

DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.111

## NUÔI VỖ THÀNH THỰC VÀ KÍCH THÍCH SINH SẢN CẦU GAI ĐEN *Diadema setosum* (LESKE, 1778)

Hứa Thái Nhân\*, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thị Ngọc Anh

Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hứa Thái Nhân (email: htnhan@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 26/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 15/12/2018

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

### Title:

Maturation culture and spawning induction of black sea urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778)

### Từ khóa:

Cầu gai đen *Diadema setosum*, nuôi vỗ thành thực, kích thích sinh sản

### Keywords:

Black sea urchin, *Diadema setosum*, maturation culture, spawning induction

### ABSTRACT

This study was conducted to determine the appropriate feed for maturation culture and spawning induction method on black sea urchin *Diadema setosum*. Two experiments were conducted. In the first experiment, sea urchins were fed with three different diets including (1) Seaweed *Gracilaria* sp., 2) pellet feed, and 3) the combination of sea weed and pellet feed. For the second experiment, four different spawning inductions of injection 1.0 mL KCl (0.5M), temperature shock, UV shock and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> methods were employed to induce spawning of black sea urchin. The result showed that the average survival rate was above 50% in all diets of the first experiment after 90 days. The highest GSI (7.08±2.95%) was found for those animal fed with pellet feed and was significantly different ( $P < 0.05$ ) from those animal fed with sea weed, but did not differ significantly compared to those animal fed with both pellet and sea weed diet. In addition, most of the gonad of sea urchin that fed with diets 2 and 3 were found in maturation stage III and IV. In the second experiment, spawning rate (63.43±4.77%) by using KCl was significantly higher compared to the temperature shock method. No spawning had occurred for those methods of using UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> shock. Embryonic processes and hatching took about 27-30 hours after spawning and larval metamorphosis and stage development prior to settlement took more than 25 days.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện gồm 2 thí nghiệm (TN) nhằm xác định được thức ăn thích hợp trong nuôi vỗ thành thực và phương pháp kích thích sinh sản phù hợp cho cầu gai đen *Diadema setosum*. Ở TN1, cầu gai trưởng thành được cho ăn với 3 nghiệm thức (NT) thức ăn: 100% rong *Gracillari* sp. (NT1), 100% thức ăn chế biến (NT2) và kết hợp rong và thức ăn chế biến (NT3). TN2 được thực hiện với 4 phương pháp (PP) kích thích sinh sản khác nhau là: Tiêm 1,0 mL kalioclorua (KCl 0,5M), sốc nhiệt, chiếu đèn UV và hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Kết quả cho thấy sau 90 ngày nuôi tỷ lệ sống cầu gai đạt >50% ở tất cả các NT. Hệ số thành thực sinh dục GSI đạt cao nhất (7,08±2,95%) ở NT2 và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT1 ( $P < 0,05$ ), tuy nhiên không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT3. Tỷ lệ cầu gai đạt các giai đoạn thành thực III và IV chủ yếu ở NT2 và NT3. Kết quả TN2 cho thấy tỷ lệ sinh sản bằng PP tiêm KCl (63,43±4,77%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với PP sốc nhiệt ( $P < 0,05$ ). Tương tự, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở bằng PP sốc nhiệt luôn thấp hơn so với PP tiêm KCl ( $P < 0,05$ ). Không có cầu gai sinh sản ở 2 PP dùng đèn UV và PP dùng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thời gian nở từ 27 h đến 30 h, và ấu trùng phát triển qua các giai đoạn trước khi chuyển xuống đáy >25 ngày.

Trích dẫn: Hứa Thái Nhân, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thị Ngọc Anh, 2019. Nuôi vỗ thành thực và kích thích sinh sản cầu gai đen *Diadema setosum* (Leske, 1778). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 81-89.

## 1 GIỚI THIỆU

Cầu gai còn được gọi là nhum hay nhím biển, thuộc lớp ngành động vật da gai. Hiện nay, có hơn 800 loài cầu gai phân bố trên thế giới, trong đó loài cầu gai *Diadema setosum* (Leske, 1778) còn được gọi là cầu gai đen. Loài cầu gai này phân bố chủ yếu ở vùng biển nông, nước cạn như khu vực nhiệt đới Ấn Độ Dương đến Nhật Bản, Nam Thái Bình Dương và vùng biển Đơ (Lessions *et al.*, 2001). Ở Việt Nam, cầu gai đen thường phân bố ở vùng ven biển miền Trung, Vịnh Bắc Bộ, Trường Sa, Côn Đảo và vùng biển phía Tây Nam Việt Nam (Latypov and Salin, 2011; Hứa Thái Nhân *và ctv.*, 2019a).

Ở Việt Nam, trong vài năm gần đây cầu gai đã được biết đến như là nguồn thực phẩm dinh dưỡng và tiêu thụ khá phổ biến ở nhiều vùng biển, đặc biệt là vùng biển Kiên Giang. Giá cầu gai rất cao dao động từ 50 – 70 nghìn đồng/con tại các nhà hàng. Tuy nhiên, nguồn cầu gai tiêu thụ chủ yếu được thu từ tự nhiên dẫn đến nguồn lợi cầu gai ngày càng giảm nghiêm trọng (Thông tin trao đổi trực tiếp từ Cán bộ Quản lý, Phòng Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, huyện Kiên Hải, Kiên Giang). Vì vậy, việc duy trì quản lý loài cầu gai đen để cải thiện nguồn lợi giúp cân bằng hệ sinh thái biển là đặc biệt cần thiết. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm tìm ra loại thức ăn thích hợp cho quá trình nuôi vỗ thành thực sinh dục và phương pháp kích thích sinh sản phù hợp kết hợp quan sát quá trình phát triển phôi, biến thái của ấu trùng cầu gai đen nhằm cung cấp dẫn liệu khoa học phục vụ nghiên cứu phát triển quy trình sản xuất giống của cầu gai đen.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2016 đến tháng 1/2017 tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.1 Nghiên cứu nuôi vỗ thành thực cầu gai bằng các loại thức ăn khác nhau

