



DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.080

NHỮNG THÀNH TỰU TRONG NGHIÊN CỨU CHUYỂN GIỚI TÍNH TÔM CÀNG XANH (*Macrobrachium rosenbergii* DE MAN, 1879)

Dương Thúy Yên¹, Bùi Thị Liên Hà², Trần Ngọc Hải¹ và Nguyễn Thanh Phương¹

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 10/02/2017

Ngày nhận bài sửa: 05/04/2017

Ngày duyệt đăng: 30/08/2017

Title:

Achievements in research on sex reversal of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879)

Từ khóa:

Biệt hóa giới tính, chuyển giới tính, *Macrobrachium rosenbergii*, tôm càng xanh

Keywords:

Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, sex determination, sex reversal

ABSTRACT

This review synthesized studies on sex determination, scientific basis, approaches, and achievements in sex reversal of giant freshwater prawn (GFP) (*Macrobrachium rosenbergii*) around the world. GFP has a ZW sex determination system, where sex chromosomes are homozygous (ZZ) in males and heterozygous (ZW) in females. Sex differentiation of this species is controlled by protein-like hormone of the androgen gland. Males whose androgen gland is ablated (andrectomy) or in-activated by using RNA interference (RNAi) will develop to neo-females. Mating of these neo-females with normal males produces monosex males. These approaches have been applied successfully in commercial farming of GFP. However, the use of artificial hormone such as 17 α -methyltestosterol was not successful in sex reversal of GFP.

TÓM TẮT

Bài viết này tổng hợp những kết quả nghiên cứu về cơ chế xác định giới tính, cơ sở khoa học, phương pháp và thành tựu trong việc chuyển giới tính tôm càng xanh trên thế giới. Tôm càng xanh có cơ chế xác định giới tính là ZW, trong đó con đực đồng hợp (ZZ) và con cái dị hợp (ZW) ở cặp nhiễm sắc thể giới tính. Sự biệt hóa giới tính của tôm càng xanh được điều khiển bởi hormon có bản chất protein của tuyến androgen. Con đực khi bị cắt bỏ tuyến androgen (phương pháp vi phẫu) hay bất hoạt tuyến này bằng phương pháp RNA can thiệp (RNAi) sẽ chuyển thành con cái giả. Sinh sản giữa những con cái giả với con đực bình thường sẽ sinh ra đàn tôm toàn đực. Các phương pháp trên đã và đang được áp dụng thành công trong nuôi thương phẩm. Tuy nhiên, phương pháp chuyển giới tính tôm càng thành bằng hormon nhân tạo như 17 α -methyltestosterol thì không thành công.

Trích dẫn: Dương Thúy Yên, Bùi Thị Liên Hà, Trần Ngọc Hải và Nguyễn Thanh Phương, 2017. Những thành tựu trong nghiên cứu chuyển giới tính tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 51b: 64-71.

1 GIỚI THIỆU

Tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii* de Man, 1879) là loài có kích thước lớn nhất trong giống *Macrobrachium* và là đối tượng nuôi quan trọng ở nhiều nước trên thế giới (New and Nair, 2012). Tôm đực có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn

và kích thước tối đa lớn hơn so với tôm cái, tôm đực có thể đạt chiều dài tối đa 32 cm, trong khi con cái đạt 25 cm (FAO, 2016). Ngoài ra, tôm đực thể hiện tăng trưởng không đồng đều giữa các cá thể trong cùng một điều kiện nuôi, trong đó, cá thể có càng màu xanh tăng trưởng nhanh nhất, tiếp theo là cá thể có càng màu cam và chậm nhất là những con

tôm đực nhỏ (FAO, 2016). Nuôi chung tôm đực với tôm cái dẫn đến sự sai khác lớn về kích cỡ trong cùng một đàn, tỉ lệ sống giảm do tôm lớn ăn tôm nhỏ và năng suất không cao (Ohs *et al.*, 2006b). Vì vậy, để nâng cao năng suất tôm nuôi, nhiều nghiên cứu đã chú ý đến vấn đề chuyển giới tính tôm càng xanh theo hướng sản xuất ra tôm toàn đực. Hiện nay, một số phương pháp sản xuất tôm toàn đực như phương pháp vi phẫu, phương pháp RNA can thiệp đã thành công và được ứng dụng vào sản xuất ở một số nước trên thế giới. Bài tổng quan này nhằm cung cấp cơ sở khoa học của các phương pháp chuyển giới tính và những thành tựu trên thế giới cũng như ở Việt Nam về lĩnh vực này.

2 NỘI DUNG

2.1 Cơ chế xác định giới tính và sự biệt hóa giới tính của tôm càng xanh

Thông tin về cơ chế xác định giới tính và cơ chế biệt hóa giới tính của các loài thủy sản là những cơ sở khoa học quan trọng để từ đó con người có thể tác động làm thay đổi kiểu hình giới tính của đối tượng theo hướng có lợi cho người sản xuất.

2.1.1 Cơ chế xác định giới tính của tôm càng xanh

Cơ chế xác định giới tính của tôm càng xanh được nghiên cứu đầu tiên của Malecha *et al.* (1992). Nhóm nghiên cứu này cho phối giữa tôm cái thường với tôm đực giả (con cái được chuyển giới tính thành con đực bằng cách cấy tuyến đực (tuyến androgen) từ tôm đực trưởng thành vào con cái ở giai đoạn tôm bột 30 ngày tuổi hay PL₃₀) cho kết quả ở thế hệ đàn con F₁ có tỉ lệ đực:cái là 1:3,2 (tương đương với tỉ lệ 1:3 khi 2 cá thể bố mẹ đều dị hợp). Tiếp tục cho 6 cặp F₁ sinh sản với nhau thu được tỉ lệ đực:cái tích lũy ở thế hệ F₂ là 1:3,4. Qua kết quả đạt được nhóm tác giả đưa ra giả thuyết rằng cơ chế xác định giới tính của tôm càng xanh là cơ chế ZW, trong đó, cặp nhiễm sắc thể giới tính ở con cái là dị hợp ZW và con đực là đồng hợp ZZ. Gần đây, nghiên cứu dựa trên chỉ thị phân tử (AFLP) đã chứng minh giả thuyết trên là đúng (Jiang and Qiu, 2013).

