Một số loài hoặc là lưỡng tính đồng thời nghĩa là cá có cả mô buồng trứng và tinh hoàn chức năng trong cùng thời điểm, hoặc lưỡng tính tuần tự. Các loài lưỡng tính có thể được chia thành ba nhóm. Đầu tiên là lưỡng tính có chuyển đổi giới tính với tính cái chín trước (protogyny), cá bắt đầu cuộc sống của nó như một con cái nhưng sau này trở thành con đực. Ngược lại, nhóm thứ hai là trường

hợp đối với các loài có đặc điểm sinh học sinh sản là tính đực chín trước (protandry), nghĩa là trong quá trình phát triển từ cá con đến trưởng thành cá phát triển tính đực trước, sau đó là tính cái. Nhóm thứ ba bao gồm một số ít loài có thể thay đổi giới tính của chúng (thay đổi giới tính hai chiều), nghĩa là trong tuyển sinh dục, sản phẩm sinh dục của cá bao gồm cả giao tử đực và giao tử cái. Cho đến nay, công bố của con người về hiện tượng giới tính linh hoạt này chỉ duy nhất được biết đến xuất hiện ở cá và như vậy có cung cấp cơ sở cho nghiên cứu các hệ thống mô hình để điều tra các cơ chế xác định giới tính và sự khác biệt ở động vật có xương sống, thể hiện mức tiến hóa thấp của cá trong nhóm động vật có xương sống đồng thời là sự thích ứng với môi trường sống của cá nhằm đảm bảo cho sự tồn tại của giống loài [97].

Kết quả nghiên cứu trên chưa đồng nhất với một số công bố về tính lưỡng tính có chuyển đổi giới tính từ đực sang cái ở đa số cá khoang cổ trong đó có KCYN. Tuy nhiên, dựa trên các tiêu bản mô học và các học thuyết về tính lưỡng tính tiềm sinh, hoàn toàn có thể xảy ra hiện tượng lưỡng tính đồng thời ở cá KCYN. Cần tiếp tục có những nghiên cứu bổ sung nhằm tìm ra các yếu tố ảnh hưởng như địa lý hoặc môi trường ... dẫn đến kết quả với sự sai khác giới tính này ở cá KCYN vùng biển Khánh Hòa hoặc các vùng lân cận. Hiện tượng lưỡng tính đồng thời ở cá KCYN không phải là duy nhất trong lớp cá và nhóm cá rạn san hô, tuy nhiên, đây là vấn đề khá phức tạp và phần nào ít liên quan đến khía cạnh ứng dụng của luận án nên việc tìm hiểu sâu còn hạn chế.

3.1.2. Các giai đoạn phát triển tuyển sinh dục và tế bào trứng

Quá trình phát triển của tuyển sinh dục có sự hiện diện cùng lúc của sản phẩm sinh dục cái (noãn bào, trứng) ở các giai đoạn khác nhau, đồng thời cả sản phẩm sinh dục đực (tinh tử, tinh trùng). Tuyển sinh dục của cá KCYN gồm hai thùy thường không bằng nhau trong quá trình phát triển, một thùy lớn và một thùy nhỏ nằm hai bên xoang bụng và được treo vào vách của xoang cơ thể nhờ màng treo. Phần sau tuyển sinh dục là ống dẫn ngắn, hai ống dẫn hợp lại thành một và thông với bên ngoài qua lỗ sinh dục. Lỗ sinh dục này có thể kéo dài ra ngoài cơ thể cá khoảng 3mm và chỉ xuất hiện khi cá đang đẻ hoặc thụ tinh. Qua lỗ sinh dục, các sản phẩm sinh dục đực và cái được thải ra. Hình ảnh lỗ sinh dục được thể hiện qua Hình 3.1



Hình 3.1. Lỗ sinh dục cá KCYN khi cá đang đẻ và thụ tinh

Với kích thước lớn, từ giai đoạn II trở đi có thể nhìn thấy bằng mắt thường, màu sắc cơ quan sinh sản thay đổi có thể nhận thấy qua sự phát triển của noãn bào, nên chúng tôi phân chia các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục cá theo sự phát triển của tế bào trứng theo phương pháp phân chia thang 6 bậc của Nikolsky (1963) [7], mô tả tuyến sinh dục và tế bào sinh dục theo phương pháp của Xakun và Buskaia (1968) [22] và hoàn thiện của Nguyễn Tường Anh (1996, 1999) [1, 2].

Sự xuất hiện của noãn bào, tinh tử ở nhiều giai đoạn trong cùng một buồng trứng cho thấy đây là loài có noãn sào kiểu không đồng bộ và đẻ nhiều lần trong năm.

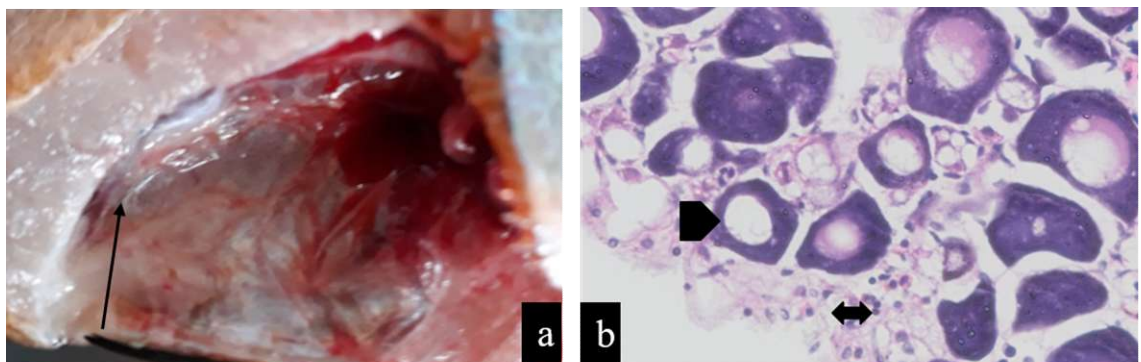
3.1.2.1. Giai đoạn I

Về ngoại hình: tuyến sinh dục dạng sợi màu trắng trong suốt nằm sát sống lưng, sau bóng hơi, hình dạng như 2 sợi chỉ, mảnh và khó để phát hiện cũng như tách khỏi cơ thể, kích thước và khối lượng nhỏ. Giai đoạn này chỉ gặp ở những cá thể thành thực lần đầu. Không phân biệt rõ noãn bào ở giai đoạn này bằng mắt thường mà chỉ có thể nhìn thấy chúng trên các tiêu bản tế bào dưới độ phóng đại lớn của kính hiển vi.

Về tổ chức học: Trên lát cắt mô học của tuyến sinh dục giai đoạn này, mô liên kết và mạch máu chưa phát triển tuy nhiên xen kẽ giữa các noãn nguyên bào là các tinh nguyên bào nằm trong các túi chứa tinh có kích thước tương đối lớn phân bố khắp tuyến sinh dục.

Noãn nguyên bào trong suốt, có hình tròn và có kích thước không lớn. Noãn bào ở pha nhân- chất nhiễm sắc có tính ưa kiềm với nguyên sinh chất bắt màu tím đậm của

Hematocine. Nhân to, nằm giữa tế bào, không bắt màu và chiếm tỷ lệ lớn hơn so với nguyên sinh chất trong noãn bào, xung quanh tế bào được bao bởi một lớp màng mỏng. Đường kính noãn nguyên bào dao động từ 12,0 – 34,1 μ m (n=48). Trong tuyến sinh dục xuất hiện số lượng lớn tinh nguyên bào với kích thước lớn có thể nhìn thấy rõ dưới kính hiển vi.



a: tuyến sinh dục (mẫu tươi); b: tuyến sinh dục (mẫu mô học) 10 μ m
 ► tbsd cái ◄ tbsd đực

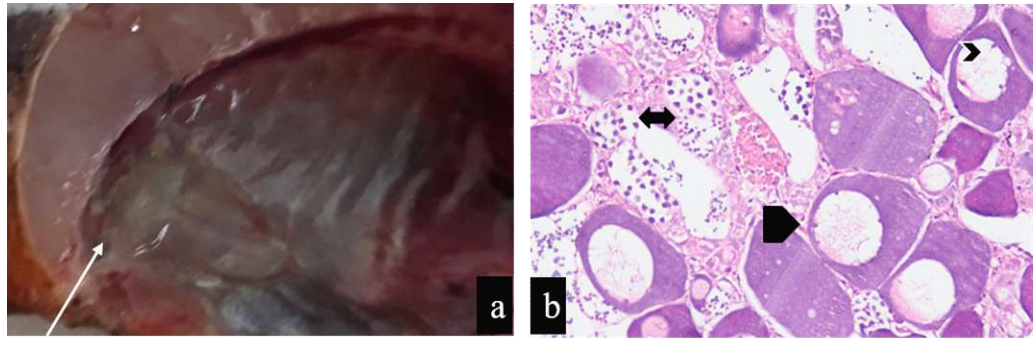
Hình 3.2. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn I

3.1.2.2. Giai đoạn II

Về ngoại hình: tuyến sinh dục bằng, màu xanh xám hoặc trong suốt, tuyến sinh dục cá thường có nhiều mô mỡ bám xung quanh và có khối lượng lớn so với giai đoạn I. Có thể dễ dàng dùng panh tách tuyến sinh dục ra khỏi ổ bụng của cá. Mạch máu và mô liên kết không phát triển nhưng có thấy mạch máu lớn ở đầu buồng trứng, noãn bào không nhìn được bằng mắt thường mà phải quan sát dưới kính soi nổi hoặc kính hiển vi.

Về tổ chức học: tuyến sinh dục bao gồm tế bào sinh dục cái là các noãn bào ở pha tiền ngoại vi nhân và pha ngoại vi nhân và các tế bào sinh dục đực với sự xuất hiện của tinh bào cấp 1 và cấp 2. Noãn bào có hình dạng tròn và màu trắng trong. Đặc điểm nhận biết noãn bào đó là sự xuất hiện của hạch nhân phân bố không theo nguyên tắc ở giai đoạn tiền ngoại vi nhân và bắt màu thuốc nhuộm Hematocine do bản chất cấu tạo bằng protein. Ở pha ngoại vi nhân hạch nhân tăng lên về số lượng và di chuyển ra ngoài tạo một vòng quanh màng nhân (ngoại vi nhân). Noãn bào thuộc thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh chất vì vậy kích thước của noãn bào tăng lên, do đó thời kỳ này trong phát triển noãn bào còn được gọi là thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh chất. Kích thước noãn bào dao động 21,5- 274,2 μ m tùy vào giai đoạn phát triển. Tinh nguyên

bào giảm xuống rõ rệt, thay thế bằng sự xuất hiện dày đặc của tinh bào cấp 1, tinh bào cấp 2 và tinh tử với số lượng rất nhiều và tập trung ở vùng rỗng trong tâm noãn sào, xung quanh là các tế bào trứng giai đoạn II. Tinh tử nhìn như các chấm đen dày đặc và kích thước tinh tử $\leq 1\mu\text{m}$.



a: tuyến sinh dục (mẫu tươi); b: tuyến sinh dục (mẫu mô học) 50µm
 ► tbsd cái ↔ tbsd đực ► hạch nhân

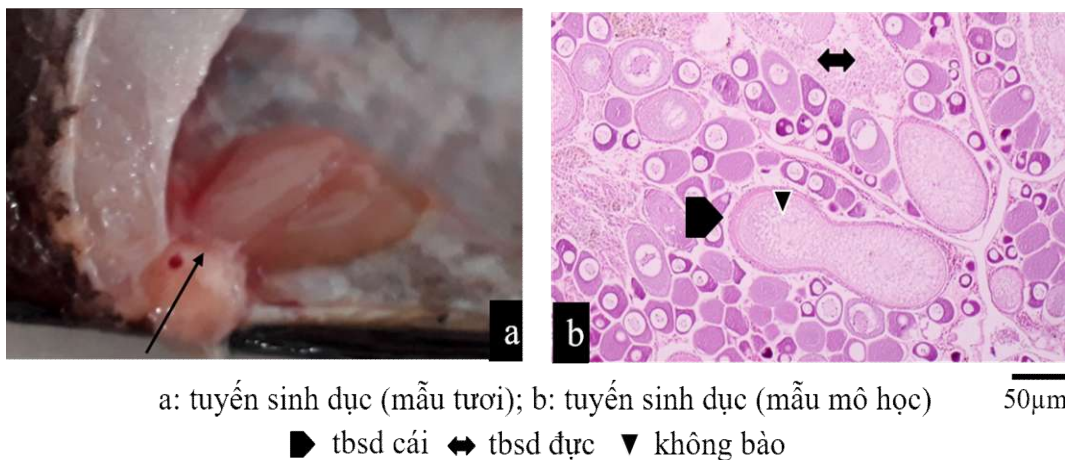
Hình 3.3. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn II

3.1.2.3. Giai đoạn III

Về ngoại hình: tuyến sinh dục tăng nhanh về thể tích, có màu hồng nhạt hoặc hồng đậm, mạch máu và mô liên kết rất phát triển. Tế bào trứng có thể được nhìn thấy bằng mắt thường nhưng rất khó tách rời từng trứng riêng biệt do chúng liên kết với nhau rất chặt chẽ. Trứng có hình dạng thay đổi chuyển dần từ dạng tròn sang dạng số 8, hình đế dày hoặc hình bầu dục.

Về tổ chức học: lát cắt ngang mô học của tuyến sinh dục bao gồm nhiều tế bào trứng với hình dạng ngoài thay đổi từ hình tròn chuyển thành dạng ovan, có thể nhìn thấy các hạt noãn bào với màu trắng trong và trắng sữa gọi là pha không bào hóa. Trứng bắt màu thuốc nhuộm nhạt dần do sự xuất hiện của các không bào như hình tròn rỗng xuất hiện bắt đầu ở hai phía theo hình ovan và xung quanh nhân số lượng hạt không bào tăng lên khắp nguyên sinh chất, các không bào này không bắt màu thuốc nhuộm Hematocine do chứa các chất có nguồn gốc đường. Ở giai đoạn này, kích thước của trứng gia tăng không chỉ do sự gia tăng về thể tích chất nguyên sinh, mà còn do kết quả của việc tích lũy các chất dinh dưỡng. Bởi vậy thời kỳ này trong sự phát triển của các noãn bào có thể được gọi là thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh – dinh dưỡng. Màng nhân không còn phân biệt rõ và hạch nhân tiếp tục di chuyển ra sát ngoài vùng tiếp giáp với nguyên sinh chất. Kích thước noãn bào (theo chiều dài) dao động từ

611,6 – 800,3 μ m. Các tế bào sinh dục đực có kích thước nhỏ và nằm trong các túi sinh tinh hoặc ống sinh tinh xen kẽ với các tế bào sinh dục cái.



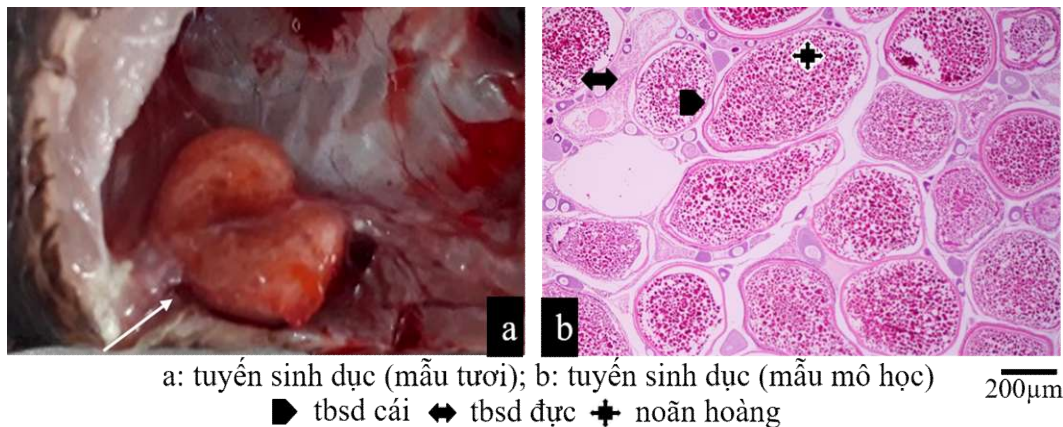
Hình 3.4. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn III

3.1.2.4. Giai đoạn IV

Về ngoại hình: Mô liên kết và mạch máu phát triển kém hơn giai đoạn III, khối lượng và kích thước tuyến sinh dục lớn. Màu sắc tuyến sinh dục chuyển từ màu cam sáng sang cam đậm hoặc đỏ hồng. Nhìn rõ các hạt trứng với noãn hoàng tích lũy với noãn hoàng màu vàng tạo nên màu của tuyến sinh dục. Tùy theo giai đoạn phát triển của tế bào trứng ở giai đoạn đầu của IV hay giai đoạn sau và số lượng trứng phát triển mà thể tích tuyến sinh dục thay đổi. Mỗi hạt trứng được nối với 1 sợi dây gắn trứng vào tuyến sinh dục và có tính đàn hồi nên có thể tách rời các trứng ra khỏi tuyến sinh dục khi sử dụng panh, kẹp.

Về tổ chức học: lát cắt ngang mô học của tuyến sinh dục bao gồm nhiều tế bào trứng ở giai đoạn khác nhau trong đó các tế bào trứng ở pha thể noãn hoàng chiếm đa số và có kích thước lớn hơn. Hình dạng của trứng chuyển hoàn toàn thành dạng hình ovan. Trứng nhìn rõ bằng mắt thường và có màu vàng cam ở các pha thể noãn hoàng từ thứ nhất đến thứ ba. Ở pha thể noãn hoàng thứ nhất, các hạt noãn hoàng bắt đầu xuất hiện ở hai đầu noãn bào thành hai cụm. Phần giữa của noãn bào to dần lên do không bào tiếp tục phát triển làm hình dạng của noãn bào dần trở về dạng ovan với kích thước lớn hơn pha 4, nang trứng được hình thành. Pha thể noãn hoàng thứ hai, noãn hoàng tiếp tục được tổng hợp và tích lũy dần lấp đầy hai cực của noãn bào. Noãn hoàng xuất hiện dày lên chia nhỏ các không bào, các không bào tập trung dày ở xung quanh nhân. Pha thể noãn hoàng thứ ba, toàn bộ nguyên sinh chất được lấp đầy bởi các

hạt noãn hoàng bắt màu tím đậm của Hematocine do bản chất protein. Kích thước các hạt noãn hoàng tăng lên và dính lại với nhau thành từng đám. Nang trứng dày lên rõ rệt với vành phóng xạ của màng follicule xuất hiện rõ ràng. Hạch nhân tiêu biến, nhân là một khối đồng nhất bắt màu tím nhạt, chiều dài trứng $\leq 1.550 \mu\text{m}$. Số lượng các tế bào sinh dục đực dường như ít đi do kích thước của trứng lớn và màu sắc đậm, song khi kiểm tra dưới kính hiển vi độ phóng đại cao, các túi chứa tinh vẫn chứa tinh tử hoặc tinh tử nằm trong các ống sinh tinh xen kẽ với trứng.

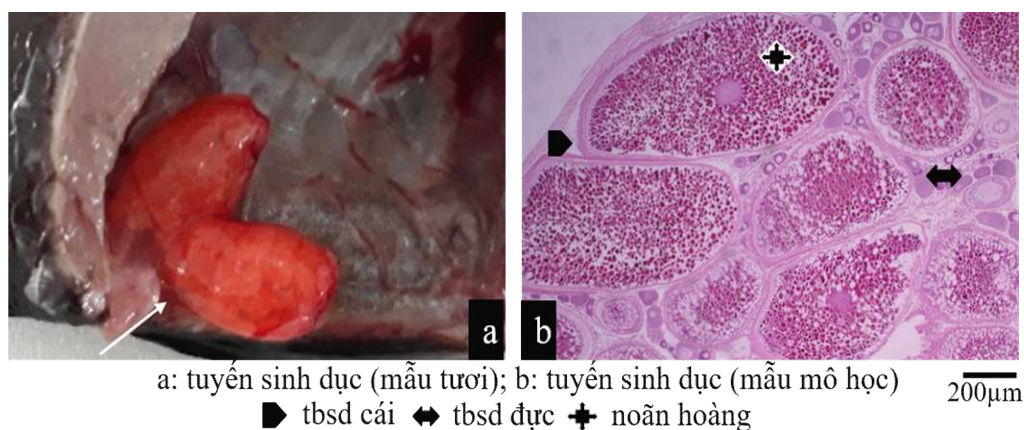


Hình 3.5. Tuyến sinh dục cá KCYN giai đoạn IV

3.1.2.5. Giai đoạn V

Về ngoại hình: Khi trứng chuẩn bị rụng, tuyến sinh dục có hiện tượng xung huyết (căng phồng), buồng trứng rất mềm, vuốt nhẹ bụng cá, trứng có thể chảy từng hạt có độ trương và căng đầy. Tuyến sinh dục có màu cam sậm do có sự chuyển đổi màu sắc rõ rệt của tế bào trứng, kích thước tuyến sinh dục tăng lên đáng kể. Khi giải phẫu tuyến sinh dục, trứng dễ dàng tách rời ra khỏi noãn sào riêng rẽ từng quả qua ống dẫn ở phía cuối tuyến sinh dục.

Về tổ chức học: Trên lát cắt mô học của tuyến sinh dục, trứng cá ở pha thành thực chiếm đa số về mặt thể tích, kích thước trứng lớn tối đa, màng follicul có sự tách biệt với màng tế bào trứng sẵn sàng cho sự phóng thích tế bào trứng. Trứng có độ tích lũy noãn hoàn cực đại nên dễ vỡ khi làm tiêu bản lát cắt mô học tế bào. Noãn bào ở pha thành thực, trứng có túi mầm tan biến, nhân co lại và di chuyển về cực động vật, màng nhân tiêu biến và càng ở gần cực động vật càng nhỏ dần và tan biến khi tiến sát về vùng cực. Trong quá trình dịch chuyển nhân, trứng có hiện tượng phân cực, trên một cực là phân bố của nhân và phần chủ yếu của nguyên sinh chất (cực động vật) còn ở cực khác là noãn hoàng (cực thực vật). Nang trứng dần tách khỏi noãn bào sẵn sàng cho sự rụng trứng.

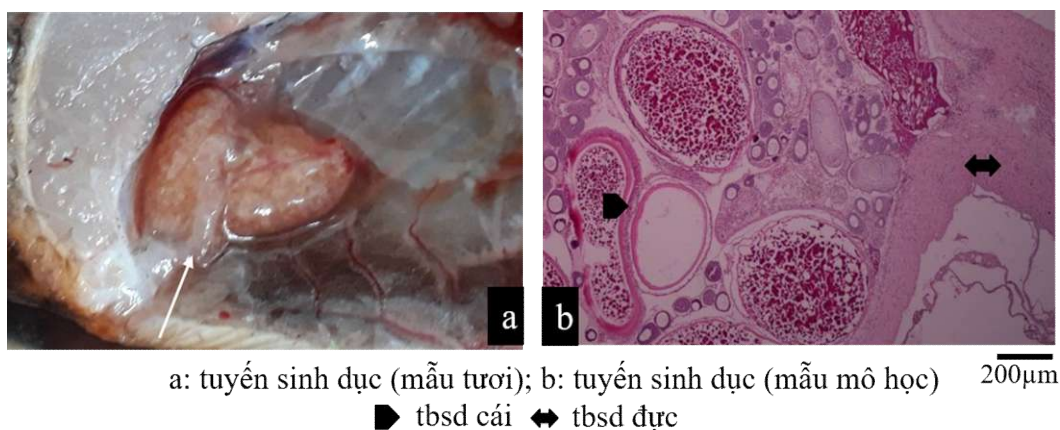


Hình 3.6. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn V

Giai đoạn VI

Về ngoại hình: thể tích tuyến sinh dục nhỏ lại, mềm nhão. Nét khác biệt của tuyến sinh dục giai đoạn này là sự có mặt của các nang bị vỡ nên có sự xuất huyết, có màu đỏ tím, màng buồng trứng dày lên Theo thành phần tế bào trứng, buồng trứng của cá gần giống như giai đoạn III vì là nhóm cá đẻ nhiều lần trong năm.

Về tổ chức học: trong buồng trứng còn sót lại tế bào trứng ở giai đoạn V và chúng sẽ bị hấp thụ nhanh chóng. Buồng trứng có nhiều màng follicle rỗng và có nhiều thể vàng. Ngoài ra, trong buồng trứng vẫn có mặt của các tế bào sinh dục cái giai đoạn từ II-IV nhưng số lượng trứng giai đoạn IV, V thấp mà đa số là giai đoạn II, III. Kết quả lát cắt dọc mô học của noãn sào cho thấy, ở phần cuống của tuyến sinh dục gần ống dẫn sinh dục có sự xuất hiện của rất nhiều tế bào sinh dục đực hoạt hóa (tinh trùng). Chưa xác định có sự chuyển đổi giới tính ở cá KCYN trong các thí nghiệm, Đây chính là cơ sở để nhận định là nhóm cá lưỡng tính đồng thời trong đó cá thể có kích thước lớn nhất lần lượt là đực và cái chức năng.



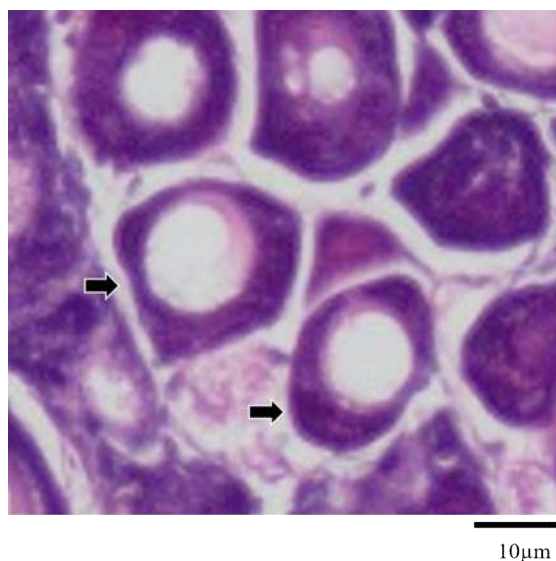
Hình 3.7. Tuyến sinh dục (mẫu tươi và mô học) cá KCYN giai đoạn VI

3.1.3. Các giai đoạn phát triển noãn bào cá KCYN

Nhiều tác giả tại Việt Nam sử dụng bậc thang chín muối của buồng trứng cá theo 6 giai đoạn do tính thích hợp của nó trong việc nhận dạng trên mẫu tươi và trên tiêu bản tổ chức học. Sự phát triển của noãn bào cá KCLYN dựa theo phân chia 6 bậc thang của Nikolskii và Sakun và Butskaya được thể hiện như sau:

3.1.3.1. Pha nhân - chất nhuộm sắc

Các noãn nguyên bào là những tế bào sinh dục khởi nguồn của tất cả tế bào trứng được cá đẻ ra sau này (Hình 3.8).