Cầu gai trưởng thành (đường kính vỏ 4,07±0,24 cm) được thu từ tự nhiên ở vùng biển Hòn Sơn, Kiên Hải, Kiên Giang. Mẫu cầu gai sau khi thu được vận chuyển sống trong thùng xốp có sục khí về Trại Thực nghiệm Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

**Hệ thống thí nghiệm.** Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống tuần hoàn bể composite (200 L/bể), thể tích nước khoảng 150 L/bể với mật độ 12 con/bể. Một hệ thống tuần hoàn gồm 3 bể nuôi cầu gai bố mẹ và 1 bể lọc sinh học (100L), 5L giá thể lọc (RK Plast bioelement, SSA: 750 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>) được cho vào bể lọc sau đó chạy hệ thống khoảng 1 tuần trước bố trí thí nghiệm. Nước từ 3 bể nuôi trước khi qua bể lọc

sinh học được lọc qua bông lọc (Thái Hòa, Việt Nam) để loại các chất lơ lửng và thải từ cầu gai. Thời gian thí nghiệm là 90 ngày. Độ mặn được duy trì ở 30 ‰ trong suốt quá trình thí nghiệm.

**Bố trí thí nghiệm.** Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nghiệm thức (NT) thức ăn khác nhau với 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức:

NT 1: Cho ăn 100% rong câu chỉ vàng *Gracilaria* sp.

NT 2: Cho ăn 100% thức ăn chế biến,

NT 3: Cho ăn kết hợp rong và thức ăn chế biến.

Ở NT 1, cầu gai được cho ăn rong theo nhu cầu *ad libitum* hàng ngày. Ở NT3, rong và thức ăn chế biến được cho ăn xen kẽ mỗi ngày với khẩu phần ăn của thức ăn chế biến và rong là theo nhu cầu. Tuy nhiên khẩu phần ăn thức ăn chế biến ở NT 2 và NT 3 được tính toán hàng ngày sau khi cho ăn dao động từ 0,5-1,5% khối lượng thân/ngày. Rong câu chỉ vàng *Gracilaria* sp. được thu trực tiếp từ các ao nuôi tôm quảng canh ở Bạc Liêu sau khi vận chuyển về trại thực nghiệm nước lợ Khoa Thủy sản và nuôi trữ trong bể.

Thức ăn chế biến với các thành phần nguyên liệu và dinh dưỡng được trình bày trong Bảng 1. Trong đó, các thành phần nguyên liệu sử dụng được thừa kế từ Senaratna *et al.* (2005) và Dworjanyn *et al.* (2007) và có hiệu chỉnh dựa trên các nghiên cứu cơ bản của nhóm nghiên cứu.

**Bảng 1: Thành phần nguyên liệu và hóa học của thức ăn chế biến**

Thành phần	Tỷ lệ (%), vật chất khô
Bột cá biển Kiên Giang	15
Bột đậu nành đã ly trích dầu	35
Bột đậu nành đậm đặc <sup>1</sup>	10
Bột mì tinh	28
Dầu cá hồi	2,0
Dầu đậu nành	2,9
Premix-khoáng <sup>2</sup>	2,0
Bột rong <i>Enterophora</i> sp.	5,0
CMC	0,1
<b>Thành phần dinh dưỡng</b>	
Protein	36,5
Lipid	6,41
Carbohydrate	26,5
Tro	7,24

<sup>1</sup>Empyreal®75, protein đậm đặc, Cargill, Inc., Blair, NE 68008, USA.

<sup>2</sup>Premix-vitamin –No.8, Vemedim Co. LTD, Cần Thơ, Việt Nam.

**Chế biến thức ăn.** Trộn các thành phần như bột cá biển, bột đậu nành, bột đậu nành đậm đặc, premix khoáng và dầu được trộn đều với nhau. Bột mì tinh và CMC được trộn với nước nóng đun sôi (tỷ lệ 15-20% tổng vật chất khô của nguyên liệu thức ăn) sau đó trộn chung với thành phần trên rồi tiến hành ép viên với đường kính viên thức ăn là 1,0 mm. Sau đó, thức ăn được sấy khô 24h ở nhiệt độ 60<sup>o</sup>C, bảo quản trong tủ mát đến khi sử dụng. Thành phần dinh dưỡng của thức ăn được phân tích theo phương pháp AOAC (2002) tại phòng thí nghiệm dinh dưỡng, Bộ Môn Dinh dưỡng và Chế biến Thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.

**Cho ăn và quản lý thức ăn.** Cầu gai được cho ăn 1 lần/ngày vào lúc 18 h. Thức ăn dư thừa được đánh giá vào sáng hôm sau để điều chỉnh lượng thức ăn ở lần cho ăn tiếp theo. Thức ăn dư thừa được siphon loại bỏ hàng ngày để tránh ảnh hưởng đến chất lượng nước.

**Đánh giá sự thành thực của cầu gai.** Sự thành thực của cầu gai được xác định vào các ngày nuôi thứ 60 và 90 bằng cách thu mẫu ngẫu nhiên 3 con ở mỗi nghiệm thức (1 con/bê). Mẫu thu được cân đo và được giải phẫu để thu tuyến sinh dục. Sự thành thực của cầu gai được xác định bằng hệ số thành thực GSI (Gonadosomatic index) theo công thức (1).

*Hệ số thành thực (gonado somatic index – GSI):*

$$GSI (\%) = (GW/BW) \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: GW là khối lượng tuyến sinh dục (g)

BW là khối lượng tổng (g).

