

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



NGUYỄN VĂN AN

**NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỘNG HÀM LƯỢNG HORMONE
STEROID HUYẾT TƯƠNG TRONG CHU KỲ SINH SẢN CÁ DÌA
Siganus guttatus (Bloch, 1787)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Khánh Hòa - 2022

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



NGUYỄN VĂN AN

**NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỘNG HÀM LƯỢNG HORMONE
STEROID HUYẾT TƯƠNG TRONG CHU KỲ SINH SẢN CÁ DÌA
Siganus guttatus (Bloch, 1787)**

Ngành đào tạo: Nuôi trồng Thủy sản

Mã số: 9620301

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS. PHẠM QUỐC HÙNG

Phản biện 1: GS. TS. ĐỖ THỊ THANH HƯƠNG

Phản biện 2: PGS. TS. NGUYỄN TƯỜNG ANH

Phản biện 3: TS. TRƯƠNG QUỐC THÁI

Khánh Hòa – 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan mọi kết quả của đề tài: ***“Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone steroid huyết tương trong chu kỳ sinh sản cá dìa *Siganus guttatus* (Bloch, 1787)”*** là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi và chưa từng được công bố trong bất cứ công trình khoa học nào khác cho tới thời điểm này. Một phần kết quả nghiên cứu trong luận án nằm trong đề tài mã số 106.052017.40 của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED).

Nha Trang, ngày tháng năm 2022

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Nguyễn Văn An

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian thực hiện đề tài, tôi đã nhận được sự giúp đỡ của quý phòng ban trường Đại học Nha Trang, đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi được hoàn thành đề tài. Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.052017.40 đã hỗ trợ một phần kinh phí thực hiện luận án của tôi.

Lời cảm ơn đặc biệt và chân thành nhất tôi muốn giành cho người thầy đáng kính PGS. TS. Phạm Quốc Hùng đã định hướng chuyên môn, hướng dẫn đề tài, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án của mình.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình và tất cả bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Nha Trang, ngày tháng năm 2022

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Nguyễn Văn An

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC VIẾT TẮT.....	vii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Một số đặc điểm sinh học cá dìa	4
1.1.1. Đặc điểm hình thái.....	4
1.1.2. Đặc điểm phân bố.....	4
1.1.3. Đặc điểm môi trường sống	5
1.1.4. Đặc điểm dinh dưỡng	5
1.1.5. Đặc điểm sinh trưởng	6
1.1.6. Đặc điểm sinh sản.....	9
1.2. Tình hình nghiên cứu cá dìa trên thế giới và ở Việt Nam	10
1.2.1. Trên thế giới	10
1.2.2. Tại Việt Nam	13
1.3. Chu kỳ sinh sản tự nhiên ở cá.....	14
1.4. Buồng trứng và sự phát triển của noãn bào	15
1.4.1. Các giai đoạn phát triển của buồng trứng.....	15
1.4.2. Sự phát triển của noãn bào	17
1.5. Tinh sào và sự phát triển của tinh bào	19
1.5.1. Các giai đoạn phát triển của tinh sào.....	19
1.5.2. Các giai đoạn phát triển của tinh bào ở cá xương	20
1.6. Hormone điều khiển chu kỳ sinh sản ở cá.....	21

1.6.1. Hormone phóng thích KDT của não bộ (GnRH)	22
1.6.2. Kích dục tố của tuyến yên (Gonadotropin)	23
1.7. KDT điều khiển chức năng của tinh sào	23
1.7.1. Điều khiển tổng hợp và tiết hormone steroid ở tinh sào	23
1.7.2. Điều khiển quá trình tạo tinh	24
1.8. KDT điều khiển chức năng của buồng trứng	24
1.8.1. Điều khiển tổng hợp và tiết hormone steroid ở nang trứng.....	24
1.8.2. Điều khiển quá trình tạo trứng.....	26
1.9. Hormone steroid của tuyến sinh dục	27
1.9.1. Điều khiển quá trình phát triển tinh sào	27
1.9.2. Điều khiển quá trình phát triển buồng trứng	29
1.10. Hormone steroid trong chu kỳ sinh sản ở một số loài cá biển	29
1.11. Ảnh hưởng của môi trường lên chu kỳ sinh sản của cá.....	32
1.11.1. Nhiệt độ	32
1.11.2. Chu kỳ trăng	32
1.11.3. Độ mặn	33
1.12. Các loại hormone sử dụng trong sinh sản nhân tạo cá	34
1.12.1. Kích dục tố màng đệm nhau thai (hCG).....	34
1.12.2. GnRH-A, chất kháng Dopamin và phương pháp LinPe.....	36
1.12.3. Hormone steroid	38
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	40
2.1. Thời gian, địa điểm và đối tượng nghiên cứu	40
2.2. Phương pháp nghiên cứu	41
2.2.1. Giả thuyết và sơ đồ khối nội dung nghiên cứu.....	41
2.2.1.1. Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu.....	42
2.2.1.2. Bố trí thí nghiệm.....	43
2.2.2. Thu và phân tích mẫu	44
2.2.2.1. Phương pháp thu và cố định mẫu	44

2.2.2.2. Phương pháp xác định các chỉ tiêu sinh học sinh sản	45
2.2.2.3. Phương pháp làm tiêu bản tổ chức tuyến sinh dục và đọc kết quả	45
2.2.2.4. Phương pháp phân tích hàm lượng hormone steroid huyết tương	47
2.2.3. Xác định thành phần sinh hóa trứng cá đũa qua các giai đoạn	52
2.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu	53
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	54
3.1. Sự phát triển của tuyến sinh dục và biến động hàm lượng hormone steroid của cá đũa trong chu kỳ sinh sản	54
3.1.1. Sự phát triển của tuyến sinh dục cá đũa trong chu kỳ sinh sản	54
3.1.1.1. Kích thước đàn cá nghiên cứu	54
3.1.1.2. Sự phát triển của buồng trứng trong chu kỳ sinh sản	54
3.1.1.3. Sự phát triển của tinh sào trong chu kỳ sinh sản	56
3.1.1.4. Hệ số gan (HSI)	58
3.1.1.5. Hệ số thành thực (GSI)	60
3.1.2. Biến động hàm lượng hormone steroid trong huyết tương	64
3.1.2.1. Biến động hàm lượng E2 ở cá cái	64
3.1.2.2. Mối quan hệ giữa E2 với HSI, GSI và sự phát triển của buồng trứng	67
3.1.2.3. Biến động hàm lượng T và 11-KT ở cá đực	68
3.1.2.4. Mối quan hệ giữa T, 11-KT với HSI, GSI và sự phát triển của tinh sào	72
3.2. Ảnh hưởng của hCG, LHRH-A lên hàm lượng E2 và T trong huyết tương	74
3.2.1. Biến động hàm lượng E2 dưới sự ảnh hưởng của hCG và LHRH – A ở cá cái ..	74
3.2.2. Biến động hàm lượng T dưới sự ảnh hưởng của hCG và LHRH – A ở cá đực ..	76
3.3. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên đặc điểm sinh lý sinh sản và thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng cá đũa	77
3.3.1. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên đặc điểm sinh lý sinh sản	77
3.3.1.1. Sức sinh sản	77
3.3.1.2. Kích thước noãn bào của đàn cá thí nghiệm	78

3.3.2. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng cá dĩa	79
3.3.2.1. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa	79
3.3.2.1.1. Thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa ở giai đoạn thành thực và chưa thành thực	79
3.3.2.1.2. Ảnh hưởng của hormone lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa	80
3.3.2.2. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên thành phần sinh hóa của buồng trứng cá dĩa	83
3.3.2.2.1. Thành phần sinh hóa của buồng trứng cá dĩa ở giai đoạn thành thực và chưa thành thực	83
3.3.2.2.2. Ảnh hưởng của hormone lên thành phần sinh hóa trong buồng trứng cá dĩa (giai đoạn IV).....	84
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT.....	87
1. KẾT LUẬN	87
2. ĐỀ XUẤT.....	87
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	90
PHỤ LỤC	I

DANH MỤC VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ	Tiếng Việt (nếu có)
11-KT	11 - Ketotestosterone	
17-MT	17 α - methyltestosterone	
17P	17 α - Hydroxyprogesteron	
17 α ,20 β P	17 α , 20 β P, dihydroxy-4-pregnen-3-one	
20 β -HSD	20 β -hydroxysteroiddehydrogenase	
aa	Amino acid	Axit amin
BW	Body weight	Trọng lượng cơ thể
DA	Dopamineantagonist	Chất kháng Dopamin
DOC	Desoxycorticosterone	
DOCA	Desoxycorticosterone Acetate	
DOM	Domperidone	
Dtn	Determination	Đơn vị định lượng
EIA	EnzymeImmunoassay	
E ₂	Estradiol - 17 β	
ELISA	Emzyme Linked Immunosorbent Assay	Phân tích miễn dịch liên kết men
FSH	Follicle – Stimulating Hormone	Hormon kích thích nang trứng
GnRH	Gonadotropin – Releasing Hormone	Hormon gây phóng thích KDT
GnRH - A	GnRH - Analog	Chất tương tự GnRH
GSI	Gonadosomatic Index	Hệ số thành thực (HSTT)
GnRH-A	GnRH-Analog	Chất tương tự GnRH
GTH	Gonadotropin	Kích dục tố
GTH-I	Gonadotropic hormone - I	Hormon kích dục I
GTH-II	Gonadotropic hormone - II	Hormon kích dục II
GV	Germinal vesicles	Túi mầm
hCG	Human Chorionic Gonadotropin	KDT màng đệm nhau thai người
HSI	Hepatosomatic Index	Hệ số gan
IU	International Unit	Đơn vị quốc tế
KDT		Kích dục tố
L	Length	Chiều dài

LH	Luteinizing Hormone	Hormon hoàng thể hóa
mGnRH	Mammalgonadotropin-releasing hormone	Hormon gây phóng thích KDT trên động vật có vú
LHRH-A	Luteinizing Releasing Hormone Analog lumen	
lu	Maturation-inducing steroid	
MIS	Matured Oocytes	Steroid gây chín
MO	Messenger Ribonucleic acid	Tế bào trứng chín
mRNA		ARN thông tin
NTTS		Nuôi trồng Thủy sản
P	Progesterone	
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotrpine	KDT huyết thanh ngựa chữa
pof	post – ovulatory follicle	Nang trứng tách khỏi tế bào trứng
pvo	previtellogenic oocytes	Tiền tích lũy noãn hoàng
SGnRH	Salmon Gonadotropin – Releasing Hormone	Hormon gây phóng thích KDT trên cá hồi
SPE	Salmon Pituitary Extract	Dịch chiết tuyến yên cá hồi
T	Testosterone	
T3	3,5,3'-triiodo-L-thyronine	
T4	3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine	
TL	Total length	Chiều dài toàn thân
TSD		Tuyến sinh dục
vo	vitellogenic oocytes	Trứng có noãn hoàng
VTG	Vitellogenin	Chất tiền noãn hoàng
W	Weight	Khối lượng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số loại GnRH-A được sử dụng trong sinh sản nhân tạo cá	37
Bảng 2.1. Nồng độ các hormone steroid chuẩn (pg/ml).....	49
Bảng 2.2. Trình tự đưa dung dịch vào các giếng.....	50
Bảng 3.1. Biến động hàm lượng Estradiol 17- β (E_2) (pg/ml) trong huyết tương cá dìa cái sau khi tiêm 1.500 IU hCG/kg và 50 μ g LHRH-A/kg + 5 mg DOM.....	75
Bảng 3.2. Biến động hàm lượng Testosterone (pg/ml) trong huyết tương cá dìa đực sau khi tiêm 1.500 IU hCG/kg và 50 μ g LHRH-A/kg + 5 mg DOM.....	76
Bảng 3.3. Sức sinh sản của đàn cá nghiên cứu theo khối lượng cá cái	77
Bảng 3.4. Kích thước noãn bào đàn cá thí nghiệm.....	78
Bảng 3.5. Thành phần sinh hóa của tinh sào cá dìa 1+ tuổi nuôi trong ao đất tại Khánh Hòa trước khi tiêm kích dục tố	79
Bảng 3.6. Mức độ thành thực của cá dìa đực sau khi tiêm hormone	81
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của hCG lên thành phần sinh hóa tinh sào (Giai đoạn IV-V).....	81
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của LHRH-A + DOM lên thành phần sinh hóa tinh sào (Giai đoạn IV-V).....	82
Bảng 3.9. Thành phần sinh hóa của buồng trứng cá dìa 1+ tuổi nuôi trong ao đất tại Khánh Hòa trước khi tiêm kích dục tố	83
Bảng 3.10. Mức độ thành thực của cá cái sau khi tiêm hormone.....	84
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của hormone lên thành phần sinh hóa trong buồng trứng cá dìa (giai đoạn IV) sau khi tiêm 1.500 IU hCG/kg cá cái.....	85
Bảng 3.12. Biến động thành phần sinh hóa trong buồng trứng cá dìa (giai đoạn IV) sau khi tiêm 50 μ g LHRH-A + 5mg DOM/kg cá cái	86

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Phân bố địa lý của cá dìa trên thế giới.....	4
Hình 1.2. Quá trình phát triển phôi cá dìa	7
Hình 1.3. Sự phát triển ấu trùng cá dìa.....	8
Hình 1.4. Các giai đoạn phát triển chính của tế bào sinh dục ở cá.....	21
Hình 1.5. KDT tuyến yên điều khiển quá trình tiết hormone steroid, phát triển và thành thực tế bào sinh dục ở cá.....	22
Hình 2.1. Hình thái cá dìa.....	40
Hình 2.2. Lồng nuôi giữ cá dìa để thu mẫu	41
Hình 2.3. Sơ đồ khối mô tả các nội dung nghiên cứu của luận án	42
Hình 2.4. Bộ KIT Estradiol, Testosterone và 11-KT ELISA	47
Hình 2.5. Máy ly tâm sử dụng trong nghiên cứu.....	48
Hình 2.6. Cách pha các dung dịch hormone chuẩn ở các nồng độ khác nhau	48
Hình 2.7. Sơ đồ bố trí các giếng	49
Hình 2.8. Đĩa 96 giếng trước và sau khi ủ.....	50
Hình 2.9. Chiết xuất, ủ và đọc mẫu trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm.....	50
Hình 2.10. Đường chuẩn E ₂	51
Hình 2.11. Đường chuẩn T	52
Hình 2.12. Đường chuẩn 11-KT	52
Hình 3.1. Tổ chức buồng trứng đàn cá thí nghiệm.....	55
Hình 3.2. Các giai đoạn phát triển của tinh sào cá dìa	56
Hình 3.3. Buồng sẹ cá dìa ở các giai đoạn phát triển	58
Hình 3.4. Hệ số gan theo tháng thu mẫu.	59
Hình 3.5. Hệ số gan theo các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục.....	60
Hình 3.6. Hệ số thành thực theo tháng thu mẫu	61
Hình 3.7. Hệ số thành thực theo các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục.....	63
Hình 3.8. Biến động hàm lượng E ₂ ở cá cái theo tháng thu mẫu	65

Hình 3.9. Biến động hàm lượng E_2 ở cá cái theo giai đoạn phát triển buồng trứng	66
Hình 3.10. Biến động hàm lượng T và 11-KT ở cá đực theo tháng thu mẫu.....	69
Hình 3.11. Biến động hàm lượng T và 11-KT ở cá đực theo các giai đoạn phát triển của tinh sào	71
Hình 3.12. Hình thái tinh sào cá địa giai đoạn chưa thành thực (B) và thành thực (C)	80
Hình 3.13. Phân loại độ thành thực của buồng trứng cá địa.....	83

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: “Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone steroid huyết tương trong chu kỳ sinh sản cá dìa *Siganus guttatus* (Bloch, 1787)”

Chuyên ngành: Nuôi trồng Thủy sản

Mã số: 9620301

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Văn An

Khóa: 2016

Họ và tên người hướng dẫn: PGS. TS. Phạm Quốc Hùng

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Nội dung đóng góp mới của luận án:

1. Nghiên cứu đã chỉ ra hàm lượng E_2 , T và 11-KT trong huyết tương cá dìa biến động theo chu kỳ sinh sản và có mối quan hệ với các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục, HSI và GSI. Ở cá cái, hàm lượng E_2 đạt giá trị cao nhất (2.305 pg/ml) trong giai đoạn tích lũy chất noãn hoàng (giai đoạn III). Ở cá đực, hàm lượng T và 11-KT trong huyết tương cao nhất được quan sát ở giai đoạn sinh tinh (giai đoạn III) với các giá trị lần lượt là 221,7 pg/ml và 222 pg/ml.

2. Cá dìa là loài đẻ nhiều lần trong năm, mùa sinh sản kéo dài. Tổ chức học tuyến sinh dục không đồng bộ, có nhiều tế bào sinh dục ở các giai đoạn phát triển khác nhau trong cùng một thời điểm. GSI và HSI biến động đáng kể trong chu kỳ sinh sản. Giá trị HSI tăng từ giai đoạn II đến giai đoạn III, sau đó giảm dần từ giai đoạn III đến giai đoạn V. Ngược lại, GSI tăng liên tục từ giai đoạn II đến giai đoạn V.

3. Hai hormone ngoại sinh là hCG và LHRH – A có ảnh hưởng đến hàm lượng E_2 ở cá cái và T ở cá đực. Khi cá được tiêm hai hormone hàm lượng E_2 và T huyết tương tăng lên, thúc đẩy quá trình tạo noãn hoàng ở cá cái và sinh tinh ở cá đực.

4. Khi tiêm hai hormone hCG và LHRH – A, hàm lượng protein, lipid và độ ẩm (ở cá đực); protein và lipid (ở cá cái) có sự biến đổi đáng kể. Khi cá được tiêm hai loại hormone này, hàm lượng protein trong tinh sào và buồng trứng tăng lên sau 12 và 24 giờ. Điều này cho thấy hormone ngoại sinh có ảnh hưởng đến sự thay đổi thành phần sinh hóa tuyến sinh dục, thúc đẩy quá trình thực sinh dục ở cá dìa.

Người hướng dẫn khoa học

(Ký và ghi rõ họ tên)

Nghiên cứu sinh

(Ký và ghi rõ họ tên)

PGS. TS. PHẠM QUỐC HÙNG

NGUYỄN VĂN AN

KEY FINDINGS

Thesis title: "Study on the plasma steroid hormone levels in the reproductive cycle of the rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch, 1787)"

Major: Aquaculture

Major code: 9620301

PhD Student: Nguyen Van An

Period of time: 2016

Science instructor: Assoc. Prof. Ph.D. Pham Quoc Hung

Institution: Nha Trang University

Key findings:

1. The study showed that E₂, T and 11-KT in the blood plasma fluctuated with the reproductive cycle and had a relationship with the developmental stages of the gonads, HSI and GSI. In females, the E₂ concentration reached the highest value (2.305 pg/ml) during the yolk accumulation phase (stage III). In males, the highest plasma concentrations of T and 11-KT were observed during spermatogenesis (stage III) with values of 221.7 pg/ml and 222 pg/ml.

2. Rabbitfish is a species that spawns many times a year, the spawning season is long. The gonadal learning organization is asynchronous, with many sex cells at different stages of development at the same time. GSI and HSI fluctuate significantly during the reproductive cycle. The HSI value increased from stage II to stage III, then gradually decreased from stage III to stage V. In contrast, GSI increased continuously from stage II to stage V.

3. Two exogenous hormones, hCG and LHRH - A, affect the E₂ content in female fish and T in male fish. When fish were injected with two hormones, plasma E₂ and T levels increased, promoting yolk sac formation in female fish and spermatogenesis in male fish.

4. When injecting two hormones hCG and LHRH - A, protein, lipid, and moisture content (male); Protein and lipid (female) had significant variation. When fish were injected with these two hormones, the protein levels in the testes and ovaries increased after 12 and 24 hours. This shows that exogenous hormones affect the change in the biochemical composition of the gonads, promoting sexual maturation in the fish.

Science instructor

Ph.D Student

Assoc. Prof. Ph.D. PHAM QUOC HUNG

NGUYEN VAN AN

MỞ ĐẦU

Nuôi trồng Thủy sản (NTTS) là ngành kinh tế có quy mô và tỷ suất hàng hóa lớn, tham gia sâu vào chuỗi cung ứng toàn cầu, có khả năng cạnh tranh cao và bền vững. Theo Quyết định số 339/QĐ-TTg ngày 11 tháng 3 năm 2021 của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt chiến lược phát triển thủy sản Việt Nam đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045 đã đề ra mục tiêu đến năm 2030, tốc độ tăng trưởng giá trị sản xuất thủy sản đạt 3,0 - 4,0%/năm; tổng sản lượng thủy sản sản xuất trong nước đạt 9,8 triệu tấn; trong đó sản lượng nuôi trồng thủy sản 7,0 triệu tấn, sản lượng khai thác thủy sản 2,8 triệu tấn; Giá trị kim ngạch xuất khẩu thủy sản đạt 14 - 16 tỷ USD. Điều này cho thấy được tầm quan trọng của ngành NTTS trong cơ cấu kinh tế của nước ta. Tuy nhiên, so với một số lĩnh vực khác trong ngành nông nghiệp như chăn nuôi hay thú y, NTTS vẫn còn nhiều hạn chế trong các lĩnh vực nghiên cứu sinh sản nhân tạo và nâng cao chất lượng con giống. Một trong những nguyên nhân chính đã được nhìn nhận là chưa có nhiều công trình nghiên cứu cải tạo nguồn gen và khả năng điều khiển sinh sản trong môi trường nhân tạo vẫn còn hạn chế [186]. Việc phụ thuộc vào con giống hay tế bào sinh dục ngoài tự nhiên có thể dẫn đến nhiều bất cập như không dự báo được sản lượng, không chủ động trong sản xuất, chất lượng không đáng tin cậy và thậm chí là sự lây lan dịch bệnh, dẫn đến không đáp ứng việc phát triển NTTS theo hướng bền vững và quy mô công nghiệp.

Trên thực tế, nhiều loài cá không đẻ được trong điều kiện nuôi nhốt do cá cái không đạt được trạng thái thành thục hoàn toàn, dẫn đến tình trạng không thể chín và rụng trứng, trong khi cá đực chỉ tạo ra rất ít tinh dịch hoặc chất lượng tinh dịch không đảm bảo cho sự thụ tinh [186]. Việc can thiệp bằng các yếu tố môi trường có thể cải thiện đáng kể tỷ lệ đẻ. Tuy nhiên một số loài phải cần đến sự kích thích của các hormone từ bên ngoài mới có thể đạt đến trạng thái thành thục và đẻ trứng [1, 2, 20]. Ở nước ta, việc nuôi vỗ thành thục và kích thích sinh sản nhân tạo các loài cá biển vẫn còn nhiều hạn chế so với cá nước ngọt, tỷ lệ thành thục và tỷ lệ đẻ còn thấp. Một trong những nguyên nhân chính là chưa có các nghiên cứu cơ bản về nội tiết học sinh sản, vì vậy chưa nắm bắt được bản chất và cơ chế tác động của hormone trong quá trình điều khiển sự thành thục và đẻ trứng ở cá dẫn đến việc kích thích cho cá đẻ vẫn chưa đạt được kết quả như mong muốn.

Sự hiểu biết cơ chế tác dụng của các loại hormone trong quá trình thúc đẩy sự thành thực sinh dục và kích thích hoạt động đẻ trứng ở cá là rất quan trọng, cho phép chúng ta xây dựng chiến lược sản xuất giống tốt hơn hoặc có thể cải tiến kỹ thuật sản xuất giống nhân tạo bằng các loại hormone tổng hợp hoặc chiết xuất nhân tạo. Khi sinh sản nhân tạo đã được kiểm soát, chúng ta có thể cung cấp ổn định nguồn giống gần như quanh năm về số lượng và chất lượng và việc cải tiến nguồn gen nhằm nâng cao tốc độ sinh trưởng, tỷ lệ sống và chất lượng thịt là có thể thực hiện được.

Các loài thuộc giống cá dìa *Siganus* chủ yếu phân bố ở vùng nhiệt đới từ Đông Ấn Độ Dương đến Tây Thái Bình Dương. Đây là loài cá biển có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Kết quả phân tích thành phần hóa học trong thịt một loài *Siganid* của Penis và cộng sự (1972) cho thấy hàm lượng protein có trong thịt tương đối cao [153]. Thức ăn chủ yếu của cá dìa là rong biển tự nhiên nhưng trong điều kiện nuôi nhốt thì cá vẫn phát triển tốt khi cho ăn bằng thức ăn công nghiệp. Cá dìa có thể chịu đựng được sự thay đổi độ mặn và nhiệt độ khá rộng nên có thể nuôi cá ở nước lợ, ao hoặc lồng ở biển [37, 115, 186]. Do cá dìa có các đặc điểm thuận lợi trong nuôi thương phẩm nên nó là một đối tượng nuôi thủy sản chủ yếu và tiềm năng đối với một số nước thuộc khu vực Thái Bình Dương [96]. Mặc dù là đối tượng nuôi ngày càng phổ biến và có giá trị kinh tế cao nhưng vấn đề sản xuất giống loài cá này vẫn chưa được giải quyết tốt. Từ năm 1985 đến nay đã có rất nhiều nghiên cứu về sinh sản nhân tạo cá dìa như cho đẻ và ương nuôi ấu trùng cá dìa ở Trung tâm Phát triển nghề cá Đông Nam Á (SEAFDEC), Philippine nhưng tỷ lệ sống rất thấp và chưa thể xây dựng quy trình sản xuất giống loài cá này [96].

Ở nước ta nói riêng và trên thế giới nói chung, việc sản xuất giống cá dìa còn gặp nhiều hạn chế như tỷ lệ đẻ thấp, việc ương nuôi ấu trùng gặp nhiều khó khăn, dẫn đến tỷ lệ sống của ấu trùng không cao, khó đạt được kích thước cá giống. Hiện nay, nghiên cứu về sinh học sinh sản, sinh lý, nội tiết sinh sản và kích thích sinh sản trong điều kiện nuôi nhốt chưa được chú ý đầy đủ [191]. Ngoài ra, việc nghiên cứu về sự thay đổi hàm lượng các hormone steroid trong chu kỳ sinh sản trên cá dìa chưa được thực hiện [5]. Trước bối cảnh đó, đề tài **“Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone steroid huyết tương trong chu kỳ sinh sản cá dìa *Siganus guttatus* (Bloch, 1787)”** đã được thực hiện, nhằm cung cấp dữ liệu khoa học, góp phần hướng đến hoàn thiện quy trình sinh sản nhân tạo và sản xuất giống cá dìa.

Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu tổng quát: Làm rõ sự biến động hàm lượng hormone steroid trong huyết tương cá dĩa *Siganus guttatus* trong chu kỳ sinh sản làm cơ sở cho các nghiên cứu về sinh sản nhân tạo.

Mục tiêu cụ thể:

(1) Làm rõ sự biến động hàm lượng Estradiol 17- β (E_2), Testosterone (T) và 11 – Keto Testosterone (11-KT) trong huyết tương cá dĩa và mối quan hệ của chúng với quá trình phát triển tuyến sinh dục trong chu kỳ sinh sản.

(2) Làm rõ sự biến động hàm lượng E_2 và T dưới ảnh hưởng của hCG và LHRH – A.

(3) Làm rõ sự thay đổi về đặc điểm sinh lý sinh sản và thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng của cá dĩa dưới ảnh hưởng của hCG, LHRH – A.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone E_2 , T và 11-KT trong huyết tương cá dĩa và mối quan hệ của chúng với quá trình phát triển tuyến sinh dục trong chu kỳ sinh sản.

Nội dung 2: Nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone E_2 và T dưới ảnh hưởng của kích dục tổ màng đệm nhau thai người hCG và LHRH – A.

Nội dung 3: Nghiên cứu sự ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên đặc điểm sinh lý sinh sản và thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng cá dĩa.

Ý nghĩa khoa học của nghiên cứu: Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học và làm sáng tỏ hơn việc sử dụng hCG và LHRH – A trong kích thích cá dĩa sinh sản, đồng thời cấp thông tin về phương pháp luận, kiến thức về nội tiết học sinh sản của biển nói chung, đồng thời cũng là tư liệu cho hoạt động đào tạo đại học, sau đại học và các lớp tập huấn cho cán bộ và sinh viên ngành NTTS.

Ý nghĩa thực tiễn của nghiên cứu: Kết quả nghiên cứu của luận án về sự biến động hàm lượng hormone steroid trong chu kỳ sinh sản cá dĩa là cơ sở cho việc xây dựng quy trình nuôi vỗ cá bố mẹ, cho sinh sản nhân tạo giống cá dĩa cũng như các loài cá biển nói chung.

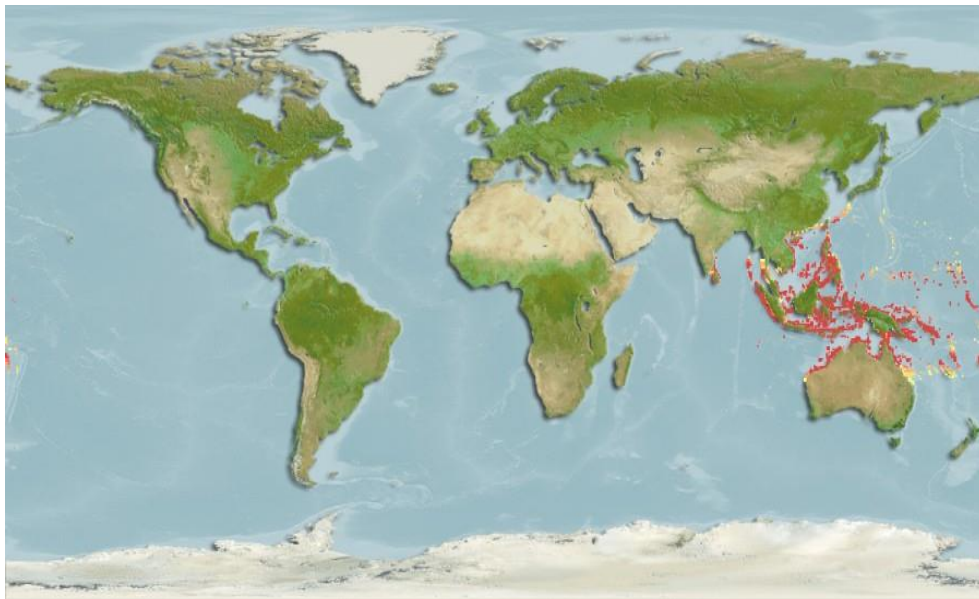
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Một số đặc điểm sinh học cá dìa

1.1.1. Đặc điểm hình thái

Cá dìa có hình bầu dục dài và dẹt hai bên, có vây tròn nhỏ, 2 bên đầu ít nhiều đều có vây, đường bên hoàn toàn. Mỗi bên mõm đều có 2 lỗ mũi, miệng bé. Vây ngực hình tròn, lớn vừa phải. Vây bụng ở dưới ngực. Vây đuôi bằng phẳng hoặc hơi chia thùy. Mảnh có nhiều chấm, có một số sọc xiên hẹp ở bên đầu, sọc từ mép miệng đến dưới mắt là rõ nhất. Đầu cuối của vây lưng có đám sọc màu nhạt. Màu sắc bên ngoài của cá từ màu vàng nhạt đến màu nâu. Cá dìa có 13 tia vây lưng, 7 tia vây hậu môn và 2 tia vây bụng [4].

1.1.2. Đặc điểm phân bố



Hình 1.1. Phân bố địa lý của cá dìa trên thế giới

(Khu vực cá dìa phân bố biểu thị màu đỏ)

(Nguồn: www.fishbase.org)

Về mặt địa lý, cá dìa phân bố ở vùng nhiệt đới, từ vĩ độ 30° Bắc đến 30° Nam, từ đông Ấn Độ Dương đến tây Thái Bình Dương, bao gồm các nước như quần đảo Andaman, Australia, Indonesia, Thái Lan, Malaysia, Singapore, Ryukyus (Nhật Bản), nam và đông nam Trung Quốc, Đài Loan, Philippine và Palau. Ở Việt Nam cá dìa phân bố ở các vùng ven bờ từ vịnh Bắc Bộ đến vịnh Thái Lan, trong đó nhiều nhất tại

các vùng biển Quảng Thái (Thừa Thiên Huế), vùng hạ lưu sông Thu Bồn và các bãi bồi thuộc tỉnh Quảng Nam, vùng hạ lưu sông Hiếu và sông Bến Hải (Quảng Trị).

Về mặt sinh thái, cá dìa thường sống ở vùng cỏ biển hoặc rạn san hô, những nơi có nhiều thức ăn là rong biển hoặc rêu mọc trên đá. Ấu trùng cá dìa có thể được tìm thấy trong khu vực rừng ngập mặn, vịnh nước nông hoặc cửa sông [72].

1.1.3. Đặc điểm môi trường sống

Khu vực phân bố của cá dìa chịu tác động lớn của nhiệt độ. Trong tự nhiên, có thể đánh bắt cá dìa ở các vùng nước có nhiệt độ từ 24 – 28°C. Cá dìa nói chung có thể chịu đựng được sự thay đổi độ mặn và nhiệt độ khá rộng [22, 2]. Cá có thể thích nghi dần dần khi độ mặn thấp xuống 5‰ [70], nhiệt độ 25 - 34°C [45].

Khả năng chịu đựng hàm lượng ôxy hòa tan thấp của cá dìa cũng rất tốt. Tuy nhiên, cá không thể chịu đựng được nếu hàm lượng ôxy hòa tan < 2mg O₂/L [75].

1.1.4. Đặc điểm dinh dưỡng

Ấu trùng cá dìa công mới nở có kích thước nhỏ 1,5 – 1,6 mm ấu trùng mở miệng 36 giờ sau khi nở, bắt đầu tập ăn vào lúc 60 giờ sau khi nở, noãn hoàng bị hấp thụ hoàn toàn khi ấu trùng 70 giờ sau khi nở [21]. Trong ba ngày đầu ấu trùng dinh dưỡng bằng noãn hoàng và giọt dầu, ấu trùng bắt đầu ăn ở 3 ngày sau khi nở ở nhiệt độ 28 – 30°C.

Ở giai đoạn ấu trùng, cá dìa chủ yếu ăn động vật phù du nhưng sang giai đoạn con non và trưởng thành dinh dưỡng hoàn toàn bằng thực vật thủy sinh [118]. Trong tự nhiên, cá dìa thường rĩa thực vật ở đáy biển, đầu chúc xuống dưới và có thể ăn cả ngày lẫn đêm [60]. Các loại rong biển có trong phổ thức ăn của cá dìa bao gồm nhiều loại như *Enteromorpha*, *Chaetomorpha*, *Gracilaria*, *Halophila* và *Cymodocea*.

Giai đoạn con non và trưởng thành: Cũng giống như các loài cá dìa khác, giai đoạn con non và trưởng thành, cá dìa công ăn hoàn toàn thực vật thủy sinh [121]. Chúng ăn bằng cách rĩa thực vật biển, thường gặm chồi non với đầu hướng xuống vào ban ngày và buổi tối [60, 87]. Các loại rong biển ưa thích của cá dìa bao gồm *Enteromorpha*, *Chaetomorpha*, *Gracilaria*, *Halophila* và *Cymodocea*. Cá trưởng thành trong điều kiện nuôi nhốt có thể nuôi bằng thức ăn viên tổng hợp (chứa 42% protein) [66].

Nhiều nghiên cứu về dinh dưỡng của cá dìa được đề cập và đều khẳng định cá dìa cả giai đoạn con non và trưởng thành đều ăn thực vật. Điều này phù hợp với các đặc điểm hình thái cấu tạo cơ quan tiêu hóa của cá dìa (răng và cơ quan tiêu hóa): miệng nhỏ; răng trên mỗi hàm thường nhỏ, tù; răng hầu khá phát triển, thành bao tử

dày, ruột rộng, dài, dày với nhiều nếp gấp [60, 115, 121]. Tuy nhiên, ở giai đoạn ấu trùng, thức ăn chủ yếu của loài cá này là sinh vật phù du, bao gồm cả thực vật và động vật phù du [72].

Phân tích về thành phần thức ăn trong dạ dày của loài *S. spinus* trưởng thành, nhận thấy thành phần thức ăn của loài cá này chủ yếu là tảo đáy như: *Padina*, *Cladophoropsis*, *Gelidium*, *Hypnea*, *Dictyota*, *Sphacelaria*, *Ectocarpus* và *Jania*. Ngoài ra còn 13 loài tảo khác cũng xuất hiện trong dạ dày loài cá này nhưng chúng không phải là những loài chiếm ưu thế. Nghiên cứu về sự lựa chọn thức ăn của cá địa con loài *S. argenteus* và *S. spinus* ở Guam cho thấy chỉ 10 trong số 45 loài tảo ở các vùng rạn san hô được ăn bởi hai loài cá địa này. Chúng đều ưa thích ăn tảo sợi hơn các loài tảo khác. Trong môi trường có nhiều giống tảo mà hai loài cá này ưa thích, chúng sẽ ăn hết loài tảo mà ưa thích nhất sau đó mới chuyển sang loài thứ hai. Thứ tự ưu tiên các loài tảo mà chúng ăn lần lượt là *Enteromorpha*, *Feldmannia*, *Derbesia* và *Cladophoropsis* [117].

Tuy nhiên, một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng cá địa không hoàn toàn chỉ là loài cá ăn thực vật mà chúng có thể sử dụng được một số loại thức ăn khác. Nghiên cứu của Hiatt và Strasburg nhận thấy loài *S. argenteus* có thể sử dụng được thức ăn là thịt cắt nhỏ [61]. Quan sát của cũng cho thấy trong dạ dày của loài *S. lineatus* có một lượng lớn các thành phần thức ăn gồm bọt biển và thịt cá nhỏ [58]. Nhiều tác giả khác cũng bắt gặp một số loại thức ăn ngoài rong tảo trong dạ dày và ống tiêu hóa của cá địa bao gồm: amphipoda, copepoda, bọt biển [47], trùng có lỗ [60], ấu trùng cá, ấu trùng giáp xác, ciliate [83], đôi khi chúng có thể ngẫu nhiên lọt vào hệ thống tiêu hóa của cá địa.

Trong điều kiện nuôi nhốt, loài *S. canaliculatus* được ghi nhận là có thể ăn được tất cả các loại thức ăn được cung cấp như cỏ lươn (*Enhalus sp.*), bọt sắn, cỏ nước ngọt (*Hydrilla sp.*), thức ăn viên của gà, com, bột thịt tôm cá [47]. Hiện tượng này cũng được quan sát trên loài *S. rivulatus* với các loại thức ăn như thịt cá hay động vật thân mềm cắt nhỏ, bột cá, thức ăn viên, rong biển và rau diếp [23, 25]. Do đó, cá địa cho thấy tiềm năng lớn có thể thuần hóa để chuyển sang ăn tạp trong điều kiện nuôi nhốt mặc dù ngoài tự nhiên chúng hầu như chỉ ăn rong tảo. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong nỗ lực sinh sản nhân tạo và sản xuất giống loài cá này trong điều kiện nuôi nhốt [72].

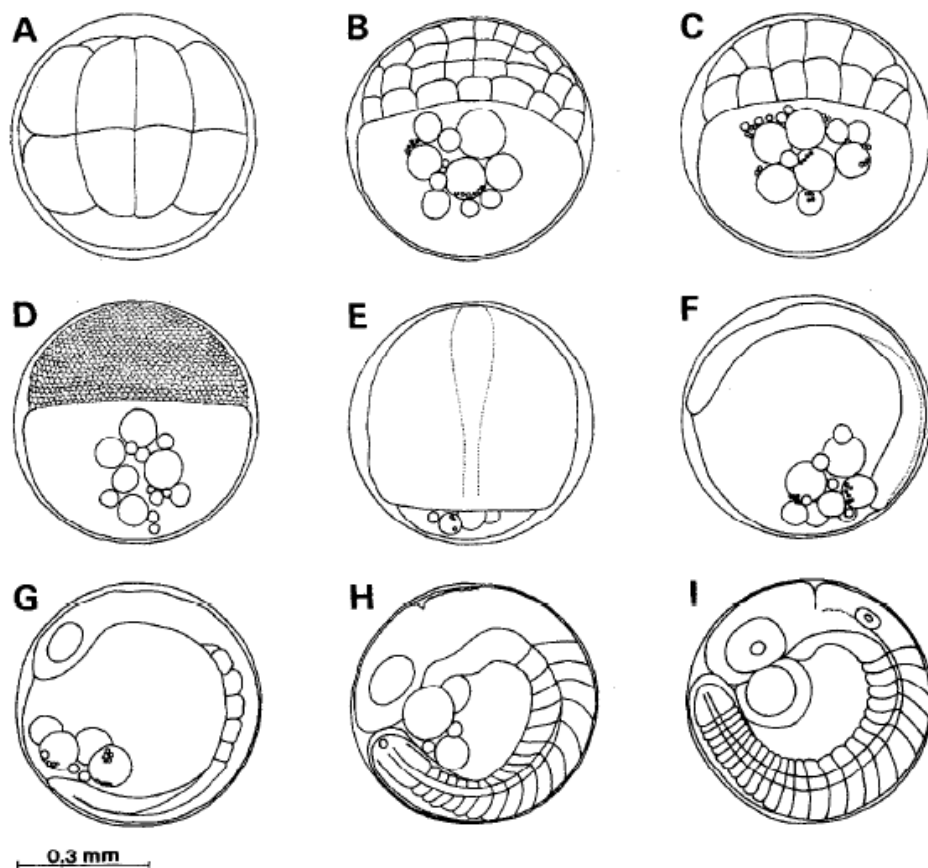
1.1.5. Đặc điểm sinh trưởng

Các thông tin khoa học về sinh trưởng của cá địa trong tự nhiên còn khá ít. Ngoài tự nhiên, cá địa có thể đạt đến kích thước chiều dài 8 cm trong 3 tháng và đến 14 cm

trong vòng 7 – 8 tháng [72]. Khi thử nghiệm trong điều kiện nuôi nhốt cá địa có thể đạt chiều dài tối đa 36 – 38 cm với trọng lượng tương ứng đạt 0,75 – 1,10 kg trong thời gian 320 ngày [118].

Các giai đoạn phát triển phôi:

Trứng cá địa khi chín dạng hình cầu, bám dính mạnh, có nhiều giọt dầu hình cầu, chìm trong nước [106]. Trứng thụ tinh có đường kính $0,56 \pm 0,008$ mm. Giống như hầu hết các loài cá địa khác thời gian phát triển phôi của loài cá địa công phụ thuộc rất vào nhiệt độ, có thể kéo dài 18 - 20 giờ ở nhiệt độ $26 - 28^{\circ}\text{C}$. Theo Kohno và cộng sự, các giai đoạn phát triển phôi của cá địa được tóm tắt như sau (Hình 1.4): giai đoạn 8 tế bào: 30 phút sau thụ tinh (A); giai đoạn 32 tế bào: sau 70 phút (B); giai đoạn túi phôi: sau 85 phút (C); giai đoạn lá phôi: sau 2 giờ (D); giai đoạn bì phôi: sau 5 giờ 45 phút (E); giai đoạn thân phôi: sau 7 giờ (F); giai đoạn 6 đốt sống: sau 7 giờ 40 phút (G); giai đoạn 16 đốt sống: sau 11 giờ 20 phút (H); giai đoạn 24 đốt sống: sau 13 giờ (I) [85].