➡ : noãn bào

Hình 3.8. Pha nhân – chất nhuộm sắc noãn bào cá KCYN

Các noãn nguyên bào trong suốt, có hình tròn và có kích thước không lớn, không thể nhận thấy các tế bào này bằng mắt thường, mà chỉ có thể nhìn thấy chúng trên các tiêu bản tế bào dưới độ phóng đại lớn của kính hiển vi. Các noãn nguyên bào sinh sản bằng kiểu phân chia nguyên nhiễm sẽ tạo ra phần dự trữ các tế bào sinh dục. Nhờ đó việc bù đắp các tế bào sinh dục sau khi đẻ luôn luôn được tiếp diễn. Noãn bào ở pha nhân- chất nhuộm sắc có tính ưa kiềm với nguyên sinh chất bắt màu tím đậm của Hematocine. Nhân to, nằm giữa tế bào, không bắt màu và chiếm tỷ lệ lớn hơn so với nguyên sinh chất trong noãn bào. Xung quanh tế bào được bao bởi một lớp màng mỏng. Đường kính noãn nguyên bào dao động từ 12,0 – 34,1 μm (n=48).

3.1.3.2. Pha tiền ngoại vi nhân

Các noãn bào có hình tròn và có màu trắng trong. Đặc điểm nhận biết tế bào sinh dục cái giai đoạn này đó là sự xuất hiện của hạch nhân phân bố không theo nguyên tắc

với số lượng tăng dần và bắt màu thuốc nhuộm Hematocine do bản chất cấu tạo bằng protein. Nhân nằm giữa tế bào, tỷ lệ giữa nhân và nguyên khoảng $\frac{1}{2}$ so do kích thước nguyên sinh chất có sự tăng lên. Màu sắc của nhân không còn trong suốt mà có sự xuất hiện của các vệt bắt màu tím nhạt của Hematocine (Hình 3.9).

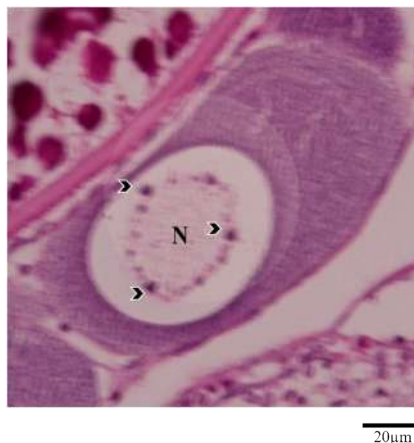


➡ : noãn bào; ➤ : hạch nhân

Hình 3.9. Pha tiền ngoại vi nhân noãn bào cá KCYN

3.1.3.3. Pha ngoại vi nhân

Noãn bào có hình tròn với kích thước tăng lên do sự gia tăng của tế bào chất làm cho kích thước nguyên sinh chất tăng lên, do đó thời kỳ này trong phát triển noãn bào còn được gọi là thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh chất. Các tế bào kết thúc thời kỳ sinh trưởng chất nguyên sinh có kích thước khá lớn, nên có thể phân biệt bằng mắt thường. Hạch nhân tăng lên về số lượng và di chuyển ra ngoài tạo một vòng quanh màng nhân (ngoại vi nhân) (Hình 3.10). Đường kính noãn bào dao động từ 61,2 – 274,2µm.

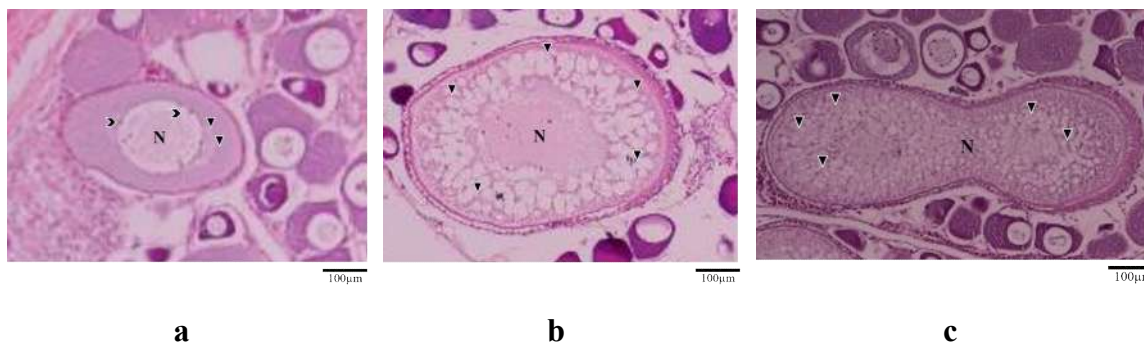


➤ : hạch nhân; N: Nhân

Hình 3.10. Pha ngoại vi nhân noãn bào cá KCYN

3.1.3.4. Pha không bào hóa

Hình dạng ngoài noãn bào thay đổi từ hình tròn chuyển thành dạng ovan, có thể nhìn thấy các hạt noãn bào với màu trắng trong và trắng sữa. Noãn bào bắt màu thuốc nhuộm nhạt dần do sự xuất hiện của các không bào như hình tròn rỗng xuất hiện bắt đầu ở hai phía theo hình ovan và xung quanh nhân (Hình 3.11a), sau đó các hạt không bào tăng lên khắp nguyên sinh chất, các không bào này không bắt màu thuốc nhuộm Hematocine do chứa các chất có nguồn gốc đường (Hình 3.11b). Ở giai đoạn này, không chỉ do sự gia tăng về thể tích chất nguyên sinh, mà còn do kết quả của việc tích lũy các chất dinh dưỡng. Bởi vậy thời kỳ này trong sự phát triển của các noãn bào có thể được gọi là thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh – dinh dưỡng. Màng nhân không còn phân biệt rõ như pha 3, hạch nhân tiếp tục di chuyển ra sát ngoài vùng tiếp giáp với nguyên sinh chất. Cuối pha không bào hóa, kích thước của noãn bào tăng lên rất nhiều do sự hình thành vô số hạt không bào có kích thước lớn ($3-5\mu\text{m}$) ở hai phía của hình ovan cùng với sự gia tăng nguyên sinh chất chia noãn bào thành dạng gần như số 8 (Hình 3.11c) do kích thước nhân không tăng lên. Kích thước noãn bào (theo chiều dài) dao động từ $611,6 - 800,3\mu\text{m}$ (Hình 3.11).



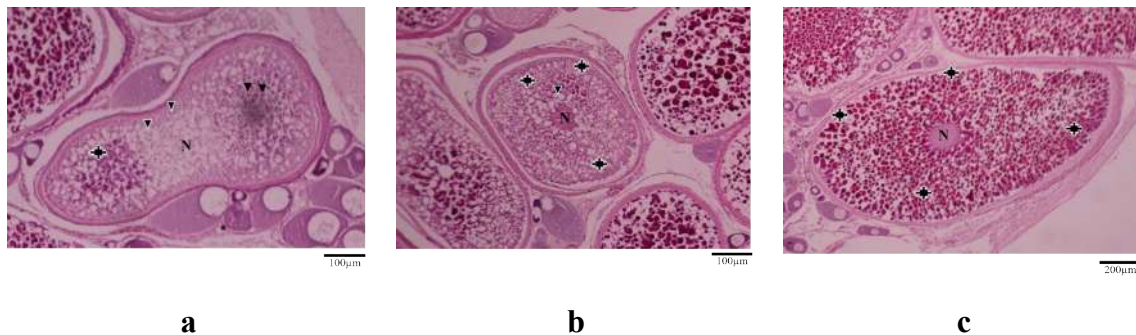
► : noãn bào; N: hạch nhân; ▼ : không bào;

Hình 3.11. Pha không bào hóa noãn bào cá KCYN

3.1.3.5. Pha thể noãn hoàng

Hình dạng ngoài noãn bào thay đổi từ hình gần giống số 8 chuyển lại thành dạng ovan. Noãn bào nhìn rõ bằng mắt thường và có màu vàng cam. Noãn bào ở pha này được chi thành ba giai đoạn: pha thể noãn hoàng thứ nhất, thứ hai và thứ ba. Ở pha thể noãn hoàng thứ nhất, các hạt noãn hoàng bắt đầu xuất hiện ở hai đầu noãn bào thành hai cụm. Phần giữa của noãn bào to dần lên do không bào tiếp tục phát triển làm hình dạng của noãn bào dần trở về dạng ovan với kích thước lớn hơn pha 4, nang trứng được hình thành (Hình 3.12a). Pha thể noãn hoàng thứ hai, noãn hoàng tiếp tục được tổng hợp và tích lũy dần lấp đầy hai cực của noãn bào. Noãn hoàng xuất hiện dày lên

chia nhỏ các không bào, các không bào tập trung dày ở xung quanh nhân (Hình 3.12b). Pha thể noãn hoàng thứ ba, toàn bộ nguyên sinh chất được lấp đầy bởi các hạt noãn hoàng bắt màu tím đậm của Hematocine do bản chất protein. Kích thước các hạt noãn hoàng tăng lên và dính lại với nhau thành từng đám. Nang trứng dày lên rõ rệt với vành phóng xạ của màng follicule xuất hiện rõ ràng. Hạch nhân tiêu biến, nhân là một khối đồng nhất bắt màu tím nhạt (Hình 3.12c). Quá trình tích lũy noãn hoàng kết thúc. Kích thước noãn bào (theo chiều dài) dao động từ 896,7 – 1548,1 μ m (Hình 3.12)

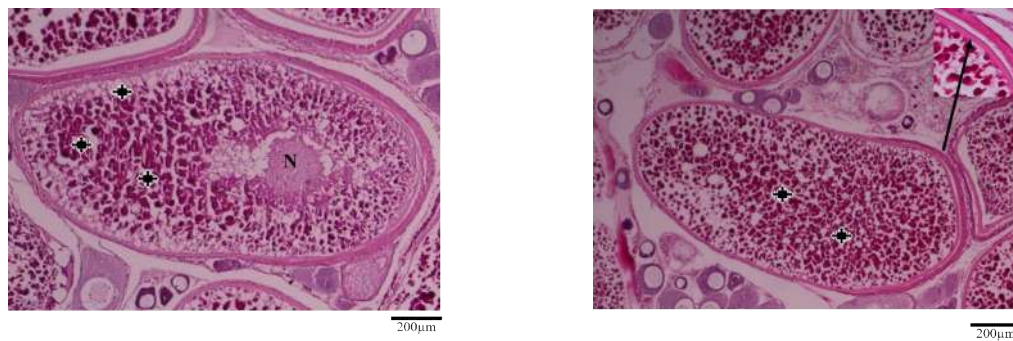


N: hạch nhân; ▼: không bào; +: noãn hoàng

Hình 3.12. Pha thể noãn hoàng noãn bào cá KCYN

3.1.3.6. Pha thành thực

Trứng chín và rụng. Trứng chín là trứng có túi mầm tan biến, nhân co lại và di chuyển về cực động vật (Hình 3.13a). Màng nhân tiêu biến và càng ở gần cực động vật càng nhỏ dần và tan biến khi tiến sát về vùng cực. Trong quá trình dịch chuyển nhân, noãn bào có hiện tượng phân cực. Trên một cực là phân bố của nhân và phần chủ yếu của nguyên sinh chất (cực động vật) còn ở cực khác là noãn hoàng (cực thực vật). Nang trứng dần tách khỏi noãn bào sẵn sàng cho sự rụng trứng khi nang trứng vỡ ra và trứng bị đẩy ra ngoài, những vỏ nang đã vỡ nằm lại trong buồng trứng (Hình 3.13b). Kích thước noãn bào (theo chiều dài) dao động từ 946,5,7 – 1382,2 μ m (Hình 3.13).



▼: Không bào; N: nhân; +: noãn hoàng; ➡: màng follicule tách ra

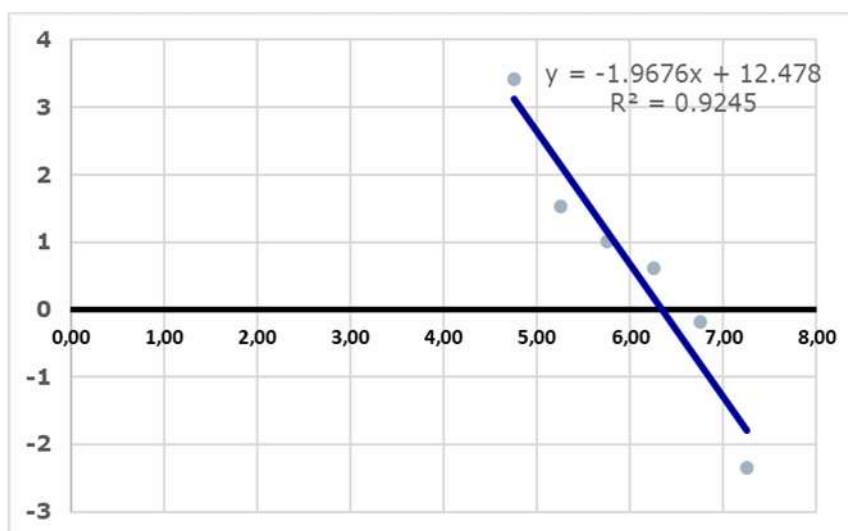
Hình 3.13. Pha thành thực noãn bào cá KCYN

3.1.3. Kích thước thành thực lần đầu

Nghiên cứu của Swagat Ghosh (2012) trên cá khoang cổ *A. nigripes* thực hiện tại quần đảo Lakshadweep, Ấn Độ cho thấy kích thước thành thực lần đầu của cá đực và cá cái lần lượt là 3,5 và 5,5 cm, kích thước trưởng thành là 4-7 cm ở con đực và 5-12 cm ở con cái. Tuy chưa có số liệu cụ thể, song nhóm nghiên cứu sử dụng cá khoang cổ nemo với kích thước từ 5 cm trở lên (cá đực có chiều dài $5,24 \pm 0,44$ cm; cá cái có chiều dài $7,67 \pm 0,73$ cm) để ghép 15 cặp cá bố mẹ, kết quả sinh sản và tái phát dục 100% trong điều kiện nhân tạo trong đó cá có thời gian tái phát dục ngắn nhất 14,33 ngày/lần và tần suất sinh sản lớn nhất là 2,13 lần/tháng và sức sinh sản lớn nhất (403 trứng/tổ) [9].

Cho đến nay chưa có kết quả nghiên cứu về kích thước thành thực lần đầu trên cá KCYN, tuy nhiên so sánh với một số loài khoang cổ cho thấy kích thước này có sự khác biệt không lớn. Nghiên cứu của Jawahar (2019) trên cá khoang cổ cái *A. sebae* tại vùng vịnh Mannar, Ấn Độ ghi nhận buồng trứng xuất hiện ở con cái có kích thước 4,95 cm, và kích thước thành thực lần đầu là 5,9 cm [105]. Ở cá khoang cổ *A. sebae*, kích thước thành thực lần đầu ở cá đực là 4,2 cm. Kết quả này không khác biệt so với ghi nhận của Pushbaraj (2010) trên khoang cổ *A. sebae* cái là $\leq 5,5$ cm [146].

Qua các mẫu nghiên cứu cho thấy, cá KCYN có kích thước lớn hơn 7,5 cm có tỷ lệ thành thực 100%. Nhóm cá có kích thước nhỏ hơn 4,6 cm chưa tham gia sinh sản. Nhóm cá có kích thước lớn hơn 6,5 cm có tỷ lệ thành thực hơn 50%, đây là kích thước thành thực lần đầu của cá KCYN. Kết quả được trình bày ở Hình 3.14.



Hình 3.14. Đồ thị tương quan giữa nhóm kích thước và $\ln((1-P)/P)K$

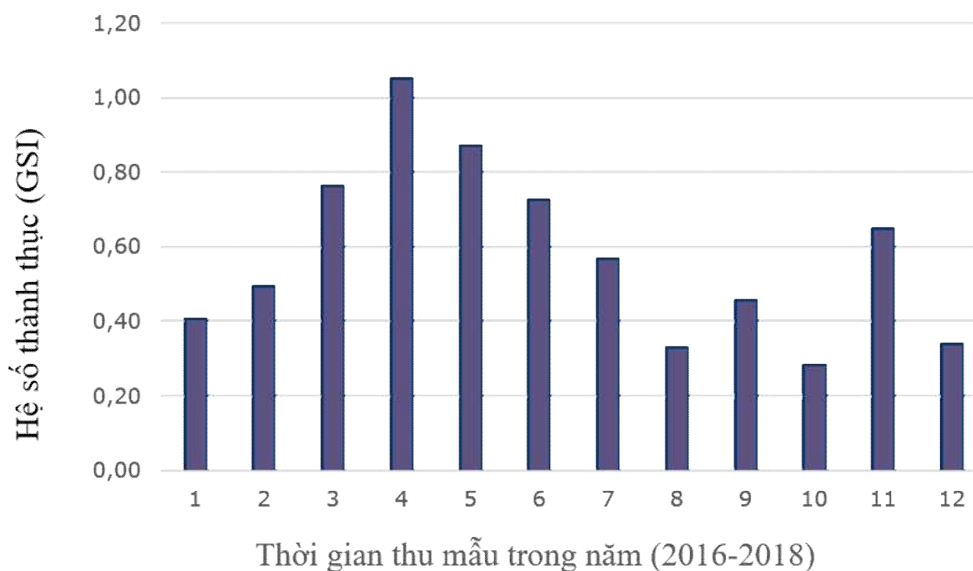
Tương quan giữa chiều dài và $\ln((1-P)/P)$ của cá được thể hiện bằng phương trình tương quan $y = -1,9676 \cdot x + 12,478$, giải phương trình xác định được kích thước thành thực lần đầu của cá là 6,37 cm.

Kích thước thành thực lần đầu cá là một yếu tố giúp người nuôi dự đoán được kích thước sinh sản thực tế để thực hiện các biện pháp kỹ thuật phù hợp cho nuôi thuần dưỡng, ghép cặp, tiến hành sinh sản nhân tạo trong sản xuất giống nhân tạo cá cảnh biển [133]. Theo kết quả nghiên cứu cho thấy nếu lựa chọn cá cho thử nghiệm sinh sản cá bố mẹ, nên tuyển chọn những cá thể cá KCYN có kích thước từ 6,5 cm trở lên. Với tính chất lưỡng tính đồng thời, không có cơ sở cần thiết cho việc ghép 2 cá thể có kích thước chênh lệch nhau theo giả định được cái như các loài khoang cổ khác mà có thể chọn lựa 2 cá thể tương đồng về kích thước để chọn lựa trong sinh sản nhân tạo.

3.1.4. Hệ số thành thực và mùa vụ sinh sản

Khối lượng tuyến sinh dục là một trong những thông số cho biết mức độ chín muồi của sản phẩm sinh dục. Vì vậy, khi nói đến quá trình phát triển của tuyến sinh dục, người ta không thể không đề cập hệ số thành thực (GSI). Thông qua GSI, chúng ta có thể dự báo và theo dõi quá trình phát triển và chín muồi của các tế bào sinh dục. GSI không thực sự là chỉ số duy nhất phản ánh trạng thái của sản phẩm sinh dục song là một trong những giá trị đánh giá sự chín muồi sinh dục ở cá.

GSI của cá KCYN trong thời gian nghiên cứu được thể hiện qua Hình 3.15



Hình 3.15. Biến động hệ số thành thực cá KCYN

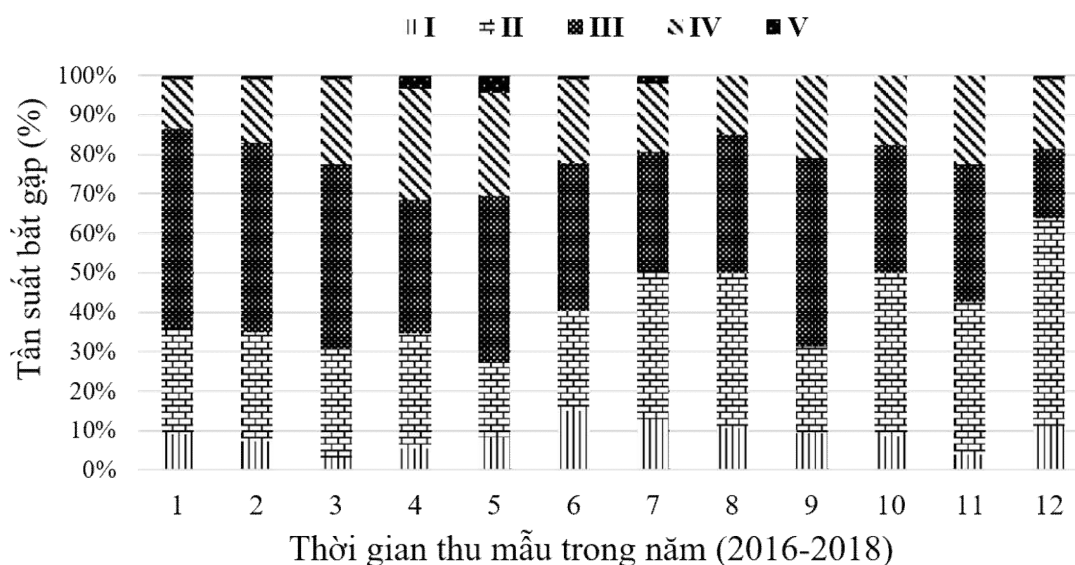
Hệ số GSI của cá KCYN trong năm đạt giá trị cao nhất vào tháng 4 ($1,05 \pm 1,31$), thấp nhất vào tháng 10 với ($0,28 \pm 0,34$). Hệ số GSI trung bình của cá KCYN là $0,57 \pm 0,85$. Kết quả nghiên cứu cho thấy GSI ở cá KCYN biến động trong chu kỳ sinh sản không thể hiện sự khác nhau rõ rệt giữa các tháng trong năm và giữa các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục, cho thấy cá KCYN có chu kỳ rụng trứng liên tục. Biến động của hệ số GSI cho thấy cá KCYN thành thực sinh dục quanh năm, trong đó mùa đẻ chính kéo dài từ tháng 3 đến tháng 7 với đỉnh cao là tháng 3-5 và mùa đẻ phụ vào tháng 11-12.

Tỷ lệ bắt gặp các cá thể thành thực có tuyến sinh dục giai đoạn III, IV, V cao nhất ở tháng 5 (73%) và thấp nhất ở tháng 9 (40%). Kết quả thể hiện ở Bảng 3.3

Bảng 3.3. Tỷ lệ thành thực của cá KCYN

Tháng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tổng mẫu (con)	97	94	94	92	95	99	99	94	96	92	98	108
Số cá thành thực	62	61	65	60	69	59	49	47	38	46	56	67
Tỷ lệ tt (%)	64	55	70	65	73	60	50	50	40	50	57	62

Trái ngược với các loài cá trong khu vực ôn đới thường đẻ 1 lần trong năm, cá ven bờ vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới chủ yếu là các loài cá đẻ trứng quanh năm và có một mùa sinh sản kéo dài [119]. Kết quả về mùa vụ sinh sản cho thấy cá KCYN là loài cá đẻ quanh năm được thể hiện ở Hình 3.16



Hình 3.16. Tần suất bắt gặp các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục trong năm

Mùa vụ sinh sản của loài cá có mối quan hệ chặt chẽ với những thay đổi môi trường đặc biệt là nhiệt độ, ánh sáng và nguồn thức ăn. Những yếu tố môi trường này có ảnh hưởng lớn nhất đối với quá trình phát triển tuyến sinh dục và khả năng sinh sản của các loài. Theo nhận định của Thornhill (2012), cá thường sinh sản vào thời điểm điều kiện môi trường thuận lợi nhất cho sự sống, phát triển của cá bột và nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong quá trình kích hoạt sinh sản cá ở vùng nhiệt đới [164]. Vì vậy, trong điều kiện tự nhiên vùng nhiệt đới không có quá nhiều biến động giữa các mùa trong năm nên cá có mùa sinh sản kéo dài. Tại vùng biển Khánh Hòa chỉ có 2 mùa chính là mùa khô và sau mùa mưa. Ở mùa hè, điều kiện khí hậu thời tiết thuận lợi, nguồn thức ăn sẵn có, nhiệt độ, độ mặn phù hợp nên cá đẻ tập trung và là mùa đẻ chính của cá. Vào mùa mưa, nước biển ven bờ bị ảnh hưởng của nguồn nước ngọt từ sông suối đổ ra, mưa nhiều dẫn đến độ mặn giảm, đồng thời thời tiết không thuận lợi cho phát triển của ấu trùng do sóng gió, nguồn thức ăn bị ảnh hưởng. Vì vậy vào khoảng tháng 11-12 (sau mùa mưa) là mùa đẻ phụ của cá đảm bảo tốt hơn cho sự phát triển của ấu trùng và cá con. Nguyên nhân giả định cá KCYN là loài sinh sản quanh năm vì chúng thuộc loài ăn tạp, sử dụng được nhiều loại thức ăn sẵn có trong tự nhiên không như các loài cá khác chỉ sử dụng được một số dạng thức ăn nhất định. Như vậy, cá KCYN có điều kiện tích lũy chất dinh dưỡng từ đó chuyển hóa thành các sản phẩm sinh dục tốt hơn các loài cá khác. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi trùng hợp với kết quả thực nghiệm của Allen (1980) trên 29 loài cá khoang cổ ở các vùng biển khác nhau trên thế giới [34] đồng thời không sai khác so với kết quả khảo sát của Hà Lê Thị Lộc (2005) trên cá khoang cổ đen đuôi vàng, khoang cổ đỏ và khoang cổ nemo vùng biển Khánh Hòa [18].

