

## HÀM LƯỢNG 11-KETO TESTOSTERONE HUYẾT TƯƠNG TRONG MÙA SINH SẢN CỦA CÁ DÌA ĐỰC (*SIGANUS GUTTATUS*)

### PLASMA 11-KETO TESTOSTERONE LEVELS IN BREEDING SEASON OF THE MALE RABBIT FISH (*SIGANUS GUTTATUS*)

Nguyễn Văn An<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Minh<sup>2</sup>, Phạm Quốc Hùng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Kiên Giang

<sup>2</sup>Viện Nuôi trồng Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn An (email: nvan@vnkgu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 22/05/2021; Ngày phản biện thông qua: 16/06/2021; Ngày duyệt đăng: 29/06/2021

#### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên 60 mẫu cá đực có chiều dài và khối lượng toàn thân trung bình lần lượt là  $30,26 \pm 2,26$  cm và  $506,27 \pm 84,06$  gram. Biến động của hàm lượng 11-ketotestosterone (11-KT) theo tháng và theo giai đoạn phát triển tinh sào trong huyết tương cá dĩa đực (*Siganus guttatus*) trong điều kiện nuôi nhốt được phân tích bằng phương pháp miễn dịch liên kết enzyme (ELISA). Tổ chức tinh sào được quan sát và đánh giá độ thành thực theo thang đo 6 bậc của Nikolski. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự thay đổi về hàm lượng 11-KT huyết tương theo tháng và theo giai đoạn phát triển của tinh sào. Hàm lượng 11-KT trong huyết tương cao được quan sát ở giai đoạn tạo tinh và trong tháng 6-7. Kết quả nghiên cứu góp phần hiểu biết thêm về nội tiết sinh sản ở cá dĩa, có thể ứng dụng trong quản lý đàn cá bố mẹ và sinh sản nhân tạo.

**Từ khóa:** Cá dĩa, *Siganus guttatus*, 11-KT, tinh sào, mùa sinh sản

#### ABSTRACT

The experiment was conducted on 60 broodfish *Siganus guttatus* with total length and body weight were  $30.26 \pm 2.26$  cm and  $506.27 \pm 84.06$  gram, respectively. Monthly changes of plasma 11-ketotestosterone (11-KT) levels in the breeding season and testicular stages of male rabbitfish (*Siganus guttatus*) in captivity were investigated by using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Testicular stages of development were observed and analyzed based on the scale of Nikolski. The results included monthly changes and testicular stages in plasma 11-KT levels. The 11-KT levels were observed high at spermatation stage and during June-July. These results contribute to further understanding of reproductive endocrinology in rabbitfish, which can be implicated for broodstock management and artificial propagation.

**Keywords:** Rabbit fish, *Siganus guttatus*, 11-KT, testis, reproductive season

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở cá, 11-ketotestosterone (11-KT) có chức năng như hormone sinh dục, một androgen nội sinh. 11-KT là một dạng testosterone bị oxy hóa có chứa nhóm keto ở vị trí C11. 11-KT có liên quan đến adrenosterone, một androgen được tìm thấy với số lượng ít trong huyết tương [3, 4]. Đã có nhiều nghiên cứu về vai trò của 11-KT ở cá xương, theo đó người ta thấy rằng 11-KT có ảnh hưởng đến một số bước của quá trình sinh tinh và biệt hóa tinh trùng [3, 4]. Một số nghiên cứu khác cho rằng 11-KT kích thích sự phát triển của các đặc điểm giới tính thứ cấp. Hàm lượng 11-KT huyết tương ở cá thay đổi theo mùa và

biến động theo giai đoạn phát triển của tinh sào [4, 7]. Hàm lượng 11-KT cũng được ghi nhận ở cả cá cái [7]. Những dữ liệu khoa học này đã góp phần vào sự hiểu biết về các khía cạnh nội tiết của quá trình sinh sản ở cá.