Tỷ lệ sống và tỷ lệ thành thực của cầu gai được xác định sau 90 ngày nuôi. Tỷ lệ sống (%) = (số cầu gai sống sau khi kết thúc thí nghiệm/số thả nuôi ban đầu) × 100.

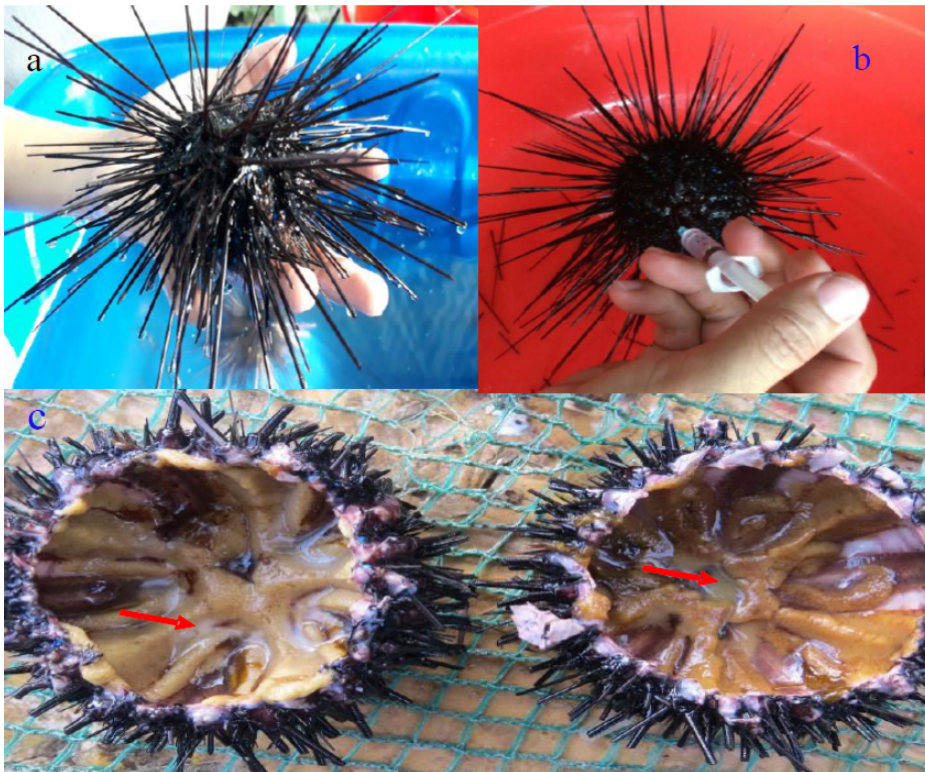
**Môi trường nước.** Khoảng 30% lượng nước trong mỗi hệ thống tuần hoàn được thay mỗi tuần nhằm để duy trì các hàm lượng khoáng tự nhiên cần thiết trong nước.

Các chỉ số môi trường như nhiệt độ, oxy hòa tan (DO) và pH được đo bằng máy đo đa chỉ tiêu (Hanna 98196, Rumani) mỗi 3 ngày/lần, độ mặn được duy trì ở mức 30 ‰ trong suốt quá trình thí nghiệm. Các chỉ tiêu thủy lý hóa như TAN and NO<sub>2</sub>-N được kiểm tra hàng tuần bằng bộ Test Kit (SERA, D52518 Heinsberg, Đức).

## 2.2 Nghiên cứu kích thích sinh sản cầu gai đen

### 2.2.1 Nguồn cầu gai bố mẹ

Cầu gai bố mẹ thành thực sử dụng trong nghiên cứu này được thu từ tự nhiên ở vùng biển Hòn Sơn, Kiên Hải, Kiên Giang.



**Hình 1:** a: Cầu gai bố mẹ sử dụng cho sinh sản. b: kích thích sinh sản bằng cách tiêm KCl, Cầu gai đực (c, trái) và cầu gai cái (c, phải) thành thực sau khi giải phẫu



Các tiêu chí chọn cá thể cầu gai bố mẹ. Cầu gai thành thực có kích thước đường kính lớn 30 mm. Cầu gai không xác định được giới tính và mức độ thành thực từ hình thái bên ngoài nên trước khi tiến hành thí nghiệm 7 đến 10 cầu gai bố mẹ được chọn ngẫu nhiên trong nhóm cầu gai bố mẹ chuẩn bị cho đẻ để giải phẫu và xác định mức độ thành thực. Đối với cầu gai đực thành thực có buồng tinh màu vàng tươi khi chạm vào bằng kéo hay dao nhọn có sẹ trắng chảy ra và cầu gai cái thành thực có tuyến sinh dục màu nâu hoặc nâu đen, dùng vật nhọn chạm vào có trứng chảy ra (Hình 1) và chỉ số thành thực (GSI) trung bình lớn hơn 12% (dựa vào kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học sinh sản).

Số lượng cầu gai bố mẹ (đường kính vỏ >40,0 cm) sử dụng cho mỗi lần kích thích sinh sản là 10 con được chọn ngẫu nhiên trong cùng 1 nhóm như nhau cho từng phương pháp kích thích sinh sản và được thực hiện 3 lần (tổng 30 con/phương pháp kích thích), ở độ mặn 30‰.