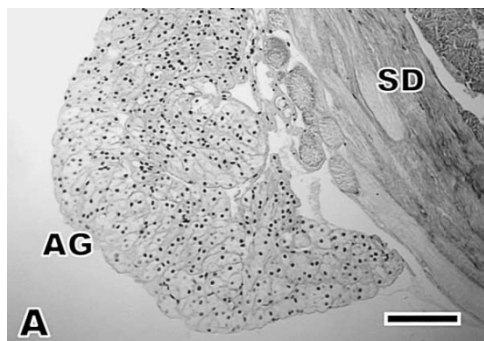
2.1.2 Cơ chế xác định giới tính của tôm càng xanh và vai trò của tuyến androgen

Mặc dù giới tính của tôm càng xanh do nhiễm sắc thể giới tính qui định nhưng tôm biệt hóa giới tính (sự khác biệt giữa con đực và cái) là do sự điều khiển của hormon tiết ra từ tuyến đực (tuyến androgen). Tuyến đực ở tôm càng xanh và một số loài giáp xác khác nằm cạnh phần cuối của ống dẫn tinh và gần với ống dẫn tinh (Hình 1). Vai trò điều

khiển sự biệt hóa giới tính ở tôm càng xanh đã được chứng minh trong một số nghiên cứu (Nagamine *et al.*, 1980a, 1980b; Sagi & cohen, 1990; Malecha *et al.*, 1992). Trong nghiên cứu của Malecha *et al.* (1992), khi cấy tuyến đực vào tôm cái có chiều dài giáp đầu ngực từ 8,0-10,3 mm, buồng trứng của con cái phát triển không bình thường và sinh sản không thành công. Khi con cái có kích cỡ nhỏ hơn, chiều dài giáp đầu ngực từ 6,5-7,2 mm (tương đương giai đoạn PL₃₀) thì cấy tuyến đực vào con cái dẫn đến sự chuyển đổi giới tính hoàn toàn, tạo ra con đực giả có khả năng sinh sản. Sagi and Cohen (1990) đã làm thí nghiệm ngược lại, chuyển tôm đực thành tôm cái bằng cách cắt bỏ tuyến đực của tôm đực có khối lượng trung bình 0,96 g; kết quả có 84% (n=25) tôm cái “giả” thành thực; trong đó có 44% con cái sinh sản bình thường và không khác biệt với tôm cái bình thường. Tuy nhiên, tăng trưởng của tôm bị cắt tuyến đực chỉ bằng 50% so với tôm không bị cắt. Kết quả ghi nhận được cho thấy tuyến đực còn tham gia điều khiển sự sinh trưởng của tôm càng xanh đực. Hai thí nghiệm trên cho thấy kích cỡ (hay ngày tuổi) tôm đực khi cắt tuyến đực lớn hơn so với cỡ tôm cái khi cấy tuyến đực để thay đổi giới tính. Nói cách khác là thời điểm biệt hóa giới tính ở tôm đực chậm hơn so với tôm cái. Các nhà khoa học cho rằng, ở tôm càng xanh cũng như các loài giáp xác khác thuộc lớp chân khớp, con đực và con cái khi chưa biệt hóa giới tính đều mang gen quyết định kiểu hình con cái (Malecha *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1999). Ở giai đoạn biệt hóa giới tính, hormon của tuyến đực tiết ra sẽ kích thích quá trình phát triển các đặc điểm sinh dục sơ cấp (tuyến sinh dục) và thứ cấp (nhánh phụ đực, gờ, kích cỡ...) của tôm đực. Tôm cái bình thường không có tuyến đực, mà có những peptid giống với GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) được tìm thấy ở hệ thần kinh trung tâm (central nervous system, CNS) và trong buồng trứng (Ngernsoungern *et al.*, 2008). Trong trường hợp con đực bị cắt hoặc bất hoạt tuyến đực, gen qui định kiểu hình con cái sẽ phát huy vai trò và khi đó tôm sẽ phát triển thành con cái (Malecha *et al.*, 1992; Ohs *et al.*, 2006b).

Ngoài vai trò quyết định sự hình thành các đặc điểm sinh dục đực, hormon tuyến đực còn ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, tạo nên sự khác biệt về hình thái giữa ba loại kiểu hình càng của tôm đực: tôm càng xanh nhỏ, tôm càng lửa và tôm càng xanh. Nghiên cứu của Okumura and Hara (Okumura and Hara, 2004) cho thấy trong cùng một ao nuôi giữa 3 loại hình tôm đực thì tôm càng xanh có kích cỡ lớn nhất, hệ số thành thực cao nhất (Bảng 1), kích thước tuyến đực cũng lớn nhất và hoạt động mạnh nhất; ngược lại, các chỉ tiêu trên nhỏ nhất ở tôm càng nhỏ. Ngoài ra, tuyến đực còn

có vai trò trong điều khiển hoạt động, tập tính sinh sản của con đực (Barki *et al.*, 2003; Okumura and Hara, 2004).