3.1.5. Sức sinh sản

Sử dụng 117 mẫu tuyến sinh dục cá ở giai đoạn phát triển trứng từ III, IV và V và đếm số lượng trứng và cân khối lượng cá để xác định chỉ số sinh sản. Cá KCYN dùng để phân tích khả năng sinh sản có kích thước dao động từ 7,2 đến 13,7 cm, tương ứng với khối lượng cá dao động từ 13,12 đến 57,21 g. Kết quả thể hiện qua Bảng 3.4

Bảng 3.4. Sức sinh sản cá KCYN vùng biển Khánh Hòa (n=117)

Giá trị	TL (cm)	SL (cm)	BW (g)	BW0 (g)	GW (g)	GSI	Fa (trứng/cá)	FGr (trứng/g)
Trung bình	10,61	8,95	28,85	27,00	0,41	1,48	823,59	42,91
Độ lệch chuẩn	1,98	1,63	12,71	12,11	0,39	1,30	259,80	40,96
Max	13,70	11,40	57,21	54,38	1,43	6,25	1830,00	316,16
Min	7,20	5,27	13,12	2,67	0,00	0,02	306,00	10,42

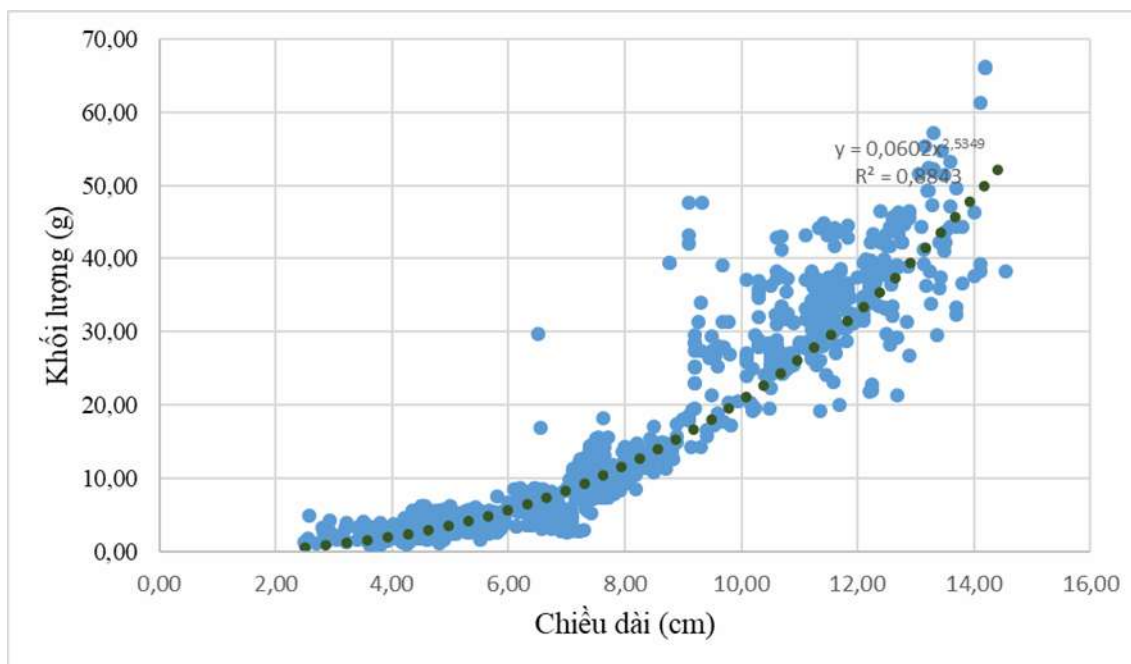
Sức sinh sản tuyệt đối trung bình của cá KCYN là $823,59 \pm 259,80$ (trứng/cá cái), dao động trong khoảng 306 - 1830 (trứng/cá). Sức sinh sản tương đối là $42,91 \pm 40,96$ trứng/g cá; có giá trị từ 10,42 đến 316,16 trứng/g cá.

Cá KCYN là loài cá đẻ trứng dính, cá bố mẹ có tập tính chăm sóc trứng và ấu trùng đến giai đoạn nở trong nhiều ngày. Vì vậy, so với các loài trứng trôi nổi hoặc cá không có tập tính chăm sóc con, sức sinh sản của cá KCYN nhỏ hơn rất nhiều. Cá nhệch *Pisodonophis boro* ở miền Bắc Việt Nam có có sức sinh sản tuyệt đối 230.820 trứng/cá cái (dao động từ 98.229 - 340.368 trứng/cá cái). Sức sinh sản tương đối trung bình là 418.610 trứng/kg cá cái (dao động từ 284.187 - 538.333 trứng/kg cá cái).

Tuy nhiên, sức sinh sản tuyệt đối của cá KCYN tương đương với các loài khoang cổ đen đuôi vàng tại vùng biển Miyake-Jima của Nhật Bản có trị số từ 1.100-2.500 trứng/tổ, giá trị này không sai khác nhiều so với nghiên cứu của Allen (1972) ở cá khoang cổ *A.chrysopterus* và cá *A.perideraion* lần lượt là 3.000-5.000 trứng/cá và 2.000-4.000 trứng/cá, tại đảo san hô vòng vùng biển Thái Bình Dương[33]. Sức sinh sản tương đối và tuyệt đối của cá KCYN lại có sự sai khác lớn so với khoang cổ đen đuôi vàng là 11.388 ± 47.745 trứng/ cá thể và 3.207 ± 1.214 trứng/g khối lượng thân và khoang cổ đỏ lần lượt là 211.850 ± 175.290 trứng/cá thể và 6.874 ± 3.137 trứng/g khối lượng thân theo nghiên cứu của Hà Lê Thị Lộc (2004) ở vùng biển Khánh Hòa [17].

3.1.6. Tương quan chiều dài và khối lượng

So sánh theo cặp mối tương quan giữa chiều dài, khối lượng và hệ số thành thực của cá KCYN đều là tương quan thuận. Trong đó, mối tương quan giữa chiều dài và khối lượng cá là tương quan thuận với $R^2 = 0,867$ có giá trị tương đối cao và có giá trị theo mức tăng trưởng dương. Điều này cho thấy khi cá có chiều dài lớn thì khối lượng cá tăng lên.



Hình 3.17 Mối tương quan giữa chiều dài và khối lượng

So sánh tương quan giữa chiều dài cá với GSI và khối lượng cá với GSI cho các giá trị lần lượt $R^2 = 0,350$ và $R^2 = 0,281$. Hệ số tương quan chiều dài đối với GSI lớn hơn không đáng kể khối lượng với GSI cho thấy có mức tương quan không chặt giữa các yếu tố này, ngoài sự tăng trưởng về chiều dài, khối lượng, hệ số thành thực cá còn phụ thuộc vào các yếu tố khác như mùa vụ sinh sản, dinh dưỡng trong đó có thể có cả yếu tố “ức chế xã hội”.

Giải thích cho hiện tượng này có thể do điểm đặc biệt trong sinh trưởng của nhóm cá khoang cổ nói chung, đó là sự phát triển kích thước và giới tính cá thể phụ thuộc vào cấp bậc xã hội của mỗi cá nhân. Đặc điểm sinh sống của cá khoang cổ theo quần đàn nhỏ từ 2 con trở lên, số lượng cá ở giai đoạn tiền trưởng thành không phụ thuộc vào kích thước cá bố mẹ, những con cá luôn tồn tại trong “tổ” ở giai đoạn này và chỉ phát triển thành cá bố mẹ với sự tăng trưởng đột ngột về kích thước và khối lượng khi một trong hai con vì lý do bị chết hoặc biến mất thì một con trong đàn sẽ phát triển vượt trội thành cá bố mẹ trưởng thành cả về tuyến sinh dục lẫn kích thước. Các con còn lại có tốc độ tăng trưởng và mức độ thành thực do bị kìm hãm bởi cặp cá thành thực trong đàn, thậm chí khi di chuyển cá con từ “tổ” hải quỳ này sang “tổ” khác thì kích thước của những con cá nhỏ cũng không tăng lên. Nghĩa là con lớn nhất trong “tổ” không phải là cá thể già nhất trong quần thể mà đó là con phát triển nhanh nhất trong thời điểm chuyển đổi nhất định [39].

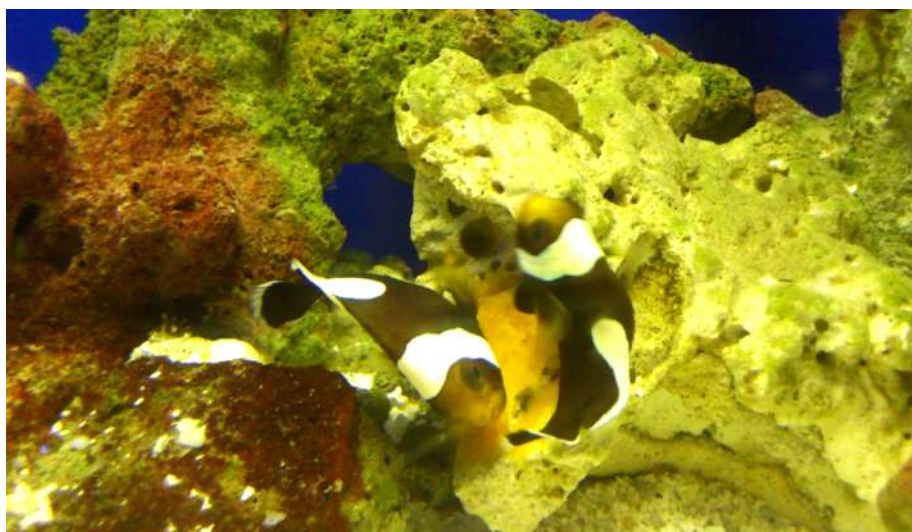
3.2. Nghiên cứu tập tính sinh sản, ấp nở, phát triển phôi và ấu trùng, cá con đến 15 ngày tuổi

3.2.1. Tập tính sinh sản, ấp nở

Đàn cá thí nghiệm được lựa chọn khá đồng đều về kích thước và phân bố ngẫu nhiên cho các nghiệm thức. Trong thời gian thí nghiệm (2016-2018), đàn cá không tăng về kích thước TL và BW cá thể cái dao động trong khoảng 10,8-12,6 cm; 35-45g/con ở lần thu mẫu đầu tiên và 11,2-12,9 cm; 34,5-48 g/con ở lần thu mẫu cuối đợt thí nghiệm.

Do là các cặp cá ghép đôi từ ngoài tự nhiên, khi thả chung với các cá thể khác có sự phân tách và con đực có xu hướng xua đuổi những cá thể còn lại, tập trung vào phía góc bể. Sự kết cặp của cá khoang cổ nói chung rất ổn định ngoài tự nhiên và bị chi phối bởi nhiều yếu tố xã hội trong quần đàn cùng với môi trường sống. Khi đã ghép đôi, mối quan hệ giữa các cá thể trong cặp thường tồn tại trong thời gian dài, được mô tả chi tiết bởi Buston (2003) trên các giống *Amphiprion* và *Premnas* [56].

Theo dõi hoạt động của cá, nhận thấy cá có hoạt động ve vãn và kết cặp thường diễn ra trong vài ngày trước khi sinh sản. Các biểu hiện đặc trưng của quá trình này là cặp bố mẹ bơi hướng đầu lên xuống liên tục và ve vãn nhau tại vị trí sẽ đẻ trứng đồng thời liên tục dùng miệng để làm sạch vị trí sẽ đẻ trứng sau này. Ngoài ra, còn có các biểu hiện khác như cắn, rượt đuổi và xòe các tia vây rộng, lật qua lật lại cơ thể hoặc hành động hung hăng, xua đuổi nhau với các biểu hiện cắn nhẹ, rượt đuổi, cọ sát nhau. Khi tiến gần quan sát cá tại thời điểm này, cá thường hung hăng di chuyển ra phía ngoài phía đối diện với vị trí đặt giá thể.



Hình 3.18 Cá KCYN bố mẹ đang đẻ trứng và thụ tinh

Trước khi đẻ một ngày, cá ngừng ăn hoặc ăn rất ít so với mọi ngày. Đường kính vòng bụng của cá hơi tăng lên so với bình thường. Trong thời gian đẻ trứng, cá cái bơi chậm, cọ sát mặt bụng nơi có ống dẫn trứng vào bề mặt giá thể. Trứng được đẩy ra khỏi ống dẫn trứng dài khoảng 3 – 5 mm, có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Hai con đực cái (chức năng) bơi chậm theo đường zíc zắc và bụng cá áp sát lên bề mặt giá thể theo nhịp từ 30' đến 3 phút mỗi lần phóng trứng hoặc tinh trùng. Số lượng trứng mỗi lần đẻ dao động từ 300 đến gần 2.500 trứng tùy thuộc vào tuổi và kích cỡ cá bố mẹ. Thời gian của một lần đẻ trứng kéo dài từ 60 – 150 phút. Trứng được đẻ lên bề mặt của giá thể và được sự chăm sóc bởi cả bố và mẹ.

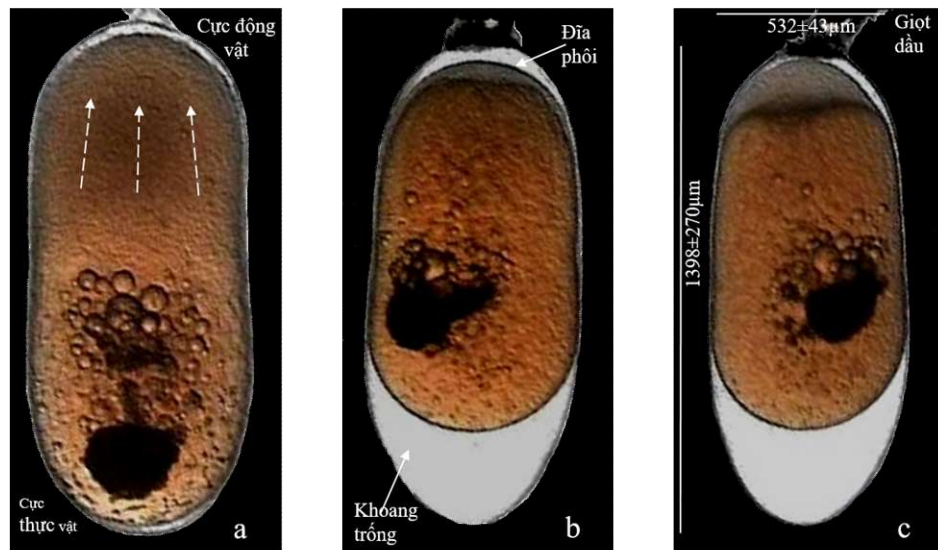
Hàng ngày, cá bố mẹ thường dùng miệng nhặt sạch trứng ung và vệ sinh tổ, đồng thời dùng vây bụng và vây ngực quạt trứng để tăng lượng oxy, đảo đều trứng. Càng gần đến ngày nở, cá bố mẹ tăng cường hoạt động quạt trứng bằng vây bụng và vây ngực. Sau khi trứng nở, cá bố mẹ ăn rất khỏe để phục hồi và chuẩn bị cho đợt đẻ tiếp theo. Trong trường hợp trứng đẻ ra mà chất lượng tinh trùng kém, tỷ lệ trứng ung nhiều, cá bố mẹ sẽ ăn hết những trứng hỏng đó là một trong những nguyên nhân một số nghiên cứu giải phẫu cá có xuất hiện trứng trong dạ dày của cá [17, 33].

3.2.2. Các giai đoạn phát triển phôi, ấu trùng và cá con đến 15 ngày tuổi

Quá trình phát triển phôi và biến thái ấu trùng cá KCYN tương tự như sự phát triển của cá, được chia thành các giai đoạn bao gồm: sự thụ tinh và kích hoạt trứng, giai đoạn phân cắt và phôi nang, phôi vị và biệt hóa hình thành cơ quan.

3.2.2.1 Sự thụ tinh và kích hoạt trứng

Sau khi tinh trùng xâm nhập vào tế bào trứng, màng thụ tinh và xoang thụ tinh được hình thành (Hình 3.19a). Đồng thời, nước xâm nhập vào khoảng trống giữa lớp vỏ và lớp màng đệm của trứng, bắt đầu từ cực động vật đến cực thực vật. Sự xâm nhập của nước làm noãn hoàng và lớp vỏ trứng tách biệt tạo thành khoang quanh noãn hoàng (perivitelline) tách biệt vỏ tế bào trứng và noãn hoàng bằng một khoảng trống, trong đó khoảng trống ở cực thực vật lớn hơn so với cực động vật. Phần noãn hoàng co lại nhưng kích thước trứng cá không thay đổi. Tế bào chất ở các phần khác của trứng cũng dồn về cực động vật, lúc đầu chỉ là một đĩa phôi mỏng phía cực động vật (Hình 3.19b), sau đó lượng tế bào chất tăng dần lên và tạo thành một đỉnh chóp trên cực động vật hình dạng tương tự như 1 mái vòm lớn đánh dấu sự quá trình kích hoạt trứng hoàn tất thường được gọi là giai đoạn 1 tế bào (Hình 3.19c).



a. Trứng thụ tinh; b. Đĩa phôi mỏng phía cực động vật; c. Giai đoạn phôi 1 tế bào

Hình 3.19 Các giai đoạn phát triển phôi (từ trứng vừa thụ tinh đến 1 tế bào)

3.2.2.2 Giai đoạn phân cắt trứng

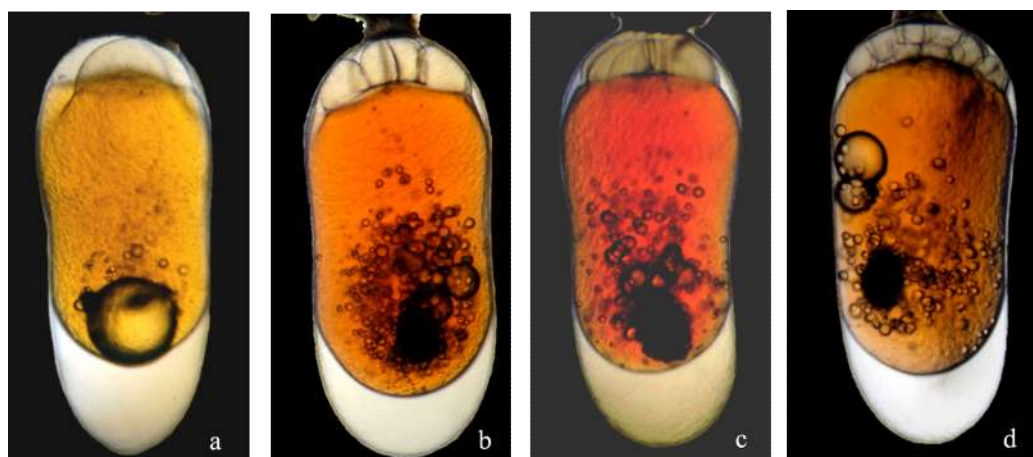
Trứng cá khoang cổ lưng yên ngựa (KCLYN) cũng như các loại trứng cá thuộc dạng trứng đoạn hoàng, phân cắt trứng thuộc dạng không hoàn toàn (dạng đĩa). Quá trình phân cắt trứng chỉ diễn ra ở khu vực đĩa phôi, nằm phía cực động vật, khối noãn hoàng giữ nguyên không tham gia quá trình phân cắt.

Giai đoạn 2 tế bào: Sự phân cắt đầu tiên bắt đầu bằng cách chia đĩa phôi thành hai nguyên bào phôi, kích thước nguyên bào phôi chỉ bằng $\frac{1}{2}$ của nguyên bào ban đầu. Quan sát rõ tế bào chất bên trong. Các giọt dầu rất nhỏ và di chuyển về phía cực thực vật (Hình 3.20a).

Giai đoạn 4 tế bào: 4 nguyên bào phôi bào tương ứng xuất hiện ở lần phân bào thứ hai trên mặt phẳng thẳng đứng vuông góc với rãnh phân bào thứ nhất. Các tế bào phôi nhỏ hơn và có kích thước bằng nhau (Hình 3.20b).

Giai đoạn 8 tế bào: 8 nguyên bào phôi bào xuất hiện khoảng hơn hai giờ sau khi thụ tinh, kết quả từ sự xuất hiện 2 đường phân chia vuông góc với 2 đường đã có chia 4 nguyên bào phôi bào thành 8 tế bào với kích thước bằng nhau và nhỏ hơn kích thước giai đoạn trước (Hình 3.20c).

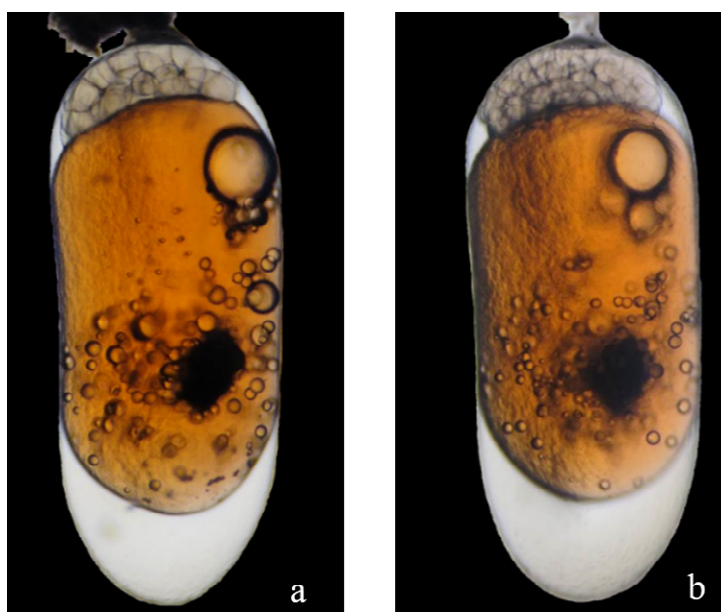
Giai đoạn 16 tế bào: 16 tế bào phôi xuất hiện khoảng ba giờ sau khi thụ tinh bởi một đường phân chia ngang. Các tế bào phôi nhỏ hơn và chỉ có một nửa kích thước của phôi bào ở giai đoạn trước. Các giọt dầu được quan sát thấy trong noãn hoàng (Hình 3.20d).



a. Giai đoạn 2 tế bào; b. Giai đoạn 4 tế bào; c. Giai đoạn 8 tế bào; d. Giai đoạn 16 tế bào

Hình 3.20 Các giai đoạn phát triển phôi (từ trứng 1 tế bào đến 16 tế bào)

Các tế bào phôi tiếp tục được phân chia theo cấp số nhân 2 lần so với số phôi bào trước đó. Số lượng phôi bào lần lượt là 32 (Hình 3.21a) và 64 tế bào (Hình 3.21b). Ở giai đoạn 64 tế bào, các phôi bào sắp xếp lại các tế bào thành hai lớp, đánh dấu sự hoàn thành của giai đoạn phân cắt. Giai đoạn phân cắt được hoàn thành sau khoảng 5 giờ 30 phút trứng thụ tinh.



a : Giai đoạn 32 tế bào; b. Giai đoạn 64 tế bào

Hình 3.21 Các giai đoạn phát triển phôi (từ trứng 32 tế bào đến 64 tế bào)

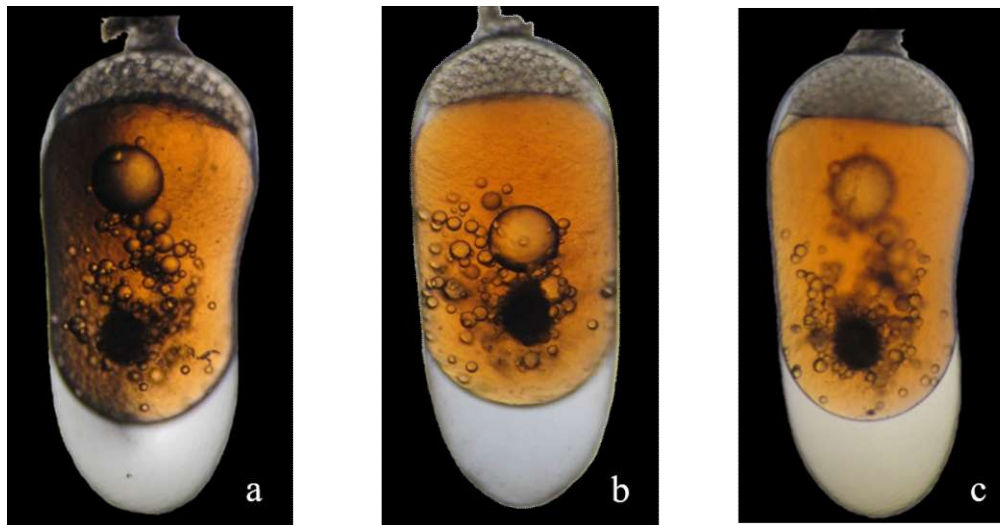
3.2.2.3 Giai đoạn phôi nang

Các tế bào phôi mở rộng theo chiều ngang và sắp xếp như một lớp phẳng gọi là bì phôi hoặc đĩa phôi. Phôi được phát triển từ các phôi bào tiếp tục phân chia theo cấp

số nhân đến khi các kích thước của chúng trở nên rất nhỏ và xếp chồng thành nhiều lớp tạo thành một khối hình bán cầu nằm phía cực động vật tách biệt với phần noãn hoàng ở phía cực thực vật.

Ở giai đoạn phôi nang, có thể chia thành các giai đoạn phôi nang cao, phôi nang thấp và phôi nang muộn với sự phân biệt dựa vào vị trí đĩa phôi.