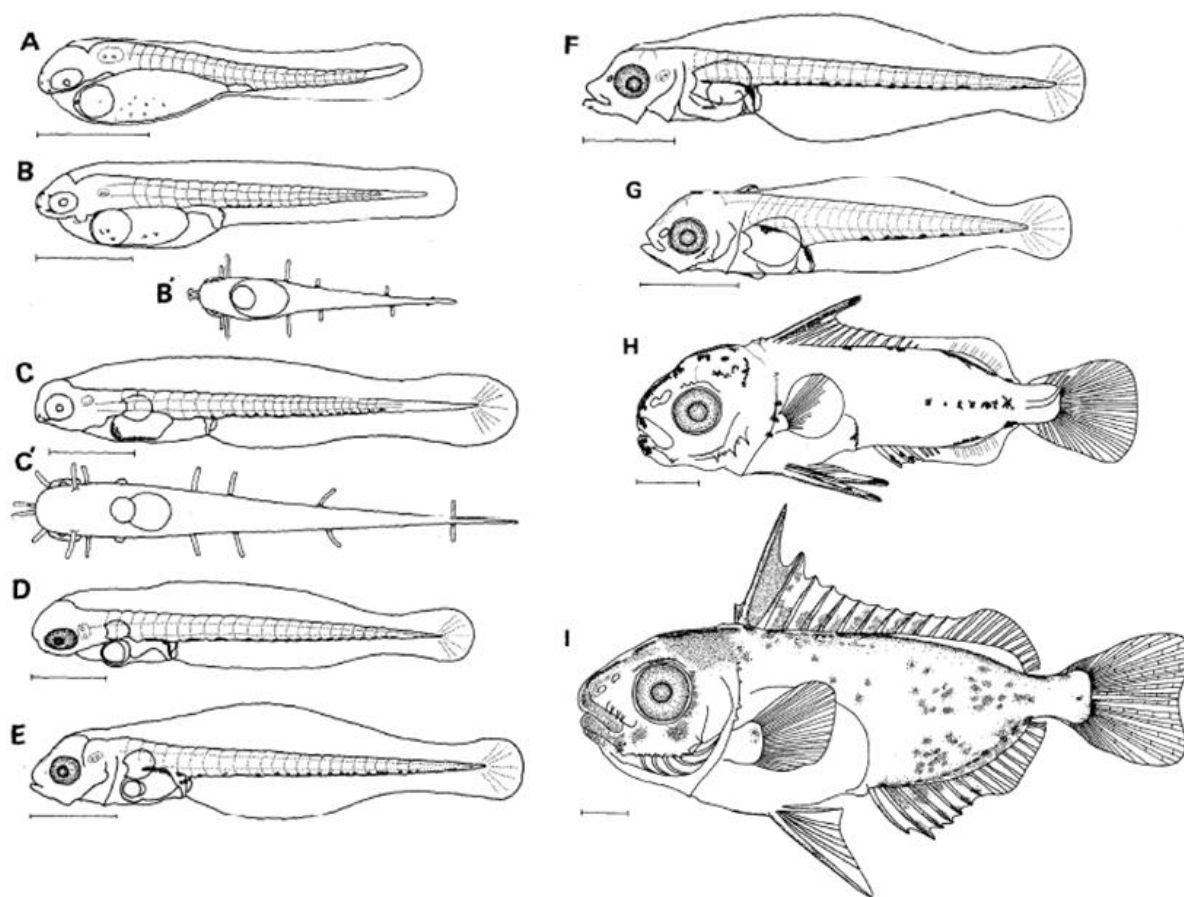
Hình 1.2. Quá trình phát triển phôi cá địa

Giai đoạn 8 tế bào (A); giai đoạn 32 tế bào (B); giai đoạn túi phôi (C); giai đoạn lá phôi (D); giai đoạn bì phôi (E); giai đoạn thân phôi (F); giai đoạn 6 đốt sống (G); giai đoạn 16 đốt sống (H); giai đoạn 24 đốt sống (I) [85]

Các giai đoạn biến thái ấu trùng cá dìa:

Ấu trùng mới nở sống trôi nổi chiều dài cơ thể 1,5 – 1,8 mm với ruột thẳng, mắt không màu, miệng chưa hình thành [62, 117]. Ấu trùng mang khối noãn hoàng hình ovan kích thước 0,7 x 0,24 mm và hai giọt dầu [85]. Ở điều kiện độ mặn 32‰, nhiệt độ 27 – 30° C, noãn hoàng hoàn toàn được sử dụng hoàn toàn sau 3 ngày nở, còn giọt dầu tiêu biến hoàn toàn 4 ngày sau khi nở [20].

Theo Kohno và cộng sự (1986), vây lưng và vây bụng xuất hiện khi ấu trùng có chiều dài toàn thân (TL) 3,39 mm, dây sống cong hoàn tất khi ấu trùng 6,5 mm và hoàn thiện các vây khi ấu trùng dài 8 mm (TL). Hàm và răng hầu bắt đầu phát triển khi ấu trùng đạt 4,0 – 8,0 mm và hoàn thiện biến thái ấu trùng khi đạt 8,0 mm (15 - 16 ngày sau khi nở) đồng thời thay đổi tập tính ăn [85].



Hình 1.3. Sự phát triển ấu trùng cá dìa

A. Ấu trùng mới nở; B. 6 giờ sau khi nở; C. 13 giờ sau khi nở; D. 24 giờ sau khi nở; F. 2 ngày tuổi; G. 8 ngày tuổi; H. 13 ngày tuổi; I. 17 ngày tuổi [85].

1.1.6. Đặc điểm sinh sản

Cá địa đực và cái rất khó phân biệt nếu chỉ dựa vào hình thái ngoài. Tuy nhiên, vào mùa sinh sản có thể quan sát phần bụng để xác định con cái nhờ hình dáng tròn trịa hoặc thăm trứng, còn con đực khi vuốt nhẹ sẽ có sẹ (tinh dịch) màu trắng chảy ra. Bên cạnh đó, những con đực thường nhỏ hơn so với con cái và con cái ít hoạt động hơn so với con đực vào mùa sinh sản. Cá địa có thể thành thực trong điều kiện nuôi nhốt nếu điều kiện môi trường thuận lợi và được cung cấp thức ăn đầy đủ và chất lượng [66, 117].

Chưa có nghiên cứu cụ thể nào về tuổi thành thực của cá địa ngoài tự nhiên nhưng quan sát thấy sự thành thực lần đầu của cá địa cái nuôi nhốt ở cỡ 34 cm (trọng lượng 200 g/con) [117]. Trong điều kiện nuôi nhốt, cá địa đực có thể thành thực ở 10 tháng tuổi với kích thước chiều dài 19 cm, cá cái thành thực ở 12 tháng tuổi với chiều dài 21,5 cm [66].

Trong tự nhiên, sự sinh sản của cá địa có liên quan chặt chẽ với thủy triều, cá thường đẻ vào ban đêm (từ 23 giờ đến 3 giờ sáng trước khi trăng) khi thủy triều xuống ở gần tầng mặt của vùng nước mở [76, 114]. Sức sinh sản của cá địa dao động từ 300.000 đến 400.000 trứng tùy thuộc vào kích thước của cá [80]. Cá địa ở Philipin có thể đẻ quanh năm. Thông tin này chưa được kiểm chứng trong điều kiện Việt Nam. Tuy vậy, việc quan sát thực tế hàng năm cho thấy cá địa con kích thước 1,5 – 2,0 cm thường xuất hiện vào tháng 4 – 5 âm lịch ít nhất tại hai khu vực là phá Tam Giang – Cầu Hai (Thừa Thiên Huế) và đầm Thị Nại (Bình Định).

Trong điều kiện nhân tạo, cá địa thường được kích thích sinh sản bằng liệu pháp hormone. Những con có noãn bào đạt cỡ $\geq 0,46$ mm sẽ đẻ sai khi tiêm hormone với liều 2.000 IU hCG/kg cá; những con có noãn bào $\leq 0,43$ mm không đẻ hoặc chỉ đẻ sau vài lần tiêm [66].

Trứng cá địa thuộc loại trứng dính, hình cầu, có nhiều giọt dầu, chìm trong nước. Các trứng đã thụ tinh có đường kính từ 0,42 – 0,70 mm và mất khoảng 18 – 35 giờ để nở ở nhiệt độ 22 – 30°C [119].

1.2. Tình hình nghiên cứu cá dìa trên thế giới và ở Việt Nam

Cá dìa phân bố ở vùng nhiệt đới từ Đông Ấn Độ Dương đến Tây Thái Bình Dương. Cá dìa là loài cá biển có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Kết quả phân tích thành phần hóa học trong thịt một loài Siganidae của Penis và cộng sự cho thấy hàm lượng protein có trong thịt tương đối cao [153]. Thức ăn chủ yếu của cá dìa là rong biển tự nhiên nhưng trong điều kiện nuôi nhốt thì cá vẫn phát triển tốt khi cho ăn bằng thức ăn nhân tạo. Cá dìa có thể chịu đựng được sự thay đổi độ mặn và nhiệt độ khá rộng [35, 106] nên có thể nuôi cá ở nước lợ, ao hoặc lồng ở biển [186]. Do cá dìa có các đặc điểm thuận lợi trong nuôi thương phẩm nên nó là một đối tượng nuôi thủy sản chủ yếu và tiềm năng đối với một số nước thuộc khu vực Thái Bình Dương [106]. Mặc dù là đối tượng nuôi ngày càng phổ biến và có giá trị kinh tế cao nhưng vấn đề sản xuất giống loài cá này vẫn chưa được giải quyết tốt. Từ năm 1985 đến nay đã có rất nhiều nghiên cứu về sinh sản nhân tạo cá dìa như cho đẻ và ương nuôi ấu trùng cá dìa ở Trung tâm Phát triển Nghề cá Đông Nam Á (SEAFDEC), Philippine nhưng tỷ lệ sống rất thấp và chưa thể xây dựng quy trình sản xuất giống loài cá này [93].

Khánh Hòa và một số tỉnh Nam Trung Bộ có điều kiện tự nhiên thuận lợi như nguồn nước biển luôn trong sạch độ mặn cao ổn định, có nhiều đảo nhỏ, eo vịnh kín gió, diện tích mặt nước ven biển phong phú, người dân có nhiều kinh nghiệm về nuôi hải sản. Đây là điều kiện rất thuận lợi cho sản xuất giống các đối tượng cá biển cũng như phát triển nuôi các đối tượng này nói riêng và hải sản nói chung. Hiện nay, cá dìa cũng được nuôi nhiều ở tỉnh Khánh Hòa, nhưng chỉ là nuôi ghép, nguồn cá dìa giống chủ yếu là từ khai thác tự nhiên, cá nuôi sau 1 năm có thể đạt 0,4 - 0,6 kg, người dân đã nuôi cá dìa từ lâu nhưng chủ yếu dưới hình thức nuôi ghép. Tuy nhiên, việc nuôi cá dìa không ổn định do nguồn giống còn phụ thuộc hoàn toàn vào khai thác tự nhiên.

1.2.1. Trên thế giới

Nghiên cứu sinh sản nhân tạo cá dìa trong điều kiện nuôi nhốt đã được tiến hành từ lâu [113], nhất là sau khi có hội nghị về nuôi cá dìa tại Hawaii năm 1972. Tuy nhiên, việc ương nuôi không thành công từ giai đoạn ấu trùng lên hết giai đoạn biến thái. Hầu hết việc nghiên cứu ấu trùng cá dìa chưa được thành công ở giai đoạn đầu hoặc nếu có thì tỷ lệ sống rất thấp [212]. Một số công trình nghiên cứu báo cáo tỷ lệ sống cho đến khi ấu trùng biến thái hoàn toàn chưa đến 1%. Tỷ lệ sống đạt 9% trên đối

tượng *S. vermiculatus* và thành công nhất trên đối tượng *S. lineatus* [119]. Trong các năm từ 1981 đến 1983, Juario và cộng sự (1985) đã nâng được tỷ lệ sống khi ương nuôi ấu trùng cá địa đến hết giai đoạn biến thái lên từ 1,9% đến 12,8% nhưng kết quả không ổn định. Tác giả không giải thích được vì sao tỷ lệ sống của năm 1982 và 1983 lại kém hơn so năm 1981. Năm 1985, nghiên cứu cho đẻ và ương nuôi ấu trùng cá địa ở Trung tâm Phát triển Nghề cá Đông Nam Á (SEAFDEC) – Indonesia nhưng tỷ lệ sống rất thấp và chưa thể xây dựng quy trình sản xuất giống loài cá này.

Mặc dù cá địa là một đối tượng nuôi ngày càng phổ biến và có giá trị kinh tế cao ở khu vực Đông Nam Á nhưng vấn đề sản xuất giống vẫn chưa được giải quyết tốt. Và đặc biệt hơn là chất lượng ấu trùng có liên quan đến chất lượng trứng. Nếu nâng cao chất lượng trứng sẽ một phần nâng cao chất lượng ấu trùng.

Bên cạnh đó, Vitellogenesis, một giai đoạn phát triển nhanh của trứng ở động vật đẻ trứng, nhằm làm cho tế bào trứng đạt được kích thước tối đa, sau đó là thành thực và rụng trứng dưới sự kích thích của hormone thích hợp. Quá trình này là nhờ sự hấp thu của Vitellogenin (VTG). VTG được tổng hợp từ gan và một phần được chuyển thành các protein của noãn hoàng [49, 224]. Ở một số cá biển đẻ trứng đặc biệt, còn có thêm sự phân cắt protein lòng đỏ trong quá trình trưởng thành noãn bào cuối cùng và sau đó là quá trình hấp thu rõ rệt của nước [64, 65]. Trong quá trình phát triển phôi thai, một lượng lớn các nguồn năng lượng có thể được phân giải nhanh chóng được tích lũy trong tế bào trứng. Đây có thể là kết quả của quá trình thủy phân protein của lòng đỏ [205]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng chất xúc tác cho quá trình phân giải bên trong trứng của VTG là cathepsin D [49, 177, 206].

Cathepsin D (EC 3.4.23) là một endopeptidase aspartic và có phần xúc tác như các aspartic khác với hai axit aspartic tại vị trí hoạt động [202]. Cathepsin D đã được chứng minh là tham gia vào quá trình phân giải protein thông qua lysosome [202]. Cathepsin D ở vị trí cùng với VTG trong các thể không bào (MVB) sau quá trình thực bào. mRNA của cathepsin D biểu hiện ngày càng tăng ở đầu quá trình vitellogenesis cũng như từ điểm mất đến đẻ nở [43]. Gen của cathepsin D đã được tách chiết và giải trình tự từ một số loài động vật có vú [39, 68, 73], ở gà [94] và trong một số loài cá như cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) [43], cá tráp (*Sparus aurata*) [50], cá rô phi (*Tilapia nilotica*) [92], cá bống Nam Cực (*Chionodraco hamatus*) [46], cá ngựa vằn (*Danio rerio*) [176], cá chép (*Cyprinus carpio*) [78], cá trích (*Clupea harengus*) [139], cá nóc (*Takifugu*

rubripes) [105], cá tuyết Đại Tây Dương (*Gadus morhua*) [91] cũng đã khẳng định vai trò quan trọng của cathepsin D đối với quá trình phân giải vitellogenin.

Năm 1991, Ayson đã nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của hCG đến quá trình đẻ trứng của cá dĩa. Theo nghiên cứu này, kích thước noãn bào tối thiểu để cá cái đẻ trứng mà không cần tiêm hormone là 0,46 mm và đối với những cá cái có kích thước noãn bào $\leq 0,45$ mm thì cần thiết phải sử dụng hCG để gây cảm ứng; nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở lần lượt là 96% và 59%, không có sự khác biệt so với cá sinh sản tự nhiên [30]. Hormone tuyến giáp có thể đóng vai trò quan trọng trong thời kỳ đầu phát triển của ấu trùng cá dĩa và Thyroxine là tác nhân giúp nâng cao hormone tuyến giáp ở cá dĩa [31]. Đến năm 2006, nghiên cứu quá trình thành thực của cá dĩa và cho thấy rằng hormone GnRHa có tác dụng tốt trong việc thúc đẩy quá trình sinh tinh ở cá dĩa đực. Gần đây hơn đã có báo cáo ương nuôi được ấu trùng cá dĩa ở Indonesia trong năm 2007 nhưng tỷ lệ sống của quá trình ương nuôi vẫn còn thấp, nhỏ hơn 2% khi ương đến 35 ngày tuổi [152]. Và cũng có nhiều nghiên cứu về hormone để kích thích sinh sản nhân tạo cá dĩa theo ý muốn của mình, tạo tiền đề cho các hướng nghiên cứu mới. Nghiên cứu về mối tương quan giữa hormone steroid trong huyết tương, quá trình sinh noãn hoàng và chu kỳ mặt trăng ở cá dĩa cái. Sự thay đổi hàng tuần của GSI đạt mức cao nhất vào tuần đầu tiên của tháng 6 và tháng 7, đây cũng là khoảng thời gian hình thành tế bào trứng. Các quan sát mô học cho thấy tế bào trứng xuất hiện trở lại sau khi cá sinh sản được một tuần và phát triển đồng bộ, điều này cho thấy đây là loài sinh sản nhiều lần trong năm và sự phát triển tế bào trứng là kiểu đồng bộ theo nhóm [170]. Hormone steroid trong huyết tương và mức sinh noãn hoàng thay đổi song song với những thay đổi trong GSI. Theo kết quả đó, chu kỳ trăng là yếu tố chính trong việc kích thích hoạt động sinh sản ở cá dĩa [170].

Không chỉ có nghiên cứu cá dĩa cái mà cũng có những nghiên cứu về cá dĩa đực, như Garcia (1989) đã chứng minh LHRH-A có hiệu quả trong việc kích thích tiết tinh ở cá dĩa. Ngoài ra, tiêm LHRH-A hàng tuần có thể duy trì sản xuất tinh dịch ở cá dĩa trưởng thành. Trong nghiên cứu GnRHa làm phát triển và trưởng thành các tế bào mầm sinh tinh dẫn đến sự sinh tinh trong tinh hoàn cá dĩa đực [102].

Ngoài các nghiên cứu liên quan tới sinh sản, các nghiên cứu về sinh trưởng và phát triển ở cá dĩa cũng được thực hiện bởi nhiều nhà nghiên cứu khác như các nghiên cứu về tác động của thụ thể melatonin trong các mô thần kinh cá dĩa, nghiên cứu

hormone tăng trưởng ở cá dìa, nghiên cứu biểu hiện của loại II của gen iodothyronine deiodinase trong não cá dìa, nghiên cứu biểu hiện của insulin trong quá trình phát triển của phôi và ấu trùng cá dìa [198]. Từ đó tạo tiền đề cho nghiên cứu chuyên sâu về cá dìa nhằm tạo ra con giống đạt chất lượng tốt nhất.

1.2.2. Tại Việt Nam

Các nghiên cứu về cá dìa ở Việt Nam tương đối ít. Cá dìa được mô tả đặc điểm phân loại và ghi vào danh mục các loài cá biển Việt Nam [21]. Loài cá này được nghiên cứu đặc điểm sinh học sinh sản ở vùng đầm Thị Nại [17]. Nghiên cứu về cá dìa của Lê Văn Dân, Lê Đức Ngoan (2006), thực hiện ở vùng đầm phá Tam Giang – Thừa Thiên Huế là những công trình có giá trị. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong điều kiện nuôi nhốt, chu kỳ phát dục của noãn sào cá dìa không rõ ràng, chỉ bắt gặp cá thành thực vào tháng 3 và 5, tỷ lệ thành thực thấp (8,3%); thời gian thành thực của cá dìa được từ tháng 3 đến tháng 7 năm sau, tỷ lệ thành thực cao vào tháng 3 (72,7%) và 6 (61,5%); cá dìa là loài cá đơn tính, trong cấu trúc tế bào học tuyến sinh dục có nhiều tế bào sinh dục phát triển qua các thời kỳ khác nhau, tế bào trứng chín có kích thước khác nhau chứng tỏ cá đẻ nhiều đợt trong năm và thời gian đẻ kéo dài [6]; tuổi thành thực lần đầu của cá cái cũng như cá đực là 01 năm, khối lượng thành thực trung bình của cá cái là 488,57g và của cá đực là 432,85g, sức sinh sản tuyệt đối của cá cái có trọng lượng từ 386g – 820g dao động từ 551.586 – 1.082.650 trứng/cá thể và sức sinh sản tương đối dao động từ 1.437 – 1.862 trứng/g [7], tỷ lệ thành thực trong 8 tháng (tháng 1 - 8) là rất cao (cá đực >89%, cá cái >96%); ấu trùng nở ra chỉ sống được 3 - 4 ngày, đến ngày thứ 5 tỷ lệ sống chỉ còn 5% và chết hoàn toàn ở ngày thứ 7 [6, 7].

Cá dìa được người dân vùng đầm phá và người nuôi lồng trên biển đưa vào nuôi từ lâu chủ yếu dưới hình thức nuôi ghép. Trong khuôn khổ dự án IMOLA, Trung tâm Khuyến ngư Thừa Thiên – Huế đã thực hiện mô hình nuôi cá dìa kết hợp với rong câu chỉ vàng và tôm sú cho kết quả tốt, là một mô hình mang ý nghĩa lớn về mặt kinh tế - xã hội, có tính thiết thực giúp cho người dân các vùng nuôi tôm sú đang bị ô nhiễm tạo ra hướng đi thích hợp nhằm phát triển kinh tế và phục hồi vùng nuôi. Mô hình còn góp phần đa dạng hoá đối tượng nuôi, khắc phục hiện tượng nuôi tôm thua lỗ kéo dài của người dân một số địa phương [22].

Năm 2007, Trung tâm khuyến ngư Thừa Thiên Huế đã tiến hành thử nghiệm mô hình nuôi cá dìa giống nhân tạo kết hợp với tôm sú (*Penaeus monodon*) và đạt được kết quả tích cực [22]. Mặc dù đã có những nghiên cứu về sức sinh sản nhân tạo và đánh giá chất lượng trứng và tinh trùng để nâng cao chất lượng ấu trùng và con giống nhưng cũng chưa khả thi và chưa có nhiều thành công. Kết quả nghiên cứu của Võ Thị Ngọc Giàu năm 2014 của mình đã xác định thành phần, hàm lượng, nồng độ để tinh trùng hoạt lực tốt nhất khi phóng thích ra môi trường, đã xác định được tỷ lệ pha loãng, pH, nhiệt độ, nồng độ thẩm thấu và nồng độ cation tối ưu cho hoạt lực tinh trùng cá dìa. Kết quả cho thấy, mật độ tinh trùng cá dìa là: $9,60 \pm 1,45$ ($\times 10^9$ tb/ml), độ quán đạt $91,71 \pm 3,35\%$ và hoạt lực tinh trùng tốt nhất ở môi trường có tỷ lệ pha loãng 1:50, pH dao động từ 8,0 - 8,25 và nồng độ thẩm thấu 400 mOsm/kg với thời gian hoạt lực và phần trăm hoạt lực lần lượt là $362,14 \pm 37,8$ giây và $96,29 \pm 1,7\%$ [11].

Mặc dù đã có những nghiên cứu về sức sinh sản nhân tạo cá dìa và đánh giá chất lượng trứng và tinh trùng để nâng cao chất lượng ấu trùng và con giống nhưng cũng chưa khả thi và chưa có nhiều thành công. Năm 2009 - 2013, Phan Văn Út và cộng sự đã nghiên cứu các thông số kỹ thuật, xây dựng quy trình kỹ thuật sản xuất giống nhân tạo và có kết quả cần thiết. Cá dìa có thể kích thích sinh sản bằng hCG hoặc LHRH-A liều lượng tương ứng 2.000 IU hoặc 40 μ g/kg cá cái. Thời gian hiệu ứng từ 40 - 72 giờ, tỷ lệ thụ tinh trung bình trên 80%. Thời gian phát triển phôi từ 16 - 20 giờ, tỷ lệ nở trung bình đạt 85,9%. Tổng số ấu trùng cá qua 16 lần sinh sản đạt 14,37 triệu con. Cá được ương với mật độ 50 - 150 ấu trùng/L [23].

Thức ăn cho ấu trùng cá dìa là vi tảo, luân trùng dòng siêu nhỏ, nauplius copepoda, luân trùng nhỏ, artemia và thức ăn tổng hợp NRD. Sau 55 - 60 ngày ương, cá dìa đạt chiều dài trung bình 2,9 - 3,2 cm. Tỷ lệ sống của cá dìa từ ấu trùng đến cá 3 cm đạt trung bình 0,35%. Các thông số tối ưu cho ương cá dìa giai đoạn giống (2 - 5 cm): thức ăn NRD (3/5), khẩu phần thức ăn 14% khối lượng thân/ngày; mật độ ương tối ưu 2 - 4 con/L, độ mặn 15 - 25‰. Tỷ lệ sống của cá con giai đoạn 5 - 7 cm đạt trung bình 40,70%. Hệ số GSI của cả cá cái và đực dao động từ 7,5 - 8,8% [23].

1.3. Chu kỳ sinh sản tự nhiên ở cá

Ở cá xương, quá trình phát triển tuyến sinh dục trải qua nhiều giai đoạn đặc trưng và chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, độ mặn, chu kỳ

quang, dòng chảy, lượng mưa, nền đáy và thức ăn cũng như chịu sự điều khiển của hệ thần kinh nội tiết bên trong. Cách thức sinh sản, chu kỳ phát triển tuyến sinh dục và tổ chức tuyến sinh dục của chúng khác nhau tùy theo đặc điểm sinh học và môi trường sống của từng loài, tạo nên sự đa dạng giữa các loài. Đối với các loài cá chỉ sinh sản một lần trong năm hay trong đời, tại một thời điểm nhất định trong tuyến sinh dục chỉ tồn tại một giai đoạn phát triển và các tế bào sinh dục thể hiện tính đồng bộ cao. Ngược lại, đối với các loài đẻ nhiều lần trong năm, sự phát triển của tuyến sinh dục khá phức tạp. Trong tuyến sinh dục luôn hiện diện các tế bào sinh dục ở các giai đoạn phát triển khác nhau [20].

Việc hiểu biết quy luật phát triển của tuyến sinh dục trong chu kỳ sinh sản cũng như ảnh hưởng của các yếu tố bên ngoài và bên trong lên quá trình tạo giao tử là rất quan trọng cho công tác quản lý đàn cá bố mẹ. Điều đó giúp người nuôi có thể dự báo và xây dựng chiến lược sản xuất giống nhân tạo thích hợp. Ngoài ra, việc can thiệp hay điều khiển các tác nhân bên ngoài như môi trường hay hormone ngoại sinh có thể góp phần đáng kể trong việc nâng cao tỷ lệ thành thực và tỷ lệ đẻ, phục vụ công tác sản xuất giống nhân tạo.

1.4. Buồng trứng và sự phát triển của noãn bào [18, 19]

Quá trình phát triển tuyến sinh dục cá xương trải qua rất nhiều giai đoạn đặc trưng tuy nhiên có sự khác biệt giữa các loài tùy vào đặc điểm sinh học và môi trường sống của chúng. Hiện nay có khá nhiều quan điểm phân chia các giai đoạn phát triển tuyến sinh dục tùy thuộc vào mức độ chi tiết ở từng giai đoạn hoặc đặc điểm sinh học từng loài. Ở nước ta, sự phát triển tuyến sinh dục cá xương thường được phân chia theo bậc thang 6 giai đoạn [18, 19].

1.4.1. Các giai đoạn phát triển của buồng trứng

Giai đoạn I (giai đoạn còn non): Giai đoạn chưa thành thực thường bắt gặp khi cá cái mới lớn, chưa sinh sản lần đầu. Tuyến sinh dục là những dải mỏng, trong suốt, có khi màu hơi vàng hay hơi hồng, mắt thường không phân biệt được tế bào sinh dục. Ở đa số cá, theo ngoại hình bên ngoài bằng mắt thường thì khó phân biệt được được cái trong giai đoạn này. Tế bào sinh dục là những noãn nguyên bào trong thời kỳ sinh trưởng về nguyên sinh chất và sinh sôi bằng phân bào nguyên nhiễm.

Đây là các noãn nguyên bào tạo nên nguồn dự trữ tế bào sinh dục cho cá sau khi cá đẻ. Thời kỳ này được gọi là thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh chất.

Giai đoạn II (sinh trưởng sinh chất và biến đổi nhân): Giống như ở giai đoạn I, buồng trứng vẫn còn trong suốt và chạy dọc theo buồng trứng là một mạch máu lớn có những nhánh nhỏ. Vào giai đoạn này, buồng trứng cá thường có nhiều mô mỡ và mất dần ở các giai đoạn sau. Đại đa số các tế bào sinh dục trong buồng trứng giai đoạn II là những noãn bào thuộc thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh chất. Cuối giai đoạn II, trong buồng trứng xuất hiện những noãn bào đã kết thúc sinh trưởng về nguyên sinh chất, kích thước của chúng đã lớn đến mức có thể quan sát bằng mắt thường hoặc dưới kính lúp.

Giai đoạn III (tích lũy noãn hoàng): Được xác định là giai đoạn bắt đầu và kết thúc sự tích lũy noãn hoàng hay còn gọi là sự lớn lên về chất dinh dưỡng hay sinh trưởng lần thứ hai. Buồng trứng có sự tăng trưởng mạnh về kích thước. Các tế bào trứng không còn trong suốt mà chuyển sang đục và có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Màu sắc của buồng trứng cũng đậm hơn. Nang trứng được hình thành xung quanh mỗi noãn bào làm nhiệm vụ nội tiết và vận chuyển chất tiền noãn hoàng (VTG). Bên trong buồng trứng có nhiều noãn bào đang trong thời kỳ tích lũy noãn hoàng. Trong các noãn bào, chất dinh dưỡng được tạo ra dưới dạng những giọt mỡ và hạt noãn hoàng. Trong quá trình tích lũy noãn hoàng, kích thước và số lượng các hạt mỡ đều tăng lên. Ngoài các chất dinh dưỡng, trong noãn bào còn xuất hiện các không bào có chứa chất đặc biệt có bản chất là polysaccharide. Đây là giai đoạn khá dài và có nhiều biến đổi phức tạp, vì vậy người ta có thể chia giai đoạn này thành nhiều giai đoạn phụ khác nhau tùy theo tác giả. Trong nhiều trường hợp, khi giai đoạn III kết thúc, sự phát triển của noãn bào có thể bị phong tỏa một thời gian trước khi noãn bào chuyển sang giai đoạn thành thực hoàn toàn.

Giai đoạn IV (di chuyển túi mầm và cực hóa): Đây là giai đoạn kéo dài suốt quá trình di chuyển của nhân (ở giai đoạn này nhân noãn bào còn được gọi là túi mầm) noãn bào từ trung tâm ra ngoại biên tạo nên sự phân cực của noãn bào. Cực động vật là nơi dừng lại của túi mầm ở ngoại biên, ở đó, ngoài túi mầm còn có một phần tế bào chất của noãn bào. Phía đối diện là cực thực vật hay còn gọi là cực sinh dưỡng, chứa toàn bộ khối noãn hoàng. Khi noãn bào chuyển sang pha chín, chất noãn hoàng hợp thành một khối

đồng nhất, nhiều giọt mỡ nhỏ hợp lại thành một hoặc nhiều giọt mỡ lớn hơn. Buồng trứng to và chiếm phần lớn xoang thân. Kích thước của noãn bào tới hạn.

Giai đoạn V (chín và rụng trứng): Đây là giai đoạn rất ngắn, trứng đã chín và rụng. Trứng chín là trứng có túi mầm tan biến và sự rụng trứng là sự tách và vỡ nang trứng để đẩy trứng ra ngoài, rơi vào xoang buồng trứng hoặc xoang thân. Các tế bào trứng trở nên trong suốt. Buồng trứng mềm, nếu vuốt nhẹ ở bụng, trứng có thể chảy ra ngoài qua lỗ sinh dục.

Giai đoạn VI (sau khi cá đẻ): Buồng trứng trở nên mềm, nhão, rỗng và có màu đỏ bầm do sự xuất huyết khi nang trứng vỡ. Nét nổi bật ở giai đoạn này là trong buồng trứng có mặt những nang trứng đã vỡ, các tế bào trứng ở các pha phát triển khác nhau, giống như buồng trứng ở giai đoạn II hoặc III.

1.4.2. Sự phát triển của noãn bào

Noãn bào hay tế bào sinh dục cái là thành phần chủ yếu và chiếm tỷ lệ lớn trong tổ chức buồng trứng. Mức độ phát triển và thành thực của noãn bào là căn cứ để xác định giai đoạn phát triển của buồng trứng. Trong nghiên cứu sinh học sinh sản ở nước ta, bậc thang chín muồi của tuyến sinh dục thường được áp dụng dựa trên các tài liệu hướng dẫn trong và ngoài nước [18, 19]. Trên cơ sở đó, quá trình phát triển của noãn bào cá xương được chia thành 6 thời kỳ đặc trưng hay được gọi là các phase.

Phase 1 (Biến đổi nhân và chất nhiễm sắc): Các noãn bào ưa kiềm mạnh, nhân và nguyên sinh chất đều bắt màu tím của thuốc nhuộm Hematoxyline. Màng nhân bắt màu đậm hơn. Nhân to và nằm giữa tế bào. Xung quanh tế bào được bao bởi một màng mỏng. Đây là các noãn nguyên bào được tạo ra từ các tế bào sinh dục nguyên thủy qua các lần nguyên phân tạo nên nguồn dự trữ để bổ sung nguồn tế bào sinh dục sau khi cá đẻ. Các noãn nguyên bào có những biến đổi đặc trưng và tăng lên về kích thước, biến thành những noãn bào sau này.

Phase 2 (Tiền ngoại vi nhân): Tế bào chất của noãn bào ưa kiềm bắt màu tím bao quanh nhân. Nhân bắt màu tím nhạt hơn và nằm giữa tế bào. Các tế bào ở phase này có hình góc cạnh. Trong nhân xuất hiện các hạch nhỏ bắt màu tím đậm, sắp xếp không theo trật tự. Sự sinh trưởng của tế bào chất làm gia tăng kích thước noãn bào. Thời kỳ này được gọi là thời kỳ sinh trưởng nguyên sinh chất thứ nhất.

Phase 3 (Ngoại vi nhân): Nếu như ở phase tiền ngoại vi nhân, các hạch nhân bắt đầu xuất hiện và sắp xếp không theo trật tự, thì ở phase này, các hạch nhân tăng về số lượng, di chuyển và phân bố ở phía ngoại vi nhân, bao quanh màng nhân. Kích thước hạch nhân dao động trong khoảng 5-7,5 μm . Tế bào chất tiếp tục gia tăng làm cho noãn bào phát triển nhanh về kích thước. Noãn bào có hình tròn hoặc hình góc cạnh cùng với sự xuất hiện nang trứng bao xung quanh. Ở cuối phase này, noãn bào kết thúc quá trình sinh trưởng nguyên sinh chất và đạt kích thước tới hạn trong thời kỳ sinh trưởng thứ nhất.

Phase 4 (Không bào hóa): Bên ngoài tế bào, độ dày của nang trứng tăng lên (nang trứng dày khoảng 3,8-7,5 μm) và bắt đầu xuất hiện màng phóng xạ. Nguyên sinh chất bắt màu tím, nhân hình tròn, bắt màu hồng nhạt và nằm ở giữa. Hạch nhân đã tiêu biến. Nguyên sinh chất không còn là khối đồng nhất do sự xuất hiện của các không bào giống như các hình cầu rỗng với nhiều kích thước khác nhau (5-38 μm). Đầu tiên các không bào xuất hiện phía trong, gần màng nhân, sau đó chúng lan ra khắp nguyên sinh chất. Màng nhân không còn phân biệt rõ như ở phase 1.

Phase 5 (Hình thành hạt noãn hoàng): Thời kỳ này có thể chia thành 3 thời kỳ phụ: Thở noãn hoàng thứ nhất, thứ hai và thứ ba. Ở thời kỳ thứ nhất, các hạt noãn hoàng bắt đầu xuất hiện và phân bố ở quanh màng noãn bào, kích thước các hạt noãn hoàng rất nhỏ. Ở thời kỳ thứ hai, noãn hoàng tiếp tục được tổng hợp và tích lũy, chiếm khoảng một nửa thể tích nguyên sinh chất, các không bào bị dồn về phía nhân. Sang thời kỳ cuối, nguyên sinh chất được lấp đầy bởi các hạt noãn hoàng. Kích thước của các hạt noãn hoàng tăng lên, chúng kết dính lại với nhau thành từng đám. Kết thúc thời kỳ thở noãn hoàng thứ ba cũng là kết thúc quá trình tích lũy noãn hoàng, kích thước noãn bào đạt tới hạn. Ở cuối phase này, các hạt noãn hoàng và các hạt mờ hòa với nhau, tạo thành một khối đồng nhất. Nang trứng dày lên rõ rệt. Vành phóng xạ của nang trứng có thể nhìn thấy rõ qua kính hiển vi và bắt màu tím. Ở cá Chêm Mồm Nhọn, nang trứng có độ dày khoảng 10-15 μm .

Phase 6 (Cực hóa, chín và rụng): Noãn bào đạt kích thước tối đa và đã kết thúc quá trình tích lũy chất noãn hoàng. Nhân co lại, kích thước nhân giảm và bắt đầu di chuyển về cực động vật làm noãn bào phân cực. Màng nhân tiêu biến, dịch nhân chảy ra ngoài hình thành một khối chất nhỏ bắt màu tím nhạt. Nang trứng bắt đầu tách ra khỏi noãn bào, đó là thời kỳ chuẩn bị cho sự rụng trứng. Nang trứng trở lên mỏng

dần. Hiện tượng này có thể giải thích bởi quá trình tăng kích thước mạnh mẽ của khối tế bào chất, trong khi đó màng tế bào vẫn giữ nguyên độ dày.

1.5. Tinh sào và sự phát triển của tinh bào [18, 19]

1.5.1. Các giai đoạn phát triển của tinh sào

Các giai đoạn thành thực của tinh sào người ta xác định theo ngoại hình, kích thước, hệ số thành thực, màu sắc, độ trong, tính đàn hồi và tình trạng của các ống dẫn tinh. Tuy nhiên, để xác định chính xác các giai đoạn phát triển của tinh sào, ngoài các đặc điểm về hình dạng bên ngoài, việc quan sát tổ chức học tinh sào trên kính hiển vi là rất cần thiết. Cũng giống như buồng trứng, sự phân chia các giai đoạn phát triển của tinh sào khác nhau gồm 6 giai đoạn tùy theo đặc điểm từng loài, mức độ chi tiết và phương pháp của tác giả [18].

Giai đoạn I: Ở giai đoạn này, về mặt tổ chức học, tinh bào chưa phát triển. Tuyến sinh dục là những dây mỏng, trong suốt và chưa phân biệt được đực cái. Mạch máu ở đa số các loài cá kém phát triển. Tuyến sinh dục không màu, hơi vàng hay xám. Trong các tinh sào chỉ có các tinh nguyên bào lớn riêng biệt.

Giai đoạn II: Đặc trưng của giai đoạn này là sự có mặt của những tế bào sinh dục ở giai đoạn đầu của quá trình tạo tinh trong trạng thái sinh sôi. Kết quả của quá trình này là tinh sào lớn lên về mặt kích thước, không trong suốt mà trở nên đục. Tinh sào có dạng những giải tròn hay mảnh, thường có màu xám hay hồng nhạt, một số loài có màu đỏ vì có nhiều mạch máu phân bố.

Giai đoạn III: Ở giai đoạn này, tinh sào tăng lên về thể tích. Các ống chứa tinh có đầy các bào nang với những tế bào tinh đang ở những giai đoạn khác nhau của sự tạo tinh. Khoảng trống giữa các ống tinh rất hẹp, vì vậy tinh sào chắc và đàn hồi. Trong tinh sào có các nguyên tinh bào, tinh bào cấp I, cấp II và tinh tử. Cuối giai đoạn này xuất hiện những tinh trùng chín muồi.

Giai đoạn IV: Đây là giai đoạn kết thúc quá trình tạo tinh. Trong các ống sinh tinh chỉ có những tinh trùng chín muồi đi ra khỏi các bào nang và những nguyên tinh bào lớn là nguồn dự trữ cho vụ đẻ sau. Do có nhiều tinh trùng tức là có nhiều tế bào rất nhỏ nên tinh sào có màu trắng sữa. Ở cuối giai đoạn này, tinh trùng dễ dàng theo ống dẫn đổ ra ngoài qua lỗ sinh dục nếu ta vuốt nhẹ ở bụng cá.

Giai đoạn V: Đây là giai đoạn thể hiện tình trạng đang sinh sản của cá đực. Tinh dịch được tạo ra làm loãng khối tinh trùng và làm cho chúng chảy ra ngoài dễ dàng. Tinh sào màu trắng sữa, bụng mềm, vuốt nhẹ hay uốn cong thân cá thấy có sẹ trắng đục chảy ra.

Giai đoạn VI: Là trạng thái cá đực sau khi sinh sản, tinh sào co lại có dạng như một giải mỏng và mềm nhão. Mạch máu mở rộng, tinh sào màu hồng hay nâu. Nếu cắt tinh sào hay vuốt bụng thì có ít nước đục loãng, có thể hơi vàng chảy ra. Sau giai đoạn này, tinh sào trở về giai đoạn II hoặc giai đoạn III.

1.5.2. Các giai đoạn phát triển của tinh bào ở cá xương

Dựa vào sự biến đổi của tế bào sinh dục đực từ những tế bào sinh dục nguyên thủy đến khi thành thực và biệt hóa thành tinh trùng (giao tử), hai tác giả Sakun và Butskaia (1968) đã chia sự phát triển của tế bào sinh dục đực thành các thời kỳ phát triển như sau [15, 17]:

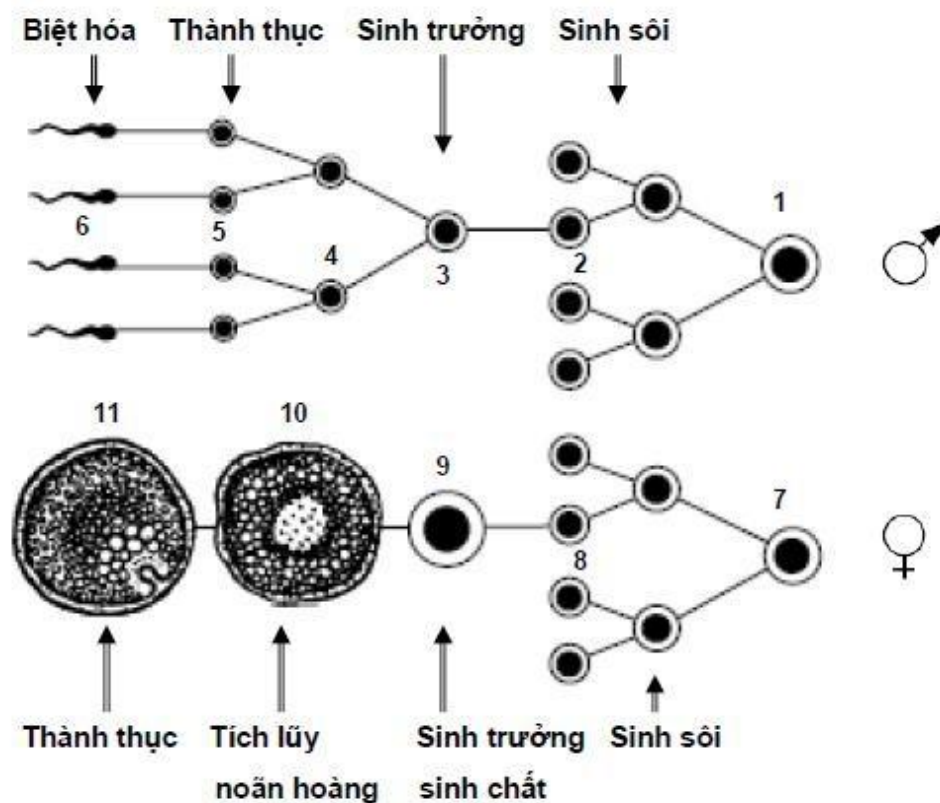
Thời kỳ sinh sản: Tế bào sinh dục lúc này được gọi là tinh nguyên bào, nằm trên thành ống tinh. Các tinh nguyên bào phân chia nhiều lần, kết quả là tăng lên về số lượng và giảm về kích thước. Từ một tinh nguyên bào hình thành một nhóm tinh nguyên bào nhỏ hơn nằm trong một vỏ chung. Những nhóm tế bào sinh dục như thế được gọi là bào nang.

Thời kỳ sinh trưởng: Ở thời kỳ này, tế bào sinh dục được gọi là tinh bào cấp I. Chúng hơi lớn lên về kích thước và bên trong nhân xảy ra các quá trình chuẩn bị thuộc phân bào giảm nhiễm. Những thay đổi về nhân này làm cho các tinh bào cấp I có hình dáng đặc biệt để phân biệt chúng với các loại tinh bào đang ở thời kỳ khác.

Thời kỳ thành thực: Các tinh bào cấp I phân chia hai lần. Sau lần phân chia thứ nhất được 2 tinh bào cấp II. Sau lần phân chia thứ hai, được 4 tinh tử. Sau 2 lần phân chia này, số nhiễm sắc thể còn lại phân nửa.

Thời kỳ biệt hóa: Các tinh tử dần dần biến thành tinh trùng chín muồi. Khác với quá trình hình thành tế bào trứng, tinh tử trải qua thời kỳ biệt hóa để biến đổi thành tinh trùng như: nhân dồn về phía đầu, thể Golgi biến thành thể đỉnh, phần dưới kéo dài thành đuôi, bên trong có các bó sợi trục do trung tử đuôi biến thành. Trong quá trình tạo tinh, kích thước tế bào giảm dần. Tinh nguyên bào có kích thước lớn nhất và tinh

trùng có kích thước nhỏ nhất. Đây cũng là đặc điểm đáng chú ý để xác định các giai đoạn phát triển của tinh bào trên các tiêu bản tổ chức học. Ở cá Chép, đường kính tinh nguyên bào là 14 μm , trong khi đó đường kính đầu tinh trùng chín muồi là 1,5 μm . Sự phát triển tế bào sinh dục đực xảy ra bên trong các ống sinh tinh. Trong các ống sinh tinh, các tế bào nằm thành từng nhóm, còn gọi là bào nang. Trong một bào nang có các tế bào có hình dạng giống nhau và ở cùng một giai đoạn phát triển. Sau khi các tinh trùng hình thành, các bào nang vỡ ra và tinh trùng nằm trong khoảng trống của ống sinh tinh.