### 2.2.2 Phương pháp kích thích sinh sản

Các phương pháp kích thích sinh sản cầu gai được sử dụng trong nghiên cứu này là:

- Phương pháp tiêm dung dịch muối potassium chloride (KCl). Pha 3,73 g KCl với 100mL nước cất thành dung dịch KCl (0,5M), sau đó dùng ống xilanh tiêm 1,0 mL dung dịch KCl vào vùng xoang của cầu gai cách miệng khoảng 1,0 cm theo góc nghiêng 45°. Sau khi tiêm dung dịch KCl cho cầu gai vào bể đẻ sau đó bắt đầu quan sát quá trình sinh sản của cầu gai. Bể đẻ có thể tích (nước mặn 30 ‰ đã qua lọc mắt lưới 25 µm) khoảng 30-50L ở các bể điều được sục khí nhẹ.

- Phương pháp sốc nhiệt. Phơi cầu gai bố mẹ dưới ánh nắng râm khoảng 10 phút, sau đó cho vào bể đẻ (bể nhựa 30 L nước mặn đã qua lưới lọc như mô tả bên trên), tiếp theo nhiệt độ được tăng lên từ 3-5°C trong 30 phút bằng heater và sau đó giảm xuống nhiệt độ bình thường (28°C) cách thay 100% nước trong bể đẻ.

- Phương pháp sử dụng đèn UV. Cho cầu gai thành thực vào bể đẻ như mô tả ở phương pháp tiêm KCl sau đó dùng đèn UV (UV Lamp 7W, SEBO, China) soi trực tiếp vào bể khoảng 30 phút sau đó thay 100% nước trong bể đẻ và bắt đầu quan sát sự sinh sản của cầu gai.

- Phương pháp sử dụng hóa chất hydrogen peroxide (oxy già, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): Pha và chuẩn bị H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> được thực hiện theo phương pháp của Nhan and Ako (2014). Dung dịch oxy già H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> có hàm lượng 3% được mua từ cơ sở bán thuốc tây. Sau khi chọn ngẫu nhiên 10 cầu gai bố mẹ cho vào bể đẻ có thể tích 30L nước độ mặn 30‰, bể đẻ có sục khí mạnh,

lượng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% được nhỏ từng giọt vào bể đẻ đến khi đạt được nồng độ 0,06% thì dừng lại và quan sát biểu hiện của cầu gai bố mẹ trong 30 phút. Sau đó nước trong bể đẻ được siphon ra ngoài hoàn toàn và thay bằng nước mới sau đó bắt đầu quan sát cầu gai sinh sản.

Quá trình sinh sản của cầu gai rất dễ nhận biết khi quan sát bằng mắt thường. Cầu gai đực khi sinh sản sẽ phóng tinh ra môi trường nước có màu trắng như luồng khói và con cái phóng trứng ra môi trường nước có dạng hạt, màu vàng nhạt và được phun ra từng luồng.

Nguồn nước. Nước được sử dụng cho nghiên cứu này là nước có độ mặn 30‰ được pha từ nước có độ mặn 80‰ với nước máy sau đó xử lý bằng chlorine (45 g/m<sup>3</sup>), sau 24 h sục khí mạnh khoảng 48 h sau đó test chlorine, nếu còn tồn lưu thì trung hòa chlorin bằng Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> với liều lượng 15 g/m<sup>3</sup>.

### 2.2.3 Quá trình phát triển phôi và biến thái của ấu trùng cầu gai

Sau khi đẻ khoảng 15 phút tiến hành vớt cầu gai bố mẹ ra, sau đó siphon trứng thụ tinh qua vợt (25 µm). Trứng được rửa 2-3 lần khoảng 1-2 phút/lần bằng nước sạch đã qua xử lý như mô tả bên trên trước khi đưa vào bể ấp và bắt đầu quan sát quá trình phát triển phôi.

Các chỉ tiêu theo dõi: Thời gian sinh sản (phút), tỷ lệ sinh sản (%), sức sinh sản (trứng/kg), tỷ lệ thụ tinh (%) và tỷ lệ nở (%) được xác định.

- Tỷ lệ cầu gai sinh sản (%) = (Số lượng cầu gai đẻ/ Tổng số lượng cầu gai cho sinh sản) x 100

- Tỷ lệ thụ tinh (%) = (Số lượng trứng thụ tinh/ Số lượng trứng quan sát) x 100

- Tỷ lệ nở (%) = (Số lượng ấu trùng/ Số lượng trứng thụ tinh) x 100

Khoảng 24 h sau khi nở, ấu trùng được bố trí vào bể ương có thể tích 50 L ở độ mặn 30 ‰ để quan sát quá trình phát triển và biến thái của ấu trùng cầu gai đến ngày thứ 25, tức thời gian ấu trùng chuẩn bị chuyển sang giai đoạn sống đáy. Bể ương được duy trì mật độ tảo 8.000 – 10.000 tế bào/ml và có sục khí liên tục trong 24 h. Hỗn hợp tảo là *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros gracillis* và *Thalassiosira* sp. với tỷ lệ 1:1:1. Tảo được thu từ phòng thí nghiệm, Bộ môn Thủy sinh học Ứng dụng, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.

### 2.3 Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các số liệu về hệ số thành thực (GSI), tỷ lệ sinh sản, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở ở các nghiệm thức kích thích sinh sản được thu thập và được tính toán giá trị trung bình và độ lệch chuẩn bằng chương trình Excel 2013 và được phân tích đánh



giá bằng phương pháp kiểm định phương sai ANOVA (SPSS, version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) và phép thử Tukey ở mức ý nghĩa  $P < 0,05$ .

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Các yếu tố môi trường

Các yếu tố môi trường như nhiệt độ dao động trong khoảng  $27,6 \pm 0,50$  đến  $29,30 \pm 0,4$ °C. Oxy hòa tan (DO) được duy trì ở mức trên 6,5 mg/L do hệ thống nuôi có sục khí liên tục. pH được ghi nhận trong thời gian thí nghiệm và dao động từ 6,5 đến 7,6; TAN ( $0,45 \pm 0,15$  đến  $0,5 \pm 0,11$  mg/L) và  $\text{NO}_2\text{-N}$  ( $0,14 \pm 0,38$  đến  $0,60 \pm 0,4$  mg/L) được duy trì trong khoảng thích hợp do hệ thống được lắp đặt bể lọc sinh học.