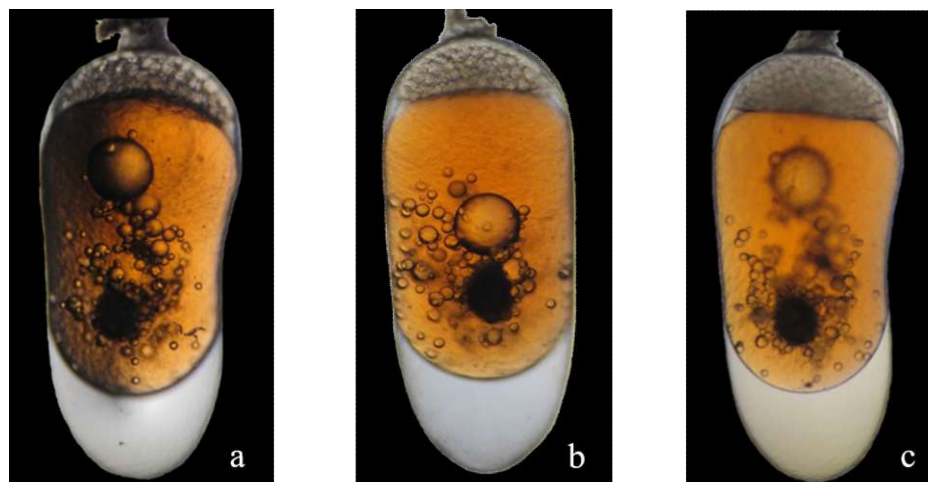
Phôi nang cao: đĩa phôi nhô lên cao trên túi noãn hoàng, eo thắt giữa phôi và khối noãn hoàng nhìn thấy rõ rệt. Số lượng phôi bào tiếp tục tăng lên, ở cuối giai đoạn này, vì phân cắt nhiều lần, kích thước phôi bào nhỏ dần nên hầu như không nhìn rõ ranh giới giữa các phôi bào (Hình 3. 22).



Hình 3.22 Các giai đoạn phát triển phôi nang cao

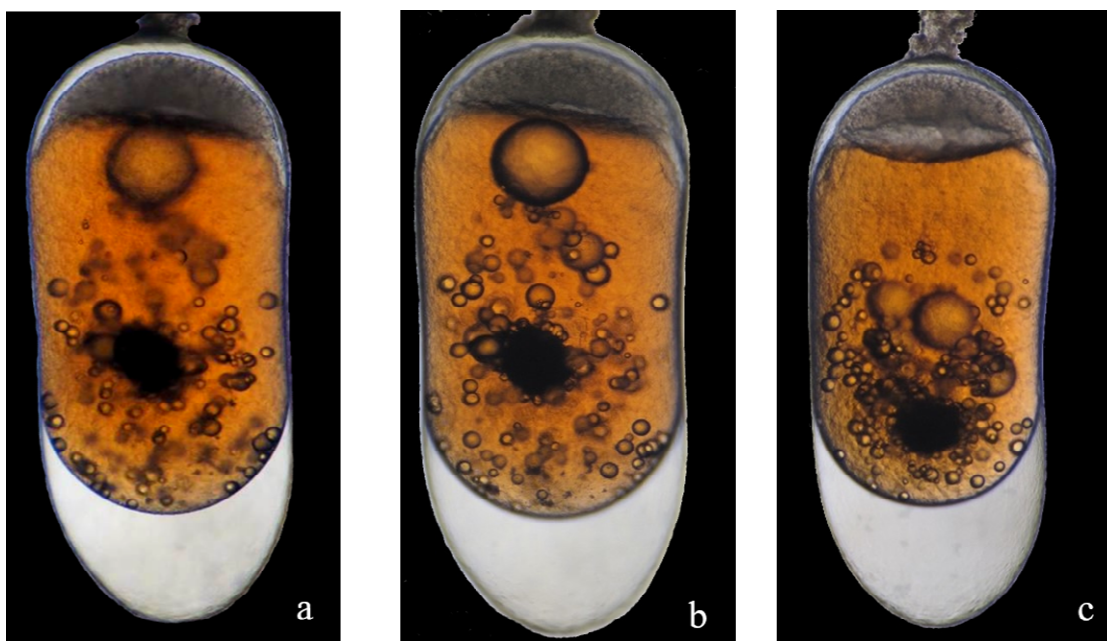
a. Phôi nang cao (128 tế bào); b. 256 phôi bào; c. Giai đoạn nhiều phôi bào

Phôi nang thấp: đĩa phôi có xu hướng phủ xuống túi noãn hoàng, do vậy eo thắt giữa phôi và khối noãn hoàng bớt rõ rệt dần (Hình 3.23).



Hình 3.23 Các giai đoạn phát triển phôi nang thấp

Phôi nang muộn: đĩa phôi phủ xuống dần, eo thắt giữa phôi và khối noãn hoàng hoàn toàn biến mất (Hình 3.24).



Hình 3.24 Các giai đoạn phát triển phôi nang muộn

Phôi nang của cá KCLYN gồm phôi bì hình thành mũ ở trên cùng và tâm viên phôi ở ngay phía dưới và tiếp xúc chặt chẽ với noãn hoàng.

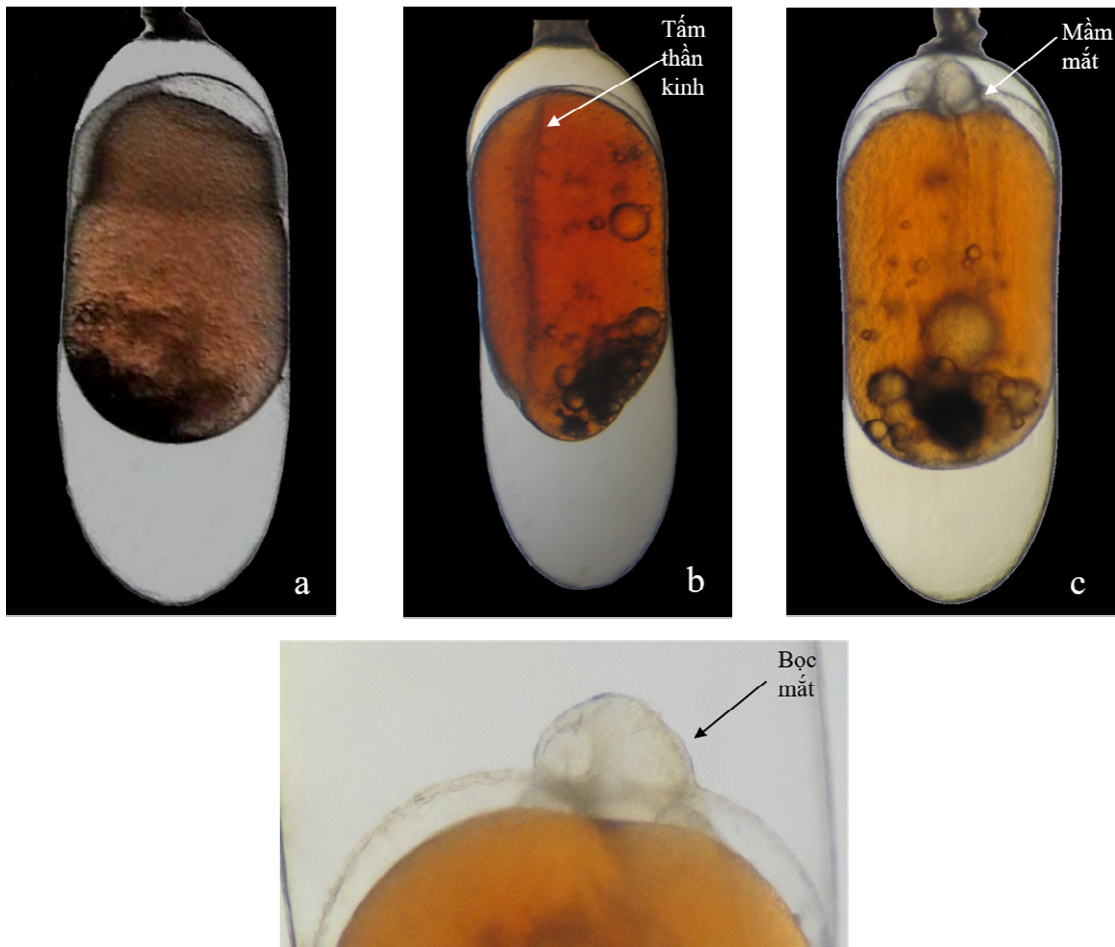
3.2.2.4 Giai đoạn phôi vị

Khi đĩa phôi phủ từ $\frac{1}{3}$ đến $\frac{1}{2}$ túi noãn hoàng thì quá trình tạo phôi vị bắt đầu. Phôi vị hóa là quá trình vận động, trong đó, các khu vực của phôi nang thay đổi cấu trúc và vị trí để tạo nên các lá phôi là mầm mống của các tổ chức và cơ quan tương lai của cơ thể. Quá trình này gọi là phôi vị hóa. Cá KCLYN thuộc lớp cá xương, do đó trứng thuộc kiểu tận hoàng, nghĩa là noãn hoàng nằm lệch một bên mà quá trình phôi vị hóa trở nên đặc biệt.

Ở giai đoạn phôi nang, có 2 lá phôi là thượng bì và hạ bì. Giai đoạn phôi vị làm tiêu biến xoang phôi nang tạo thành một xoang phôi mới là xoang phôi vị. Phôi gồm 3 lá phôi là ngoại bì, nội bì và trung bì. Trong đó, trung bì hình thành trong thời kỳ phôi vị hóa sau ngoại bì và nội bì. Khi hình thành xong thì trung bì là toàn bộ những tế bào nằm giữa ngoại bì.

Các tế bào phôi di chuyển xuống từ cực động vật để che một phần của noãn hoàng gọi là mọc phủ. Các tế bào phôi bắt đầu di chuyển vào bên trong để tạo thành ba lớp mầm gọi là sự hình thành phôi vị hay hình thành lá phôi thứ 3 (Hình 3.25a).

Khi phôi vị hóa, đĩa phôi trở nên mỏng hơn còn mép phôi ở ngoài cùng của nó lại dày lên tạo ra vòng rìa. Đĩa phôi lớn dần, đĩa phôi càng lớn thì vòng rìa càng lan dần từ cực động vật xuống cực thực vật. Vào đầu phôi vị hóa, lá dưới phôi giống như một cái lưỡi tiến về phía trước giữa lớp ngoài và đĩa phôi, dần dần mọc phủ lên noãn hoàng, trùm lấy toàn khối. Đến gần cuối phôi vị hóa, các mép mọc phủ khép gần kín ở phần đuôi thân phôi, tấm thần kinh hình thành (Hình 3.25b). Cuối giai đoạn này, khi mép phôi bao trùm toàn khối noãn hoàng, mầm mắt xuất hiện báo hiệu sự hình thành các cơ quan.



a. Đầu phôi vị; b. Hình thành tấm thần kinh;
c. Cuối phôi vị (Xuất hiện mầm mắt)

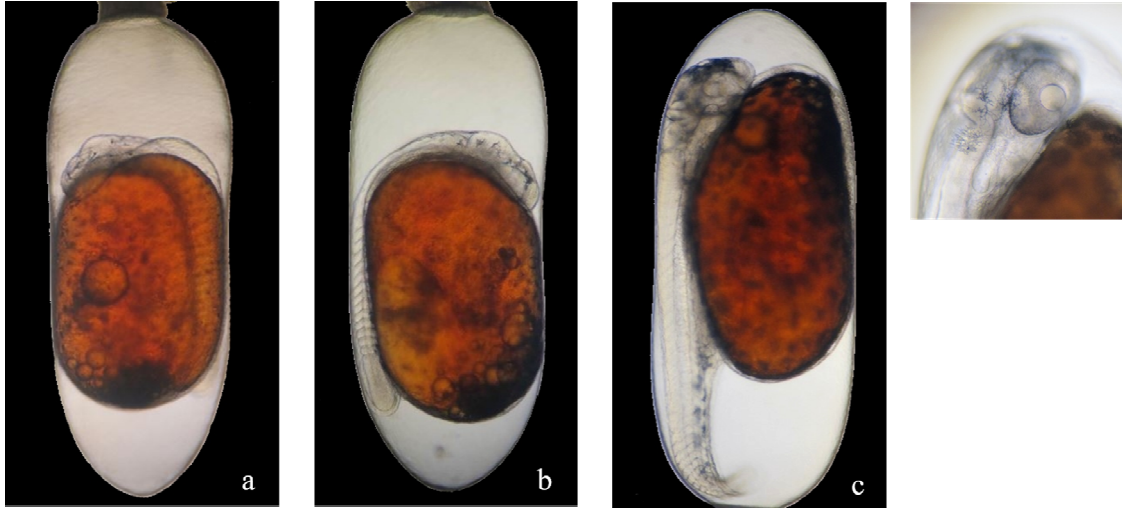
Hình 3.25 Các giai đoạn phát triển phôi vị

3.2.2.5 Biệt hóa và hình thành cơ quan

Sự hình thành cơ quan là giai đoạn phát triển bắt đầu sau giai đoạn phôi vị. Sự hình thành các cơ quan, lúc đầu hình thành những cơ quan đặc thù cho ấu trùng và khi phát triển, cá dần hoàn chỉnh cơ thể. Đặc trưng của quá trình phát triển phôi của cá

KCYN là từ lúc được cá đẻ ra ngoài môi trường và luôn nằm trong màng phôi, thời gian phát triển tương đối dài (7 ngày tuổi⁺). Vì vậy, phân chia quá trình phát triển phôi cá giai đoạn hình thành cơ quan theo ngày chỉ mang tính chất tương đối phụ thuộc vào quan sát sự xuất hiện của các cơ quan qua lớp màng phôi.

*** Giai đoạn phôi cá 2 ngày tuổi**



a. Hình thành rãnh thần kinh; b. Mầm đuôi rõ ràng; c. Tim xuất hiện, đuôi cử động

Hình 3.26 Các giai đoạn phát triển cơ quan ở phôi 2 ngày tuổi

Tám thần kinh rõ ràng dần, rãnh thần kinh xuất hiện. Các ống thần kinh theo chiều dọc được hình thành và gắn vào noãn hoàng. Lúc đầu cơ thể trong suốt không có cấu trúc cơ (Hình 3.26 a).

Đầu với hai con mắt được tách ra nổi bật so với phần còn lại của cơ thể. Mầm đuôi xuất hiện, đốt sống và xương sống hình thành (Hình 3.26 b).

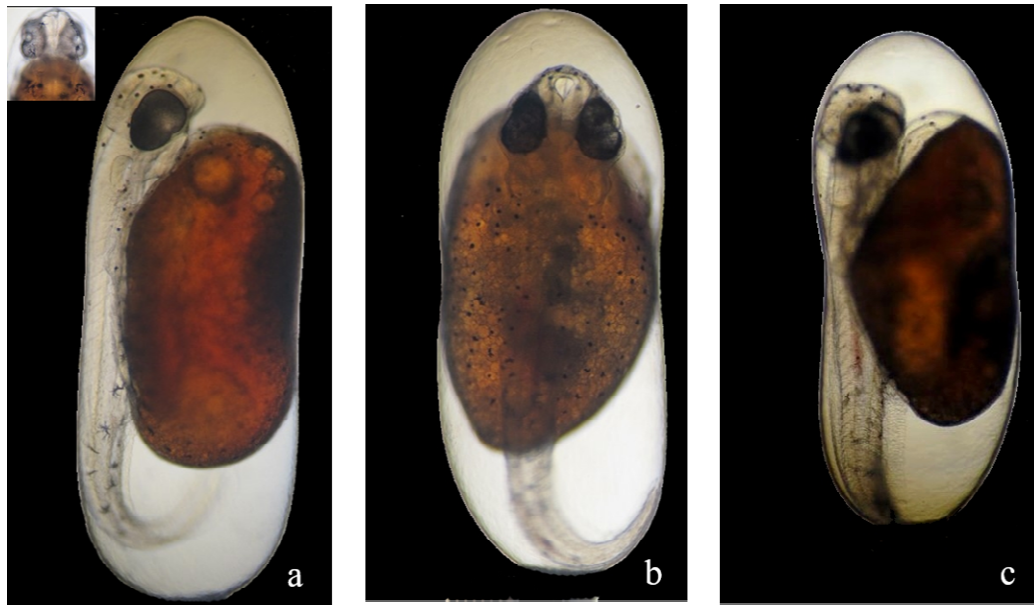
Tim xuất hiện, đuôi phát triển dài ra và chưa có sắc tố. Phần đầu rõ ràng và áp chặt vào phần noãn hoàng, xuất hiện 3 túi não sơ khai xuất hiện (não trước, não giữa và não sơ khai) chỉ là những nếp gấp lớn trên đỉnh đầu phôi (Hình 3.26 c).

*** Giai đoạn phôi cá 3 ngày tuổi**

Đầu cá tách ra khỏi khối noãn hoàng. Đuôi dài ra và tách ra khỏi noãn hoàng, cơ thể vẫn dính vào noãn hoàng. Đá tai rõ ràng. Quan sát mắt, chồi đuôi, và tế bào sắc tố đen nằm ở đầu và trên bề mặt noãn hoàng rõ rệt (Hình 3.27a).

Miệng nguyên thủy xuất hiện, mắt có sắc tố đen dần lên. Ở giai đoạn này phôi phát triển mạnh. Cơ thể vẫn còn dính noãn hoàng nhưng giảm dần diện tích tiếp xúc. Đuôi cử động nhẹ và ít, tim đập chậm (Hình 3.27b).

Tim hoạt động mạnh hơn, phổi xuất hiện, hệ thống tuần hoàn với các động mạch, tĩnh mạch xuất hiện, lúc đầu chưa có hồng cầu, sau đó hồng cầu xuất hiện làm phần đuôi cá dần có các cụm máu màu hồng nhạt. Chiều dài cơ thể cá tăng lên rõ rệt. Đá tai nhỏ được quan sát dễ dàng. Các tế bào sắc tố đen đã được tăng lên trong ở khu vực đầu. (Hình 3.27c)



a. Đầu tách khỏi noãn hoàng; b. Miệng rõ ràng; c. Phổi xuất hiện

Hình 3.27 Các giai đoạn phát triển cơ quan ở phôi 3 ngày tuổi

***. Giai đoạn phôi cá 4-7 ngày tuổi**

Kích thước noãn hoàng giảm dần trong khi phôi đang phát triển cơ thể lớn dần lên. Đầu và đuôi được tách ra rõ ràng khỏi noãn hoàng. Ba túi chứa não chính: não trước, não giữa và não sau đã được nhìn thấy rõ trong vùng đầu. Nắp mang xuất hiện (Hình 3.28a).

Đôi mắt to và nổi bật có sắc tố màu nâu đen. Phần đầu có nhiều sắc tố và ít hơn ở vùng đuôi. Trục cột sống rõ ràng. Các tế bào máu đỏ chạy trong các mạch máu có thể được quan sát cho thấy hoạt động của hệ tuần hoàn. Đầu và đuôi của phôi được mở rộng chạm vào nang trứng. Ống hậu môn xuất hiện (Hình 3.28b).

Kích thước các cơ quan phát triển lớn lên, noãn hoàng nhỏ dần. Bụng lớn hơn và phủ lên noãn hoàng. Các tế bào sắc tố đen được phân bố đều trong toàn bộ cơ thể (Hình 3.28c).

Phôi được mở rộng hơn và chứa đầy hầu hết nang trứng. Vây ngực khá lớn. Mang hoạt động mạnh. Phôi chuyển động mạnh và thường xuyên hơn. (Hình 3.28d).

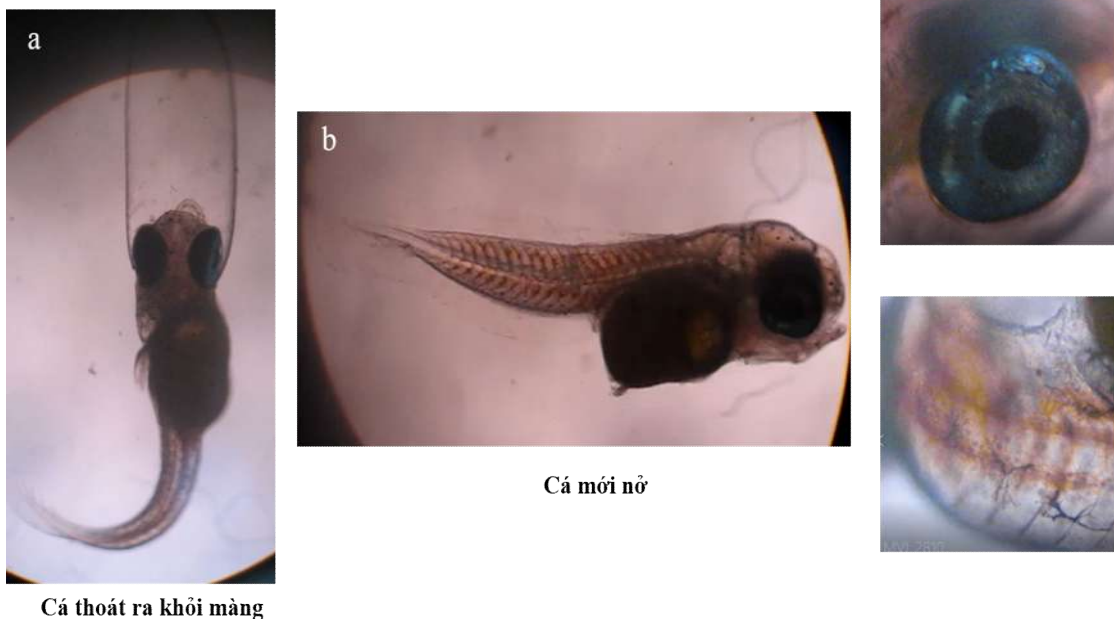


a. Nắp mang rõ ràng (phôi 3 ngày); b. Hậu môn xuất hiện (phôi 4 ngày); c. Hệ tuần hoàn hoạt động khắp cơ thể (phôi 5 ngày); d. Phôi vận động mạnh (phôi 6 ngày)

Hình 3.28 Các giai đoạn phát triển cơ quan ở phôi 4-7 ngày tuổi

3.2.2.6 Giai đoạn cá nở

Phôi bắt đầu nở bằng cách đuôi vận động mạnh để phá vỡ nang trứng. Ấu trùng được giải phóng khỏi nang và trở thành cá con mới nở (Hình 3.29a). Vây lưng, vây đuôi và vây hậu môn liên tục theo đường dọc. Vây bụng không rõ ràng ở giai đoạn này (Hình 3.29b).



a. Phôi nở (phôi 7 ngày); b. Cá con 1 ngày tuổi

Hình 3.29 Giai đoạn phôi nở, cá con thoát ra ngoài môi trường

Thời gian phát triển các giai đoạn phôi cá KCYN được trình bày ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Thời gian phát triển các giai đoạn phôi cá KCLYN

Các giai đoạn	Thời gian (từ lúc cá đẻ)			Các đặc điểm phát triển
	Ngày	Giờ	Phút	
<i>Sự thụ tinh và kích hoạt trứng</i>				
1			10	Ngay sau thụ tinh, tế bào chất dồn về cực động vật
2		1	25	Tạo thành khoang trống quanh noãn hoàng (do nước xâm nhập cực động, thực vật)
3		1	30	1 tế bào
<i>Giai đoạn phân cắt trứng</i>				
4		1	55	2 phôi bào
5		2	5	4 phôi bào
6		2	10	8 phôi bào
7		3	5	16 phôi bào
8		4	55	32 phôi bào
9		5	20	64 phôi bào
<i>Giai đoạn phôi nang</i>				
10		6	02	128 phôi bào
11		7	25	256 phôi bào
12		13	15	Phôi nang cao
13		15	25	Phôi nang thấp (eo thắt mờ dần)
14		17	5	Phôi nang thấp (eo thắt biến mất)
15		18	15	Phôi nang muộn
<i>Giai đoạn phôi vị</i>				
16		20	10	Đầu giai đoạn phôi vị
17	1	0	15	Hình thành tám thần kinh
18	1	3	20	Cuối giai đoạn phôi vị, mầm mắt hình thành
<i>Biệt hóa và hình thành cơ quan</i>				
19	1	4	35	Hình thành rãnh thần kinh, đốt sống và xương sống
20	1	5	50	Hình thành mầm đuôi
21	1	22	10	Tim xuất hiện, đuôi phát triển dài ra và bắt đầu chuyển động chậm, bọc mắt xuất hiện, 3 túi não sơ khai xuất hiện: não trước, não giữa và não sau
22	2	8	40	Đầu tách dần khỏi noãn hoàng, đá tai xuất hiện
23	2	12	5	Miệng xuất hiện
24	2	15	3	Tim bắt đầu hoạt động mạnh hơn, phổi xuất hiện
25	3	2	10	Nắp mang xuất hiện, mắt có nhiều sắc tố đen nên có màu sậm dần
26	4	10	50	Xuất hiện hậu môn
27	5	14	55	Kích thước noãn hoàng nhỏ dần, nắp mang rõ ràng, hình thành các cơ quan
28	6	1	30	Phôi cử động nhiều, mang hoạt động theo nhịp tim
29	7	5	20	Phôi nở

Cá khoang cổ là một trong những nhóm loài được sớm nghiên cứu thử nghiệm sinh sản nhân tạo thành công trên thế giới. Kết quả quan sát quá trình phát triển phôi cho thấy, thời gian phát triển phôi của cá KCYN dài hơn so với cá khoang cổ đỏ (152 giờ sau thụ tinh); kết quả cũng cho thấy thời gian phát triển phôi cũng dài hơn so trên cùng loài cá KCLYN tại vịnh Thái Lan (6 ngày⁺), điều này có thể lý giải do nhiệt độ quan sát quá trình phát triển phôi cá ở 27-28⁰C, nhiệt độ phòng thí nghiệm nên có thể thấp hơn so với nhiệt độ ngoài trời của những tác giả khác. So sánh thời gian và các giai đoạn phát triển phôi, ấu trùng cá khoang cổ đỏ và cá khoang cổ đỏ tại Việt Nam và kích thước trứng cũng cho thấy, thời gian phát triển của cá KCYN dài hơn, kích thước phôi cá nhỏ hơn so với 2 loài trên [67, 163, 179].

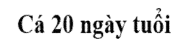
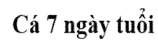
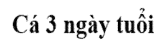
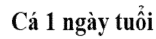
Trong nghiên cứu của chúng tôi, phôi nở hoàn toàn sau 173 ± 6 giờ tương ứng với 7 ngày và 6 giờ sau khi thụ tinh. Quá trình phân cắt phôi của cá KCLYN chỉ diễn ra ở cực động vật tương tự như quy luật chung ở các loài cá xương.

