

NGHIÊN CỨU SINH SẢN HẢI SÂM VÚ (*Holothuria nobilis* Selenka, 1867) TẠI TỈNH KHÁNH HOÀ

Nguyễn Văn Hùng^{1,*}, Kiều Tiến Trung¹,
Lê Trung Hậu¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy¹

TÓM TẮT

Hải sâm vú (*Holothuria nobilis* Selenka, 1867) là loài động vật da gai quý hiếm và có giá trị kinh tế cao. Hiện nay, hải sâm vú bị khai thác nhiều để làm thức ăn, thuốc chữa bệnh cho con người dẫn đến nguồn lợi bị cạn kiệt. Nghiên cứu này thử nghiệm kích thích sinh sản hải sâm vú bằng hormone tái tổ hợp Neurohormone relaxin-like gonad-stimulating peptide (RGP) và thử nghiệm ương nuôi ấu trùng hải sâm vú bằng các loại thức ăn và mật độ khác nhau. 4 nồng độ hormone RGP: NT1 (đối chứng chỉ tiêm 1 μ l AFSW, tương ứng 0 μ g/kg), NT2: (25 μ g/kg), NT3: (50 μ g/kg) và NT4: (75 μ g/kg) được sử dụng để kích thích sinh sản và theo dõi hoạt động đẻ trứng sau khi tiêm, xác nhận thời gian hiệu ứng hormone, tỷ lệ đẻ, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở và thời gian biến thái phát triển phôi. Ấu trùng sinh ra được thử nghiệm nuôi bằng các loại thức ăn, mật độ và giá thể bám khác nhau. Kết quả cho thấy, hải sâm vú được kích thích sinh sản tối ưu ở nồng độ hormone sử dụng 75 μ g/kg, đạt tỷ lệ đẻ 66,7%, tỷ lệ thụ tinh 81,5%, tỷ lệ nở 82,5%. Thức ăn thích hợp cho ấu trùng giai đoạn trôi nổi là tổ hợp vi tảo đơn bào (1,5 x 10⁴tb/ml), ở mật độ ương ấu trùng tốt nhất là 600 con/l đạt tỷ lệ sống 27,5% và giai đoạn xuống đáy là vi tảo đáy đơn bào *Navicula* sp. quét trên giá bám tôn nhựa đạt tỷ lệ sống 16%.

Từ khóa: Ấu trùng nổi, ấu trùng bám, hải sâm vú, sinh sản, hormone tái tổ hợp (RGP).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hải sâm là một trong những động vật biển sở hữu 2 giá trị đặc biệt phục vụ lợi ích cho con người. Là động vật biển cung cấp thức ăn và nguyên liệu để sản xuất một số loại thuốc dinh dưỡng cho con người [1-4]; đồng thời là một trong những thành viên của biển xử lý các chất ô nhiễm môi trường biển bằng cách sử dụng các chất lưu cơ trong môi trường nước biển [5, 6]. Trong đó, hải sâm vú (*Holothuria nobilis* Selenka, 1867) là một trong những loài hải sâm có giá trị cao nhất. Tại thị trường Hồng Kông (Trung Quốc), giá thị trường hải sâm vú tăng liên tục từ 192 USD/kg vào năm 2011 tăng 219 USD/kg vào năm 2016 [7].

Hải sâm vú phân bố từ vùng biển Madagascar đến biển Đỏ ở phía Tây, ngang qua quần đảo Easter ở phía Đông và từ Nam Trung Quốc đến phía Nam của quần đảo Lord Howe, khắp phía Tây và trung tâm Thái Bình Dương đến đảo Polynesia [8]. Ở Việt Nam, chúng phân bố rộng dọc theo biển từ Bắc vào Nam, nhiều nhất là các vùng biển đảo Nam Trung bộ như đảo Trường Sa (Khánh

Hòa), đảo Phú Quý (Bình Thuận), Côn Đảo (Bà Rịa Vũng Tàu) và đảo Phú Quốc (Kiên Giang) [9].

Với những giá trị hấp dẫn, hải sâm vú bị khai thác quá nhiều không kiểm soát dẫn đến nguồn lợi cạn kiệt và được Tổ chức Bảo tồn Thiên nhiên Quốc tế (IUCN) xếp loại nguy cấp cần được bảo tồn. Một trong biện pháp hiệu quả nhất để phục hồi nguồn lợi các đối tượng quý hiếm là nghiên cứu sinh sản nhân tạo, chủ động sinh sản tạo được con giống. Nghiên cứu này trình bày các kết quả đã thực hiện về sinh sản hải sâm vú bằng hormone tái tổ hợp (RGP) tại Nha Trang, Khánh Hòa, bao gồm nồng độ hormone kích thích, quá trình phát triển phôi và biến thái ấu trùng, ương nuôi ấu trùng giai đoạn nổi và giai đoạn ấu trùng xuống đáy bám bằng các loại thức ăn khác nhau, mật độ ương khác nhau và giá thể bám khác nhau.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

- Thời gian: Từ tháng 2 năm 2021 đến tháng 6 năm 2021.

- Địa điểm: Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nuôi biển, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III (Nha Trang, Khánh Hòa).

¹ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

*Email: ngvnhungria3@yahoo.com

- Đối tượng nghiên cứu: Hải sâm vú (*Holothuria nobilis* Selenka, 1867), ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nổi (Auricularia - 3 ngày tuổi đến 14 ngày tuổi sau thụ tinh), ấu trùng hải sâm vú giai đoạn xuống đáy (Doliolaria đến Pentactula - 15 ngày tuổi đến 30 ngày tuổi sau thụ tinh).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu hải sâm vú bố mẹ và điều kiện lưu giữ

Hải sâm vú (*H. Nobilis*), (n=72), có khối lượng trung bình 1.800 ± 300 g và chiều dài 28 cm, khỏe mạnh, màu sắc tươi sáng được thu thập từ đảo Trường Sa (11°26' Vĩ độ bắc và 114°20' Kinh độ đông) thuộc tỉnh Khánh Hoà bằng phương pháp lặn vào tháng 2 năm 2021. Các cá thể bố mẹ này nhanh chóng được đưa vào bể thông thủy có thể tích 30 m³ đặt trong tàu đánh bắt cho đến đảo Phú Quý - cảng Phan Thiết (Bình Thuận) trước khi được đưa vào bao ni lông (30 x 50 cm chứa nước biển sạch chiếm 30% thể tích bao bơm oxy và đặt trong thùng xốp kích thước 50 x 70 x 50 cm) giữ nhiệt độ ổn định 20 - 22°C bằng đá lạnh trong suốt thời gian vận chuyển bằng xe về Trại thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nuôi biển Nha Trang, Viện Nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản III.