Hình 1: Tuyến đực (androgen - AG) nằm cạnh ống dẫn tinh (SD) ở tôm càng xanh (Okumura and Hara, 2004)

Khi quan sát mô học buồng tinh của tôm đực, Okumura and Hara (2004) nhận thấy hoạt động sinh tinh có liên quan đến quá trình lột xác của tôm đực, số lượng các tiền tinh trùng tăng nhanh ở giai đoạn trước khi lột xác và trở thành các tinh trùng sau khi lột xác. Trong khi đó, hoạt động của tuyến đực không thay đổi theo quá trình lột xác. Hoạt động sinh tinh xảy ra mạnh ở tôm càng xanh nhỏ và tôm càng lửa, trong khi ở tôm càng xanh buồng tinh đã chứa đầy những tinh trùng thành thực. Như vậy, ở tôm càng xanh cũng như các loài giáp xác khác, chức năng sản sinh tinh trùng và chức năng

nội tiết do 2 cơ quan khác nhau đảm nhiệm là chức năng sản sinh tinh trùng do buồng tinh và chức năng nội tiết do tuyến đực. Khác với giáp xác, ở cá và động vật có xương sống, hai chức năng này đều do 2 loại tế bào có trong buồng tinh đảm nhận.

Vai trò của tuyến đực đối với sự biệt hóa giới tính ở một số loài giáp xác đã được biết từ lâu (từ những năm 1950, trích bởi Ventura *et al.*, 2011), nhưng phải qua nhiều năm nghiên cứu và tranh luận các nhà nghiên cứu mới đi đến thống nhất về bản chất của hormon của tuyến này. Hormon tuyến đực được cho là mang bản chất protein hay chuỗi polypeptide, khác với cá, hormon sinh dục đực mang bản chất là steroid. Bản chất protein của hormon tuyến đực ban đầu được King (1964) đề xuất (trích bởi Subramoniam, 2016) và sau đó được chứng minh qua một số nghiên cứu (Okumura and Hara, 2004; Ventura *et al.*, 2009, 2011b). Cấu trúc peptide của hormon tuyến đực ở tôm càng xanh và các loài giáp xác khác giống với cấu trúc của nhóm insulin nên được gọi “insulin-like androgenic gland” (IAG) và ở tôm càng xanh, được ký hiệu là Mr-IAG (*M. rosenbergii* insulin-like AG). Gen Mr-IAG đã được giải trình tự (số truy cập ngân gen gen, GENBANK, là FJ409645) và tương tự như IAG của một số loài giáp xác khác (Ventura *et al.*, 2009). Tìm ra trình tự của gen IAG có ý nghĩa quan trọng trong việc tác động lên tuyến đực với mục đích chuyển đổi giới tính tôm càng xanh.

Bảng 1: Kích cỡ và hệ số thành thực (GSI) của 3 kiểu hình tôm đực (Okumura and Hara, 2004)

Kiểu hình tôm càng xanh đực	Số mẫu	Khối lượng thân (g)	Dài giáp đầu ngực (cm)	GSI*
Càng xanh	40	70,2±21,3	52,0±5,5	0,49±0,12
Càng lửa	46	56,5±17,3	50,3±5,3	0,24±0,08
Tôm nhỏ	32	14,7±3,90	32,0±2,8	0,18±0,11

Ghi chú: (*) $GSI = 100 \times \text{túi và ống tinh} / \text{khối lượng cơ thể}$

2.1.3 Chỉ thị DNA phân biệt giới tính ở tôm càng xanh

Tôm càng xanh có thể phân biệt được giới tính dựa vào những đặc điểm như đối với tôm đực có nhánh phụ đực (ở chân bụng thứ hai) và gờ (hay nhú lồi sinh dục đực) ở gốc chân ngực thứ 5. Tuy nhiên, những đặc điểm này chỉ hình thành ở giai đoạn hậu ấu trùng (PL) từ PL30-45 (Nguyễn Thanh Phương và *ctv.*, 2003). Ở giai đoạn sớm hơn khó có thể phân biệt được con đực và con cái. Vì vậy, việc tìm ra chỉ thị phân tử sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn quan trọng. Ventura *et al.* (2011a) đã thành công trong việc tìm ra chỉ thị DNA đặc trưng cho tôm cái. Sử dụng kỹ thuật AFLP (Amplified fragment length polymorphism) và giải trình tự, nhóm nghiên cứu đã tìm ra vùng gen liên quan đến giới tính. Vùng gen này có độ dài 3000 bp (basepair, cặp bazơ) và có sự khác biệt giữa tôm

đực và tôm cái là 3 bp có ở tôm cái nhưng không có ở tôm đực và 2 vị trí nucleotide khác đa hình ở con cái nhưng đơn hình ở tôm đực. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng trong nghề nuôi tôm càng xanh, nhờ đó, có thể xác định giới tính của từng cá thể tôm ở giai đoạn sớm như ở giai đoạn ấu trùng (Ventura *et al.*, 2012).

2.2 Chuyển giới tính tôm càng xanh theo hướng toàn đực

Chuyển đổi giới tính tôm càng xanh được nghĩ đến từ lâu, xuất phát từ sự khác biệt giữa tôm đực và tôm cái về tốc độ tăng trưởng và kích cỡ tối đa. Những năm 1980, một số nghiên cứu đã chứng minh nuôi tôm càng xanh toàn đực cho năng suất cao và thời gian ngắn hơn so với nuôi tôm toàn cái hoặc nuôi chung đực và cái (Sagi *et al.*, 1986; Siddiqui *et al.*, 1997). Gần đây, một nghiên cứu khác ở Ấn Độ cũng khẳng định kết quả trên, hiệu

quả kinh tế của 3 mô hình nuôi tôm càng xanh toàn đực (qui mô 4.000 m²/ao) cao hơn mô hình nuôi toàn cái và nuôi chung tương ứng là 60,2% và 63,1% (Nair *et al.*, 2006). Vì vậy, nhiều nhà khoa học đã tìm những phương pháp để tạo nên đàn tôm toàn đực, phục vụ nghề nuôi.

Các phương pháp chuyển giới tính tôm càng xanh đực được chia làm 2 nhóm chính là nhóm dùng hormone bên ngoài và nhóm tác động lên tuyến đực để tạo tôm cái giả.