Vai trò của nuôi nước xanh trong ấp nở và ương nuôi ấu trùng cá cảnh biển trong nuôi trồng thủy sản. Ở cá KCYN, do thời gian phát triển phôi dài so với đa số các loài cá đẻ trứng nổi hoặc trôi nổi, vì vậy, khi ấu trùng nở ra, túi noãn hoàng còn lại trong ấu trùng có kích thước nhỏ và thường chỉ đến ngày thứ 2 là tiêu biến. Để đảm bảo quá trình dinh dưỡng của cá khoang cổ được tốt nhất, ấu trùng cá được cung cấp thức ăn ngay khi vừa nở ra. Vì vậy, tổ trứng thường được tách khỏi bố mẹ vào ngày ấp thứ 6 – 7 tùy theo màu sắc của trứng và sắc tố trong điểm mắt của phôi. Giá thể chứa trứng được đưa vào bể ấp nở với việc cung cấp đầy đủ thức ăn sống (Rotifer và vi tảo).

Cá 1 ngày tuổi: Ấu trùng cá KCYN mới nở chìm xuống đáy rồi dần dần bơi yếu ớt và hết hướng lên mặt nước toàn thân cá trong suốt với hai mắt to màu đen với phần ánh bạc quan sát rõ ràng. Miệng mở thụ động và hậu môn rõ ràng, khối noãn hoàng còn lại kích thước rất nhỏ, bụng phẳng và không nhìn thấy thức ăn. Tất cả các vây được hợp nhất với nhau để tạo thành một nếp gấp đơn.

Cá 2 ngày tuổi: cơ thể xuất hiện điểm sắc tố rõ và cá bơi chủ động hơn, trên cơ thể trong suốt có thể nhìn thấy phần bụng đậm hơn do cá bắt đầu bắt mồi thụ động.

Các giai đoạn phát triển cá con đến 15 ngày tuổi được thể hiện ở Hình 3.14



3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và nhiệt độ đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN

3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn lên hiệu quả sinh sản

Một trong những yếu tố đóng vai trò quan trọng nhất đến chất lượng của sản phẩm sinh dục của các loài cá được biết đến là thành phần dinh dưỡng. Kết quả thể hiện qua Bảng 3.6

Bảng 3.6. Hiệu quả nuôi vỗ cá bố mẹ bằng các loại thức ăn khác nhau

Nghiệm thức	NT2	NT3	NT4	NT5
Chỉ tiêu				
Tần suất đẻ (lần/tháng)	0,25 ± 0,462 ^a	0,37 ± 0,079 ^{ab}	0,67 ± 0,067 ^c	0,47 ± 0,042 ^b
Số lượng trứng (trứng/ổ)	396 ± 36 ^a	495 ± 54 ^{ab}	708 ± 71 ^c	618 ± 48 ^{bc}
Kích thước trứng (mm)	1,38 ± 0,047 ^a	1,49 ± 0,032 ^{ab}	1,50 ± 0,043 ^b	1,53 ± 0,025 ^{ab}
Tỷ lệ thụ tinh (%)	31,19 ± 3,919 ^a	55,43 ± 1,864 ^b	72,45 ± 4,310 ^b	58,81 ± 9,561 ^b
Tỷ lệ nở (%)	34,17 ± 7,945 ^a	53,73 ± 5,493 ^b	81,33 ± 4,005 ^c	61,89 ± 6,676 ^b
Số lượng ấu trùng (con)	39 ± 13 ^a	150 ± 27 ^b	409 ± 21 ^c	211 ± 22 ^b
Kích thước ấu trùng (mm)	2,39 ± 0,034 ^a	2,51 ± 0,017 ^b	2,61 ± 0,027 ^b	2,54 ± 0,041 ^b
Thời gian nở (ngày)	9,37 ± 0,426 ^a	8,5 ± 0,353 ^a	7,35 ± 0,239 ^b	7,63 ± 0,375 ^b

Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình ± sai số chuẩn

Các số liệu mang ký tự chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$.

Sử dụng 5 loại thức ăn trong đó NT1 là thức ăn tổng hợp thường được người nuôi sử dụng trong nuôi dưỡng các loài cá cảnh biển gia đình, kết quả cá chỉ đẻ 1 lần, các chỉ tiêu về số lượng trứng, tỷ lệ thụ tinh và nở thấp, số liệu chưa đủ nên không đưa vào thống kê so sánh. Các NT còn lại là thức ăn phối trộn trong đó thành phần gồm nhiều loại thức ăn khác nhau (tôm, mực, bột cá, bột moi, tảo, rong...). Kết quả cho thấy, thức ăn có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN bố mẹ trong nuôi vỗ thành thực và cho đẻ, các loại thức ăn phối trộn cho cá khoang cổ trong thí nghiệm đều có thể sử dụng cho cá KCYN, tuy nhiên thức ăn tổng hợp không phù hợp cho cá KCYN ở giai đoạn này. Trong cả 4 loại thức ăn phối trộn, loại thức ăn phối trộn theo NT4 đạt hiệu quả sinh sản cao nhất dựa trên các chỉ tiêu quan sát (tần suất đẻ của cá $0,67 \pm 0,067$ lần/tháng, số lượng trứng 708 ± 71 trứng/tổ, tỷ lệ thụ tinh $72,45 \pm 4,310\%$, tỷ lệ nở $81,33 \pm 4,005\%$ ($P \leq 0,05$). Sử dụng NT1 thức ăn tổng hợp, cá bố mẹ chỉ đẻ 1

lần nhưng các chỉ tiêu về số lượng trứng, tỷ lệ thụ tinh và nở thấp. Thành phần thức ăn không ảnh hưởng đến kích thước ấu trùng cá KCYN và chỉ có sự sai khác ở kích thước trứng khi sử dụng thức ăn tổng hợp so với các loại thức ăn phối trộn là thấp hơn đáng kể ($P \leq 0,05$). Thời gian nở của ấu trùng khi sử dụng 4 loại thức ăn từ 7-9 ngày, trong đó cá ăn bằng thức ăn NT4, NT5 có thời gian nở không sai khác và sớm hơn so với cá ăn bằng NT5, NT5 ($P \leq 0,05$).

Tần suất đẻ và số lượng trứng, số lượng ấu trùng tăng dần khi cho cá ăn thức ăn từ NT2 đến NT3 và giảm dần ở NT5 lần lượt là $0,25 \pm 0,462$ lần /tháng, $0,37 \pm 0,079$ lần /tháng và $0,47 \pm 0,042$ lần /tháng, với số lượng trứng lần lượt là 396 ± 36 trứng/tổ, 3495 ± 54 trứng/tổ, 618 ± 48 trứng/tổ, tuy nhiên sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tuy nhiên số lượng trứng, kích thước trứng, tỷ lệ thụ tinh, kích thước ấu trùng không có sự sai khác thống kê giữa cá cho ăn bằng NT 4 và NT5 với giá trị lần lượt 708 ± 71 và 618 ± 48 trứng/ổ; kích thước trứng là $1,50 \pm 0,043$ mm và $1,53 \pm 0,025$ mm; tỷ lệ thụ tinh là $72,45 \pm 4,31\%$ và $58,81 \pm 9,561\%$; kích thước ấu trùng là $1,50 \pm 0,043$ mm và $1,53 \pm 0,025$ mm và không sai khác với cá cho ăn bằng NT3.

Trong số các dưỡng chất, Protein là thành phần có ảnh hưởng lớn nhất đến quá trình sinh sản của cá [50, 153, 172, 173]. Kết quả về hàm lượng Protein $\geq 50\%$ là phù hợp trong thức ăn của cá KCYN bố mẹ, tuy nhiên về hiệu quả kinh tế, khi cho cá ăn ở hàm lượng 55%, hiệu quả sinh sản không tăng ($P \leq 0,05$). Vì vậy, loại thức ăn ở NT4 là loại tốt nhất cho nuôi thành thực và sinh sản cá KCYN. Phân tích thành phần các loại thức ăn thử nghiệm (NT1 là số liệu được cung cấp bởi nhà sản xuất).

Bảng 3.7. Thành phần dinh dưỡng của các nghiệm thức thức ăn nuôi sinh sản

Thành phần Nghiệm thức	Protein (Đạm)	Lipid (Béo)	Moistrute (Xơ)	Ash (Tro)	NFE (Năng lượng)
1	38,1	9,7	2,8	8,2	41,2
2	39,95	12,95	4,96	14,43	27,70
3	45,22	11,45	14,16	15,80	13,37
4	49,83	10,54	13,36	12,75	13,53
5	55,12	9,88	13,23	10,50	11,28

Kết quả này không sai khác với thử nghiệm sinh sản của Binu (2009) trong phòng thí nghiệm tại Thái Lan khi nuôi cá khoang cổ *A. sebae*, cho ăn bằng mực tươi, với lượng protein 55 - 60% và lipid 9 - 12%, số lượng trứng và ấu trùng cao hơn so với thức ăn thịt tôm và thịt vẹm [165]. Khả năng sinh sản của *A. ocellaris* cho ăn bằng động

vật phù du và tảo dao động từ 23-1518 trứng, số lượng trứng trung bình là 582 ± 478 trứng [108]. Công bố của Izquierdo (2001), Zambonino-Infante (2010), Chambel (2015) đều cho rằng hàm lượng Protein phù hợp cho cá khoảng cổ từ 45-50% [64, 103, 180].

Ngoài hàm lượng, nguồn gốc của Protein với nguồn cung cấp các chất DHA và acid béo không no từ các nguồn nguyên liệu có nguồn gốc từ biển bao gồm bột cá, trứng bào xác (Cyclop – eeze), bột moi, rong và tảo biển cùng các nguyên tố vi lượng cần thiết cho cá [12, 85] có trong thức ăn ở NT4 cũng là nguyên nhân dẫn đến hiệu quả sinh sản cá cao khi cho cá KCYN ăn loại thức ăn này.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên hiệu quả sinh sản

Ảnh hưởng của độ mặn lên sự thành thực, đẻ trứng và phát triển phôi ở cá cảnh biển chưa được nghiên cứu đầy đủ. Độ mặn có ảnh hưởng khác nhau tùy từng loài, quần thể và giai đoạn phát triển cá thể. Độ mặn là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh sản, thời gian nở của trứng và khả năng kết dính của trứng với giá thể. Kết quả thử nghiệm nuôi vỗ và sinh sản cá KCYN bố mẹ ở các mức độ mặn khác nhau được biểu hiện ở Bảng 3.8

Bảng 3.8. Hiệu quả nuôi vỗ cá bố mẹ ở các mức độ mặn khác nhau

Chỉ tiêu	Độ mặn	25‰	29‰	33‰	37‰
Tần suất đẻ (lần/tháng)		$0,33 \pm 0,067^a$	$0,75 \pm 0,046^b$	$0,71 \pm 0,104^b$	$0,21 \pm 0,04^a$
Số lượng trứng (trứng/ổ)		450 ± 34^a	681 ± 34^b	683 ± 57^b	316 ± 51^a
Kích thước trứng (mm)		$1,50 \pm 0,048^b$	$1,54 \pm 0,037^b$	$1,50 \pm 0,044^b$	$1,25 \pm 0,044^a$
Tỷ lệ thụ tinh (%)		$70,75 \pm 5,508^b$	$83,99 \pm 3,238^b$	$78,85 \pm 4,631^b$	$52,88 \pm 5,559^a$
Tỷ lệ nở (%)		$60,27 \pm 6,174^b$	$79,98 \pm 1,657^c$	$78,45 \pm 2,338^c$	$41,37 \pm 3,341^a$
Số lượng ấu trùng (con)		202 ± 53^b	505 ± 19^d	398 ± 29^c	69 ± 14^a
Kích thước ấu trùng (mm)		$2,40 \pm 0,023^{ab}$	$2,61 \pm 0,086^c$	$2,57 \pm 0,061^b$	$2,229 \pm 0,051^a$
Thời gian nở (ngày)		$6,42 \pm 0,21^a$	$7,35 \pm 0,16^b$	$7,10 \pm 0,38^b$	$12,25 \pm 0,38^c$

Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Các số liệu mang ký tự chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu cho thấy cá KCYN có khả năng thích nghi và có thể đạt đến trạng thái thành thực hoàn toàn và đẻ trứng ở độ mặn 25 ‰, 29 ‰, 33 ‰ và 37 ‰.

Tần suất đẻ, số lượng trứng của cá KCYN bị tác động bởi mức độ mặn, ở mức độ mặn 29 ‰ và 33‰, cá có tần suất đẻ, số lượng trứng cao nhất (tần suất đẻ lần lượt là $0,75 \pm 0,046$, $0,71 \pm 0,104$ lần/tháng và 681 ± 34 , 683 ± 57 trứng/tổ) và cao hơn so với mức độ mặn 25 ‰ và 37 ‰ (có giá trị là $0,33 \pm 0,067$, $0,21 \pm 0,04$ lần/tháng và 450 ± 34 , 316 ± 51 trứng/tổ) ($P \leq 0,05$). Kích thước trứng, tỷ lệ thụ tinh không có sự sai khác ở 3 mức độ mặn 24 ‰, 29 ‰ và 33 ‰, kích thước trứng, tỷ lệ thụ tinh nhỏ nhất ở mức độ mặn 37 ‰ ($P \leq 0,05$). Số lượng trứng, tỷ lệ thụ tinh và kích thước ấu trùng sai khác có ý nghĩa thống kê theo thứ tự tăng dần ở mức độ mặn 37 ‰, 25 ‰ và không sai khác ở mức độ mặn 29 và 33 ‰. Tỷ lệ nở của ấu trùng cao nhất ở 29 ‰ và 33 ‰ (có giá trị là $79,98 \pm 1,657$ %, $78,45 \pm 2,338$ %) và thấp dần ở 24 ‰ ($60,27 \pm 6,174$ %) và 37 ‰ ($41,37 \pm 3,341$ %) ($P \leq 0,05$). Kích thước ấu trùng không có sự sai khác có ý nghĩa ở các mức độ mặn khác nhau theo thí nghiệm, có giá trị từ 2,3 – 2,6 mm. Số lượng ấu trùng có sự sai khác có ý nghĩa ở các mức độ mặn khác nhau trong đó số lượng ấu trùng cao nhất ở 29 ‰ (505 ± 19 con), sau đó giảm dần ở các mức 33 ‰ (398 ± 29 con), 25 ‰ (202 ± 53 con) và 37 ‰ (69 ± 14 con) ($P \leq 0,05$). Ở các mức độ mặn thí nghiệm, độ mặn càng cao thì thời gian nở của ấu trùng càng tăng ($P \leq 0,05$). Có thể nhận định, mức độ mặn 29 ‰ và 33 ‰ phù hợp cho nuôi vỗ thành thực cá KCYN bố mẹ và sự phát triển của ấu trùng cá.

Ở độ mặn 37 ‰, hiệu quả sinh sản của cá bố mẹ thấp nhất ($P \leq 0,05$) với số ấu trùng chỉ 69 ± 14 con, ngoài ra các chỉ số sinh sản khác như số lượng ấu trùng, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở đều thấp nhất so với các mức độ mặn khác. Có thể thấy ở độ mặn này, cá KCYN có thể sinh sản được song hiệu quả sinh sản không cao.

Kết quả của nghiên cứu tương tự với thử nghiệm tại Đại học Burapha (Thái Lan) khi nuôi dưỡng khoang cổ *A. ocellaris*, *A. percula*, *A. melanopus*, *A. clarkii* và *A. nigripe* ở độ mặn từ 24 – 30 ‰, cả 5 loài cá đều sinh sản sau 3-6 tháng nuôi với số lần đẻ từ 14 – 18 lần/năm [165]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này có sự khác biệt so với nghiên cứu của Trần Văn Phước (2010) trên cá khoang cổ đỏ trong các điều kiện độ mặn từ 27 - 42 ‰, ở độ mặn 27-29 ‰ thời gian thành thực và tái sinh sản của cá bố mẹ kéo dài gấp đôi so với độ mặn 33-35 ‰. Còn ở độ mặn 40-45 ‰, cá bố mẹ có biểu hiện thành thực nhưng không tham gia sinh sản [26].

Độ mặn 15 - 40‰ không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cá khoang cổ nemo trưởng thành, dao động từ 97,8 - 100% [39]. Ở cá khoang cổ đen đuôi vàng, độ mặn

thích hợp cho loài cá dao động từ 20 - 45‰, tuy nhiên khoảng độ mặn này thấp hơn so cá khoang cổ nemo và khoang cổ đỏ (5 - 55‰) [26].

Có thể thấy, cá KCYN thích nghi ở các mức độ mặn 25 ‰, 29 ‰, 33 ‰ và 37 ‰. Tuy nhiên, độ mặn có ảnh hưởng đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN bố mẹ, trong đó mức độ mặn thích hợp cho cá sinh sản và phát triển cá bột là 29 và 33 ‰. Mức độ mặn 37 ‰ không phù hợp cho phát dục và sinh sản của cá KCYN. Kết quả này cho thấy, trong điều kiện nuôi nhốt, người nuôi cần chú ý đến sự bốc hơi nước biển và có sự kiểm tra độ mặn thường xuyên khi nuôi sinh sản cá KCYN.

3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên hiệu quả sinh sản

Cá là động vật biến nhiệt nên nhiệt độ là yếu tố môi trường ảnh hưởng mạnh mẽ nhất đến quá trình trao đổi chất, từ đó ảnh hưởng đến suốt quá trình sinh sản của cá. Mỗi loài cá đòi hỏi một tổng nhiệt thành thực nhất định. Cùng loài cá sống ở vùng nước có nhiệt độ thấp thường có tuổi thành thực và thời gian thành thực dài hơn cá cùng loài sống ở vùng nước có nhiệt độ ấm hơn. Mỗi loài cá chỉ thực hiện việc đẻ trứng ở một phạm vi nhiệt độ nhất định [131]. Ở cá KCYN, nhiệt độ là một trong những yếu tố tác động đến hiệu quả sinh sản của cá bố mẹ.

Nhiệt độ thích hợp cho sinh sản cá KCYN là từ 27-30°C trong đó nhiệt độ 27°C là tốt nhất ($P \leq 0,05$) biểu hiện ở Bảng 3.9

Bảng 3.9. Hiệu quả sinh sản cá bố mẹ ở các mức nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ	24°C	27°C	30°C	33°C
Chỉ tiêu				
Tần suất đẻ (lần/tháng)	0,71 ± 0,040 ^{bc}	0,83 ± 0,117 ^c	0,54 ± 0,042 ^b	0,25 ± 0,082 ^a
Số lượng trứng (trứng/ổ)	625 ± 16 ^{bc}	767 ± 47 ^c	488 ± 21 ^b	313 ± 77 ^a
Kích thước trứng (mm)	1,49 ± 0,043 ^b	1,50 ± 0,044 ^b	1,50 ± 0,012 ^b	1,255 ± 0,088 ^a
Tỷ lệ thụ tinh (%)	79,59 ± 2,725 ^b	76,52 ± 4,553 ^b	76,49 ± 1,507 ^b	52,88 ± 5,59 ^a
Tỷ lệ nở (%)	79,76 ± 3,714 ^{ab}	88,17 ± 1,315 ^b	70,08 ± 3,498 ^a	69,10 ± 4,593 ^a
Số lượng ấu trùng (con)	395 ± 15 ^c	515 ± 22 ^d	261 ± 16 ^b	129 ± 45 ^a
Kích thước ấu trùng (mm)	2,65 ± 0,017 ^b	2,72 ± 0,034 ^b	2,49 ± 0,032 ^a	2,41 ± 0,057 ^a
Thời gian nở (ngày)	11,40 ± 0,50 ^d	8,20 ± 0,16 ^c	7,20 ± 0,38 ^b	6,42 ± 0,21 ^a

Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình ± sai số chuẩn

Các số liệu mang ký tự chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$.

Hiệu quả sinh sản tốt nhất của cá KCYN ở nhiệt độ 27⁰C. Trong đó các chỉ tiêu: tần suất đẻ, số lượng trứng, số lượng ấu trùng đều cao hơn các nhiệt độ còn lại trong thí nghiệm và có giá trị các chỉ số lần lượt là: $0,83 \pm 0,117$ lần/tháng, 767 ± 47 trứng/tổ, 515 ± 22 con ($P \leq 0,05$). Các chỉ tiêu quan sát tần suất đẻ, số lượng trứng, kích thước trứng, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở không có sự khác biệt có ý nghĩa khi nuôi sinh sản cá bố mẹ ở 24 và 30⁰C ($P > 0,05$). Ở nhiệt độ 24⁰C, số lượng ấu trùng cao hơn so với 30⁰C lần lượt là 395 ± 15 con và 261 ± 16 ($P \leq 0,05$). Ở mức nhiệt độ 33⁰C, đa số các chỉ tiêu sinh sản đều thấp nhất ($P \leq 0,05$) trừ thời gian nở là ngắn nhất ($6,42 \pm 0,21$ ngày). Thời gian nở của ấu trùng tỷ lệ nghịch với mức tăng nhiệt độ, ở 24⁰C, thời gian nở của cá kéo dài ~12 ngày dẫn đến thời gian chăm sóc lâu, tỷ lệ hao hụt trong quá trình ấp nở cao, cá bố mẹ tái thành thực sinh dục chậm, hiệu quả kinh tế không cao.

Nghiên cứu của Jonhston (2000) trên cá khoang cổ cam cho kết quả tương tự, ở nhiệt độ khoảng $27,7 \pm 1,4^0$ C cá có tốc độ tăng trưởng tối ưu. Ở nhiệt độ 27,7 ⁰C cá khoang cổ cam có mức tăng trưởng chiều dài cá cao hơn 68% so với cá nuôi ở nhiệt độ và 21⁰C [107].

Nhiệt độ là một trong các yếu tố có ảnh hưởng lớn đến sự thành thực sinh dục, thời gian phát triển phôi, tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá cảnh biển nói chung [178]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với khoảng nhiệt độ phù hợp khuyến cáo của cá cảnh biển nói chung, cá khoang cổ vùng nhiệt đới thường từ 24-28⁰C [33].

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và mật độ đến hiệu quả ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 - 15 ngày tuổi

3.4.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại thức ăn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

Khối lượng và tốc độ tăng trưởng khối lượng ngày cao nhất theo cặp khi cho ấu trùng cá KCYN ăn bằng thức ăn sống với sự kết hợp của nhiều loại thức ăn Rotifer, Artemia và Copepoda (thức ăn phối hợp) và thức ăn sống Copepoda lần lượt là: $0,0315 \pm 0,0005$ (g) và $0,0337 \pm 0,0011$ (g) và $14,04 \pm 0,170$ % và $14,41 \pm 0,200$ %. Hai giá trị này thấp hơn ($P \leq 0,05$) ở nghiệm thức cho ấu trùng cá KCYN ăn bằng Rotifer và Artemia, lần lượt là: $0,0254 \pm 0,0017$ g, $0,0269 \pm 0,0008$ g và $12,62 \pm 0,427$ %, $12,62 \pm 0,427$ %, $13,19 \pm 0,241$ %.

Tuy nhiên, giá trị chiều dài và tốc độ tăng trưởng chiều dài ngày cao nhất khi cho ấu trùng cá KCYN ăn bằng thức ăn phối hợp, sau đó là cho ăn bằng Copepoda, tiếp theo

là *Artemia* và thấp nhất ở ấu trùng cá được cho ăn Rotifer ($P \leq 0,05$), các giá trị chiều dài thu hoạch ấu trùng cá lần lượt là $8,00 \pm 0,07$ mm, $6,60 \pm 0,023$ mm, $6,41 \pm 0,015$ và $5,97 \pm 0,015$ mm. Giá trị tốc độ tăng trưởng chiều dài ngày của ấu trùng cá lần lượt là: $7,58 \pm 0,006$ %, $6,27 \pm 0,017$ %, $6,09 \pm 0,023$ % và $5,63 \pm 0,109$ %.

Ấu trùng cá KCYN mới nở được cho ăn hỗn hợp thức ăn sống (Rotifer, Copepoda và *Artemia*) đạt chỉ tiêu tỷ lệ sống cao nhất $57,03 \pm 1,07$ %, sau đó là ấu trùng cá cho ăn bằng Copepoda ($42,90 \pm 0,86$) ($P \leq 0,05$). Ấu trùng cá KCYN cho ăn bằng Rotifer và *Artemia* có tỷ lệ sống thấp nhất so với 2 nghiệm thức thức ăn còn lại là $26,03 \pm 0,39$ % và $25,46 \pm 0,67$ % ($P > 0,05$). Kết quả thử nghiệm các loại thức ăn khác nhau trong ương ấu trùng cá KCYN thể hiện ở Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN với các loại thức ăn khác nhau

Chỉ tiêu \ Thức ăn	Tổng hợp	Rotifer	Artemia	Copepoda	Rotifer + Artemia + Copepoda
Chiều dài đầu (mm)	2.60	2,57 ± 0,003	2,58 ± 0,003	2,59 ± 0,003	2,57 ± 0,002
Chiều dài cuối (mm)	—	5,97 ± 0,015 ^a	6,41 ± 0,015 ^b	6,60 ± 0,023 ^c	8,00 ± 0,071 ^d
Khối lượng đầu (g)	0,0039± 0,0000 ^a	0,0038	0,0038	0,0037	0,0038
Khối lượng cuối (g)	—	0,0254 ± 0,0017 ^a	0,0269 ± 0,0008 ^a	0,0315 ± 0,0005 ^b	0,0337 ± 0,0011 ^b
TLS (%)	—	26,03 ± 0,39 ^a	25,46 ± 0,67 ^a	42,90 ± 0,86 ^b	57,03 ± 1,07 ^c
SGRL (%ngày)	—	5,63±0,109 ^a	6,09 ± 0,023 ^b	6,27 ± 0,017 ^c	7,58 ± 0,006 ^d
SGRW (% ngày)	—	12,62 ± 0,427 ^a	13,19 ± 0,241 ^a	14,04 ± 0,170 ^b	14,41 ± 0,200 ^b

Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình ± sai số chuẩn

Các số liệu mang ký tự chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$.