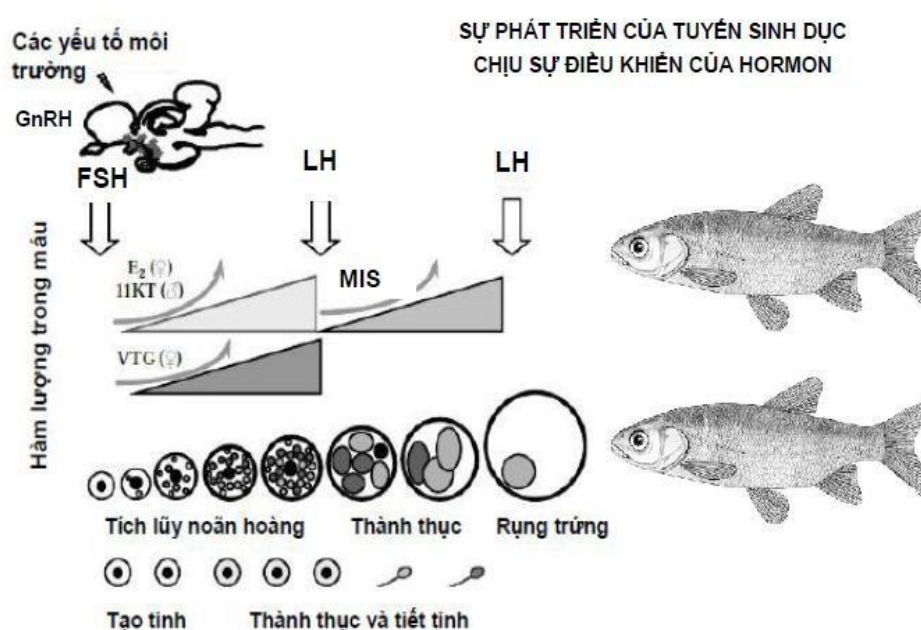
Hình 1.4. Các giai đoạn phát triển chính của tế bào sinh dục ở cá [114]

1 và 2: Tinh nguyên bào; 3: Tinh bào cấp I; 4: Tinh bào cấp II; 5: Tinh tử; 6: Tinh trùng; 7 và 8: Noãn nguyên bào; 9: Noãn bào cấp I (noãn bào sơ cấp); 10: Noãn bào cấp II (noãn bào thứ cấp); 11: Tế bào trứng thành thục

1.6. Hormone điều khiển chu kỳ sinh sản ở cá

Để quá trình thành thục và phóng thích sản phẩm sinh dục ra ngoài thông qua sự đẻ trứng ở con cái và tiết tinh ở con đực thành công, các bộ phận trong hệ trục thần kinh nội tiết sinh sản phải thực hiện tốt và đồng bộ chức năng của chúng trong cả chu

kỳ [30, 37, 38, 73]. Sự tiết các hormone từ GnRH, FSH, LH đến các steroid là rất cần thiết cho hoạt động đẻ trứng và tiết tinh. Sự rối loạn một trong các bước trên hay thiếu một trong các hormone trên cũng có thể dẫn đến sự thoái hóa hay cá không thể đạt đến trạng thái thành thục hoàn toàn và như vậy sự đẻ trứng và tiết tinh sẽ không xảy ra. Các nguyên nhân chủ yếu như cá bị stress, môi trường nuôi không thích hợp có thể ảnh hưởng đến sự điều tiết của các hormone trong hệ thần kinh nội tiết và như vậy ức chế sự thành thục.



Hình 1.5. KDT tuyến yên điều khiển quá trình tiết hormone steroid, phát triển và thành thục tế bào sinh dục ở cá [114]

1.6.1. Hormone phóng thích KDT của não bộ (GnRH)

Não bộ là trung tâm thần kinh điều khiển nhiều hoạt động sống của cơ thể trong đó có nội tiết sinh sản. Não bộ cũng là nơi thu nhận các tín hiệu và kích thích từ môi trường bên ngoài và phản ứng lại các kích thích đó thông qua hệ thống thần kinh thể dịch. GnRH là hormone quan trọng nhất của não bộ tham gia điều hòa hoạt động tổng hợp và tiết KDT của tuyến yên. Ở cá xương, GnRH là một hormone thần kinh được tổng hợp bởi các tế bào thần kinh trong các vùng đặc biệt của não bộ. Các GnRH được các sợi thần kinh truyền trực tiếp đến tuyến yên và được phóng thích vào các vùng phụ cận gần với các tế bào kích dục, gắn vào các thụ thể đặc hiệu trên màng và kích thích sinh tổng hợp và tiết cả hai KDT là FSH và LH.

1.6.2. Kích dục tố của tuyến yên (Gonadotropin)

Tuyến yên là cơ quan nội tiết trung tâm tham gia điều khiển nhiều hoạt động sống của cơ thể, trong đó có hoạt động sinh sản thông qua việc kích thích tổng hợp steroid và tạo giao tử của tuyến sinh dục. Ở cá xương, trước đây người ta cho rằng, tuyến yên chỉ tạo ra một loại KDT và KDT này có bản chất giống như LH ở động vật có vú, đảm nhiệm toàn bộ chức năng kích thích quá trình tạo giao tử ở cả con cái và con đực. Tuy nhiên, bằng các kết quả nghiên cứu sau đó, lần đầu tiên vào năm 1988, người ta đã phát hiện và xác định được hai loại KDT khác nhau tồn tại trong tuyến yên cá xương. Sau đó, các nhà khoa học thống nhất rằng, tuyến yên cá xương tạo ra hai loại KDT và được định danh là Gonadotropic Hormone I (GTH-I) và Gonadotropic Hormone II (GTH-II).

1.7. KDT điều khiển chức năng của tinh sào

1.7.1. Điều khiển tổng hợp và tiết hormone steroid ở tinh sào

Người ta đã xác định được 2 loại KDT GTH-I và GTH-II trong huyết tương cá Hồi đực và hàm lượng của chúng có quan hệ với các giai đoạn phát triển của tinh sào [135, 163, 197]. Điều này cho thấy vai trò của FSH và LH trong quá trình điều khiển sinh tổng hợp hormone steroid của tinh sào. Trong thời kỳ giữa và cuối của quá trình tạo tinh, hàm lượng FSH và 11-KT trong huyết tương tăng lên. Tuy nhiên khi cá chuyển sang giai đoạn thành thực và tiết tinh, hàm lượng FSH giảm xuống và LH cùng với 17,20 β -P trong huyết tương tăng lên.

Ở cá Hồi đực cũng như một số loài cá xương khác, T và 11-KT trong huyết tương tăng lên trong suốt giai đoạn tạo tinh và giảm xuống khi cá đực thành thực hoàn toàn và bắt đầu tiết tinh, đồng thời hàm lượng 17 α ,20 β -P cũng tăng lên. Quá trình tạo tinh ở cá hồi Nhật Bản (*Hucho perryi*) cũng có thể được kích thích bằng 11-KT *in vitro* [123]. Tuy nhiên quá trình tiết tinh và hoạt lực của tinh trùng lại được kích thích bởi 17 α ,20 β -P [124]. KDT tuyến yên kích thích sự tạo T và 11-KT trong các tế bào sinh dưỡng trong tinh sào và khả năng tổng hợp các hormone steroid này tăng lên trong thời kỳ tạo tinh. Trong giai đoạn đầu và giữa của quá trình tạo tinh, cả FSH và LH đều có hiệu lực như nhau trong việc kích thích tinh sào tiết T, 11-KT và 17 α ,20 β -P. Tuy nhiên ở giai đoạn cuối và trong thời kỳ tiết tinh, hiệu lực LH mạnh hơn FSH [163].

Hiệu lực của FSH và LH trong thời kỳ đầu như nhau có thể có liên quan đến sự có mặt của một loại thụ thể của KDT. Thụ thể này có thể liên kết với cả FSH và LH

[126]. Thụ thể này đã được xác định trên các tế bào Sertoli nằm trong tinh sào, nhưng cũng có thể chúng có mặt trong các tế bào Leydig. Trong thời kỳ tiết tinh, khi mà hiệu lực của LH tăng lên, thụ thể thứ hai sẽ xuất hiện và liên kết đặc hiệu với LH trên các tế bào Leydig. Như vậy, ở cá Hồi trong thời kỳ tiết tinh và tăng cường hoạt lực của tinh trùng, cá được chịu sự chi phối của LH chứ không phải FSH.

1.7.2. Điều khiển quá trình tạo tinh

Ở một số loài cá xương, vai trò chính của FSH là kích thích quá trình tạo tinh. Trên cá hồi vân, FSH kích thích sự sinh sôi của tinh nguyên bào [111]. FSH cũng kích thích quá trình tạo tinh ở cá hồi Nhật Bản [30] và cá hồi Thái Bình Dương (*Oncorhynchus spp*) [44]. Hàm lượng 11-KT trong huyết tương cá Hồi thành thực tăng lên cùng với sự xuất hiện của các tinh bào cấp I, điều đó cho thấy quá trình tạo tinh đã bắt đầu [111]. Ở cá hồi Thái Bình Dương, hàm lượng FSH tăng lên đáng kể trước khi 11-KT được tiết ra [44].

Các nghiên cứu về khả năng kích thích tạo 11-KT của FSH và sự xuất hiện các thụ thể của FSH trong tinh sào trong thời kỳ tạo tinh cho phép kết luận FSH đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo tinh ở cá Hồi [134]. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy trên cá trê phi [53]. Vào cuối giai đoạn tạo tinh, tinh sào cũng chịu sự điều khiển bởi KDT. Các thí nghiệm *in vivo* trên nhiều loài cá cho thấy việc sử dụng các chế phẩm KDT tuyến yên hoặc GnRH-A cho kết quả là thu được tinh dịch [150]. Ngoài ra, trong điều kiện tự nhiên, hàm lượng LH, 11-KT và $17\alpha,20\beta$ -P trong huyết tương tăng lên trong thời kỳ tiết tinh trên nhiều loài cá [126, 197].

Ngày nay người ta biết rằng, trong giai đoạn chín của tinh sào, các thụ thể của LH tăng lên cùng với hàm lượng 11-KT và $17\alpha,20\beta$ -P. Do đó, chúng ta có thể kết luận rằng, 11-KT và $17\alpha,20\beta$ -P được tiết ra dưới ảnh hưởng của LH và có thể có vai trò quan trọng trong thời kỳ tiết tinh ở cá đực.

1.8. KDT điều khiển chức năng của buồng trứng

1.8.1. Điều khiển tổng hợp và tiết hormone steroid ở nang trứng

Các nghiên cứu trên nhiều loài cá cho thấy trong thời kỳ sinh trưởng của noãn bào, hàm lượng E_2 trong huyết tương tăng lên và sau đó giảm xuống ngay khi noãn bào chuyển sang giai đoạn thành thực [94]. Quá trình tạo E_2 trong các tế bào nang trứng ở buồng trứng cá Hồi có sự tham gia của lớp tế bào vỏ và lớp tế bào hạt. Dưới

ảnh hưởng của KDT tuyến yên, lớp tế bào vỏ sản xuất T, chất này khuếch tán vào bên trong lớp tế bào hạt ở đó có enzym aromatase [25, 97, 132]. Tại đây, enzym aromatase chuyển T thành E₂. Sự phân bố của T và E₂ trên nang trứng cá hồi vân đã được xác định bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Tuy nhiên mô hình này lại không đúng đối với một số loài cá không có các tế bào vỏ đặc biệt trong nang trứng mà chỉ có lớp tế bào hạt làm nhiệm vụ tổng hợp hormone steroid như ở cá *Fundulus heteroclitus* và *Oryzias latipes* [159].

Khi nghiên cứu cơ chế hoạt hóa enzym aromatase trên nang trứng của cá *Oryzias latipes*, một đối tượng mà các bước phát triển buồng trứng như tích lũy noãn hoàng, chín và rụng có thể được dự báo thời điểm chính xác [178]. Việc sử dụng mô hình này cho thấy hoạt động của enzyme aromatase tăng dần lên và chuyển đổi T ngoại sinh sang E₂ trên nang trứng đã được phân lập trong 18-20 giờ trước lúc cá đẻ [179]. Ở loài cá này hoạt động của enzym aromatase được tăng cường đáng kể bởi KDT huyết thanh ngựa chữa (PMSG) sau 18 giờ ủ nang trứng. Điều này chứng tỏ huyết thanh ngựa chữa kích thích hoạt tính của enzym aromatase trong nang trứng của cá *Oryzias latipes* [134]. Ngoài ra, lớp tế bào vỏ ở cá hồi *Oncorhynchus rhodurus* và lớp tế bào hạt ở cá hồi vân có thể tạo ra cùng một ảnh hưởng giống như việc sử dụng kết hợp 2 lớp tế bào này trên cùng một loài [134].

Việc sử dụng qua lại 2 loại tế bào này cũng có tác dụng như nhau. Kết quả này thể hiện tính đặc hiệu ở mỗi một loại tế bào giữa các loài trong họ cá hồi [132]. Tuy nhiên, mô hình 2 kiểu tế bào như mô tả ở trên lại không đúng đối với loài *Fundulus heteroclitus* và *Oryzias latipes*. Ở những loài này, các tế bào vỏ đặc biệt không có trong lớp vỏ và tế bào hạt là nơi chủ yếu tổng hợp hormone steroid và như vậy việc tạo ra E₂ không cần sự tham gia của 2 loại tế bào [145, 159].

FSH và LH đều có khả năng kích thích *in vitro* sự tổng hợp T và E₂ từ nang trứng đã tách [201]. Khả năng kích thích sự tổng hợp hormone steroid của FSH và LH ở giai đoạn này là do sự xuất hiện chỉ một loại thụ thể của KDT trong cả lớp tế bào vỏ và tế bào hạt và thụ thể này có thể liên kết với cả FSH và LH [126, 217]. Mặc dù chức năng kích thích tạo hormone steroid của FSH và LH ở giai đoạn này là như nhau, nhưng hàm lượng LH trong máu lại rất thấp hoặc không xác định được. Hơn nữa hàm lượng FSH trong máu có quan hệ chặt chẽ với E₂ [101, 147]. Như vậy E₂ được tạo ra từ nang trứng dưới tác dụng của KDT tuyến yên mà ở đây chủ yếu là FSH.

Khi chuyển sang thời kỳ trứng thành thực, sự khác nhau về hoạt tính của FSH và LH có liên quan đến sự tổng hợp E_2 và $17,20\beta$ -P của buồng trứng [133]. Trong thời kỳ này, buồng trứng chuyển dịch tổng hợp E_2 sang $17,20\beta$ -P trên một số loài cá hồi [133, 185] và cá vền [143]. Tuy nhiên, cho đến nay, số lượng các loài cá nghiên cứu còn hạn chế, vì vậy câu hỏi đặt ra là có phải cơ chế chuyển dịch sinh tổng hợp này là quy luật chung cho tất cả các loài cá xương. Nhiều giả thuyết cho rằng, sự chuyển dịch này là do sự điều khiển bởi KDT tuyến yên [133]. Tuy nhiên giả thuyết này sau đó được kiểm chứng trên cá hồi, một đối tượng cho phép so sánh về hàm lượng, hoạt tính sinh học và thụ thể giữa FSH và LH.

Ngày nay, người ta biết rằng, sự chuyển dịch sinh tổng hợp E_2 sang $17,20\beta$ -P xảy ra ngay khi trứng chuyển sang giai đoạn thành thực và có liên quan đến sự gia tăng hàm lượng LH, sự xuất hiện các thụ thể của LH trong các tế bào hạt của nang trứng và sự gia tăng hoạt động của LH trong việc kích thích tổng hợp $17,20\beta$ -P [126, 164, 197, 217]. Sự xuất hiện các thụ thể của KDT thứ hai trong các tế bào hạt được xem là điểm mấu chốt của sự chuyển dịch này bởi vì nó có thể cho thấy hai hoạt tính đặc biệt của LH đối với sự thành thực của noãn bào. Thứ nhất, LH ức chế các tế bào hạt của nang trứng sản xuất E_2 bằng cách ức chế hoạt động của enzym aromatase; thứ hai, LH kích thích sự tổng hợp $17,20\beta$ -P bởi các tế bào hạt bằng cách tăng cường hoạt tính của 20β -HSD. Trước thời điểm rụng trứng, các thụ thể của LH xuất hiện và tăng lên ngày càng nhiều trong tế bào hạt, kích thích sinh tổng hợp P dưới ảnh hưởng của LH [164, 196].

1.8.2. Điều khiển quá trình tạo trứng

E_2 được tạo ra ở buồng trứng dưới ảnh hưởng của KDT, phóng thích vào máu và kích thích tế bào gan tổng hợp và sản xuất VTG. Việc tiêm dịch chiết tuyến yên kích thích tổng hợp E_2 và dẫn đến sự tích lũy VTG đã được thử nghiệm trên nhiều loài cá. Hàm lượng E_2 và quá trình tích lũy noãn hoàng có mối quan hệ thuận. Các estrogen ngoại sinh có thể kích thích quá trình sinh tổng hợp VTG ở gan và phóng thích vào máu. VTG sau đó được kết nạp vào các noãn bào một cách đặc hiệu. Các thụ thể của chất noãn hoàng đã được xác định trên các màng của noãn bào đã được phân lập ở cá hồi *Oncorhynchus kisutch* [192] và rô phi *Oreochromis niloticus* [56]. Trên bề mặt của noãn bào chỉ có một lớp các điểm liên kết. Ở cá rô phi, số lượng các điểm liên kết và ái lực của các liên kết này tăng lên từ giai đoạn tiền tích lũy noãn hoàng đến giai đoạn tích lũy noãn hoàng và tại thời điểm này ái lực của sự liên kết thụ thể này đạt cao nhất.

Ngoài KDT, một vài hormone khác như thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), insulin, và hormone sinh trưởng cũng có liên quan đến hoạt động điều khiển sự lớn lên của noãn bào mặc dù vai trò của các hormone này chưa được xác định cụ thể trên các loài cá. FSH kích thích *in vitro* sự hấp thụ VTG vào lớp tế bào nang trên cá hồi vân cũng như sự kết nạp *in vitro* VTG bởi một phần nang trứng [209]. Khi sử dụng các noãn bào đã tách lớp tế bào nang trên cá hồi vân người ta thấy rằng insulin và thyroxin làm tăng sự hấp thụ VTG. Ngược lại cả FSH và LH lại không có hiệu quả trên cá hồi *Oncorhynchus keta*. Các noãn bào thành thực chỉ có khả năng kết nạp 1/15 VTG vào trong và insulin cũng không có tác dụng trên các noãn bào thành thực. Từ những kết quả nghiên cứu trên người ta đưa ra giả thuyết rằng sự kết nạp VTG vào noãn bào thông qua lớp tế bào nang được thực hiện dưới sự tác động của KDT lên lớp tế bào nang trứng.

Khi quá trình tích lũy noãn hoàng kết thúc, noãn bào chuyển sang giai đoạn tiếp theo được gọi là giai đoạn thành thực và chín. Sự thành thực và chín của noãn bào xảy ra trước khi rụng trứng và được xác định khi nhân di chuyển ra ngoài biên, trứng có sự cực hóa và túi mầm tan biến làm cho dịch nhân chảy ra ngoài. Trứng bắt đầu giảm phân và hình thành giảm phân I, cực cầu I bị đẩy ra ngoài và sau đó giảm phân II lại bị phong tỏa cho đến khi tinh trùng xâm nhập hay được kích thích tiếp tục bằng một tác nhân khác. Ở cá, các quá trình này được điều khiển bởi LH trong các phép thử *in vitro* [97, 164]. Hàm lượng LH thường tăng cao trong huyết tương ở thời kỳ này. LH không chỉ đo được ở mức cao trong thời kỳ cá thành thực mà bằng phương pháp tiêm LH có thể làm một vài loài cá chuyển sang trạng thái thành thực và chín.

LH không tác động trực tiếp sự thành thực của noãn bào mà thông qua sinh tổng hợp hormone steroid gây chín (MIS) ở tế bào hạt của nang trứng. Một điều quan trọng trong quá trình điều khiển sự chín của noãn bào là MIS ($17,20\beta$ -P hoặc 20β -S: tùy theo loài) có thể tác động trực tiếp lên noãn bào bằng cách tương tác với thụ thể của màng tế bào [133, 205]. Vì vậy giả thuyết đặt ra ở đây là LH kích thích sự chín noãn bào thông qua kích thích tổng hợp MIS. Tuy nhiên, kết quả của nhiều công trình nghiên cứu trên cá xương đã gợi ý rằng việc LH kích thích sự thành thực noãn bào có lẽ không phụ thuộc vào khả năng của LH kích thích tạo MIS [116].

1.9. Hormone steroid của tuyến sinh dục

1.9.1. Điều khiển quá trình phát triển tinh sào

Quá trình phát triển và thành thực sinh dục ở cá đực (tinh sào) cũng được điều khiển bởi các KDT tuyến yên. Tuy nhiên, hoạt tính của hormone steroid tiết từ tinh sào

có ảnh hưởng mạnh hơn. Androgen 11-KT là hormone steroid chính điều khiển quá trình phát triển của tinh bào và MIS điều khiển sự thành thực của tinh trùng. Cả hai hormone steroid này đều được tổng hợp bởi các tế bào sinh dưỡng trong tinh sào dưới ảnh hưởng của KDT tuyến yên. LH là KDT tham gia chủ yếu vào quá trình kích thích tổng hợp androgen trong tế bào Leydig vì thế còn có tên là ICSH. Trong khi đó FSH tham gia nhiều chức năng khác nhau trong tinh sào, kích thích tổng hợp androgen trong tế bào Leydig và điều khiển hoạt động của tế bào Sertoli trong quá trình tạo tinh. Mặc dù cơ chế hoạt động của FSH đến nay vẫn chưa được biết đến một cách đầy đủ, nhưng chức năng của FSH trong tinh sào là kích thích sự gia tăng và biệt hóa các tế bào Sertoli và tổng hợp các yếu tố sinh trưởng. Các yếu tố này tác động theo cơ chế tự tiết và cận tiết trong quá trình gia tăng và biệt hóa các tế bào Sertoli và phát triển của các tế bào mầm.

Trước khi quá trình tạo tinh bắt đầu, quá trình tạo các tế bào mầm của tinh nguyên bào được điều khiển bởi E_2 , tác động lên các tế bào Sertoli [129]. Ở một thời điểm nhất định, KDT tuyến yên (chủ yếu là FSH) kích thích sự dịch chuyển quá trình tạo tế bào mầm sang quá trình sinh sôi của các tinh nguyên bào. Đây là giai đoạn đầu tiên của quá trình tạo tinh. FSH tác động lên các tế bào Sertoli và kích thích sinh tổng hợp 11-KT thông qua hoạt hóa các enzym 11β -hydroxylase và 11β -hydroxysteroid dehydrogenase. Từ đó, 11-KT có vai trò điều khiển toàn bộ quá trình tạo tinh [129].

Ở cá đực, hàm lượng FSH trong huyết tương cao ở giai đoạn đầu quá trình tạo tinh và đạt cực đại trong suốt thời kỳ phát triển của tinh sào và sau đó giảm xuống sau khi sinh sản. Hàm lượng LH trong huyết tương thấp trong thời kỳ đầu quá trình tạo tinh, bắt đầu tăng lên trong thời kỳ phát triển và đạt cực đại trong lúc sinh sản. Khi quá trình tạo tinh kết thúc, LH được tiết ra từ tuyến yên kích thích sự chuyển dịch quá trình tạo hormone steroid của tinh sào sang tổng hợp MIS. MIS đến lượt mình điều khiển sự thành thực của tinh trùng. Trong thời kỳ thành thực, 17α -hydroxyprogesterone tổng hợp từ các tế bào Leydig sẽ chuyển thành MIS trong tinh sào do hoạt động của enzyme 20β -hydroxysteroid dehydrogenase. Hoạt tính của MIS không trực tiếp tác động lên sự thành thực của tinh trùng mà thông qua các enzym đặc hiệu làm tăng pH huyết tương từ đó làm tăng hoạt lực và sự biệt hóa của tinh tử thành tinh trùng. Ở cá đực, trong thời kỳ thành thực, hàm lượng androgen luôn được duy trì ở mức cao trong huyết tương.

1.9.2. Điều khiển quá trình phát triển buồng trứng

Ở cá cái, E_2 điều khiển sự phát triển của noãn bào, đặc biệt là giai đoạn tích lũy VTG dưới ảnh hưởng của KDT tuyến yên (FSH). Trong buồng trứng, E_2 được tổng hợp theo mô hình 2 kiểu tế bào. Trong quá trình tích lũy noãn hoàng, lớp tế bào vỏ tổng hợp T từ cholesterol, sau đó chuyển T vào lớp tế bào hạt, ở đó dưới tác dụng của enzyme aromatase, T được chuyển thành E_2 . Trong thời kỳ tích lũy noãn hoàng, E_2 thực hiện hai chức năng chính, một là điều khiển sự phát triển của noãn bào và hai là kích thích tế bào gan tổng hợp VTG [136].

Khi quá trình tích lũy noãn hoàng kết thúc, tuyến yên bắt đầu tăng tiết LH, kích thích sự chuyển dịch hoạt động sinh tổng hợp hormone steroid trong buồng trứng bằng cách giảm sản xuất T và E_2 , đồng thời tăng cường sinh tổng hợp hormone steroid gây chín (MIS). Điều này được thực hiện thông qua sự giảm hoạt động của enzym aromatase và tăng hoạt động của enzym tạo MIS. Hai hormone steroid gây chín đã được xác định ở cá là 17,20 β -P hoặc DHP và 20 β -S. Cả hai 17,20 β -P và 20 β -S đều có vai trò gây chín noãn bào như nhau ở nhiều loài cá. Tuy nhiên một trong hai chất trên có tính năng vượt trội hơn ở những loài cá khác nhau. 17,20 β -P là MIS chính ở một vài loài cá Hồi và một số loài không thuộc họ cá hồi, trong khi đó, 20 β -S là MIS chính đối với các loài *Micropogonias undulatus*, *Cynoscion nebulosus*, *Morone saxatilis* và *Acanthopagrus schlegelii*.

1.10. Hormone steroid trong chu kỳ sinh sản ở một số loài cá biển

Sự phát triển, thành thực và chín muồi tế bào sinh dục ở cá chịu sự điều khiển của các hormone steroid sinh dục. Hàm lượng hormone steroid trong huyết tương thay đổi tùy thuộc vào giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục và loài. Đối với các loài cá đẻ nhiều lần trong năm, sự biến động hàm lượng hormone steroid trong chu kỳ sinh sản khá phức tạp. Nhiều loài trong số này là cá biển [136]. Một đặc điểm được ghi nhận là hàm lượng androgen và estrogen trong huyết tương khá thấp ở các loài cá đẻ nhiều lần trong năm [149]. Các hormone steroid gây chín cũng thấp hoặc không đo được hoặc ít thay đổi trong suốt các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục. Nguyên nhân có thể là do ảnh hưởng của sự trao đổi chất hay phương pháp thu mẫu không phù hợp chẳng hạn thời gian thu mẫu giữa hai lần quá xa, khó xác định được sự thay đổi ngắn hạn của các hormone steroid. Ngoài ra, hoạt động của các hormone steroid sinh dục theo cơ chế cận tiết cũng là nguyên nhân làm cho hàm lượng của chúng thấp trong huyết tương.

Chế độ thủy triều (nhật triều và bán nhật triều) có ảnh hưởng lớn đến chu kỳ sinh sản của hầu hết cá biển kể cả những loài đẻ một lần trong năm. Sự khác biệt cơ bản về hàm lượng hormone steroid trong huyết tương giữa nhóm cá đẻ nhiều lần và một lần trong năm là hàm lượng T và E₂ không giảm ở thời kỳ rụng trứng đối với nhóm cá đẻ nhiều đợt, đặc biệt là khi buồng trứng có các noãn bào đang lớn lên. Ở một vài loài, hàm lượng T và E₂ vẫn ở mức cực đại mặc dù cá cái đã chuyển sang giai đoạn thành thục và rụng trứng [151]. Ở cá *Fundulus heteroclitus*, hoạt động đẻ trứng theo chu kỳ bán nhật triều. Toàn bộ quá trình tích lũy noãn hoàng, thành thục và chín xảy ra khoảng 6 ngày trước khi đẻ trứng. Hàm lượng E₂ tăng lên và ổn định trong suốt các giai đoạn trên, sau đó giảm xuống trong 6 ngày sau khi cá đẻ [55]. Ở cá *Fundulus grandis*, hàm lượng hormone steroid thay đổi hàng ngày và hàm lượng T thường đạt cực đại vào nửa đêm trong một vài ngày trước khi cá đẻ [70]. Ở các loài cá địa, chu kỳ sinh sản phụ thuộc vào chế độ thủy triều rất rõ với thời gian đẻ trứng kéo dài trong một vài tháng.

Cá địa thường đẻ vào tuần thứ nhất của chu kỳ trăng (đầu tháng âm lịch) và hàm lượng E₂; T; 17 α ,20 β -P và 20 β -S luôn tăng cao và kéo dài trong suốt thời kỳ đẻ trứng, trong đó E₂ và T vượt quá 10 ng/ml [170]. Hàm lượng hormone steroid ở cá đực cũng tương tự như hàm lượng T, 11-KT và 17 α ,20 β -P lần lượt là 20,5 và 10 ng/ml. Điều này cho thấy hàm lượng hormone steroid trong huyết tương cao hơn với những loài có khoảng cách dài hơn giữa hai lần đẻ trứng. Một số loài khác thuộc giống cá địa cũng có cùng sự biến động hormone steroid tương tự nhưng thời điểm đẻ trứng lại khác nhau. Chẳng hạn cá địa *Siganus argenteus* đẻ vào cuối tuần trăng và có hàm lượng T, 11-KT và 17 α ,20 β -P cao, ở cá cái E₂ và 17 α ,20 β -P cao và có quan hệ với thời kỳ đẻ trứng [172].

Đối với những loài cá đẻ hàng ngày như cá tráp vàng (*Sparus aurata*) hay cá *Pseudolabrus japonicus*, E₂ trong huyết tương đạt cực đại khoảng 6 giờ trước khi cá rụng trứng, nhưng hàm lượng 17 α ,20 β -P lại không thay đổi [224]. Cá tráp đỏ (*Pagrus major*) thường rụng trứng vào khoảng 13:00h-14:00h và đẻ lúc 16:00h-19:00h, hàm lượng 17 α ,20 β -P thường đạt cực đại vào lúc sáng sớm (400 pg/ml) trong thời kỳ trứng thành thục và hàm lượng E₂ đạt cực đại (1.200 pg/ml) trong thời kỳ tích lũy noãn hoàng [96]. Cá hồng (*Pagrus auratus*) một loài thường đẻ hàng ngày vào buổi tối có thời điểm rụng trứng vào đầu buổi chiều. Trong mùa đẻ trứng hàm lượng E₂ và T trong

huyết tương luôn duy trì ở mức cao [51]. Bằng cách rút ngắn khoảng cách thời gian giữa các lần thu mẫu (3 giờ một lần trong ngày), người ta cũng không thấy có sự thay đổi về hàm lượng E_2 và T trong huyết tương trong ngày. Tuy nhiên E_2 và T trong buồng trứng đạt cực đại lúc 21:00h-24:00h ở hầu hết các buồng trứng có noãn bào đang trong thời kỳ cuối giai đoạn tích lũy noãn hoàng. Ngược lại, $17\alpha,20\beta$ -P trong buồng trứng lại không thay đổi, nhưng trong huyết tương lại đạt cực đại lúc 09:00h khi noãn bào đang trong thời kỳ hấp nước. Hàm lượng hormone steroid ở cá hồng đạt cực đại nhỏ hơn 2.000 pg/ml [88].

Cá *Pseudolabrus japonicus* đẻ trứng lúc 06:00h-09:00h và hàm lượng $17\alpha,20\beta$ -P và 20β -S trong huyết tương đạt cực đại khi noãn bào bắt đầu chuyển sang thành thực [118]. Khi nghiên cứu về sự thay đổi hormone steroid trong ngày trên cá đực, người ta thấy rằng hàm lượng 11-KT huyết tương đạt cực đại vào giữa trưa, trong khi đó hàm lượng $17,20\beta$ -P đạt cực đại vào giữa trưa và lúc nửa đêm [117].

Các kết quả từ các công trình nghiên cứu nêu trên có thể cho phép khẳng định rằng quá trình phát triển của tuyến sinh dục ở cá xương trong chu kỳ sinh sản chịu sự chi phối rất rõ bởi thần kinh nội tiết. Sự phát triển, thành thực, chín muồi và phóng thích sản phẩm sinh dục ra ngoài môi trường đều có sự tham gia điều khiển của nhiều loại hormone khác nhau trong trục điều hòa Não bộ-Tuyến yên-Tuyến sinh dục ở từng giai đoạn phát triển khác nhau. Các hormone của não bộ như GnRH, KDT tuyến yên (FSH và LH) và các hormone steroid có nguồn gốc khác nhau và cơ quan đích không giống nhau, nhưng tất cả đều có mối quan hệ và ảnh hưởng lẫn nhau trong quá trình điều khiển sự phát triển và thành thực của tế bào sinh dục.

Đối với những loài cá đẻ một lần trong đời hay trong năm, sự tăng lên cả androgen và estrogen trong huyết tương khá rõ và điển hình trong quá trình phát triển và thành thực sinh dục. Hàm lượng progestin đạt cực đại khi cá thành thực. Tuy nhiên đối với những loài đẻ rải rác, nhiều lần trong năm thì sự biến động chu kỳ hormone steroid khá phức tạp và khó xác định theo mùa vụ và không xác định được điểm cực đại của progestin. Sự tồn tại của các hormone steroid ở giá trị cực đại là rất ngắn. Hơn nữa một vài loài không xác định được estrogen trong thời kỳ tích lũy noãn hoàng và lại có hàm lượng androgen cao ở cá cái. Vì vậy việc đo hàm lượng hormone steroid trong chu kỳ sinh sản là công cụ hữu ích xác định tình trạng nội tiết và sinh lý của cá trong quá trình kiểm soát sinh sản.

1.11. Ảnh hưởng của môi trường lên chu kỳ sinh sản của cá

1.11.1. Nhiệt độ

Nhiệt độ nước là yếu tố môi trường quan trọng đối với quá trình thành thực của động vật nói chung, đặc biệt đối với các loài biến nhiệt như cá. Hiện tượng phát dục có tính mùa vụ của cá là do sự chi phối của nhiệt độ môi trường. Toàn bộ quá trình sinh lý, sinh hoá diễn ra trong cơ thể động vật chịu tác động mạnh mẽ của nhiệt độ môi trường nước. Ảnh hưởng của nhiệt độ đã làm biến đổi quá trình trao đổi chất, quá trình điều hoà nội tiết trong cơ thể thúc đẩy quá trình thành thực của tế bào sinh dục. Tuy nhiên, nhiệt độ không phải là yếu tố duy nhất chi phối quá trình thành thực ở cá mà còn có sự tương tác với các yếu tố môi trường khác nữa. Hiện nay chưa có nhiều các công trình nghiên cứu về mối tương tác giữa nhiệt độ với từng giai đoạn phát triển và thành thực ở cá biển. Hầu hết các nghiên cứu đều tập trung xác định biên độ giới hạn nhiệt độ thích hợp cho từng loài và như vậy thông thường trong giới hạn cho phép, nếu nhiệt độ thấp thì quá trình thành thực chậm hơn so với nhiệt độ cao [1]. Khi nhiệt độ quá cao hay quá thấp, cá sẽ không còn khả năng bắt mồi, nguồn mỡ dự trữ cạn kiệt, lúc ấy tuyển sinh dục sẽ là nguồn dinh dưỡng duy nhất để duy trì sự sống của cá. Ở miền Bắc nước ta, mùa đông có nhiều ngày ấm sẽ làm cho cá thành thực sớm hơn. Ngược lại nếu mùa rét kéo dài sự thành thực của cá bố mẹ có thể sẽ chậm hơn [1].

1.11.2. Chu kỳ trăng

Chu kỳ quang là thời gian có ánh sáng trong một ngày đêm (24 giờ liên tục). Chu kỳ quang thay đổi theo mùa và vị trí địa lý. Ở nước ta, mùa đông có chu kỳ quang khoảng 10 giờ có ánh sáng (ban ngày) và 14 giờ tối (ban đêm), mùa hè có chu kỳ quang ngược lại, tức là 10 giờ tối (ban đêm) và 14 giờ có ánh sáng (ban ngày). Bằng thực nghiệm người ta đã chứng minh rằng chu kỳ quang có ảnh hưởng đáng kể đến sự thành thực, chín muồi và sinh sản ở nhiều loài cá. Đối với các loài cá Hồi, trong tự nhiên sự thành thực diễn ra khi quang kỳ giảm dần và người ta đã biết vận dụng điều đó bằng cách giảm thời gian chiếu sáng ban ngày để thúc cá thành thực và đẻ trứng sớm hơn. Một số công trình đã chỉ ra rằng chu kỳ quang ảnh hưởng đến hệ nội tiết sinh sản thông qua trục điều hoà não bộ, tuyến yên và tuyến sinh dục [42].

Trên cá Hồi Vân, sự gia tăng chu kỳ quang vào mùa xuân – hè đã kích thích cá phát dục, khởi đầu là quá trình tích lũy noãn hoàng ở cá cái và tạo tinh ở cá đực. Chu kỳ quang không những ảnh hưởng đến sự thành thực sinh dục, thời điểm đẻ trứng ở

các loài cá nước lạnh mà còn ảnh hưởng đến các loài cá vùng ôn đới và nhiệt đới như cá hồi Thái Bình Dương (*Salmo salar*), cá vược (*Dicentrarchus labrax*) [52], cá tráp (*Sparus aurata*) [229], cá đù (*Sciaenops ocellatus*) [204], cá tuyết (*Gadus morhua*) [66] cá *Hippoglossus hippoglossus* [189], rô phi (*Oreochromis niloticus*) [45] và cá đối (*Mugil cephalus*) [98]. Tuy nhiên sự phát triển của tuyến sinh dục không những chịu ảnh hưởng bởi chu kỳ quang mà còn bởi một số yếu tố khác nữa cũng như phụ thuộc vào sự tương tác giữa chu kỳ quang với các yếu tố môi trường và đặc điểm sinh sản của từng loài.

1.11.3. Độ mặn

Độ mặn là yếu tố sinh thái quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến nhiều chức năng sinh lý sinh sản ở cá nói chung, đặc biệt đối với các loài cá biển [26]. Độ mặn có ảnh hưởng khác nhau tùy từng loài, quần thể và giai đoạn phát triển cá thể [192]. Một vài nghiên cứu cho thấy rằng trong cùng một thang độ mặn, nhưng ở các loài khác nhau có những phản ứng về sinh lý và thích nghi khác nhau [83, 141]. Đối với các loài cá di cư sinh sản, độ mặn có ảnh hưởng lớn đến quá trình phát triển, thành thực và đẻ trứng. Tuy nhiên ảnh hưởng của độ mặn lên sự phát triển của tuyến sinh dục và hoạt động sinh sản ở cá biển vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ, mặc dù trong tự nhiên có nhiều loài cá di cư từ các thủy vực nước ngọt sang nước mặn và ngược lại trong vòng đời hoặc trong chu kỳ sinh sản.

Một số nghiên cứu trên cá vược (*Dicentrarchus labrax*) [222] và cá *Acanthopagrus butcheri* [83] thông báo rằng độ mặn không ảnh hưởng đến sự phát triển và thành thực của tuyến sinh dục. Tuy nhiên Zanuy & Carrillo (1984) [222] gợi ý có thể hạ độ mặn để hạn chế sự sinh sản của cá vược. Khi nghiên cứu ảnh hưởng độ mặn lên sự phát triển buồng trứng cá đối (*Mugil cephalus*), Tamaru và cộng sự (1994) kết luận rằng ở phạm vi độ mặn 13-35 ‰, sự phát triển buồng trứng như nhau. Tuy nhiên tác giả nhận thấy rằng ở độ mặn thấp hơn thì quá trình phát triển buồng trứng chậm lại cũng như tỷ lệ noãn bào kết thúc sự tích lũy noãn hoàng thấp hơn so với cá nuôi ở độ mặn cao hơn. Cá cái chỉ đẻ trứng khi được kích thích trong nước biển. Trên cá hồi Đại Tây Dương, Magwood và cộng sự (1999) [112] cũng cho biết cá có thể rụng trứng sớm hơn nếu được đưa vào nuôi trong môi trường nước ngọt khoảng 3-4 tháng trước mùa cá đẻ trứng so với cá nuôi hoàn toàn trong nước biển. Ngoài ra, cá nuôi trong môi trường nước biển cho độ đồng bộ tế bào sinh dục kém hơn so với cá đưa vào nước ngọt. Như vậy độ mặn có ảnh hưởng đến thời gian rụng và đẻ trứng ở một số loài cá.

Một số yếu tố khác như thức ăn, chế độ thủy triều, mưa, dòng chảy hay sự xuất hiện của con khác giới cũng ảnh hưởng đến sự thành thực và sinh sản ở cá. Tuy nhiên những yếu tố này ảnh hưởng khác nhau ở các loài cá khác nhau tùy theo đặc điểm sinh sản ở từng loài. Một số loài cá đẻ trứng nổi như cá biển thường đẻ trứng vào thời điểm có nhiều sinh vật phù du phát triển. Các loài cá họ chép lại thường đẻ vào mùa mưa lũ hay các loài cá đối (*Mugil cephalus*) lại sinh sản phụ thuộc vào tuần trăng và thủy triều [114].

1.12. Các loại hormone sử dụng trong sinh sản nhân tạo cá

Trước khi các phương pháp xác định hàm lượng hormone trong huyết tương phát triển, người ta đã biết được sự rối loạn của hormone dẫn đến không thành thực, rụng trứng và đẻ trứng ở cá và sự can thiệp bằng hormone từ bên ngoài để kích thích thành thực và đẻ trứng đã được áp dụng. Công trình nghiên cứu đầu tiên trong việc sử dụng hormone ngoại sinh trong sinh sản nhân tạo là của Giáo sư Houssay (1930) người Argentina. Trong nghiên cứu về chức năng của KDT ở tuyến yên động vật có xương, ông ta đã tiêm cho cá cái dịch chiết tuyến yên từ loài cá khác và thấy cá đã rụng trứng. Giáo sư Houssay sau đó nhận giải thưởng Nobel năm 1947 trong lĩnh vực sinh lý và y khoa cho công trình của ông về vai trò của tuyến yên trong quá trình trao đổi chất của glucozo. Công trình nghiên cứu của ông về sau đã được ứng dụng rộng rãi và được phát triển các phương pháp sử dụng hormone trong sinh sản nhân tạo, bắt đầu với phương pháp dùng KDT.

1.12.1. Kích dục tố màng đệm nhau thai (hCG)

Mặc dù các loại KDT tinh khiết chiết xuất từ tuyến yên của cá đã được chuẩn hóa tính hiệu nghiệm và có mặt trên thị trường, nhưng chi phí cho các hormone này trong NTTS vẫn còn cao và chưa được người nuôi sử dụng rộng rãi. Vì vậy đầu những năm 1930, các nhà khoa học bắt đầu thử nghiệm với các loại KDT chiết xuất từ tuyến yên của động vật có vú như KDT từ huyết thanh ngựa chửa hay KDT màng đệm nhau thai chiết xuất từ nước tiểu của phụ nữ có thai (hCG). So với KDT ở động vật có vú và PMSG, hCG là loại KDT được sử dụng phổ biến nhất trong sinh sản nhân tạo cá vì hCG đã được chuẩn hóa theo tiêu chuẩn đơn vị quốc tế (IU) và hoạt tính sinh học của nó giống với LH của cá [69, 107].

hCG thường được tiêm một lần duy nhất với liều lượng dao động trong khoảng 100-4.000 IU/ kg khối lượng thân, tùy theo loài. Hiệu quả của hCG cho một lần tiêm có lẽ

do hCG có thời gian tồn tại trong máu lâu hơn. Điều này không có nghĩa là do hCG khác loại đối với cá nên tồn tại lâu, vì trên thực tế, ở người, hCG cũng tồn tại lâu trong hệ tuần hoàn so với KDT tuyến yên như FSH và LH [70]. Ở cá giò (*Rachycentron canadum*) người ta chỉ cần tiêm một liều thấp (275 IU/ kg) là đủ để kích thích cá rụng trứng đối với các noãn bào đã kết thúc thời kỳ tích lũy chất noãn hoàng [60]. Đối với cá *Macquaria novemaculeata* tiêm một liều với 500 IU/kg cũng cho hiệu quả rụng trứng kể cả cá nuôi hoặc cá đánh bắt ngoài tự nhiên [34]. Cá hồng bạc (*Lutjanus argentimaculatus*) có thể đẻ sau một lần tiêm nhưng ở liều cao hơn (1.500 IU/kg) [72]. Đối với cá đực, khi sử dụng hCG, liều có thể thấp hơn 2-4 lần so với cá cái [33, 199, 213]. hCG cũng đã được thử nghiệm về độ nhạy của noãn bào cá Mè Trắng. Tính chất tồn tại lâu trong hệ tuần hoàn và kéo dài thời gian kích thích sự thành thực cũng đã được ứng dụng ở cá chình Nhật Bản (*Anguilla japonica*) sau khi tiêm một liều hCG [123]. Trên một số loài cá chép Trung Quốc, hCG thường được dùng ở liều 1.500-2.000 IU/kg cá bố mẹ với thời gian hiệu ứng khoảng 5-6 giờ [138]. Ở một số loài cá mú (*Epinephelus spp.*), liều hCG dùng dao động trong khoảng 500-1.000 IU/kg và thường được tiêm 2-3 lần với thời gian hiệu ứng 12-24 giờ [87]. Đối với cá lóc bông (*Channa micropeltes*) để kích thích sinh sản, hCG có thể tiêm 2.000-3.000 IU/kg cho cá đực và 500 IU/kg cho cá cái và tiêm cá đực trước khi tiêm cá cái [30]. Tuy nhiên nếu cá cái được tiêm 1.000 IU/kg thì cho sức sinh sản tốt hơn so với liều 1.500 IU/kg [20]. hCG có khả năng kích thích sinh sản cá Leo với liều lượng từ 2.000-5.000 IU/kg [16]. Một trong những ưu điểm của hCG là nó ảnh hưởng nhanh hơn vì tác động trực tiếp lên tuyến sinh dục, kích thích thành thực, rụng và đẻ trứng [89].