#### 3.2 Nuôi vỗ thành thực bằng các loại thức ăn khác nhau

Bảng 2 thể hiện sự tăng trưởng và chỉ số thành thực sinh dục (GSI) của cầu gai bố mẹ sau 90 ngày ương. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống trung bình đạt cao ở tất cả các nghiệm thức. Chỉ số thành thực sinh dục GSI đạt cao nhất ( $7,08 \pm 2,95\%$ , dao động từ 2,14 - 11,96%) ở nghiệm thức cho ăn kết hợp thức ăn chế biến và rong và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 1 (cho ăn hoàn toàn bằng rong) ( $P < 0,05$ ), tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức cho ăn thức chế biến. Mặc dù hệ số thành thực của cầu gai trong thí nghiệm không cao và thấp hơn so với chỉ số GSI thu từ tự nhiên ( $> 12\%$ ).

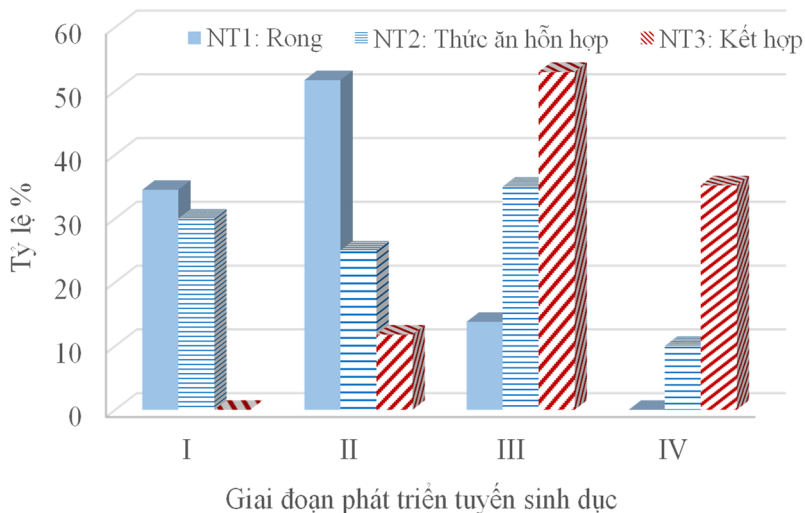
**Bảng 2:** Sự tăng trưởng, GSI và tỷ lệ sống của cầu gai trưởng thành sau 90 ngày nuôi

Thời gian	Các chỉ tiêu tăng trưởng	Nghiệm thức		
		NT1: Rong	NT2: Thức ăn chế biến	NT3: Kết hợp
Ban đầu	Đường kính vỏ (cm)		$4,07 \pm 0,24$	
	Khối lượng (g/con)		$37,8 \pm 5,88$	
	GSI (%)		$2,75 \pm 1,56$	
Sau 90 ngày nuôi	Đường kính vỏ (cm)	$4,0 \pm 0,75$	$4,85 \pm 1,22$	$4,19 \pm 0,59$
	Khối lượng (g/con)	$34,25 \pm 18,25$	$33,56 \pm 2,33$	$39,11 \pm 12,51$
	GSI (%)	$2,80 \pm 1,72^a$	$7,08 \pm 2,95^b$	$6,12 \pm 1,14^b$
Tỷ lệ sống (%)		$60,0 \pm 0,0^a$	$60,0 \pm 6,7^a$	$51,1 \pm 10,2^a$

Các ký tự a, b, c trong cùng 1 hàng khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$ . Các số liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (TB±SD).

Kết quả phân tích tỷ lệ các giai đoạn thành thực sinh dục cho thấy có nhiều cầu gai ở NT 2 và 3 thành thực đạt đến giai đoạn III và IV, trong đó có đến 35% cầu gai đạt giai đoạn IV (NT3) và chỉ có 10% cầu gai ở NT2 đạt giai đoạn thành thực sinh dục, giai đoạn IV (Hình 2). Đối với NT chỉ cho ăn hoàn toàn

bằng rong, không có cầu gai đạt đến giai đoạn thành thực sinh dục, có đến 50% cầu ở nghiệm thức này đạt giai đoạn II và chỉ có khoảng 10% đạt đến giai đoạn III. Kết quả này có thể là do trong rong thiếu một số thành phần dinh dưỡng thiết yếu cho nhu cầu phát triển và thành thực của cầu gai.



**Hình 2:** Tỷ lệ các giai đoạn thành thực sinh dục của cầu gai

Nghiên cứu nuôi vỗ thành thực cầu gai đã được thực hiện trên nhiều nước trên thế giới trong đó đặc biệt là cầu gai tím *Heliocidaris erythrogramma*, theo Senaratna *et al.* (2005) cầu gai thành thực sinh dục tốt khi cho ăn thức ăn chế biến. Cũng theo Dworjanyan *et al.* (2007) cho rằng cầu gai thành thực tốt khi cho ăn kết hợp thức ăn chế biến có bổ sung 5% rong. Bên cạnh đó theo Hammer *et al.* (2006) thì tỷ lệ protein (35%) cao và carbohydrate (9%) thấp trong thức ăn có ảnh hưởng trực tiếp đến thành phần sinh hóa và phát triển của trứng cầu gai *Lytechinus variegatus*. Nhóm tác giả cũng kết luận rằng khi nuôi vỗ thành thực sinh dục cầu gai cần phải bổ sung thức ăn chế biến do thức ăn chế biến cung cấp đủ các thành phần dinh dưỡng thiết yếu giúp tăng quá trình thành thực và nâng cao tỷ lệ sống của cầu gai. Từ các nghiên cứu trên cho thấy việc nuôi vỗ cầu gai bằng thức ăn chế biến là hoàn toàn khả thi và kết quả nghiên cứu này cho thấy cầu gai đen thành thực khi cho ăn bằng thức ăn chế biến và khi có bổ sung rong *Gracilaria* sp.