Ấu trùng cá KCYN được nuôi bằng thức ăn sống với sự kết hợp của nhiều loại thức ăn (Rotifer, Artemia và Copepoda) cho tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều dài và khối lượng lần lượt là: $57,03 \pm 1,07\%$, $7,513 \pm 0,062\%$ ngày và $14,414 \pm 0,200\%$ ngày. So với các nghiệm thức cho ấu trùng cá ăn riêng lẻ từng loại thức ăn, sự phối hợp các loại thức ăn sống là tốt nhất cho ấu trùng cá KCYN từ 1-15 ngày tuổi ($P \leq 0,05$).

Ấu trùng cá KCYN mới nở được cho ăn hỗn hợp thức ăn sống (Rotifer, Copepoda và Artemia) đạt các chỉ tiêu sinh trưởng và tỷ lệ sống cao nhất. Điều này là do sự kết hợp ưu điểm của các loại thức ăn sống giúp thỏa mãn nhu cầu dinh dưỡng của ấu trùng, cả về kích thước cũng như thành phần dinh dưỡng. Trong khi Rotifer có kích cỡ môi phù hợp với giai đoạn đầu (1-9 ngày) thì các giai đoạn khác nhau của Copepoda và nauplius Artemia lại phù hợp hơn ở giai đoạn sau, từ ngày thứ 7 trở đi. Nhờ nuôi bằng hỗn hợp ba loại thức ăn sống, các loại thức ăn này chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng cần thiết như các axit amin, axit béo không no, khoáng chất, bổ sung nhiều enzyme tiêu hóa, chất tạo sắc tố và các thành phần dinh dưỡng khác giúp kích thích ấu trùng bắt môi, sinh trưởng và phát triển tối ưu.

Kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước khi cho rằng sự kết hợp giữa Rotifer và Artemia nauplius giúp cải thiện đáng kể kết quả ương ấu trùng nhiều loài trong đó có giống cá khoang cổ [19, 28, 98].

Có thể sử dụng Copepoda nhiều kích cỡ khác nhau trong quá trình ương nuôi ấu trùng cá KCYN tuy nhiên, hiệu quả không tốt bằng việc sử dụng kết hợp 3 loại thức ăn sống. Artemia và Rotifer là thức ăn không phù hợp cho ấu trùng cá KCYN nếu sử dụng riêng lẻ từng loại..

Việc sử dụng đơn lẻ các loại thức ăn sống này cho ương ấu trùng cá KCYN tỏ ra không thật sự hiệu quả. Ở nghiệm thức chỉ sử dụng Rotifer, ấu trùng sinh trưởng và phát triển tốt trong 7 ngày đầu nhưng sau đó giảm dần, nhất là sinh trưởng và tỷ lệ sống, thấp hơn đáng kể so với các nghiệm thức sử dụng thức ăn sống khác. Nguyên nhân được cho là từ ngày thứ 7 trở đi, ấu trùng gia tăng kích thước cơ thể và cỡ miệng, Rotifer không còn phù hợp về thành phần dinh dưỡng cũng như cỡ môi. Việc bắt các con môi có kích thước quá nhỏ trong khi năng lượng thu được không đủ thỏa mãn nhu cầu dinh dưỡng của ấu trùng giai đoạn 7 - 15 ngày tuổi làm giảm tốc độ sinh trưởng và

tỷ lệ sống. *Artemia nauplius* lại có kích thước lớn hơn so với khả năng bắt mồi của ấu trùng mới nở. Sau 2 - 3 ngày, ấu trùng gia tăng kích thước nhờ tiêu hóa hết noãn hoàng, chúng mới có thể sử dụng được các nauplius *Artemia* cỡ nhỏ, trong khi đó, năng lượng tiêu hao lớn trong quá trình đuổi bắt con mồi di chuyển nhanh là nguyên nhân làm giảm tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng giai đoạn này so với nghiệm thức sử dụng hỗn hợp thức ăn sống.

Ở nghiệm thức sử dụng Copepoda, kết quả thể hiện tốt hơn do bản thân Copepoda gồm nhiều giai đoạn và kích cỡ khác nhau giúp gia tăng khả năng bắt mồi của ấu trùng cá khoang cổ, mặc dù lớn hơn Rotifer nhưng nhỏ hơn *Artemia nauplius*. Do đó, ấu trùng vẫn có thể sử dụng được một phần nguồn thức ăn này qua đó cải thiện tốc độ sinh trưởng và tỷ lệ sống.

Không thể sử dụng thức ăn tổng hợp trong ương nuôi ấu trùng cá KCYN giai đoạn từ 1-15 ngày tuổi, cá chết sau 2-3 ngày nuôi. Ở giai đoạn này, ấu trùng chưa thích nghi với việc ăn các loại thức ăn không có khả năng vận động, các cơ quan cảm giác chưa phát triển, hệ tiêu hóa chưa hoàn thiện để có thể hấp thu được các hợp chất có cấu trúc phân tử phức tạp như protein, lipid, carbohydrate có trong thức ăn tổng hợp. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Gordon (1999) trên cá khoang cổ cam chỉ sử dụng được thức ăn tổng hợp với ấu trùng 10 - 15 ngày tuổi trở đi [89]. Nhiều nghiên cứu cũng khẳng định việc loại bỏ hoàn toàn thức ăn sống ở giai đoạn bắt đầu sử dụng thức ăn ngoài của ấu trùng cá biển thường gây hiện tượng thiếu hụt dinh dưỡng, phân hủy tổ chức mô, hậu quả làm chết ấu trùng [173].

3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

Độ mặn là một trong những yếu tố sinh thái có ảnh hưởng rất lớn đến sự phân bố của sinh vật, sự phát triển phôi, biến thái ấu trùng, các quá trình sinh lý, sinh hoá cuối cùng ảnh hưởng đến sinh trưởng, tỷ lệ sống của nhiều loài cá biển trong đó có nhóm cá khoang cổ. Mỗi loài cá có khả năng thích nghi với một khoảng độ mặn nhất định tùy thuộc vào môi trường sống tự nhiên, sự thuần dưỡng và giai đoạn phát triển trong vòng đời.

Ngoài tự nhiên, cá khoang cổ nói riêng và cá cảnh biển nói chung phân bố chủ yếu ở các vùng rạn san hô nơi có độ mặn cao (33 ‰), độ trong cao và các yếu tố môi

trường ổn định quanh năm [33, 175]. Tuy nhiên, cá có giai đoạn ấu trùng trôi nổi di chuyển theo dòng nước trước phát triển và sống định cư ở một cụm hải quỳ xác định. Trong giai đoạn này, cá có thể trôi vào các vùng nước ven bờ, cửa sông, nơi có độ mặn thấp và không ổn định so với ở vùng rạn.

Thử nghiệm nuôi ấu trùng cá KCYN ở các mức độ mặn từ 20, 25, 30, 35 và 40 ‰ cho thấy độ mặn ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của cá thí nghiệm. Sau 15 ngày ương, cá được ương ở độ mặn 30‰ đạt tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều dài, tốc độ tăng trưởng khối lượng đặc trưng cao nhất lần lượt là $58,81 \pm 0,95$ % và $6,484 \pm 0,091$ %/ngày và $16,048 \pm 0,469$ %/ngày ($P < 0,05$). Cá được ương nuôi ở độ mặn 25 ‰ đạt tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều dài và khối lượng đặc trưng cao hơn so với ở độ mặn 35 ‰ ($P < 0,05$), lần lượt là $53,30 \pm 2,49$ %, $6,212 \pm 0,044$ % ngày và $16,110 \pm 0,269$ % ngày ở 25 ‰ và $43,41 \pm 2,44$ %, $5,732 \pm 0,063$ % ngày, $12,484 \pm 0,111$ % ngày ở mức độ mặn 35 ‰. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.11

Bảng 3.11. Tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN ở các mức độ mặn khác nhau

Chỉ tiêu \ Độ mặn	20‰	25‰	30‰	35‰	40‰
Chiều dài đầu (mm)	2,77 ± 0,006	2,77 ± 0,005	2,77 ± 0,006	2,77 ± 0,003	2,76 ± 0,004
Chiều dài cuối (mm)	3,37 ± 0,088 ^b	7,03 ± 0,059 ^d	7,32 ± 0,241 ^e	6,56 ± 0,066 ^c	3,00 ± 0,055 ^a
Khối lượng đầu (g)	0,0046	0,0042	0,0044	0,0043	0,0045
Khối lượng cuối (g)	0,0204 ± 0,0007 ^a	0,0479 ± 0,0002 ^c	0,0488 ± 0,0030 ^c	0,0281 ± 0,0004 ^b	0,0188 ± 0,0013 ^a
TLS (%)	25,99 ± 1,15 ^b	53,30 ± 2,49 ^d	58,81 ± 0,95 ^e	43,41 ± 2,44 ^c	18,26 ± 1,63 ^a
SGRL (%ngày)	1,34 ± 0,172 ^b	6,212 ± 0,044 ^d	6,484 ± 0,091 ^d	5,732 ± 0,063 ^c	0,556 ± 0,117 ^a
SGRW (% ngày)	10,266 ± 0,279 ^a	16,110 ± 0,269 ^c	16,048 ± 0,469 ^c	12,484 ± 0,111 ^b	9,674 ± 0,469 ^a

Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình ± sai số chuẩn

Các số liệu mang ký tự chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$.

Độ mặn ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình tiêu hóa noãn hoàng, phát triển và tỷ lệ sống của ấu trùng thông qua sự tiêu hao năng lượng cho quá trình điều hòa áp suất thẩm thấu. Sống trong môi trường có độ mặn quá cao hay quá thấp, cá phải tiêu tốn một lượng lớn năng lượng khoảng 20 – 50%, cho quá trình điều hòa áp suất thẩm thấu, cân bằng nồng độ ion K^+ và Na^+ giữa môi trường bên trong và bên ngoài cơ thể [99].

Chính sự tiêu hao năng lượng này là nguyên nhân làm giảm tốc độ sinh trưởng của cá trong thí nghiệm. Điều này giải thích tại sao cá được nuôi ở độ mặn dưới 20‰ hay trên 35‰ cho tốc độ tăng trưởng thấp hơn so với nuôi ở độ mặn 25, 30 và 35‰.

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng ấu trùng cá khoang cổ là nhóm rộng muối, có khả năng thích ứng với biên độ dao động độ mặn lớn. Trong điều kiện được thuần dưỡng tốt, một số loài cá khoang cổ như *A. ocellaris*, *A. percular* và *A. akallopisos* đã được sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi thành công bằng nguồn nước lợ cửa sông [71, 112]. Khả năng thích ứng với độ mặn của cá khoang cổ nói chung phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loài, giai đoạn phát triển, vùng phân bố tự nhiên, sự thuần dưỡng. Về cơ bản, giai đoạn cá lớn hơn, khả năng thích ứng với độ mặn của cá tốt hơn so với giai đoạn còn nhỏ do tương tự điều kiện tự nhiên. Hà Lê Thị Lộc và cs (2005) cho rằng ngưỡng thích nghi từ 20 - 45‰ ở cá khoang cổ đen đuôi vàng và khoang cổ đỏ thì (có tỷ lệ sống trên 50%) và độ mặn thích hợp nhất cho cá nuôi là từ 25‰ đến 40‰. Nghiên cứu của Dhaneesh (2012) khi nuôi cá khoang cổ *A. akallopisos* giai đoạn ấu trùng cho thấy cá có thể sống ở độ mặn từ 20 – 40 ‰, tỷ lệ sống ở độ mặn 30 ‰ là 100%, ở độ mặn 35 ‰ là 88% và giảm dần ở các mức độ mặn 25, 20‰, ấu trùng cá khoang cổ *A. akallopisos* chết 100% ở độ mặn 55 ‰ [72].

So sánh giữa các mức độ mặn thí nghiệm, mức 40 ‰ là không phù hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển của ấu trùng cá KCYN, ấu trùng cá có tỷ lệ sống thấp, đạt $18,26 \pm 1,63$ %. Kết quả thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của các mức độ mặn khác nhau lên sinh trưởng, phát triển của ấu trùng. Như vậy, có thể thấy độ mặn từ 25 – 35 ‰ phù hợp với ương nuôi ấu trùng cá KCYN.

Thí nghiệm của Trần Văn Phước và cs (2010) cho thấy có thể nuôi ấu trùng cá khoang cổ đỏ ở độ mặn từ 15 - 40‰, tỷ lệ sống của ấu trùng cá $\geq 92\%$ và có tốc độ tăng trưởng gần như nhau, thích hợp nhất là từ 30 - 40‰. Ấu trùng cá chết rải rác đến

hoàn toàn ở độ mặn 5 -10 ‰ [26]. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ mặn lên cá khoang cổ cam cho thấy độ mặn có ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng (0 - 30 ngày tuổi) với khoảng độ mặn tối ưu từ 30 - 35‰ [5].

Độ mặn của môi trường nuôi là một trong những thông số phù hợp hơn ảnh hưởng đến sinh lý cá, điều chỉnh lượng thức ăn và hiệu suất tăng trưởng ở nhiều loài cá. Độ mặn cao hay thấp hơn mức độ mặn của loài làm mất cảm giác ngon miệng và di chuyển, cuối cùng dẫn đến tử vong ở cá con. Ngoài ra, năng lượng tiêu hao nhiều hơn cho việc điều hoà áp suất thẩm thấu sẽ làm cho cá ăn mỗi kém, vận động và phản xạ kém linh hoạt hơn so với các nghiệm thức độ mặn tối ưu. Như vậy, từ nghiên cứu này có thể nhận thấy độ mặn thích hợp nhất cho ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 – 15 ngày tuổi là 25 - 35‰. Các nghiên cứu tiếp theo nên tập trung đánh giá sâu hơn ảnh hưởng của độ mặn đến các chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá và đánh giá khả năng thuần dưỡng loài cá này ở độ mặn thấp hơn nhằm mở rộng phạm vi nuôi cảnh loài cá này ở những nơi xa biển nơi nguồn nước mặn thường hạn chế cả về số lượng và chất lượng.

3.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ lên hiệu quả ương nuôi ấu trùng

Thử nghiệm các mật độ ương khác nhau trong quá trình ương nuôi ấu trùng cá KCYN cho thấy, mật độ ương có ảnh hưởng đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN với xu hướng chung là mật độ càng cao thì các chỉ tiêu sinh trưởng và tỷ lệ sống càng thấp, tuy nhiên, xu hướng này không có sự biến động nhiều ở mật độ nuôi 3 -5 con/L, cá có các chỉ tiêu phát triển tốt nhất ở mật độ nuôi 1 con/L. Ở mật độ 7 con/L, tỷ lệ sống và chất lượng cá (sinh trưởng chiều dài, khối lượng) ấu trùng giảm.

Tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều dài ngày của ấu trùng cá ở 1 con/L, 3 con/L và 5 con/L lần lượt theo cặp là: $58,70 \pm 0,65\%$, $7,515 \pm 1,11\%$ ngày; $62,46 \pm 2,05$, $6,19\%$ ngày và $59,86 \pm 1,43\%$, $5,994 \pm 0,118\%$ ngày, ở cả 3 mật độ này, tỷ lệ sống và tốc độ tăng trưởng chiều dài ngày của ấu trùng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tỷ lệ sống, mức tăng trưởng đặc trưng về chiều dài, khối lượng ngày của ấu trùng cá ở mật độ 7 con/L lần lượt là: $44,98 \pm 1,22\%$, $5,317 \pm 0,190\%$ ngày, $13,757 \pm 0,168\%$ ngày, mức sai khác so với 3 mật độ còn lại có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$). Kết quả thể hiện ở Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá KCYN ở các mật độ ương khác nhau

Chỉ tiêu	Mật độ			
	1 con/L	3 con/L	5 con/L	7 con/L
Chiều dài đầu (mm)	2,58 ± 0,002	2,57 ± 0,004	2,59 ± 0,003	2,58 ± 0,002
Chiều dài cuối (mm)	7,99 ± 0,135 ^c	6,56 ± 0,098 ^b	6,36 ± 0,119 ^b	5,75 ± 0,162 ^a
Khối lượng đầu (g)	0,0046	0,0042	0,0051	0,0049
Khối lượng cuối (g)	0,0564 ± 0,0019 ^c	0,0468 ± 0,0018 ^b	0,0448 ± 0,0014 ^b	0,0345 ± 0,0008 ^a
TLS (%)	58,70 ± 0,65 ^b	62,46 ± 2,05 ^b	59,86 ± 1,43 ^b	44,98 ± 1,22 ^a
SGRL (%ngày)	7,515 ± 1,117 ^c	6,196 ± 0,095 ^b	5,994 ± 0,118 ^b	5,317 ± 0,190 ^a
SGRW (% ngày)	17,145 ± 0,259 ^c	15,959 ± 0,221 ^b	15,492 ± 0,197 ^b	13,757 ± 0,168 ^a

Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình ± sai số chuẩn

Các số liệu mang ký tự chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$.

Có sự sai khác về mức độ tăng trưởng khối lượng ngày giữa cá nuôi 1 con/L với 3 nghiệm thức còn lại, song để nâng cao hiệu quả trong quá trình nuôi dưỡng, ương nuôi ấu trùng cá KCYN ở mật độ 5 con/L là tốt nhất. So với các loài cá kinh tế, mật độ ương nuôi không cao, tuy nhiên đây là loài cá cảnh, cá bố mẹ có tập tính đẻ trứng dính và chăm sóc trứng trong suốt quá trình ấp nở, vì vậy số lượng trứng của mỗi đợt đẻ không nhiều, vì vậy, mật độ ương nuôi ấu trùng cá ở 5 con/L là hoàn toàn phù hợp.

Mật khác ảnh hưởng của mật độ thả đến tăng trưởng phù hợp với quan điểm rằng ở nhiều loài cá nuôi tăng trưởng có liên quan nghịch với mật độ thả và điều này chủ yếu là do các tương tác xã hội, điều này đặc biệt nhất ở cá khoang cổ sống trong các nhóm xã hội dựa trên hệ thống phân cấp kích thước [35, 79, 93]. Cá khoang cổ kiểm soát kích thước và tốc độ tăng trưởng của chúng theo vị trí của chúng trong hệ thống phân cấp nhóm [57, 58].

Hà Lê Thị Lộc và cs (2005), Hồ Sơn Lâm và cs (2016), Chambel (2015) đều nhận thấy ở cá khoang cổ đen đuôi vàng, khoang cổ đỏ và khoang cổ nemo đều có sức sinh trưởng và tỷ lệ sống khi nuôi ấu trùng cá ở mật độ 1-3 con/L cao hơn so với cá nuôi ở mật độ 5 -7 con/L [20, 64, 154]. Tuy nhiên, một số thí nghiệm với điều kiện dinh dưỡng tốt, chế độ chăm sóc hợp lý, mật độ ương của cá khoang cổ có thể lên đến 5-7 con/L [15, 98, 160].

Gia tăng mật độ ương nuôi trên một đơn vị diện tích hay thể tích mà vẫn đảm bảo tốc độ sinh trưởng và tỷ lệ sống là một trong những điểm then chốt để nâng cao năng suất và hiệu quả kinh tế trong nuôi thủy sản [102]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng ương nuôi cá với mật độ quá cao làm giảm sinh trưởng, tỷ lệ sống, hiệu quả sử dụng thức ăn, chất lượng nước; gia tăng tỷ lệ phân đàn, xuất hiện những bất thường về tập tính sống, nhạy cảm với các tác nhân gây căng thẳng, biến động môi trường và dịch bệnh [31]. Ảnh hưởng của mật độ ương lên sinh trưởng và tỷ lệ sống của cá còn phụ thuộc vào loài và giai đoạn phát triển. Việc nghiên cứu xác định mật độ nuôi thích hợp cho từng loài và giai đoạn phát triển cũng như các giải pháp gia tăng mật độ nuôi trong phạm vi cho phép là hết sức có ý nghĩa ở cả góc độ kỹ thuật và kinh tế. Các nghiên cứu tiếp theo nên tập trung vào việc đánh giá sâu hơn ảnh hưởng của mật độ ương đến các giai đoạn lớn hơn thông qua các chỉ tiêu sâu hơn như: sinh lý, sinh hóa, tập tính và hiệu quả sử dụng thức ăn nhằm gia tăng hiệu quả ương nuôi cá.

3.4.4. Thử nghiệm sản xuất giống và ương nuôi ấu trùng cá KCYN

Có 4 cặp cá bố mẹ là kết quả của thử nghiệm các loại thức ăn khác nhau được tiếp tục sử dụng cho thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo cá KCYN tại trại sản xuất giống cá cảnh biển Đường Đệ, phường Vĩnh Hòa, thành phố Nha Trang. Số liệu về kích thước và khối lượng cá bố mẹ thể hiện qua Bảng 3.13

Bảng 3.13. Kích thước, khối lượng cá bố mẹ trong sản xuất giống nhân tạo (n=8)

Giá trị	TL (cm)	BW (g)
Giá trị trung bình±SD	12,41±0,90	48,83±10,85
Min -Max	11,74-14,12	40,14-66,07

Kết quả thử nghiệm sản xuất giống ở quy mô sản xuất tại trại giống từ ngày 2/7/2017 đến 19/9/2017 được thể hiện ở Bảng 3.14

Bảng 3.14. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi ấu trùng cá KCYN

Đợt đẻ	Thời gian	Số trứng (cái)	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ nở (%)	Số lượng ấu trùng (con)	Tỷ lệ sống (%)	Số lượng cá con (con)	Ghi chú
1	15/7/17	780	67,0	84,4	441	45,6	201	Cặp II
2	16/7/17	650	83,8	64,0	349	60,0	209	Cặp III
3	17/7/17	460	73,7	85,0	288	57,0	164	Cặp IV
4	22/7/17	650	74,3	66,7	322	58,0	187	Cặp I
5	8/8/17	350	81,9	75,0	215	48,0	103	Cặp II
6	12/8/17	550	74,5	84,2	345	60,0	207	Cặp IV
7	14/8/19	750	85,7	71,0	456	60,0	274	Cặp III
8	28/8/17	560	75,0	72,6	305	58,0	177	Cặp II
9	28/7/17	620	77,4	65,0	312	57,7	180	Cặp I
10	17/1/00	420	93,4	65,0	255	71,0	181	Cặp III
11	19/9/17	450	96,1	58,8	254	42,0	107	Cặp IV
Giá trị trung bình		567	80,2	72,0	322	56,1	181	
Độ lệch chuẩn		138	8,9	9,2	74	8,1	47	
Max		780	96,1	85,0	456	71,0	274	
Min		350	67,0	58,8	215	42,0	103	
Tổng		6.240			3.542		1.990	

Qua bảng 3.13 cho thấy cá bố mẹ có kích thước từ 11,74 đến 14,12 cm, kích thước cá đều lớn hơn kích thước cá thành thực hoàn toàn (7,5cm); khối lượng cá đạt từ 40,14 – 66,07g/cá.

Kết quả từ Bảng 3.14 trong thời gian từ tháng 7 đến tháng 9 năm 2017, 4 cặp cá KCYN bộ mẹ đã sinh sản 11 lần, ấu trùng được ấp nở và ương nuôi đến 15 ngày tuổi.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, với số lượng cặp cá nuôi là 4 cặp (chất lượng tốt), sau 3 tháng nuôi, tỷ lệ đẻ đạt 100%, số lần đẻ 11 đợt. Trung bình mỗi cặp đẻ ~1 đợt/tháng. Số lượng trứng tạo ra là 6.240 trứng (tương ứng với 568 con/ổ trứng). Tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở của trứng trung bình đạt lần lượt là 80,2%, 72% và 56%. Trong đó tỷ lệ thụ tinh cao nhất đạt 96%, thấp nhất 67%; tỷ lệ nở cao nhất đạt 85%, thấp nhất 58%;. Đã có 3.542 ấu trùng đã được ấp nở (trung bình 322 ấu trùng/tổ), cao nhất là 456 ấu trùng/tổ và thấp nhất là 215 ấu trùng/tổ.

Với mật độ ương từ 3-5 con/L, sau 15 ngày nuôi, cá đạt chiều dài từ 8 - 10 mm. Tỷ lệ sống của ấu trùng cao nhất là 71% và thấp nhất là 42% (trung bình 56%), đã có 1.990 con cá KCYN giống 15 ngày tuổi được sản xuất thành công. Kết quả này đã khẳng định được tính ổn định của quy trình kỹ thuật được áp dụng cho sản xuất giống nhân tạo cá KCYN tại các trại giống cá cảnh.

3.5. Thảo luận

Cá cảnh biển bao gồm những loài cá có màu sắc đẹp, độc đáo về hình thái cơ thể, tập tính sống thu hút người chơi thủy sinh vật cảnh. Chúng được nuôi giữ làm cảnh trong các hệ thống bể nuôi nhân tạo nước mặn cho mục đích thư giãn, giải trí cả ở quy mô gia đình và quy mô thương mại [61].

Mỗi năm có tới hơn 46 triệu sinh vật cảnh được khai thác mua bán cho khoảng 2 triệu người nuôi trên toàn thế giới (nhóm cá chiếm tới hơn 20 triệu con, chủ yếu là họ cá thia chiếm gần một nửa), giá trị ước tính cho riêng cá cảnh biển đã đạt gần 300 triệu USD Mỹ. Nhóm cá cảnh biển thường có kích thước nhỏ, màu sắc sắc sỡ, thành phần loài đa dạng, nhu cầu cao tuy nhiên chúng chỉ chiếm 10% giá trị thương mại toàn cầu, còn lại là cá cảnh nước ngọt (90%). Đáng chú ý, trong số này chỉ có 1% số cá cảnh nước mặn có nguồn gốc sinh sản nhân tạo còn lại khai thác từ tự nhiên. Khi sử dụng làm cảnh, cá có giá trị cao hơn nhiều so với làm thực phẩm, cá hoàng đế là một ví dụ, khi làm thức ăn chúng chỉ từ 6,0 - 16,5 USD/kg tuy nhiên khi làm cảnh lại có giá từ 50 – 1.800 USD/kg [63]. Tuy nhiên, ngành công nghiệp thủy sinh vật cảnh phát triển cũng đặt ra nhiều vấn đề liên quan đến cạn kiệt nguồn lợi, phá hủy hệ sinh thái tự nhiên, ảnh hưởng đến đa dạng sinh học, lây nhiễm mầm bệnh. Nuôi trồng thủy sản

được coi là một trong những giải pháp tích cực; trong đó có sản xuất giống nhân tạo, đặc biệt là các loài cá cảnh biển.

