



ĐỰC HÓA CÁ RÔ PHI *Oreochromis niloticus* BẰNG PHƯƠNG PHÁP NGÂM TRONG NƯỚC PHA SPIRONOLACTON

Nguyễn Tường Anh¹

¹ Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

Title:

Masculinization of tilapia *Oreochromis niloticus* by immersion method using spironolactone

Từ khóa:

Đực hóa, ngâm, hiệu suất đực hóa

Keywords:

Masculinization, immersion, masculinizing efficiency

ABSTRACT

In order to verify “paradoxical masculinization in fish” (according to words of Howell et al., 1994) by spironolactone (SP), tilapias at 7 days post hatching (DPH) were exposed in SP waters at concentrations of 2.5 ; 5.0 ; 12.5 ppm during 2 hours in polyethylene bags filled up with oxygen. The results showed that survival rates at 28 DHP were not statistically significant among treatments with values of 96.7, 95.7, 94.7, 96.3 and 97.5% % in control treatment and MT2.5, SP2.5, SP5.0, SP12.5, respectively. Male proportion and masculinizing efficiencies [(survival rate) x (male proportion)] were $63.30 \pm 3.30 \div 82.20 \pm 1.90$ % and $59.60 \pm 4.10 \div 80.30 \pm 3.10$ % respectively. Thus, SP, an aldosterone antagonist, a human hypertension drug with antiandrogenic or feminizing side effects (including for mammalian models) has been proven to have the clear masculinizing effect in tilapia.

TÓM TẮT

Để kiểm tra hiệu ứng đực hóa nghịch lý ở cá (Howell et al., 1994) của spironolacton (SP) thí nghiệm ngâm cá rô phi 7 ngày tuổi sau khi nở trong nước pha SP ở các nồng độ 2,5, 5,0 và 12,5 mg/l trong 2 giờ trong túi có bơm oxy. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống ở 28 ngày tuổi bằng $94,7 \pm 2,05 \div 97,7 \pm 1,50$ % sự khác biệt so với đối chứng và phương pháp tương tự với 17 α -methyltestosteron (MT) là không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ đực và hiệu suất đực hóa của các quần thể cá thí nghiệm bằng lần lượt là $63,30 \pm 3,30 \div 82,20 \pm 1,90$ % và $59,60 \pm 4,10 \div 80,30 \pm 3,10$ % . SP, một chất đối kháng của aldosteron, trên người là thuốc điều trị cao huyết áp có tác dụng phụ (kể cả trên động vật có vú) là kháng androgen hay cái hóa, nhưng trên cá rô phi có hiệu ứng đực hóa rõ ràng.

1 GIỚI THIỆU

Spironolacton (SP) là một steroid nhân tạo. SP là chất đối kháng (antagonist) của aldosteron nên được dùng như một loại thuốc chống cao huyết áp. SP thường có hiệu ứng phụ là kháng androgen hay còn gọi là hiệu ứng (phụ) nữ hóa như chứng vú to và bất lực ở nam giới khi điều trị lâu dài, rụng lông – tóc ở phụ nữ, rối loạn kinh nguyệt, căng tức vú ở phụ nữ, thay đổi giọng nói ở cả hai giới.

Điều nghịch lý được Howell et al., (1994) phát hiện là hiệu ứng đực hóa của SP trên cá Ấn muối *Gambusia affinis*. Tất cả cá Ấn muối cái trưởng

thành sau 21 ngày sống trong nước có hàm lượng SP bằng 0,1; 1,0 và 2,5 mg/l đã có vây hậu môn biến thành gonopodium (“chân sinh dục” – một dạng ống dẫn tinh). Sự thay đổi chỉ diễn ra ở sự biểu hiện đặc điểm sinh dục phụ đực, không có sự đổi giới tính (tuyển sinh dục). Các cá cái thí nghiệm vẫn mang những noãn bào hoặc phôi đang phát triển.

