

## Effect of dietary astaxanthin on reproductive performance, egg quality and larvae of clownfish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830)

Nguyen Thi Nguyet Hue\*, Ho Son Lam, Dao Thi Hong Ngoc, Dang Tran Tu Tram, Huynh Minh Sang, Dinh Truong An, Doan Van Than, Nguyen Truong Tan Tai, Do Hai Dang, Hua Thai An

*Institute of Oceanography, VAST, Vietnam*

\*E-mail: [huenguyen82@gmail.com](mailto:huenguyen82@gmail.com)

Received: 28 August 2020; Accepted: 26 October 2020

©2020 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

### Abstract

This study was designed to evaluate the effects of astaxanthin in broodfish diets on reproductive performance, egg quality and larvae quality parameters of clownfish (*Amphiprion ocellaris*). Five treatments were tested with 5 levels of astaxanthin (Carophyll Pink 10% CWS) of 0, 50, 100, 150 and 200 mg/kg added to the feed. Each treatment was repeated in triplicate and the supplemental feeding trials were arranged for 13 months. The results showed that there were significant differences in hatching rate of egg, malformed rate and survival rate of larvae in 3 days post-hatch ( $p < 0.05$ ) among the feeding trials of astaxanthin supplements. The highest hatching rate of egg and survival rate and the lowest malformed rate of larvae were observed in the treatment that was supplemented with astaxanthin 150 mg/kg feed, respectively 92.14 %; 93.57 % and 0.55 %. However, the astaxanthin supplementary diets did not affect the re-maturation and spawning period, spawning frequency, fecundity, egg diameter and larval size of nemo fish among the treatments. The results also suggested that astaxanthin requirement for clownfish broodstock to improve reproductive performance was 150 mg/kg feed.

**Keywords:** Astaxanthin, nemo clownfish, reproductive quality, nutrition.

---

*Citation:* Nguyen Thi Nguyet Hue, Ho Son Lam, Dao Thi Hong Ngoc, Dang Tran Tu Tram, Huynh Minh Sang, Dinh Truong An, Doan Van Than, Nguyen Truong Tan Tai, Do Hai Dang, Hua Thai An, 2020. Effect of dietary astaxanthin on reproductive performance, egg quality and larvae of clownfish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 20(4A), 163–172.

## Ảnh hưởng của astaxanthin bổ sung vào thức ăn lên hiệu quả sinh sản, chất lượng trứng và ấu trùng cá khoang cổ Nemo *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830)

Nguyễn Thị Nguyệt Huệ\*, Hồ Sơn Lâm, Đào Thị Hồng Ngọc, Đặng Trần Tú Trâm, Huỳnh Minh Sang, Đinh Trường An, Đoàn Văn Thân, Nguyễn Trương Tấn Tài, Đỗ Hải Đăng, Hứa Thái An

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

\*E-mail: [huenguyen82@gmail.com](mailto:huenguyen82@gmail.com)

Nhận bài: 28-8-2020; Chấp nhận đăng: 26-10-2020

### Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của Astaxanthin được bổ sung vào thức ăn cá bố mẹ đến các chỉ tiêu sinh sản, chất lượng trứng và ấu trùng của cá khoang cổ nemo *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). Thí nghiệm được thực nghiệm bao gồm 5 nghiệm thức với 5 hàm lượng Astaxanthin (Carophyll Pink 10% CWS) khác nhau: 0, 50, 100, 150 và 200 mg/kg bổ sung vào thức ăn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Sau 13 tháng thí nghiệm đã cho thấy tỷ lệ nở, tỷ lệ dị hình và tỷ lệ sống của cá con 3 ngày tuổi có sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) giữa các nghiệm thức cho ăn bổ sung Astaxanthin. Tỷ lệ nở, tỷ lệ sống của ấu trùng cao nhất và tỷ lệ dị hình thấp nhất ở nghiệm thức cho ăn bổ sung Astaxanthin 150 mg/kg thức ăn, tương ứng lần lượt là 92,14 %; 93,57 % và 0,55 %. Tuy nhiên, các chế độ cho ăn này không tác động đến thời gian tái thành thực và sinh sản, tần suất sinh sản, sức sinh sản thực tế, kích thước trứng và ấu trùng của cá khoang cổ nemo. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy bổ sung 150 mg Astaxanthin/kg thức ăn đã cải thiện hiệu quả sinh sản cho cá khoang cổ nemo bố mẹ.