Việc sử dụng hCG bộc lộ một số trở ngại nhất định. hCG là một peptide lớn và khi cá được tiêm hCG, chúng có thể phát triển các kháng thể chống lại [69, 107, 225]. Ở những lần tiêm tiếp theo, khi cá được tiêm hCG với liều tương tự, chúng sẽ hình thành phản ứng miễn dịch và hCG sẽ bị trung hòa miễn dịch. Như vậy để kích thích cá đẻ trứng thì cần phải tiêm liều cao hơn cho những lần sau. Một trong số ít các nghiên cứu về kháng nguyên hCG đã thực hiện trên cá Vàng và cá mè trắng [210]. Kết quả nghiên cứu kết luận rằng dù tiêm nhiều lần hCG, nhưng vẫn không tìm thấy các kháng thể của hCG. Bằng phương pháp ELISA, người ta cũng đã phát triển các kháng thể đặc hiệu cho hCG để phản ứng lại với hCG ngoại sinh trên cá *Morone saxatilis* [227]. Kháng thể của hCG xuất hiện trong máu của cá sau khi tiêm 17 ngày với liều

500 IU/kg. Hàm lượng kháng thể hCG đạt cực đại sau khi tiêm 1 tháng và duy trì ít nhất trong 60 ngày. Nhằm đánh giá sâu hơn kháng thể hCG, người ta tiêm lần 2 ở ngày thứ 60 và kết quả cho thấy kháng thể hCG miễn dịch rất mạnh và như vậy ở cá đã phát triển kháng thể chống lại hCG [227].

1.12.2. GnRH-A, chất kháng Dopamin và phương pháp LinPe

GnRH-A được sử dụng rộng rãi trong sinh sản nhân tạo vì các loại GnRH-A làm tăng hiệu quả đáng kể so với các GnRH tự nhiên. Nghiên cứu đầu tiên trên cá cái cho thấy GnRH tự nhiên và GnRH-A có hiệu quả trong việc kích thích sự phát triển buồng trứng, thành thực và rụng trứng ở liều lượng 1-15 mg GnRH/kg cá bố mẹ, hoặc 1-100 mg GnRH-A/kg [69, 225, 226]. Một số loài cá không thành thực trong điều kiện nuôi nhốt vẫn có thể tổng hợp và tiết KDT nội sinh nếu được tiêm GnRH tự nhiên hoặc GnRH-A với liều lượng thích hợp. Điều này khẳng định tính hiệu quả của GnRH tự nhiên và GnRH-A trên các loài cá nuôi.

Mặc dù việc sử dụng GnRH tự nhiên có tác động nhanh chóng làm tăng KDT trong máu ở nhiều loài cá, nhưng thời gian GnRH tự nhiên tồn tại trong máu lại khá ngắn [62, 144, 224, 225]. Các GnRH tự nhiên chỉ tồn tại trong máu khoảng 5 phút, trong khi đó các GnRH-A có thể tồn tại khoảng 20 phút. Do đó, các GnRH-A có khả năng kéo dài thời gian kích thích tuyến yên tiết KDT khoảng 24-72 giờ tùy thuộc vào loài và nhiệt độ môi trường nước [62, 86]. Các GnRH tự nhiên khi tiêm vào bị phân giải rất nhanh do các enzyme endopeptidase có mặt trong tuyến yên, gan và thận của cá [223]. Các enzyme này thường phá vỡ cấu trúc của phân tử GnRH tự nhiên, đặc biệt ở các vị trí amino acid thứ 5-6 và thứ 9-10 làm cho phân tử nhỏ hơn và trở nên không còn hoạt tính.

Bằng cách thay thế các vị trí aa thứ 6 của GnRH tự nhiên bằng một dextrorotatory (D) aa và vị trí thứ 10 bằng nhóm ethylamide, người ta có thể tổng hợp được một GnRH-A và có thể chống lại sự phân giải của enzyme [80, 215, 217]. Do đó, GnRH-A tồn tại trong máu lâu hơn và kéo dài hoạt tính kích thích phóng thích KDT từ tuyến yên so với các GnRH tự nhiên. Do chúng được thay thế các aa tại một số vị trí trong cấu trúc nên các GnRH-A được tăng cường ái lực liên kết với các thụ thể GnRH của tuyến yên [68, 81, 148]. Sự kết hợp giữa việc tăng cường ái lực với các thụ thể

GnRH và khả năng đề kháng lại các enzym phân hủy đã làm cho các GnRH-A tăng hiệu quả trong khoảng 30-100 lần so với GnRH [60, 157, 225]. Vì tính hiệu quả của nó nên các GnRH-A đã được sử dụng rộng rãi và nhanh chóng thay thế các loại hormone khác trong sinh sản nhân tạo.

Một trong số các GnRH-A đã được thử nghiệm trên cá [61, 154, 225]. Các GnRH-A được sử dụng khá phổ biến hiện nay là [D-Ala6,Pro9,Net]-mGnRH ở động vật có vú và [D-Arg6,Pro9,NET]-sGnRH ở cá Hồi. Hai loại này có cùng chức năng trên cá *Sparus auratus* [225, 226], trong khi đó [D-Arg6,Pro9,NET]-sGnRH có hoạt tính mạnh hơn ở cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) [66] và cá vàng [154]. Do [D-Ala6,Pro9,Net]-mGnRH được tổng hợp bằng các kỹ thuật tiên tiến trong y khoa nên được sử dụng phổ biến rộng rãi và rẻ hơn so với [D-Arg6,Pro9,NET]-sGnRH. Do vậy, [D-Ala6,Pro9,Net]-mGnRH là hormone được sử dụng nhiều trong nghiên cứu và sinh sản nhân tạo. Việc sử dụng các GnRH-A trong NTTS đã làm thay đổi đáng kể trong công tác quản lý đàn cá bố mẹ và sinh sản nhân tạo và việc sử dụng GnRH-A được xem như là một công cụ rất hiệu quả và không thể thiếu đối với các trại sản xuất giống nhân tạo. GnRH-A cũng có thể được tổng hợp ở dạng viên nén và cấy dưới da của cá bố mẹ. Phương pháp này cho thấy một số ưu điểm như kéo dài thời gian kích thích [76], rẻ tiền và hạn chế stress cho cá [29]. Bên cạnh đó, một số công trình đã thực hiện vào đầu những năm 1990 cho thấy tiềm năng của việc sử dụng GnRH-A thông qua cho ăn [121, 190, 194], mặc dù kết quả cho thấy nhiều hứa hẹn nhưng phương pháp này vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ và ứng dụng rộng rãi trong sinh sản nhân tạo.

Bảng 1.1. Một số loại GnRH-A được sử dụng trong sinh sản nhân tạo cá [3]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
mGnRH-A	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<i>D-Ala</i>	Leu	Arg	Pro-NHC ₂ H ₅
sGnRH-A	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<i>D-Arg</i>	Trp	Leu	Pro-NHC ₂ H ₅
cGnRH-A	pGlu	His	Trp	Ser	His	<i>D-Arg</i>	Trp	Tyr	Pro-GlyNH ₂
Buserelin	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<i>D-Ser</i>	Leu	Arg	Pro-NHC ₂ H ₅

Các chất kháng Dopamin thường được sử dụng kết hợp với GnRH-A trong sinh sản nhân tạo [156]. Ở một vài loài cá, Dopamin tác động ở tuyến yên bằng cách ức chế tiết KDT và làm yếu đi hoạt tính của GnRH lên tuyến yên. Trong sinh sản nhân tạo, sử dụng kết hợp GnRH-A và chất kháng Dopamin, tiêm GnRH-A bằng hai lần và các chất kháng Dopamin (domperidone, pimozide, reserpine và metoclopramide) được tiêm một lần ở lần đầu cùng với GnRH-A. Việc tiêm chất kháng Dopamin ở thời điểm này nhằm loại bỏ sự ức chế tiết KDT và tăng cường hiệu quả ảnh hưởng cho lần tiêm thứ 2 lên quá trình tiết KDT. Sự ức chế của Dopamin được chứng minh trên các loài cá họ chép và cá trê phi [208] nhưng lại không thấy trên hầu hết các loài cá biển có giá trị kinh tế [58, 113, 228]. Cường độ ảnh hưởng ức chế của Dopamin thay đổi theo chu kỳ sinh sản và mặc dù vậy nó ảnh hưởng mạnh ở cá vàng trong mùa sinh sản [155, 208], nhưng lại ảnh hưởng ít ở một số loài cá khác trong mùa sinh sản [122]. Kết quả là phương pháp kích thích sinh sản sử dụng GnRH-A và chất kháng Dopamin đã được sử dụng nhiều ở các loài họ cá chép [156, 157].

Phương pháp LinPe là phương pháp sử dụng tổ hợp hai hoạt chất để kích thích sinh sản bao gồm GnRH-A và chất kháng Dopamin. Thành phần của tổ hợp gồm hai hoạt chất nói trên thường được thiết lập dựa vào kinh nghiệm của người sử dụng. Trên thị trường các biệt dược có tên như Ovaprim và Ovopel là những chất kích thích cá sinh sản. Ovaprim (sản phẩm của Canada) bao gồm 20 microgram sGnRH-A và 10 mg Domperidon được pha trong 1 ml propylen glycol. Đây cũng là liều quyết định thường dùng cho 1 kg cá cái. Ovopel (sản phẩm dạng viên của Hungary) là tổ hợp của 18-20 microgram LHRH-A và 8-10 mg Metoclopramid, đủ dùng trong một liều quyết định kích thích 1 kg cá cái đẻ.

1.12.3. Hormone steroid

Đầu những năm 1950, các hormone steroid ngoại sinh đã được chứng minh là có khả năng gây chín và rụng trứng trên nhiều loài cá. Một trong số đó là cá Chạch (*Misgurnus fossilis*) đã chín và rụng trứng khi được tiêm Methyltestosterone và Progesteron ngoại sinh. Sau đó hàng loạt các công trình tiếp theo nghiên cứu sử dụng các loại hormone steroid ngoại sinh khác như DOC, Hydrocortison cho cá nheo mang túi (*Heteropneustes fossilis*), Oxyprogesteron cho cá mè trắng, Hydroxyprogesteron cho cá trê phi (*Clarias gariepinus*), Cortexolon cho cá chép, DOCA cho cá trê phi [1]. Tuy nhiên cho đến nay việc ứng dụng hormone steroid trong sinh sản nhân tạo các loài

cá nuôi trên thế giới vẫn còn rất hạn chế. Ở nước ta, hầu hết các công trình nghiên cứu cũng như sử dụng hormone steroid trong sinh sản nhân tạo chủ yếu trên các loài cá nước ngọt như cá chép, trê phi, bống tượng, mè hoa, mè trắng và Mrigal của các tác giả Nguyễn Tường Anh, Phạm Văn Khánh và Thái Thanh Bình vào những năm 1997-1998 [1]. Tuy nhiên các kết quả trên đều chưa được công bố rộng rãi cũng như chưa được ứng dụng nhiều trong sản xuất giống, đặc biệt trên các loài cá biển. Các hormone steroid mà nhóm tác giả trên sử dụng chủ yếu là P, 17P và 17,20 β -P.

Gần đây, một số công trình nghiên cứu sử dụng các hormone steroid nhóm C21 (chủ yếu là 17P và 17,20P) đã được thử nghiệm cho đẻ thành công trên cá tra và cá hủ [4], cá mè vinh và cá he vàng [3], cá trắm cỏ [8], cá trôi Ấn Độ *Labeo rohita* [9] và cá chép [10, 15]. Kết quả thu được đầy hứa hẹn từ các công trình nghiên cứu nêu trên đã cho thấy tiềm năng rất lớn của các hormone steroid trong sản xuất giống nhân tạo. Tuy nhiên có thể nói những nghiên cứu trên chỉ mới dừng lại ở mức độ thử nghiệm quy mô nhỏ mà chưa được ứng dụng trong sản xuất giống quy mô lớn. Vì vậy cần phải có những công trình nghiên cứu trên quy mô sản xuất, so sánh hiệu quả kinh tế của hormone steroid với các loại hormone khác và hoạt tính sinh học của chúng mới có thể đưa hormone steroid áp dụng trong sản xuất giống.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

- **Đối tượng nghiên cứu:** Cá dìa *Siganus guttatus* (Bloch, 1787)

Vị trí phân loại:

Giới: Animalia

Ngành: Chordata

Lớp: Actinopterygii

Bộ: Perciformes

Họ: Siganidae

Giống: *Siganus*

Loài: *Siganus guttatus* (Bloch, 1787)

Tên tiếng Việt: Cá dìa

Tên tiếng Anh: Golden rabbitfish, Orange - spotted Spinefoot.



Hình 2.1. Hình thái cá dìa

- **Thời gian nghiên cứu:** Từ tháng 5/2017 – 5/2021

- **Địa điểm nghiên cứu:**

+ Viện Nuôi trồng Thủy sản (Trường Đại học Nha Trang).

+ Trung tâm Thí nghiệm Thực hành (Trường Đại học Nha Trang).

+ Địa điểm thu mẫu và bố trí thí nghiệm: Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa ($12^{\circ}52'15''\text{N}$, $108^{\circ}40'33''\text{E}$).

- Vật liệu nghiên cứu

Đàn cá địa bố mẹ tuổi 1+, không dị tật hay có dấu hiệu của bệnh, khỏe mạnh, màu sắc đặc trưng của loài, được nuôi trong ao đất có diện tích 100 m^2 , độ sâu 1,2 m tại Cam Ranh, Khánh Hòa ($12^{\circ}52'15''\text{N}$, $108^{\circ}40'33''\text{E}$), tỷ lệ đực và cái là 1:1, mật độ nuôi 3 con/m^2 . Nhiệt độ nước trong ao ở mùa xuân $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và $29 \pm 3^{\circ}\text{C}$ vào mùa hè, độ mặn $29 \pm 3\text{‰}$, pH 7,8 – 8,6 và oxy hòa tan (DO) $4 \pm 0,5\text{ mg/L}$. Mỗi tuần thay nước từ 20 – 30% lượng nước có trong ao. Cá được cho ăn hàng ngày bằng thức ăn công nghiệp cho cá biển với thành phần protein 42%, lipid 6%, tro 16%, chất xơ 3% và độ ẩm 11% với tỷ lệ 2 – 3% trọng lượng thân.



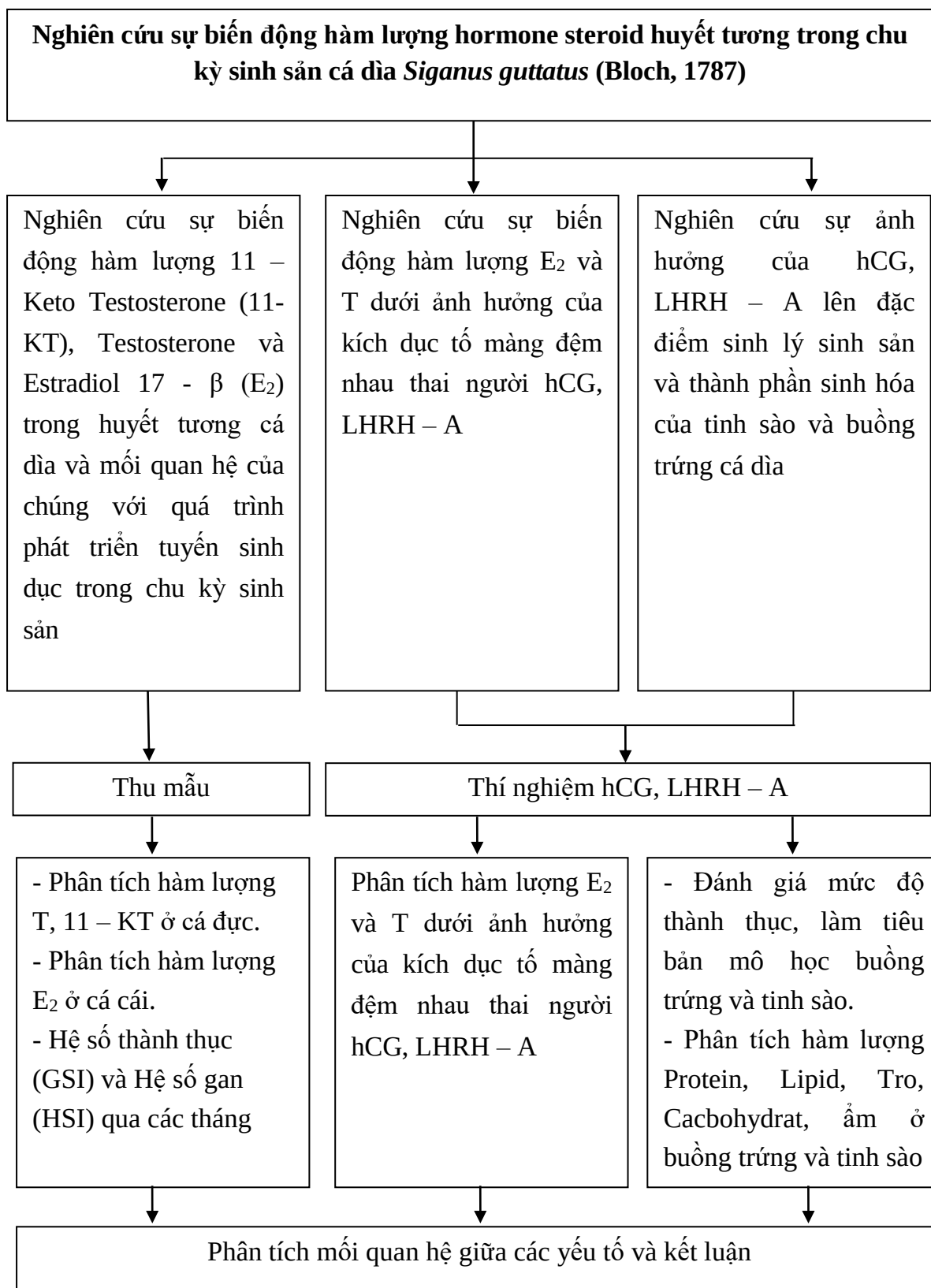
Hình 2.2. Lồng nuôi giữ cá địa để thu mẫu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Giả thuyết và sơ đồ khối nội dung nghiên cứu

Hoạt động sinh sản ở cá chịu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường và sự điều khiển của thần kinh nội tiết. Vì vậy, nghiên cứu sự biến động hàm lượng hormone steroid trong huyết tương và sự phát triển của tuyến sinh dục trong chu kỳ sinh sản tự nhiên là cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng.

2.2.1.1. Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu



Hình 2.3. Sơ đồ khối mô tả các nội dung nghiên cứu của luận án

2.2.1.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Hormone steroid trong chu kỳ sinh sản

Hàng tháng, 10 mẫu cá đực và 10 mẫu cá cái được bắt ngẫu nhiên để thu mẫu máu, tuyến sinh dục, đo kích thước và cân trọng lượng. Chiều dài toàn thân và trọng lượng đối với cá bố mẹ lần lượt là 24 ± 2 cm và 520 ± 60 g. Thu mẫu máu, sau đó ly tâm để tách huyết tương và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi phân tích hàm lượng E_2 ở cá cái và T, 11-KT ở cá đực.

Thí nghiệm 2: Sự biến động của E_2 và T dưới ảnh hưởng của hCG, LHRH – A

Trong thí nghiệm này, đàn cá địa bố mẹ với 120 cá thể tuổi 1+, có chiều dài toàn thân và trọng lượng lần lượt là 30 ± 4 cm và 550 ± 80 g.

Nghiem thức 1 (Đối chứng): 1ml nước muối sinh lý/kg cá cái

Nghiem thức 2 (hCG): 1.500 IU/kg cá cái

Nghiem thức 3 (LHRH – A + DOM): 50 μg + 5 mg/kg cá cái

Sau khi tiêm, cá được thả vào bể 4 m^3 , nhiệt độ nước, độ mặn, pH và oxy hòa tan lần lượt là $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $32 \pm 2\text{‰}$, 7,8 – 8,6 và $5 \pm 0,5$ mg/L. Không cho cá ăn trong thời gian tiến hành thí nghiệm. Ở mỗi nghiệm thức sau khi tiêm, tất cả cá đều được bắt để thu mẫu máu ở các thời điểm 6, 12, 24 và 48 giờ. Mẫu máu sau khi thu được ly tâm để tách huyết tương và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi phân tích hàm lượng T và E_2 .

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của hCG, LHRH–A lên đặc điểm sinh lý sinh sản và thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng.

Đàn cá trước khi tiêm được giải phẫu ngẫu nhiên 10 cá để đánh giá mức độ thành thực của tuyến sinh dục. Đàn cá dùng cho thí nghiệm này có chiều dài và khối lượng toàn thân trung bình lần lượt là: cá đực $30,64 \pm 1,03$ cm và $524,55 \pm 84,54$ g; cá cái là $31,22 \pm 2,28$ cm và $606,67 \pm 104,04$ g, màu sắc tự nhiên, bơi lội bình thường, linh hoạt, không dị tật, dị hình và không có biểu hiện bệnh, sau đó được thuần dưỡng 10 ngày trong bể xi măng 4 m^3 với mật độ 6 con/ m^3 (3kg/ m^3) trước khi được đưa vào tiêm hormone. Cá được cho ăn hàng ngày bằng thức ăn công nghiệp dùng cho cá biển với thành phần protein (42%), lipid (6%), tro (16%), chất xơ (3%) và độ ẩm (11%) với tỷ lệ 2-3 % khối lượng thân. Nhiệt độ nước, độ mặn, pH và oxy hòa tan trong bể nuôi lần lượt là $28\text{--}32^{\circ}\text{C}$, 29-34 ‰, 7,8-8,6 và 4,5-5,6 mg/l.

Thí nghiệm được bố trí với 3 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 20 cá thể:

Nghiem thức 1: cá được tiêm 1.500 IU hCG/ kg cá

Nghiem thức 2: cá được tiêm 50 µg LHRH-A + 5 mg DOM/kg cá

Nghiem thức 3 (đối chứng): cá được tiêm 1 ml nước muối sinh lý/kg cá

Sau khi tiêm, cá được đưa vào bể và duy trì các yếu tố môi trường giống như trước khi tiêm hormone. Cá thí nghiệm ngừng cho ăn sau khi tiêm hormone.

Trước khi tiêm hormone, chúng tôi giải phẫu ngẫu nhiên 10 cá cái và 10 cá đực để đánh giá mức độ thành thục của buồng trứng và tinh sào, cũng như xác định một số đặc điểm sinh lý, sinh học sinh sản. Sau khi cá được tiêm hormone, 12 giờ và sau 24 giờ, chúng tôi tiến hành giải phẫu, đánh giá mức độ thành thục và phân tích thành phần sinh hóa của buồng trứng và tinh sào để so sánh với trước khi tiêm.

2.2.2. Thu và phân tích mẫu

2.2.2.1. Phương pháp thu và cố định mẫu

Thu mẫu định kỳ 1 lần/tháng, số lượng cá thể ít nhất 10 con/lần. Cá được gây mê bằng nước đá và lấy mẫu máu ngay tại ao nuôi, mẫu máu (3ml) được bảo quản trong thùng xốp chứa sẵn đá để vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sau khi lấy máu, tiến hành cân khối lượng từng cá thể và đo chiều dài để có cơ sở đánh giá sự biến động của E_2 , T và 11-KT có liên quan đến chiều dài và khối lượng cơ thể cá hay không, sự thành thục của cá trong chu kỳ sinh sản có liên quan đến chiều dài và khối lượng hay không,... ghi chép số liệu thu mẫu để xác định các chỉ tiêu về chiều dài và khối lượng.

Cá được giải phẫu lấy tuyến sinh dục và gan mang đi cân khối lượng để xác định hệ số gan và hệ số thành thục. Buồng trứng được cố định trong dung dịch formol 10% để tiến hành làm tiêu bản mô học tuyến sinh dục và phân tích các thành phần sinh hóa trong trứng. Tất cả các mẫu đã được lấy sẽ được đưa về phòng thí nghiệm đặt trong tủ đông -80°C , đảm bảo thời gian nhanh nhất để không ảnh hưởng đến việc chất lượng các mẫu đã được lấy.

2.2.2.2. Phương pháp xác định các chỉ tiêu sinh học sinh sản

Hệ số thành thực (GSI-Gonadosomatic index): Xác định theo phương pháp của Qasim (1973) [168] và King (2001) [100]. Là tỷ lệ phần trăm giữa khối lượng tuyến sinh dục và khối lượng toàn bộ cơ thể cá, được tính bằng công thức:

$$GSI = \frac{GW}{BW} \times 100\%$$

Trong đó: - GSI: Hệ số thành thực (%);

- GW: Khối lượng tuyến sinh dục (g);

- BW: Khối lượng cơ thể không nội quan (g).

Hệ số gan (HSI-Hepatosomatic index): Là tỷ lệ phần trăm giữa khối lượng gan và khối lượng toàn bộ cơ thể cá, được tính bằng công thức:

$$HSI = \frac{HW}{BW} \times 100\%$$

Trong đó: - HSI: Hệ số gan (%);

- HW gan: Khối lượng gan (g);

- BW: Khối lượng cơ thể không nội quan (g).

Sức sinh sản tuyệt đối (AF - Absoluted fecundity): xác định theo phương pháp Laurence & Briand (1990) [109]. Là toàn bộ số trứng trong buồng trứng ở giai đoạn IV.

Sức sinh sản tương đối (RF- Relative fecundity): Xác định theo phương pháp của King (2001) [100]. Là số trứng trên một đơn vị khối lượng cơ thể, theo công thức sau:

$$RF = \frac{AF}{BW} \text{ (trứng/g)}$$

2.2.2.3. Phương pháp làm tiêu bản tổ chức tuyến sinh dục và đọc kết quả

+ Phương pháp làm tiêu bản tổ chức tuyến sinh dục:

Tuyến sinh dục sau khi được cố định trong formaldehyde 10% sẽ được tiến hành làm tiêu bản tổ chức học, quy trình được tiến hành qua 5 bước như sau:

Chuẩn bị mẫu: Mẫu tuyến sinh dục được đưa ra khỏi dung dịch cố định, rửa và rút nước bằng cách ngâm trong cồn tuyệt đối khoảng 4-8 giờ, tiếp theo, ngâm trong

methyl salicylate 12-24 giờ. Sau cùng, mẫu được thấm trong parafin nóng chảy ở 65°C trong thời gian ít nhất 6 giờ.

Đúc mẫu trong parafin: Sử dụng máy đổ parafin đã nóng chảy vào khuôn đã chứa mẫu, để trên dàn lạnh khoảng 30 phút cho mẫu parafin đông cứng lại. Dùng dao gọt khối parafin chứa mẫu thành hình thang hoặc hình chữ nhật để dễ cắt lát.

Cắt lát mẫu: Dùng dao gọt khối parafin chứa mẫu thành hình thang hoặc hình chữ nhật để dễ cắt lát. Khối parafin được gắn lên đế gỗ sau đó đế gỗ được gắn vào máy microtome, cắt lát có độ dày 5 -7 μm . Đưa lát cắt vào nước ấm (40 – 45°C) khoảng 1-2 phút để lát cắt giãn, không bị nhăn. Dùng lam sạch lấy lát cắt ra khỏi nước và sấy trên máy sấy ở nhiệt độ từ 45 – 60°C trong 1 – 4 giờ.

Nhuộm Hematoxin và Eosin: Tiếp theo, mẫu được khử parafin bằng cách ngâm trong dung dịch xylen và làm trương nước bằng cách nhúng trong dung dịch ethanol ở các nồng độ khác nhau khoảng 2-3 phút, bằng dung dịch Xylen I và Xylen II lần lượt mỗi dung dịch trong 5 phút, bước 2 là làm mẫu trương nước bằng cách nhúng trong dung dịch Ethanol ở các nồng độ khác nhau khoảng 2-3 phút (Ethanol 100% từ 2 - 3 phút, Ethanol 95% từ 2 - 3 phút, Ethanol 80% từ 2 - 3 phút, Ethanol 50% từ 2 - 3 phút, mỗi nồng độ sẽ lặp lại 2 lần). Mẫu được nhúng nước 3 - 6 lần. Cuối cùng, mẫu được nhuộm trong dung dịch Hematoxin - Mayer trong 4 - 6 phút rồi rửa qua nước chảy nhẹ 4 - 6 phút và nhuộm Eosin trong 2 phút.

Làm trong mẫu: Để thuận tiện trong việc quan sát, các tiêu bản được ngâm trong dung dịch Xylen I, II trong 2 - 3 phút, để khô và đặt lamên bằng keo dán Baume (Canada). Ghi nhãn trên lamên là khâu cuối cùng của quy trình.

+ Đọc kết quả trên kính hiển vi:

Tiêu bản tổ chức học tuyến sinh dục sẽ được quan sát trên kính hiển vi Olympus, ở vật kính 10. Đường kính noãn bào được đo bằng thước vi thị kính gắn trên thị kính, ở vật kính 10. Kích thước noãn bào ở mỗi pha được đo trên 15 noãn bào, và được tính theo công thức:

$$L = 0.1 * (A/n)$$

Trong đó: L: Chiều dài thực của noãn bào (mm)

A: Số vạch đếm được trên thước vi thị kính

n: Bội giác của vật kính

2.2.2.4. Phương pháp phân tích hàm lượng hormone steroid huyết tương

Trong nghiên cứu này, E₂, T và 11-KT trong huyết tương cá diều được phân tích bằng phương pháp miễn dịch liên kết enzyme (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*: ELISA). EIA Kit hormone steroid từ nhà sản xuất (*Enzyme Immuno Assay*: EIA) Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Phương pháp ELISA lợi dụng sự liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên (antigen) và kháng thể (antibody) để tạo thành cộng hợp kháng nguyên, kháng thể. Cộng hợp kháng nguyên – kháng thể này sẽ tiếp hợp với kháng thể thứ 2 được đánh dấu bằng enzyme *Acetylcholinesterase* (AChE). Phức hợp này sẽ được phát hiện bằng chất hiện màu (Ellman's Reagent) và đo mật độ quang trên máy quang phổ 96 giếng (Thermo Multiskan EX, Hà Lan) ở bước sóng 405 nm.



Hình 2.4. Bộ KIT Estradiol, Testosterone và 11-KT ELISA

Phương pháp phân tích được tóm tắt theo trình tự các bước thực hiện như sau:

(1) Dung dịch đệm EIA (EIA buffer) và dung dịch rửa (Wash buffer): Hòa tan 10 ml dung dịch đệm EIA đậm đặc với 90ml nước tinh khiết (Merck, Đức). Hòa tan 5ml dung dịch rửa đậm đặc với 2.000ml nước tinh khiết. Sau đó, hòa tan 1 ml Tween 20 vào dung dịch rửa này trước khi sử dụng. Bảo quản các dung dịch này ở nhiệt độ 4°C.

(2) Mẫu huyết tương: Lấy 0,5 ml mẫu huyết tương hòa tan với 2,5 ml diethyl ether và lắc đều trên máy Vortexer. Để yên trong khoảng 5-10 phút, hỗn hợp sẽ được tách biệt thành 2 lớp. Dùng pipet hút lấy phần dung dịch ở lớp trên trong suốt, đó là lớp ether có chứa hormone steroid, cho vào trong ống nghiệm mới và lặp lại quy trình lần thứ 2 tương tự. Sau khi chiết xuất được phần ether có lẫn hormone steroid, cho bay hơi hết ether, hormone steroid còn lại sẽ lắng tụ ở đáy và thành của ống nghiệm. Đưa

0,5 ml dung dịch đậm EIA vào ống nghiệm và lắc đều, đảm bảo hòa tan được hormone steroid với dung dịch đậm EIA.



Hình 2.5. Máy ly tâm sử dụng trong nghiên cứu

(3) Hormone steroid chuẩn: Dùng pipet lấy 100 μ l hormone steroid chuẩn trong bộ kit của nhà cung cấp cho vào ống nghiệm sạch. Sau đó hòa tan hormone steroid chuẩn này với 900 μ l nước tinh khiết bằng máy lắc đảo Vortexer. Sau đó chuẩn bị 8 ống nghiệm sạch và đánh dấu từ 1 đến 8. Đưa 900 μ l dung dịch đậm EIA vào ống nghiệm số 1 và 500 μ l dung dịch đậm EIA vào các ống nghiệm 2 đến 8. Chuyển 100 μ l hormone steroid chuẩn đã hòa tan vào ống nghiệm 1 lắc đều, sau đó lấy ra 500 μ l đưa vào ống nghiệm 2 và lắc đều. Tiếp theo, lấy ra 500 μ l từ ống nghiệm 2 và đưa vào ống nghiệm 3 và lắc đều. Tương tự như vậy, thực hiện cho đến ống nghiệm thứ 8. Cuối cùng ta có dung dịch chuẩn với 8 nồng độ khác nhau. Dung dịch đánh dấu (hormone steroid AchE Tracer) pha chế bằng cách hòa tan 100 dtn hormone steroid với 6mL EIA buffer. Kháng nguyên (hormone steroid EIA antiserum) cũng được pha chế bằng cách hòa tan 100 dtn hormone steroid antiserum với 6ml EIA buffer.



Hình 2.6. Cách pha các dung dịch hormone chuẩn ở các nồng độ khác nhau

Bảng 2.1. Nồng độ các hormone steroid chuẩn (pg/ml)

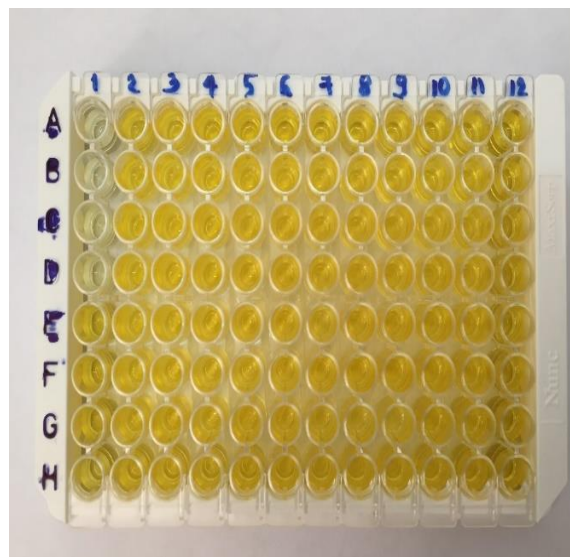
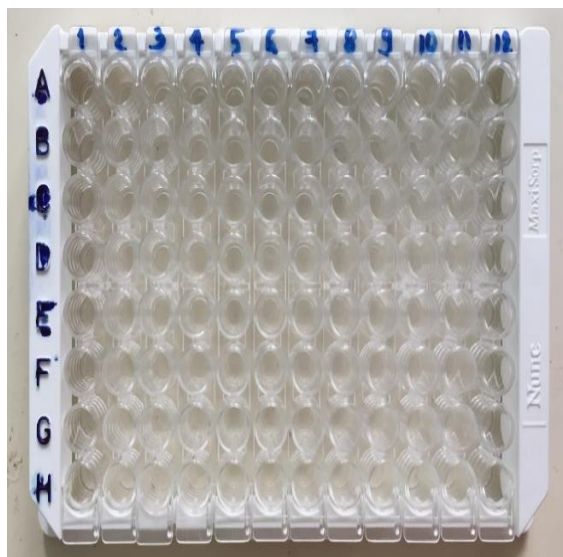
Thứ tự	1	2	3	4	5	6	7	8
Estradiol	4000	1600	640	256	102,4	41,0	16,4	6,6
Testosterone	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9
11-KT	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,95

(4) Phân tích mẫu: Dùng micropipet hút 50 μ l các dung dịch đã chuẩn bị (EIA buffer, dung dịch chuẩn, mẫu, chất đánh dấu enzyme và kháng nguyên) đưa vào đĩa nhựa 96 giếng theo sơ đồ phân tích đã bố trí sẵn. Sau đó, đĩa nhựa được ủ trên máy lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng (25-28 $^{\circ}$ C) trong thời gian 1-2 giờ tùy theo từng loại hormone steroid cần phân tích. Tiếp theo, rửa sạch các giếng và đưa cơ chất (Ellman's reagent) vào các giếng trên đĩa, tiếp tục ủ đĩa trong thời gian 60-90 phút. Cuối cùng, đo mật độ quang của các giếng trên đĩa nhựa ở bước sóng 405 nm trên máy quang phổ ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Hình 2.7. Sơ đồ bố trí các giếng

Blk (Blank): mẫu trắng, NSB (Non – Specific Binding): không có liên kết đặc trưng, B₀ (Maximum Binding): liên kết nhiều nhất, TA (Total Activity): tất cả mọi hoạt động, S1 – S8: dung dịch steroid chuẩn ở 8 nồng độ khác nhau, 1 - 24: mẫu cần phân tích.



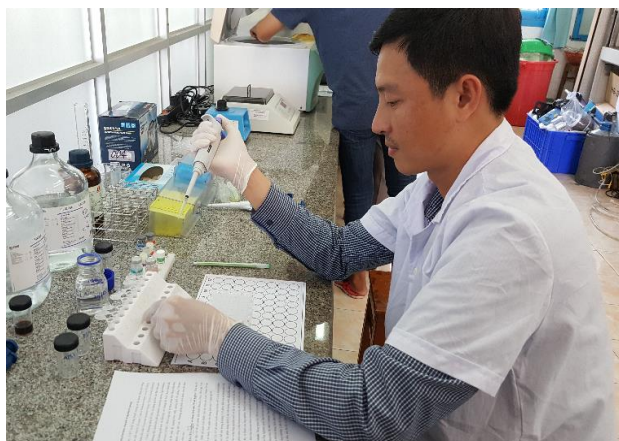
Hình 2.8. Đĩa 96 giếng trước và sau khi ủ

(Blk: Blank; NSB: Non-Specific Binding; Bo: Maximim Binding; S1-S8: Standard 1-8; A4-H6: Samples)

Trình tự đưa các dung dịch đã chuẩn bị (ELISA buffer, dung dịch estradiol 17- β chuẩn, mẫu, ELISA Tracer, ELISA Antiserum) vào đĩa 96 giếng được tóm tắt như sau:

Bảng 2.2. Trình tự đưa dung dịch vào các giếng

Well	ELISA buffer	Standard/Sample	Tracer	Antiserum
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 μ l (at devl. step)	-
NSB	100 μ l	-	50 μ l	-
Bo	50 μ l	-	50 μ l	50 μ l
Std/Sample	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l



Hình 2.9. Chiết xuất, ủ và đọc mẫu trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm

Sau đó, đĩa nhựa được ủ trên máy lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng (25-28°C) trong thời gian 1 giờ. Tiếp theo, rửa sạch các giếng bằng dung dịch ELISA wash buffer 5 lần.

Dung dịch Ellman's reagent được pha bằng cách hòa tan 20 ml nước cất với 100 dtn Ellman's reagent. Sau khi rửa xong, đưa 200 µl cơ chất này (Ellman's reagent) vào các giếng trên đĩa, và 5 µl ELISA Tracer vào giếng TA, tiếp tục ủ đĩa trong thời gian 60 phút. Cuối cùng, đo mật độ quang của các giếng trên đĩa nhựa ở bước sóng 405 nm trên máy quang phổ ELISA.

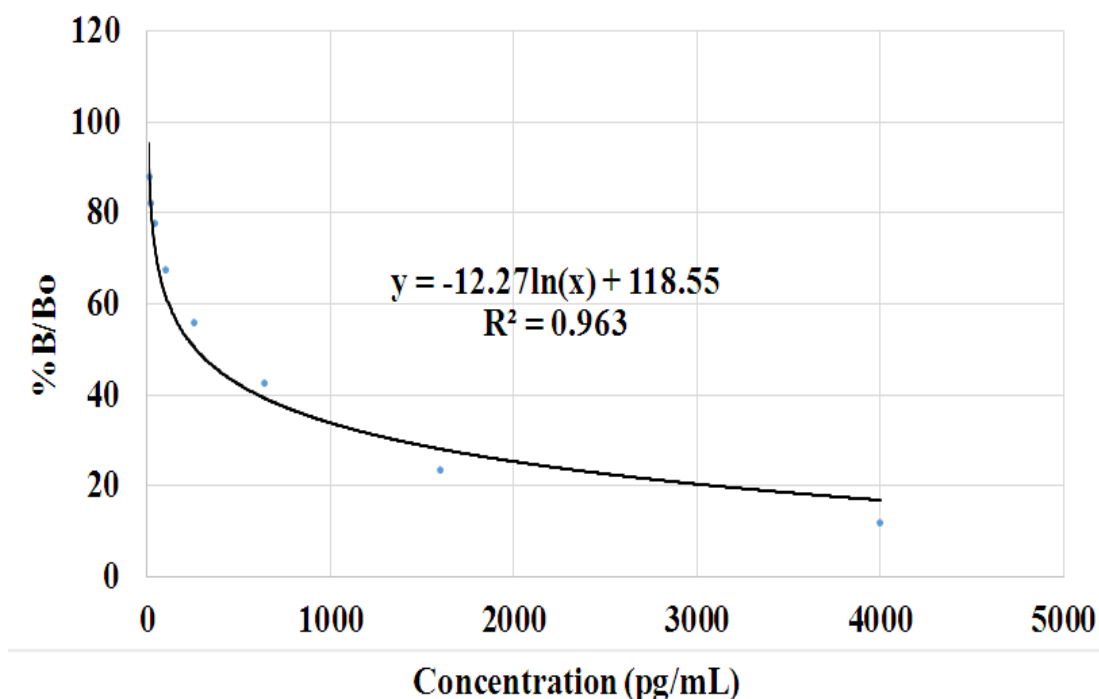
(5) Đường chuẩn và tính toán kết quả: Đường chuẩn được xây dựng trên cơ sở các nồng độ hormone steroid chuẩn (pg/ml) đã được chuẩn bị trước (X) và %B/Bo của các hormone steroid chuẩn (Y). Dựa vào phương trình $Y = a\ln(X) + b$, hàm lượng hormone steroid trong mẫu được tính theo hàm số $X = \exp((Y-b)/a)$.