Đây là một gợi ý để sử dụng SP như một chất đực hóa cá, rẻ, dễ kiếm và tương đối an toàn cho người. Chúng tôi đã thử tác dụng của SP trên cá rô phi và Bầy màu (ở một bài khác), so sánh với việc

không xử lý được hóa (đôi chứng ĐC) và xử lý bằng methyltestosteron (MT).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được tiến hành tại Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ (huyện Cái Bè, Tiền Giang, từ 9/2010 đến 6/2011. Nhiệt độ nước thường xuyên trên 25°C và xấp xỉ 27 – 28 °C, các điều kiện thủy lý hóa khác là khá thuận lợi. Cá thí nghiệm là rô phi *Oreochromis niloticus*, được lấy tại chỗ, khi đã tiêu hết noãn hoàng và được xác định là 7 ngày tuổi (kể từ lúc nở). Cá đối chứng (ĐC) và thí nghiệm được hóa sau xử lý được ương nuôi trong giai riêng theo từng nghiệm thức (mỗi nghiệm thức có 100 con) trong những điều kiện như nhau được áp dụng tại cơ sở. Các nghiệm thức như sau : MT 2,5 – 100 cá bột 7 ngày tuổi được ngâm trong túi polyetylen chứa 2 lít nước với nồng độ methyltesteron (MT) (Methyltestosterone, Aburaihan Co. Tehran – Iran) 2,5 mg / l , với khoảng 4 lít O₂ và buộc kín trong 2 giờ. Một cách tương tự là SP2,5 , SP5,0 và SP12,5 là các nghiệm thức ứng với hoạt chất là Spironolacton (Verospiron, Hungary) với các nồng độ lần lượt là 2,5 ; 5,0 và 12,5 mg/l. Trước khi pha vào nước để xử lý, các viên thuốc MT và SP được nghiền kỹ và hòa tan trong cồn ethanol. Nồng độ cồn trong nước xử lý cá được tính toán không quá 1%. Sau khi xử lý cá được ương trong giai (30x30cm) độ sâu nước trong giai là 30 cm. Mỗi giai (theo các nghiệm thức) ban đầu có 100 cá bột. Việc cho ăn và chăm sóc cá theo phương pháp thường quy. Tỷ lệ sống của cá ĐC và trong các nghiệm thức được xác định sau 21 ngày ương nghĩa là khi cá ở tuổi 28 ngày, tương đương với tuổi cá được được hóa bằng cách cho thức ăn có trộn MT khi kết thúc việc xử lý và đạt tuổi cá hương trong phương pháp thường quy. Việc xác định giới tính (tỷ lệ cá đực) được tiến hành sau 60 ngày ương trong 30 mẫu theo phương pháp của Guerrero & Shelton (1974). Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ đực

hóa [(tỷ lệ cá đực của nghiệm thức) – (tỷ lệ đực đối chứng)] x (tỷ lệ cái đối chứng)⁻¹, Hiệu suất được hóa (HSDH) bằng [(tỷ lệ đực) x (tỷ lệ sống)]. Do việc xác định tỷ lệ sống (ở tuổi 28 ngày kể từ khi nở) và tỷ lệ đực (ở tuổi 60 ngày) nên hiệu suất được hóa coi như được tính ở thời điểm cá đạt tuổi 28 ngày, tuổi kết thúc giai đoạn cá hương. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Kết quả là giá trị trung bình của ba lần thí nghiệm và ± độ lệch chuẩn (SD Standard Deviation -). Trắc nghiệm χ^2 (“khi bình phương”) và bảng Pearson (Plokhinsky, Плохинский, 1961) được dùng để so sánh các kết quả.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Số liệu trong Bảng 1 cho thấy tỷ lệ sống của cá sau khi được xử lý và quá trình ương 21 ngày là khá cao. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức với nhau và với đối chứng là không có ý nghĩa thống kê. Trong một nghiên cứu trước đây của chúng tôi trên cá rô phi với MT và quy trình tương tự, tỷ lệ sống sau 3 tháng ương là 93,33 – 95,89% (Nguyễn Tường Anh & Ngô Đức Quân, 2011). Trong khi đó, tỷ lệ sống sau 21 ngày ương với thức ăn có pha thêm MT có thể chỉ là 69,51 – 83,4% (Nguyễn Văn Tư, 2006). So với kết quả của các nghiên cứu khác (Lê Ngọc Thảo & Nguyễn Tường Anh, 2007, Lê Văn Thắng & Phạm Anh Tuấn, 2000) có thể thấy nguyên nhân của việc đạt được tỷ lệ sống cao của cá rô phi được được hóa bằng cách ngâm trong hormon theo phương pháp của chúng tôi là cá thí nghiệm được ngâm trong thời gian ngắn (2 – 4 giờ) ở môi trường có hàm lượng hormon thấp, giàu oxy mà không sục khí và sau đó hưởng một chế độ dinh dưỡng đa dạng và gần với tự nhiên hơn (thức ăn không phải chỉ có bột cá và vitamin C !). Quy trình được hóa cá rô phi như trên được xây dựng trên cơ sở đặc tính sinh học của hormon steroid và của chính loài cá này (Lê Ngọc Thảo & Nguyễn Tường Anh, 2007; Nguyễn Tường Anh & Ngô Đức Quân, 2011).