**Từ khoá:** Astaxanthin, cá khoang cổ nemo, chất lượng sinh sản, tỷ lệ sống, thức ăn sống.

### MỞ ĐẦU

Cá khoang cổ Nemo (*Amphiprion ocellaris*) là một trong những loài cá được nuôi phổ biến nhất trong các loài cá cảnh biển trên thế giới. Sinh sản nhân tạo thành công đã góp phần chủ động nguồn cá cung cấp cho thị trường, giảm thiểu đánh bắt hủy diệt nguồn lợi tự nhiên [1]. Tuy nhiên, để nâng cao hiệu quả sản xuất thương mại, cung cấp con giống chất lượng thì việc cải thiện chất lượng cá bố mẹ là rất cần thiết. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy việc điều chỉnh chế độ ăn của cá bố mẹ có thể ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng và sự phát triển của tuyến sinh dục [2], đến hiệu suất sinh sản như

cũng như chất lượng của giao tử và ấu trùng [3–6]. Các chất bổ sung vào thức ăn cho cá đã được nghiên cứu như các chất tăng cường miễn dịch (MOS, beta-glucan,...), các axit béo không no (HUFA), các vitamin C, sắc tố carotene astaxanthin cho cá,... Do đó, chiến lược đầu tư dinh dưỡng cho cá bố mẹ ngắn hạn hay dài hạn cũng có thể tác động đến chất lượng các sản phẩm sinh dục.

Trong các chất bổ sung cho cá thì Astaxanthin (Asta) là sắc tố caroten được sử dụng phổ biến cho nhiều loài cá để cải thiện màu sắc cho cá [7, 8]. Bên cạnh đó, đã có nhiều nghiên cứu cho thấy Asta mang lại tác động

đáng kể đến hiệu suất sinh sản, sản lượng và chất lượng trứng của nhiều loài thủy sản như cá tuyết (*Gadus morhua* L) [9], cá cam Nhật Bản (*Seriola quinqueradiata*) [6], cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss* [10], tôm bạc hà *Lysemata wurdemanni* [11],... Ngoài ra, Asta còn có vai trò hoạt động như là tiền thân của retinoids (provitamin A), chống tia UV và cải thiện chức năng hô hấp [12, 13], khả năng chống oxy hoá mạnh ngăn ngừa sự peroxid hóa tế bào hoặc mô sinh sản và phát triển trứng [14, 15]. Những phát hiện này cho thấy Asta rất quan trọng trong việc đảm bảo sự phát triển phôi bình thường và cũng có thể ảnh hưởng đến tỷ lệ nở và tỷ lệ sống của ấu trùng. Mặc dù có nhiều nghiên cứu ảnh hưởng của Asta đến màu sắc da, thúc đẩy tăng trưởng và tăng cường đáp ứng miễn dịch ở cá khoang cổ nemo trưởng thành [8, 16, 17] nhưng ảnh hưởng của Asta lên hiệu quả sinh sản của cá khoang cổ Nemo bố mẹ vẫn chưa được nghiên cứu. Do đó, kết quả của bài báo sẽ cung cấp các thông tin về ảnh hưởng của Asta đến chất lượng sản phẩm sinh dục, ấu trùng cũng như tỷ lệ hao hụt của trứng, tỷ lệ nở, tỷ lệ sống và tỷ lệ dị hình của ấu trùng cá khoang cổ Nemo cũng như đề xuất hàm lượng Asta cần thiết bổ sung vào thức ăn nhằm cải thiện hiệu quả sinh sản cho cá khoang cổ Nemo bố mẹ.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chuẩn bị thức ăn

Astaxanthin được sử dụng trong thí nghiệm có tên thương mại là Carophyll Pink với 10% Asta tổng hợp, dạng bột. Hàm lượng bổ sung sản phẩm carophyll lần lượt là 500, 1.000, 1.500 và 2.000 mg carophyll/kg thức ăn. Asta được hoà với nước sau đó mới cho vào thức ăn cơ bản trên và được trộn đều một lần nữa. Thức ăn cơ bản của cá Nemo bố mẹ được xay nhuyễn gồm 70% thịt tôm tươi và 30% nhuyễn thể. Thức ăn được bảo quản ở -32°C và sử dụng trong 1 tháng. Khi cho ăn, thức ăn được bẻ ra thành miếng nhỏ và rải đồng ở nhiệt

độ phòng và dùng thìa cắt thành từng miếng nhỏ cho cá ăn.

### Thiết kế thí nghiệm

#### Nguồn cá thí nghiệm

Cá khoang cổ Nemo được đặt mua từ các ghe đánh bắt. Cá có màu sắc tươi sáng, không trầy xước, bơi lội hoạt bát, đạt kích cỡ từ 5 cm trở lên. Cá được thuần dưỡng thích nghi và được nuôi vỗ bằng tôm, ruốc tươi (cho ăn 2 lần/ngày, tỷ lệ 5–10% khối lượng cơ thể) đến khi từng đôi cá bắt cặp với nhau trong 6 tháng (từ tháng 10/2016–3/2017). 15 cặp cá bố mẹ đã bắt cặp với nhau trong 6 tháng (cá đực có chiều dài  $5,29 \pm 0,038$  cm; cá cái có chiều dài  $7,87 \pm 0,065$  cm) được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm.

#### Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trong 7 tháng (từ tháng 4–11/2017) tại Trại thực nghiệm Viện Hải dương học, với 15 bể kính có thể tích 120 lít có lọc sinh học riêng biệt (thể tích 70 lít) và 1 chậu đất sét làm giá thể. Mỗi bể nuôi có 1 cặp cá Nemo bố mẹ đã bắt cặp. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần với 5 hàm lượng Asta bổ sung tương ứng lần lượt là 0 (NT1), 50 (NT2), 100 (NT3), 150 (NT4) và 200 (NT5) mg Asta/kg thức ăn.

#### Chăm sóc, quản lý

Cá được cho ăn 2 lần/ngày vào các thời điểm 8 h và 16 h. Thức ăn thừa và chất thải trong bể nuôi sẽ được siphon sau khi cho ăn khoảng 1 h. Bể nuôi được vệ sinh hàng ngày và được bổ sung nước ngọt (đã qua lắng và sục khí) để duy trì độ mặn ổn định (khoảng 33–35‰) cũng như lượng nước bay hơi trong suốt thời gian thí nghiệm.

#### Các yếu tố môi trường

Các chỉ tiêu môi trường được đo hàng ngày vào lúc 14 h, trong đó: nhiệt độ được đo bằng nhiệt kế thủy ngân (độ chính xác 1°C); pH đo bằng test kit (JBL); độ mặn đo bằng khúc xạ kế (chính xác 1‰).

Bảng 1. Kích thước cá bố mẹ khoang cổ Nemo ở các nghiệm thức

Cá	NT	NT1 (cm)	NT2 (cm)	NT3 (cm)	NT4 (cm)	NT5 (cm)
	Cái		7,93	7,84	7,80	7,82
Đực		5,28	5,25	5,32	5,33	5,25



Hình 1. Đàn cá khoang cổ Nemo bố mẹ

Hàm lượng các muối dinh dưỡng ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ): được thu mẫu và phân tích theo APHA (1998) tại phòng Sinh thái biển, Viện Hải dương học với định kỳ đo 2 tuần/lần.

#### Phương pháp thu thập số liệu

##### Chỉ số sinh sản cá bố mẹ

Sức sinh sản thực tế (Số lượng trứng/cá cái): Tổng số trứng cá vừa mới đẻ sẽ được đếm trực tiếp bằng mắt thường thông qua hình ảnh phóng to chụp toàn bộ ổ trứng bằng máy ảnh Canon powershot A2200HD 14.1 mega pixels.

Tần suất sinh sản của cá = Số lần cá sinh sản trong toàn bộ thời gian thí nghiệm/30 ngày (số lần/tháng).

Thời gian tái thành thực và sinh sản = Thời gian tính từ lúc cá sinh sản lần đầu đến sinh sản lần cuối/số lần cá tham gia sinh sản (ngày/lần).

Tỷ lệ trứng hao hụt = Số trứng còn lại sau khi ấp  $\times 100/\text{số trứng cá đẻ ngày đầu}$ . Tổng số trứng cá tại thời điểm trước khi nở sẽ được đếm trực tiếp bằng mắt thường thông qua hình ảnh phóng to chụp lại toàn bộ ổ trứng bằng máy ảnh Canon powershot A2200HD 14.1 mega pixel.

##### Chỉ số chất lượng trứng

*Đường kính của trứng:* Sau khi cá đẻ từ 40–60 phút, dùng panh nhọn lấy ngẫu nhiên 5 trứng/1 tổ trứng cho vào ống eppendorf 1,5 ml có chứa dung dịch cố định formol 4%. Đường kính của trứng được xác định bằng thước đo trên kính hiển vi.

*Tỷ lệ nở của trứng (%) =* (Số trứng cá còn lại trước khi chuyển sang bể nở – Số trứng không nở)  $\times 100/\text{Số trứng còn lại sau khi ấp trước khi chuyển sang bể nở}$ . Trứng trước khi nở sẽ được chuyển sang bể riêng. Thời điểm chuyển bể phụ thuộc vào nhiệt độ, trong vòng 6–7 ngày. Cá thường nở vào buổi tối từ 19–21 h. Tổng số trứng còn lại trước khi chuyển bể đã được mô tả ở phần tỷ lệ trứng hao hụt. Số trứng không nở sẽ chìm xuống đáy và được thu lại bằng cách siphon đáy bể. Một số trứng không nở khác còn lại trên tổ sẽ được đếm trực tiếp bằng mắt trên giá thể.

##### Chỉ số chất lượng ấu trùng

*Tỷ lệ sống của ấu trùng sau 3 ngày tuổi (%) =* (Số cá nở – số cá chết)  $\times 100/\text{Số cá nở}$ . Mỗi ngày đều siphon toàn bộ đáy bể và đếm số cá chết trong 3 ngày kể từ khi trứng nở.