Hormone gonad stimulating peptide (RGP) được sản xuất tại Đại học Sunshine Coast (USC - Úc) bằng kỹ thuật tái tổ hợp [10]. Hormone RGP được giữ trong tủ lạnh âm sâu -20°C tại Phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nuôi biển Nha Trang dưới dạng đông khô. Khi sử dụng được pha loãng với nước biển qua lọc tiệt trùng (AFSW) trước khi tiêm vào từng cá thể hải sâm vú bố mẹ.

2.2.2. Phương pháp kiểm tra độ thành thực hải sâm vú bố mẹ trước khi kích thích sinh sản

Sử dụng kim tiêm độ dài mũi kim là 2 cm, đưa mũi kim vào một bên thân hải sâm vú, vị trí này bằng 1/3 chiều dài cơ thể tính từ miệng của hải sâm vú, đặt mũi kim chếch hướng 45° so với cơ thể hải sâm, sau đó từ từ rút mũi kim tuyến sinh dục để kiểm tra. Quan sát tế bào sinh dục của hải sâm vú dưới kính hiển vi Olympus CX31 (Nhật Bản) có độ phóng đại 100 và 400. Các giai đoạn phát triển của tế bào sinh dục hải sâm vú được phân biệt theo

Conand (1993) [11] và Ramofafia và cs (2000) [12]. Bố mẹ có trứng với kích thước đường kính lớn 50 µm và tinh hoạt động mạnh [11, 12] được tuyển chọn để làm bố mẹ cho thí nghiệm kích thích sinh sản.

2.2.3. Kích thích hải sâm sinh sản bằng hormone tái tổ hợp (RGP)

Trước khi kích thích sinh sản, hải sâm vú bố mẹ được rửa sạch bằng nước biển lọc sạch và đặt ngẫu nhiên vào các bể thí nghiệm 300 lít composite hình tròn với mật độ 6 con/bể (tỷ lệ đực cái 1: 1) với sục khí liên tục. Thí nghiệm có 4 nghiệm thức (NT) tương ứng với 4 nồng độ hormone RGP được sử dụng: NT1 (đối chứng chỉ tiêm 1 µl AFSW, tương ứng 0 µg/kg); NT2: (25 µg/kg); NT3: (50 µg/kg) và NT4: (75 µg/kg). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Theo dõi hoạt động đẻ trứng của hải sâm vú bố mẹ sau khi tiêm, xác định thời gian hiệu ứng hormone, tỷ lệ đẻ, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở và thời gian biến thái phát triển phôi, ấu trùng.

2.2.4. Thu mẫu quan sát quá trình phát triển phôi, phát triển ấu trùng hải sâm vú

Hải sâm vú bố mẹ được kích thích sinh sản trong môi trường nước, lấy mẫu trứng thụ tinh trong môi trường nước (10 mẫu) để quan sát trên kính hiển vi quang điện OLYMPUS CX31 (Nhật Bản) độ phóng đại 400 và ghi nhận thời gian biến thái và phát triển phôi, các giai đoạn ấu trùng.

2.2.5. Ương nuôi ấu trùng giai đoạn nổi

Sau 3 ngày sinh sản, trứng thụ tinh phát triển thành ấu trùng giai đoạn trôi nổi Auricularia, giai đoạn này được chia làm 3 thời kỳ: tiền, trung và hậu kỳ với những đặc điểm và hình thái khác nhau. Giai đoạn này kéo dài 14 -15 ngày ương ở nhiệt độ 28-29,5°C.

- Thí nghiệm lựa chọn thức ăn thích hợp cho ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nổi: Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức (NT): NT1: (kết hợp 3 loài tảo đơn bào là *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* và *Isochrysis* với tỷ lệ 1: 1: 1, tương đương 10⁴ tb/ml/mỗi loài); NT2: (3 loài tảo đơn bào + Selco; (NT3): 3 loài tảo đơn bào + Selco + thức ăn tổng hợp - Frippak). Mật độ tảo đơn bào 10⁴ tb/mL theo các giai đoạn biến thái ấu trùng từ tiền - trung -

hậu Auricularia. Thức ăn tổng hợp kết hợp trong các nghiệm thức với lượng 1 g/m³. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Điều kiện ương và chế độ chăm sóc như nhau: thí nghiệm bằng bể composite 250 lít, mật độ ương 1.000 con/lít, độ mặn 32-33‰, thay nước hàng ngày bằng cách cấp bù lượng nước siphon bằng tảo đơn bào. Theo dõi tỷ lệ sống và tăng trưởng của ấu trùng đến cuối giai đoạn hậu Auricularia, thời gian theo dõi 15 ngày.

- Thí nghiệm xác định mật độ ương ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nôi: Ấu trùng 3 ngày tuổi giai đoạn tiền Auricularia được đưa vào bể composite 250 lít ương ở 3 mật độ khác nhau: 300, 600, 1.000 con/l và lặp lại 3 lần. Thức ăn sử dụng kết quả của thí nghiệm 1 và các điều kiện chăm sóc bể ương ấu trùng được áp dụng tương tự, kéo dài trong 15 ngày; đồng thời theo dõi diễn biến các yếu tố môi trường trong bể ương. Đánh giá tỷ lệ sống của ấu trùng và tăng trưởng 15 ngày sau thụ tinh.

2.2.6. Ương nuôi ấu trùng giai đoạn xuống bám đáy

Ấu trùng Auricularia 14 -15 ngày tuổi bắt đầu thay đổi biến thái chuyển sang xuống sống đáy bám vào giá thể ở giai đoạn hậu Auricularia và tiền Doliolaria. Giai đoạn này là điểm chết đối với ấu trùng hải sâm vú, vì những thay đổi về thức ăn và giá bám không phù hợp. Việc xác định thức ăn và cung cấp giá thể bám phù hợp là hết sức cần thiết để tăng được tỷ lệ sống của ấu trùng ở giai đoạn này.