Cá dĩa (*Siganus guttatus*) là loài cá biển có giá trị kinh tế [1, 2]. Sự phát triển tuyến sinh dục ở cá nói chung có liên quan đến mùa vụ, tính chu kỳ và đặc biệt là sự thay đổi hàm lượng hormone sinh dục, sinh sản trong huyết tương [10, 11]. Một số nghiên cứu về sự biến động hàm lượng testosterone và estradiol trên cá dĩa cái và đực cũng đã được thực hiện [8, 12]. Tuy nhiên hormone steroid 11-KT được xác định là

androgen chủ yếu đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển tinh sào ở cá [4]. Vì vậy chúng tôi nghiên cứu hàm lượng 11-KT huyết tương trong mùa sinh sản của cá địa đực nhằm tìm ra quan hệ giữa 11-KT và chu kỳ phát triển tinh sào trên cá địa. Kết quả nghiên cứu nhằm góp phần làm rõ hơn về vai trò của 11-KT trên cá địa đực và đóng góp vào sự hiểu biết về nội tiết sinh sản ở cá biển nói chung.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đàn cá nghiên cứu và thu mẫu

Đàn cá nghiên cứu có chiều dài và khối lượng toàn thân trung bình lần lượt là  $30,26 \pm 2,26$  cm và  $506,27 \pm 84,06$  gram. Cá bố mẹ được nuôi trên các lồng biển tại Cam Ranh, Khánh Hòa ( $12^\circ 52' 15''N$ ,  $108^\circ 40' 33''E$ ). 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 khẩu phần 2-3 % khối lượng thân. Mật độ nuôi bình quân  $3 \text{ kg/m}^3$  với tỷ lệ đực cái 1:1; Nhiệt độ nước:  $28-32^\circ\text{C}$ ; độ mặn: 29-34 ‰; pH: 7,8 - 8,6 và oxy hòa tan: 4,5 - 6,5 mg/l. Hàng tháng, 10 cá đực được thu ngẫu nhiên để lấy máu và tinh sào.

### 2.2. Phân tích hàm lượng 11-KT trong huyết tương

Hàm lượng 11-KT trong huyết tương được phân tích bằng phương pháp miễn dịch liên kết enzym (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA). ELISA Kit hormone steroid từ nhà sản xuất Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Phương pháp phân tích hàm lượng 11-KT trong huyết tương được tóm tắt theo trình tự các bước thực hiện như sau:

(1) Dung dịch đệm ELISA (ELISA buffer) và dung dịch rửa (Wash buffer): Hòa tan 10 ml dung dịch đệm ELISA buffer đậm đặc với 90 ml nước tinh khiết. Hòa tan 5 ml dung dịch rửa Wash buffer đậm đặc với 2000 ml 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  $4^\circ\text{C}$ .

(2) Mẫu huyết tương: Mẫu máu cá địa đực thu và bảo quản đông ở  $-80^\circ\text{C}$  sau đó được tách lấy phần huyết tương và huyết cầu bằng máy ly

tâm MIKRO 120 ở 10.000 vòng trong thời gian 15 phút. Lấy 0,5 ml mẫu huyết tương đã tách 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 tiếp tục tách lần 2 tương tự như lần 1. 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 đệm ELISA Buffer vào ống nghiệm và lắc đều, đảm bảo hòa tan được hormone steroid với dung dịch đệm ELISA Buffer

(3) Hormone steroid chuẩn: Dùng pipet lấy 100  $\mu\text{l}$  hormone steroid chuẩn trong bộ kit của nhà cung cấp cho vào ống nghiệm sạch. Ở thí nghiệm này dùng hormone 11-KT standar. Sau đó hòa tan hormone steroid chuẩn này với 900  $\mu\text{l}$  nước tinh khiết và lắc bằng máy lắc Vortexer. Tiếp theo chuẩn bị 8 ống nghiệm sạch và đánh dấu từ 1 đến 8. Đưa 900  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm ELISA vào ống nghiệm số 1 và 500  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm ELISA vào các ống nghiệm 2 đến 8. Chuyển 100  $\mu\text{l}$  hormon steroid chuẩn đã hòa tan vào ống nghiệm 1 lắc đều trên máy lắc Vortexer, sau đó lấy ra 500  $\mu\text{l}$  từ ống nghiệm 1 đưa vào ống nghiệm 2 và lắc đều. Tiếp theo, lấy ra 500  $\mu\text{l}$  từ ống nghiệm 2 và đưa vào ống nghiệm 3 lắc đều trên máy lắc Vortexer. 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) và kháng nguyên (hormone steroid EIA antiserum): Hormone steroid AchE Tracer pha chế bằng cách hòa tan 100 dtn hormone steroid với 6 mL dung dịch đệm ELISA buffer. Hormone steroid ELISA antiserum cũng được pha chế bằng cách hòa tan 100 dtn hormon steroid antiserum với 6 ml dung dịch đệm ELISA buffer. Để tạo sự khác biệt và dễ nhìn khi dùng, dung dịch đánh dấu được nhỏ thêm 60  $\mu\text{l}$  thuốc nhuộm tracer và kháng nguyên sẽ được nhỏ thêm 60  $\mu\text{l}$  thuốc nhuộm antiserum. Trong bộ kit 11-KT của nhà sản xuất ta thấy được các nồng độ chuẩn ở Bảng 1.