*Tỷ lệ dị hình của ấu trùng cá mới nở (%):* Sau 12 h, tiến hành siphon toàn bộ ấu trùng cá mới nở chết, yếu, nằm đáy, hoặc bơi sát đáy, lơ lờ, cố định mẫu trong formol 4% và quan sát trên kính hiển vi. Ấu trùng dị hình là những ấu trùng có hình dạng bất bình thường (cong thân, vẹo thân, ngắn thân, ngắn miệng). Tỷ lệ dị hình của ấu trùng cá mới nở (%) = số cá dị hình  $\times 100/\text{tổng số cá mới nở}$ .

##### Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả được tính toán bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) trên phần mềm SPSS 18.0 để so sánh sự

khác nhau giữa các nghiệm thức thí nghiệm với độ tin cậy 95% ( $p < 0,05$ ). Số liệu được biểu diễn chủ yếu dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  Sai số chuẩn (SE).

Số liệu thô của nghiên cứu biểu diễn ở dạng phần trăm được chuyển đổi bằng cách lấy logarit, căn bậc hai, nghịch đảo hoặc một số hàm khác. Kiểm định về phân phối chuẩn của dữ liệu thô bằng phép kiểm Shapiro-Wild trong SPSS.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Các yếu tố môi trường trong thời gian thí nghiệm

Trong quá trình nuôi thí nghiệm các yếu tố môi trường nước dao động không lớn (độ mặn

dao động từ 33–35‰, pH từ 7,8–8,3, nhiệt độ từ 27–29°C, hàm lượng oxy hòa tan 4,4–5,6 mg/l, hàm lượng  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  nhỏ hơn 0,01 mg/l) nằm trong giới hạn thích ứng cho sự tăng trưởng và phát triển của cá khoang cổ Nemo [19].

### Ảnh hưởng của Astaxanthin bổ sung vào thức ăn đến hiệu quả sinh sản của cá Nemo

Kết quả thí nghiệm đã cho thấy chế độ ăn có bổ sung Asta ở các hàm lượng khác nhau trong chế độ ăn của cá bố mẹ không ảnh hưởng đến thời gian tái thành thực và sinh sản, tần suất sinh sản, và sức sinh sản thực tế của cá bố mẹ ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên việc bổ sung Asta đã cải thiện được tỷ lệ trứng hao hụt trong quá trình ấp ( $p < 0,05$ ) (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của các hàm lượng astaxanthin bổ sung vào thức ăn cá khoang cổ Nemo bố mẹ lên hiệu quả sinh sản

Các chỉ tiêu hiệu quả sinh sản	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Thời gian tái thành thực và sinh sản (ngày/lần)	15,62 $\pm$ 1,031 <sup>a</sup>	14,54 $\pm$ 0,864 <sup>a</sup>	13,56 $\pm$ 0,934 <sup>a</sup>	13,45 $\pm$ 0,745 <sup>a</sup>	13,53 $\pm$ 0,274 <sup>a</sup>
Tần suất sinh sản (lần /tháng)	1,94 $\pm$ 0,136 <sup>a</sup>	2,08 $\pm$ 0,223 <sup>a</sup>	2,24 $\pm$ 0,262 <sup>a</sup>	2,24 $\pm$ 0,227 <sup>a</sup>	2,22 $\pm$ 0,080 <sup>a</sup>
Sức sinh sản thực tế (trứng/ô)	309,56 $\pm$ 34,276 <sup>a</sup>	396,56 $\pm$ 31,463 <sup>a</sup>	411,56 $\pm$ 48,967 <sup>a</sup>	415,89 $\pm$ 48,764 <sup>a</sup>	420,00 $\pm$ 35,273 <sup>a</sup>
Tỷ lệ trứng hao hụt (%)	48,69 $\pm$ 3,278 <sup>bc</sup>	32,29 $\pm$ 2,657 <sup>b</sup>	19,45 $\pm$ 3,305 <sup>a</sup>	14,66 $\pm$ 2,698 <sup>a</sup>	20,68 $\pm$ 2,944 <sup>ac</sup>

Ghi chú: Các ký hiệu số mũ khác nhau trên cùng một hàng biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  SE

Kết quả thí nghiệm cho thấy tần suất sinh sản của cá khoang cổ nemo bố mẹ dao động từ 1,94–2,24 lần/tháng, thời gian tái thành thực và sinh sản từ 13,45–15,62 ngày/lần, và không bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn có bổ sung Asta ( $p > 0,05$ ). Thời gian tái thành thực và sinh sản của cá Nemo bố mẹ trong nghiên cứu tương đồng với một số nghiên cứu trước đây, dao động từ 9 đến 17 ngày [18] hay từ 12–15 ngày/lần [20]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian tái thành thực và sinh sản của cá Nemo bố mẹ không bị ảnh hưởng bởi Asta bổ sung vào thức ăn ( $p > 0,05$ ).