- Thí nghiệm lựa chọn thức ăn thích hợp cho ấu trùng giai đoạn xuống đáy bám: Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức thức ăn: NT1: Tảo đáy đơn bào Navicula; NT2: Tảo đáy đơn bào kết hợp tảo khô *Spirulina* quét lên bề mặt giá bám; NT3: Tảo đáy đơn bào kết hợp dịch tảo khô *Spirulina* và thức ăn tổng hợp (Frippack) quét lên bề mặt giá thể bám. Ấu trùng hậu Auricularia (15 ngày tuổi) được ương trong bể composite 250 lít, mật độ 5 con/cm² đáy bể. Mật độ tảo đáy đơn bào navicular cung cấp mỗi ngày 800 – 1.000 tb/mL; tảo khô *Spirulina* 0,25 g/m³; thức ăn tổng hợp Frippack 1 g/m³. Thí nghiệm được theo dõi trong 9 ngày, nước chảy ra vào với lưu lượng 2 lít/phút và ngưng trong thời gian cho ăn trong 1 giờ. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3

lần; xác định tỷ lệ sống và tăng trưởng ấu trùng và theo dõi diễn biến của các yếu tố môi trường ương.

- Thí nghiệm xác định giá thể phù hợp cho ấu trùng hải sâm vú xuống đáy bám: Thí nghiệm bố trí gồm 2 nghiệm thức về giá thể bám: NT1: Giá bám bằng tôn nhựa - PVC; NT2: Giá thể bám bằng tấm nhựa ni lông. Các giá thể bám đều có sẵn tảo đáy đơn bào để làm thức ăn cho ấu trùng giai đoạn sống bám, giá thể bám được rải ở đáy bể hoặc treo, hoặc làm thành khung cho vào bể ương. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Điều kiện ương và chế độ chăm sóc như nhau, sử dụng bể composite 250 lít để ương ấu trùng và sử dụng thức ăn (kết quả tốt nhất của thí nghiệm lựa chọn thức ăn). Nước chảy ra vào với lưu lượng 2 lít/phút và ngưng trong thời gian cho ăn 1 giờ. Xác định tỷ lệ sống và tăng trưởng của ấu trùng và theo dõi diễn biến của các yếu tố môi trường trong bể ương nuôi.

2.2.7. Thu thập và xử lý số liệu

Chiều dài toàn thân hải sâm vú trưởng thành (Total Length –TL) được xác định bằng thước kẹp có độ chính xác 0,1 mm. Khối lượng cơ thể (Body Weight - BW) được cân bằng cân đồng hồ có độ chính xác 0,1 g.

Chiều dài ấu trùng được xác định dọc theo cơ thể bằng kính hiển vi Olympus CX31J gắn trực tiếp thị kính và chụp hình để xác định các giai đoạn.

Tỷ lệ sống (%) = số mẫu tại lần kiểm tra/số mẫu ban đầu x 100.

Tốc độ tăng trưởng:

Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối với hải sâm vú giai đoạn ấu trùng được đánh giá sau mỗi lần chuyển giai đoạn: Đo kích thước ấu trùng bằng thước vi thị kính ở độ phóng đại vật kính 40x, 10x trên kính hiển vi. Mỗi lần đo 10 cá thể ấu trùng/giai đoạn. Tốc độ tăng trưởng dựa trên chiều dài (ấu trùng) và khối lượng (con giống và con trưởng thành).

Tăng trưởng theo kích thước:

$$DGL \text{ (mm/ngày)} = (L_{tb2} - L_{tb1})/T$$

Trong đó: L_{tb1} , L_{tb2} là chiều dài toàn thân tại thời điểm T1 và T2; T là thời gian theo dõi (ngày, T2-T1).

Các số liệu về tỷ lệ sống của ấu trùng hải sâm vú ở các giai đoạn được chuyển sang arcsine để

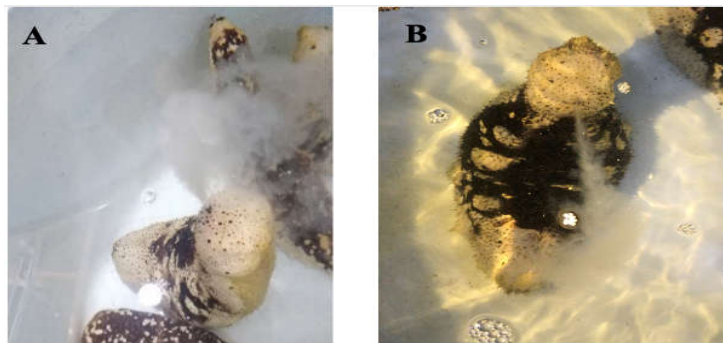
ứng tính đồng nhất. Giá trị trung bình giữa các nghiệm thức được so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) bằng kiểm định one way – ANOVA và Post-hoc test bằng Tukey's HSD trên phần mềm SPSS 22.0. Thí nghiệm 3 có 2 nghiệm thức sử dụng kiểm định so sánh cặp T-test. Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sinh sản bằng hormone tái tổ hợp (RGP)

3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ hormone RGP sử dụng đến quá trình kích thích hải sâm sinh sản

Hoạt động sinh sản xảy ra sau 15 - 65 phút sau khi tiêm tùy vào nồng độ hormone sử dụng (Bảng 1) và hoạt động sinh sản được nhìn thấy rõ ràng như biểu hiện lắc đầu, cơ thể dựng đứng và con đực phóng tinh trước sau đó con cái bắt đầu phóng trứng (Hình 1). Hoạt động phóng tinh, đẻ trứng này kéo dài trong 10 - 20 phút/lần và lặp lại 3 - 5 lần trong tổng thời gian sinh sản dài 60 - 65 phút.



Hình 1. Hoạt động sinh sản hải sâm vú bố mẹ tại Nha Trang ở nhiệt độ nước 28°C

(A: con đực phóng tinh; B: con cái đẻ trứng)

Bảng 1. Kết quả kích thích hải sâm vú (*H.nobilis*) sinh sản bằng hormone tái tổ hợp

Nồng độ hormone sử dụng	Số lượng hải sâm bố mẹ tham gia sinh sản (con)	Thời gian hiệu ứng (phút)	Tỷ lệ đẻ (%)	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ nở (%)
0 $\mu\text{g/kg}$ (AFSW)	18 (9 đực: 9 cái)	x	x	x	x
25 $\mu\text{g/kg}$	18 (9 đực: 9 cái)	32 - 60	44,4	75,5	78,2
50 $\mu\text{g/kg}$	18 (9 đực: 9 cái)	19 - 61	55,5	80,5	80,0
75 $\mu\text{g/kg}$	18 (9 đực: 9 cái)	15 - 65	66,7	81,5	82,5

Ghi chú: Autoclave Filter Sea Water (AFSW): Nước biển lọc sạch tiệt trùng

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, mặc dù hải sâm vú bố mẹ trong mùa sinh sản nếu không sử dụng hormone hay bất kỳ hình thức kích thích nào đều không đẻ. Phương pháp kích thích hải sâm vú sinh sản bằng hormone rõ ràng có hiệu quả cao ở 3 nồng độ sử dụng. Trong đó, ở nồng độ sử dụng 75 $\mu\text{g/kg}$, hải sâm vú bố mẹ cho tỷ lệ đẻ, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở cao nhất, lần lượt là 66,7%, 81,5 và 82,5%, so sánh với 2 nồng độ còn lại các tỷ lệ này thấp hơn.