Trong đó:

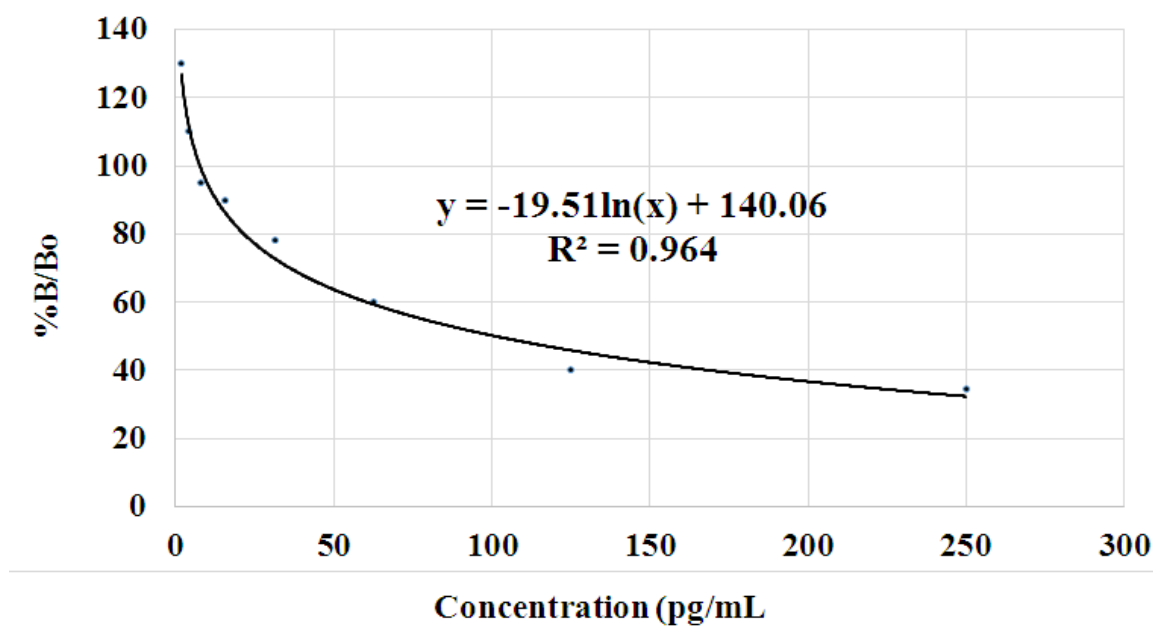
X là hàm lượng hormone steroid có trong mẫu

Y là %B/Bo của mẫu

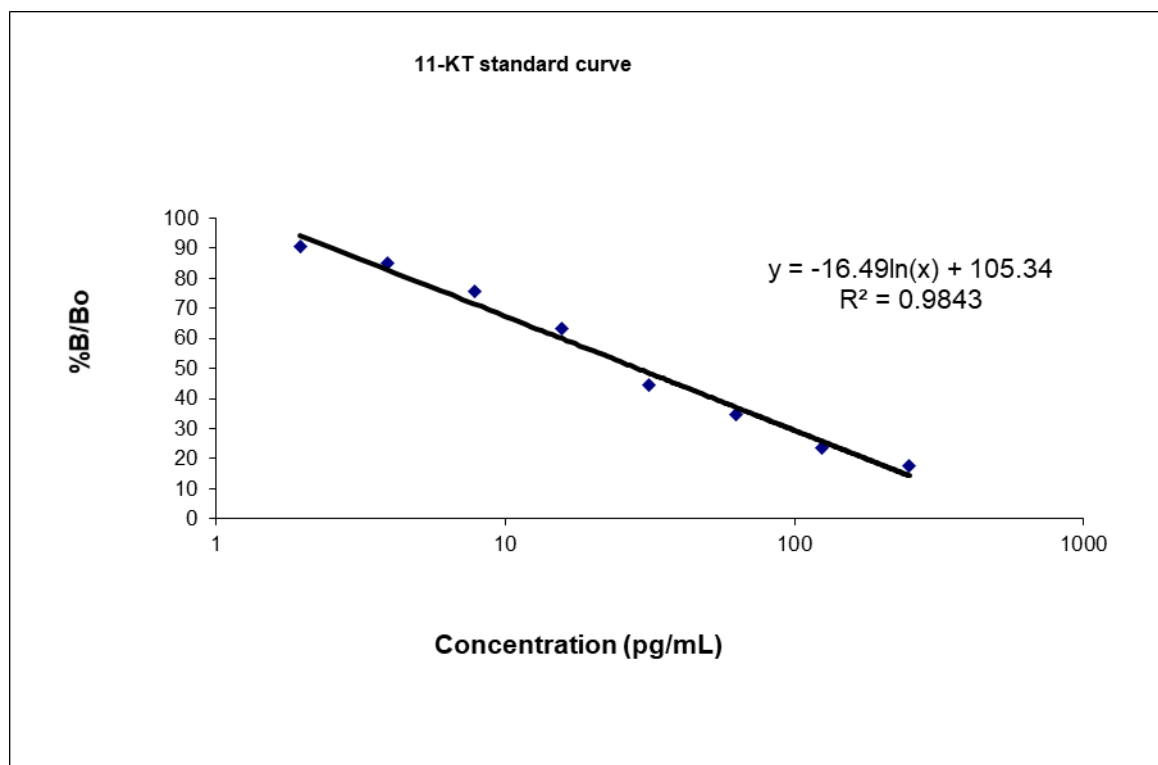
a và b là các hằng số



Hình 2.10. Đường chuẩn E₂



Hình 2.11. Đường chuẩn T



Hình 2.12. Đường chuẩn 11-KT

2.2.3. Xác định thành phần sinh hóa trứng cá địa qua các giai đoạn

Sau khi lấy mẫu làm tiêu bản tổ chức học, mẫu buồng trứng ở các giai đoạn phát triển khác nhau được mang đi phân tích thành phần sinh hóa được sấy ở nhiệt độ 60°C trong 24 giờ sau đó được nghiền mịn bằng cối sứ, mẫu nghiền xong được giữ trong điều kiện nhiệt độ -20°C cho đến khi phân tích. Thành phần đạm (protein), lipid,

tro và độ ẩm được phân tích theo phương pháp của AOAC (2000) [28] tại Trung tâm Thí nghiệm Thực hành - Trường Đại học Nha Trang.

2.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Biến động về hàm lượng hormone steroid theo tháng, các giá trị GSI, HSI và ảnh hưởng của hCG và LHRH-A đến thành phần sinh hóa của cá được phân tích theo phương pháp phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) và kiểm định Duncan với mức ý nghĩa $P < 0,05$ bằng phần mềm SPSS.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự phát triển của tuyến sinh dục và biến động hàm lượng hormone steroid của cá dià trong chu kỳ sinh sản

Môi trường và sự điều khiển của thần kinh nội tiết là các tác nhân chi phối chu kỳ sinh sản ở cá xương. Sự thay đổi mùa vụ trong năm có ảnh hưởng đến hệ thần kinh nội tiết. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, não bộ là trung tâm điều khiển hoạt động sinh sản thông qua trục Não bộ - Tuyến yên - Tuyến sinh dục. Trạng thái thành thực của cá có thể đánh giá hoặc dự báo được thông qua sự phát triển của tuyến sinh dục và những thay đổi về hàm lượng hormone steroid trong huyết tương, điều này có ý nghĩa trong công tác quản lý đàn cá bố mẹ.

3.1.1. Sự phát triển của tuyến sinh dục cá dià trong chu kỳ sinh sản

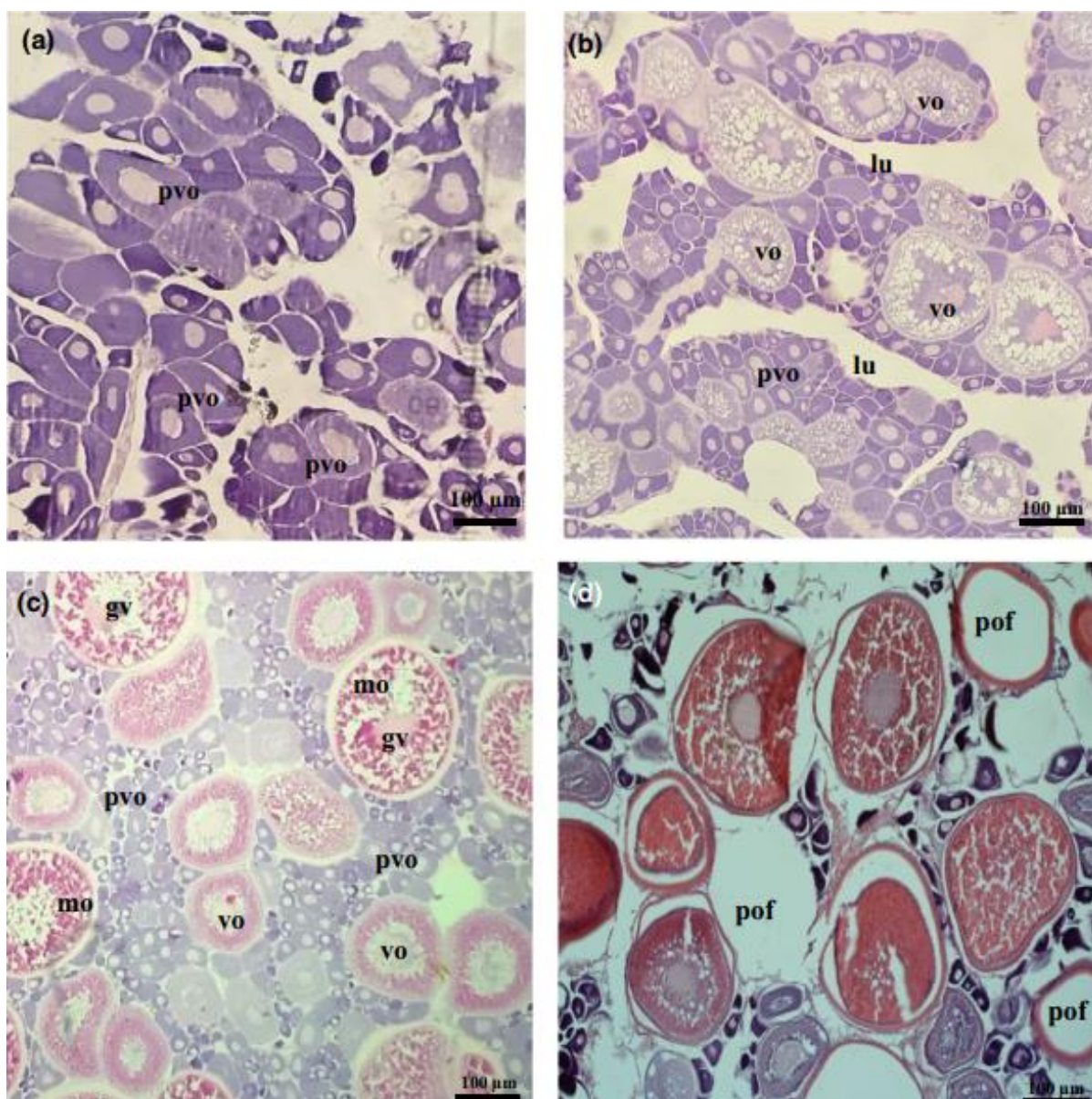
3.1.1.1. Kích thước đàn cá nghiên cứu

Đàn cá dià bố mẹ có chiều dài toàn thân (TL) dao động từ 19 – 34 cm. Chiều dài trung bình lớn nhất là $31,33 \pm 1,87$ cm và nhỏ nhất là $20,86 \pm 1,68$ cm. Khối lượng thân (BW) cá dao động từ 130 – 800 g. Khối lượng trung bình lớn nhất là $606,67 \pm 104,04$ g và nhỏ nhất là $154,29 \pm 29,92$ g. Trong thời gian nghiên cứu, kích thước đàn cá bố mẹ không thay đổi nhiều.

Đối với cá dià, cùng một thời gian và điều kiện sinh trưởng, cá cái thường có chiều dài và khối lượng tối đa lớn hơn cá đực. Tỷ lệ khối lượng trên chiều dài của cá cái thường lớn hơn cá đực. Điều này có thể nhận định rằng vào giai đoạn sinh sản cơ thể cá cái trong giai đoạn tích lũy, tích trữ năng lượng nên có xu hướng tăng lên về mặt khối lượng.

3.1.1.2. Sự phát triển của buồng trứng trong chu kỳ sinh sản

Vào mùa sinh sản, những chất dự trữ tích lũy ở các cơ quan được huy động để tổng hợp thành protein nuôi dưỡng các tế bào sinh dục phát triển, tức là nhu cầu dinh dưỡng và năng lượng cho quá trình thành thực và tạo giao tử ở cá tăng lên. Trong thời kỳ tạo giao tử, sự sinh trưởng của tuyến sinh dục tăng lên liên tục, trong khi đó sự sinh trưởng của tế bào sinh dưỡng hầu như dừng lại. Thậm chí sau khi cá ngừng ăn, nhưng tuyến sinh dục vẫn tiếp tục tích lũy lipid và protein. Vì vậy, trước khi bước vào thời kỳ sinh sản, cơ thể cá phải tích lũy năng lượng, chuẩn bị cho quá trình sinh sản.



Hình 3.1. Tổ chức buồng trứng đàn cá thí nghiệm

Hình 3.1a: Buồng trứng giai đoạn II; Hình 3.1b: Buồng trứng giai đoạn III; Hình 3.1c: Buồng trứng giai đoạn IV; Hình 3.1d: Buồng trứng giai đoạn V

Kết quả quan sát tổ chức buồng trứng ở giai đoạn II, ta nhận thấy noãn sào rỗng, vì các noãn bào đang trong quá trình sinh trưởng nguyên sinh chất, chưa đạt kích thước cực đại. Các noãn bào có nhân to nằm chính giữa, xung quanh là tế bào chất (Hình 3.1a).

Đối với giai đoạn III, ta thấy sự lớn lên của noãn bào gồm quá trình tăng thể tích nguyên sinh chất và quá trình tích lũy dinh dưỡng. Noãn sào gồm những noãn bào có chứa không bào, hạt noãn hoàng và những giọt mỡ. Nhân vẫn nằm ở tâm (Hình 3.1b).

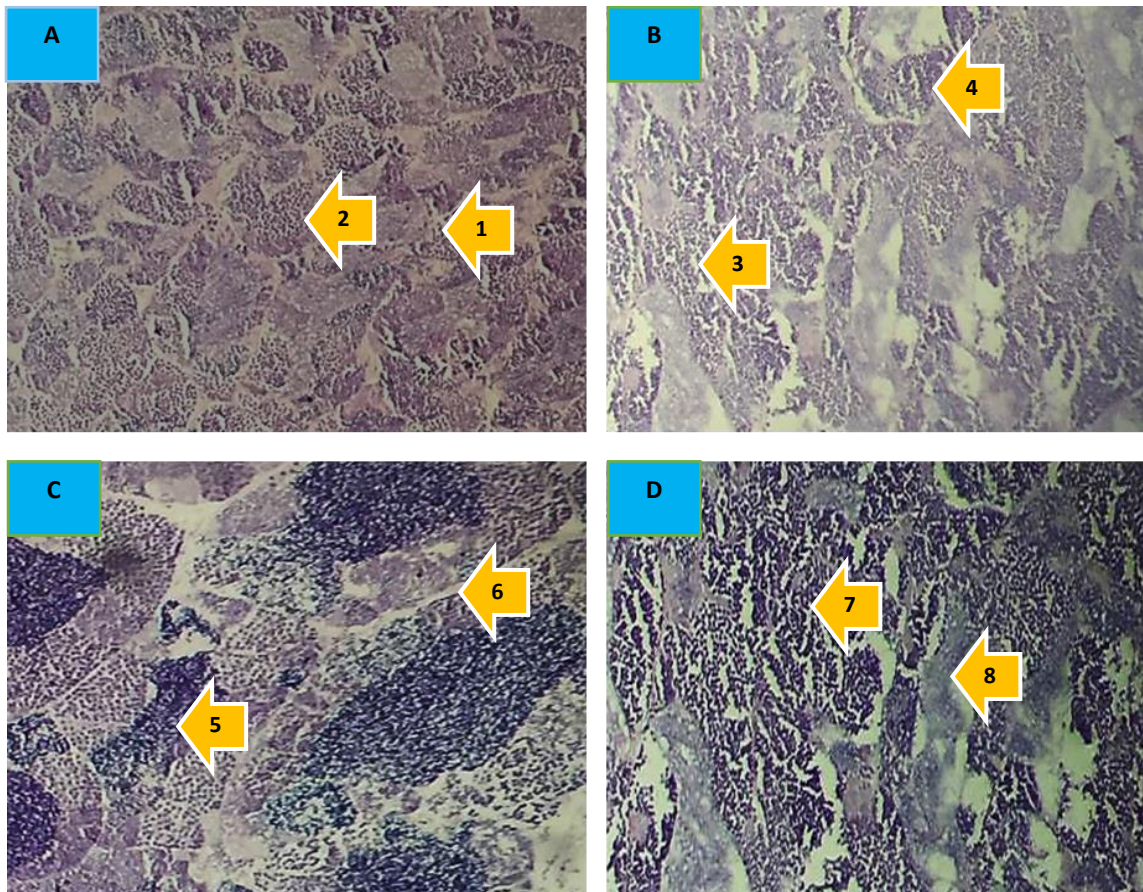
Sang giai đoạn IV, cấu trúc noãn sào trở nên chặt chẽ hơn vì các noãn bào đã thành thực, đạt kích thước cực đại. Trong các noãn bào này, nhân bắt đầu di chuyển về

cực động vật, noãn hoàng dồn về cực thực vật, màng nhân mờ và biến mất hoàn toàn. Bên cạnh đó, noãn sào còn có các noãn bào đang ở thời kỳ trước (Hình 3.1c).

Bước vào giai đoạn V, buồng trứng to, kích thước noãn bào đạt cực đại, nhân di chuyển ra ngoại biên. Trứng chín là trứng có túi mầm tan biến và sự rụng trứng là sự tách và vỡ nang trứng để đẩy trứng ra ngoài, rơi vào xoang buồng trứng hoặc xoang thân. Các tế bào trứng trở nên trong suốt (Hình 3.1d).

3.1.1.3. Sự phát triển của tinh sào trong chu kỳ sinh sản

Sự phát triển tinh sào của cá địa đực ở giai đoạn I, đặc trưng của giai đoạn này đó là tinh sào chỉ có tinh nguyên bào lớn riêng biệt nằm trong các bào nang, tinh bào chưa phát triển. Nhìn bên ngoài, tinh sào là những dải mỏng giống noãn sào ở giai đoạn I, chính vì thế rất khó để phân biệt đực cái. Giai đoạn này chỉ xuất hiện ở những cá thành thục lần đầu. Trong nghiên cứu này chưa tìm được giai đoạn này.



Hình 3.2. Các giai đoạn phát triển của tinh sào cá địa

A: Tinh sào giai đoạn II, B: Tinh sào giai đoạn III, C: Tinh sào giai đoạn IV, D: Tinh sào giai đoạn V. 1: Bào nang, 2: Tinh nguyên bào, 3: Tinh bào cấp I, 4: Tinh bào cấp II, 5: Tinh tử, 6: Mô liên kết, 7: Tinh trùng, 8: Tinh trùng được hòa loãng bởi tinh dịch

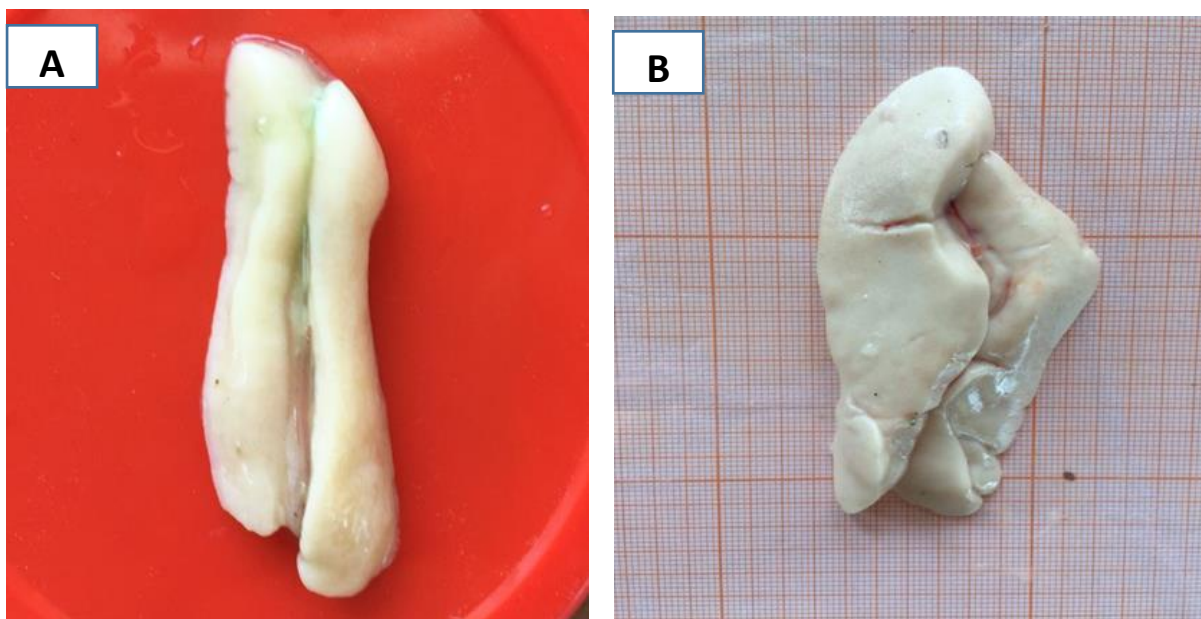
Bước sang giai đoạn II, Tinh sào tăng lên về kích thước, các tinh nguyên bào phân chia mạnh dẫn đến sự xuất hiện của các tinh bào thời kỳ I. Bên cạnh những tinh nguyên bào đang phân chia, trong tinh sào vẫn xuất hiện những tinh nguyên bào chưa phân chia. (Hình 3.2A).

Khi quan sát tinh sào giai đoạn III, tinh sào tăng lên về mặt thể tích. Trong các ống sinh tinh có đầy đủ các bào nang chứa các tinh nguyên bào, tinh bào cấp I, cấp II, tinh tử. Khoảng trống giữa các ống tinh hẹp. Cuối giai đoạn này, trong tinh sào đã xuất hiện một số tinh trùng chín muồi. (Hình 3.2B)

Đối với giai đoạn IV, kích thước tinh bào đạt tối đa. Tinh trùng chín xuất hiện trong các bào nang và có xu hướng đi ra khỏi bào nang. Các tinh nguyên bào lớn đang phân chia giảm nhiệm. Ngoài ra lúc này, trong tinh sào còn có các tinh bào sơ cấp, tinh bào thứ cấp và các tinh tử nằm trên thành các ống sinh tinh dự trữ cho lần phát dục tiếp theo. (Hình 3.2C)

Giai đoạn V, đây là giai đoạn tinh sào đang ở thời kỳ sinh sản. Tinh sào lúc này có màu trắng sữa. Bên trong ống sinh tinh chứa đầy các tế bào tinh trùng chín muồi. Bụng cá mềm, vuốt nhẹ sẽ thấy sẹ trắng chảy ra. Tinh dịch được tiết ra để hòa loãng tinh trùng. (Hình 3.2D)

Đặc trưng của giai đoạn VI là ngay sau khi cá được sinh sản, tinh sào giảm kích thước đáng kể do tinh trùng đã được phóng thích ra ngoài. Sau giai đoạn này, tinh sào sẽ trở về giai đoạn II. Các tinh tử ở giai đoạn cuối quá trình tạo tinh, tinh bào đang phân chia, các tinh bào sơ cấp, tinh bào thứ cấp được tìm thấy ở gần ống sinh tinh, chuẩn bị cho quá trình sinh sản tiếp theo.



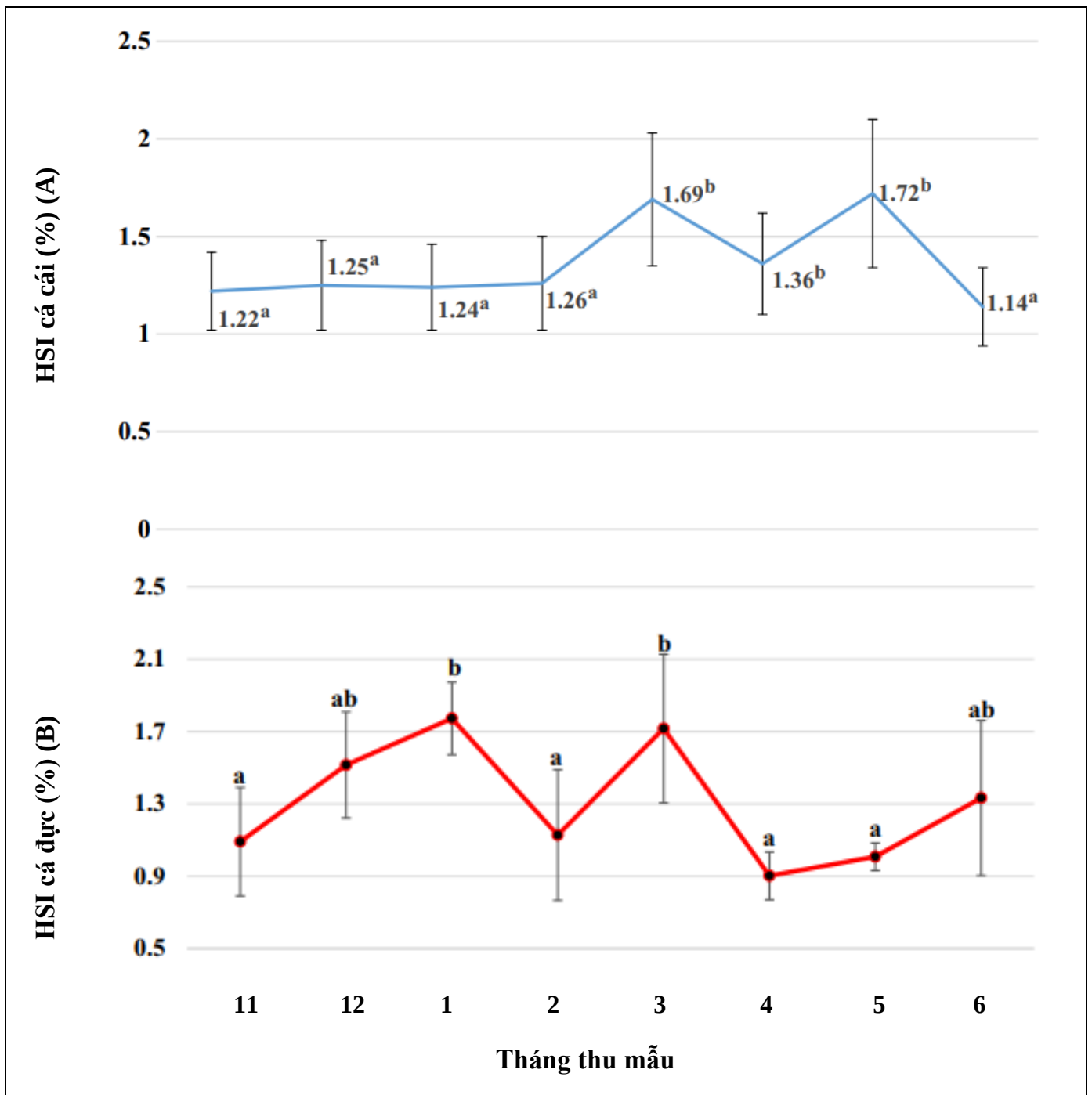
Hình 3.3. Buồng sẹ cá đìa ở các giai đoạn phát triển

A: Giai đoạn chưa thành thực B: Giai đoạn thành thực

3.1.1.4. Hệ số gan (HSI)

Hệ số gan cùng với chất tạo noãn hoàng trong huyết tương là những thông số quan trọng cho biết hiện trạng của quá trình tích lũy chất noãn hoàng ở cá cái. HSI ngày càng được quan tâm từ phía các nhà khoa học khi nghiên cứu về quá trình tổng hợp VTG trong gan. Trong nghiên cứu này, HSI ở cá cái có sự thay đổi trong thời gian thu mẫu. Cụ thể, trong mùa sinh sản, HSI có sự thay đổi đáng kể ($P < 0,05$) giữa tháng 3 (1,69%) và tháng 6 (1,14%), đạt cực đại ở tháng 5 (1,72%); trong thời gian từ tháng 3 đến tháng 5, ghi nhận sự thay đổi về HSI không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Từ tháng 11 đến tháng 2, HSI thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) giữa các tháng và duy trì trong khoảng 1,22% – 1,26%. Đặc biệt, từ tháng 5 đến tháng 6, ghi nhận sự suy giảm đột ngột của HSI từ 1,72% xuống 1,14% (Hình 3.4A).

Đối với cá đực, HSI có sự thay đổi đáng kể giữa các tháng thu mẫu. Giá trị HSI đạt cực đại ở tháng 1 (1,77%) và thấp nhất ở tháng 4 (1,01%). Giá trị của HSI ở các tháng 11, tháng 2, tháng 4 và tháng 5 sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tương tự, HSI ở các tháng 12, tháng 1, tháng 3 và tháng 6 cũng không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Hình 3.4B).

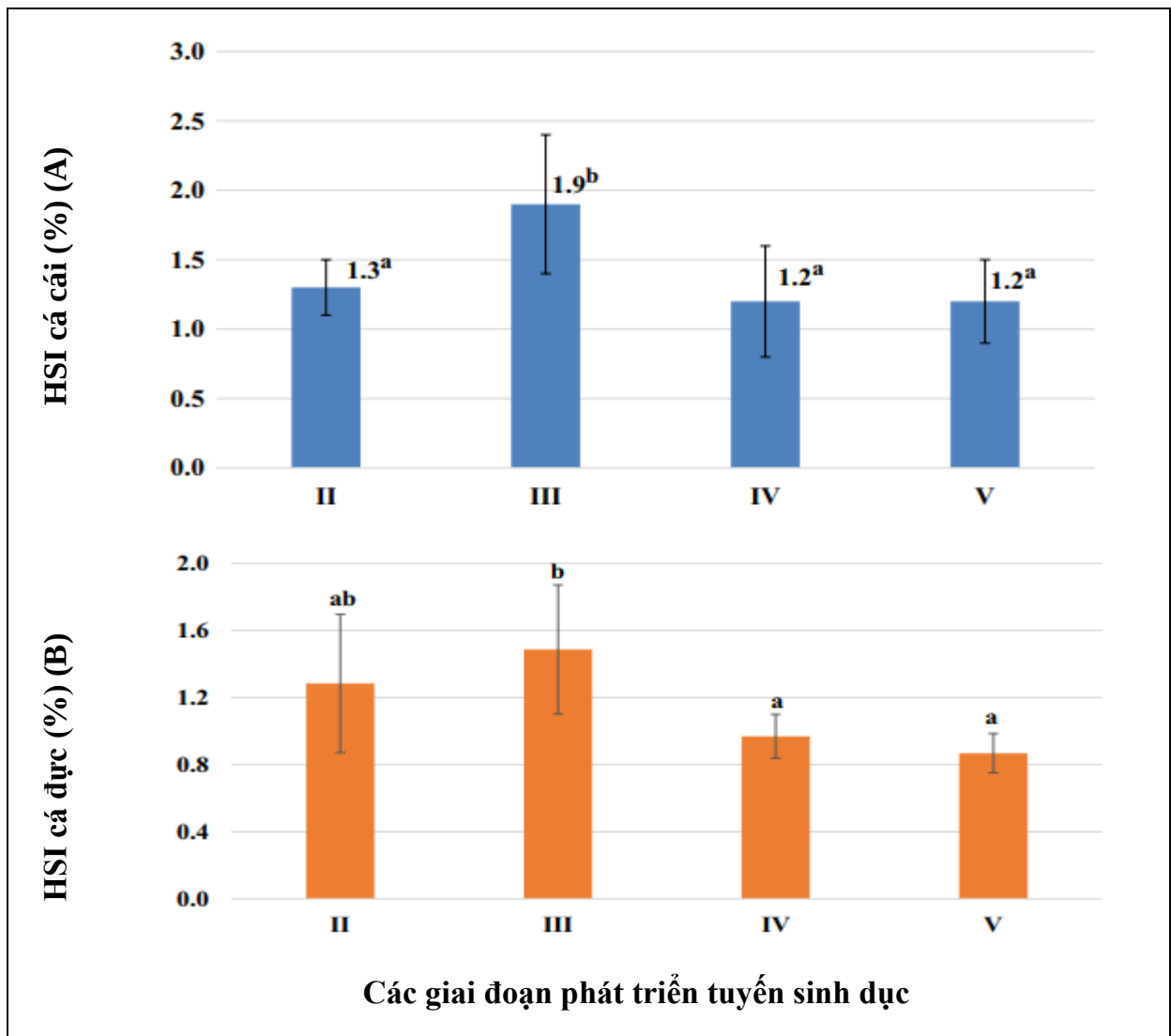


Hình 3.4. Hệ số gan theo tháng thu mẫu.

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Giá trị HSI cao nhất (1,9%) được ghi nhận trong giai đoạn tích lũy noãn hoàng (Giai đoạn III) và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với các giai đoạn khác (Hình 3.5A). Đối với cá đực, trị số HSI cao nhất (1,49%) cũng được quan sát thấy trong giai đoạn sinh tinh (Giai đoạn III), thấp nhất ở giai đoạn sinh sản (0,87%) và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với các giai đoạn khác (Hình 3.5B).

Nhìn chung, sự biến động HSI ở cá cái và cá đực là tương đối giống nhau theo từng tháng thu mẫu cũng như theo các giai đoạn phát triển của buồng trứng và tinh sào.



Hình 3.5. Hệ số gan theo các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

3.1.1.5. Hệ số thành thực (GSI)

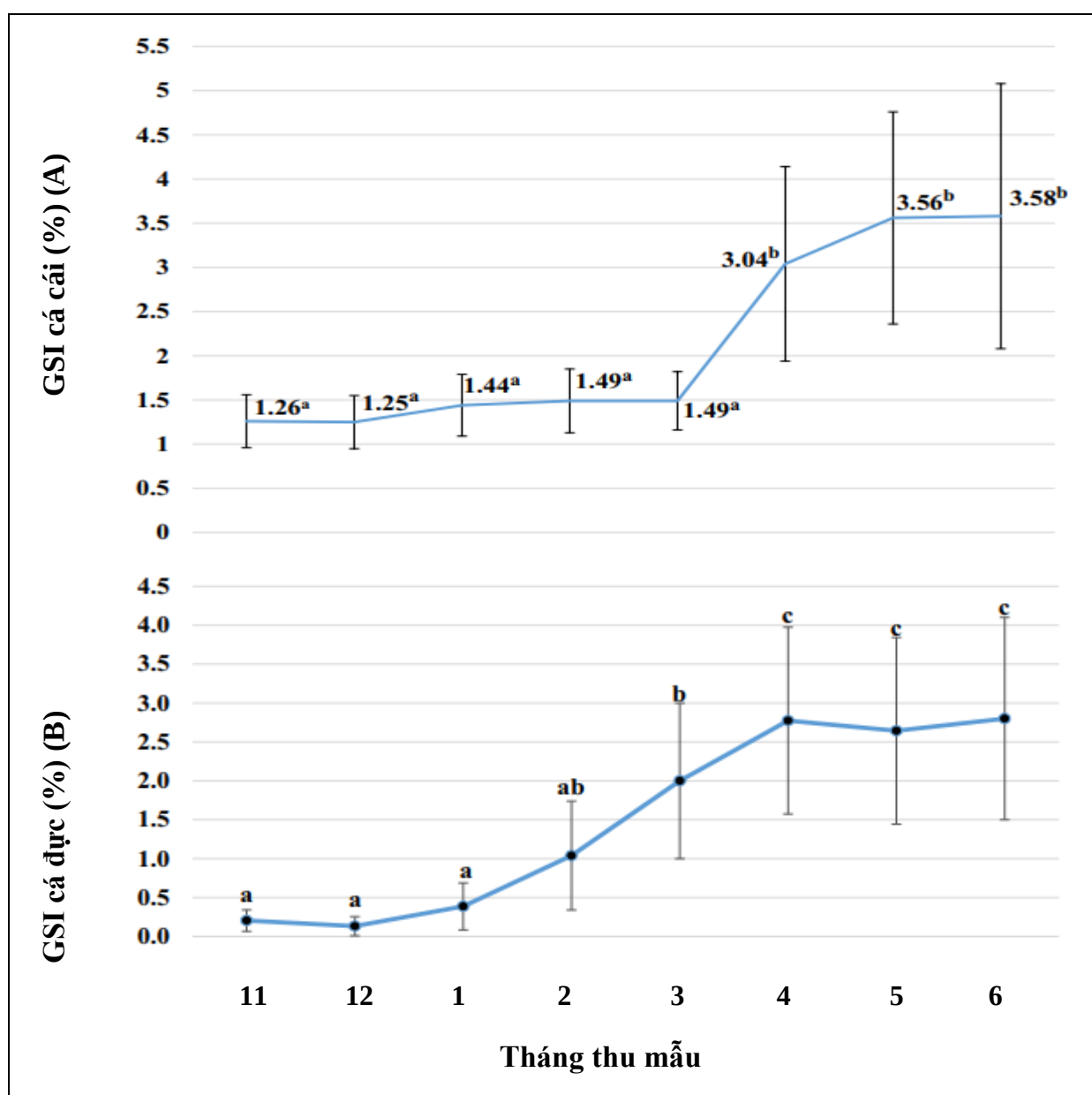
Một trong những thông số quan trọng để đánh giá mức độ thành thực sinh dục đó là khối lượng tuyến sinh dục. Vì vậy, khi nói đến quá trình phát triển của tuyến sinh dục, người ta không thể không nhắc đến hệ số thành thực (GSI). Thông qua GSI, chúng ta có thể dự báo và theo dõi quá trình phát triển và chín muồi của các tế bào sinh dục. GSI được sử dụng nhiều trong các công trình nghiên cứu về sinh học sinh sản. Tuy nhiên, GSI đôi khi không phản ánh đầy đủ trạng thái thực của các sản phẩm sinh dục, đặc biệt đối với các loài cá đẻ nhiều lần trong năm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy GSI trên cá địa cái biến động theo chu kỳ sinh. Cụ thể, GSI thấp nhất vào tháng 12 (1,26%) và đạt giá trị cao nhất vào tháng 6 (3,58%). Từ tháng 11 đến tháng 3 năm sau, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$), dao động trong khoảng 1,25% đến 1,49%. Tuy nhiên, từ tháng 4 đến tháng 6, GSI tăng đáng

kể, giá trị cao nhất được ghi nhận là 3,58%. Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$) về giá trị GSI giữa các tháng 4, tháng 5 và tháng 6 (Hình 3.6A).

GSI trên cá cái ở các tháng 4, 5, 6 cao hơn và thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) so với các tháng còn lại trong thời gian thu mẫu, vì đây là mùa vụ sinh sản chính trong năm của cá địa, điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó [7].

Khi so sánh với cá địa ở vùng đầm phá Thừa Thiên Huế, sự biến động GSI trong chu kỳ sinh sản có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu này [7]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, GSI chỉ được xác định qua mùa vụ sinh sản chính, chưa phân tích đầy đủ được sự biến động qua các tháng trong năm.



Hình 3.6. Hệ số thành thực theo tháng thu mẫu

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$)

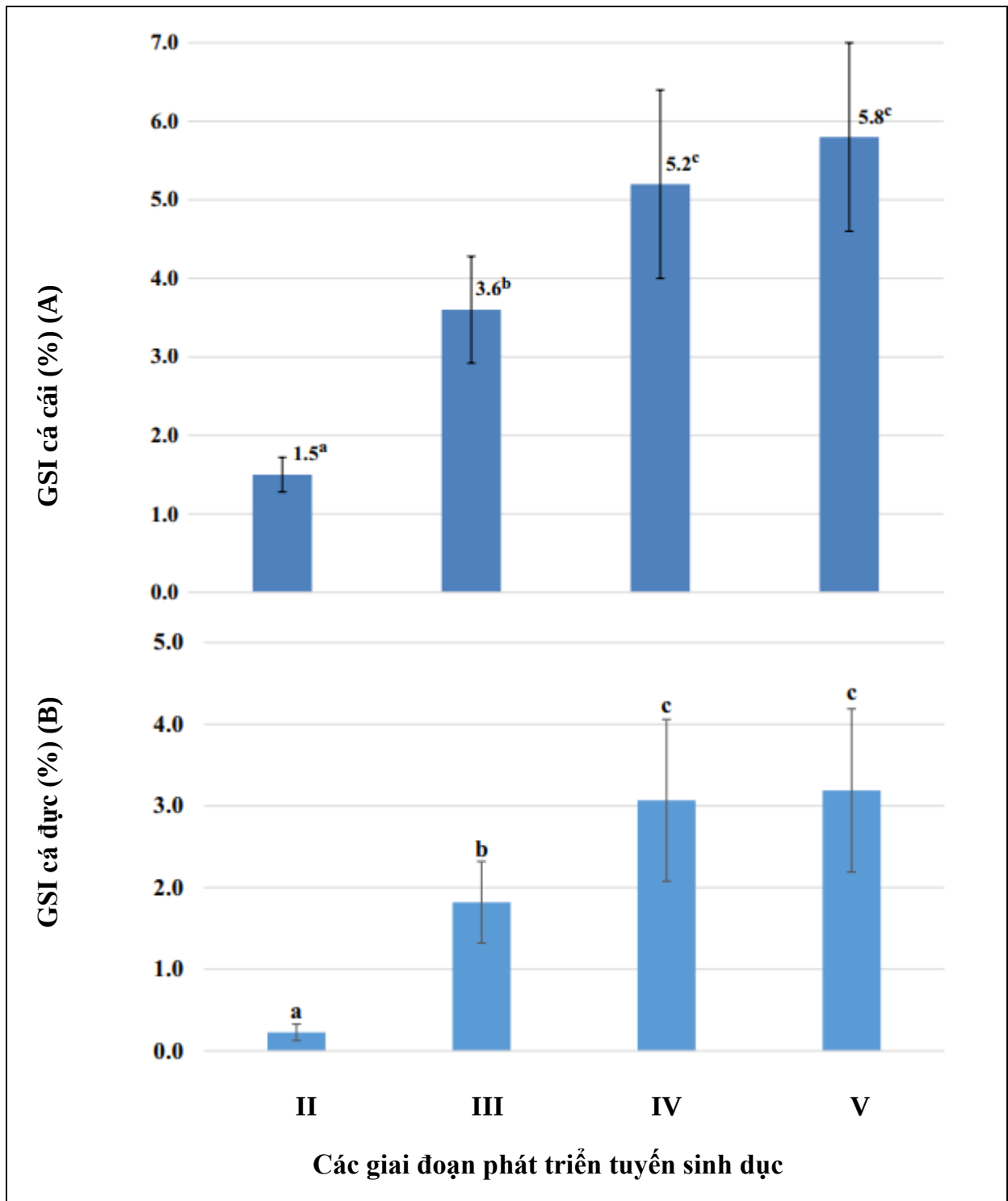
Đối với cá đực, giá trị GSI biến động theo chu kỳ sinh sản tương đối giống cá cái. GSI cá đực thấp nhất vào tháng 12 ($0,13\%$) và đạt giá trị cao nhất vào tháng 6 ($2,77\%$). GSI tăng liên tục từ tháng 12 đến tháng 4 và duy trì ở mức cao cho đến hết tháng 6. Giá trị GSI trung bình của cá đực qua 8 tháng nghiên cứu dao động từ $0,13\% \pm 0,12\%$ đến $2,77\% \pm 1,94\%$ (Hình 3.6B). Cá đũa tại vùng biển Nha Trang – Khánh Hòa, giá trị GSI cao nhất vào tháng 6 ($7,12\% \pm 0,64\%$) và giảm thấp nhất ở tháng 7 ($4,06\% \pm 0,77\%$). Cá đực bước vào mùa sinh sản thứ 2 ở tháng 10 với mức GSI đạt $6,22\% \pm 0,70\%$. Sau tháng 10, cá bước vào thời kỳ nghỉ dưỡng [71]. Có sự sai khác lớn về GSI này được giải thích bởi độ no của ruột, cá trong điều kiện nuôi nhốt, cụ thể trong nghiên cứu này, có chế độ cho ăn hợp lý, vì vậy ruột của chúng sẽ được no, khối lượng toàn thân tăng, làm giá trị GSI bị giảm đi rất nhiều.

Sự biến động GSI qua 8 tháng nghiên cứu được chia làm 3 giai đoạn (Hình 3.6B). Tháng 11, tháng 12 GSI rất thấp, đây là giai đoạn cá sau khi tham gia sinh sản nên GSI rất thấp và đạt giá trị nhỏ nhất vào tháng 12 ($0,13\% \pm 0,12\%$), thời gian này tinh sào chủ yếu ở giai đoạn II. Sau đó GSI bắt đầu tăng từ tháng 1 - 3. Đây là thời gian cá bắt đầu tích lũy năng lượng cho quá trình tái thành thực, tinh sào chủ yếu ở giai đoạn II, III. Đến tháng 4, tháng 5 và tháng 6 cá bắt đầu tham gia sinh sản và GSI đạt giá trị lớn nhất vào tháng 6 ($2,77\% \pm 1,94\%$), tinh sào chủ yếu ở giai đoạn IV, V và bước vào thời kỳ sinh sản (Hình 3.6B).

Từ tháng 2 đến tháng 5, có thể bắt gặp cá có tinh sào ở nhiều giai đoạn phát triển khác nhau trong quá trình thu mẫu, nên giá trị độ lệch chuẩn của GSI rất lớn, vì vậy có thể nói cá đũa là loài thành thực không đồng đều trong điều kiện nuôi nhốt.

Sự khác biệt về vùng địa lý, dẫn đến sự khác biệt về khí hậu, nhiệt độ, chu kỳ chiếu sáng, sẽ dẫn đến sự khác biệt về mùa vụ sinh sản. Ở Huế ($16-16^{\circ}80'B$) mùa sinh sản của cá đũa là từ tháng 5 đến tháng 9 [6]. Một số loài cá cũng có sự khác biệt về mùa vụ sinh sản khi ở các vĩ độ khác nhau: Cá đũa *Siganus canaliculatus* ở Dammam, Ả Rập ($26^{\circ}17'B$ $50^{\circ}12'D$) có mùa sinh sản vào tháng 4, tháng 5 trong khi đó ở Oman, Ả Rập ($23^{\circ}36'B$ $58^{\circ}33'D$) lại có 2 mùa sinh sản từ tháng 11 đến tháng 2, tháng 6 và tháng 7, cá đũa *Siganus sutor* ở Dar es Salaam, Tanzania ($6^{\circ}48'N$ $39^{\circ}17'D$) có mùa sinh sản kéo dài từ tháng 10 đến tháng 5 và đạt đỉnh điểm vào tháng 3 nhưng ở Kenya ($1^{\circ}16'N$ $36^{\circ}48'D$) lại chia làm 2 mùa sinh sản, một mùa vào tháng 6, tháng 7 và một mùa từ tháng 10 đến tháng 1 [21].

Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$) về giá trị GSI quan sát được ở các tháng 4, 5 và 6 (Hình 3.6B).



Hình 3.7. Hệ số thành thực theo các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$)

Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy giá trị GSI biến động theo các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục. Đối với cá cái, GSI tăng từ giai đoạn II (sinh trưởng) đến giai đoạn V (chín và rụng trứng) và đạt mức cao nhất là 5,89%. Các giá

trị GSI ở các giai đoạn khác nhau có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) và dao động trong khoảng 1,5% đến 5,8% (Hình 3.7A).

Ở cá đực, tổ chức mô học của tinh sào phức tạp hơn ở buồng trứng bởi có sự xuất hiện ở nhiều giai đoạn khác nhau. Trong tinh sào cá đực đều tồn tại các tế bào sinh dục ở cùng một giai đoạn phát triển hay cùng tồn tại nhiều giai đoạn phát triển. GSI cũng tăng liên tục từ giai đoạn II (giai đoạn chưa trưởng thành) đến giai đoạn V (sinh sản), cao nhất ở giai đoạn V (3,19%) và thấp nhất ở giai đoạn II (0,23%) (Hình 3.7B).

Nhìn chung, xu hướng biến động của HSI và GSI theo các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục là khác nhau. Cụ thể, giá trị HSI tăng từ giai đoạn II đến giai đoạn III, sau đó giảm dần từ giai đoạn III đến giai đoạn V (Hình 3.5). Trong khi đó, GSI tăng liên tục từ giai đoạn II đến giai đoạn V (Hình 3.7).

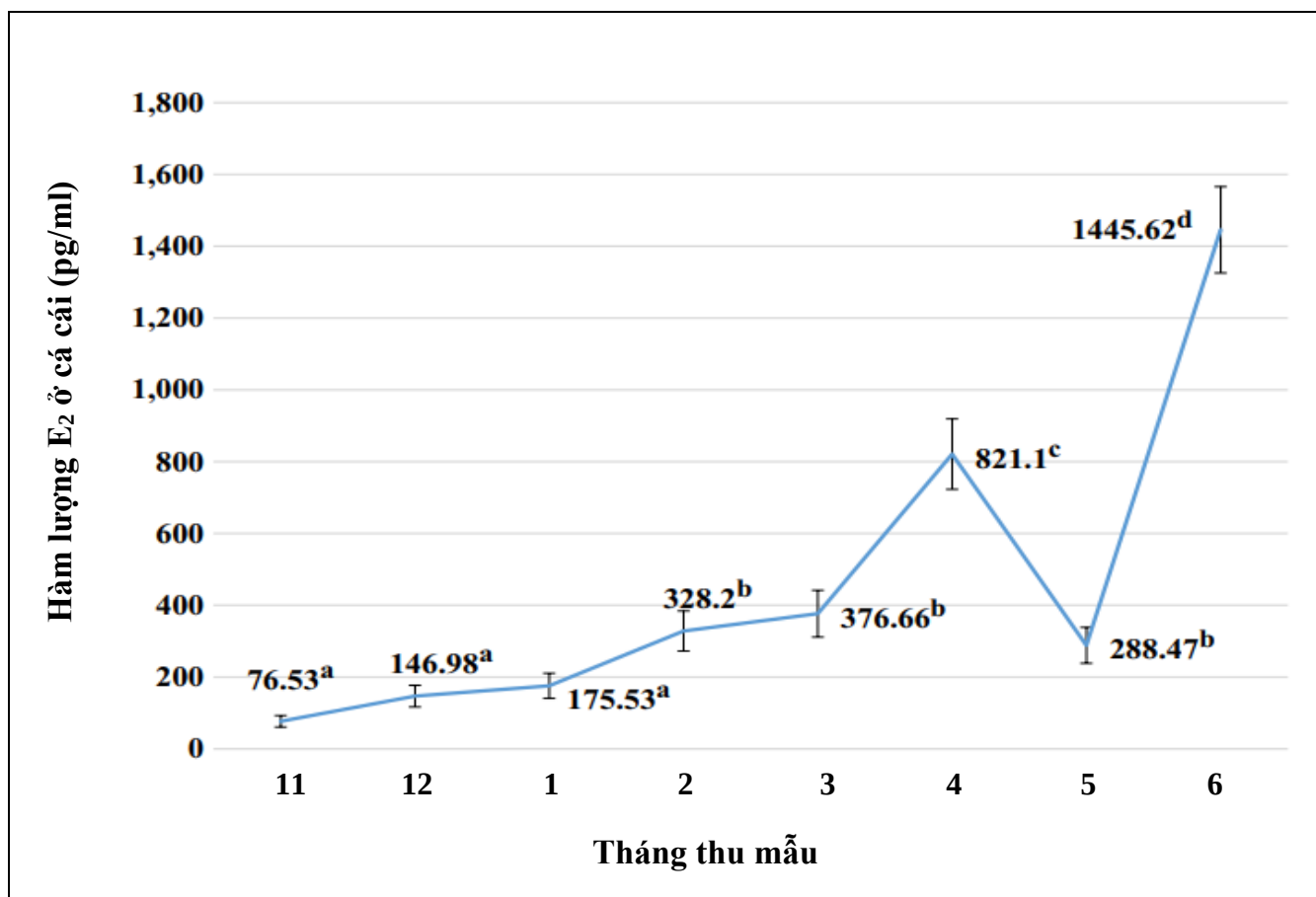
3.1.2. Biến động hàm lượng hormone steroid trong huyết tương

3.1.2.1. Biến động hàm lượng E_2 ở cá cái

Hàm lượng E_2 trong huyết tương cá dìa thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) giữa các tháng trong năm (Hình 3.8), điều này chỉ ra rằng, trong điều kiện nuôi nhốt, mùa vụ sinh sản của cá dìa kéo dài quanh năm. Từ tháng 11 đến tháng 1, hàm lượng E_2 khá thấp và không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$), dao động từ 76,53 pg/ml đến 175,53 pg/ml. Từ tháng 2 đến tháng 4, E_2 tăng mạnh lên mức 821,1 pg/ml ở tháng 4. Tuy nhiên, hàm lượng E_2 lại giảm đột ngột xuống mức 288,47 pg/ml ở tháng 5. Hàm lượng E_2 trong huyết tương cá dìa đạt mức cao nhất ở tháng 6 (1.445,62 pg/ml).

Một nghiên cứu trước đây trên cùng một loài cho thấy có mối tương quan giữa hormone steroid trong huyết tương và chu kỳ trăng [170]. Hàm lượng E_2 trong huyết tương của cá dìa trong mùa đông (từ tháng 11 đến tháng 1) thấp, có thể liên quan đến nhiều lý do, trong đó nhiệt độ thấp có thể làm giảm quá trình nội tiết tố hoặc đây có thể là giai đoạn không tham gia sinh sản trong chu kỳ sinh sản tự nhiên của cá dìa. Vào mùa hè từ tháng 2 đến tháng 6, khi nhiệt độ nước cao hơn, mức E_2 tăng lên đáng kể. Những quan sát đó có thể thấy rằng nhiệt độ nước là một trong những yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình nội tiết tố và sự thành thực ở cá dìa.

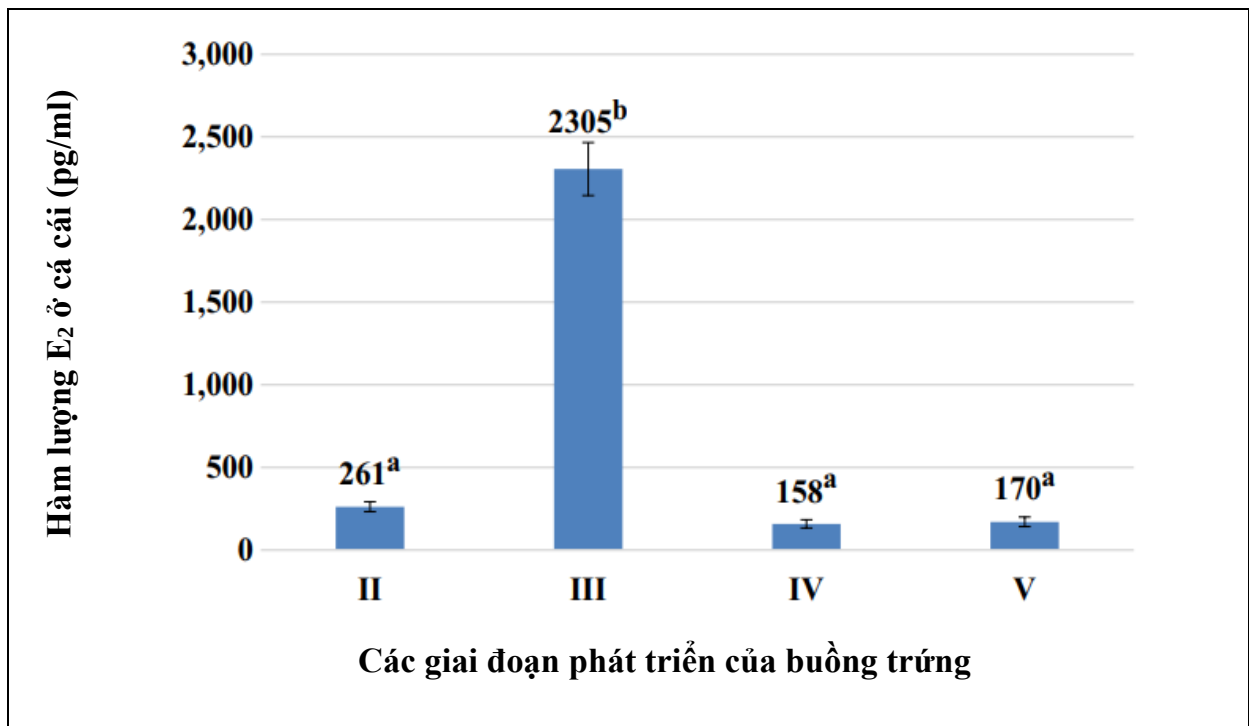
Sự suy giảm hàm lượng E_2 trong tháng 5 có thể liên quan đến sự thành thực của cá cái được lấy mẫu. Chất tiền noãn hoàn được hình thành theo mùa hoặc theo chu kỳ tùy thuộc vào các hormone gây phóng thích KDT như hormone kích thích nang trứng (FSH) và hormone hoàng thể hóa (LH), kích thích tiết steroid sinh dục từ các tuyến sinh dục [175]. Trong chu kỳ sinh sản của cá, trong giai đoạn tạo noãn hoàng, FSH được sản xuất bởi tuyến yên và chịu trách nhiệm sản xuất estradiol. Các nghiên cứu khác cho thấy trước và sau giai đoạn hình thành noãn hoàng, E_2 trong huyết tương được ghi nhận ở mức độ thấp trên một số loài cá [33, 120, 127, 161, 181].



Hình 3.8. Biến động hàm lượng E_2 ở cá cái theo tháng thu mẫu

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Nghiên cứu cho thấy, E_2 trong huyết tương cá dìa có mối quan hệ khá rõ với các giai đoạn phát triển buồng trứng. Hàm lượng E_2 trong huyết tương thay đổi theo các giai đoạn buồng trứng và mức E_2 cao nhất (2.305 pg/ml) được quan sát thấy ở giai đoạn III. Sau đó có sự sụt giảm đáng kể ở giai đoạn IV (thành thực) và giai đoạn V (sinh sản). Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) về hàm lượng E_2 trong huyết tương ở giai đoạn II (chưa trưởng thành), giai đoạn IV (thành thực) và giai đoạn V (sinh sản), hàm lượng E_2 dao động từ 158 pg/ml đến 261 pg/ml (Hình 3.9).



Hình 3.9. Biến động hàm lượng E₂ ở cá cái theo giai đoạn phát triển buồng trứng

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

E₂ là một hormone steroid trong huyết tương thể hiện rõ chức năng điều khiển sự phát triển của buồng trứng và có mối quan hệ với các giai đoạn phát triển của buồng trứng. Hàm lượng E₂ cao nhất trong quá trình tạo noãn hoàng (giai đoạn III) cho thấy rằng E₂ là một hormone steroid kích thích sự hình thành noãn hoàng ở cá diều. E₂ kích thích gan sản xuất VTG sau đó sẽ được vận chuyển vào tế bào trứng thông mạch máu [128, 133, 218]. Ở một số loài cá biển như cá vược sọc (*Morone saxatilis*), cá tuyết Đại Tây Dương, cá chêm mõm nhọn (*Psammoperca waigiensis*), hàm lượng E₂ trong huyết tương duy trì ở mức cao trong quá trình hình thành noãn hoàng [64, 130, 161]. Hàm lượng E₂ thấp ở các giai đoạn II, IV và V có thể kết luận rằng E₂ không phải là một steroid chính trong việc kích thích sự thành thực và rụng trứng ở cá diều. Các nghiên cứu trước đây cho thấy các steroid gây chín (MPF) như 17, 20b, 21-trihydroxy-4pregnen-3-one và yếu tố gây chín (MPF) điều khiển sự chín, rụng trứng và sự di chuyển của túi mầm [134, 229]. Sự khác biệt đáng kể của hàm lượng E₂ trong quá trình tạo noãn hoàng và các giai đoạn phát triển buồng trứng ở cá diều có thể cung cấp dữ liệu về sinh học sinh sản ở cá biển.

3.1.2.2. Mối quan hệ giữa E₂ với HSI, GSI và sự phát triển của buồng trứng

E₂ là một hormone điển hình ở cá cái. Trong nghiên cứu này, E₂ thể hiện mối quan hệ khá rõ ràng với HSI, GSI và các giai đoạn phát triển của buồng trứng. Hàm lượng E₂ tăng trong giai đoạn III (2.305 pg/ml) và giảm trong giai đoạn IV–V (158-170 pg/ml), sự biến động này tương ứng với sự tăng giảm của HSI ở giai đoạn III (1.9%) và trong giai đoạn IV-V (1,2-1,2%). Ngược lại, sự biến động của E₂ đối với GSI và các giai đoạn phát triển của buồng là ngược nhau, cụ thể nếu E₂ giảm từ giai đoạn IV và V thì GSI lại tăng ở cả hai giai đoạn này, các giá trị tương ứng là 5,2% và 5,8%.

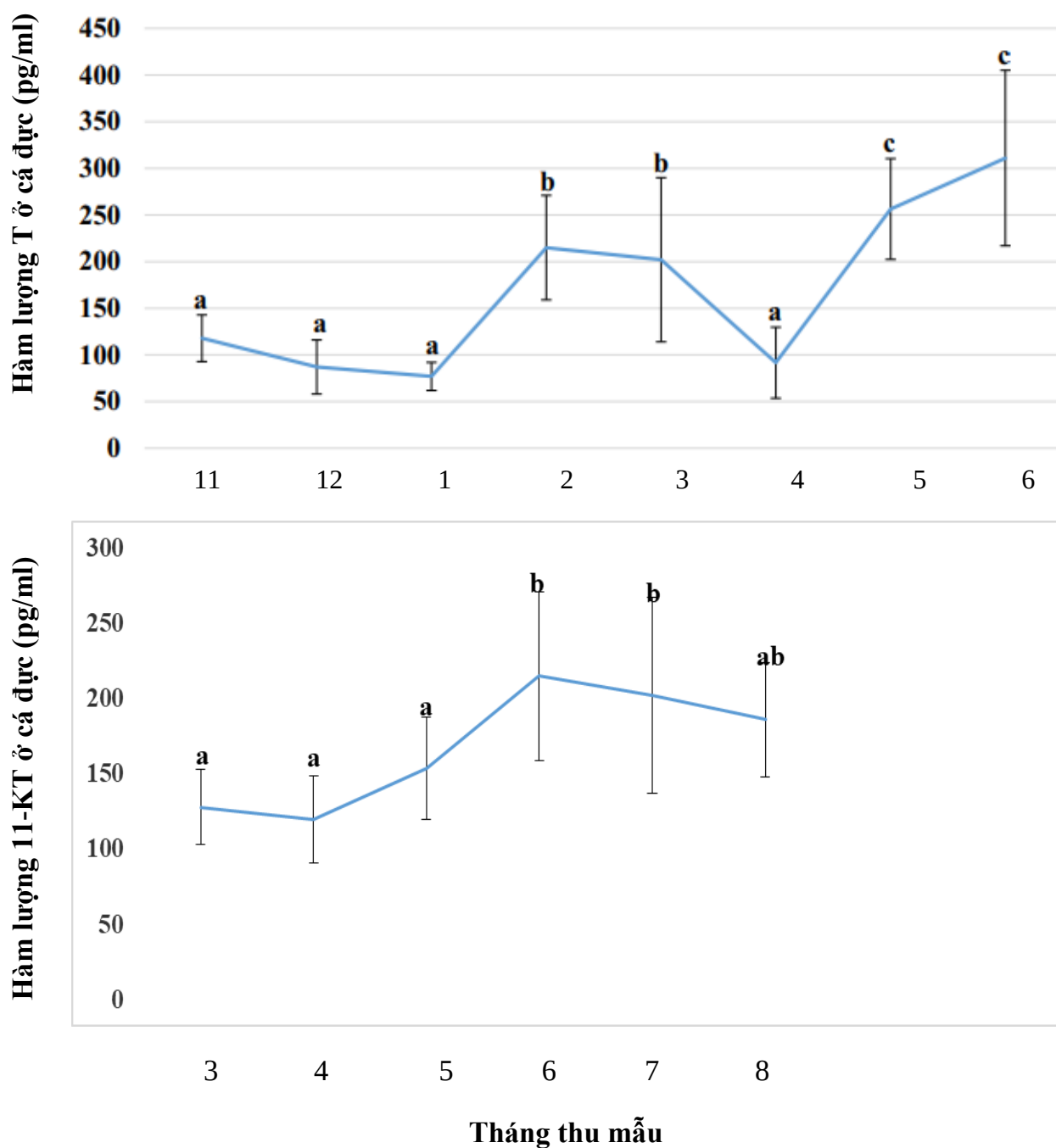
Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự phát triển buồng trứng ở cá được điều khiển thông qua trục Não bộ – Tuyến yên – Tuyến sinh dục. Mối quan hệ giữa E₂ với HSI, GSI và sự phát triển của buồng trứng được quan sát trong nghiên cứu này đã giúp hiểu rõ hơn về chu kỳ sinh sản của cá diều trong điều kiện nuôi nhốt. Rahman, Takemura và Takano (2000) cũng cho thấy rằng những thay đổi hàm lượng E₂ trong huyết tương có liên quan đến những thay đổi của GSI và tổ chức học buồng trứng ở cá diều [171]. Các nghiên cứu khác trên cá tuyết Đại Tây Dương, cá chêm mõm nhọn và cá bảy màu (*Melanotaenia boesemani*) chỉ ra rằng có mối quan hệ giữa sự biến động hàm lượng E₂ trong huyết tương ở các giai đoạn phát triển của buồng trứng và giá trị GSI trong quá trình hình thành noãn hoàng [62, 161]. Các giai đoạn phát triển của buồng trứng cá diều trong nghiên cứu này cho thấy có liên quan đến giá trị HSI. HSI cao nhất quan sát ở giai đoạn III, quá trình tạo noãn hoàng. Ở cá diều, chất tiền noãn hoàng VTG được tổng hợp ở gan dưới sự kích thích của E₂. Tuy nhiên, quá trình tổng hợp này khác nhau tùy thuộc vào loài và mức độ nhạy cảm với E₂ [175]. Ở cá, quá trình trao đổi chất diễn ra nhanh trong quá trình tạo noãn hoàng, sự phát triển của tế bào trứng dẫn đến trọng lượng của buồng trứng tăng lên [175, 184]. Các nghiên cứu khác trên một số loài cá như cá cam (*Seriola dumerilii*), cá cam Nhật Bản (*Seriola lalandi alandi*) và cá chêm mõm nhọn [114, 161, 165] cũng cho kết quả tương tự.

Các quan sát mô học cho thấy trong buồng trứng cá diều có các tế bào trứng ở các giai đoạn khác nhau. Rahman và cộng sự (2000), khi nghiên cứu cá diều ở vùng

biển Okinawa, Nhật Bản cũng cho kết quả tương tự. Ở vùng biển Indonesia, Susilo và cộng sự cho thấy buồng trứng cá địa thành thực và sinh sản hai lần trong năm. Một nghiên cứu khác ở Philippines chỉ ra rằng cá địa sinh sản hàng tháng trong năm [84]. Rahman và cộng sự nhận thấy rằng sự phát triển buồng trứng của cá địa về mặt mô học được chia thành ba giai đoạn, giai đoạn chưa trưởng thành (tháng 8 - tháng 4), thời kỳ trước khi sinh sản (tháng 5) và thời kỳ sinh sản (tháng 6 - tháng 7) [171]. Từ những nhận xét đó, có thể suy ra rằng cá địa là loài sinh sản nhiều lần trong năm và với sự phát triển noãn bào không đồng bộ. Từ các dữ liệu của chúng tôi, có thể kết luận rằng có mối quan hệ giữa hàm lượng E_2 trong huyết tương với các giai đoạn phát triển của noãn bào, GSI và HSI ở cá địa cái.

3.1.2.3. Biến động hàm lượng T và 11-KT ở cá đực

Hàm lượng T trong huyết tương cá địa có sự thay đổi theo các tháng nghiên cứu trong năm (Hình 3.10). Giá trị T thấp trong suốt mùa xuân từ tháng 11 đến tháng 1. Vào mùa hè, nồng độ T tăng lên và đạt đỉnh vào tháng 6 (301,986 pg/ml). Cụ thể, hàm lượng T giảm dần từ tháng 11 (117,922 pg/ml) đến tháng 1 (76,907 pg/ml). Sau đó lại tăng lên vào tháng 2, tháng 3 (214,918 pg/ml, 202,050 pg/ml) đạt cực đại ở tháng 6. Trong khoảng thời gian từ tháng 11 đến tháng 1 cá đã tham gia sinh sản của mùa vụ sinh sản trước nên GSI giảm và bắt đầu mùa sinh sản thứ 2 từ tháng 2 đến tháng 6, tăng mạnh vào tháng 5 và tháng 6, trong thời gian này cá tích lũy dinh dưỡng trở lại để thành thực và tham gia sinh sản. Tháng 2, tháng 3 cá bắt đầu tham gia sinh sản. Hàm lượng T tăng lên, nhưng đến tháng 4 hàm lượng T lại giảm xuống. Đây có lẽ do cá đã tham gia sinh sản nên hàm lượng giảm mạnh hoặc do tháng này thu mẫu trứng vào những con đã tham gia sinh sản. Sau khi đã tham gia sinh sản ở tháng 4 thì cá vẫn tích lũy dinh dưỡng để tham gia sinh sản tiếp theo vào tháng 5, 6. Việc tăng giảm hàm lượng T này là do mùa sinh sản của cá địa kéo dài trong năm và trong tình sào của cá địa đực ở nhiều giai đoạn khác nhau nên hàm lượng T có thể tăng giảm trong mùa sinh sản từ tháng 2 đến tháng 6.



Hình 3.10. Biến động hàm lượng T và 11-KT ở cá đực theo tháng thu mẫu

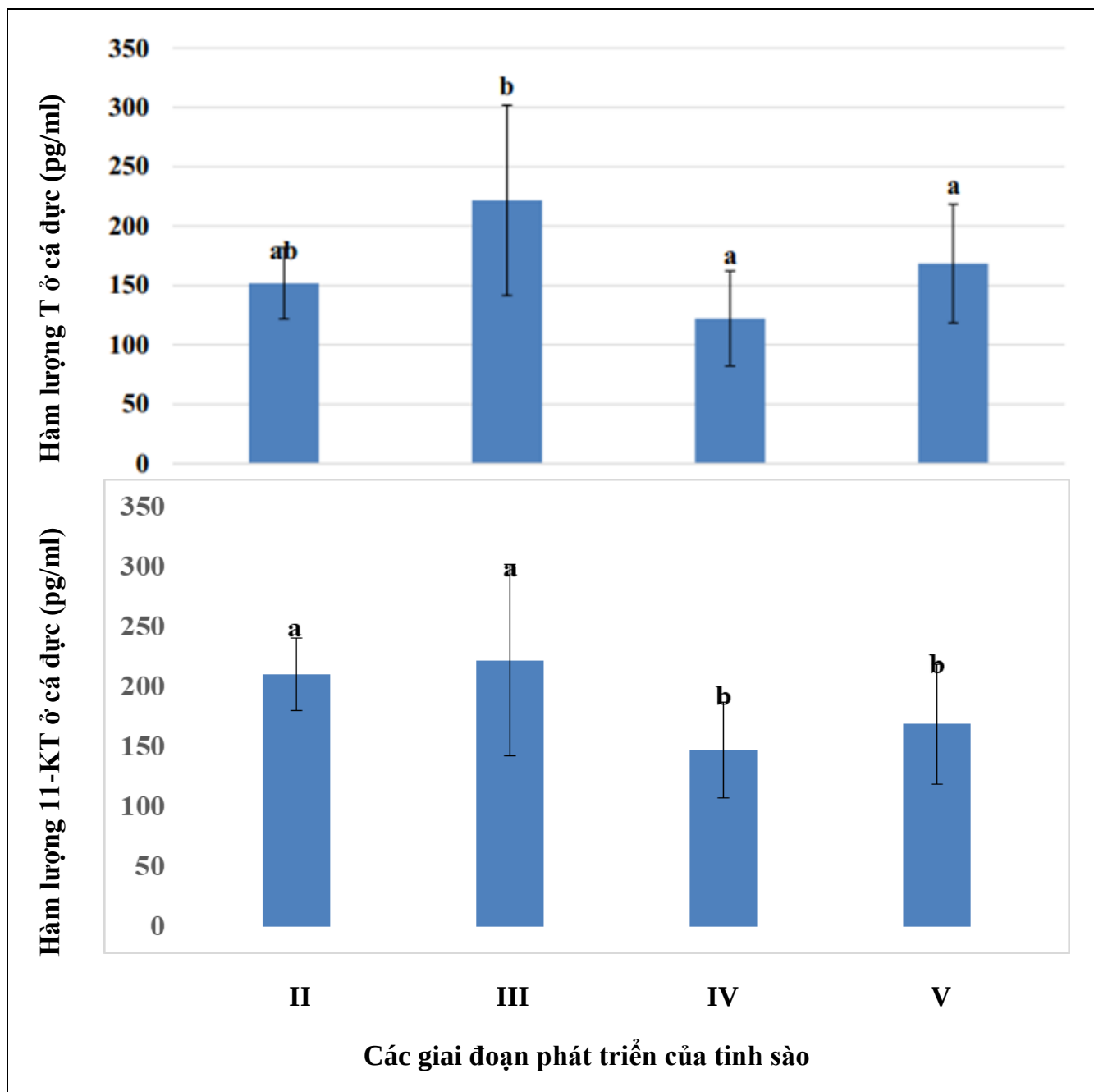
Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Các nghiên cứu trên cá cho thấy, T được sinh ra bởi tế bào Leydig trong tinh sào, có tác dụng kích thích sự phát triển của tinh sào và quá trình sinh tinh [134, 135, 225].

Trong nghiên cứu này, hàm lượng T trong huyết tương cao nhất ở giai đoạn III cho thấy T kích thích quá trình sinh tinh ở cá dìa đực (Hình 3.11). Ở một số loài cá như cá chêm mõm nhọn và cá tuyết Đại Tây Dương, hàm lượng T trong huyết tương được duy trì ở mức cao trong suốt quá trình sinh tinh [64, 161]. Giá trị T ở giai đoạn

IV và V thấp cho thấy T không phải là steroid chính trong việc kích thích sinh tinh ở cá địa đực. Các nghiên cứu khác trên cá biển cho thấy nồng độ 11-KT và 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) trong huyết tương tăng trong giai đoạn trước khi sinh sản và tăng nhanh trong giai đoạn sinh sản [169]. Ở một số loài, tinh sào trưởng thành không chỉ chứa T mà còn chứa 11-KT và 17α - 20β -dihydroxyprogesterone (17α , 20β -P), đây là những steroid chính trong tinh sào trưởng thành cuối cùng [134, 180]. Ở cá Pacu đực (*Piaractus mesopotamicus*), Gazola và Borella (1997) cho thấy hàm lượng T và 11-KT cao nhất trong giai đoạn thành thục ($T = 2.400 \pm 56$ pg/ml; $11-KT = 2.300 \pm 60$ pg/ml) và các mức thấp hơn duy trì trong thời gian không tham gia sinh sản [77]. Sự thay đổi hàm lượng T trong chu kỳ sinh sản cho thấy các hoạt động sinh sản của cá địa đực có liên quan đến mùa vụ. Điều này cho ta thấy rằng, trong điều kiện nuôi nhốt, mùa vụ sinh sản của cá địa đực kéo dài. Một nghiên cứu khác trên cá địa cũng đã chỉ ra rằng có mối tương quan giữa hormone steroid trong huyết tương và chu kỳ trứng [170]. Hàm lượng T trong huyết tương cá địa thấp ở mùa đông, từ tháng 11 đến tháng 1 có thể được giải thích bởi những lý do sau. Nhiệt độ thấp có thể làm giảm hoạt động nội tiết tố hoặc đây có thể là giai đoạn nghỉ ngơi trong chu kỳ sinh sản tự nhiên của cá địa. Vào mùa hè từ tháng 2 đến tháng 6, hàm lượng T tăng lên đáng kể. Điều này cho thấy nhiệt độ nước cao có thể làm tăng hoạt động nội tiết tố ở loài này. Các nghiên cứu cho thấy rằng T ảnh hưởng đến quá trình phát triển của tinh sào và quá trình sinh tinh [38]. Điều này chứng minh rằng nhiệt độ nước là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình nội tiết tố và quá trình sinh tinh ở cá địa đực trong điều kiện nuôi nhốt. Sự biến động hàm lượng T trong huyết tương cá địa giữa các giai đoạn phát triển của tinh sào và giữa các tháng trong nghiên cứu này có thể góp phần cung cấp thêm dẫn liệu về sinh học sinh sản của cá địa đực trong điều kiện nuôi nhốt.

Giống như T, 11-KT là một hormone steroid điển hình ở cá đực. Trong nghiên cứu này, sự biến động hàm lượng 11-KT trong năm khá giống với T. Hàm lượng 11-KT tăng nhanh trong giai đoạn sinh sản từ tháng 3 đến tháng 6, sau đó giảm dần từ tháng 6 đến tháng 8 nhưng không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$) giữa các tháng trong mùa vụ sinh sản. 11-KT cao nhất ở tháng 6 (215 pg/ml) và thấp nhất ở tháng 4 (120 pg/ml) (Hình 3.10).



Hình 3.11. Biến động hàm lượng T và 11-KT ở cá đực theo các giai đoạn phát triển của tinh sào

Các ký tự khác nhau trên cùng một đồ thị thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Trong nghiên cứu này, giống như cá cái, tinh sào cá đực chỉ tồn tại các giai đoạn từ II đến V. Dựa trên các giai đoạn phát triển của tinh sào, sự biến động hàm lượng T và 11-KT cũng khá tương đồng nhau. Giá trị T và 11-KT cao nhất được quan sát thấy ở giai đoạn III lần lượt là 221,7 pg/ml và 222 pg/ml; thấp nhất ở giai đoạn IV, tương ứng là 122,3 pg/ml và 147 pg/ml. Sau đó, giảm xuống ở giữa các giai đoạn IV (trước sinh sản) và V (sinh sản). Không có sự khác biệt đáng kể về hàm

lượng T trong huyết tương được quan sát thấy giữa các giai đoạn II (tinh hoàn chưa trưởng thành), IV và V (Hình 3.11). Kết quả phân tích chỉ ra rằng hàm lượng 11-KT quan sát ở giai đoạn II, III có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với giai đoạn IV, V.

Hàm lượng T giảm từ tháng 2 đến tháng 4 và tăng lên đến tháng 6; đối với 11-KT cũng có xu hướng tương tự T, tuy nhiên sau đó giảm dần từ tháng 6, điều này cho chúng ta thấy mối quan hệ chặt chẽ với sự phát triển của tinh sào. Sự phát triển của tinh sào luôn đi kèm với sự tăng lên của T và 11-KT trong máu [40, 140, 181]. Các nghiên cứu gần đây đã tìm thấy sự tồn tại các thụ thể của androgen và progestogen trong tinh sào cá [91, 208]. Điều đó giúp hiểu được cơ chế hình thành các hormone steroid sinh dục ở cá đực là rất đáng được chú ý.

Nếu như 11-KT là một hormone steroid cơ bản và hiệu quả nhất trong việc kích thích quá trình tạo tinh ở cá đực [40, 123] trong khi đó T đóng vai trò không thể thiếu trong việc kích thích hoạt động của tuyến yên và não bộ [54, 78] và sau đó hoạt hóa chức năng của tinh sào [129].

Sự biến động hàm lượng hormone sinh dục cho chúng ta thấy cá di là loài đẻ nhiều lần trong năm, tương ứng với nhiều nhóm tinh bào ở các giai đoạn phát triển khác nhau cùng tồn tại trong tinh sào cá di ở một thời điểm nhất định. Ở một số nghiên cứu trước đó trên cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo solar*) [193], *Catostomus commersonii* [181], *Hippoglossus hippoglossus* [122] và *Salvelinus alpinus* [120], hàm lượng 11-KT và T trong huyết tương cá đực đạt cực đại trong thời kỳ tiền sinh sản, chứ không phải trong thời kỳ sinh sản. Tuy nhiên, cũng có một vài loài thể hiện hàm lượng hormone sinh dục cực đại trong thời kỳ sinh sản [99, 158, 166].

3.1.2.4. Mối quan hệ giữa T, 11-KT với HSI, GSI và sự phát triển của tinh sào

T và 11-KT là hai hormone điển hình ở cá đực. Nghiên cứu này đã cho thấy, T và 11-KT thể hiện mối quan hệ khá rõ ràng với HSI, GSI và các giai đoạn phát triển của buồng trứng. Hàm lượng T và 11-KT tăng trong giai đoạn III với giá trị tương ứng lần lượt 221,7 pg/ml và 222 pg/ml và giảm trong giai đoạn IV–V, sự biến động này tương ứng với sự tăng giảm của HSI ở giai đoạn III (1,49%) và trong giai đoạn IV-V.

Ngược lại, sự biến động của T và 11-KT đối với GSI và các giai đoạn phát triển của tinh sào là ngược nhau, cụ thể nếu T và 11-KT giảm từ giai đoạn IV và V thì GSI lại tăng ở cả hai giai đoạn này.

Giá trị HSI thay đổi theo tháng trong chu kỳ sinh sản của cá địa cho ta thấy đây là loài sinh sản nhiều lần trong năm. Sự gia tăng HSI từ tháng 11 đến tháng 1 có thể liên quan đến sự tích trữ năng lượng ở gan để chuẩn bị cho mùa sinh sản. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng năng lượng dự trữ trong gan có thể liên quan đến HSI ở cá [57, 188]. Sự gia tăng trọng lượng và kích thước gan là do quá trình tích trữ năng lượng, dẫn đến giá trị HSI tăng lên [142]. Trong các nghiên cứu gần đây về mối tương quan giữa HSI và các giai đoạn phát triển của tinh sào cho thấy HSI không phải là chỉ số để xác định các giai đoạn phát triển tinh sào ở cá địa đực. HSI hay gan đóng một vai trò quan trọng trong việc tích lũy các chất dinh dưỡng như protein và lipid. Những chất dinh dưỡng này sau đó được sử dụng làm năng lượng và nguyên liệu để tổng hợp và tiết hormone sinh dục [203]. Hơn nữa, gan có nhiều thụ thể cho các hormone lưu thông và tổng hợp các yếu tố tăng trưởng giống insulin và các tiền chất hormone [199].

GSI được coi là một thông số dùng để dự đoán mức độ thành thục và tích lũy năng lượng ở cá [230, 180]. Từ kết quả nghiên cứu này, GSI có thể được coi là một chỉ số để xác định các giai đoạn phát triển của tinh sào ở cá địa đực. Zeyl và cộng sự cho rằng GSI có thể được sử dụng để đánh giá tình trạng thành thục của cá bống cát (*Neogobius melanostomus*) [231].

Sự biến động hàng tháng của GSI trong nghiên cứu này cho thấy mùa sinh sản của cá địa đực bắt đầu vào tháng 3 và kéo dài đến tháng 6, đạt mức cao nhất vào tháng 6 và hầu như ít thay đổi trong các tháng 4, 5 và 6. Một nghiên cứu trước đây trên loài này cũng cho thấy mùa vụ sinh sản kéo dài từ tháng 3 đến tháng 6 [163].

Trong nghiên cứu này, không quan sát thấy tinh sào ở giai đoạn I (chưa tham gia sinh sản) và tinh sào sau sinh sản (giai đoạn VI). Methven và cộng sự đã chỉ ra rằng nó được đặc trưng bởi các ống rỗng với mô liên kết, tế bào sinh tinh sơ cấp và thứ cấp [122]. Tất cả những con đực được quan sát là chưa thành thục từ tháng 11 đến tháng 2 có thể là do nhiệt độ thấp, làm giảm quá trình sinh tinh. Từ tháng 3 đến tháng 6, khi nhiệt độ nước tăng lên, khoảng 70% cá địa đực được quan sát đã thành thục.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy nhiệt độ nước và chu kỳ quang ảnh hưởng đến sự phát triển của tuyến sinh dục [30]. Quan sát sự phát triển của tinh sào của cá dìa ở quần đảo Okinawa, Nhật Bản, các giai đoạn chưa trưởng thành, trước khi sinh sản và sinh sản lần lượt là tháng 11 đến tháng 3, tháng 4 đến tháng 5 và tháng 6 đến tháng 7 [169]. Các báo cáo khác trên cá dìa ở Philippines cũng chỉ ra rằng trong điều kiện nuôi nhốt, cá dìa sinh sản nhiều lần trong năm [84]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu hiện tại ở Việt Nam, các giai đoạn chưa trưởng thành, trước khi sinh sản và sinh sản lần lượt là tháng 11 đến tháng 2, tháng 3 đến tháng 4 và tháng 5 đến tháng 6. Điều này có thể do sự khác biệt theo vĩ độ trong mùa sinh sản xảy ra ở cá đực của loài này. Sự phát triển của tinh sào trùng hợp với sự gia tăng nồng độ T trong huyết tương (Borg 1994). Các nghiên cứu trước đây cho thấy sự tồn tại của các thụ thể androgen trong tinh sào ở cá [147, 218]. Trong nghiên cứu này, cá dìa đực chưa thành thực được quan sát thấy vào tháng 11 đến tháng 2 có liên quan đến hàm lượng T thấp. Hàm lượng T trong huyết tương cá dìa đực duy trì ở mức cao vào các tháng 3, 5 và 6. Sự gia tăng hàm lượng T xảy ra khi xuất hiện tinh trùng trong giai đoạn thành thực, GSI cao nhất được quan sát thấy ở cá pacu đực [77]. Khi cá dìa đực chuyển sang giai đoạn sinh sản và sau sinh sản (giai đoạn IV-V), hàm lượng T trong huyết tương giảm đáng kể và duy trì ở mức thấp. Từ các số liệu của chúng tôi, có thể kết luận rằng có mối quan hệ giữa hàm lượng T trong huyết tương với các giai đoạn phát triển của tinh sào, GSI và HSI ở cá dìa đực.

3.2. Ảnh hưởng của hCG, LHRH-A lên hàm lượng E₂ và T trong huyết tương

3.2.1. Biến động hàm lượng E₂ dưới sự ảnh hưởng của hCG và LHRH – A ở cá cái

Trong thí nghiệm sử dụng hCG và LHRH-A + DOM, nhận thấy những thay đổi đáng kể về hàm lượng E₂. Tại thời điểm 12 giờ sau khi tiêm, mức E₂ lần lượt là 2.567 ± 192 và 524 ± 33 pg/ml ở các nghiệm thức hCG và LHRH-A + DOM. Hàm lượng E₂ trong huyết tương trước khi tiêm là 81 ± 26 pg / ml. Sau đó, mức E₂ giảm đáng kể khi tiêm hCG và LHRH-A + DOM sau 24 giờ lần lượt là 82 ± 13 và 28 ± 3 . Sự thay đổi về hàm lượng E₂ ở nhóm được tiêm nước muối sinh lý không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Biến động hàm lượng Estradiol 17- β (E_2) (pg/ml) trong huyết tương cá đìa cái sau khi tiêm 1.500 IU hCG/kg và 50 μ g LHRH-A/kg + 5 mg DOM

Thời điểm	Nghiệm thức		
	Đối chứng (nước muối sinh lý)	hCG	LHRH-A + DOM
Trước khi tiêm	81 $\pm$ 26 ^a	81 $\pm$ 26 ^a	81 $\pm$ 26 ^a
6 giờ sau khi tiêm	48 $\pm$ 5 ^a	48 $\pm$ 8 ^a	61,93 $\pm$ 3 ^a
12 giờ sau khi tiêm	84 $\pm$ 15 ^a	2.567 $\pm$ 192 ^c	524 $\pm$ 33 ^b
18 giờ sau khi tiêm	39 $\pm$ 11 ^a	354 $\pm$ 22 ^b	246 $\pm$ 21 ^b
24 giờ sau khi tiêm	21 $\pm$ 3 ^a	82 $\pm$ 13 ^a	28 $\pm$ 3 ^a

Trong cùng một cột, giá trị có chỉ số trên khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Ở cá đìa cái, sự gia tăng hàm lượng E_2 sau khi tiêm hCG và LHRH-A cho thấy sự tác động của chúng đối với sự hình thành steroid. Trong một nghiên cứu trước đây trên cá chẽm mõm nhọn, hCG và LHRH-A đã làm gia tăng đáng kể hàm lượng E_2 trong huyết tương [160]. Prat và cộng sự (2001) cũng cho thấy rằng hàm lượng E_2 trong huyết tương tăng mạnh ở thời điểm 12 giờ sau khi tiêm GnRH đầu tiên ở cá vược châu Âu (*Dicentrarchus labrax*) [167]. Trong nghiên cứu này, tuyến sinh dục ở cá phản hồi chậm hơn so với cá đực. Điều này có thể là do cá đực thành thực hơn so với cá cái. Ngoài ra, ở cá đực và cá cái, cơ chế tác dụng của hormone là khác nhau, do đó có thể dẫn đến thời gian hiệu ứng khác nhau. Cả hai hormone ngoại sinh hCG và LHRH-A đều làm gia tăng đáng kể hàm lượng E_2 ở buồng trứng và thúc đẩy quá trình tạo noãn hoàng. Kết quả này giúp ích trong việc xác định liều lượng và loại hormone sử dụng trong sinh sản nhân tạo cá biển nói chung và cá đìa nói riêng. Sự suy giảm hàm lượng E_2 sau 12 giờ tiêm có thể liên quan đến hoạt động của trục Não bộ - Tuyến yên – Tuyến sinh dục trong chu kỳ sinh sản ở cá. Khi tế bào trứng ở giai đoạn cuối của quá trình thành thực, nang trứng tạo ra steroid gây chín (MIS) thay vì E_2 như phản ứng với LH [42, 58]. Quá trình hình thành steroid trong buồng trứng được tạo ra bởi hai hormone kích thích sự chín (MIH) là 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α ,20 β -P) và 17 α ,20 β , 21-trihydroxy-4 -pregnen-3-one (20 β -S). Khi MIH tăng cao trong giai đoạn cuối của quá trình thành thực và rụng trứng, chức năng của E_2 suy giảm [59, 134,

136]. Ảnh hưởng của loại hormone khác giải thích cho việc suy giảm hàm lượng E_2 sau khi tiêm 12 giờ.