Sức sinh sản trung bình của cá khoang cổ Nemo thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng 309 trứng/ô và cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 200 mg Asta/kg thức ăn với 420 trứng/ô, tuy nhiên không có sự sai khác có ý nghĩa giữa các

nghiệm thức ( $p > 0,05$ ). Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như các nghiên cứu trên cá vược Nhật *Lateolabrax japonicus* [21], cá vàng *Carassius auratus* [22] và cá tuyết *Gadus morhua* [23].

Qua phân tích thống kê cũng cho thấy tỷ lệ hao hụt trứng đạt giá trị thấp nhất ở chế độ ăn bổ sung 150 mg Asta/kg thức ăn (14,66%) và cao nhất ở cá bố mẹ ăn thức ăn đối chứng (48,69%) ( $p < 0,05$ ). Ở các nghiệm thức bổ sung 100, 150 và 200 mg Asta/kg thức ăn không sai khác với nhau ( $p > 0,05$ ) từ 14,66–20,68 % nhưng lại thấp hơn có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức 50 mg/kg thức ăn và nghiệm thức đối chứng (lần lượt là 32,29% và 48,69%). Qua đó cho thấy, bổ sung Asta vào thức ăn với hàm lượng từ 100 và 150 mg Asta/kg thức ăn đã cải thiện tỷ lệ hao hụt trứng

của cá khoang cổ Nemo. Tỷ lệ trứng hao hụt trong thời gian ấp có thể liên quan đến tập tính ăn trứng của loài cá này. Tập tính ăn trứng cũng đã được ghi nhận trên nhiều loài cá khoang cổ [24–26]. Trứng bị ăn thường là trứng không thụ tinh, trứng yếu, trứng bệnh. Tuy nhiên, trong thí nghiệm này có ghi nhận những trường hợp thường xảy ra với cá bố mẹ đẻ lần đầu, sau thời gian ấp đến ngày thứ 7, mặc dù nhận thấy sự phát triển diêm mắt của trứng nhưng cá bố mẹ vẫn tiếp tục ăn trứng. Hiện tượng này cũng bắt gặp trên nhiều họ cá như họ cá chép Cyprinodonts, họ cá gai Gasterosteids, họ cá thái dương Centrarchids, họ Hexagrammidae, cá bống biển Cottidae, họ cá rô Cichlids, họ cá thia Pomacentridae, họ cá Tripterygiids, họ cá Blennids và họ cá Belontiids [27]. Một số nghiên cứu đã cho thấy chế độ ăn đầy đủ có thể làm giảm hiện tượng ăn trứng của cá bố mẹ đã được ghi nhận trên cá thia *Stegastes rectifraenum* [28], cá *Aidablennius sphynx* [29], cá bống

*Pomatoschistus microps* [30]. Ngược lại, hai nghiên cứu trên cá bống *Etheostoma* [31] và cá ba gai *Gasterosteus aculeatus flabellare* [32] đã chỉ ra việc cho ăn đầy đủ hay không cũng không làm ảnh hưởng đến tính ăn trứng của hai loài cá này.

**Ảnh hưởng của hàm lượng Astaxanthin bổ sung vào thức ăn cá khoang cổ Nemo bố mẹ lên chất lượng trứng và ấu trùng**

Các chỉ tiêu về chất lượng trứng và ấu trùng cá khoang cổ Nemo trong thời gian thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, kích thước của trứng cá mới đẻ không phụ thuộc vào chế độ ăn bổ sung hàm lượng Asta khác nhau ( $p > 0,05$ ) nhưng kích thước ấu trùng cá mới nở thì ngược lại ( $p < 0,05$ ). Kích thước ấu trùng cá ở các nghiệm thức 50 và 100 mg Asta/kg thức ăn có sự khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung Asta cao hơn ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của các hàm lượng Astaxanthin bổ sung vào thức ăn đến chất lượng trứng và ấu trùng

Các chỉ tiêu chất lượng trứng và ấu trùng	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Kích thước trứng (mm)	CD: 2,31 ± 0,062 <sup>a</sup> CR: 1,14 ± 0,055 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,071 <sup>a</sup> 1,19 ± 0,052 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,065 <sup>a</sup> 1,26 ± 0,049 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,067 <sup>a</sup> 3,43 ± 0,031 <sup>bc</sup>	2,28 ± 0,063 <sup>a</sup> 3,48 ± 0,043 <sup>c</sup>
Kích thước ấu trùng (mm)	3,27 ± 0,021 <sup>a</sup>	3,36 ± 0,020 <sup>b</sup>	3,42 ± 0,022 <sup>bc</sup>	3,30 ± 0,028 <sup>a</sup>	3,23 ± 0,037 <sup>a</sup>
Tỷ lệ nở (%)	79,78 ± 1,772 <sup>a</sup>	88,47 ± 0,744 <sup>b</sup>	91,67 ± 0,299 <sup>c</sup>	92,14 ± 0,959 <sup>c</sup>	89,31 ± 0,927 <sup>bc</sup>
Tỷ lệ sống (%)	89,95 ± 0,134 <sup>a</sup>	92,33 ± 0,941 <sup>b</sup>	94,26 ± 0,303 <sup>c</sup>	93,57 ± 1,058 <sup>c</sup>	91,89 ± 1,104 <sup>ab</sup>
Tỷ lệ dị hình (%)	1,55 ± 0,325 <sup>bc</sup>	2,03 ± 0,334 <sup>bc</sup>	0,73 ± 0,184 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,173 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,304 <sup>ab</sup>