**3.3 Kết quả kích thích sinh sản**

Bảng 3 cho thấy kết quả kích thích sinh sản cầu gai bằng các phương pháp khác nhau. Kết quả cho thấy thời gian sinh sản cầu gai bằng phương pháp tiêm dung dịch KCl là 1-3 phút, cầu gai bắt đầu phóng tinh và trứng vào môi trường nước và quá

trình thụ tinh diễn ra. Tuy nhiên, đối với phương pháp kích thích bằng cách sốc nhiệt thì thời gian sinh sản của cầu gai bắt đầu lâu hơn, khoảng 45 phút. Không có cầu gai sinh sản bằng phương pháp sử dụng đèn UV và dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, đặc biệt là khoảng 30% số cầu gai bố mẹ chết sau sử dụng phương pháp H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tỷ lệ đẻ cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp kích thích. Trong đó, tỷ lệ đẻ bằng phương pháp tiêm KCl cao hơn có ý nghĩa thống kê so với phương pháp sốc nhiệt (Bảng 3). Tương tự, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở bằng phương pháp sốc nhiệt luôn thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với phương pháp tiêm KCl. Điều này có thể lý giải rằng do thời gian hiệu ứng và bắt đầu sinh sản không đồng bộ. Kết quả này có thể là mức độ thành thực của cầu gai đực và cái không đồng đều, do nguồn bố mẹ cho sinh sản được thu từ tự nhiên. Đây được xem và vấn đề hạn chế trong nghiên cứu, tuy nhiên thí nghiệm được thực hiện cùng mùa vụ sinh sản của loài này ngoài tự nhiên, tháng 5-8 (Hứa Thái Nhân và *ctv.*, 2019). Quá trình theo dõi ghi nhận được con đực thường có thời gian hiệu ứng và phóng tinh sớm hơn con cái. Bên cạnh đó, cầu gai bố mẹ sau khi kích thích sinh sản bằng phương pháp sốc nhiệt thì cầu gai bố mẹ khỏe hơn so với pháp tiêm KCl.

**Bảng 3: Kết quả kích thích sinh sản cầu gai bằng các phương pháp khác nhau**

Phương pháp kích thích	Số lượng cầu gai bố mẹ	Thời gian sinh sản (phút)	Tỷ lệ đẻ (%)	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ nở (%)
KCl	30	1-3	63,43±4,77 <sup>a</sup>	85,5±5,67 <sup>a</sup>	85,6±4,3 <sup>a</sup>
Sốc nhiệt	30	45-60	8,90±7,4 <sup>b</sup>	67,9±12,5 <sup>b</sup>	68,3± 8,5 <sup>b</sup>
Đèn UV	30	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30	-	-	-	-

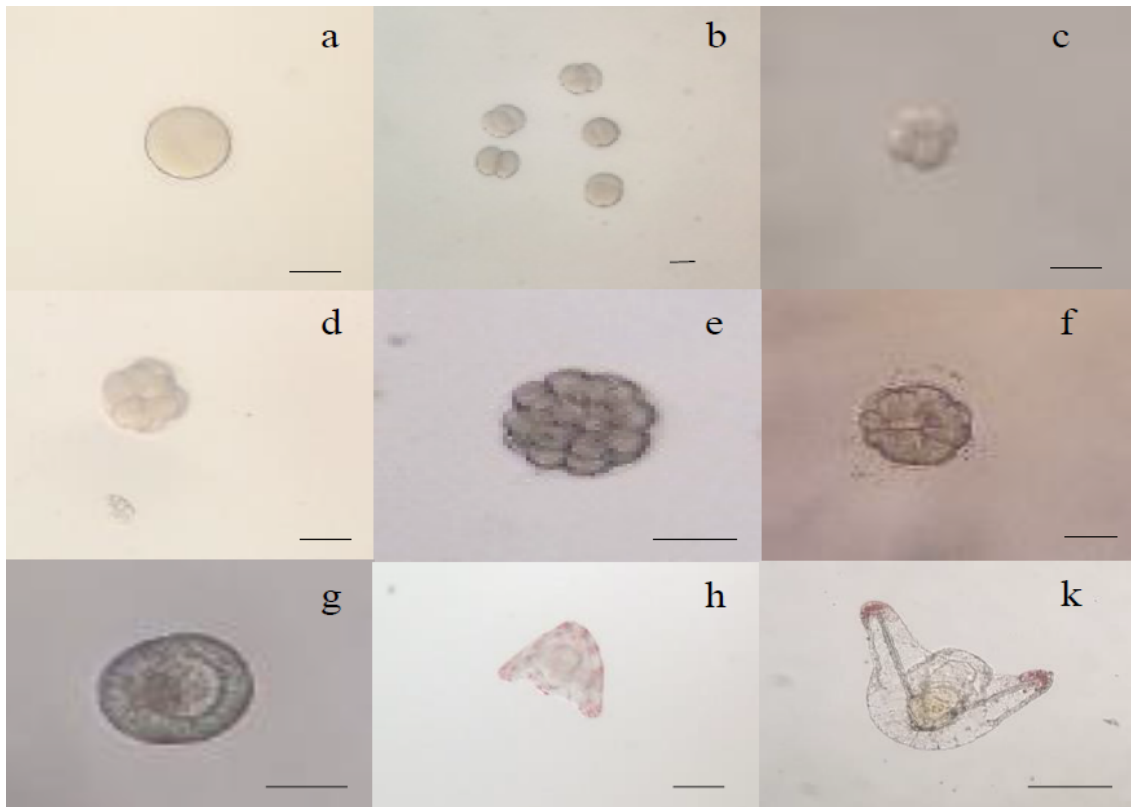
Các ký tự a,b,c trong cùng 1 cột khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức P < 0,05. Các số liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (TB±SD).