3.1.2. Phát triển phôi và ấu trùng hải sâm vú (*H. nobilis*) tại Khánh Hoà

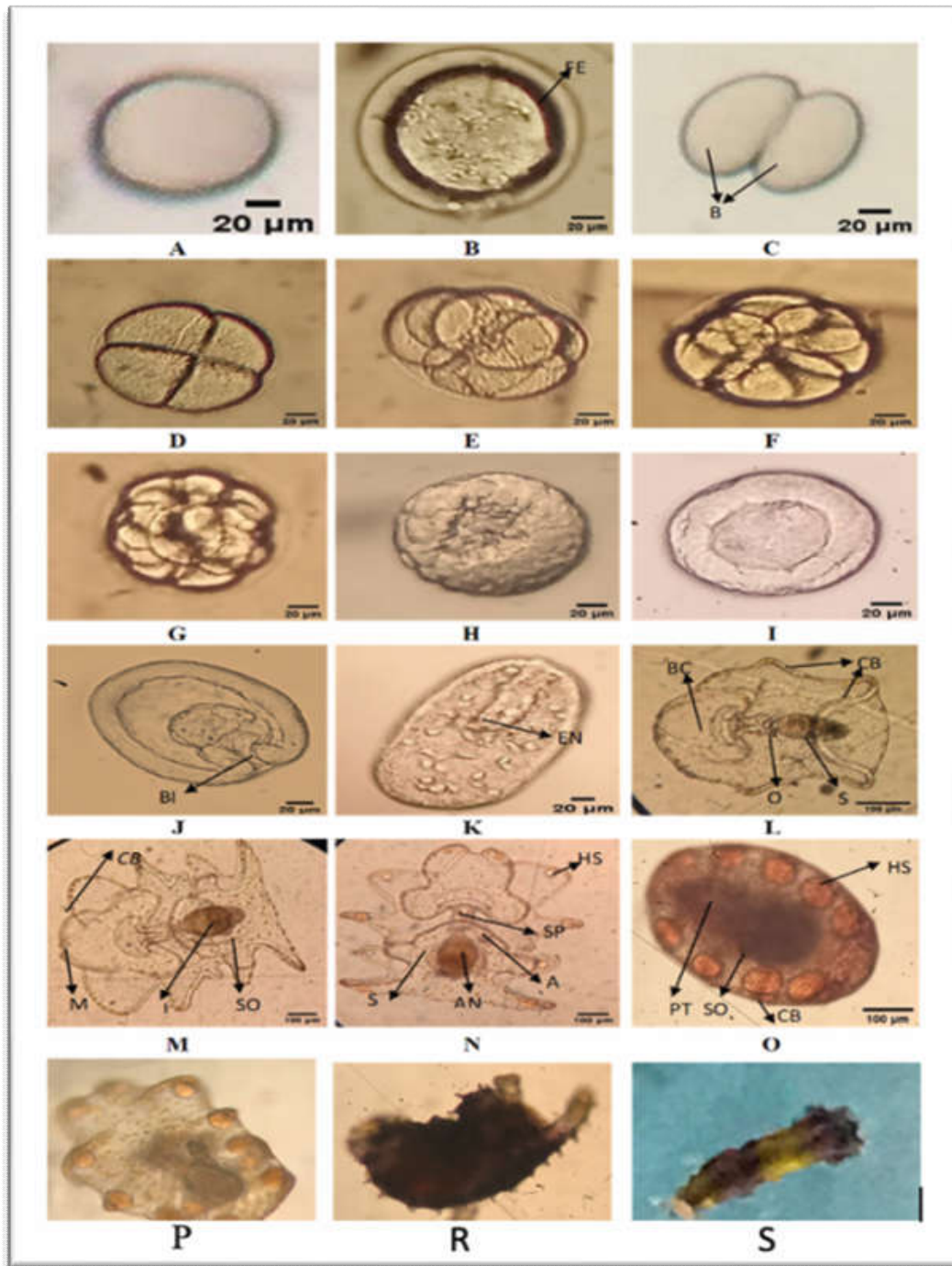
Ở nhiệt độ nước duy trì 28 - 29,5°C, quá trình thụ tinh xảy ra ngay sau khi hải sâm vú phóng tinh

và trứng ra môi trường nước, trứng được thụ tinh có kích thước 170,2 μm , được bao bọc bởi một lớp màng trong suốt (Hình 2.A), sau đó quá trình phân cắt xảy ra 2 tế bào, 4 tế bào, 8 tế bào, 16 tế bào trong vòng 180 phút sau khi trứng thụ tinh. Quá trình phát triển phôi giai đoạn tiếp theo là Morula trong vòng 4 giờ sau thụ tinh và đạt kích thước 180,2 μm , giai đoạn Blastula trong thời gian 5 giờ nhưng kích thước không phát triển, đến giai đoạn Rotary blastula sau 9 giờ và tiếp tục đến giai đoạn hậu kỳ Gastrula kết thúc quá trình phát triển phôi sau 32 giờ kể từ lúc trứng thụ tinh và nở thành ấu trùng gọi là tiền kỳ ấu trùng auricularia có kích

thước 988,9 μm (ấu trùng auricularia mới nở - Hình 2.L).

Quá trình biến thái ấu trùng trải qua 5 giai đoạn, gồm: Tiền kỳ Auricularia (Hình 2.L), trung kỳ Auricularia (Hình 2.M), hậu kỳ Auricularia (Hình

2.N), Doliolaria (giai đoạn xuống đáy - Hình 2.P) và giai đoạn Pentactula (ấu trùng giai đoạn bám), gồm giai đoạn tiền kỳ và hậu kỳ (ấu thể - Hình 2.R) trước khi chuyển sang giai đoạn con giống Juvenile (Hình 2.S).