Trong các loài cá cảnh biển nhiệt đới, cá khoang cổ là một trong những nhóm được ưa chuộng và nuôi phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới bắt đầu từ năm 1881 [137]. Từ đó, nhiều quốc gia ở Châu Âu đã nghiên cứu và cho sinh sản nhân tạo thành công cá khoang cổ. Đức đã cho sinh sản nhân tạo thành công 5 loài trong điều kiện có hoặc không có hải quỳ [115, 137]. Ở Pháp, từ năm 1983, cá khoang cổ nemo sinh sản nhân tạo và ương nuôi cá con bằng Rotifer Rotifer và Artemia với tỷ lệ sống đạt được dao động từ 5 - 40% [32]. Bỉ và Nga cũng cho sinh sản nhân tạo thành công lần lượt 4 và 5 loài cá khoang cổ [46], Thái Lan cũng đã tiến hành sản xuất giống thành công 7 loài cá khoang cổ [61, 151].

Theo thống kê chưa đầy đủ về thành phần loài cá cá cảnh biển đã sinh sản nhân tạo thành công và đưa vào hệ thống kinh doanh thương mại gồm 85 loài trong đó chiếm nhiều nhất là họ Pomacentridae. Cá khoang cổ có số lượng loài sinh sản nhân tạo thành công trong điều kiện nhân tạo nhiều nhất trong các loài cá cảnh biển (19/28 loài trong giống cá Amphiprion, họ Pomacentridae trong đó có ghi nhận sinh sản nhân tạo ở những khía cạnh nhất định trong đó có KCYN.

Nghiên cứu thử nghiệm sinh sản nhân tạo KCYN của Astakhop D. A. (2002) cho thấy, có thể thực hiện sinh sản nhân tạo và ương nuôi ấu trùng thành cá con thành cá trưởng thành trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Nga là một trong những công bố ít ỏi về đối tượng này trong sinh sản nhân tạo [46]. Tương tự như kết quả đó, Nguyễn Thị Mỹ Ngân (2007) đã thu phôi và cho ấp nở thành công ấu trùng cá KCYN tại Viện HDH đến cá con 4 tháng tuổi đã cung cấp một số thông số cơ bản trong điều kiện nuôi dưỡng ấu trùng và cá con [23]. Các nghiên cứu khác thực hiện tại Thái Lan (Sukjai, 2005, 2006; Rattanayuvakorn, 2005) chủ yếu tập trung vào mô tả sự phát triển phôi và ấu trùng cũng như một số biểu hiện của hiện tượng chuyển đổi giới tính trên tiêu bản mô học tuyến sinh dục của cá [148, 162, 163]. Các nghiên cứu đã cung cấp những dữ liệu cơ bản nhất về đặc điểm phân loại, đặc điểm dinh dưỡng và sinh trưởng như tập tính ăn động vật phù du ở cá giai đoạn ấu trùng và giống, thức ăn cho cá bố mẹ sử dụng trong thời gian dài đó làm thịt tôm hay các giai đoạn phát triển ấu trùng cá qua nhiều giai đoạn do thời gian biến thái ấu trùng dài, hiện tượng chuyển đổi giới tính thể hiện qua 6 giai đoạn của tuyến sinh dục trong đó ở giai đoạn cá nhỏ, toàn bộ cá đều là

cá đực tiền trưởng thành, sau đó phát triển thành cá đực và cái trưởng thành qua sự thoái hóa tuyến sinh dục từ đực sang cái ở giai đoạn cá có kích thước lớn. Các dữ liệu trên là cơ sở khoa học quan trọng cho nhóm đề tài tham khảo và đưa ra một số biện pháp kỹ thuật trong quá trình thực hiện.

Sử dụng các phương pháp nghiên cứu cơ bản truyền thống, thực hiện việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học sinh sản chủ yếu nhằm xác định các chỉ số sinh học sinh sản của cá KCYN, đề tài đã thu được các số liệu về giới tính và tỷ lệ cá lưỡng tính, các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục và tế bào trứng, kích thước thành thực sinh dục lần đầu, hệ số thành thực và mùa vụ sinh sản, sức sinh sản, mối tương quan giữa chiều dài, khối lượng và hệ số thành thực và mô tả tập tính sinh sản, ấp nở, phát triển phôi và ấu trùng của cá KCYN. Đồng thời nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố thức ăn, độ mặn và mật độ đến hiệu quả sinh sản và sinh trưởng của ấu trùng cá KCYN giai đoạn từ 1 đến 15 ngày tuổi.

Kết quả đề tài đã thu được một số số liệu cụ thể và có tính mới trong khoa học và thực tiễn. Đề tài đã xác định được tại vùng vịnh ven biển tỉnh Khánh Hòa, cá KCYN là loài lưỡng tính đồng thời trong suốt vòng đời (tuyến sinh dục lưỡng tính từ giai đoạn I đến giai đoạn VI sau khi cá đẻ). Trong toàn bộ 1.158 mẫu tuyến sinh dục thu được trong thời gian từ 2016 -2018 với chiều dài khai thác của cá KCYN từ 2,5 đến 14,54 cm, khối lượng khai thác từ 0,72 đến 62,59 g, chưa ghi nhận được tuyến sinh dục đơn tính nào của các mẫu nghiên cứu.

Nghiên cứu lần đầu tiên xác định một số chỉ tiêu sinh sản của cá KCYN như kích thước thành thực lần đầu của cá KCYN là 6,37 cm, hệ số GSI của cá KCYN trong năm đạt giá trị cao nhất vào tháng 4, thấp nhất vào tháng 10 với mùa vụ sinh sản chính là tháng 3-5 và mùa phụ tháng 11-12, sức sinh sản tuyệt đối và tương đối của cá cũng như tập tính sinh sản đặc trưng của cá là kết cặp, làm tổ, đẻ trứng dính, thụ tinh và chăm sóc phôi trong quá trình phát đến ấu trùng nở ở cá KCYN tương tự một số loài cá khoang cổ như khoang cổ đỏ, khoang cổ nemo, khoang cổ cam.

Việc thực nghiệm triển khai các loại thức ăn khác nhau, độ mặn và nhiệt độ khác nhau trong nuôi thành thực sinh sản cá nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả sinh sản của cá làm cơ sở đề xuất các biện pháp kỹ thuật phù hợp cho nuôi dưỡng cá bố mẹ. Cần có những nghiên cứu thêm nhằm cải thiện khả năng sinh sản của

cá khoang cổ yên ngựa bố mẹ tập trung vào các giải pháp nâng cao chất lượng dinh dưỡng, bổ sung nguyên tố vi lượng, đồng thời có những biện pháp khắc phục hiện tượng đẻ không đều, hao hụt trứng trong quá trình cá bố mẹ chăm sóc trứng, nâng cao chất lượng trứng và tỷ lệ nở.

Đề tài đã thu được một số kết quả trong nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản và xác định một số giải pháp kỹ thuật phục vụ cho sản xuất giống nhân tạo cá KCYN về sinh học sinh sản và sản xuất giống nhân tạo cá KCYN. Kết quả sản xuất giống nhân tạo từ 4 cặp cá KCYN bố mẹ đã sinh sản 11 đợt, trung bình mỗi cặp đẻ ~1 lần/tháng. Số lượng trứng tạo ra là 6.240 trứng (tương ứng với 568 con/ổ trứng). Đã có 3.542 ấu trùng được ấp nở (trung bình 322 ấu trùng/tổ). Với mật độ ương là 3-5 con/L, sau 15 ngày nuôi, cá đạt chiều dài từ 8 - 10 mm. Tỷ lệ sống trung bình 56%, đã có 1.990 cá KCYN giống 15 ngày tuổi được sản xuất tại trại giống cho thấy tính ổn định của quy trình.

Một số yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả sinh sản của cá KCYN trong điều kiện nhân tạo đã được thử nghiệm song tần suất sinh sản còn hạn chế, tỷ lệ sống của ấu trùng chưa cao. Không chỉ thức ăn, độ mặn, mật độ ảnh hưởng đến ương nuôi ấu trùng cá mà chất lượng thức ăn, các thành phần vi lượng bổ sung trong thức ăn, thời điểm chuyển đổi thức ăn của ấu trùng cũng như một số yếu tố thủy lý, thủy hóa khác đều có thể có ảnh hưởng đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng. Cần tiếp tục các nghiên cứu sâu hơn nhằm cải thiện tỷ lệ sống của cá trong quá trình ương. Các giải pháp nên tập trung vào việc làm giàu thức ăn sống cho Rotifer, Copepoda và Artemia nauplius. Đánh giá ảnh hưởng của thức ăn lên một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa, khả năng chịu sốc của ấu trùng, khả năng tiêu hóa của ấu trùng và cá con ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của ấu trùng. Vì vậy, tiếp tục các thử nghiệm liên quan nhằm nâng cao tỷ lệ sống, chất lượng sinh sản, sinh trưởng của ấu trùng và cá các giai đoạn làm cơ sở cho việc xây dựng quy trình sản xuất giống cá KCYN và cá cảnh biển, góp phần đa dạng hóa đối tượng nuôi, nâng cao hiệu quả kinh tế trong nuôi trồng thủy sản sinh vật cảnh biển.

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1. Kết luận

4.1.1. Một số kết quả đặc điểm sinh học sinh sản cá KCYN

Cá KCYN thuộc nhóm lưỡng tính đồng thời, tuyển sinh dục bao gồm cả sản phẩm sinh dục đực và cái. Tuyển sinh dục cá thành thực không đồng bộ, cá đẻ nhiều lần trong năm; Kích thước thành thực lần đầu của cá KCYN là 6,37 cm, tỷ lệ thành thực 100% ở cá $\geq 7,5$ cm; Hệ số GSI của cá có cao nhất vào tháng 4 ($1,05 \pm 1,31$), thấp nhất vào tháng 10 ($0,28 \pm 0,34$); Mùa vụ sinh sản chính là tháng 3-5 và mùa phụ tháng 11-12. Sức sinh sản tuyệt đối trung bình của cá KCYN là $823,59 \pm 259,80$ trứng/cá, dao động 306-1830 trứng/cá. Sức sinh sản tương đối $42,91 \pm 40,96$ trứng/g cá; dao động từ 10,42 - 316,16 trứng/g cá; Mối tương quan giữa chiều dài và khối lượng cá là tương quan thuận, có hệ số $R^2 = 0,867$.

4.1.2. Tập tính sinh sản, ấp nở, phát triển phôi và ấu trùng cá KCYN

Cá KCYN có hoạt động ve vãn và kết cặp trước khi sinh sản. Trong thời gian đẻ trứng, cá cái bơi chậm, cọ sát mặt bụng nơi có ống dẫn trứng vào bề mặt giá thể. Trứng được đẻ lên bề mặt của giá thể và được sự chăm sóc bởi cả bố và mẹ.

Cá bố mẹ thường dùng miệng nhặt sạch trứng ung và vệ sinh tổ, đồng thời dùng vây bụng và vây ngực quạt trứng và loại bỏ trứng hư ra khỏi tổ.

Quá trình phát triển phôi và biến thái ấu trùng cá KCYN được chia thành các giai đoạn bao gồm: sự thụ tinh và kích hoạt trứng, giai đoạn phân cắt và phôi nang, phôi vị và biệt hóa hình thành cơ quan. Thời gian phát triển phôi của cá KCYN khoảng 7 ngày và 6 giờ sau khi thụ tinh. Quá trình phân cắt phôi của cá KCYN chỉ diễn ra ở cực động vật tương tự như quy luật chung ở các loài cá xương.

4.1.3. Ảnh hưởng của thức ăn, nhiệt độ và độ mặn đến hiệu quả sinh sản

+ Thức ăn phối trộn NT4 (thành phần: bột cá, Cyclop – eeze, bột moi, bột mực, bột gạo, rong biển, Spirulina và men bánh mì, Vitamin premix, Vitamin C, Wheat Gluten, Astaxanthin), là thức ăn tốt nhất cho nuôi sinh sản cá KCYN bố mẹ (tần suất đẻ của cá $0,67 \pm 0,067$ lần/tháng, số lượng trứng 708 ± 71 trứng/tổ, tỷ lệ thụ tinh $72,45 \pm 4,310\%$, tỷ lệ nở $81,33 \pm 4,005\%$). Thức ăn tổng hợp không phù hợp cho nuôi sinh sản cá KCYN.

+ Cá KCYN có khả năng thích nghi và có thể đạt đến trạng thái thành thực hoàn toàn và đẻ trứng ở độ mặn 25 ‰, 29 ‰, 33 ‰ và 37 ‰. Mức độ mặn 29 ‰ và 33‰,

cá có tần suất đẻ, số lượng trứng cao nhất (tần suất đẻ lần lượt là $0,75 \pm 0,046$, $0,71 \pm 0,104$ lần/tháng và 681 ± 34 , 683 ± 57 trứng/tổ). Ở độ mặn 37 ‰, hiệu quả sinh sản của cá bố mẹ thấp nhất ($P \leq 0,05$) với số ấu trùng chỉ 69 ± 14 con, ngoài ra các chỉ số sinh sản khác như số lượng ấu trùng, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở đều thấp nhất so với các mức độ mặn khác.

+ Hiệu quả sinh sản tốt nhất của cá KCYN ở nhiệt độ 27°C . Trong đó các chỉ tiêu: tần suất đẻ, số lượng trứng, số lượng ấu trùng đều cao hơn các nhiệt độ còn lại trong thí nghiệm và có giá trị các chỉ số lần lượt là: $0,83 \pm 0,117$ lần/tháng, 767 ± 47 trứng/tổ, 515 ± 22 con ($P \leq 0,05$). Ở mức nhiệt độ 33°C , đa số các chỉ tiêu sinh sản đều thấp nhất ($P \leq 0,05$) trừ thời gian nở là ngắn nhất ($6,42 \pm 0,21$ ngày).

4.1.4. Hiệu quả ương ấu trùng cá KCYN giai đoạn 1 - 15 ngày tuổi chịu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và mật độ ương

+ Ấu trùng cá được nuôi bằng thức ăn sống với sự kết hợp của nhiều loại thức ăn (Rotifer, Artemia và Copepoda) là tốt nhất cho tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều dài và khối lượng cao lần lượt là: $57,03 \pm 1,07\%$, $7,513 \pm 0,062\%$ ngày và $14,414 \pm 0,2\%$ ngày ($P \leq 0,05$). Không thể sử dụng thức ăn tổng hợp trong ương nuôi ấu trùng cá KCYN giai đoạn từ 1-15 ngày tuổi, cá chết sau 2-3 ngày nuôi.

+ Độ mặn từ 25 – 35 ‰ phù hợp với ương nuôi ấu trùng cá KCYN, ấu trùng cá đạt tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều dài, tốc độ tăng trưởng khối lượng đặc trưng cao nhất ở độ mặn 30‰ lần lượt là $58,81 \pm 0,95\%$ và $6,484 \pm 0,091\%$ /ngày và $16,048 \pm 0,469\%$ /ngày ($P < 0,05$).

+ Ấu trùng cá KCYN phát triển tốt nhất ở mật độ nuôi 1, 3 và 5 con/L, chỉ số tỷ lệ sống và tốc độ tăng trưởng chiều dài ngày của ấu trùng không có sự sai khác ý nghĩa ($P > 0,05$). Không ương nuôi ấu trùng cá KCYN ở mật độ 7 con/L (tỷ lệ sống, mức tăng trưởng đặc trưng về chiều dài, khối lượng ngày của ấu trùng thấp nhất).

4.1.5. Thử nghiệm sản xuất giống nhân tạo và ương nuôi ấu trùng cá KCYN tại cơ sở sản xuất

Kết quả sản xuất giống nhân tạo từ 4 cặp cá KCYN có kích thước từ 11,74 đến 14,12 cm, khối lượng cá đạt từ 40,14 – 66,07g/cá đã sinh sản 11 đợt. Số lượng trứng tạo ra là 6.240 trứng (tương ứng với 568 con/tổ). Đã có 3.542 ấu trùng được ấp nở (trung bình 322 ấu trùng/tổ). Với mật độ ương là 3-5 con/L, sau 15 ngày nuôi, cá giống

đạt chiều dài từ 8 - 10 mm. Tỷ lệ sống trung bình 56%, đã có 1.990 cá KCYN giống 15 ngày tuổi được sản xuất tại trại giống.

4.2. Đề xuất ý kiến

1. Với đa số nhận định về chuyển đổi giới tính của cá khoang cổ, việc xác định hiện tượng lưỡng tính đồng thời của cá KCYN cần tiếp tục nghiên cứu làm rõ để xác định đặc điểm sinh học sinh sản này là đặc điểm loài hay do các yếu tố khác (như vùng phân bố, yếu tố thủy lý, thủy hóa, thủy sinh ...).

2. Nghiên cứu chỉ là những nghiên cứu cơ bản về sản xuất giống cá KCYN trong điều kiện nhân tạo với quy mô còn hạn chế. Cần có những nghiên cứu về khả năng sinh sản của cá KCYN tập trung vào các giải pháp nâng cao chất lượng dinh dưỡng, bổ sung nguyên tố vi lượng, đồng thời có những biện pháp khắc phục hiện tượng đẻ không đều, hao hụt trứng trong quá trình cá bố mẹ chăm sóc trứng, nâng cao chất lượng trứng và tỷ lệ nở nhằm nâng cao hiệu quả và quy mô sản xuất.

3. Ương nuôi cá cảnh biển nói chung, ấu trùng cá KCYN nói riêng còn tồn tại một số hạn chế nhất định về kỹ thuật nhằm hoàn thiện quy trình và nâng cao hiệu quả sản xuất. Cần tiếp tục các nghiên cứu sâu hơn nhằm nâng cao tỷ lệ sống của cá trong quá trình ương. Các giải pháp nên tập trung vào việc làm giàu thức ăn sống cho Rotifer, Copepoda và Artemia nauplius. Đánh giá ảnh hưởng của thức ăn lên một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa, khả năng chịu sốc của ấu trùng, cá con nhằm nâng cao tỷ lệ sống, chất lượng sinh sản, sinh trưởng của ấu trùng và cá các giai đoạn trong ương nuôi cá KCYN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tường Anh (1996), *Sinh học đại cương: Sự đa dạng, sự sinh sản và phát triển của động vật*, Đại học Khoa học tự nhiên.
2. Nguyễn Tường Anh (1999), *Một số vấn đề về nội tiết học sinh sản cá*, Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp, pp. 238.
3. Lê Hoàng Thị Mỹ Dung và Phạm Quốc Hùng (2015), "Sự phát triển noãn sào trong mùa sinh sản của cá chêm mõm nhọn – *Psammoperca waigiensis* (Cuvier, 1828)", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 4, pp. 27-33.
4. Lưu Thị Dung và Phạm Quốc Hùng (2015), *Giáo trình mô phôi học thủy sản*, Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
5. Trần Văn Dũng (2017), "Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá khoang cổ cam *Amphiprion percula* Lacepede, 1802", *Báo cáo khoa học đề tài Nghiên cứu khoa học công nghệ cấp Bộ*.
6. Phạm Thị Minh Giang (1963), Hướng dẫn nghiên cứu cá (chủ yếu cá nước ngọt). (Bản dịch của Pravdin, I. F.), Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, pp. 278.
7. Đào Tấn Hồ, Nguyễn Thị Mỹ Ngân, Hoàng Lê Thanh Huyền và Bùi Quang Nghi (2000), Thành phần cộng sinh giữa hải quỳ và cá khoang cổ, *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị "Biển đông 2000"* Nhà xuất bản Nông nghiệp: Nha Trang.
8. Trần Ngọc Hải, Trần Thanh Phương (2006), *Kỹ thuật sản xuất giống và nuôi cá biển*, Giáo trình Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.
9. Lại Văn Hùng (2004), *Dinh dưỡng và thức ăn trong nuôi trồng thủy sản*, Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
10. Trương Sĩ Kỳ và Hà Lê Thị Lộc (2002), "Một số đặc điểm sinh học sinh sản của cá khoang cổ *Amphiprion clarkii* vùng biển Khánh Hòa", *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị "Khoa học biển Đông - 2002"*, pp. 236-243.
11. Trương Sĩ Kỳ, Lưu Hoàng Đức Lưu, Hoàng Hồ Thị Hoa và Lăng Phạm Vũ Lăng (2012), "Ảnh hưởng của mật độ lên sự sinh trưởng và tỉ lệ sống của cá ngựa vằn (*Hippocampus comes*, Cantor, 1850) ở vùng biển Khánh Hòa", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 10.

12. Hồ Sơn Lâm và Phạm Thị Anh (2016), "Ảnh hưởng của selenium lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và khả năng chịu sốc độ mặn của cá khoang cổ (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830)", *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 43, pp. 89-96.
13. Hà Lê Thị Lộc, Nguyễn Thị Thanh Thủy và Hồ Ngọc Huỳnh (2009), "Quá trình phát triển phôi và biến thái ấu thể của cá khoang cổ Nemo *A. ocellaris* Cuvier 1830 trong điều kiện thí nghiệm", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 9, pp. 103-115.
14. Hà Lê Thị Lộc (2011), "Nghiên cứu công nghệ sản xuất giống và nuôi thương phẩm một số loài cá cảnh có giá trị xuất khẩu". Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ đề tài cấp nhà nước KC.06/06 – 10
15. Hà Lê Thị Lộc (2004), "Một số đặc điểm dinh dưỡng của cá khoang cổ đỏ (*Amphiprion frenatus* Brevoort, 1856) vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa", *Tuyển tập nghiên cứu biển*, XVI.
16. Hà Lê Thị Lộc (2004), "Nghiên cứu đặc điểm sinh học sinh sản cá khoang cổ đỏ (*Amphiprion frenatus* Brevoort, 1856) vùng biển Nha Trang", *Tuyển tập Hội thảo toàn quốc về nghiên cứu và ứng dụng khoa học công nghệ trong nuôi trồng thủy sản*, NXB KHKT, pp. 571 – 576.
17. Hà Lê Thị Lộc (2005), "Nghiên cứu cơ sở sinh học phục vụ cho sinh sản nhân tạo cá khoang cổ (*Amphirion* spp.) vùng biển Khánh Hòa", *Luận án Tiến sĩ Ngư Loại Học*.
18. Hà Lê Thị Lộc, Nguyễn Thị Thanh Thủy và Hồ Ngọc Huỳnh (2009), "Quá trình phát triển phôi và biến thái ấu thể của cá khoang cổ Nemo *A. ocellaris* Cuvier 1830 trong điều kiện thí nghiệm", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 9, pp. 103-115.
19. Hà Lê Thị Lộc và Bùi Thị Quỳnh Thu (2009), "Ảnh hưởng của mật độ nuôi lên tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá khoang cổ đỏ (*Amphiprion frenatus* Brevoort 1856)", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ biển*, 9(1), pp. 69-77.
20. Hà Lê Thị Lộc và Nguyễn Thị Thanh Thủy (2009), "Ảnh hưởng của thức ăn đến tỷ lệ sống và tăng trưởng của cá khoang cổ đỏ (*Amphiprion frenatus* Brevoort 1856) giống", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ biển*, 9(2), pp. 81-89.

21. Lê Thanh Lựu và Trần Mai Thiên (1982), *Xác định các giai đoạn phát dục và nghiên cứu chu kỳ sinh dục cá. (Bản dịch từ tiếng Nga của Xakun, O. F và Buskaia, N. A., 1968)*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, pp. 47.
22. Nguyễn Thị Mỹ Ngân, Bùi Thị Thanh Thủy và Chu Anh Khánh (2007), "Bước đầu nghiên cứu sinh sản cá khoang cổ yên ngựa *Amphiprion polymnus* (linne, 1758) trong điều kiện nuôi nhốt ở bảo tàng hải dương học ", Tuyển tập Báo cáo Hội nghị Quốc gia "Biển Đông-2007", Nha Trang
23. Nguyễn Hữu Phụng (1991), Cá biển quần đảo Trường Sa, *Hội nghị khoa học toàn quốc về biển lần thứ III*, học T.t.b.c.k., Editor: Hà Nội. pp. 217-223.
24. Nguyễn Hữu Phụng, Lê Trọng Phấn, Nguyễn Nhật Thi, Nguyễn Phi Đình, Đỗ Thị Như Nhung và Nguyễn Văn Lực (1995), *Danh mục cá biển Việt Nam tập III*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
25. Trần Văn Phước, Nguyễn Đình Trung, Hà Lê Thị Lộc và Võ Thành Đạt (2010), "Ảnh hưởng của thức ăn và độ mặn đến sinh trưởng và tỷ lệ sống cá khoang cổ đỏ (*Amphiprion frenatus* Brevoort, 1856) (dưới 60 ngày tuổi)", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 1, pp. 87 - 91.
26. Trần Văn Dũng (2017), "Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá khoang cổ cam *Amphiprion percula* Lacepede, 1802", *Báo cáo khoa học đề tài Nghiên cứu khoa học công nghệ cấp Bộ*.
27. Trần Thị Lê Trang (2013), Nghiên cứu sinh sản nhân tạo cá khoang cổ cam *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802), phục vụ nhu cầu nuôi cá cảnh trong nước và xuất khẩu, Trường đại học Nha Trang: Báo cáo đề tài NCKH cấp trường.
28. Nguyễn Văn Tuấn (2019), *Phân tích dữ liệu khoa học với R*, Nhà xuất bản khoa học thành phố Hồ Chí Minh, pp. 517.
29. Mai Thị Yến (2010), *Ảnh hưởng của mật độ và thức ăn lên sinh trưởng và tỷ lệ sống của cá khoang cổ Nemo (Amphiprion ocellaris Cuvier, 1830) giai đoạn 60 – 120 ngày tuổi*. Luận văn Thạc sỹ, Trường Đại học Nha Trang.
30. Alava V.R. và Gomes L.A. (1989), "Breeding marine aquarium animals: the anemonefish", *NAGA, Iclarm*, 12(3), pp. 12 -13.
31. Alayse J.P. (1983), "Application of techniques used for temperate marine fish in breeding *Amphirion ocellaris* Cuvier, 1830", *Proceedings of Marine Aquariology of the Oceanographical Institue*, (10 (5)), pp. 505 – 519.