3.2.2. Biến động hàm lượng T dưới sự ảnh hưởng của hCG và LHRH – A ở cá đực

Ở cá đực, hàm lượng T có sự thay đổi sau khi tiêm hCG và LHRH – A + DOM. Hàm lượng T trong huyết tương ở cá đực trước khi thí nghiệm là 92 ± 39 pg/ml. Khi tiêm hCG và LHRH – A + DOM sau 6 giờ, hàm lượng T trong huyết tương có sự gia tăng lần lượt là 170 ± 12 pg/ml và 650 ± 102 pg/ml. Ở thí nghiệm 12 và 18 giờ sau khi tiêm hCG và LHRH – A + DOM, hàm lượng T ở nghiệm thức tiêm hCG thay đổi không đáng kể, ngược lại với nghiệm thức tiêm LHRH-A, hàm lượng T giảm. Ở 24 giờ sau khi tiêm hormone, hàm lượng T là 190 ± 5 pg/ml (tăng) đối với hCG và 339 ± 5 pg/ml (giảm) đối với thí nghiệm tiêm LHRH – A + DOM. Đối với nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý (đối chứng) không có sự thay đổi đáng kể về hàm lượng T (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Biến động hàm lượng Testosterone (pg/ml) trong huyết tương cá dìa đực sau khi tiêm 1.500 IU hCG/kg và 50 μ g LHRH-A/kg + 5 mg DOM

Thời điểm	Nghiệm thức		
	Đối chứng (nước muối sinh lý)	hCG	LHRH-A + DOM
Trước khi tiêm	92 ± 39^a	92 ± 39^a	92 ± 39^a
6 giờ sau khi tiêm	59 ± 10^a	170 ± 12^b	650 ± 102^c
12 giờ sau khi tiêm	66 ± 10^a	135 ± 10^b	648 ± 118^c
18 giờ sau khi tiêm	82 ± 6^a	149 ± 3^b	490 ± 62^b
24 giờ sau khi tiêm	37 ± 4^a	190 ± 5^b	339 ± 39^b

Trong cùng một cột, giá trị có chỉ số trên khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Testosterone có ảnh hưởng đến quá trình thành thực của tinh sào và hình thành tinh trùng [38, 216]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng T trong huyết tương tăng lên đáng kể sau khi tiêm hCG và LHRH – A, điều này cho thấy ảnh hưởng của chúng đối

với hoạt động sinh sản của cá địa đực. Zadmajid và cộng sự (2018) cho rằng rằng LHRH – A + DOM có tác dụng giải phóng androgen (hormone sinh dục đực), cụ thể là hàm lượng T trong huyết tương tăng cao. Do đó, hàm lượng T đạt cao nhất vào 6 giờ và 12 giờ sau khi tiêm với giá trị lần lượt là 650 ± 102 pg/ml và 648 ± 118 pg/ml. Cần phải hiểu rõ rằng hCG và LHRH – A tác dụng đến cơ quan đích khác nhau [221]. hCG là một kích dục tố hoạt động trên tuyến yên để kích thích bài tiết các hormone steroid, LHRH – A là một hormone gây phóng thích kích dục tố (GnRH) hoạt động trên tuyến yên để kích thích bài tiết kích dục tố, sau đó kích thích giải phóng các hormone steroid [67, 138]. Cơ chế này giải thích cho việc hàm lượng T ở cá địa đực lại khác nhau giữa các nghiệm thức.

3.3. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên đặc điểm sinh lý sinh sản và thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng cá địa

3.3.1. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên đặc điểm sinh lý sinh sản

3.3.1.1. Sức sinh sản

Sức sinh sản là một trong những chỉ tiêu sinh học sinh sản quan trọng. Qua đó, chúng ta có thể ước tính số lượng trứng đẻ ra mỗi lần, từ đó xây dựng kế hoạch sản xuất giống sát với thực tế và yêu cầu. Kết quả xác định sức sinh sản của chúng tôi trên đàn cá cái có khối lượng dao động từ 440 đến 600 gram có kết quả thể hiện ở Bảng 3.3. Trong nghiên cứu này sức sinh sản tuyệt đối của cá địa dao động từ 420.632 đến 732.353 trứng, tương ứng với sức sinh sản tương đối dao động từ 826 đến 1221 trứng/g cá cái. Nghiên cứu của Yeldan và Avsar [220] trên cá địa *Siganus rivulatus*, chỉ ra rằng sức sinh sản tuyệt đối trung bình là 434.761 trứng/cá cái.

Bảng 3.3. Sức sinh sản của đàn cá nghiên cứu theo khối lượng cá cái

STT	Kích thước cá cái (Chiều dài và khối lượng)	Sức sinh sản tuyệt đối (trứng III-IV/cá cái)	Sức sinh sản tương đối (trứng/gram cá cái)
1	29 cm; 440 g	420.632	956
2	31 cm; 580 g	478.943	826
3	30 cm; 600 g	732.353	1.221
Trung bình $\pm$ Độ lệch chuẩn		543.976 ± 165.724	1.001 ± 201

Các loài cá có kích thước noãn bào lớn thường có sức sinh sản nhỏ và ngược lại, những loài cá có sức sinh sản lớn thường có kích thước noãn bào nhỏ. Sức sinh sản và kích thước noãn bào còn phụ thuộc vào tập tính chăm sóc con của cá bố mẹ [18, 19]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về kích thước noãn bào qua các giai đoạn phát triển được thể hiện ở Bảng 3.4. So với các loài cá dìa khác cùng họ, đường kính trứng thành thực của cá dìa *Siganus rivulatus* lớn hơn cá dìa *Siganus guttatus* và trung bình đạt 440 μm [220]. Cá dìa là loài thụ tinh ngoài, do đó trong môi trường tự nhiên có nhiều yếu tố bất lợi như nhiệt độ, dòng chảy, kẻ thù do vậy sức sinh sản của cá phải lớn để tăng tần suất bắt gặp tinh trùng, tỷ lệ thụ tinh và duy trì giống loài đặc biệt đối với các loài cá không có tập tính chăm sóc trứng.

3.3.1.2. Kích thước noãn bào của đàn cá thí nghiệm

Vào mùa sinh sản chính kích thước noãn bào phát triển rất nhanh, đạt kích thước tối đa và thành thực hoàn toàn. Ở phase nhân và chất nhiễm sắc tiền ngoại vi nhân (tương ứng giai đoạn I của buồng trứng) có kích thước nhỏ nhất (53 μ); phase cực hóa, chín và rụng trứng (tương ứng giai đoạn V của buồng trứng), noãn bào đạt kích thước lớn nhất (371 μ) (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Kích thước noãn bào đàn cá thí nghiệm

STT	Các giai đoạn phát triển noãn bào	Đường kính (μm)
1	Phase nhân và chất nhiễm sắc tiền ngoại vi nhân	53 ± 12
2	Phase tiền ngoại vi nhân và ngoại vi nhân	82 ± 18
3	Phase không bào hóa	148 ± 40
4	Phase thể noãn hoàng – tích lũy noãn hoàng	364 ± 40
5	Phase cực hóa, chín và rụng trứng	371 ± 52

Kích thước noãn bào cũng như đặc điểm hình thái và tổ chức học của buồng trứng cá dìa cũng được mô tả trong các nghiên cứu trước đây. Trong buồng trứng tồn tại nhiều noãn bào đại diện cho các giai đoạn phát triển khác nhau, nhưng chủ yếu là các giai đoạn III, IV và V. Trong nghiên cứu này, giai đoạn VI không tìm thấy trong buồng trứng, thực tế giai đoạn này khá ngắn, ngay sau khi cá đẻ xong và sau đó quay về giai đoạn III.

3.3.2. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên thành phần sinh hóa của tinh sào và buồng trứng cá dĩa

3.3.2.1. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa

3.3.2.1.1. Thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa ở giai đoạn thành thực và chưa thành thực

Trong nghiên cứu này, 60 mẫu tinh sào được thu từ đàn cá dĩa thí nghiệm trong tháng 4 năm 2018. Các mẫu tinh sào được phân thành 2 nhóm, nhóm tinh sào chưa thành thực (giai đoạn III) và nhóm tinh sào thành thực (giai đoạn IV-V) [18, 19] (Hình 3.12). Kết quả phân tích thành phần sinh hóa của 2 nhóm tinh sào được thể hiện qua Bảng 3.5. Kết quả cho thấy, hàm lượng protein và tro của tinh sào ở giai đoạn thành thực cao hơn so với giai đoạn chưa thành thực. Ngược lại, hàm lượng lipid ở giai đoạn thành thực thấp hơn so với giai đoạn chưa thành thực. Trong khi đó độ ẩm không khác nhau nhiều giữa 2 giai đoạn phát triển của tinh sào.

Bảng 3.5. Thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa 1+ tuổi nuôi trong ao đất tại Khánh Hòa trước khi tiên kích dục tố

Các chỉ tiêu	Tinh sào giai đoạn chưa thành thực (III)	Tinh sào giai đoạn thành thực (IV-V)
Protein (%)	13,60 ± 1,30	14,80 ± 1,20
Lipid (%)	13,14 ± 0,60	11,91 ± 0,50
Tro (%)	0,90 ± 0,02	1,69 ± 0,06
Độ ẩm (%)	75,59 ± 2,80	79,23 ± 2,40

Protein, lipid, độ ẩm và tro là các chỉ tiêu sinh hóa cơ bản phản ánh mức độ thành thực sinh dục của tinh sào ở cá xương [55]. Vào mùa sinh sản, các chất dự trữ tích lũy ở các cơ quan được huy động để tổng hợp protein nuôi dưỡng các tế bào sinh dục phát triển. Khi đó, nhu cầu dinh dưỡng và năng lượng cho quá trình thành thực và tạo giao tử ở cá tăng lên [172]. Trong thời kỳ tạo giao tử, sự sinh trưởng của tuyến sinh dục tăng lên liên tục. Trong khi đó, sự sinh trưởng của tế bào sinh dưỡng hầu như dừng lại. Thậm chí, sau khi cá dừng ăn, tuyến sinh dục vẫn tiếp tục tích lũy lipid và protein [55, 172]. Chất dinh dưỡng được chuyển hóa vào tuyến sinh dục chủ yếu có nguồn gốc từ mô sinh dưỡng ở cá bố mẹ, có khoảng 7,0-8,7 % lipid từ tế bào sinh dưỡng được chuyển hóa vào tuyến sinh dục của cá [18].



(A)

Cá dĩa *Siganus guttatus*



(B)

Tinh sào giai đoạn III: Khối tinh sào đã lớn nhưng chưa căng nở, màu trắng đục, căng đầy. Đang dần tích lũy.



(C)

Hình 3.12. Hình thái tinh sào cá dĩa giai đoạn chưa thành thực (B) và thành thực (C)

So với các loài động vật có xương sống khác, hàm lượng protein trong tinh sào cá là khá thấp [195]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng protein trong tinh sào cá dĩa thành thực là 14,8%, tỷ lệ này cao hơn nhiều so với một số loài cá xương khác [195], và chỉ thấp hơn cá hồi Đại Tây Dương (30%) [58]. Nhiều tác giả cho rằng thành phần protein này có thể đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tinh trùng và nó có chứa một số enzyme quan trọng của quá trình trao đổi chất [58, 59, 60].

3.3.2.1.2. Ảnh hưởng của hormone lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá dĩa

Kết quả phân tích cho thấy tinh sào cá đực được xác định ở các giai đoạn III, IV và V. Sau khi tiêm 12 giờ và 24 giờ, tất cả tinh sào cá đực đều chuyển sang giai đoạn V. Điều này cho thấy hCG và LHRH-A + DOM có ảnh hưởng đến sự thành thực hoàn toàn của tinh sào sau 12 giờ. Điều đáng lưu ý là ở nghiệm thức đối chứng, việc tiêm nước muối sinh lý cũng làm cho cá đực thành thực hoàn toàn. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Mức độ thành thực của cá địa đực sau khi tiêm hormone

Thời điểm	Nghiệm thức		
	Đối chứng	hCG	LHRH-A + DOM
Trước khi tiêm	Giai đoạn III, IV và V		
12 giờ sau khi tiêm	Giai đoạn V	Giai đoạn V	Giai đoạn V
24 giờ sau khi tiêm	Giai đoạn V	Giai đoạn V	Giai đoạn V

Việc xác định thành phần sinh hóa của tinh sào cá địa dưới ảnh hưởng của các hormone ngoại sinh là cơ sở khoa học để lựa chọn loại và liều lượng hormone phù hợp trong sinh sản nhân tạo. Ngoài ra, thông tin về thành phần sinh hóa của tinh sào giúp người nuôi lựa chọn và bổ sung thành phần dinh dưỡng vào khẩu phần ăn hằng ngày trong quá trình nuôi vỗ cá bố mẹ, giúp thúc đẩy nhanh quá trình thành thực và nâng cao chất lượng sản phẩm sinh dục [14, 41, 162]. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hCG và LHRH-A lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá địa được trình bày ở Bảng 3.7 và Bảng 3.8.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của hCG lên thành phần sinh hóa tinh sào (Giai đoạn IV-V)

Thời điểm	Thành phần sinh hóa			
	Độ ẩm (%)	Tro (%)	Protein (%)	Lipid (%)
Trước khi tiêm	79,23 ± 0,10 ^a	1,69 ± 0,10 ^a	14,80 ± 0,05 ^a	11,91 ± 0,10 ^b
12 giờ sau khi tiêm	67,25 ± 0,10 ^b	1,49 ± 0,10 ^a	18,66 ± 0,05 ^b	6,96 ± 0,10 ^a
24 giờ sau khi tiêm	59,56 ± 0,10 ^b	1,55 ± 0,10 ^a	16,25 ± 0,05 ^b	8,27 ± 0,10 ^a

Trong cùng một cột, giá trị có chỉ số trên khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

hCG là loại kích dục tố dị chủng, được dùng có hiệu quả trên nhiều loài cá, gây được những phản ứng oxy hóa cho các enzyme chuyển hóa protein và lipid như dehydrogenara và estaraza [20, 207]. Do đó, hàm lượng protein tăng lên đáng kể sau khi tiêm hormone. Kết quả phân tích cho thấy không có sự sai khác về hàm lượng tro ($P > 0,05$) trước và sau khi tiêm hCG. Tuy nhiên, hàm lượng protein, lipid và độ ẩm đã

có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) ở thời điểm trước khi tiêm và 24 giờ sau khi cá được tiêm 1.500 IU hCG/kg cá (Bảng 3.7). Tương tự, khi phân tích thành phần sinh hóa của tinh sào cá dìa ở nghiệm thức tiêm 50 μ g LHRH-A + 5 mg DOM/kg cá, cho thấy hàm lượng protein và độ ẩm có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở thời điểm 12 giờ và 24 giờ sau khi cá được tiêm hormone, ngược lại hàm lượng lipid và tro không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.8).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của LHRH-A + DOM lên thành phần sinh hóa tinh sào (Giai đoạn IV-V)

Thời điểm	Thành phần sinh hóa			
	Độ ẩm (%)	Tro (%)	Protein (%)	Lipid (%)
Trước khi tiêm	79,23 $\pm$ 0,10 ^a	1,69 $\pm$ 0,10 ^a	14,80 $\pm$ 0,05 ^a	11,91 $\pm$ 0,10 ^a
12 giờ sau khi tiêm	77,65 $\pm$ 0,10 ^a	1,57 $\pm$ 0,10 ^a	14,61 $\pm$ 0,05 ^a	9,22 $\pm$ 0,10 ^a
24 giờ sau khi tiêm	72,32 $\pm$ 0,10 ^b	1,62 $\pm$ 0,10 ^a	12,44 $\pm$ 0,05 ^b	10,26 $\pm$ 0,10 ^a

Trong cùng một cột, giá trị có chỉ số trên khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

LHRH – A là một GnRH (hormone giải phóng gonadotropin/Gonadotropin-releasing hormone) tổng hợp. Đây là hormone gây phóng thích kích dục tố, tác động lên tuyến yên tiết ra FSH (Follicle-stimulating hormone) và LH (Luteinizing hormone), hai hormone này ảnh hưởng lên tuyến sinh dục, kích thích tuyến sinh dục tiết hormone steroid [219]. FSH tham gia nhiều chức năng khác nhau trong tinh sào, kích thích tổng hợp androgen trong tế bào Leydig và điều khiển hoạt động của tế bào Sertoli trong quá trình tạo tinh [169, 219]. Hàm lượng FSH trong huyết tương cao ở giai đoạn đầu quá trình tạo tinh và đạt cực đại trong suốt thời kỳ phát triển của tinh sào, sau đó giảm xuống sau khi sinh sản. Hàm lượng LH trong huyết tương thấp trong thời kỳ đầu quá trình tạo tinh, bắt đầu tăng lên trong thời kỳ phát triển và đạt cực đại trong lúc sinh sản [169, 219].

Trong điều kiện nuôi nhốt, biến động của các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ mặn, chu kỳ trăng,... thường gây bất lợi, gây stress cho cá và ức chế sự tiết hormone sinh dục và sinh sản, từ đó các quá trình trao đổi chất, chuyển hóa năng lượng và tích lũy noãn hoàng đều chậm do thiếu hormone kích thích [169].

Do vậy việc tiêm hCG và LHRH-A + DOM đã kích thích tuyến sinh dục tiết steroid kích thích sự thành thục sinh dục, cụ thể ở đây là tinh sào và thúc đẩy quá trình sinh tinh.

3.3.2.2. Ảnh hưởng của hCG, LHRH – A lên thành phần sinh hóa của buồng trứng cá dĩa

3.3.2.2.1. Thành phần sinh hóa của buồng trứng cá dĩa ở giai đoạn thành thục và chưa thành thục

Bảng 3.9. Thành phần sinh hóa của buồng trứng cá dĩa 1+ tuổi nuôi trong ao đất tại Khánh Hòa trước khi tiêm kích dục tố

Các chỉ tiêu	Buồng trứng giai đoạn chưa thành thục (II)	Buồng trứng giai đoạn thành thục (IV)
Protein (%)	21,74 ± 0,05	28,33 ± 0,05
Lipid (%)	28,83 ± 0,10	23,82 ± 0,10
Tro (%)	0,32 ± 0,10	0,9 ± 0,10
Độ ẩm (%)	67,91 ± 0,10	60,86 ± 0,10

Trong nghiên cứu này, 60 mẫu tinh sào được thu từ đàn cá dĩa thí nghiệm trong tháng 4 năm 2018. Các mẫu tinh sào được phân thành 2 nhóm, nhóm tinh sào chưa thành thục (giai đoạn II) và nhóm tinh sào thành thục (giai đoạn IV) [18, 19]. Kết quả phân tích cho thấy thành phần sinh hóa của 2 nhóm buồng trứng được thể hiện qua Bảng 3.9. Kết quả cho thấy, hàm lượng protein và tro của buồng trứng ở giai đoạn thành thục cao hơn so với giai đoạn chưa thành thục. Ngược lại, hàm lượng lipid và độ ẩm ở giai đoạn thành thục thấp hơn so với giai đoạn chưa thành thục (Bảng 3.9).



Cá dĩa *Siganus guttatus*



Buồng trứng giai đoạn II: màu hồng nhạt, thể tích nhỏ, mạch máu nhỏ xung quanh. các hạt trứng không thể quan sát bằng mắt thường.



Buồng trứng giai đoạn IV: màu sắc đậm, mạch máu phát triển, thể tích và khối lượng tăng lên đáng kể, các hạt trứng to và có thể quan sát bằng mắt thường.

Hình 3.13. Phân loại độ thành thục của buồng trứng cá dĩa

3.3.2.2.2. Ảnh hưởng của hormone lên thành phần sinh hóa trong buồng trứng cá địa (giai đoạn IV)

Sau khi tiêm hormone, cá được giải phẫu để kiểm tra độ thành thực của buồng trứng từ đó đánh giá ảnh hưởng của hCG và LHRH-A lên khả năng chuyển hóa của buồng trứng. Kết quả đánh giá ở các mốc thời gian 12 giờ và 24 giờ sau khi tiêm được thể hiện ở Bảng 3.10. Buồng trứng của đàn cá nghiên cứu trước khi tiêm hormone được đánh giá có độ thành thực không đồng đều. Các buồng trứng của cá cái bắt gặp đang ở giai đoạn II, III và IV. Sau khi tiêm hormone 12 giờ và 24 giờ, độ thành thực của buồng trứng ở các nghiệm thức không có sự sai khác. Hơn nữa độ thành thực sau khi tiêm không khác so với trước khi tiêm. Các cá thể cái sau khi giải phẫu có độ thành thực của buồng trứng giai đoạn II, III và IV. Tuy nhiên quan sát của chúng tôi có hơn 80% số cá cái có buồng trứng giai đoạn III-IV. Điều này chưa thể nhận định rằng hCG và LHRH-A có vai trò ảnh hưởng đến sự phát triển của noãn bào, kích thích nang trứng tiết estradiol và thúc đẩy sự tích lũy noãn hoàng và thành thực của cá địa cái.

Bảng 3.10. Mức độ thành thực của cá cái sau khi tiêm hormone

Thời điểm	Nghiệm thức		
	Đối chứng	hCG	LHRH – A + DOM
Trước khi tiêm	Giai đoạn II, III và IV		
12 giờ sau khi tiêm	Giai đoạn III	Giai đoạn V	Giai đoạn II, III
24 giờ sau khi tiêm	Giai đoạn III, IV	Giai đoạn II, IV	Giai đoạn II, III

Từ kết quả thu được, chúng tôi có thể nhận định rằng trong khoảng thời gian 12-24 giờ là chưa đủ dài để các quá trình chuyển hóa về mặt sinh lý và nội tiết sinh sản diễn ra, kích thích sự thành thực hoàn toàn của noãn bào và buồng trứng. Quá trình thành thực sinh dục ngoài yếu tố hormone, còn có cả các yếu tố môi trường, dinh dưỡng và sự có mặt của con khác giới. Đặc biệt cá địa là loài đẻ trứng dính do đó sự có mặt của các giá thể cũng có ảnh hưởng đến sự thành thực.

Protein, ẩm, tro và lipid là các chỉ tiêu sinh hóa căn bản phản ánh mức độ tích lũy dinh dưỡng hay noãn hoàng trong tế bào trứng, từ đó dự báo mức độ thành thực

của cá [13]. Do đó việc xác định thành phần sinh hóa của trứng cá trong tuyến sinh dục là cần thiết. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 3.11 và Bảng 3.12.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của hormone lên thành phần sinh hóa trong buồng trứng cá dìa (giai đoạn IV) sau khi tiêm 1.500 IU hCG/kg cá cái

Thời điểm	Thành phần sinh hóa			
	Độ ẩm (%)	Tro (%)	Protein (%)	Lipid (%)
Trước khi tiêm	67,91 ± 0,1 ^a	0,32 ± 0,1 ^a	21,74 ± 0,05 ^a	28,83 ± 0,1 ^b
12 giờ sau khi tiêm	65,40 ± 0,1 ^a	0,75 ± 0,1 ^a	37,90 ± 0,05 ^b	6,5 ± 0,1 ^a
24 giờ sau khi tiêm	66,80 ± 0,1 ^a	0,78 ± 0,1 ^a	36,98 ± 0,05 ^b	5,5 ± 0,1 ^a

Các ký tự khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$)

Kết quả phân tích chỉ ra không có sự sai khác về độ ẩm và tro ($P > 0,05$) trước và sau khi cá cái được tiêm hCG. Tuy nhiên, hàm lượng protein và lipid đã có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) ở thời điểm 12 giờ và 24 giờ sau khi cá được tiêm hormone (Bảng 3.11). Tương tự như vậy thành phần sinh hóa buồng trứng cá dìa cũng được quan sát đối với nghiệm thức tiêm LHRH-A + 5mg DOM, kết quả cho thấy hàm lượng protein và lipid có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.12).

LHRH-A là GnRH tổng hợp, tác động lên tuyến yên, kích thích tuyến yên tiết kích dục tố. Các kích dục tố như FSH và LH đến lượt mình ảnh hưởng lên tuyến sinh dục, kích thích tuyến sinh dục tiết hormone steroid [5, 13]. Từ đó, steroid kích thích tế bào gan tổng hợp chất tiền noãn hoàng và sau đó kết nạp vào noãn bào. hCG gây được những phản ứng oxy hóa cho các enzym chuyển hóa protein và lipid như dehydrogenaza và esteraza [5, 12]. Do đó dưới ảnh hưởng của hCG, hàm lượng protein và lipid trong buồng trứng có sự gia tăng hàm lượng đáng kể.

Bảng 3.12. Biến động thành phần sinh hóa trong buồng trứng cá dià (giai đoạn IV) sau khi tiêm 50 µg LHRH-A + 5mg DOM/kg cá cái

Thời điểm	Thành phần sinh hóa			
	Độ ẩm (%)	Tro (%)	Protein (%)	Lipid (%)
Trước khi tiêm	67,91 ± 0,1 ^a	0,32 ± 0,1 ^a	21,74 ± 0,05 ^a	28,83 ± 0,1 ^b
12 giờ sau khi tiêm	71,80 ± 0,1 ^a	0,79 ± 0,1 ^a	36,89 ± 0,05 ^b	6,4 ± 0,1 ^a
24 giờ sau khi tiêm	58,80 ± 0,1 ^a	0,72 ± 0,1 ^a	33,95 ± 0,05 ^b	8,1 ± 0,1 ^a

Các ký tự khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$)

Thành phần lipid và protein trong trứng đóng vai trò quan trọng. Chất lượng noãn hoàng cũng như tỷ lệ dưỡng chất trong trứng ảnh hưởng đến quá trình phát triển phôi và chất lượng ấu trùng cá về sau [162]. Do vậy việc đảm bảo các yếu tố môi trường, bổ sung dinh dưỡng trong khẩu phần ăn cho cá bố mẹ trong quá trình nuôi vỗ hoặc can thiệp bằng hormone ngoại sinh như hCG hay LHRH-A là cần thiết, giúp thúc đẩy quá trình tích lũy noãn hoàng và thành thực sớm. Trong điều kiện nuôi nhốt, các yếu tố môi trường thường bất lợi gây stress cho cá, ức chế sự tiết hormone sinh dục và sinh sản, từ đó các quá trình trao đổi chất, chuyển hóa năng lượng và tích lũy noãn hoàng đều chậm do thiếu hormone kích thích. Do vậy việc tiêm hCG và LHRH-A đã kích thích tuyến sinh dục tiết steroid kích thích sự thành thực của noãn bào, chín và rụng trứng [5, 12, 13].

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

1. KẾT LUẬN

Hàm lượng E_2 , T và 11-KT trong huyết tương cá địa biến động theo chu kỳ sinh sản và có mối quan hệ với các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục, HSI và GSI. Ở cá cái, hàm lượng E_2 đạt giá trị cao nhất (2.305 pg/ml) trong giai đoạn tích lũy chất noãn hoàng (giai đoạn III). Ở cá đực, hàm lượng T và 11-KT trong huyết tương cao nhất được quan sát ở giai đoạn sinh tinh (giai đoạn III) với các giá trị lần lượt là 221,7 pg/ml và 222 pg/ml.

Cá địa là loài đẻ nhiều lần trong năm, mùa sinh sản kéo dài. Tổ chức học tuyến sinh dục không đồng bộ, có nhiều tế bào sinh dục ở các giai đoạn phát triển khác nhau trong cùng một thời điểm. GSI và HSI biến động đáng kể trong chu kỳ sinh sản. Giá trị HSI tăng từ giai đoạn II đến giai đoạn III, sau đó giảm dần từ giai đoạn III đến giai đoạn V. Ngược lại, GSI tăng liên tục từ giai đoạn II đến giai đoạn V.

Hai hormone ngoại sinh là hCG và LHRH – A có ảnh hưởng đến hàm lượng E_2 ở cá cái và T ở cá đực. Khi cá được tiêm hai hormone hàm lượng E_2 và T huyết tương tăng lên, thúc đẩy quá trình tạo noãn hoàng ở cá cái và sinh tinh ở cá đực.

Khi tiêm hai hormone hCG và LHRH – A, hàm lượng protein, lipid và độ ẩm (ở cá đực); protein và lipid (ở cá cái) có sự biến đổi đáng kể. Khi cá được tiêm hai loại hormone này, hàm lượng protein trong tinh sào và buồng trứng tăng lên sau 12 và 24 giờ. Điều này cho thấy hormone ngoại sinh có ảnh hưởng đến sự thay đổi thành phần sinh hóa tuyến sinh dục, thúc đẩy quá trình thành thực sinh dục ở cá địa.

2. ĐỀ XUẤT

Trong chu kỳ sinh sản của cá địa, ngoài việc xác định E_2 , T và 11-KT, cần có những nghiên cứu về P trong chu kỳ sinh sản. Qua đó, cho chúng ta thấy rõ hơn mối tương quan giữa E_2 , T, 11-KT và P trong chu kỳ sinh sản, cũng như mối liên hệ với GSI và HSI.

Trong thí nghiệm tiêm hCG và LHRH – A, nên lập lại nhiều lần và thử nghiệm ở nhiều nồng độ hormone khác nhau để so sánh hiệu quả sử dụng cũng như lựa chọn loại hormone và liều lượng tối ưu trong sinh sản nhân tạo cá địa.

Trên cơ sở hiểu rõ sự thay đổi các hormone steroid trong chu kỳ sinh sản cá dìa, cần có những nghiên cứu về dinh dưỡng cho đàn cá bố mẹ và nâng cao hiệu quả sinh sản nhân tạo đối tượng này.

Ngoài ra, cần có nghiên cứu tiếp theo về quan hệ giữa hàm lượng hormone steroid huyết tương với thành phần sinh hóa của tuyến sinh dục nhằm làm rõ vai trò của hormone steroid huyết tương trong quá trình phát triển của tuyến sinh dục ở dìa nói riêng và cá xương nói chung.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyễn Văn An**, Nguyễn Văn Minh, Phạm Quốc Hùng (2021), “Hàm lượng 11-Keto Testosterone huyết tương trong mùa sinh sản của cá dìa đực (*Siganus guttatus*)”. *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, Số 2/2021, tr 2-7.
2. Pham, H. Q., Phan, U. V., **Nguyen, A. V.**, Augustine Arukwe., Le, H. M., (2020), “Effects of human chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone analogue on plasma steroid hormones and spawning performances in golden rabbitfish *Siganus guttatus*”. *Journal of Applied Ichthyology*, 2020;36:212–218.
3. Pham, H. Q., **Nguyen, A. V.**, (2019), “Seasonal changes in hepatosomatic index, gonadosomatic index and plasma estradiol-17 β level in captivity reared female rabbitfish (*Siganus guttatus*)”. *Aquaculture Research*, 50 (8): 2191-2199.
4. **Nguyễn Văn An**, Nguyễn Văn Minh, Phạm Quốc Hùng (2019), “Ảnh hưởng của hCG và LHRH – A lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá dìa (*Siganus guttatus*)”. *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, Số 3/2019, tr 3-8.
5. Phạm Quốc Hùng, Phạm Huy Trường, **Nguyễn Văn An** (2018), “Ảnh hưởng của hCG và LHRH – A lên đặc điểm sinh lý sinh sản cá dìa (*Siganus guttatus*)”. *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, Số 3/2018, tr 38-43.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Tường Anh (1999), *Một số vấn đề về nội tiết học sinh sản cá*. Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp, 238 trang.
2. Nguyễn Tường Anh (2003), *Một số tiến bộ trong nội tiết học sinh sản cá. Khía cạnh cơ sở lý thuyết và ứng dụng*. Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp, 183-193.
3. Nguyễn Tường Anh và Phan Văn Kỳ (2004), “Dùng $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one kích thích cá mè vinh và cá he vàng đẻ”. Hội thảo toàn quốc về nghiên cứu và ứng dụng khoa học và công nghệ trong NTTS, Vũng Tàu 22-23/12/2004, 323-329.
4. Nguyễn Tường Anh, Nguyễn Thị Ngọc Duyên và Nguyễn Hà Thanh Phong (2005), “Kích thích cá tra và cá hủ đẻ: Dùng $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one trong liều quyết định”. *Tạp Chí Thủy Sản*, số 12, 2005.
5. Nguyễn Tường Anh, Phạm Quốc Hùng (2016), Sách chuyên khảo: *Cơ sở ứng dụng Nội tiết học Sinh sản cá*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 180 trang.
6. Lê Văn Dân, Lê Đức Ngoan (2006), “Nghiên cứu sự phát triển tuyến sinh dục cá dìa (*Siganus guttatus* Bloch, 1787) ở vùng đầm phá Thừa Thiên Huế”; *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 2, 61-64.
7. Lê Văn Dân và Lê Đức Ngoan (2006), "Một số chỉ tiêu sinh sản của cá (*Siganus guttatus* Bloch, 1787) ở đầm phá Thừa Thiên Huế". *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 49-61.
8. Lê Văn Dân, Nguyễn Tường Anh, Võ Văn Phú (2007a), “Kích thích chín và rụng trứng cá Trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idellus*) bằng $17\alpha,20\beta$ --dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20P) như liều quyết định”. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 99, 36-39.
9. Lê Văn Dân, Nguyễn Tường Anh, Võ Văn Phú (2007b), “Tác dụng của Progesteron, $17\alpha,20\beta$ --dihydroxy-4-pregnen-3-one và Desoxycorticosteron Acetat lên sự chín và rụng trứng *in vivo* của cá Trôi Ấn độ (*Labeo rohita*)”. *Tạp Chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, số 4, 67-74.

10. Nguyễn Dương Dũng, Nguyễn Tường Anh (2003), “Kích thích cá Chép sinh sản bằng 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesteron sau liều sơ bộ bằng LHRH-A”. *Tuyển tập Báo cáo Khoa học về Nuôi trồng Thủy sản tại Hội nghị Khoa học Toàn quốc lần thứ 2 (24-25/11/2003)*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 262-265.
11. Võ Thị Ngọc Giàu, Lê Minh Hoàng, Phan Văn Út, Phạm Quốc Hùng (2014), “Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng, pH và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cá dìa (*Siganus guttatus* Bloch, 1787)”. *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, số 3/2014, 26-30.
12. Phạm Quốc Hùng, Nguyễn Tường Anh (2011), Sách tham khảo: “Sinh sản nhân tạo cá - ứng dụng hormone steroid”, Nhà xuất bản Nông nghiệp 2011.
13. Phạm Quốc Hùng (chủ biên), Nguyễn Tường Anh, Nguyễn Đình Mão (2014), Sách tham khảo: “Hormone và sự điều khiển sinh sản ở cá”, Nhà xuất bản Nông nghiệp 2014.
14. Phạm Quốc Hùng, Phan Văn Út, Lê Minh Hoàng, Nguyễn Văn Minh, Phạm Phương Linh (2017), “Chu kỳ phát triển buồng trứng và ảnh hưởng của Vitamin C lên một số đặc điểm sinh học sinh sản cá dìa (*Siganus guttatus*)”. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 3+4/2017, 190-195.
15. Nguyễn Thị Yến Linh, Diệp Hồng Phước, Nguyễn Tường Anh (2006), “Thí nghiệm kích thích cá Chép (*Cyprinus carpio*) sinh sản bằng Domperidon và 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20P)”. *Tạp Chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, số đặc biệt chuyên đề Thủy sản 4/2006, 201-206.
16. Dương Nhật Long và Nguyễn Hoàng Thanh (2008), “Kết quả bước đầu về sinh sản nhân tạo cá Leo (*Wallago attu* Schneider)”. *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, 2008 (2), 29-38.
17. Nguyễn Đình Mão (1996), “Một số đặc điểm sinh học của cá Dìa (*Siganus guttatus*) ở đầm Thị Nại, Quy Nhơn”, *Tập san Khoa học Công nghệ Thủy sản*, số 1, 19-26.
18. Nikolski, G.V. (1963) “*Sinh thái học cá*”. Người dịch Phạm Thị Minh Giang & Mai Đình Yên, Nhà xuất bản Đại Học, 1973.
19. Sakun O. F. & Butskaia N. A. (1968), “Chu kỳ phát triển tuyến sinh dục của cá”. Nguyễn Tường Anh dịch, 42 trang.

20. Bùi Minh Tâm, Nguyễn Thanh Phương và Dương Nhựt Long (2008), “Ảnh hưởng của liều lượng và phương pháp tiêm hCG đến sinh sản bán nhân tạo cá lóc bông (*Channa micropeltes*)”, *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, 76-81.
21. Nguyễn Nhật Thi (1991), "Cá biển Việt Nam. Cá Xương vịnh Bắc bộ", *Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật*, 84-85.
22. Trung tâm khuyến ngư Thừa Thiên Huế (2007), *Báo cáo kết quả thực hiện mô hình: Nuôi Cá dìa giống sinh sản nhân tạo (Siganus guttatus) kết hợp với Rong Câu chỉ vàng (Gracilaria Verrucosa) và tôm sú (Penaeus Monodon)*.
23. Phan Văn Út (2011 – 2014), *Nghiên cứu các thông số kỹ thuật, xây dựng quy trình kỹ thuật sản xuất giống nhân tạo cá dìa Siganus guttatus* (Bloch, 1787), Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu Khoa học và Công nghệ, Tỉnh Khánh Hòa.

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

24. Aas, G. H., Terje, R., Bjarne, G. (1991), “Evaluation of milt quality of Atlantic salmon”. *Aquaculture*, 95, 125-132.
25. Adachi, S., Kajiura, H., Kagawa, H. and Nagahama, Y. (1990), “Identification of aromatizable androgens secreted by isolated thecal cell layers from vitellogenic ovarian follicles of a teleost, amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)”. *Biomedical Research*, 11, 359-363.
26. Alderdice, D.F. (1998), “Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae”. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds), *Fish Physiology* Vol. 11A, Academic Press, London, 163-251.
27. Almendras, J.M., Duenas, C., Nacario, J., Sherwood, M., Crim, L.W. (1988), “Sustained hormone release: III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass (*Lates calcarifer*)”. *Aquaculture*, 74, 97-111.
28. AOAC (2000). Official Methods of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
29. Arukwe, A., and Goksøyr, A. (2003), “Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption”. *Comparative Hepatology* 2003, 2-4.

30. Ayson, F.G. (1991), "Induced spawning of rabbitfish (*Siganus guttatus* Bloch) using human chorionic gonadotropin (HCG)". *Aquaculture*, 95, 133-137.
31. Ayson, F.G. và Lam, T.J. (1993), "Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival". *Aquaculture*, 109 (1), 83-93.
32. Barannikova, I. A., Dyubin, V. P., Bayunova, L. V., & Semenkova, T. B. (2002). Steroids in the control of reproductive function in fish. *Neuroscience and ehavioral Physiology*, 32(2), 141–148. <https://doi.org/10.1023/A:1013923308125>.
33. Battaglione, C., Talbot, B. (1994), "Hormone induction and larval rearing of mullet (*Argyrosomus hololepidotus*: Sciaenidae)". *Aquaculture*, 126, 73-81.
34. Battaglione, C., Selosse, M. (1996), "Hormone-induced ovulation and spawning of captive and wild broodfish of the catadromous Australian bass, *Macquaria novemaculeata* Steindachner, (Percichthyidae)". *Aquaculture. Res.* 27, 191-204.
35. Ben-Tuvia, A. (1966), "Red Sea fishes recently found in the Mediterranean Sea", 254-275.
36. Bern, H. A. (1967), "Hormones and endocrine glands of fishes. Studies of fish endocrinology reveal major physiologic and evolutionary problems". *Science*, 158, 455-462.
37. Bieniarz, K., Epler, P. (1992), "Advances in reproductive endocrinology of fish". *Journal of Physiol and Pharmacol*, 43, 215-22.
38. Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B (1982) Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 65– 79. <https://doi.org/10.1139/f82-009>.
39. Birch, N.P., Loh, Y.P. (1990), "Cloning and sequence and expression of rat cathepsin D". *Nucleic Acids Research*, 18, 6445–6446.
40. Borg, B., (1994), "Androgens in teleost fishes". *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3, 219-245.

41. Bozkurt, Y., Gretmen, F., Kokcu, O., Erçin, U. (2011). Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science*, 56(8), 355–364.
42. Bromage, N., Porter M, Randall C. (2001), “The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin”. *Aquaculture*, 197, 63-98.
43. Brooks, S., Tyler, C.R., Carnevali, O., Coward, K., Sumpter, J.P. (1997), “Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*”. *Gene*, 1997. 201, 45-54.
44. Campbell, B., Dickey, J.T., and Swanson, P. (2003), “Endocrine Changes during Onset of Puberty in Male Spring Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*”. *Biology of Reproduction*, 69, 2109-2117.
45. Campos-Mendoza, A., McAndrew, B.J., Coward, K., and Bromage, N. (2004), “Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effects on spawning periodicity, fecundity and egg size”. *Aquaculture*, 231, 299 – 314.
46. Capasso, C., Lees, W.E., Capasso, A., Scudiero, R., Carginale, V., Kille, P., Kay, J., Parisi, E. (1999), “Cathepsin D from the liver of the Antarctic icefish *Chionodraco hamatus* exhibits unusual activity and stability at high temperatures”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1431, 64-73.
47. Carnevali, O., Mosconi, G., Roncarati, A., Belvedere, P., Romano, M., Limatola, E. (1992), “Changes in the electrophoretic pattern of yolk proteins during vitellogenesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*” L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 103, 955-962.
48. Carnevali, O., Mosconi, G., Roncarati, A., Belvedere, P., Limatola, E., Polzoneni-Magni, A.M. (1993), “Yolk protein changes during oocyte growth in European sea bass *Dicentrarchus labrax*” L. *Journal of Applied Ichthyology*, 9, 175-184.

49. Carnevali, O., Carletta, R., Cambi, A., Vita, A., Bromage, N. (1999a), "Yolk Formation and Degradation during Oocyte Maturation in Seabream *Sparus aurata*: Involvement of Two Lysosomal Proteinases". *Biology of Reproduction*, 60, 140-146.
50. Carnevali, O., Centonze, F., Brooks, S., Marota, I., Sumpter, J.P. (1999b), "Molecular Cloning and Expression of Ovarian Cathepsin D in Seabream, *Sparus aurata*". *Biology of Reproduction*, 61, 785-791.
51. Carragher, F. and Pankhurst, W. (1993), "Plasma levels of sex steroids during sexual maturation of snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae), caught from the wild". *Aquaculture*, 109, 375-388.
52. Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerda, J., Ramos, J., Mañanos, E., and Bromage, N. (1995), "Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)", in: Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Bromage, N.R. and Roberts R.J., Eds., Blackwell Science, Oxford, UK, 138.
53. Cavaco, E., Vilroix, C., Trudeau, V L. Schulz, R W., and Goos, H J. (1998), "Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*)". *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275, R1793-R1802.
54. Cavaco, E., van Baal, J., van Dijk, W., Hassing, G. A., Goos, H. J., Schulz, R. W. (2001), "Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*)". *Biol Reprod*, 64, 1358-65.
55. Cerda J., Calman G., LaFleur Jr J., Limesand, S. (1996), "Pattern of Vitellogenesis and Follicle Maturation Competence during the Ovarian Follicular Cycle of *Fundulus heteroclitus*". *General and Comp Endocrinol*, 103, 24-35.
56. Chan, L., Tan, H., Pangm, M, and Lam, J. (1991). "Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766)". *Journal of Experimental Zoology*, 257, 96-109.

57. Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 47, 775–787.
58. Copeland, P., and Thomas, P. (1989), “Control of Gonadotropin Release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): Evidence for Lack of Dopaminergic Inhibition”. *General and Comparative Endocrinology*, 74, 474-483.
59. Cowan, M., Azpeleta, C., & López-Olmeda, J. F. (2017). Rhythms in the endocrine system of fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 187, 1057–1089. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1094-5>.
60. Crim, L.W., Bettles, S. (1997). “Use of GnRH analogues in fish culture. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.F. (Eds), Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 1: *Endocrinology and Reproduction*”. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, 369-382.
61. Crim, L.W., Nestor Jr., J.J., Wilson, C.E. (1988a), “Studies of the biological activity of LHRH analogs in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder”. *General and Comparative Endocrinology*, 71, 372-382.
62. Crim, L.W., Sherwood, N.M., Wilson, C.E. (1988b), “Sustained hormone release II. Effectiveness of LHRH analog (LHRH-A) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout”. *Aquaculture*, 74, 87-95.
63. Cyr, G.D. and Eales, G.J. (1996), “Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish”. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6, 165-200.
64. Dahle, R., Taranger, G. L., Karlsen, O., Kjesbu, O. S., & Norberg, B. (2003). Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 136(3), 641–653.
65. Davie, A., Porter, M.J.R., Bromage, N.R., and Migaud, H. (2007), “The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in Atlantic cod (*Gadus morhua*)”. Part I. Sexual maturation, *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 64, 84-97.

66. De Leeuw, R., Van't Veer, C., Smit-Van Dijk, W., Goos, H.J.T., Van Oordt, P.G.W.J. (1988), "Binding affinity and biological activity of gonadotropin-releasing hormone agonists in the African catfish, *Clarias gariepinus*". *Aquaculture*, 71, 119-131.
67. De Silva, S. S., Nguyen, T. T. T., & Ingram, B. (2008). Fish reproduction in relation to aquaculture. In M. J. Rocha, A. Arukwe & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish reproduction: Cytology, biology and ecology*, 535–576. Enfield, NH: Science Publisher, Oxford, IBH Publishing Co.
68. Diedrich, J.F., Staskus, K.A., Retze, E.F., Haase, A.T. (1990), "Nucleotide sequence of a cDNA encoding mouse cathepsin D". *Nucleic Acids Research*, 18, 71-84.
69. Donaldson, M., Hunter, A. (1983), "Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes". In: Hoar, S., Randall, J., Donaldson, M. (Eds), *Fish Physiology. Reproduction IX*, Academic Press, Orlando, FL, 351-403.
70. Emata, C., Meier, A. and Hsiao. S. (1991), "Daily variations in plasma hormone concentrations during the semilunar spawning cycle of the gulf killifish, (*Fundulus grandis*)". *Journal of Experimental Zoology*, 259, 343–354.
71. Emata, C., Eullaran, B., Bagarinao, U. (1994), "Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*)". *Aquaculture*, 121, 381-387.
72. Epping, J. (1992), "Growth and development of mammalian oocytes in vitro", *Arch Pathol Lab Med*, 116, 379, 1992.
73. Faust, P.L., Kornfeld, S., Chirgwin, J.M. (1985), "Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 4910-4914.
74. Fontaine, A., Dufour, S., Tanguy, G., Khan, A., Cedard, L., Leloup-Hatey, J. (1984), "Clairances metaboliques de la gonadotropine chorionique humaine (hCG) et de la gonadotropin de carpe (cGtH) chez un poisson teleosteen, Anguille". *Proceedings of the Colloque Physiologie des Poissons. INRArIFREMER*.