*Ghi chú:* Các ký hiệu số mũ khác nhau trên cùng một hàng biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± SE.

Nghiên cứu cũng đã cho thấy kết quả về tỷ lệ nở, tỷ lệ sống và tỷ lệ dị hình có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức bổ sung Asta. Tỷ lệ nở của cá khoang cổ Nemo cao nhất ở nghiệm thức cho ăn Asta 150 mg/kg thức ăn và không sai khác so với nghiệm thức 100 mg/kg thức ăn (lần lượt là 92,1% và 91,6%) ( $p > 0,05$ ) và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (79,7%) ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ sống của ấu trùng cá 3 ngày tuổi cũng cho kết quả tương tự, cao nhất ở hàm lượng bổ sung Asta 100 và 150 mg/kg thức ăn (94,2% và 93,5%) và hao hụt nhiều nhất ở nghiệm thức không bổ sung Asta (89,9%). Chế độ ăn bổ sung hàm lượng Asta 150 mg/kg thức ăn cho thấy tỷ lệ dị hình của ấu

trùng thấp nhất (0,55%) nhưng không sai khác so với nghiệm thức bổ sung Asta 100 mg/kg thức ăn (0,73%) và 200 mg/kg thức ăn (1,19%) ( $p > 0,05$ ) nhưng khác biệt so với hai nghiệm thức còn lại.

Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, kích thước trứng, tỷ lệ nở, tỷ lệ sống và tỷ lệ dị hình của cá khoang cổ Nemo được cải thiện đáng kể ở nghiệm thức bổ sung Asta 150 mg/kg thức ăn ( $p < 0,05$ ) tuy nhiên, không có sự khác biệt về kích thước của trứng cá khoang cổ Nemo ở các chế độ cho ăn khác nhau ( $p > 0,05$ ). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò của việc bổ sung Asta vào thức ăn giúp cải thiện khả năng sinh sản của một số đối tượng

thủy sản [6, 10, 21, 22, 33]. Ở cá vàng *Carassius auratus*, chế độ ăn bổ sung 150 mg Asta/ kg thức ăn (so với 50 và 100 mg) trong 150 ngày cũng đã làm tăng đáng kể đến chất lượng tinh trùng và tỷ lệ thụ tinh của cá [22]. Pangantihon-Kuhlmann et al., (1998), đã nhận thấy sự cải thiện sức sinh sản, phát triển buồng trứng và đẻ trứng của tôm sú giống *Penaeus monodon* khi bổ sung Asta (100 mg/ kg) trong 61 ngày [33]. Bổ sung Asta đã cải thiện tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ sống của cá như cá háo sọc *Pseudocaranx dentex* [6], cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss* [10], cá vược Nhật Bản (*Lateolabrax japonicus*) [21] cũng đã được chứng minh. Ảnh hưởng tích cực này của Asta có thể liên quan đến các chức năng chống oxy hóa của carotenoids [14, 15], hoạt động tiền vitamin A, bảo vệ khỏi tia UV [12, 13] và chống oxy hóa chống lại các tổn thương gốc tự do [14].

Ngoài ra, quan sát màu sắc trứng cá khoang cổ nemo bằng mắt thường mặc dù chỉ mang tính tương đối nhưng cho thấy trứng của cá bố mẹ cho ăn thức ăn có bổ sung Asta có màu vàng cam đậm hơn so với trứng của cá bố mẹ trong chế độ ăn không bổ sung Asta. Cá không có khả năng tự tổng hợp Asta mà lấy chúng từ thức ăn và tích trữ trong thịt, da, gan và các cơ quan sinh sản. Màu sắc ô trứng khác nhau giữa cá bố mẹ cho ăn Asta và không cho ăn Asta cũng được ghi nhận ở cá vược Nhật Bản (*L. japonicus*) [21], cá tráp đỏ *Pagrus major* hay cá cam Nhật Bản *S. quinqueradiata* [6]. Nghiên cứu trên cá hồi cầu vồng *Oncorhynchus mykiss* đã cho thấy mối quan hệ thuận giữa sắc tố trứng và thụ tinh cũng như sự sống sót của trứng cá khi bổ sung carotene trong chế độ ăn cho cá [12]. Các nghiên cứu trên các loài cá hồi (*Salmo trutta* Linn) [34], *Oncorhynchus mykiss* [35] khi tham gia sinh sản đã cho thấy Asta được huy động từ các mô cơ, thịt và gan sang buồng trứng của cá cái, và màu sắc da của con đực. Tương tự sự tạo màu trên da và thịt cá hồi, hàm lượng carotenoid trong trứng cũng cho thấy biểu hiện màu sắc của trứng. Bên cạnh đó, Hoff (1996) đã cho rằng tỷ lệ nở và tỷ lệ sống của ấu trùng cá khoang cổ Nemo có liên quan đến sắc tố trứng cá [19].