32. Allen G.R. (1972), *The anemonefishes: their classification and biology*, TFH Publications Inc., Neptune City, New Jersey Google Scholar, USA.
33. Allen G.R. (1980), *Anemonefishes of the World. Handbook for Aquarists, divers, and Scientists*, Rob the Book Man (Vancouver, WA, U.S.A.).
34. Allen G.R. (1991), *Damselfishes of the world.* , Melle, Germany: Mergus Verlag, pp. 171.
35. Allen G.R. (2000), "Family Pomacentridae (Damselfishes)", *Ruffles Bull. Zool*, pp. 626-627.
36. Allen G.R. (2001), "Damselfishes (anemonefishes)", *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific*, 5, pp. 3337-3356.
37. Allen G.R. (2009), *Anemonefishes of the World*, Hawking Books (Corona, CA, U.S.A.).
38. Allen G.R. (2017), *The Anemonefishes of the World: Species, Care, and Breeding : Handbook For Aquarists, Divers, and Scientists*, Discover Books (Toledo, OH, U.S.A.).
39. Allen G.R., Drew J.A. và Kaufman L. (2008), "*Amphiprion barberi*, a new species of anemonefish (Pomacentridae) from Fiji, Tonga, and Samoa", *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 14(3).
40. Allen G.R. và Erdmann M.V. (2012), *Reef Fishes of the East Indies*, Perth, Australia: Trop. Reef Res.
41. Allen G.R., Joshua A.D. và Les K. (2008), "*Amphiprion barberi*, a new species of anemonefish (Pomacentridae) from Fiji, Tonga, and Samoa", *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 14(3), pp. 105-114.
42. Arvedlund M., Bundgaard I. và Nielsen L.E. (2000), "Host imprinting in anemonefishes (Pisces: Pomacentridae): does it dictate spawning site preferences?", *Environmental Biology of Fishes*, 58(2), pp. 203-213.
43. Arvedlund M., McCormick M.I. và Ainsworth T. (2000), "Effects of photoperiod on growth of larvae and juveniles of the anemonefish *Amphiprion melanopus*", *Naga, the ICLARM Quarterly*, 23(2), pp. 18-23.
44. Arvedlund M., McCormick M.I., Fautin D.G. và Bildsoe M. (1999), "Host recognition and possible imprinting in the anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pisces: Pomacentridae)", *Marine Ecology Progress Series*, 188, pp. 207-218.

45. Astakhov D.A. (2002), "Species composition of anemonefishes (Perciformes, Pomacentridae) and their host sea anemones (Cnidaria, Actiniaria) in the Khanhhoa Province (South Vietnam)", *Journal of Ichthyology*, 42(1), pp. 37-50.
46. Astakhov D.A. (2012), "Fauna of anemonefishes (Perciformes, Pomacentridae, Amphiprioninae) and host sea anemones (Cnidaria, Actiniaria) of the Bach Long Vi Island (South China Sea, Gulf of Tonkin, Northern Vietnam)", *Journal of Ichthyology*, 52(9), pp. 661-663.
47. Astakhov D.A. (2015), "Materials on fauna of anemonefishes (Pomacentridae, Amphiprioninae) and their host sea anemones (cnidaria, actiniaria) on reefs of Ly Son Islands (South China Sea, Central Vietnam))", *Journal of Ichthyology*, 55(5), pp. 753-756.
48. Astakhov D.A., Poponov S.Y. và Poponova V.R. (2002), "Scientific Research in Zoological Parks, euro- asian regional association of zoos and aquaria. Moscow zoo", *Government of Moscow*, 14, pp. 145 – 155.
49. Avella M.A., Olivotto I., Gioacchini G., Maradonna F. và Carnevali O. (2007), "The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*", *Aquaculture*, 273(1), pp. 87-95.
50. Baert P., Bosteels T. và Sorgeloos P. (1996), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*.
51. Bell L.J. (1976), "Notes on the nesting success and fecundity of the anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima, Japan", *Japanese Journal of Ichthyology*, 22(4), pp. 207-211.
52. Breen N.E., Bonanno J.A., Hunt S., Grossman J., Brown J., Nolte H. và Rhyne A.L. (2019), "On the half-life of thiocyanate in the plasma of the marine fish *Amphiprion ocellaris*: implications for cyanide detection", *PeerJ*, 7, pp. e6644.
53. Breen N.E., Loewenstein J., Metivier R., Andrade L. và Rhyne A.L. (2018), "Can excreted thiocyanate be used to detect cyanide exposure in live reef fish?", *PLoS One*, 13(5), pp. e0196841.
54. Buston P. (2003), "Forcible eviction and prevention of recruitment in the clown anemonefish", *Behavioral Ecology*, 14(4), pp. 576-582.
55. Buston P. (2003), "Morality is associated with social rank in the clown anemonefish (*Amphiprion percula*)", *Marine Biology*, 143(4), pp. 811-815.

56. Buston P. (2003), "Social hierarchies: size and growth modification in clownfish", *Nature*, 424(6945), pp. 145.
57. Buston P.M. và Elith J. (2011), "Determinants of reproductive success in dominant pairs of clownfish: a boosted regression tree analysis", *J Anim Ecol*, 80(3), pp. 528-38.
58. Cahu C. và Infante J.Z. (2001), "Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae", *Aquaculture*, 200(1-2), pp. 161-180.
59. Calado R., Olivotto I., Oliver M.P. và Holt G.J. (2017), *Marine Ornamental Species Aquaculture*, John Wiley & Sons, pp. 663.
60. Casas L., Saborido-Rey F., Ryu T., Michell C., Ravasi T. và Irigoien X. (2016), "Sex Change in Clownfish: Molecular Insights from Transcriptome Analysis", *Sci Rep*, 6, pp. 35461.
61. Cato J.C. và Brown C.L. (2008), *Marine ornamental species: collection, culture and conservation*, John Wiley & Sons.
62. Chambel J., Severiano V., Baptista T., Mendes S. và Pedrosa R. (2015), "Effect of stocking density and different diets on growth of *Percula Clownfish*, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802)", *SpringerPlus*, 4, pp. 183-183.
63. Chambel J., Severiano V., Baptista T., Mendes S. và Pedrosa R. (2015), "Effect of stocking density and different diets on growth of *Percula Clownfish*, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802)", *Springerplus*, 4, pp. 183.
64. Chavez-Sanchez C., Martinez-Palacios C.A., Martinez-Perez G. và Ross L.G. (2000), "Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther)", *Aquaculture Nutrition*, 6(1), pp. 1-10.
65. Chuah T.S. (2006), "Embryonic development of clownfish *Amphiprion ocellaris* under laboratory conditions", *Journal of Sustainability Science and Management*, 1(1), pp. 64-73.
66. Clipperton J. (2015), "Fishes in Focus: Clownfish", *UltraMarine Magazine*, (51), pp. 72.
67. Daigle G.(1978), *Commercial fish collecting*. Papers and Comments on Tropical Reef Fish, Working Paper No. 34. Sea Grant College Program, University of Hawaii, pp. 13-17.
68. Dhaneesh K.V., Ajith Kumar T.T. và Shunmugaraj T. (2009), "Embryonic development of percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802)", *Middle-east journal of scientific research*, 4(2), pp. 84-89.

69. Dhaneesh K.V., Devi K.N., Kumar T.T.A., Balasubramanian T. và Tissera K. (2012), "Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*", *Journal of King Saud University-Science*, 24(3), pp. 201-209.
70. Dhaneesh K.V., Nanthini D.K., Ajith K.T.T., Balasubramanian T. và Tissera K. (2012), "Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*", *Journal of King Saud University - Science*, 24(3), pp. 201-209.
71. Divya S.P., Kumar T.T.A., Rajasekaran R. và Balasubramanian T. (2011), "Larval rearing of clownfish using *Brachionus plicatilis* rotifer as starter food", *Science Asia*, 37(3), pp. 179-185.
72. Earle K.E. (1995), "The nutritional requirements of ornamental fish", *Veterinary Quarterly*, 17(sup1), pp. 53-55.
73. Emel'yanova N. và Pavlov D.A. (2012), *From oocyte to larva: hormonal induction of oocyte maturation and initial development of coral reef fishes*.
74. Eri I., Yukiko N., Mai H. và Hideaki S. (2008), "Social Environment and Sex Differentiation in the False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris*", *Zoological Science*, 25(2), pp. 123-128.
75. Eryalçın K.M. (2018), "Effects of Different Commercial Feeds and Enrichments on Biochemical Composition and Fatty Acid Profile of Rotifer (*Brachionus Plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia Franciscana*", *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), pp. 81-90.
76. Fautin D.G. (1986), "Why do anemonefishes inhabit only some host actinians?", *Environmental Biology of Fishes*, 15(3), pp. 171-180.
77. Fautin D.G. (1991), *The anemonefish symbiosis: what is known and what is not*.
78. Fautin D.G. (1992), *Anemonefish recruitment: the roles of order and chance*.
79. Fautin D.G. và Allen G.R. (1992), "Field guide to anemonefishes and their host sea anemones", *West. Aust. Mus: Perth*.
80. Frisch A.J. (2004), "Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish", *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14(4), pp. 481-499.
81. Fujita R., Thornhill D.J., Karr K., Cooper C.H. và Dee L.E. (2014), "Assessing and managing data-limited ornamental fisheries in coral reefs", *Fish and Fisheries*, 15(4), pp. 661-675.

82. Furuita H., Hori K., Sugita T. và Yamamoto T. (2007), "Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*", *Aquaculture*, 267(1-4), pp. 55-61.
83. García-Díaz M.M., Tuset V.M., González J.A. và Socorro J. (1997), "Sex and reproductive aspects in *Serranus cabrilla* (Osteichthyes: Serranidae): macroscopic and histological approaches", *Marine Biology*, 127(3), pp. 379-386.
84. Ghiselin M.T. (1969), "The evolution of hermaphroditism among animals", *The Quarterly Review of Biology*, 44(2), pp. 189-208.
85. Gordon A.H. và Hecht T. (2002), *Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning*. Vol. 18.
86. Gordon A.K. (1999), *The effect of diet and age-at-weaning on growth and survival of clownfish *Amphiprion percula* (Pisces: Pomacentridae)*, Rhodes University Grahamstown, South Africa.
87. Gordon A.K., Kaiser H., Britz P.J. và Hecht T. (2000), "Effect of feed type and age-at-weaning on growth and survival of clownfish *Amphiprion percula* (Pomacentridae)", *Aquarium Sciences and Conservation*, 2(4), pp. 215-226.
88. Green B.S. và Fisher R. (2004), "Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299(1), pp. 115-132.
89. Halver J.E. và Hardy R.W. (2013), *Fish nutrition*, Elsevier.
90. Hattori A. (1991), "Socially controlled growth and size-dependent sex change in the anemonefish *Amphiprion frenatus* in Okinawa, Japan", *Japanese Journal of Ichthyology*, 38(2), pp. 165-177.
91. Hattori A. và Yanagisawa Y. (1991), "Life-history pathways in relation to gonadal sex differentiation in the anemonefish, *Amphiprion clarkii*, in temperate waters of Japan", *Environmental Biology of Fishes*, 31(2), pp. 139-155.
92. Hecht T., Uys W. và Britz (1988), "The culture of Sharptooth Catfish, *Clarias gariepinus* in Southern African", *South Africa National Scientific Programme Report*, (153), pp. 47-61.

93. Helfrich P. (1958), *The early life history and reproductive behavior of the maomao, Abudefduf abdominalis (Quoy and Gaimard)*. Ph.D. Dissertation, University of Hawaii, Hono-lulu. 228 pp.
94. Henshaw J.M. (2018), "Protandrous Hermaphroditism", *Springer International Publishing AG 2018* pp. 1-6.
95. Hoff F.H. (1996), *Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish*, Aquaculture Consultants Inc., Florida, USA, pp. 212.
96. Holliday F.G.T. (1969), 4 The Effects of Salinity on the Eggs and Larvae of Teleosts, in: *Fish Physiology*, Hoar W.S. và Randall D.J., Editors., Academic Press. pp. 293-311.
97. Holt G.J. (2011), *Larval fish nutrition*, John Wiley & Sons.
98. Huo J.Z., Nelis H.J., Lavens P., Sorgeloos P. và De Leenheer A.P. (1996), "Determination of vitamin E in aquatic organisms by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Analytical biochemistry*, 242(1), pp. 123-128.
99. Ignatius B., Rathore G., Jagadis I., Kandasamy D. và Victor A.C.C. (2001), "Spawning and larval rearing technique for tropical clown fish *Amphiprion sebae* under captive condition", *Journal of Agriculture in Tropics*, 16(3), pp. 241-249.
100. Izquierdo M.S., Fernandez-Palacios H. và Tacon A.G.J. (2001), "Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish", *Aquaculture*, 197(1-4), pp. 25-42.
101. Jawahar P., Anand C. và Stephen S.J. (2019), Growth and reproductive biology of *Amphiprion sebae* from gulf of Mannar, southeast coast of India, *Asian Pacific Aquaculture 2019 (Aquaculture for Health, Wealth and Happiness)*.
102. Jenkins A., Allen G., Myers R., Yeeting B. và Carpenter K.E. (2017), *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*, © 2017 International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.
103. Johnston G. (2000), *Effect of feeding regimen, temperature and stocking density on growth and survival of juvenile clownfish (Amphiprion percula)*, Rhodes University.
104. Khoo M.L., Das S.K. và Ghaffar M.A. (2018), "Growth pattern, diet and reproductive biology of the clownfish *Amphiprion ocellaris* in waters of Pulau Tioman, Malaysia", *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), pp. 233-239.

105. King M. (2001), *Fisheries biology assessment and management*, Osney, Oxford, England.
106. Kobayashi M. và Hattori A. (2006), "Spacing pattern and body size composition of the protandrous anemonefish *Amphiprion frenatus* inhabiting colonial host anemones", *Ichthyological Research*, 53(1), pp. 1-6.
107. Koskela J., Pirhonen J. và Jobling M. (1997), *Effect of low temperature on feed intake, growth rate and body composition of juvenile Baltic Salmon*. Vol. 5.
108. Kumar T.T.A. và Balasubramanian T. (2009), "Broodstock development, spawning and larval rearing of the false clown fish, *Amphiprion ocellaris* in captivity using estuarine water", *Current Science*, 97(10), pp. 1483-1486.
109. Kuwamura T. và Nakashima Y. (1998), "New aspects of sex change among reef fishes: recent studies in Japan", *Environmental Biology of Fishes*, 52(1-3), pp. 125-135.
110. Langdon C., Clack B. và Önal U. (2007), "Complex microparticles for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and pharmaceuticals to marine fish larvae", *Aquaculture*, 268(1-4), pp. 143-148.
111. Lange F.F. (1989), "Powder processing science and technology for increased reliability", *Journal of the American Ceramic Society*, 72(1), pp. 3-15.
112. Last J.M. (1980), "The food of twenty species of fish larvae in the eastern English Channel and southern North Sea", *Fish. Res. Tech. Rep.*, 60.
113. Laurence W.C. và Briand G. (1990), *Reproduction trong Method for Fish Biology*, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
114. Lindén O., Sharp J.R., Laughlin R. và Neff J.M. (1979), "Interactive effects of salinity, temperature and chronic exposure to oil on the survival and developmental rate of embryos of the estuarine killifish *Fundulus heteroclitus*", *Marine Biology*, 51(2), pp. 101-109.
115. Longhurst A.R. và Pauly D. (1987), *Ecology of Tropical Oceans*, Academic press, San Diego, pp. 407.
116. Lovell T. (1989), *Nutrition and feeding of fish*. Vol. 260. Springer.
117. Luquet P. và Watanabe T. (1986), "Interaction "nutrition-reproduction" in fish", *Fish Physiology and Biochemistry*, 2(1-4), pp. 121-129.

118. Madhu K. và Madhu R. (2006), "Protandrous hermaphroditism in the clown fish *Amphiprion percula* from Andaman and Nicobar islands", *Indian Journal of Fisheries*, 53(4), pp. 373-382.
119. Madhu K. và Madhu R. (2007), "Influence of lunar rhythm on spawning of clown anemone fish *Amphiprion percula* under captive condition in Andaman and Nicobar islands", *J. Mar. Biol. Assoc. India*, 49(1), pp. 58-64.
120. Madhu K., Madhu R., Krishnan L., Sasidharan C.S. và Venugopal K.M. (2006), *Spawning and larval rearing of Amphiprion ocellaris under captive condition*. Vol. 188.
121. Madhu R. và Madhu K. (2012), "Lunar spawning rhythm in orange anemone fish *Amphiprion sandaracinos* (Pomacentridae) under captive condition", *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 27(1-4), pp. 1.
122. Madhu R., Madhu K. và Rethesh T. (2013), "Breeding and seed production of Clown fishes under captivity".
123. Martin B. (2007), "Controlled reproduction and domestication in aquaculture", *Aquaculture Europe*, 32(1), pp. 5-14.
124. Masuda H. (1984), *The fishes of the Japanese Archipelago*, Tokai University Press.
125. Mitcheson Y. và Liu M. (2008), "Functional hermaphroditism in teleosts", *Fish and Fisheries*, 9, pp. 1-43.
126. Moe M.A. (1992), *The Marine aquarium Handbook: Beginner to Breeder*, T.F.H. Publications Inc., Neptune, New Jersey, USA, pp. 318.
127. Mohammadi Zarejabad A., Sudagar M., Pouralimotlagh S. và Bastami K. (2010), "Effects of rearing temperature on hematological and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile", *Comparative Clinical Pathology*, 19, pp. 367-371.
128. Moyer J.T. và Nakazono A. (1978), "Protandrous hermaphroditism in six species of the anemonefish genus *Amphiprion* in Japan", *Japanese Journal of Ichthyology*, 25(2), pp. 101-106.
129. Moyle P.M. và Cech J.J.J. (2000), *Fishes: An Introduction to Ichthyology*, Prentice - Hall, Inc., pp. 611.

130. Nagahama Y., Nakamura M., Kitano T. và Tokumoto T. (2004), "Sexual plasticity in fish: a possible target of endocrine disruptor action", *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 11(1), pp. 73-82.
131. Nakamura M., Kobayashi Y., Miura S., Alam M.A. và Bhandari R.K. (2005), "Sex change in coral reef fish", *Fish Physiol Biochem*, 31(2-3), pp. 117-22.
132. Neugebauer F.A. (1969), "Crystalline tetrazolanyl radical", *Angewandte Chemie International Edition in English*, 8(7), pp. 520-520.
133. Ni I.H. và Kwok K.Y. (1999), "Marine fish fauna in Hong Kong waters", *Zoological studies -Taipei*, 38, pp. 130-152.
134. Ochi H. (1985), "Temporal patterns of breeding and larval settlement in a temperate population of the tropical anemonefish, *Amphiprion clarkii*", *Japanese journal of ichthyology*, 32(2), pp. 248-257.
135. Olivotto I., Buttino I., Borroni M., Piccinetti C.C., Malzone M.G. và Carnevali O. (2008), "The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture", *Aquaculture*, 284(1-4), pp. 211-216.
136. Olivotto I., Capriotti F., Buttino I., Avella A.M., Vitiello V., Maradonna F. và Carnevali O. (2008), "The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth", *Aquaculture*, 274(2-4), pp. 347-352.
137. Pandey A., Kaur V., Srivastava A., Datta S. và Singh A. (2016), *Effect of Formulated Feeds with Different Nutrient Levels on Growth and Reproductive Performance of Molly, Poecilia sphenops (Valenciennes)*. Vol. 16.
138. Patki L.R., Bhalchandra B.L. và Jeevaji I.H.(1989), *An Introduction to microtechnique*, S. Chand & Company, Ltd. Ram Nagar, New Delhi-110055, pp. 28-78.
139. Pitkin L.M. (2001), *Coral Fish*, Smithsonian Institution Press.
140. Pushparaj A. (2010), "Intra specific hybridization between *Amhiprion sebae* and *A. polymnus* under captive conditions", *Int J Biological Technology*, 1, pp. 52-56.

141. Qasim S.Z. (1973), "Some Implications of the Problem of Age and Growth in Marine Fishes from the Indian Waters", *Indian J. Fish*, 20, pp. 351-370.
142. Rattanayuvakorn S., Mungkornkarn P., Thongpan A. và Chatchavalvanich K. (2005), "Embryonic development of saddleback anemonefish, *Amphiprion polymnus*, Linnaeus (1758)", *Kasetsart J (Nat Sci)*, 39, pp. 455-463.
143. Rhyne A.L. và Tlusty M.F. (2012), "Trends in the marine aquarium trade: the influence of global economics and technology", *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux)*, 5(2).
144. Richardson D.L., Harrison P.L. và Harriott V.J. (1997), "Timing of spawning and fecundity of a tropical and subtropical anemonefish (Pomacentridae: Amphiprion) on a high latitude reef on the east coast of Australia", *Marine Ecology Progress Series*, 156, pp. 175-181.
145. Rueger T., Barbasch T.A., Wong M.Y.L., Srinivasan M., Jones G.P. và Buston P.M. (2018), "Reproductive control via the threat of eviction in the clown anemonefish", *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1891), pp. 20181295.
146. Sahandi J. (2011), "Reproduction of Persian Gulf anemone fish (*Amphiprion clarkii*) in captive system", *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 4(5), pp. 704-708.
147. Sales J. và Janssens G.P.J. (2003), "Nutrient requirements of ornamental fish", *Aquatic Living Resources*, 16(6), pp. 533-540.
148. Sammouth S., Roque D.E., Gasset E., Lemarie G., Breuil G., Marino G., Coeurdacier J.L., Fivelstad S. và Blancheton J.P. (2009), "The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system", *Aquacultural Engineering*, 40(2), pp. 72-78.
149. Sang H.M. và Lam H.S. (2016), "Reproductive biology of blue tang fish (*Paracanthurus hepatus* Linnaeus, 1776) in Khanh Hoa seawater, Viet Nam", *Indian Journal of Geo marine science*, 47(4), pp. 839-845.
150. Sang H.M. và Lam H.S. (2018), "Reproductive biology of blue tang fish (*Paracanthurus hepatus* Linnaeus, 1776) in Khanh Hoa seawater, Viet Nam".
151. Sargent J., McEvoy L., Estevez A., Bell G., Bell M., Henderson J. và Tocher D. (1999), "Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions", *Aquaculture*, 179(1), pp. 217-229.

152. Siva M.U. và Haq M.A.B. (2017), "Embryonic development of anemone fishes in captivity", *Journal of Oceanography and Marine Science*, 8(1), pp. 1-13.
153. Skjermo J. và Vadstein O. (1999), "Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae", *Aquaculture*, 177(1-4), pp. 333-343.
154. Sreeraj G. (2002), *Studies on the reproductive biology, Breeding and larval rearing of Selected marine-ornamental fishes Belonging to the family Pomacentridae*, PGPM, Central Marine Fisheries Research Institute.
155. Sukjai R., Pisut M., Amara T. và Kannika C. (2005), "Embryonic development of saddleback anemonefish, *Amphiprion polymnus*, Linnaeus (1758)", *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 39(3), pp. 455-463.
156. Sukjai R., Pisut M., Amara T. và Kannika C. (2006), "Gonadal development and sex inversion in saddleback anemonefish *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758)", *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 40(1), pp. 196-203.
157. Thornhill D.J. (2012), "Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade", *Defenders of Wildlife*, 187.
158. Varghese B., Paulraj R., Gopakumar G. và Chakraborty K. (2009), "Dietary influence on the egg production and larval viability in true Sebae clownfish *Amphiprion sebae* Bleeker 1853", *Asian Fisheries Science*, 22(1), pp. 7-20.
159. Verwey I. (1930), "The Symbiosis between damselfishes and sea anemones in Batavia Bay", *Treubia*, 12, pp. 305-366.
160. Vijayagopal P., Gopakumar G.N. và Vijayan K.K. (2008), "Empirical feed formulations for the marine ornamental fish, striped damsel, *Dascyllus aruanus* (Linné 1758) and their physical, chemical and nutritional evaluation", *Aquaculture research*, 39(15), pp. 1658-1665.
161. Wagner H.P. (2008), "Marine ornamental species. Collection, culture & conservation", *Crustaceana*, 81(2), pp. 255.
162. Warner R.R. (1975), "The adaptive significance of sequential hermaphroditism in animals", *The American Naturalist*, 109(965), pp. 61-82.
163. Warner R.R. (1984), "Mating behavior and hermaphroditism in coral reef fishes", *American Scientist*, 72(2), pp. 128-136.
164. Watanabe T., Kiron V. và Satoh S. (1997), "Trace minerals in fish nutrition", *Aquaculture*, 151(1-4), pp. 185-207.

165. Watanabe T. và Vassallo Agius R. (2003), *Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan*. Vol. 227.
166. Wendy M.N. (2000), "Anemonefish and Their Selection of Host Anemone Species in Captivity", *Bios*, 71(4), pp. 121-126.
167. Wilkerson J.D. (2001), *Clownfishes: A Guide to Their Captive Care, Breeding & Natural History*. Microcosm, TFH Publications Professional Series, Neptune City, NJ.
168. Wood E. (2001), "Global advances in conservation and management of marine ornamental resources", *Aquarium Sciences and Conservation*, 3(1-3), pp. 65-77.
169. Yasir I. và Qin J.G. (2007), "Embryology and early ontogeny of an anemonefish *Amphiprion ocellaris*", *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(4), pp. 1025-1033.
170. Ye L., Yang S.Y., Zhu X.M., Liu M., Lin J.Y. và Wu K.C. (2011), "Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes)", *Acta Ecologica Sinica*, 31(5), pp. 241-245.
171. Yoon Y.S., Rho S., Choi Y.U., Kim J.S. và Lee Y.D. (2005), "Studies on Seed Production of Saddleback Clownfish, *Amphiprion polymnus* Spawning, Egg Development and Larvae Culture", *Journal of Aquaculture*, 18(2), pp. 107-114.
172. Zambonino-Infante J.L. và Cahu C.L. (2010), "Effect of nutrition on marine fish development and quality", *Recent advances in aquaculture research*, pp. 103-124.
173. (<https://www.google.com.vn/search?q=amphiprion+polymnus&sxsrf>
174. (<https://www.iucnredlist.org/IUCN> Red List of Threatened Species I.R.L.