**Bảng 1: Nồng độ 11 - ketotestosterone chuẩn (pg/ml)**

Thứ tự mẫu chuẩn	1	2	3	4	5	6	7	8
Hàm lượng 11- KT chuẩn	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78

4) *Phân tích mẫu*: Bố trí đĩa 96 giếng theo mẫu. Sau đó dùng micropipet hút lần lượt các dung dịch đã chuẩn bị cho vào các giếng như sau: Dùng micropipet hút 100 µl dung dịch đệm ELISA buffer vào giếng NSB và 50 µl dung dịch đệm ELISA buffer vào giếng Bo, tiếp theo hút 50 µl hormone chuẩn đã pha loãng ở 8 nồng độ khác nhau vào các giếng S1 tới S8 trên đĩa, hút 50 µl mẫu huyết tương đã tách ở bước 2 cho vào các giếng đã bố trí trên đĩa. Sau đó cũng dùng micropipet hút 50 µl dung dịch đánh dấu AchE Tracer vào tất cả các giếng đã bố trí và loại trừ giếng Blk và giếng TA. Tiếp tục cũng hút 50 µl kháng nguyên ELISA antiserum vào tất cả các giếng đã bố trí và loại trừ giếng Blk, TA và NSB. Sau đó đem đĩa nhựa 96 giếng ủ trên máy lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng (25-28°C) trong thời gian 1-2 giờ. Sau thời gian ủ lần 1, rửa sạch các giếng bằng dung dịch rửa ELISA Wash, rửa 5 lần bằng dung dịch này và đưa cơ chất (Ellman's reagent) vào các giếng trên đĩa.

Dung dịch Ellman's reagent được pha bằng cách hòa tan 20 ml nước cất với 100 dtn Ellman's reagent. Sau khi thực hiện xong bước rửa giếng, đưa 200 µl cơ chất (Ellman's reagent) này vào các giếng trên đĩa và 5 µl ELISA Tracer vào giếng TA, tiếp tục ủ đĩa lần thứ 2 trong thời gian 1- 2 giờ cho đến khi trên đĩa xuất hiện màu vàng. Cuối cùng, sau khi kết thúc thời gian ủ lần 2, lấy đĩa ra đo mật độ quang của các giếng trên đĩa ở trên máy quang phổ bước sóng 405 nm ELISA. Thu được kết quả phân tích.

(5) *Đường chuẩn và tính toán kết quả*: Đường chuẩn được xây dựng trên cơ sở các nồng độ 11-KT chuẩn (pg/ml) đã được chuẩn bị trước (X) và %B/Bo của 11-KT chuẩn (Y). Dựa vào phương trình  $Y = a \ln(X) + b$ , hàm lượng 11-KT trong mẫu được tính theo hàm số  $X = \text{Exp}((Y-b)/a)$ . Trong đó: X là hàm lượng 11 -KT có trong mẫu; Y là %B/Bo của mẫu; a và b là các hằng số.

**2.3. Phương pháp làm tiêu bản tinh sào**

Mẫu tinh sào cá địa đực 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. 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. Gắn khối parafin lên đế gỗ và dán nhãn. Gắn đế gỗ có mẫu vào máy microtom, cắt lát có độ dày 5-7 micron. Đưa lát cắt vào nước ấm (40-45°C) khoảng 1-2 phút để lát cắt giãn ra. Dùng lam sạch lấy lát cắt ra khỏi nước và sấy trên máy sấy ở nhiệt độ 45-60°C trong 1-4 giờ. Sau khi được sấy khô, mẫu được khử parafin bằng cách ngâm trong dung dịch xilen và làm tương nước bằng cách nhúng trong dung dịch ethanol ở các nồng độ khác nhau khoảng 2-3 phút. Cuối cùng mẫu được nhuộm trong dung dịch Hematoxylin-Mayer (4-6 phút) và Eosin (2 phút) để khô và đặt lamên bằng keo dán. Bậc thang phân biệt các giai đoạn phát triển tinh sào dựa theo lý thuyết của Nikolski và Sakun [5, 9].