## KẾT LUẬN

Sau 13 tháng thử nghiệm ảnh hưởng của Astaxanthin bổ sung vào thức ăn cho cá bố mẹ khoang cổ Nemo đã cho thấy kích thước của trứng, thời gian tái thành thực, tần suất sinh sản, sức sinh sản thực tế cá khoang cổ Nemo không phụ thuộc vào chế độ ăn có bổ sung Astaxanthin nhưng có tác động đến tỷ lệ trứng hao hụt, tỷ lệ nở, kích thước ấu trùng, tỷ lệ sống và tỷ lệ dị hình của ấu trùng. Ngoài ra, qua phân tích số liệu đã xác định mức tối ưu của Astaxanthin bổ sung vào thức ăn cho cá Nemo bố mẹ là 150 mg/kg thức ăn.

**Lời cảm ơn:** Bài báo có sử dụng một số dữ liệu của dự án “Hoàn thiện quy trình và thử nghiệm sản xuất giống và nuôi thương mại cá khoang cổ Nemo (*Amphiprion ocellaris*)” Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST.SXTN.03/17–18) do ThS. Hồ Sơn Lâm làm chủ nhiệm. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí và điều kiện vật chất để hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ha Le Thi Loc, 2010. Research on hatchery technology and growth out culture of Nemo fish (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830) for exportation. Summary report on scientific and technological results of national level KC. 06.07/06-10.2010: 207 p. (in Vietnamese).
- [2] Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., and Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155(1–4), 103–115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00121-X).
- [3] Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J. F., Farndale, B., Carrillo, M., ... and Bromage, N., 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture*, 177(1–4), 85–97. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00071-X).

- [4] Hamre, K., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Norberg, B. and Hamre, K., 2011. Effects of Broodstock Diet on Eggs and Larvae. In: *Larval Fish Nutrition*. GJ Holt (Ed) Wiley-Blackwell, UK, pp. 153–182.
- [5] Izquierdo, M. S., Fernandez-Palacios, H., and Tacon, A. G. J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1–4), 25–42. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00581-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6).
- [6] Watanabe, T., and Vassallo-Agius, R., 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227(1–4), 35–61. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00494-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00494-0).
- [7] Doolan, B. J., Allan, G. L., Booth, M. A., and Jones, P. L., 2008. Effect of carotenoids and background colour on the skin pigmentation of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Research*, 39(13), 1423–1433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02012.x>.
- [8] Ramamoorthy, K., Bhuvaneshwari, S., Sankar, G., and Sakkaravarthi, K., 2010. Proximate composition and carotenoid content of natural carotenoid sources and its colour enhancement on marine ornamental fish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1880). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6), 545–550.
- [9] Salze, G., Tocher, D. R., Roy, W. J., and Robertson, D. A., 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, 36(15), 1488–1499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01367.x>.
- [10] Ahmadi, M. R., Bazayar, A. A., Safi, S., Ytrestøyl, T., and Bjerkeng, B., 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 22(5), 388–394. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00770.x>.
- [11] Díaz-Jiménez, L., Hernández-Vergara, M. P., Pérez-Rostro, C. I., and Ortega-Clemente, L. A., 2019. The effect of astaxanthin and  $\beta$ -carotene inclusion in diets for growth, reproduction and pigmentation of the peppermint shrimp *Lysmata wurdemanni*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(3), 559–567.
- [12] Craik, J. C. A., 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47(1), 61–88. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90008-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90008-0).
- [13] Mikulin, A. E., 2000. Functional role of pigments and pigmentation in fish ontogeny. *VNIRO, Moscow*, 432.
- [14] Edge, R., McGarvey, D. J., and Truscott, T. G., 1997. The carotenoids as antioxidants—a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189–200. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(97\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00092-4).
- [15] Britton, G., Liaen-Jensen, S., and Pfander, H. (Eds.), 2008. Carotenoids, Vol. 4: Natural functions. *Springer Science & Business Media*.
- [16] Yasir, I., and Qin, J. G., 2010. Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(3), 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00373.x>.
- [17] Lam, H. S., Vy, N. T., and Ngoc, P. T., 2016. Effect of dietary astaxanthin on growth, survival rate and pigmentation of commercial clownfish, *Amphiprion ocellaris*. *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 16(3), 321–327. <https://doi.org/10.15625/1859-3097/16/3/7322>.
- [18] Ha Le Thi Loc, Nguyen Kim Bich, Nguyen Thi Thanh Thuy, Nguyen Trung Kien, 2012. Protocol of seed production and growth out culture of nemo fish (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830) for exportation. *Proceedings of the International Conference on “Bien Dong*