2.2.1 Phương pháp dùng hormone để chuyển giới tính tôm càng xanh đực

Hormone nhân tạo dùng trong chuyển giới tính đực đối với nhiều loài cá là 17 α -methyltestosterol (17MT). Hormone này cũng được thử nghiệm trên tôm càng xanh bằng phương pháp cho ăn.

Thí nghiệm ban đầu được thực hiện bởi Baghel *et al.* (2004). Hormone 17MT được giàu hóa trong ấu trùng *Artemia* trước khi cho tôm ăn; ấu trùng *Artemia* (sau 24 giờ ấp) được giàu hóa bằng cách ngâm với 17MT ở các nồng độ khác nhau (0, 5, 15, 30, 50 và 100 mg/L) trong 24 giờ. Hormone được hòa tan trong 90% ethanol trước khi pha vào nước để giàu hóa *Artemia*. Ấu trùng tôm 5 ngày tuổi được cho ăn *Artemia* giàu hóa trong 50 ngày. Sau đó, tôm được cho ăn thức ăn viên công nghiệp 40% đạm, không chứa hormone và nuôi đến 120 ngày, cho đến khi tôm có thể phân biệt giới tính dựa nhánh phụ đực. Kết quả cho thấy ảnh hưởng của 17MT đến chuyển đổi giới tính không rõ ràng, tỉ lệ đực và cái cao ở nghiệm thức 30 và 100 mg/L nhưng lại rất thấp ở 50 mg/L và không thay đổi so với đối chứng ở nghiệm thức 5 và 15 mg/L. Tuy nhiên, tỉ lệ sống của tôm ở những nghiệm thức cho ăn hormone thấp hơn so với đối chứng (Bảng 2).

Trong một nghiên cứu khác, Ohs *et al.* (2006a) trộn 17MT vào thức ăn với 5 liều lượng (0, 100,

200 và 400 mg/kg) và cho ăn với khoảng thời gian (20, 40 và 60 ngày) khác nhau kể từ PL₃. Sau thời gian cho ăn thức ăn chứa hormone theo từng nghiệm thức thì tôm được cho ăn thức ăn như ở nghiệm thức đối chứng (thức ăn viên công nghiệp chứa 55% đạm và 15% lipid) đến 120 ngày. Kết quả cho thấy liều lượng và thời gian cho ăn hormone 17MT không làm thay đổi tỉ lệ giới tính và không ảnh hưởng đến tăng trưởng cũng như tỉ lệ sống của tôm (Bảng 3). Tác giả cho rằng, tỉ lệ tôm đực ở những nghiệm thức cho ăn hormone không tăng (so với đối chứng) có thể do thời gian cho ăn hormone đã sau giai đoạn tôm bắt đầu biệt hóa giới tính và do nồng độ hormone chưa đủ cao.

Bảng 2: Tỉ lệ giới tính và tỉ lệ sống của tôm đực cho ăn Artemia giàu hóa 17MT với liều lượng khác nhau (Baghel *et al.*, 2004)

Nồng độ hormone (mg/L)	Số tôm kiểm tra	Tỉ lệ	
		đực:cái	Tỉ lệ sống
0	536	0,41	67,0 ± 0,45
5	330	0,49	41,3 ± 0,50
15	453	0,48	56,7 ± 0,44
30	396	0,92	49,6 ± 1,37
50	340	0,69	42,5 ± 1,93
100	328	0,93	41,1 ± 0,74

Tuy nhiên, kết quả của 2 nghiên cứu đều cho thấy phương pháp dùng hormone 17MT đều không đạt kết quả chuyển đổi giới tính toàn đực, như đã thành công trên một số loài cá. Nguyên nhân không thành công khi dùng 17MT trên tôm càng xanh có thể do bản chất hormone tự nhiên của tôm (AG, protein) và hormone nhân tạo (steroid) đưa vào khác nhau. Vì vậy, các nhà nghiên cứu nghĩ đến một số phương pháp khác, đặc biệt là những phương pháp tác động lên tuyến đực để tạo tôm cái giả và sau đó cho sinh sản với tôm đực thường.

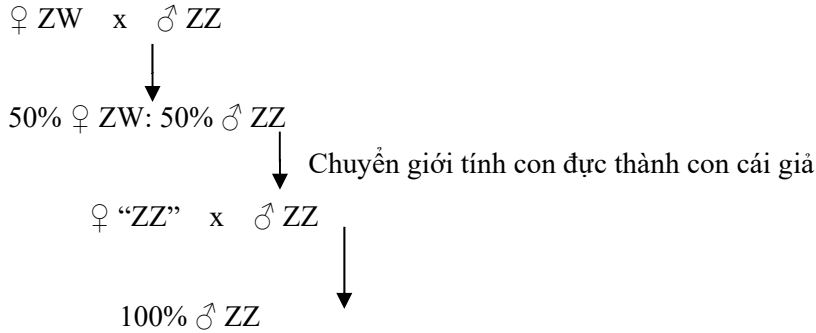
Bảng 3: Tỉ lệ giới tính, tỉ lệ sống và khối lượng ban đầu của tôm đực cho ăn 17MT với liều lượng và thời gian sử dụng khác nhau hóa 17MT với liều lượng khác nhau (Ohs *et al.*, 2006a)