**2.4. Phân tích thống kê**

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Biến động hàm lượng 11-KT theo tháng và theo giai đoạn phát triển của tinh sào 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.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

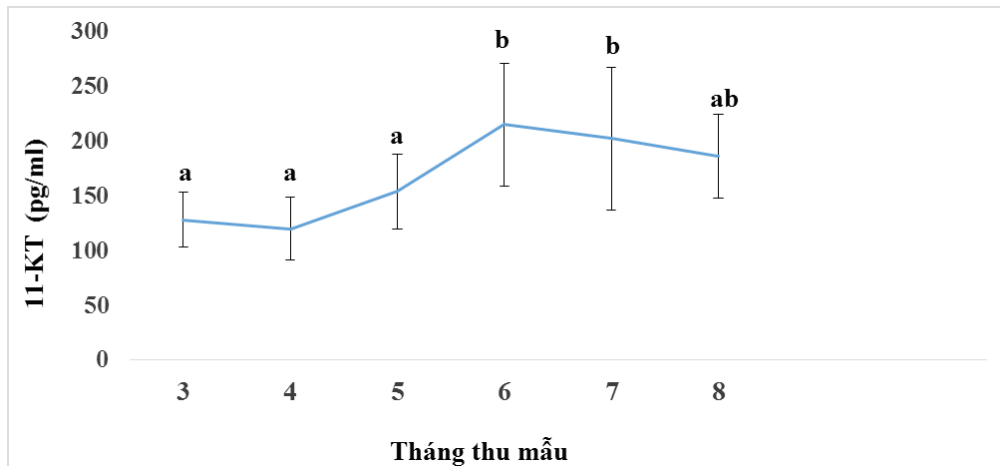
**3.1. Biến động hàm lượng 11-KT huyết tương trong mùa sinh sản**

Biến động hàm lượng 11-KT huyết tương ở cá đực trong mùa sinh sản từ tháng 3 đến tháng 8 được trình bày ở Hình 1. Trong mùa sinh sản, cá đực có tỷ lệ thành thực sinh dục cao, chiếm 70-90% số mẫu thu được. Hàm lượng 11-KT

ít biến động, dao động từ 120 đến 215 pg/ml. Giá trị cao nhất ở tháng 6, thấp nhất ở tháng 4, và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tháng trong mùa sinh sản.

Cá dìa là loài đẻ nhiều lần trong năm. Trong tinh sào luôn tồn tại tinh bào ở các giai đoạn

khác nhau. Trong đó các tinh bào ở giai đoạn đang phát triển luôn hiện diện. 11-KT là một steroid có vai trò kích thích sự phát triển của tinh bào ở cá đực [3, 4]. Điều này giải thích vì sao hàm lượng 11-KT luôn tồn tại trong huyết tương qua các tháng trong mùa sinh sản [4, 7].