75. François, C. M., Florence, P., Frank, G., Alain, G., Célia, R., Solange, M., Céline, J. G. (2017). A novel action of follicle-stimulating hormone in the ovary promotes estradiol production without inducing excessive follicular growth before puberty. *Scientific Report*, 7, 46222. <https://doi.org/10.1038/srep46222>.
76. Garcia, L.M.B. (1989), “Development of an ovarian biopsy technique in the sea bass, *Lates calcarifer*”. *Aquaculture*, 77, 97-102.
77. Gazola R, Borella MI (1997) Plasma testosterone and 11ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(12), 1485–1487.
78. Goldmann, T., Moorkamp, A., Wiedorn, K.H., Suter, L., Otto, F. (2001), “The prognostic value of the expression of collagenase IV, cathepsin D and metallothionein in squamous cell carcinomas of the skin determined by immunohistochemistry”. *Archives of Dermatological Research*, 293, 115-120.
79. Goos, H. J., de Leeuw, R., Burzawa-Gerard, E., Terlouw, M., Richter, C. J. (1986), “Purification of gonadotropic hormone from the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), and the development of a homologous radioimmunoassay”. *General and Comparative Endocrinology*, 63, 162-70.
80. Goren, A., Zohar, Y., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y., 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 79, 291-305.
81. Habibi, R., Marchant, A., Nahorniak, S., Van Der Loo, H., Rivier, E., Vale, W. (1989), “Functional relationship between receptor binding and biological activity for agonists of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish *Carassius auratus*”. *Biology Reproduction*, 40, 1152-1161.
82. Haddy, A., and Pankhurst, W. (2000). “The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilisation and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheri*”. *Aquaculture*, 188, 115-131.

83. Haney, C., and Nordlie, G. (1997), "Influence of environmental salinity on routine metabolic rate and critical oxygen tension of *Cyprinodon variegatus*". *Physiological Zoology*, 70, 511-518.
84. Hara, S., Duray, M. N., Parazo, M., & Taki, Y. (1986), Year-round spawning and seed production of the rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Aquaculture*, 59, 259–272. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90008-6).
85. Hara, S., Kohno, H. and Taki, Y. (1986), "Spawning behavior and early life history of the rabbitfish, *Siganus guttatus*, in the laboratory". *Aquaculture*, 59, 273-285.
86. Harmin, A. and Crim, W. (1993), "Influence of gonadotropin hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum)". *Fish Physiology and Biochemistry*, 10, 399-407.
87. Head, D., Watanabe, O., Ellis, C., Ellis, P. (1996), "Hormone-induced multiple spawning of captive Nassau grouper broodstock". *Prog. Fish-Cult*, 58, 65-69.
88. Hobby, C., and Pankhurst, W. (1997), "The relationship between plasma and ovarian levels of gonadal steroids in the repeat spawning marine fishes *Pagrus auratus* (Sparidae) and *Chromis dispilus* (Pomacentridae)". *Fish Physiology and Biochemistry*, 16, 65-75.
89. Hodson, R., Sullivan, C.V. (1993), "Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* Walbaum, broodstock with implanted GnRH α and injected hCG". *Aquaculture of Fisheries Management*, 24, 389-398.
90. Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y. (1999), "cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype". *Journal and Biological Chemistry*, 274, 25205-9.
91. Inui, Y. and Miwa S. (1985), "Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae". *General and Comparative Endocrinology*, 60, 450-454.
92. Jiang, S.T., Wang, Y.T., Chen, C.S. (1991), "Purification and characterization of a proteinase identified as cathepsin D from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* .times. *Tilapia aurea*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1597-1601.

93. Juario. J. V, Duray. M. N, Duray. V. M, Nacario. J. F and Almendras. J. M. E. (1985), "Breeding and larval rearing of the rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch)", *Aquaculture*, 44, 91-101.
94. Kagawa, H., Young, G. and Ngahama, Y. (1983), "Relationship between seasonal plasma estradiol-17B and testosterone levels and in vitro production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)". *Biology of Reproduction*, 29, 301-309.
95. Kagawa, H., Young, G., Adachi, S. and Nagahama, Y. (1985), "Estrogen synthesis in the teleost ovarian follicle: the two-cell type model in salmonids". In *Salmonid Reproduction* (Eds. R.N. Iwamoto and S. Sower). Washington SeaGrant Program, University of Washington, Seattle, 20-25.
96. Kawaga, H., Tanaka, K., Okuzawa, M., Matsuyama, M., Hirose, K. (1991), "Diurnal changes in plasma 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during spawning season in the red sea bream *Pagrus major*". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57:769.
97. Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K & Kobayashi M. (1998), "GTH II but not GTH I induces final oocyte maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*". *General and Comparative Endocrinology*, 112, 80-88.
98. Kelly, D., Tamaru, S., Lee, S., Moriwake, A., and Miyamota, G. (1991), "Effects of photoperiod and temperature on the annual ovarian cycle of the striped mullet, *Mugil cephalus*", in: *Reproductive Physiology of Fish*, Scott, A.P., Sumpter J.P, Kime D.E., and Rolfe M.S., Eds., Norwich, 142.
99. Kindler, M, Philipp, P, Gross, R, Bahr, M. (1989), "Serum 11-ketotestosterone and testosterone concentrations associated with reproduction in male bluegill (*Lepomis macrochirus*: Centrarchidae)". *General and Comparative Endocrinology*, 75, 446-453.
100. King M. (2001), *Fisheries biology assessment and management*, Osney, Oxford, England. (147)
101. Khan, A., Hawkins, B., Thomas, P. (1999), "Gonadal stage-dependent effects of gonadal steroids on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)". *Biology of Reproduction*, 61, 834-841.

102. Komatsu, T., Bhandari, R.K., Kobayashi, Y., Nakamura, S. và Nakamura, M. (2006), "GnRHa-accelerated spermatogenesis in the testes of underyearling golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch)". *Aquaculture*, 257(1–4), 558-565.
103. Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K., Kagawa, H. (2003), "Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*)". *General and Comparative Endocrinology*, 131, 264-273.
104. Kuo, C. (1995), "Manipulation of ovarian development and spawning in grey mullet, *Mugil cephalus*". *Israeli Journal Aquaculture. Bamidgeh*, 47, 43-58.
105. Kurokawa, T., Uji, S., Suzuki, T. (2005), "Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 133-140.
106. Lam. T. J. (1974), "Siganids: Their biology and mariculture potential", *Aquaculture*, 325-354.
107. Lam, T.J. (1982), "Applications of endocrinology to fish culture". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 11-137.
108. Lam, T.J (1983), Environmental influences on gonadal activity in fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds) *Fish physiology*, vol IXB. Academic press, New York, 65–116.
109. Laurence W.C. và Briand G. (1990), *Reproduction trong Method for Fish Biology*, American Fisheries Society, Bethesda, Mryland, USA.
110. Linard, B., Anglade, I., Bennani, S., Salbert, G., Navas, J.M., Bailhache, T., Pakde, F., Jegu, P., Valotaire, Y., Saligaut, C., Kah, O. (1995), "Some insights into sex steroid feedback mechanisms in the trout". In: Goetz, F.W., Thomas, P. Eds., *Reproductive Physiology of Fish*. Fish Symposium 95, Austin, Texas, 49-51.
111. Loir M. (1999), "Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study on the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity". *Molecular Reproduction and Development*, 53, 434–442.
112. Magwood, S., Bromage, N., Duncan, N.J., Porter, M. (1999), "The influence of salinity on reproductive success in female Atlantic salmon (*Salmo salar*)

- grilse”. In: Taranger, G.L., Norberg, B., Stefansson, S., Hansen, T., Kjesbu, O., Andersson, E. (Eds.), Proceedings of VIth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Bergen 4-9 July 1999, 346.
113. Manacop, P. R (1973), "The artificial fertilization of dangit, *Amphacanthus oramin* (Bloch and Schneider)". *Phillipine Journal of Science*, 62, 299-237.
 114. Mañanós, E., Duncan, N., and Mylonas, C. (2009), “Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish in Elsa Cabrita, Vanesa Robles and Paz Herráez (Eds), Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species”. CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, New York, 549, 3-80.
 115. Marino, G., Mandich, A., Massari, A., Andaloro, F., Porrello, S., Finola, M. G., & Cevalco, F. (1995). Aspects of reproductive biology of the Mediterranean amberjack *Seriola dumerilii* during the spawning period. *Journal of Applied Ichthyology*, 11, 9–24. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1995.tb00002.x>.
 116. Matsuyama M., Adachi S., Nagahama Y., Kitajima C., Matsuura S. (1991), “Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of captive Japanese sardine”. *Japanese journal of Ichthyology*, 37 (4), 381-390.
 117. Matsuyama, M., Morita, S., Hamaji, N., Kashiwagi, M. and Nagahama, Y. (1995), “Diurnal rhythm in testicular activity in the secondary male of a protogynous wrasse, *Pseudolabrus japonicus*”. In *Reproductive Physiology of Fish*, F. W. Goetz and p. Thomas (eds). *Fisheries Symposium*, 95, Austin, 212-214.
 118. Matsuyama, M., Ohta, K., Morita, S., Hoque, M., Kagawa, H., and Kambegawa, A. (1998), “Circulating levels and in vitro production of two maturation-inducing hormones in teleost: 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 17 α ,20 β -,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one, in a daily spawning wrasse, *Pseudolabrus japonicus*”. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 1-11.
 119. May, R.C., Popper, D. và McVey, J.P. (1974), "Rearing and larval development of *Siganus canaliculatus* (Park) (Pisces: Siganidae)". *Micronesica*, 10 (2): 285-298.

120. Mayer, I., Schmitz, M., Borg, B., & Schulz, R. (1992). Seasonal endocrine changes in male and female Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). I. Plasma levels of three androgens, 17 α -hydroxy-20 β -dihydroxyprogesterone and 17 β -estradiol. *Canadian Journal of Zoology*, 70, 37–42. <https://doi.org/10.1139/z92-006>.
121. McLean, E., Parker, D.B., Warby, C.M., Sherwood, N.M., Donaldson, E.M. (1991), “Gonadotropin release following oral delivery of luteinizing-releasing hormone and its superactive analogue des-Gly¹⁰ D-Ala⁶ x LHRHethylamide to 17 β -oestradiol-primed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*”. Walbaum. *Journal of Fish Biology*. 38,851-858.
122. Methven DA, Crim LW (1991). Seasonal changes in spermatocrit, plasma sex steroids, and motility of sperm from Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (eds) proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish. University of East Anglia, Norwich, 170.
123. Miura, T., Yamauchi, K., Nagahama, Y., Takahashi, H. (1991), “Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin”. *Zoological Science*, 8, 63-73.
124. Miura, T., Yamauchi, K., Takahshi, H. and Nagahama, Y. (1992), “The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish”. *Journal of Experimental Zoology*, 261, 359-363.
125. Miura, T., C. Miura, T. Ohta, M.R. Nader, T. Todo and K. Yamauchi. (1999) “Estradiol-17 β - stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264, 230-234.
126. Miwa S, Yan L. & Swanson P. (1994), “Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography”. *Biology of Reproduction*, 50, 629-642.
127. Mommsen, P. T., & Korsgaard, B. (2008). Vitellogenesis. In M. J. Rocha, A. Arukwe, & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish reproduction*, 113–169. Enfield, New Hampshire: Science.
128. Mommsen, P. T., & Walsh, P. J. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly.

- In W. S. Hoar, D. J. Randall, & E. M. Donaldson (Eds.), *Fish physiology* (347–406). New York, NY: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60202-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60202-2).
129. Montero, M., Le Belle, N., King, J., Millar, R., Dufour, S. (1995), “Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*)”. *Neuroendocrinology*, 61, 525-35.
 130. Mylonas, C. C., Woods, L. C., Thomas, P., & Zohar, Y. (1998). Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRH α -delivery systems. *General and Comparative Endocrinology*, 110, 276–289. <https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7073>.
 131. Mylonas C., Zohar Y. (2001), “Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*”. *Aquaculture*, 202, 205-220.
 132. Nagahama, Y. (1987), “Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads”. *Zoological Science*, 4, 209-222.
 133. Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., & Katsu, Y. (1995). “Regulation of oocyte growth and maturation in fish”. *Current Topics in Developmental Biology*, 30, 103–145. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60565-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60565-7).
 134. Nagahama, Y. (1994), “Endocrine regulation of gametogenesis in fish”. *International Journal of Development Biology*, 38, 217-229.
 135. Nagahama, Y., Miura, T., and Kobayashi, T. (1994), “The onset of spermatogenesis in fish”. Ciba Foundation Symposium 182, 255-267; discussion 267-270.
 136. Nagahama Y. (1997), “17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in fish: Mechanisms of synthesis and action”. *Steroids*, 62, 190-196.
 137. Nagahama, Y., and Yamashita, M. (2008), “Regulation of oocyte maturation

- in fish". *Development Growth and Differentiation* 50 Suppl 1, S195-219.
138. Ngamvongchon, S., Pawaputanon, O., Leelapatra, W., Johnson, W.E. (1988), "Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and catfish in northeast Thailand". *Aquaculture*, 74, 35-40.
 139. Nielsen, L.B., Nielsen, H.H. (2001), "Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*)". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128, 351-363.
 140. Norberg, B., Weltzien, F.A., Karlsen, O., Holm, J. C., 2001. "Effects of photoperiod on sexual maturation and somatic growth in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L)". *Comperative Biochemistry and Physiology Part B*, 129, 357-365.
 141. Nordlie, F., & Haney, D. (1998), "Adaptation in salt marsh teleosts to life in waters of varying salinity". *Italian journal of zoology*, 64, 405-409.
 142. Nunes C, Silva A, Soares E (2011) The use of hepatic and somatic indices and histological information to characterize the reproductive dynamics of Atlantic sardine *Sardina pilchardus* from the Portuguese coast. *Mar Coastal Fish* 3:127–144. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.556911>.
 143. Ohta, K., Yamaguchi, K. Gen, K. Okuzawa, H. Kagawa, A. Yamaguchi and M. Matsuyama. (2002), "Steroidogenesis in the ovarian follicles of the red seabream, *Pagrus major* (Sparidae, Teleostei) during vitellogenesis". *Fisheries Science*, 68, 680-687.
 144. Omeljaniuk, R., Tonon, M., and Peter, R. (1989), "Dopamine inhibition of gonadotropin and alpha-melanocyte-stimulating hormone release in vitro from the pituitary of the goldfish (*Carassius auratus*)". *General and Comperative Endocrinology*, 74, 451-467.
 145. Onitake, K. and Iwamatsu, T. (1986), "Immunocytochemical demonstration of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*". *Journal of Experimental Zoology*, 239, 97-103.
 146. Oppen-Berntsen DO, Helvik JV, Walther BT (1990) The major structural

- proteins of cod *Gadus morhua* eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening. *Develomental Biology*, 137, 258–265.
147. Oppen-Berntsen, O., Olsen, O., Rong C, Tarnger G, Swanson P, Walther B. (1994), “Plasma levels of eggshell zr-proteins, estradiol 17b and gonadotropins during an annual reproductive cycle of Atlantic salmon (*Salmo salar*)”. *Journal of Experimental Zoology*, 268, 59-70.
 148. Pagelson, G., Zohar, Y. (1992), “Characterization of gonadotropin-releasing hormone GnRH. receptors in the gilthead seabream (*Sparus aurata*)”. *Biology of Reproduction*, 47, 1004-1008.
 149. Pankhurt, W., and Carragher, J. (1991), “Seasonal endocrine cycle in marine teleosts”. In: *Reproductive physiology of fish*, A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E., Kime and M.S. Rolfe (Eds.) *Fisheries Symposium*, 91, Sheffield, 131-135.
 150. Pankhurst, W. (1994), “Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae)”. *Aquaculture*, 125, 185-197.
 151. Pankhurst, W. Hilder I. and Pankhurs, M. (1999), “Reproductive Condition and Behavior in Relation to Plasma Levels of Gonadal Steroids in the Spiny Damsel fish *Acanthochromis polyacanthus*”. *General and Comperative Endocrinology*, 115, 53-69.
 152. Park, Y.J., Takemura, A. and Lee, Y.D. (2006), "Lunar-synchronized reproductive activity in the pencil-streaked rabbitfish *Siganus doliatus* in the Chuuk Lagoon, Micronesia". *Ichthyological Research*, 53(2), 179-181.
 153. Penis, T. S. S. and Grero. J. (1972), "Chemical analysis of some Ceylon fishes - 2", *Bulletin of the Fisheries Research Station Sri Lanka*, 23, 1-7.
 154. Peter, R., Nahorniak, C., Sokolowska, M., Chang, J., Rivier, J., Vale, W., King, J., Millar, R. (1985), “Structure-activity relationships of mammalian, chicken, and salmon gonadotropin releasing hormones in vivo in goldfish”. *General and Comperative Endocrinology*, 58, 231-242.
 155. Peter, R., Chang, J., Nahorniak, C., Omeljaniuk, R., Sokolowska, M., Shih, S., Billard, R. (1986), “Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of

- gonadotropin secretion in teleost fish”. *Recent Progress in Hormone Research*, 42, 513-547.
156. Peter, R., Lin, H., van der Kraak, G., Little, M. (1993), “Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning”. In: Muir, J.F., Roberts, R.J. Eds, *Recent Advances in Aquaculture*. Blackwell Scientific, Oxford, 25-30.
 157. Peter, R., Lin, H., Van Der Kraak, G. (1988), “Induced ovulation and spawning of culture freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists”. *Aquaculture*, 74, 1-10.
 158. Peter R., and Yu K. (1997), Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fishereis*, 7, 173-197.
 159. Petrino, T., Greeley, M., Selman, K., and Wallace, A. (1989), “Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. Production of 17 (1-hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, testosterone, and 17 β -estradiol by various components of the ovarian follicle”. *General and Comperative Endocrinology*, 76, 230-240.
 160. Pham, H. Q., Nguyen, A. T., Nguyen, M. D., & Arukwe, A. (2010). Sex steroid levels, oocyte maturation and spawning performance in waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*) exposed to thyroxin, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone and carp pituitary extract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.044>.
 161. Pham, H. Q., Nguyen, A. T., Kjørsvik, E., Nguyen, M. D., & Arukwe, A. (2012). Seasonal reproductive cycle in Waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*). *Aquaculture Research*, 43, 815–830. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02894.x>.
 162. Pham HQ, Phan UV (2016), “Embryonic and larval development and effects of salinity levels on egg and ovary performances in rabbitfish *Siganus guttatus*”. *Israeli Journal of Aquaculture = Bamidgeh*, 68, 1–7.
 163. Planas, V., Swanson, P., Dickhoff, W. (1993), “Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH-I and GTH-II) and cyclic AMP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)”. *General and Comperative*

164. Planas, J., Athos, J., Goetz, F., Swanson, P. (2000), "Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish". *Biology of Reproduction*, 62, 1262- 1269.
165. Poortenaar, C. W., Hooker, S. H., & Sharp, N. (2001). Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi alandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*, 201, 271–286. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00549-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00549-X).
166. Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., et al. (1990), "Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass". *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology*, 78, 361-373.
167. Prat, F., Zanuy, S., & Carrillo, M. (2001). Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 198, 325–338. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00600-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00600-1).
168. Qasim S.Z. (1973), "Some Implications of the Problem of Age and Growth in Marine Fishes from the Indian Waters", *Indian J. Fish*, 20, 351-370.
169. Rahman MS, Takemura A, Takano K (2000a), "Annual changes in testicular activity and plasma steroid hormones in the golden rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch)". *Fisheries of Sciences*, 66, 894–900.
170. Rahman, M.S., Takemura, A. và Takano, K. (2000b), "Correlation between plasma steroid hormones and vitellogenin profiles and lunar periodicity in the female golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch)". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1), 113-122.
171. Rahman, M. S., Takemura, A., & Takano, K. (2000c), "Annual changes in ovarian histology, plasma steroid hormones and vitellogenin in the female golden Rabbitfish, *Siganus guttatus* (bloch)". *Bulletin of Marine Science*, 67(2), 729–740. <https://is.gd/dP7JYn>.
172. Rahman, S., Takemura, A., Park, J., Takano, K. (2003). Lunar cycle in the

- reproductive activity in the forktail rabbitfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 443-444.
173. Rainis, S., Gasco, L., Ballestrazzi, R. (2005). Comparative study on milt quality features of different finfish species. *Italian Journal of Animal Science*, 4(4), 355-363.
 174. Rakitin, A., Ferguson, M.M., Trippel, E.A. (1999). Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture*, 170, 349–358.
 175. Reading, B. J., & Sullivan, C. V. (2017). Vitellogenesis in fishes. *Reference module in life sciences*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-803076-4>.
 176. Riggio, M., Scudiero, R., Filosa, S., Parisi, E. (2000), “Sex- and tissue-specific expression of aspartic proteinases in *Danio rerio* (zebrafish)”. *Gene*, 260, 67-75.
 177. Ritzek, H., Steyrer, E., Sanders, E.J., Nimpf, J., Schneider, W.J. (1992), “Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation”. *DNA and Cell Biology*. 11; 1992. p 661-672.
 178. Sakai, N., Iwamatsu, T., Yamauchi, K. and Nagahma, Y. (1987), “Development of the steroidogenic capacity of medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicles during vitellogenesis and oocyte maturation”. *General and Comparative Endocrinology*, 66, 333- 342.
 179. Sakai, N., Iwamatsu, T., Yamauchi, K. Suzuki N and Nagahma, Y. (1988), “Influence of follicular development on steroid production in the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle in response to exogenous substrates”. *General and Comparative Endocrinology*, 71, 516-523.
 180. Schulz RW, de Franca LR, Lareyre JJ, Legac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T (2010) Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>.
 181. Scott, A. P., MacKenzie, D. S., & Stacey, N. E. (1984). Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. II. Steroid hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 56, 349–359. [https://doi.org/10.1016/0016-7181\(84\)90016-9](https://doi.org/10.1016/0016-7181(84)90016-9).

://doi.org/10.1016/0016-6480(84)90077-7.

182. Scott, A., Sumpter, J. (1989), "Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old". *General and Comparative Endocrinology*, 73, 46-58.
183. Secor, D., Gunderson, T., & Karlsson, K. (2000), "Effect of temperature and salinity on growth performance in anadromous (Chesapeake Bay) and nonanadromous (Santee-Cooper) strains of striped bass *Morone saxatilis*". *Copia*, 2000, 291-296.
184. Selman, K., & Wallace, R. A. (1983), "Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. III. Vitellogenesis". *Journal of Experimental Zoology*, 226(3), 441–457.
185. Senthilkumaran, B, Yoshikuni and Nagahama, Y. (2004), "A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215, 11-18.
186. Sim. S. Y, Suwirya. K and Rimmer. M, "Rabbitfish *Siganus guttatus* breeding and larval rearing trial", *Marine Finfish Aquaculture Network*, 2007, 39-41.
187. Sire, M.-F., Babin, P.J., Vernier, J.-M. (1994), "Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout". *Journal of Experimental Zoology*, 269, 69-83.
188. Skjæraasen JE, Nash RDM, Kennedy J, Thorsen A, Nilsen T, Kjesbu OS (2010) Liver energy, atresia and oocyte stage influence fecundity regulation in Northeast Arctic cod. *Marine Ecology Progress Series*, 404, 173–183. <https://doi.org/10.3354/meps08486>.
189. Smith, P., Bromage, N., Shields, R., Gamble, J., Gillespie, M., Dye, J., Young, C., and Bruce, M. (1991), "Photoperiod controls spawning time in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)", presented at Proc IV Int Symp *Reproductive Physiology of Fish*, Scott, A.P., Sumpter J.P, Kime D.E., and Rolfe M.S., Eds., Norwich, UK, July 7-12, 1991.
190. Solar, I., McLean, E., Baker, J., Sherwood, M., Donaldson, M. (1990), "Short communication: induced ovulation of sablefish *Anoplopoma fimbria* following oral admin of (desGly10-D-Ala6) LH-RH ethylamide". *Fish Physiology and*

Biochemistry, 8, 497-499.

191. Sri Susilo, E., Harnadi, L. & Takemura, A. (2009), "Tropical monsoon environments and the reproductive cycle of the orange-spotted spinefoot *Siganus guttatus*". *Marine Biology Research*, 5, 179-185.
192. Stifani, S., Le Menn. F., Rodriguez, J, N. And Schneider, W. (1990), "Regulation of oogenesis: the piscine receptor of vitellogenin". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1045, 271-279.
193. Stuart-Kregor, C., Sumpter, P., Dodd, M. (1981), "The involvement of gonadotrophin and sex steroids in the control of reproduction in the parr and adults of Atlantic salmon, *Salmo salar*". *Journal of fish Biology*, 18, 59-72.
194. Sukumasavin, N., Leelapatra, W., McLean, E., Donaldson, E. (1992), "Orally induced spawning of Thai carp *Puntius gonionotus* Bleeker, following co-administration of Gly¹⁰ D-Arg⁶, sGnRH ethylamide and domperidone". *Journal of fish Biology*, 40, 477-479.
195. Suquet, M., Cosson, J., Germaine, D., Chauvaud, C.M., Laurent, C.F. (1994), Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources*, 283-294.
196. Suzuki, K., Nagahama, Y. and Kawauchi, H. (1988), "Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins". *General and Comparative Endocrinology*, 71, 452-458.
197. Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., and Dickhoff, W. (1991), "Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II". *Biology of Reproduction*, 44, 29-38.
198. Tagawa, M và Hirano, T. (1990), "Changes in tissue and blood concentrations of thyroid hormones in developing chum salmon". *General and Comparative Endocrinology*, 76, 437-443.
199. Takei Y, Loretz CA (2006) Endocrinology. In: Evans DH, Claiborne JB (eds) The physiology of fishes, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, 271–318.

200. Tamaru, S., Carlstrom Trick, C., FitzGerald, J., Ako, H. (1996), "Induced final maturation and spawning of the marbled grouper *Epinephelus microdon* captured from spawning aggregations in the Republic of Palau, Micronesia". *Journal of the World Aquaculture Society*, 27, 363-372.
201. Tanaka, H. Kagawa, K. and Hirose, K. (1993), "Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II". *Fish Physiology and Biochemistry*, 10, 409-418.
202. Tang, J., Wong, R. (1987), "Evolution in the structure and function of aspartic proteases". *Journal of Cellular Biochemistry*, 33, 53-63.
203. Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien FA, Dufour S, Karlsen O, Norberg B, Andersson E, Hansen T. (2010), "Control of puberty in farmed fish". *General and Comparative Endocrinology*, 165, 483–515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>.
204. Thomas, P., Arnold, C.R., and Holt, J. (1995), "Red drum and other Sciaenids". In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, Bromage, N.R. and Roberts R.J., Eds., Blackwell Science, Oxford, UK, 1995, 118.
205. Thomas, P., Pang Y., Zhu, Y., Detweiler, C., Doughty, K. (2004), "Multiple rapid progestin actions and progestin membrane receptor subtypes in fish". *Steroids*, 69, 567-573.
206. Thorsen, A., Fyhn, H.J. (1991), "Free aminoacids and K1 as osmotic effectors during preovulatory swelling of marine fish eggs". Scott AP, Sumpter JP, Kime ED, Rolfe MS (eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. Norwich, UK: University of East Anglia Press, 312-314.
207. Todo, T., Adachi, S., Yamauchi, K. (1996), Molecular cloning and characterization of Japanese eel estrogen receptor cDNA. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 119, 37-45.
208. Trudeau, L., Peter, E. (1995), "Functional interactions between neuroendocrine systems regulating GtH-II release". In: Goetz, F.W., Thomas, P. Eds., *Reproductive Physiology of Fish*, 1995. Fish Symposium 95, Texas, 44-48.

209. Tyler, R. (1991), "Vitellogenesis in Salmonids. In *Reproductive Physiology of Fish*". pp. 295-299. Edited by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D. Kime and M.S. Rolfe. University of East Anglia Press, Norwich.
210. Van der Kraak, G., Pankhurst, W., Peter, E., Lin, R. (1989), "Lack of antigenicity of HCG in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* and goldfish (*Carassius auratus*)". *Aquaculture*, 78, 81-86.
211. Wallace, R.A. (1985), "Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates". In: Browder LW (ed.), *Developmental Biology*. New York: Plenum Press, 127–177.
212. Wallace, R.A., Selman, K. Wallace RA, Selman K. (1985), "Major protein changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes". *Developmental Biology*, 68, 172–182.
213. Watanabe, O., Ellis, P., Ellis, C., Chaves, J., Manfredi, C., Hagood, W., Sparsis, M., Arneson, S. (1998), "Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture". *Journal of the World Aquaculture Society*, 29, 176-187.
214. Weil, S., Vendola, K., Zhou, J., Bondy, A. (1999), "Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development". *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 2951-2956.
215. Weil, J., Vendola, K., Zhou, J., Adesanya, O., Wang, J., Okafor, J., Bondy, A. (1998), "Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations". *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 2479-2485.
216. Weltzien, F. A., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian-Tabrizi, K., & Norberg, B. (2004), The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137, 447–477. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.007>.
217. Yan, L, Swanson, P & Dickhoff, W. (1992), "A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II)". *Biology of Reproduction*, 47, 418-427.
218. Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., & LevaviSivan, B.

- (2003). Regulation of fish gonadotropins. *International Review of Cytology*, 225, 131–185. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)25004-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)25004-0).
219. Yaron, Z., Levavi-Sivan, B. (2011), “Endocrine regulation of fish reproduction”. In: Farrell A.P., (ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, 2, 1500–1508. San Diego: Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-0-1237-4553-8.00058-7>.
 220. Yeldan H., and Avsar D., 2000. A Preliminary Study on the Reproduction of the Rabbitfish (*Siganus rivulatus*) in the Northeastern Mediterranean. *Turkish Journal of Zoology*, 24, 173-182.
 221. Zadmajid, V., Bashiri, S., Sharafi, N., & Butts, I. A. E. (2018), “Effect of hCG and Ovaprim™ on reproductive characteristics of male Levantine scraper, *Capoeta damascina* (Valenciennes, 1842)”. *Theriogenology*, 115, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.017>.
 222. Zanuy, S., Carrillo, M. (1984), “Delayed spawning of sea bass after rearing at low salinity. In: Barnabe, G., Billard, R. (Eds). *The Aquaculture of Sea Bass and Sparids*. INRA, Paris, 73-80.
 223. Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y. (1990), “Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver”. *General and Comparative Endocrinology*, 79, 306-331.
 224. Zohar, Y. (1988), “Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations”. In: Zohar, Y., Breton, B. (Eds), *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. INRA Press, Paris, pp.47-62.
 225. Zohar, Y. (1989a), “Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation”. In: Shilo, M., Sarig, S. (Eds), *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, 65-119.
 226. Zohar, Y. (1989b), “Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction growth, and smoltification”. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7, 395-405.
 227. Zohar, Y., Mylonas, C. (2001), “Endocrine manipulations of spawning in

- cultured fish: from hormones to genes”. *Aquaculture*, 197, 99-136.
228. Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S., Tandler, A. (1995a), “Gilthead sea bream (*Sparus aurata*)”. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford, 94-117.
229. Zohar, Y., Munoz-Cueto, J. A., Elizur, A., & Kah, O. (2010), Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 438–455. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>.
230. Zutshi B, Murthy PS (2001) Ultrastructural changes in testis of gobiid fish *Glossogobius giuris* (Hamilton, 1822) induced by fenthion. *Indian Journal of Experimental Biology* 39:170–173 <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/23653>.
231. Zeyl JN, Love PO, Higgs MD. (2014), “Evaluating gonadosomatic index as an estimator of reproductive condition in the invasive round goby *Neogobius melanostomus*”. *Journal of Great Lakes Research*, 40, 164–171.

PHỤC LỤC

PHỤC LỤC 1

1. Estradiol (E₂)

Layout map						
	1	2	3	4	5	6
A	Blank	STD 1	STD 1	T11	T11	T11
B	Blank	STD 2	STD 2	T12	T12	T12
C	NSB	STD 3	STD 3	T1	T1	T1
D	NSB	STD 4	STD 4	T2	T2	T2
E	Bo	STD 5	STD 5	T3	T3	T3
F	Bo	STD 6	STD 6	T4	T4	T4
G	Bo	STD 7	STD 7	T5	T5	T5
H	TA	STD 8	STD 8	T6	T6	T6

Measurement count: 1 Filter: 405						
	1	2	3	4	5	6
A	0.063	0.22	0.209	0.595	0.652	0.65
B	0.059	0.309	0.239	0.602	0.549	0.552
C	0.069	0.445	0.447	0.475	0.831	0.564
D	0.072	0.546	0.575	0.54	0.431	0.527
E	0.946	0.658	0.671	0.463	0.472	0.485
F	0.942	0.785	0.725	0.296	0.711	0.58
G	0.961	0.882	0.458	1.078	0.397	0.68
H	1.195	0.884	0.831	0.281	0.38	0.416

AVG Blank	0.061	Standard	Std dose	%B/Bo
		0.1535	4000	16.379
AVG NSB	0.0095	0.213	1600	23.147
		0.385	640	42.711
AVG Bo	0.888666667	0.4995	256	55.735
		0.6035	102.4	67.564
Correct Bo	0.879166667	0.694	41	77.858
		0.609	16.4	68.190
		0.7965	6.6	89.517

		Sample (mL)	Buffer (mL)	Diluted ratio			
		0.5	0.5	1			
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T11-1	0.595	0.534	59.659	107.930	107.930		
T11-6	0.652	0.591	66.142	60.215	60.215		
T11-8	0.65	0.589	65.915	61.460	61.460		
						76.53	27.20
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T12-2	0.602	0.541	60.455	100.465	100.465		
T12-9	0.549	0.488	54.427	172.850	172.850		
T12-13	0.552	0.491	54.768	167.622	167.622		
						146.98	40.37
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T1-2	0.475	0.414	46.009	368.720	368.720		
T1-4	0.831	0.77	86.502	9.634	9.634		
T1-8	0.564	0.503	56.133	148.244	148.244		
						175.53	181.09
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T2-7	0.54	0.479	53.403	189.534	189.534		
T2-8	0.431	0.37	41.005	578.541	578.541		
T2-10	0.527	0.466	51.924	216.516	216.516		
						328.20	217.22
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T3-4	0.463	0.402	44.645	416.920	416.920		
T3-10	0.472	0.411	45.668	380.221	380.221		
T3-16	0.485	0.424	47.147	332.839	332.839		
						376.66	42.15

Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T4-2	0.296	0.235	25.649	2304.544	2304.544		
T4-7	0.711	0.65	72.853	32.913	32.913		
T4-20	0.58	0.519	57.953	125.845	125.845		
						821.10	1285.54

Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T5-4	1.078	1.017	114.597	0.768	0.768		
T5-11	0.397	0.336	37.137	819.424	819.424		
T5-12	0.68	0.619	69.327	45.207	45.207		
						288.47	460.36

Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV
T6-9	0.281	0.22	23.943	2687.074	2687.074		
T6-10	0.38	0.319	35.204	975.204	975.204		
T6-12	0.416	0.355	39.299	674.573	674.573		
						1445.62	1085.59

2. Testosterone (T)

	1	2	3	4	5	6
A	Blank	STD 1	STD 1	T11	T11	T11
B	Blank	STD 2	STD 2	T12	T12	T12
C	NSB	STD 3	STD 3	T1	T1	T1
D	NSB	STD 4	STD 4	T2	T2	T2
E	Bo	STD 5	STD 5	T3	T3	T3
F	Bo	STD 6	STD 6	T4	T4	T4
G	Bo	STD 7	STD 7	T5	T5	T5
H	TA	STD 8	STD 8	T6	T6	T6

Absorbance readings 405 nm						
	1	2	3	4	5	6
A	0.055	0.166	0.163	0.235	0.259	0.226
B	0.059	0.244	0.237	0.284	0.237	0.273
C	0.066	0.312	0.3	0.285	0.256	0.276
D	0.068	0.358	0.346	0.202	0.173	0.209
E	0.406	0.38	0.366	0.229	0.167	0.211
F	0.359	0.372	0.322	0.236	0.248	0.307
G	0.288	0.332	0.327	0.192	0.187	0.163
H	1.183	0.286	0.269	0.193	0.164	0.145

Avg Blk	0.057	Standard	Std dose	%B/Bo
		0.1075	250	34.331
Avg NSB	0.01	0.1835	125	61.092
		0.249	62.5	84.155
Avg Bo	0.294	0.295	31.3	100.352
		0.316	15.6	107.746
Correct Bo	0.284	0.29	7.8	98.592
		0.2725	3.9	92.430
		0.2205	1.95	74.120

		Sample	Buffer	Diluted ratio				
		0,5ml	0,5ml	1				
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	Giai đoạn
T11-4	0.235	0.178	59.155	123.902	123.902			
T11-5	0.259	0.202	67.606	90.435	90.435			
T11-7	0.226	0.169	55.986	139.429	139.429			
						117.922	25.038	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T12-1	0.284	0.227	76.408	65.148	65.148			
T12-7	0.237	0.18	59.859	120.693	120.693			
T12-11	0.273	0.216	72.535	75.261	75.261			
						87.034	29.58485	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T16	0.285	0.228	76.761	64.299	64.299			
T17	0.256	0.199	66.549	94.065	94.065			
T1-7	0.276	0.219	73.592	72.357	72.357			
						76.907	15.39612	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T2-3	0.202	0.145	47.535	191.027	191.027			
T2-4	0.173	0.116	37.324	279.461	279.461			
T2-5	0.209	0.152	50.000	174.266	174.266			
						214.918	56.52089	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T3-4	0.229	0.172	57.042	134.049	134.049			2
T3-12	0.167	0.11	35.211	302.348	302.348			3
T3-17	0.211	0.154	50.704	169.753	169.753			2

						202.050	88.67611	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T4-1	0.236	0.179	59.507	122.287	122.287			4
T4-5	0.248	0.191	63.732	104.474	104.474			5
T4-10	0.307	0.25	84.507	48.179	48.179			3
						91.647	38.68337	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T5-5	0.192	0.135	44.014	217.806	217.806			3
T5-9	0.187	0.13	42.254	232.572	232.572			5
T5-10	0.163	0.106	33.803	318.637	318.637			3
						256.338	54.45532	
Sample	Readings	Avg	%B/Bo	Conc. (pg/mL)	Final conc.	Avg (pg/mL)	STDV	
T6-1	0.193	0.136	44.366	214.967	214.967			
T6-3	0.164	0.107	34.155	314.484	314.484			
T6-5	0.145	0.088	27.465	403.507	403.507			
						310.986	94.31874	

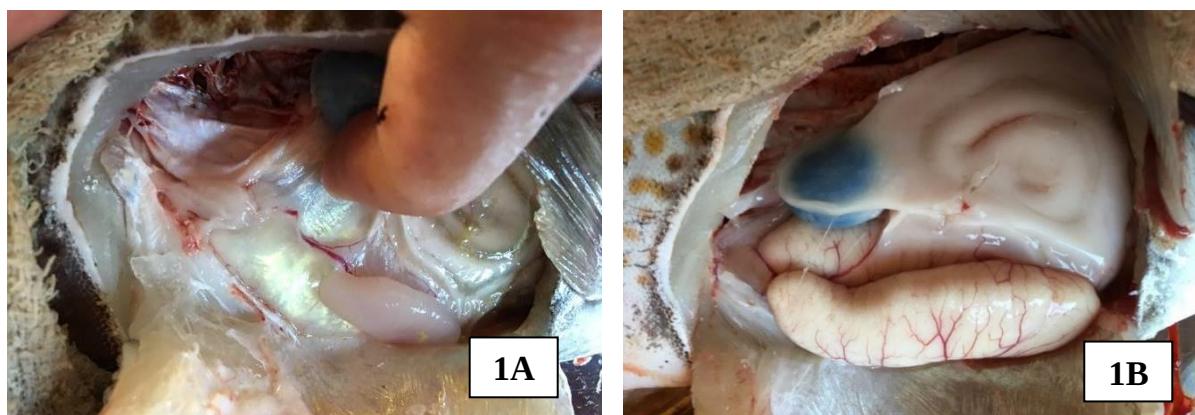
Measurement count: 1 Filter: 405											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.055	0.166	0.163	0.235	0.259	0.226	0.217	0.211	0.221	0.203	0.191	0.2
0.059	0.244	0.237	0.284	0.237	0.273	0.29	0.291	0.275	0.231	0.219	0.234
0.066	0.312	0.3	0.285	0.256	0.276	0.275	0.275	0.283	0.261	0.264	0.274
0.068	0.358	0.346	0.202	0.173	0.209	0.299	0.309	0.301	0.238	0.204	0.222
0.406	0.38	0.366	0.229	0.167	0.211	0.201	0.17	0.192	0.229	0.222	0.123
0.359	0.372	0.322	0.236	0.248	0.307	0.153	0.162	0.15	0.175	0.181	0.142
0.288	0.332	0.327	0.192	0.187	0.163	0.212	0.204	0.191	0.269	0.205	0.127
1.183	0.286	0.269	0.193	0.164	0.145	0.123	0.106	0.099	0.122	0.112	0.095

3. 11-keto Testosterone (11-KT)

Measurement count: 1 Filter: 405												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.063	0.22	0.209	0.595	0.652	0.65	0.965	0.967	0.965	0.652	0.759	0.741
B	0.059	0.309	0.239	0.602	0.549	0.552	0.777	0.755	0.763	0.738	0.764	0.734
C	0.069	0.445	0.447	0.475	0.831	0.564	0.72	0.687	0.677	0.913	0.877	0.875
D	0.072	0.546	0.575	0.54	0.431	0.527	0.666	0.644	0.639	0.661	0.688	0.652
E	0.946	0.658	0.671	0.463	0.472	0.485	0.622	0.607	0.562	0.513	0.524	0.507
F	0.942	0.785	0.725	0.296	0.711	0.58	0.435	0.45	0.436	0.472	0.484	0.481
G	0.961	0.882	0.458	1.078	0.397	0.68	0.285	0.251	0.218	0.439	0.444	0.412
H	1.195	0.884	0.831	0.281	0.38	0.416	0.671	0.577	0.573	0.38	0.38	0.34

PHỤ LỤC 2

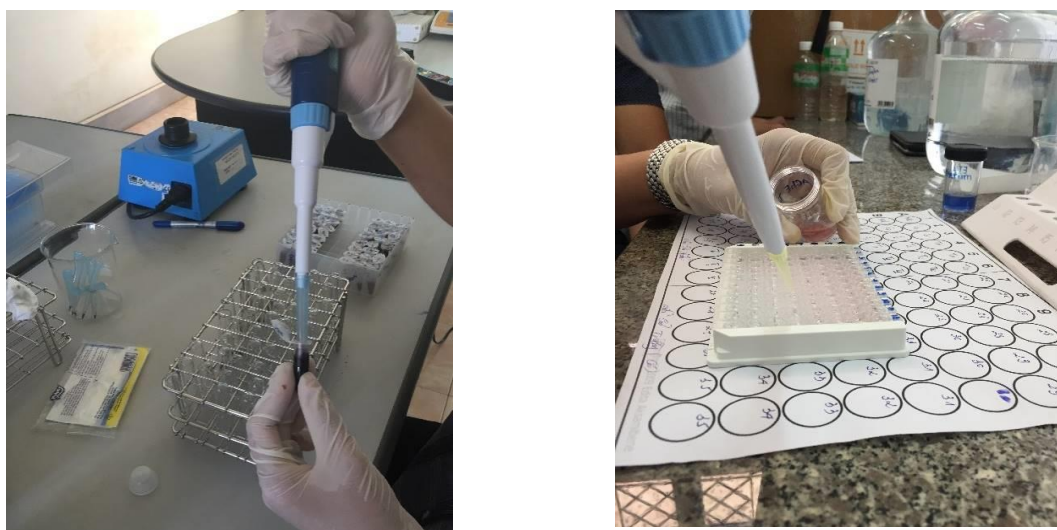
Một số hình ảnh trong quá trình nghiên cứu



Hình 1. Nội quan cá địa; buồng trứng chưa thành thực (1A) và thành thực (1B)



Hình 2. Tiêm hormone cho cá thí nghiệm



Hình 3. Chiết xuất hormone steroid trong huyết tương và nhỏ dung dịch vào các giếng



Hình 4. Máy ly tâm



Hình 5. Máy lắc Vortexer



Hình 6. Máy ủ mẫu



Hình 7. Máy đọc cường độ quang



Hình 8. Dụng cụ thu mẫu