Tương tự kết quả nghiên cứu kích thích sinh sản cầu gai bằng phương pháp tiêm dung dịch KCL (0,5 M) cho kết quả tối ưu nhất trên loài *Echinometra mathaei* (Jose *et al.*, 2007), *Strongylocentrotus purpuratus* (Vacquier, 2011).

**3.4 Quá trình phát triển phôi**

Thời gian biến thái và phát triển ấu trùng cầu gai được trình bày trong Bảng 4 và Hình 3. Kết quả

quan sát cho thấy sau khi kích thích sinh sản và thụ tinh thì quá trình phát triển phôi đến khi nở mất khoảng 25-27 h ở nhiệt độ nước 27,5-29,0°C. Trứng phát triển thành 2 tế bào sau khi thụ tinh khoảng 30-45 phút, quá trình phát triển phôi tiếp tục phát triển đến giai đoạn 4 tế bào, 8 tế bào, 16 tế bào, 32 tế bào, phôi nang, phôi vị và phôi thần kinh đến khoảng 23 h sau khi thụ tinh; trứng thụ tinh bắt đầu nở sau 25-27 h.



**Hình 3:** Thời gian và quá trình phát triển phôi và hậu phôi của cầu gai đen ở nhiệt độ 27-29°C. a: 15 phút sau khi để trứng đã thụ tinh; b: 2 và 4 tế bào, 30-45 phút - sau khi thụ tinh; c: 8 tế bào, 3 h sau khi thụ tinh; d: 32 tế bào 9 h sau khi thụ tinh; e: 64 tế bào; f: Phân chia cực đồng đều; g: Phôi nang và phôi vị khoảng 20 h 30 sau khi thụ tinh; h: ấu trùng 1 h sau khi nở; k: ấu trùng 5 h sau khi nở; bar: 50 µm

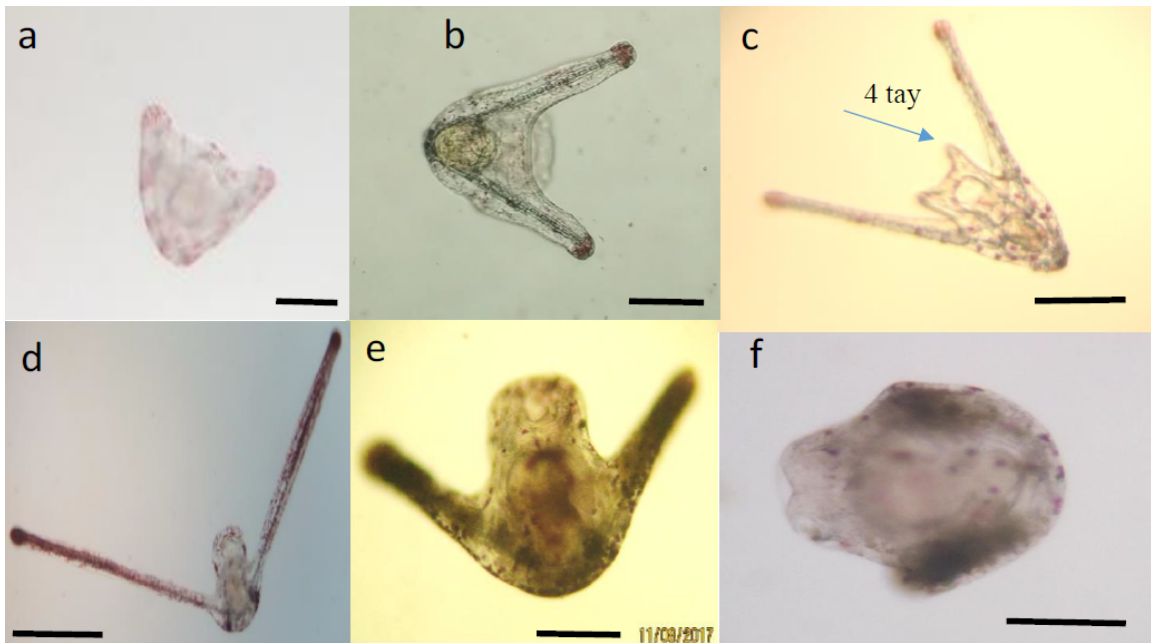
**Bảng 4:** Quá trình phát triển phôi của ấu trùng cầu gai đen (*Diadema setosum*) (27,5-29,0 °C)

Giai đoạn phát triển	Thời gian phát triển
2 tế bào	30-45 phút sau khi thụ tinh
4 tế bào	1h 20 phút
8 tế bào	3h 20 phút
16 tế bào	5 h
32 tế bào	9-10 h
Giai đoạn phôi nang	15-17 h
Phôi vị	19-20 h
Xuất hiện phôi thần kinh	23 h
Ấu trùng mới nở	25-27 h
2 gai xuất hiện và phát triển	27-30 h

### 3.5 Quá trình biến thái của ấu trùng cầu gai

Quá trình phát triển và biến thái chuyển giai đoạn của ấu trùng cầu gai đen trong thời gian thí nghiệm 1 được thể hiện trong Hình 4. Ấu trùng 3h sau khi nở (Hình 4a) và hệ tiêu hóa xuất sau 48 h, bao tử được hình thành và ấu trùng bắt đầu ăn phiêu sinh thực vật; 2 tay, chiều dài và chiều rộng thân bắt đầu phát triển đạt kích cỡ lớn nhất từ 5 đến ngày 7 sau khi ương (Hình 4 c, d), sau đó kích cỡ 2 tay giảm dần và biến mất trước khi chuyển xuống giai đoạn sống đáy (Hình 4 e, f). Kết quả quan sát trong suốt thời gian ương cho thấy 2 tay của nhiều ấu trùng bắt đầu biến mất vào ngày 25 và nhiều ấu trùng có biểu hiện xuống đáy sau khi tắt sục khí. Cho nên đây là thời điểm thích hợp để chuyển sang giai đoạn ương từ ấu trùng bám lên cầu gai giống.