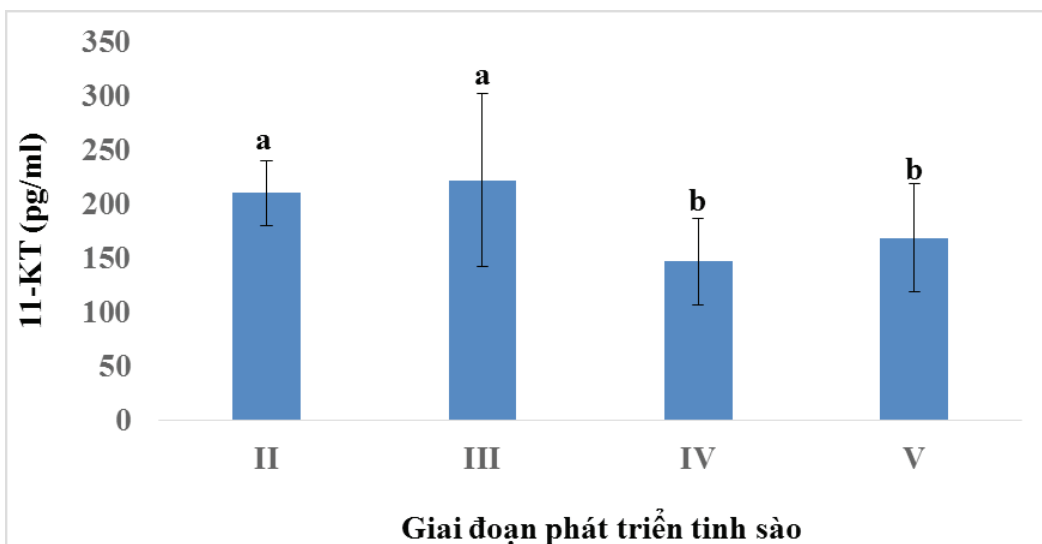


Hình 1: Biến động hàm lượng 11-KT huyết tương ở cá đực trong mùa sinh sản

### 3.2. Hàm lượng 11-KT huyết tương theo giai đoạn phát triển tinh sào

Hàm lượng 11-KT huyết tương ở cá đực theo giai đoạn phát triển tinh sào được trình bày ở Hình 2. Cá dìa đực có tinh sào phát triển ở giai đoạn II và III, hàm lượng 11-KT huyết tương đo được lần lượt là 210 và 222 pg/ml, ở giai đoạn

IV và V, hàm lượng 11-KT huyết tương đo được lần lượt là 147 và 169 pg/ml. Kết quả phân tích cũng cho thấy có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về hàm lượng 11-KT giữa các giai đoạn phát triển tinh sào ( $P < 0,05$ ). Theo đó hàm lượng 11-KT huyết tương cao ở giai đoạn II và III, nhưng thấp hơn ở giai đoạn IV và V.



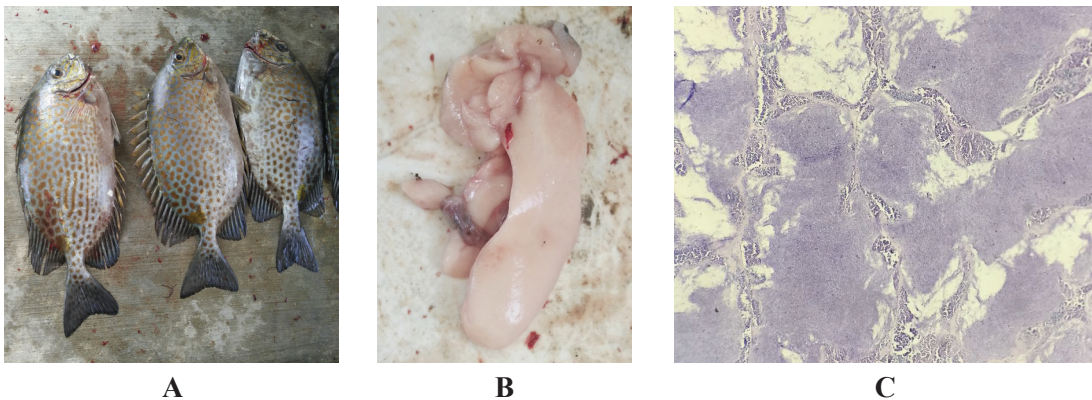
Hình 2: Hàm lượng 11-KT huyết tương ở cá đực theo giai đoạn phát triển tinh sào

Quá trình phát triển tinh sào ở cá chọi sự ảnh hưởng của hormone nội tiết. Theo đó giai đoạn sinh tinh, 11-KT đóng vai trò như steroid hormone chính, trong khi đó ở giai đoạn tiết tinh, maturation induction steroid (MIS) đóng vai trò chính, kích thích sự thành thực của tinh trùng [3, 4]. Điều này lý giải vì sao cá chọi có tinh sào phát triển ở giai đoạn II và III có hàm lượng 11-KT huyết tương cao hơn cá chọi có tinh sào phát triển ở giai đoạn IV và V.