Liều lượng/thời gian sử dụng hormone	Khối lượng tôm giống (g)	Tỉ lệ đực: cái	Tỉ lệ sống (%)
100/20	1,12 ± 0,05	0,87 ± 0,03	35,1 ± 8,8
100/40	1,22 ± 0,10	0,87 ± 0,17	12,4 ± 6,3
100/60	1,09 ± 0,11	1,04 ± 0,19	21,8 ± 16,0
200/20	1,22 ± 0,07	0,95 ± 0,05	26,4 ± 9,5
200/40	1,19 ± 0,06	1,07 ± 0,11	23,4 ± 1,1
200/60	1,14 ± 0,04	0,89 ± 0,12	39,1 ± 5,2
400/20	1,05 ± 0,03	1,23 ± 0,17	45,5 ± 1,7
400/40	1,12 ± 0,04	1,40 ± 0,16	31,7 ± 5,2
400/60	1,08 ± 0,05	1,32 ± 0,40	26,4 ± 13,8
0/0	1,06 ± 0,03	1,11 ± 0,12	43,4 ± 7,6

Liều lượng: mg MT/kg thức ăn; thời gian: số ngày cho ăn hormone, từ PL₃

2.2.2 Chuyển giới tính tôm càng xanh đực bằng các phương pháp tác động lên tuyến đực

Cơ sở của các phương pháp này là dựa vào cơ chế xác định giới tính và cơ chế biệt hóa giới tính của tôm càng xanh. Theo cơ chế xác định giới tính của tôm càng xanh (cơ chế ZW), để có đàn tôm con toàn đực ZZ thì con đực và con cái sinh sản với nhau phải có cùng kiểu gen giới tính ZZ. Tuy nhiên, con cái bình thường mang kiểu gen ZW, do



Hình 2: Sơ đồ tạo đàn tôm toàn đực

a. Phương pháp vi phẫu

Phương pháp vi phẫu là kỹ thuật cắt tuyến đực của tôm đực ở giai đoạn trước khi tôm biệt hóa giới tính. Khi tôm đực không nhận được hormon tuyến đực thì tuyến sinh dục của tôm sẽ phát triển theo hướng của con cái và hình thành buồng trứng.

Kỹ thuật vi phẫu đã được Sagi and Cohen (1990) thực hiện thành công ban đầu ở Israel và sau đó được thực hiện ở một số nước trên thế giới như Ấn Độ (Aflalo *et al.*, 2012), Thái Lan (Rungsin *et al.*, 2006), Việt Nam (Nguyễn Nhứt và *ctv.*, 2009; Sagi, 2013).

Ở Thái Lan, Rungsin *et al.* (2006) báo cáo kết quả vi phẫu 87 tôm đực giai đoạn PL₄₅, tỉ lệ sống của tôm là 80,4%, trong đó có 30,0% phát triển thành con cái với 27,1% tôm cái thành thực. Trong 12 con cái "giả" được cho sinh sản với tôm đực bình thường, có 8 cặp cho kết quả đàn con 100% đực, 2 cặp có tỉ lệ đực 88,0- 99,5%, 2 cặp khác có tỉ lệ đực:cái 1:1, chứng tỏ 2 con cái này đã bị xác định sai giới tính từ ban đầu. Nghiên cứu này cũng cho biết sức sinh sản của tôm cái giả tương đương với tôm cái bình thường.

Từ năm 2004, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2 đã áp dụng kỹ thuật vi phẫu và đạt được những thành công nhất định. Sau đó, dự án sản xuất thử nghiệm kỹ thuật này được thực hiện trong 3 năm (2006-2008). Kết quả vi phẫu được khoảng 77.000 cá thể PL₃₀, tỉ lệ sống của tôm sau một tháng cắt bỏ tuyến đực đạt 55,2±2,8% (~ 25.000 cá thể), tỉ lệ chuyển giới tính là 55,2±11,5%, trong đó 100% con cái thành thực và đạt tỉ lệ tham gia sinh

đó trước hết, cần phải tạo tôm cái giả (bản chất là tôm đực, có cặp nhiễm sắc thể giới tính ZZ), tiếp đó cho tôm cái giả "ZZ" phối với tôm đực bình thường ZZ (Hình 2). Theo cơ chế biệt hóa giới tính của tôm càng xanh có thể tạo tôm cái giả "ZZ" bằng một số phương pháp tác động lên tuyến đực. Hai xu hướng tác động lên tuyến đực gồm vi phẫu loại bỏ tuyến đực và bất hoạt tuyến đực bằng phương pháp sinh học phân tử.

sản từ 50 – 70% sau 6 tháng nuôi (Nguyễn Nhứt và *ctv.*, 2009). Để nâng cao tỉ lệ sống của tôm sau khi vi phẫu, tôm được cho ăn thức ăn có bổ sung Vitamin C (2 g/kg thức ăn) và HUFA (2 mL/kg thức ăn), tỉ lệ sống của tôm 30 ngày sau vi phẫu được cải thiện đáng kể, đạt 77,7±6,4% so với đối chứng là 55,2% (Nguyễn Thị Thu Thủy và *ctv.*, 2009).

Những hạn chế của phương pháp vi phẫu

Phương pháp vi phẫu tốn nhiều thời gian và đòi hỏi nhiều lao động có trình độ tay nghề cao trong tất cả các khâu của qui trình sản xuất, từ giai đoạn ương nuôi tiền vi phẫu, giai đoạn vi phẫu, hậu vi phẫu và giai đoạn nuôi vỗ. Đặc biệt, tỉ lệ thành công của phương pháp này phụ thuộc lớn vào tay nghề của kỹ thuật viên vi phẫu. Hơn nữa, do nhiều yếu tố bên ngoài (môi trường, bệnh...) và bên trong (tôm ăn nhau) ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của tôm trong suốt quá trình nuôi nên số lượng tôm cái giả thành thực ít, tỉ lệ tôm cái giả thành thực thường đạt 17-34% so với số lượng tôm đực vi phẫu (Aflalo *et al.*, 2006, Aflalo *et al.*, 2012; Bùi thị Liên Hà, 2014).