Hình 2. Phát triển phôi và biến thái ấu trùng, giống hải sâm vú (*H. nobilis*) ở 28-29,5°C

Bảng 2. Thời gian và kích thước ấu trùng, giống hải sâm vú (*H. Nobilis*) ở 28-29,5°C

Giai đoạn phát triển	Thời gian	Kích thước (µm)
Trứng chưa thụ tinh (A)	0 - phút	153,7±18,10
Trứng thụ tinh (B)	0 – 5 phút	170,2±7,82
2-tế bào (C)	90 - phút	173,3±4,80
4-tế bào (D)	100 - phút	178,3±4,80
8-tế bào (E)	160 - phút	177,3±6,92
16-tế bào (F)	180 - phút	181,3±6,23
Morula (G)	4 giờ	180,2±9,70
Blastula (H)	5 giờ	180,2±8,86
Rotary blastula (I)	9 giờ	177,7±7,16
Tiền kỳ Gastrula (J)	16 giờ	207,8±8,17
Hậu kỳ Gastrula (K)	32 giờ	275,5±18,12
Tiền kỳ ấu trùng Auricularia (L)	3 - 6 ngày	523,9±73,32
Trung kỳ ấu trùng Auricularia (M)	7 - 12 ngày	928,3±55,30
Hậu kỳ Auricularia (N)	12 - 15 ngày	988,9±24,58
Tiền kỳ Doliolaria (O)	16 -18 ngày	565,2± 84,19
Hậu kỳ Doliolaria (P)	18 -19 ngày	750,2±12,34
Pentactula (ấu thể-R)	19 - 23 ngày	1.120,3±14,22
Con giống Juvenile (S)	35-60 ngày	2.130,25±14,52

Quá trình sinh sản và thụ tinh của hải sâm vú xảy ra trong môi trường nước, thụ tinh nhanh chóng trong vòng 0-5 phút sau khi đẻ và trải qua quá trình phân cắt phát triển phôi trong 34-36 giờ trước khi nở ra ấu trùng vành tai mới nở (Auricularia). Ở nhiệt độ nước trong hệ thống bể ương từ 28 – 29,5°C, kết quả ương ấu trùng hải sâm vú trải qua các giai đoạn biến thái gồm: ấu trùng vành tai tiền kỳ (Early auricularia) sau khi nở 2-3 ngày; ấu trùng vành tai trung kỳ (Mid auricularia) ở ngày thứ 7-8; ấu trùng vành tai hậu kỳ (Late auricularia) ở ngày thứ 15-16; ấu trùng xuống đáy (Doliolaria) ở ngày thứ 18; giai đoạn Pentactula ở

ngày thứ 19-23 ngày và con giống juvenile ở 35-60 ngày.

3.2. Ương ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nổi

3.2.1. Kết quả thí nghiệm lựa chọn thức ăn thích hợp cho ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nổi

Cũng giống như một số loài hải sâm khác, ấu trùng hải sâm vú giai đoạn Auricularia (3 ngày tuổi) được cho ăn bằng một số loại thức ăn khác nhau nhằm lựa chọn được thức ăn thích hợp cho giai đoạn này qua đánh giá tỷ lệ sống và tăng trưởng của ấu trùng. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ sống (%) và chiều dài (μm) ấu trùng nổi hải sâm vú sử dụng các loại thức ăn khác nhau

Thời gian (ngày)	Tỷ lệ sống (%) của ấu trùng nổi			Chiều dài (μm) của ấu trùng nổi		
	NT1 (n=3)	NT2 (n=3)	NT3 (n=3)	NT1 (n=3)	NT2 (n=3)	NT3 (n=3)
1	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	446,3 ± 18,1 ^a	446,3 ± 18,1 ^a	446,3 ± 18,1 ^a
3	93,8 ± 8,0 ^a	89,6 ± 2,1 ^a	93,8 ± 2,5 ^a	652,0 ± 12,2 ^a	651,0 ± 11,3 ^b	650,7 ± 7,9 ^{ab}
6	90,9 ± 7,5 ^b	72,97 ± 7,8 ^a	83,5 ± 7,0 ^{ab}	752,0 ± 9,8 ^a	750,7 ± 6,1 ^a	747,0 ± 7,5 ^a
9	82,7 ± 6,5 ^b	69,1 ± 4,9 ^a	66,4 ± 5,5 ^a	843,7 ± 18,7 ^b	840,0 ± 10,8 ^b	829,7 ± 15,9 ^a
12	72,9 ± 5,5 ^b	55,2 ± 6,3 ^a	52,1 ± 8,9 ^a	951,0 ± 8,9 ^c	938,3 ± 7,9 ^b	932,3 ± 10,4 ^a
15	27,5 ± 7,9 ^b	12,8 ± 5,5 ^a	9,2 ± 2,2 ^a	538,7 ± 9,0 ^a	538,0 ± 7,6 ^a	539,7 ± 9,3 ^a

Ghi chú: NT1: (*N. occulata* + *C. muellerii* + *I. galbana*); NT2: (*N. occulata* + *C. muellerii* + *I. galbana* + *Protein selco*); NT3: (*N. occulata* + *C. muellerii* + *I. galbana* + *Protein selco* và *Frippack*); số liệu thể hiện giá trị trung bình trong cùng hàng trong cùng một chỉ tiêu đánh giá có chữ cái a, b, c khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, ương ấu trùng hải sâm vú trôi nổi bằng hỗn hợp tảo tươi đơn bào $1,5 \times 10^4$ tb/ml cho tỷ lệ sống cao nhất, đạt 27,5% sau 15 ngày, khác biệt có ý nghĩa so với 2 nghiệm thức thức ăn khác. Trong khi đó, ghi nhận tăng trưởng về chiều dài của ấu trùng *Auricularia* có sự khác biệt giữa 3 nghiệm thức thức ăn từ ngày thứ 3 trở đi. Kết quả ở nghiệm thức 1 và 2, chiều dài ấu trùng lớn hơn so với nghiệm thức 3, đặc biệt ở ngày thứ 12 (giai đoạn trung kỳ *Auricularia*), ấu trùng ở nghiệm thức 3 là lớn nhất và khác biệt có ý nghĩa so với 2 nghiệm thức còn lại, tiếp đến là nghiệm thức 2. Tuy nhiên, đến ngày thứ 15, kích

thước ấu trùng giữa 3 nghiệm thức là tương đương nhau và có giá trị nhỏ hơn so với ngày thứ 12. Điều này là do lúc này ấu trùng hậu *Auricularia* biến thái sang giai đoạn *Doliolaria*, hình thái co tròn lại làm cho kích thước nhỏ hơn giai đoạn trước đó, ấu trùng bắt đầu chuyển sang giai đoạn sống bám.