### 3.3. Tinh sào cá chọi đực

Ở các tháng thu mẫu, tỷ lệ thành thực của tinh sào cá chọi đực ghi nhận dao động từ 70-90%. Hình thái và tiêu bản tổ chức học tinh sào

thành thực của cá chọi đực thể hiện ở Hình 3. Ở giai đoạn thành thực (giai đoạn IV-V), kích thước tinh sào đạt tối đa, màu trắng sữa, chứa đầy tinh dịch. Ở giai đoạn này, 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 thiểu. Ngoài ra, 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. Kết quả trên cho thấy quá trình phát triển, thành thực, chín muồi và phóng thích tế bào sinh dục đực trong chu kỳ sinh sản của cá chọi khá tương đồng với các loài cá biển nhiệt đới nói chung [6, 7].



Hình 3: Tinh sào cá chọi đực trong mùa sinh sản A: Mẫu cá chọi đực; B: Tinh sào cá chọi đực giai đoạn thành thực (giai đoạn V); C: Tiêu bản tinh sào cá chọi đực giai đoạn thành thực

## 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong mùa sinh sản của cá chọi từ tháng 3 đến tháng 8, hàm lượng 11-KT trong huyết tương cá chọi dao động từ 120 đến 215 pg/ml. Hàm lượng 11-KT huyết tương thấp nhất ở tháng 4 và cao nhất ở tháng 6. Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về hàm lượng 11-KT trong huyết tương giữa các tháng và giữa các giai đoạn phát triển tinh sào. Hàm lượng

11-KT huyết tương cao ở giai đoạn II và III, nhưng thấp hơn ở giai đoạn IV và V. Như vậy hàm lượng 11-KT huyết tương ở cá chọi cao hơn trong giai đoạn tạo tinh và giảm ở giai đoạn thành thực và tiết tinh. Cần có nghiên cứu bổ sung hàm lượng 11-KT huyết tương và đặc điểm của tinh sào ở các tháng còn lại trong năm nhằm làm sáng tỏ hơn chu kỳ sinh sản của cá chọi đực trong điều kiện nuôi nhốt.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

- Lê Văn Dân và Lê Đức Ngoan, 2006. “Nghiên cứu sự phát triển tuyến sinh dục cá chọi (*Siganus guttatus* Bloch, 1787) ở vùng đầm phá Thừa Thiên Huế”, Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn 2; 2006, 61-64.
- 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 chọi, *Siganus guttatus*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn; Số 3+4/2017, trang 190-195.

**Tiếng Anh**

3. Miura T., Yamauchi K., Takahashi H., Nagahama Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel *Anguilla japonica*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA 88:5774-5778
4. Nagahama Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. The International Journal of Developmental Biology 38:217-229
5. Nikolskii, G. V., 1963. The ecology of fishes : G. V. Nikolsky / translated from the Russian by L. Birkett Academic Press London, 353.
6. Ouchi K, Adachi S, Nagahama Y., 1988. Changes in plasma levels of steroid hormones during sexual maturation of male red seabream *Pagrus major*. Nippon Suisan Gakkaishi 54:593-598.
7. Pham H., Q., Nguyen A. T., Kjærsvik E, Nguyen M. D., Arukwe A., 2012. Seasonal reproductive cycle in Waigieu seaperch *Psammoperca waigiensis*. Aquaculture Research 43:815-830
8. Pham, H. Q. and Le, H. M., 2016. Effects of Thyroxin and Domperidone on Oocyte Maturation and Spawning Performances in the Rabbit Fish, *Siganus guttatus*. J World Aquacult Soc. Vol 47 (5), 691-700.
9. Sakun, O. F., Butskaya N. A., 1968. Chu kỳ phát triển tuyến sinh dục của cá (Nguyễn Tường Anh dịch). Tài liệu lưu hành nội bộ.
10. Sri Susilo, E., Harnadi, L. and Takemura, A., 2009. Tropical monsoon environments and the reproductive cycle of the orange-spotted spinefoot *Siganus guttatus*. Marine Biology Research, 5: 179-185.
11. Soletchnik, P., 1984. Aspects of nutrition and reproduction in *Siganus guttatus* with emphasis on application to aquaculture. Tigbauan, Iloilo: SEAFDEC AQD; 75 p.
12. Yeldan H., and Avsar D., 2000. A Preliminary study on the reproduction of the rabbitfish, *Siganus rivulatus*, in the Northeastern Mediterranean. Turk J Zool 24, 173-182.