Ngoài ra, khó khăn lớn trong phương pháp vi phẫu là khó xác định giới tính ở giai đoạn sớm nên làm giảm tỉ lệ thành công trong tạo con cái giả (Aflalo *et al.*, 2006; Rungsin *et al.*, 2006). Khó khăn này có thể được khắc phục bằng cách dùng chỉ thị DNA nhận diện con cái (Ventura *et al.*, 2011a) hoặc dùng qui trình 2 bước gồm bước 1 là tạo tôm cái giả (với số lượng ít) và cho sinh sản với tôm đực và bước 2 là vi phẫu đàn con (được giả

định là toàn đực) ở giai đoạn PL₂₀ đến PL₃₀ với số lượng lớn phục vụ sản xuất (Aflalo *et al.*, 2006).

b. Vô hiệu hóa gen IAG bằng phương pháp RNA can thiệp (RNAi)

Cơ sở khoa học

Cơ sở khoa học của phương pháp RNA can thiệp là dựa trên trình tự gen Mr-IAG và cơ chế gây bất hoạt gen này bằng sự can thiệp của RNA (RNA interference, RNAi). Gen IAG điều khiển hoạt động của tuyến AG để tiết ra hormone Mr-IAG, từ đó quyết định đến sự phát triển của đặc điểm sinh dục sơ cấp và thứ cấp ở tôm càng xanh đực. Từ trình tự gen IAG có thể tổng hợp được sợi đôi RNA (ds-RNA) của gen này. Sau đó, ds-RNA của gen Mr-IAG được tiêm vào cơ thể tôm để vô hiệu hóa gen Mr-IAG (Ventura *et al.*, 2009). Khi không có hormone AG được tiết ra thì sự hình thành đặc điểm sinh dục thứ cấp bị ức chế.

Cơ chế vô hiệu hóa gen Mr-IAG theo trình tự ds-RNA sau khi được tiêm vào tế bào chất sẽ bị cắt (do enzyme Dicer) thành những sợi đôi ngắn hơn (small interfering RNA, siRNA) có chiều dài khoảng 21-25 bp; tiếp đó siRNA tách làm 2 sợi đơn gồm 1 sợi bị phân hủy và sợi còn lại (gọi là sợi dẫn) bám vào phức hợp RISC (RNA-induced silencing complex). Sợi dẫn sẽ bắt cặp với RNA thông tin của gen Mr-IAG (mRNA, sản sinh từ quá trình phiên mã gen Mr-IAG) làm cho mRNA không thể dịch mã thành protein, đó là hormone tuyến đực (Ventura *et al.*, 2009).

Những nghiên cứu áp dụng phương pháp RNAi trên tôm càng xanh

Phương pháp RNAi được thực hiện ban đầu trên tôm càng xanh bởi Ventura *et al.* (2009) ở Israel. Trước hết, gen Mr-IAG được giải trình tự gen, từ đó sợi đôi RNA (ds-RNA) của gen này được tổng hợp và được tiêm vào tôm ở 130-140 ngày tuổi. Tôm đực được tiêm 2 tuần mỗi lần trong tổng số 12 lần với lượng 5 µg ds-RNA/g tôm. Trước khi thí nghiệm, tôm đực được loại bỏ một chân bụng thứ hai (có nhánh phụ đực). Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về thời gian lột xác, tăng trưởng và sự tái xuất hiện của nhánh phụ đực giữa 2 nhóm tôm tiêm và không tiêm ds-RNA (đối chứng). Thí nghiệm tương tự được lặp lại nhưng với khoảng cách 2 lần tiêm ngắn và số lần tiêm nhiều hơn, 1 tuần tiêm 3 lần trong tổng số 22 lần (trong 55 ngày) trên cỡ tôm nhỏ hơn, PL₇₀₋₈₀. Kết quả cho thấy, nhóm tôm tiêm ds-RNA (n=18 con) có chu kỳ lột xác và tăng trưởng chậm hơn so với nhóm đối chứng. Trong đó, 16 cá thể (88,9%) tiêm ds-RNA không tái xuất hiện nhánh phụ đực và không có tinh trùng trong ống dẫn tinh. Ở nhóm

đối chứng, tất cả tôm đực (n=18) đều xuất hiện nhánh phụ đực ở ngày 44 và có tinh trùng trong ống dẫn tinh. Bốn tuần sau khi kết thúc thời gian tiêm ds-RNA, tất cả tôm đực (tiêm và không tiêm ds-RNA) đều xuất hiện lại nhánh phụ đực. Thí nghiệm trên chứng tỏ việc bất hoạt tạm thời gen Mr-IAG đã ức chế sự hình thành đặc điểm sinh dục phụ, ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sự hình thành tinh trùng ở tôm đực.

Nghiên cứu tiếp theo của Ventura *et al.* (2012) nhằm tìm ra liều lượng và thời gian tiêm ds-RNA. Nhóm nghiên cứu cho biết, tiêm ds-RNA 2 lần/tuần với liều lượng từ 1- 5 µg ds-RNA/g tôm, bắt đầu từ giai đoạn PL₂₀ cho kết quả chuyển đổi giới tính hoàn toàn từ tôm đực thành tôm cái giả (Ventura *et al.*, 2012). Thời gian mang trứng, thời gian phát triển của ấu trùng tôm cái giả không khác biệt so với tôm cái đối chứng. Kiểm tra giới tính của ấu trùng zoea (bằng chỉ thị DNA đặc trưng theo giới tính) đàn con của tôm cái giả với tôm đực bình thường cho kết quả 100% tôm đực, chứng tỏ sự thành công của phương pháp RNAi trong chuyển đổi giới tính tôm càng xanh (Ventura *et al.*, 2012).