**Hình 4: Quá trình biến thái chuyển giai đoạn của ấu trùng cầu gai đen. a: ấu trùng 30 h sau khi nở; b: ấu trùng ngày thứ 3, 2 tay bắt đầu phát triển dài ra và xuất hiện 4 tay; c, d: ấu trùng ngày thứ 5 và thứ 7, 2 tay bắt đầu phát triển dài hơn; e và f: ấu trùng sau ngày thứ 25 hai tay ngắn lại và biến mất để bắt đầu chuyển giai đoạn sống đáy; bar: 50  $\mu$ m**

Tương tự kết quả quan sát quá trình phát triển và biến thái của ấu trùng cầu gai đen bởi (Dautov and Dautova, 2016), ấu trùng cầu gai đen trong nghiên cứu này chỉ phát triển đến giai đoạn 2 tay sau đó giảm dần và biến mất trước khi xuống bám đáy và phát triển thành giống. Tuy nhiên giai đoạn ấu trùng 4 tay vẫn xuất hiện vào các ngày thứ 3-4 nhưng không phát triển và sau đó biến thái và biến mất dần vào ngày thứ 7 nên một số tác giả vẫn cho là ấu trùng cầu gai đen chỉ phát triển đến giai đoạn 2 tay. Kết quả này cung cấp thông tin cơ bản về quá trình biến thái và phát triển ấu trùng cầu gai góp phần quan trọng phục vụ nghiên cứu kỹ thuật ương ấu trùng cầu gai đen giai đoạn sống trôi nổi trước khi giống đáy và phát triển thành con giống.

### 3.6 KẾT LUẬN

Cầu gai đen hoàn toàn có thể thành thực khi nuôi vỗ trong hệ thống tuần hoàn ở độ mặn 30‰ bằng thức ăn chế biến và thức ăn chế biến có kết hợp với rong *Gracilaria* sp.

Kích thích sinh sản cầu gai bằng cách tiêm dung dịch KCl (0,5M) cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ sinh sản 63,43% và tỷ lệ thụ tinh đạt 85,5% và tỷ lệ nở của ấu trùng đạt 85,6%.

Quá trình phát triển phôi đến khi nở của cầu gai đen dao động từ 27- 30 h sau khi thụ tinh (ở nhiệt độ 27,5-29,0°C). Quá trình biến thái chuyển giai đoạn

của ấu trùng cầu gai đen sau khi nở đến giai đoạn trước khi xuống đáy là khoảng 25 ngày.

### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Bộ (B2016-TCT-12ĐT).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17<sup>th</sup> Edition., The Association of Official Analytical Chemists., Gaithersburg, MD, USA.
- Dautov, S.S., and Dautova, T.N., 2016. The larvae of *Diadema setosum* (Leske, 1778) (Carmadoma: Diadematidae) from South China Sea. *Invertebrate Reproduction and Development*. 60(4): 1-7.
- Dworjanyan, S.A., Pirozzi, I., and Liu, W., 2007. The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *Aquaculture*. 273(4): 624-633.
- Hammer, H.S., Watts, S.A., Lawrence, A.L., Lawrence, J.M., and Desmond, R.A., 2006. The effect of dietary protein on consumption, survival, growth, and production of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*. 254(1-4): 483-495.
- Hứa Thái Nhân, Đào Minh Hải, Dương Thúy Yên, Võ Nam Sơn, Phạm Minh Đức và Trần Ngọc Hải, 2019a. Hiện trạng và tiềm năng phát triển nuôi cầu gai ở vùng biển Kiên Giang, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 55(1B): 38-47.

- Hứa Thái Nhân, Trương Quỳnh Như và Ngô Thị Thu Thảo, 2019b. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản của gai đen *Diadema setosum* (Leske, 1778). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(2B): 28-37.
- Jose, J.J., Lipton, A.P., and Anil, M.K., 2007. Induced spawning and larval rearing of sea urchin *Echinometra mathaei* (deBlainville, 1825). Journal of Marine Biology Assessment India. 49(2): 230- 233.
- Latypov, Y. Y, and Salin, N.I., 2011. Current status of coral reef of islands in the Gulf of Siam and Southern Viet Nam. Russian Journal of Marine Biology. 37(4): 255-262.
- Lessions, H.A., Kessing, B.D., and Pearse, J.S., 2001. Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. Evolution. 55(5): 955-975.
- Nhan, T.H., and Ako, H., 2014. Reproductive Biology and Effect of Arachidonic Acid Level in Broodstock Diet on Final Maturation of the Hawaiian Limpet *Cellana sandwicensis*. Journal of Aquaculture Research and Development. 5:256-264.
- Senaratna, M., Evans, L.H., Southam, L., and Tsvetnenko, E., 2005. Effect of different feed formulations on feed efficiency, gonad yield and gonad quality in the purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. Aquaculture Nutrition. 11(3): 199-207.
- Vacquier, V.D., 2011. Laboratory on Sea Urchin Fertilization. Molecular Reproduction and Development. 78: 553-564.