Bảng 1: Kết quả được hóa cá rô phi bằng spironolacton và methyltestosteron

NT	Tỉ lệ sống sau 21 ngày	Kết quả kiểm tra ở 60 ngày tuổi		Hiệu suất được hóa %
		Tỷ lệ đực %	Tỷ lệ đực hóa %	
ĐC	96,70 ± 1,50 ^a	48,90 ± 1,90 ^a	0 ^a	47,30 ± 6,30 ^a
MT2,5	95,70 ± 1,50 ^a	65,60 ± 1,90 ^b	32,70 ± 5,60 ^b	62,80 ± 1,90 ^b
SP2,5	94,70 ± 2,05 ^a	63,30 ± 3,30 ^b	28,20 ± 7,20 ^b	59,60 ± 4,10 ^b
SP5,0	96,30 ± 1,50 ^a	73,30 ± 3,30 ^c	47,80 ± 6,90 ^c	70,60 ± 3,00 ^c
SP12,5	97,70 ± 1,50 ^a	82,20 ± 1,90 ^d	65,20 ± 4,60 ^d	80,30 ± 3,10 ^d

Ghi chú: Sự khác biệt giữa các giá trị trong cùng một cột có chữ cái (phía trên bên phải) giống nhau thì không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Khái niệm *hiệu suất đực hóa* được chúng tôi đưa ra từ 1998 (Trịnh Quốc Trọng & Nguyễn Tường Anh, 2000) có tính đến ảnh hưởng của việc xử lý bằng hormon lên tỷ lệ đực và tỷ lệ sống, cho phép đánh giá hiệu quả thực sự của phương pháp đực hóa, tránh được trường hợp đánh giá sai khi tỷ lệ đực rất cao (như do dùng liều hormon quá cao) nhưng tỷ lệ sống lại thấp.

Số liệu ở Bảng 1 cũng cho thấy MT và SP ở tất cả các liều ngâm đều có tác dụng đực hóa. Nếu căn cứ vào *hiệu suất đực hóa*, thì MT_{2,5} cho kết quả 62,8% thấp hơn những gì chúng tôi đã đạt được trước đây: liều MT (Sigma – Aldrich) 2,4 mg/l cho HSDH bằng 84% (Lê Ngọc Thảo, Nguyễn Tường Anh, 2007). Liều MT (Fluka, Hà Lan) 2 mg/l có HSDH bằng 80,2 – 85,3% (Nguyễn Tường Anh & Ngô Đức Quân, 2011). Trong một thí nghiệm khác, chưa công bố (dạng luận văn cao học), liều MT (Fluka, Hà Lan) 2 mg/l cho HSDH bằng 82,3% còn liều MT (Ninh Ba, Trung Quốc) 2 mg/l có HSDH bằng 77,2% (Nguyễn Tường Anh, Vũ Thành Nhân, 2012 – chưa công bố). Có thể nguyên nhân của sự khác biệt ở đây là hoạt tính không đồng đều của các chế phẩm hormon đã sử dụng: trong thí nghiệm của báo cáo này MT là thuốc viên Methyltestosterone 25 của Aburaihan, Iran. Ngoài ra, cũng không thể loại trừ những khác biệt về điều kiện thí nghiệm. Một bài tổng quan rút ra nhận xét, sự hình thành giới tính ở cá, điển hình là cá rô phi có sự tham gia của ba nhóm yếu tố là 1. Nhiễm sắc thể giới tính (XY, XX) trong đó có gen định đoạt giới tính ở tất cả các lớp Động vật có xương sống trừ lớp Có vú là Dmrt 1 và tác nhân biệt hóa cuối cùng là androgen; 2. Các yếu tố môi trường mà rõ nhất là nhiệt độ và 3. Các yếu tố di truyền thứ yếu (ngoài các nhiễm sắc thể giới tính, Karayucel *et al.*, 2004; Baroiller *et al.*, 2009; Paul-Prasanth *et al.*, 2011).