Phương pháp RNAi mở ra triển vọng có thể phát triển đàn tôm càng xanh toàn đực phục vụ nghề nuôi ở qui mô lớn. Song, một số câu hỏi về mức độ an toàn của phương pháp này khi áp dụng trong nuôi thủy sản cũng được đặt ra đó là sự lo ngại (i) RNAi có được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác hay không; (ii) thời gian và mức độ ảnh hưởng của RNAi như thế nào; và (iii) chức năng sinh sản của tôm cái giả và đàn con đực sinh ra (từ tôm cái giả và tôm đực bình thường) có phát triển bình thường không. Các vấn đề trên đã được Lezer *et al.* (2015) giải đáp. Sử dụng các phương pháp đo với độ chính xác rất cao như khuếch đại thời gian thật (Realtime-PCR hay RT-PCR), định lượng RT-PCR và phương pháp “dot blot”, nhóm nghiên cứu đã đo sự có mặt của dsRNA từ bên ngoài đưa vào trong tế bào tôm. Kết quả cho thấy dsRNA lạ trong cơ thể tôm bị loại hoàn toàn sau 7 ngày. Khi tiêm dsRNA của gen Mr-IAG vào tôm, gen này chỉ bị vô hiệu hóa tạm thời. Gen sẽ phục hồi chức năng đến 82% sau 28 ngày. Tôm cái giả có khối lượng và sức sinh sản khác biệt không có ý nghĩa so với tôm cái bình thường, tương tự như kết quả nghiên cứu trước đó (Rungsin *et al.*, 2006). Các tôm toàn đực phát triển bình thường, tỉ lệ các kiểu hình hình thái (tôm càng xanh, càng lửa, tôm nhỏ và không có càng) tương tự như đàn tôm nuôi chung đực và cái. Sự ảnh hưởng ức chế gen của dsRNA chỉ là tạm thời và thời gian tính từ thời điểm xử lý RNAi (ở thế hệ thứ nhất) đến khi thu hoạch đàn tôm toàn đực (ở thế hệ thứ 2) phải trải

qua 19 tháng, do đó sẽ không có ảnh hưởng của RNAi đến sản phẩm tôm thu hoạch (Lezer *et al.*, 2015).

Kết quả nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật RNAi ở Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2 đã bước đầu thành công trong việc tạo tôm cái giả bằng phương pháp RNAi. Liều lượng tiêm là 5 µg ds-RNA/g tôm. Tôm được tiêm với các chu kỳ tiêm và thời gian tiêm khác nhau. Kết quả cho thấy tiêm với chu kỳ 1 lần /tuần và trong 3 tháng cho tỉ lệ chuyển giới tính cao (~90%), khác biệt không có ý nghĩa so với chu kỳ ngắn hơn (2-3 lần/tuần). Qua các thí nghiệm kiểm tra thì nhóm nghiên cứu nhận thấy thời gian tiêm ds-RNA tốt nhất là ở giai đoạn PL₁₀₋₂₅ và kéo dài đến khi tôm cái thành thực. Nếu ngưng tiêm ds-RNA sớm trước khi tôm thành thực thì việc chuyển giới tính tôm cái giả sẽ không hoàn toàn, tôm có thể trở lại thành tôm đực hoặc có những biểu hiện bất thường (Bùi Thị Liên Hà, 2014).

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2 trong năm 2013-2014 đã thử nghiệm sản xuất tôm cái giả theo phương pháp RNAi với qui mô 1.000 tôm hậu ấu trùng trong một tháng, tỉ lệ sống của tôm sau 1 tháng tiêm đạt 75% và tỉ lệ chuyển cái ở tháng thứ 4 đạt 90%. So với công nghệ vi phẫu, công nghệ RNAi cho hiệu quả chuyển giới tính cao hơn với thời gian xử lý tạo tôm cái giả thấp hơn, tỉ lệ tôm cái giả sinh sản thành công và công suất xử lý tạo tôm cái giả cao gấp đôi so với áp dụng công nghệ vi phẫu (Bùi Thị Liên Hà, 2014). Khi sản xuất tôm cái giả thành công, việc sản xuất ấu trùng tôm toàn đực sẽ dễ dàng và với qui mô lớn.

Ngoài những phương pháp chuyển giới tính toàn đực, các nhà nghiên cứu còn dùng phương pháp loại bỏ cang của những cá thể cang xanh. Tôm đực có mối quan hệ thứ bậc trong quần đàn, khi tôm cang xanh xuất hiện, những con tôm đực khác bị ức chế lột xác. Nếu loại bỏ cang xanh, sẽ kích thích sự lột xác của tôm để làm thay đổi thứ bậc trong đàn, do đó làm tăng năng suất nuôi (Sagi and Aflalo, 2005).

3 KẾT LUẬN

Cơ chế xác định giới tính của tôm cang xanh là cơ chế ZW và sự biệt hóa kiểu hình giới tính của con đực do hormon tuyến đực mang bản chất protein quyết định. Phương pháp dùng hormon nhân tạo để chuyển giới tính tôm cang xanh trực tiếp từ con cái thành con đực đã không thành công. Bước quan trọng quyết định sự thành công trong chuyển giới tính tôm cang xanh là tạo ra tôm cái giả. Từ đó, cho sinh sản giữa những con cái giả với

con đực bình thường sẽ sinh ra đàn tôm toàn đực. Có thể tạo tôm cái giả bằng cách cắt bỏ tuyến đực hoặc bằng phương pháp RNAi. Hai phương pháp này đã và đang được áp dụng thành công trong nuôi thương phẩm, trong đó phương pháp RNAi có triển vọng hơn trong sản xuất đàn tôm cang xanh toàn đực phục vụ nghề nuôi ở qui mô lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aflalo, E.D., Raju, D.V.S.N., Bommi, N.A., Verghese, J.T., Samraj, T.Y.C., Hulata, G., Ovadia, O., Sagi, A., 2012. Toward a sustainable production of genetically improved all-male prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Evaluation of production traits and obtaining neo-females in three Indian strains. *Aquaculture* 338–341, 197–207.