3.2.2. Kết quả thí nghiệm mật độ ương ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nổi

Tỷ lệ sống và tăng trưởng chiều dài của ấu trùng hải sâm vú giai đoạn nổi ương ở các mật độ khác nhau được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ sống (%) ấu trùng hải sâm vú ương ở các mật độ khác nhau

Thời gian (ngày)	Tỷ lệ sống (%) ấu trùng nổi			Chiều dài (μm) ấu trùng nổi		
	300* con/l	600 con/l	1.000 con/l	300 con/l	600 con/l	1.000 con/l
1	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	446,3 ± 18,1 ^a	446,3 ± 18,1 ^a	446,3 ± 18,1 ^a
3	91,7 ± 9,6 ^a	95,8 ± 4,8 ^a	87,5 ± 6,5 ^a	648,7 ± 8,2 ^a	656,7 ± 7,6 ^b	653,3 ± 11,8 ^{ab}
6	82,5 ± 1,7 ^a	93,4 ± 4,4 ^b	82,5 ± 7,0 ^a	799,0 ± 22,8 ^a	796,0 ± 13,0 ^a	798,7 ± 16,6 ^a
9	80,8 ± 1,7 ^b	84,6 ± 3,7 ^b	67,4 ± 9,6 ^a	905,7 ± 18,9 ^a	911,3 ± 19,3 ^a	903,0 ± 17,7 ^a
12	65,6 ± 9,7 ^b	63,6 ± 6,4 ^b	52,9 ± 9,8 ^a	947,0 ± 13,4 ^a	961,3 ± 8,2 ^b	959,0 ± 10,3 ^b
15	37,9 ± 6,9 ^b	41,5 ± 7,1 ^b	21,7 ± 4,8 ^a	552,7 ± 17,0 ^a	551,0 ± 14,0 ^a	552,7 ± 16,6 ^a

Ghi chú: (*) mật độ ấu trùng ương, số liệu thể hiện giá trị trung bình trong cùng hàng trong cùng một chỉ tiêu đánh giá có chữ cái a, b khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

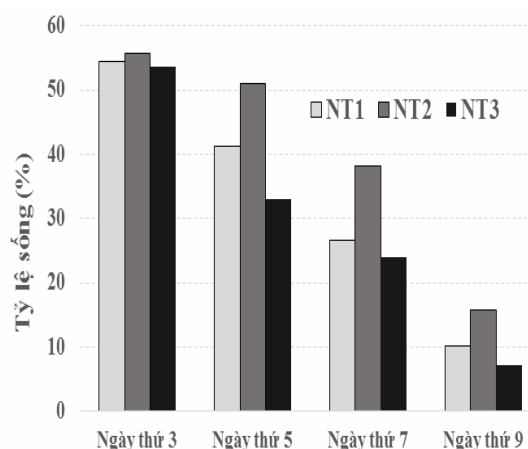
Kết quả ở bảng 4 cho thấy, ương ấu trùng hải sâm giai đoạn trôi nổi thích hợp ở mật độ 600 con/lít, tỷ lệ sống đạt 41,5%, tương ứng với chiều dài 552,7 μ m.

3.3. Ương ấu trùng hải sâm vú giai đoạn xuống bám đáy

3.3.1. Kết quả lựa chọn thức ăn thích hợp ương ấu trùng hải sâm giai đoạn xuống bám đáy

Đặc điểm ấu trùng xuống đáy tìm kiếm loại thức ăn bám sẵn trên bề mặt giá thể với kích thước và dinh dưỡng phù hợp ấu trùng sẽ thích nghi và quá trình biến thái xảy ra nhanh hơn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ấu trùng hải sâm giai đoạn xuống bám đáy sử dụng tảo đáy đơn bào kết hợp dịch tảo khô *Spirulina* cho tỷ lệ sống và tăng trưởng tốt nhất, kết quả của nghiệm thức thức ăn này khác biệt có ý nghĩa so với 2 nghiệm thức còn lại, đạt tỷ lệ sống từ *Doliolaria* đến *Pentactula* chỉ 16%. Ở giai đoạn này, ấu trùng có sự chuyển biến rõ rệt về hình thái, cấu trúc cơ thể và phương thức sống. Từ ấu trùng dạng hình lá gồm cơ quan đặc trưng tập trung nhiều dinh dưỡng để chuẩn bị cho quá trình phát triển biến thái, thay đổi tập tính ăn từ ăn lọc thức ăn nổi sang kiểu ăn các mảng bám trên giá thể. Vì vậy, tỷ lệ sống của ấu trùng giảm thấp rõ rệt so với giai đoạn trôi nổi. Đây cũng là đặc điểm thường gặp ở những đối tượng thủy sản nuôi có chu kỳ biến thái từ trôi nổi sang sống bám đáy; nghiên cứu lựa chọn thức ăn là điểm mấu chốt cần nghiên cứu đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng để

nâng cao tỷ lệ sống giai đoạn sống bám cho hải sâm vú nói riêng và nhóm hải sâm nói chung.



Hình 3. Tỷ lệ sống của ấu trùng hải sâm vú sử dụng các loại thức ăn khác nhau

Ghi chú: NT1: tảo đáy đơn bào *Navicurla*; NT2: tảo đáy đơn bào + tảo khô *Spirulina*; NT3: tảo đáy đơn bào + tảo khô *Spirulina* + *Frippack*.