HSDH của MT_{2,5} và SP_{2,5} có sự khác biệt nhỏ nhất và không có ý nghĩa. HSDH của các nghiệm thức còn lại là khác nhau một cách có ý nghĩa thống kê. HSDH cao nhất với liều SP bằng 12,5 mg/l là 80,3 ± 3.1%. Điều này có ý nghĩa là từ 100 cá được xử lý và ương ban đầu có thể thu được khoảng 80 cá đực (trừ đi số cá đã hao hụt và số cá cái). Liều 12,5 mg/l của SP chưa hẳn là tối ưu về HSDH. Chúng tôi nghĩ có thể tăng liều SP lên hơn 12,5 mg/l vì chưa thấy sự giảm tỷ lệ sống khi tăng liều xử lý.

Điều lý thú ở đây là trong khi SP được khuyến cáo là có tác dụng phụ kháng androgen hay nữ hóa (antiandrogenic or feminizing side effects) trên

người và các động vật có vú khác, thì cũng như Howell *et al.* (1994), trên cá Ấn muối *Gambusia affinis*, chúng tôi thấy SP (như một điều nghịch lý) có tác dụng đực hóa (masculinizing effect) trên cá rô phi. Do SP là thuốc dùng cho người, có thể yên tâm khi đề cập vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo, Cán bộ, công nhân viên Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. (Рлохинский Н А 1961. Биометрия Изд. Сибирского Отделения АН СССР Новосибирск. 364 стр)
2. Baroiller J F, D’Cotta H, Bezault E, Wessels S, Hoerstgen-Schwark, 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol A* doi:10.1016/j.cbpa.2008.11.0.18 1 – 9.
3. Howell W M, Hunsinger R N and Blanchard P D, 1994. Paradoxical masculinization of female western mosquitofish during exposure to spironolactone. *The Progressive Fish Culturist* 56. 51 – 55.
4. Karayucel I, Ezaz T, Karayucel S, McAndrew B J, Penman D J, 2004. Evidence for two unlinked sex reversal loci in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and for linkage of one of these to the red colour gene. *Aquaculture* 234 51 – 53.
5. Lê Ngọc Thảo, Nguyễn Tường Anh, 2007. Đực hóa cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) bằng phương pháp ngâm trong nước có pha 17 α -methyltestosteron. Báo cáo Khoa học Khoa Thủy sản lần 3 Đại học Nông Lâm TP HCM, 12/2007.
6. Lê Văn Thắng, Phạm Anh Tuấn, 2000. Nghiên cứu chuyển giới tính cá rô phi *Oreochromis niloticus* bằng phương pháp ngâm trong dung dịch hormon 17 α -methyltestosteron. Tuyển tập Báo cáo Khoa học tại Hội thảo toàn quốc về Nuôi trồng Thủy sản năm 1998. 114 – 123.
7. Nguyễn Tường Anh, Ngô Đức Quân, 2011. Cải tiến việc đực hóa cá rô phi bằng cách ngâm trong 17 α -methyltestosteron. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Thủy sản Toàn quốc

- 16/12/2011, Trường ĐH Nông Lâm TP HCM 27 – 32.
8. Nguyễn Văn Tư, 2006. Báo cáo Kết quả triển khai Dự án Chuyển giao công nghệ Sản xuất cá rô phi đơn tính đực. 44 tr.
 9. Paul-Prasanth B, Nakamura M, and Nagahama Y, 2011. Sex determination in Fishes. In Norris D O, Lopez K H (Eds.). *Hormones and Reproduction of Vertebrates. V.1, Fishes* 1 – 14.
 10. Plokhinsky N A. 1961 Biometriia. Nxb Phân nhánh Xibêri Viện HLKH Liên xô Novosibirsk. 364 tr.
 11. Trịnh Quốc Trọng, Nguyễn Tường Anh, 2000. Thử nghiệm đực hóa cá Xiêm *Betta splendens* Regan bằng cách ngâm trong nước có pha 17α -methyltestosteron. Tuyển tập Báo cáo Khoa học tại Hội thảo toàn quốc về Nuôi trồng Thủy sản năm 1998. 405 – 410.