Aflalo, E.D.D., Hoang, T.T.T.T.T., Nguyen, V.H.H., Lam, Q., Nguyen, D.M.M., Trinh, Q.S.S., Raviv, S., Sagi, A., 2006. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 256(1-4), 468–478.

Baghel, D.S., Lakra, W.S., Satyanarayana Rao, G.P., 2004. Altered sex ratio in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) using hormone bioencapsulated live *Artemia* feed. *Aquaculture Research* 35(10), 943–947.

Barki, A., Karplus, I., Khalaila, I., Manor, R., Sagi, A., 2003. Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish. *Journal of Experimental Biology* 206(11), 1791–1797.

Bùi Thị Liên Hà, 2014. Báo cáo tổng kết đề tài “Nghiên cứu các giải pháp công nghệ điều khiển giới tính tôm cang xanh (*Macrobrachium rosenbergii*)”. Đề tài cấp Nhà nước thuộc chương trình ‘Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực thủy sản đến năm 2020’. Đơn vị chủ trì: Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II.

FAO, 2016. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/en

Jiang, X.-H., Qiu, G.-F., 2013. Female-only sex-linked amplified fragment length polymorphism markers support ZW/ZZ sex determination in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Animal genetics* 44(6),782–785.

Lezer, Y., Aflalo, E.D., Manor, R., Sharabi, O., Abilevich, L.K., Sagi, A., 2015. On the safety of RNAi usage in aquaculture: The case of all-male prawn stocks generated through manipulation of the insulin-like androgenic gland hormone. *Aquaculture* 435, 157–166.

Malecha, S.R., Nevin, P.A., Ha, P., Barck, L.E., Lamadrid-Rose, Y., Masuno, S., Hedgecock, D., 1992. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed

- freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 105(3-4), 201–218.
- Martin, G., Sorokine, O., Moniatte, M., Bulet, P., Hetru, C., Van Dorselaer, A., 1999. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. *European Journal of Biochemistry* 262(3),727–736.
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G., 1980a. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. *General and Comparative Endocrinology* 41(4), 442–457.
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G., 1980b. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. *General and Comparative Endocrinology* 41(4),423–441.
- Nair, M.C., Salin, K.R., Raju, M.S., Sebastian, M., 2006. Economic analysis of monosex culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man): A case study. *Aquaculture Research* 37(9),949–954.
- New, M.B., Nair, C.M., 2012. Global scale of freshwater prawn farming. *Aquaculture Research* 43(7),960-969
- Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Kavanaugh, S., Sower, S.A., Sobhon, P., Sretarugsa, P., 2008. The identification and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Neuroscience* 8(1),49–57.
- Nguyễn Nhứt, Nguyễn Văn Hào, Trần Nguyễn Ái Hằng, Nguyễn Thị Thu Thủy, Hồ Thị Lan, 2009. Mô hình sản xuất đại trà tôm giống càng xanh toàn đực tại Việt Nam. *Tạp chí nghề cá sông Cửu Long, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II*, 168 – 177.
- Nguyễn Thanh Phương, Trần Ngọc Hải, Trần Thị Thanh Hiền, Marcy N Wilder, 2003. Nguyên lý và kỹ thuật sản xuất giống tôm càng xanh - NXB NN TP HCM, 127 trang.
- Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Nguyễn Ái Hằng, Nguyễn Nhứt, Hồ Thị Lan, 2009. Nâng cao chất lượng tôm càng xanh cái giả và tỷ lệ biến thái ấu trùng tôm càng xanh toàn đực. *Tạp chí nghề cá sông Cửu Long, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II*, 178 – 190.
- Ohs, C.L., D’Abramo, L.R., Kelly, A.M., 2006a. Effect of dietary administration of 17 α -methyltestosterone on the sex ratio of postlarval freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, during the nursery stage of culture. *Journal of World Aquaculture Society* 37,328–333.
- Ohs, C.L., D’Abramo, L.R., Petrie-Hanson, L., Kelly, A.M., 2006b. Apparent Control of Sexual Differentiation of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, Through Dietary Administration of Dopamine Hydrochloride. *Journal of Applied Aquaculture* 18(4),19–32.
- Okumura, T., Hara, M., 2004. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zoological science* 21(6),621–628.
- Rungsin, W., Paankhao, N., Na-Nakorn, U., 2006. Production of all-male stock by neofemale technology of the Thai strain of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 259(1-4), 88–94.
- Sagi & cohen, 1990. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquaculture Report* 21,87–90.
- Sagi, A., 2013. Monosex culture of prawns through androgenic gene silencing. *INFOFISH international* 22–24.
- Sagi, A., Aflalo, E.D., 2005. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man): A biotechnological perspective. *Aquaculture Research* 36(3),231–237.
- Sagi, A., Ra’anan, Z., Cohen, D., Wax, Y., 1986. Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex populations: Yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages. *Aquaculture* 51(3-4), 265–275.
- Siddiqui, A.Q., Al-Hafedh, Y.S., Al-Harbi, A.H., Ali, S.A., 1997. Effects of Stocking Density and Monosex Culture of Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* on Growth and Production in Concrete Tanks in Saudi Arabia. *Journal of the World Aquaculture Society* 28(1),106–112.
- Subramoniam, T., 2016. *Sexual Biology and Reproduction in Crustaceans*. Academic Press. P526
- Ventura, T., Aflalo, E.D., Weil, S., Kashkush, K., Sagi, A., 2011a. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Heredity* 107(5), 456-461.
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E.D., Weil, S., Raviv, S., Glazer, L., Sagi, A., 2009. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinology* 150 (3), 1278–1286.
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E.D., Weil, S., Rosen, O., Sagi, A., 2012. Timing sexual differentiation: full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulin-like gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biology of reproduction* 86(3), 90.
- Ventura, T., Rosen, O., Sagi, A., 2011b. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *General and Comparative Endocrinology* 173(3)381–388.