- 2012", *Nha Trang*, 12–14 September 2012. pp. 262–268.
- [19] Hoff, F. H., 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. *Aquaculture Consultants, Incorporated*.
- [20] Madhu, R., Madhu, K., and Rethesh, T., 2012. Life history pathways in false clown *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830: A journey from egg to adult under captive condition. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 54(1), 77–90.
- [21] Chou, Y. H., and Chien, Y. H., 2006. Effects of astaxanthin and vitamin E supplement in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) broodstock diet on their spawning performance and egg quality. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 33(2), 157–169. Doi: 10.29822/JFST.200606.0007.
- [22] Tizkar, B., Soudagar, M., Bahmani, M., Hosseini, S. A., and Chamani, M., 2013. The Effects of Dietary Supplementation of Astaxanthin and B-caroten on the Reproductive Performance and Egg Quality of Female Goldfish (*Carassius auratus*). *Caspian J. Env. Sci.*, 11(2), 217–231.
- [23] Hansen, Ø. J., Puvanendran, V., and Bangera, R., 2016. Broodstock diet with water and astaxanthin improve condition and egg output of brood fish and larval survival in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Research*, 47(3), 819–829. <https://doi.org/10.1111/are.12540>.
- [24] Ignatius, B., Rathore, G., Jagadis, I., Kandasamy, D., & Victor, A. C. C. (2001). Spawning and larval rearing technique for tropical clown fish *Amphiprion sebae* under captive condition. *Journal of Agriculture in Tropics*, 16(3), 241–249.
- [25] Madhu, K., Madhu, R., Gopakumar, G., and Sasidharan, C. S., 2006. Breeding, larval rearing and seed production of maroon clown *Premnas biaculeatus* under captive conditions. *Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series*, 190, 1–5.
- [26] Anil, M. K., Santhosh B., Jasmine. S, Reenamole, S., Unnikrishnan, C. and Anukumar, A., 2010. Techniques for mass production of two species of clown fish: Clown anemonefish *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830 and Spinecheek anemonefish *Premnas biaculeatus* (Bloch, 1790). In: Felix, S. (Ed.), *The proceedings of the National Seminar on technology and trade prospects in Ornamental aquaculture, Fisheries Research and Extension Centre, Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Chennai*, pp. 96–102.
- [27] Smith, C., and Reay, P., 1991. Cannibalism in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1(1), 41–64. <https://doi.org/10.1007/BF00042661>.
- [28] Hoelzer, G. (1992). The ecology and evolution of partial-clutch cannibalism by paternal Cortez damselfish. *Oikos*, 65(1), 113–120. Doi: 10.2307/3544893.
- [29] Kraak, S. B., 1996. Female preference and filial cannibalism in *Aidablennius sphyinx* (Teleostei, Blenniidae); a combined field and laboratory study. *Behavioural Processes*, 36(1), 85–97. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(95\)00019-4](https://doi.org/10.1016/0376-6357(95)00019-4).
- [30] Kvarnemo, C., Svensson, O. L. A., and Forsgren, E., 1998. Parental behaviour in relation to food availability in the common goby. *Animal Behaviour*, 56(5), 1285–1290. <https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0899>.
- [31] Lindström, K., and Sargent, R. C., 1997. Food access, brood size and filial cannibalism in the fantail darter, *Etheostoma flabellare*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 40(2), 107–110. <https://doi.org/10.1007/s002650050322>.
- [32] Belles-Isles, J. C., and FitzGerald, G. J., 1991. Filial cannibalism in sticklebacks: a reproductive management strategy?. *Ethology Ecology & Evolution*, 3(1), 49–62. <https://doi.org/10.1080/08927014.1991.9525388>.
- [33] Pangantihon-Kühlmann, M. P., Millamena, O., and Chern, Y., 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin

- A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquatic Living Resources*, 11(6), 403–409. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)80006-0](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80006-0).
- [34] Steven, D. M., 1949. Studies on animal carotenoids: II. Carotenoids in the reproductive cycle of the brown trout. *Journal of experimental Biology*, 26(3), 295–303.
- [35] Bjerkeng, B., Storebakken, T., and Liaaen-Jensen, S., 1992. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. *Aquaculture*, 108(3-4), 333–346. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90117-4).