Tương ứng với tỷ lệ sống của ấu trùng bám cho thấy, ấu trùng hải sâm vú sử dụng thức ở nghiệm thức 2 hỗn hợp gồm tảo đáy đơn bào + dịch tảo khô *Spirulina* có tốc độ tăng trưởng chiều dài lớn hơn, đạt $1.138,4 \pm 25,0 \mu$ m so với ấu trùng hải sâm vú ở 2 nghiệm thức còn lại, tương ứng $1.056 \pm 42,2 \mu$ m và $1.038 \pm 34,9 \mu$ m ở cuối kỳ thí nghiệm. Kết quả tăng trưởng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Tăng trưởng chiều dài (μ m) ấu trùng hải sâm ương giai đoạn bám sử dụng các loại thức ăn khác nhau

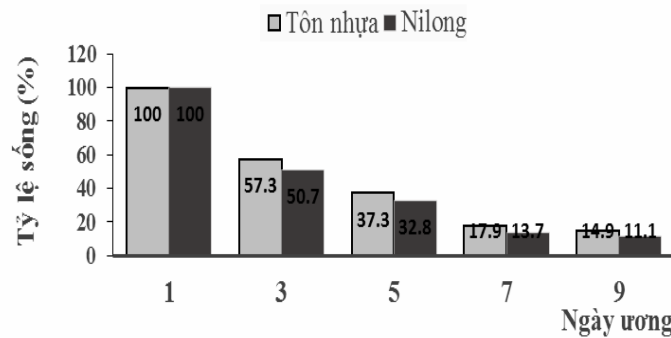
Thời gian (ngày)	Giai đoạn ấu trùng	Tăng trưởng chiều dài (μ m) ấu trùng giai đoạn bám		
		NT1 (n=3)	NT2 (n=3)	NT3 (n=3)
1	Hậu kỳ <i>Auricularia</i>	$988,2 \pm 5,5^a$	$987,5 \pm 5,2^a$	$988,4 \pm 6,6^a$
3	Tiền kỳ <i>Doliolaria</i>	$545,5 \pm 15,4^a$	$568,2 \pm 4,6^b$	$563,7 \pm 5,3^{ab}$
7	Hậu kỳ <i>Doliolaria</i>	$736 \pm 10,7^a$	$755,2 \pm 6,4^b$	$741 \pm 12,2^a$
9	<i>Pentactula</i>	$1.056 \pm 42,2^a$	$1.138,4 \pm 25,0^b$	$1.038 \pm 34,9^a$

Ghi chú: NT1: tảo đáy đơn bào *Navicurla*; NT2: tảo đáy đơn bào + tảo khô *Spirulina*; NT3: tảo đáy đơn bào + dịch tảo khô *Spirulina* + *Frippack*. Số liệu thể hiện giá trị trung bình trong cùng hàng có chữ cái a, b khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3.2. Kết quả thí nghiệm lựa chọn giá thể phù hợp ương ấu trùng hải sâm vú xuống bám đáy

Ấu trùng sử dụng thức ăn là tổ hợp tảo đáy đơn bào và dịch tảo khô *spirulina* để thực hiện thí nghiệm về vật liệu tôn nhựa và tấm nhựa bao ni

lông làm giá bám cho ấu trùng giai đoạn này. Kết quả cho thấy, hầu hết ấu trùng xuống bám tìm kiếm giá thể bám cứng có sẵn thức ăn và thức ăn duy trì phát triển ổn định trong môi trường nước nuôi cho tỷ lệ sống cao hơn, được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Tỷ lệ sống của ấu thể trên 2 loại giá thể bám khác nhau

Kết quả trên có thể giải thích rằng, với giá bám làm bằng tấm tôn nhựa đã được chà nhám tạo điều kiện cho tảo đáy đơn bào hay dịch tảo khô *spirulina* được quét lên bám bền hơn (lâu tàn hơn) so với tảo bám trên tấm nhựa ni lông có chứa ít tảo đáy đơn bào phát triển. Mặt khác, giá bám vào bằng tôn khi thả xuống đáy bể ương thường nằm vị trí ổn định, ít di chuyển qua lại hơn so với giá bám bằng nhựa ni lông. Vì vậy, ấu trùng bám trên vật bám tôn nhựa ít bị rung động nên sử dụng thức ăn nhiều hơn ấu trùng bám trên tấm nhựa ni lông.

Hơn nữa, ở giai đoạn ấu trùng sống bám, những ngày đầu thí nghiệm hầu như không siphon đáy bể tránh ảnh hưởng đến ấu trùng, đến ngày ương thứ 5 các bể thí nghiệm được cho nước chảy ra vào liên tục với lưu lượng 2 lít/phút và không siphon đáy. Các tấm tôn được kết vào nhau tạo thành giá bám, trong đó 2 tấm cách nhau 5 cm, do vậy môi trường đáy của các bể sử dụng giá bám bằng tôn thông thoáng hơn, nước, chất thải, tảo và xác ấu trùng chết được trao đổi liên tục. Trong khi đó, ở nghiệm thức sử dụng nhựa ni lông để tạo thành giá bám, các tấm ni lông cột lại thành chùm đặt dưới đáy bể. Do vậy, tại các nút cột thường đọng chất thải, tảo chết và xác ấu trùng làm cho lượng khí độc như NO_2 , NH_3 trong các bể thí nghiệm này cao hơn so với bể sử dụng tấm tôn.

Đây cũng là nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ sống của ấu trùng ở 2 dạng giá bám có sự khác biệt.

Về thời gian chuyển giai đoạn, ở nghiệm thức sử dụng tấm tôn nhựa làm giá bám thì thời gian ấu trùng *doliolaria* chuyển sang *pentactula* và sống đáy hoàn toàn là sau 9 ngày ương. Trong khi đó, ở nghiệm thức sử dụng nhựa ni lông làm giá bám, ngày ương thứ 9 của thí nghiệm vẫn bắt gặp các ấu trùng *doliolaria* lơ lửng trong tầng nước. Trong sản xuất giống các loài thủy sản nói chung và hải sâm nói riêng, rút ngắn thời gian biến thái, chuyển giai đoạn sẽ đảm bảo hiệu quả và chi phí sản xuất. Vì vậy, từ kết quả thí nghiệm có thể rút ra kết luận: vật liệu nhựa ni lông không phù hợp để làm giá bám cho ấu trùng hải sâm giai đoạn sống đáy.

4. KẾT LUẬN

Hormone tái tổ hợp RGP có ảnh hưởng rõ rệt trong quá trình thúc đẩy hải sâm vú sinh sản, nồng độ sử dụng tối ưu là 75 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể hải sâm vú bố mẹ. Hiệu ứng hormone xảy ra trong thời gian sớm nhất 15 phút sau tiêm kích thích và kéo dài đến 65 phút. Nồng độ hormone sử dụng cũng tác động đến tỷ lệ đẻ, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở của hải sâm vú bố mẹ kích thích sinh sản.

Quá trình biến thái ấu trùng hải sâm vú trải qua 5 giai đoạn bao gồm: Tiền Auricularia, trung kỳ Auricularia và hậu kỳ Auricularia (14 ngày ở

hiệt độ nước 28 - 29,5°C) trước khi chuyển sang giai đoạn xuống đáy bám Doliolaria (15 ngày), phát triển kéo dài sang giai đoạn Pentactula (23 ngày). Hậu kỳ Pentactula có đặc điểm rõ nét khi các u dọc theo cơ thể xuất hiện nhiều tơ chân giống con trưởng thành, cuối cùng quá trình phát triển biến thái từ ấu trùng nổi đến con giống Juvenile có hình thái ngoài giống con trưởng thành kéo dài đến 35 - 60 ngày.

Ấu trùng hải sâm vú ương ở giai đoạn nổi sử dụng thức ăn hợp vi tảo đơn bào *N. occulata* + *C. muellerii* + *I. galbana* ở mật độ $1,5 \times 10^4$ tb/ml, theo tỷ lệ 1: 1: 1 đạt tỷ lệ sống 27,5%, tương ứng với chiều dài 538 μ m và mật độ ương tối ưu 600 con/l.

Ấu trùng hải sâm vú ương ở giai đoạn sống bám đáy sử dụng thức ăn tối ưu nhất là tổ hợp tảo đáy đơn bào Navicular và dịch tảo khô *Spirulina* quét sẵn trên bề mặt giá thể. Giá thể bám thích hợp là các tấm tôn nhựa đã có sẵn tảo đáy đơn bào bám hoặc quét huyền dịch tảo *Spirulina*, làm thức ăn ương ấu trùng Doliolaria đến giai đoạn Pentactula đạt tỷ lệ sống 16%. Diễn biến các yếu tố môi trường được duy trì ổn định trong suốt quá trình thực hiện thí nghiệm và phù hợp với điều kiện sống và phát triển đối với hải sâm vú.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả nghiên cứu cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí cho đề tài "Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen hải sâm vú (*Holothuria nobilis* Selenka, 1867), Mã số NVQG/2017-13". Đồng thời, cảm ơn GS. Abigail Elizur từ University of Sunshine Coast (USC) đã tài trợ hormone tái tổ hợp RGP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. Inf. Bull. 18, 18-23.
2. Chen, J. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.-F., Mercier, A. (Eds.), Advances in Sea

Cucumber Aquaculture and Management, No. 463. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, Italy, pp. 25-38.

3. Ferdouse, F. (2004). World markets and trade flows of sea cucumber/beche-de-mer. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.-F., Mercier, A. (Eds.), Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management, 463. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, Italy, pp. 101-117.

4. Raison, C. M. (2008). Advances in sea cucumber aquaculture and prospects for commercial culture of *Holothuria scabra*. CAB Rev. 3:1-15.

5. Tolon, T., Emirog ̇lu, D., Gu ̇nay, D., Hanci, B. (2017a). Effect of stocking density on growth performance of juvenile sea cucumber *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788). *Aquac. Res.* 48: 4124-4131.

6. Tolon, T., Emirog ̇lu, D., Gu ̇nay, D., Ozgul, A. (2017b). Sea cucumber (*Holothuria tubulosa* Gmelin, 1790) culture under marine fish net cages for potential use in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 46:749-756.

7. Purcell, S. W., Williamson, D. H. & Ngalue, P. (2018). Chinese market prices of beche-de-mer: Implications for fisheries and aquaculture. *Marine Policy*, 91: 58-65.

8. Purcell, S. W., Hair, C. A. & Mills, D. J. (2012). Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: progress, problems and opportunities. *Aquaculture*, 368: 68-81.

9. Đào Tấn Hồ (1991). Nguồn lợi hải sâm (*Holothurioidea*) ở vùng biển phía Nam Việt Nam. Tuyển tập báo cáo khoa học - Hội nghị khoa học biển toàn quốc lần thứ III, tập 1, tr.112 -118.

10. Chieu, H. D., Turner, L., Smith, M. K., Wang, T. F., et al. (2019). Aquaculture breeding enhancement, maturation and spawning in sea cucumbers using a recombinant relaxin-like gonad-stimulating peptide. *Front. Genet.* 10, 7.

11. Conand, C. (1993). Reproductive biology of the holothurians from the major communities of

the New Caledonian Lagoon. Mar & Biology, 116: 439-450. sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. Marine biology, 136: 1045 – 1056.

12. Ramofafia, C., Battaglione, S. C., Bell, D. J. (2000). Reproductive biology of the commercial

RESEARCH ON REPRODUCTION OF TEATFISH SEA CUCUMBER

Holothuria nobilis (Selenka, 1867) IN KHANH HOA PROVINCE

Nguyen Van Hung¹, Kieu Tien Trung¹,
Le Trung Hau¹, Nguyen Thi Thanh Thuy¹

¹Research Institute for Aquaculture No. 3

Summary

Teatfish sea cucumber *Holothuria nobilis* (Selenka, 1867) is rare echinoderm with high economic value. Currently, teatfish seacucumber was over exploitation for human food and traditional medicine, leading to depletion of resources. This study tested the stimulation of teatfish seacucumber reproduction with the recombinant hormone Neurohormone relaxin-like gonad-stimulating peptide (RGP) and tested the rearing of seacucumber larvae with different types of food and densities. 4 dosages of RGP hormone: Treatment 1 (control only injected 1 µl AFSW corresponding to 0 µg/kg), treatment 2 (25 µg/kg), treatment 3 (50 µg/kg) and treatment 4 (75 µg/kg) were used to induce reproduction and record egg-laying rate, fertilization rate, hatching rate and embryo development metamorphosis time. The produced larvae are tested types of food, densities and attachment substrates. The results showed that teatfish sea cucumber were optimally stimulated to reproduce at a hormone dosage of 75 µg/kg, achieving a spawning rate of 66.7%, fertilization rate of 81.5% and hatching rate reach 82.5%. The optimal food for larvae in the swimming stage is a combination of single-celled microalgae (1.5×10^4 cell/ml) at the best larvae rearing density of 600 ind./l to achieve a survival rate of 27.5% and settlement larvae stage is a single-cell benthic – diatom *Navicula* sp. scanned on the plastic plates with a survival rate of 16%.

Keywords: *Swimming larvae, settlement larvae, teatfish sea cucumber, spawning, recombinant hormone (RGP).*

Người phản biện: TS. Huỳnh Minh Sang

Ngày nhận bài: 21/7/2023

Ngày thông qua phản biện: 4/8/2023

Ngày duyệt đăng: 11/8/2023