

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC TINH SÀO CÁ KHÉ VẦN (*Gnathanodon speciosus*) STUDY ON THE TESTIS BIOLOGY OF GOLDEN TREVALLY (*Gnathanodon speciosus*)

Hứa Thị Ngọc Dung<sup>1</sup>, Đào Thị Đoàn Trang<sup>1</sup>, Phạm Quốc Hùng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Phạm Quốc Hùng (Email: hungpq@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 12/04/2020; Ngày phản biện thông qua: 13/05/2020; Ngày duyệt đăng: 12/06/2020

### TÓM TẮT

Đây là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu về sinh học sinh sản cá khế vằn (*Gnathanodon speciosus*). Nghiên cứu tập trung vào đặc điểm tinh sào cá khế vằn đực. Đàn cá thí nghiệm có khối lượng và chiều dài lần lượt là 400-800 g và 30-44 cm. Đàn cá được nuôi trong lồng trên biển và cho ăn hàng ngày bằng cá tạp với khẩu phần 3-5% khối lượng thân. Cá đực được thu mẫu ngẫu nhiên để thu thập tinh sào. Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ số thành thực (GSI) trung bình của cá khế vằn đực tăng cao từ tháng 6 và đạt giá trị cao nhất vào tháng 9 ( $3,3\% \pm 0,6\%$ ). Tỷ lệ thành thực sinh dục ở cá đực đạt tỷ lệ cao giai đoạn từ tháng 5 đến tháng 9. Đây là loài cá đẻ nhiều lần trong năm. Trong tinh sào thành thực có nhiều tinh bào ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Thành phần sinh hóa của tinh sào thay đổi theo giai đoạn phát triển. Hàm lượng protein và lipid ở giai đoạn thành thực cao hơn so với giai đoạn chưa thành thực.

**Từ khóa:** tinh sào, cá khế vằn, *Gnathanodon speciosus*, thành phần sinh hóa, hệ số thành thực

### ABSTRACT

This is for the first time in Viet Nam, a study on reproductive biology of golden trevally (*Gnathanodon speciosus*) was conducted. The present study was focused on testis biology of the fish. The male broodstock with body weight and total length were 400-800 g and 30-44 cm, respectively. Fish were kept in seacage and daily fed with trashfish at 3-5% body weight. Testis were collected for biological parameters. The results indicated that the GSI increased from June to September ( $3.3\% \pm 0.6\%$ ). Maturation of male fish increased from May to September. Male golden trevally are multiple spawners. There are different stages of germcell development in the testis at the same time. The biochemical composition changed based on the stages of testis maturation. Protein and lipid contents in mature testis were found higher than that in immature testis.

**Keywords:** Testis, golden trevally, *Gnathanodon speciosus*, GSI, biochemical composition

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá khế vằn, *Gnathanodon speciosus*, (tên địa phương còn gọi là cá bẹ đưng, bẹ vàng, bẹ nghệ) là loài cá biển có giá trị kinh tế, sinh trưởng nhanh, dễ nuôi vì có tính ăn tạp, nguồn thức ăn dễ tìm và nuôi được ở thủy vực nước lợ [7; 12]. Hiện nay loài cá này đã được nhân giống thành công trong điều kiện nuôi nhốt và được nuôi thương phẩm ở một số địa phương ven biển [7; 12]. Điều này đã tạo tiền đề rất lớn trong việc mở rộng quy mô nghề nuôi, góp phần đa dạng hóa đối tượng nuôi cho ngành thủy sản. Trên thế giới cũng đã có một số nghiên cứu về loài cá này, nhưng chủ yếu tập trung vào sản xuất giống [11; 12]. Tuy

nhiên, cá khế vằn chưa được nghiên cứu đầy đủ, chưa có quy trình sản xuất giống và hiệu quả sản xuất không ổn định, chất lượng con giống chưa cao cũng như khi xảy ra dịch bệnh chưa có biện pháp quản lý và điều trị. Tại Việt Nam hiện vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào về đặc điểm sinh học sinh sản của cá khế vằn. Nhằm góp phần hoàn thiện quy trình sản xuất giống nhân tạo, chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh sản, tập trung vào đặc điểm tinh sào cá đực trong chu kỳ sinh sản.

Nắm được quy luật phát triển của tinh sào và những thay đổi về tổ chức học trong chu kỳ sinh sản là một trong những thông tin rất cần thiết

cho biết hoặc có thể dự báo trạng thái thành thực của cá đực, cũng như phục vụ cho công tác quản lý đàn cá bố mẹ [4; 13; 14]. Nghiên cứu này tập trung vào việc xác định đặc điểm phát triển tinh sào trong chu kỳ sinh sản cá khế vằn, đặc điểm hình thái ngoài, tiêu bản mô học các giai đoạn phát triển tinh sào, hệ số thành thực và thành phần sinh hóa của tinh sào trong chu kỳ sinh sản. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin hữu ích về đặc điểm sinh học sinh sản, đóng góp cho việc nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất giống cá khế vằn sẽ mở ra nhiều tiềm năng và cơ hội phát triển nghề nuôi cá biển, góp phần phát triển ngành nuôi trồng thủy sản.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đàn cá thí nghiệm

Đàn cá bố mẹ thuộc Công ty TNHH Phương Hải Nha Trang được nuôi trong lồng trên biển tại Đảo Trí Nguyên, Phường Vĩnh Nguyên, Nha Trang (12°4'23.01"N, 109°2'51.97"E). Mật độ nuôi bình quân 3 kg/m<sup>3</sup> với tỷ lệ đực cái 1:1; Nhiệt độ nước: 28 - 32°C; độ mặn: 29 - 34 ‰; pH: 7,8 - 8,6 và oxy hòa tan: 4,5- 6,5 mg/l. Cá bố mẹ được cho ăn cá tạp hàng ngày với khẩu phần bằng 3 - 5% khối lượng thân. Cá đực có khối lượng trung bình 400 - 800g, chiều dài trung bình từ 30 - 44cm được bắt ngẫu nhiên để thu mẫu tinh sào và đo kích thước. Thời gian thu mẫu từ tháng 3/2018 đến tháng 4/2019.

### 2. Phương pháp làm tiêu bản tổ chức học tinh sào

Mẫu tinh sào được đưa ra khỏi dung dịch cố định, rửa và rút nước bằng cách ngâm trong cồn tuyệt đối khoảng 4 - 8 giờ, tiếp theo, ngâm trong methyl salicylate 12 - 24 giờ. Sau cùng, mẫu được thấm trong parafin nóng chảy ở 65° C trong thời gian ít nhất 6 giờ. Sử dụng máy đổ parafin đã nóng chảy vào khuôn đã chứa mẫu, để trên dàn lạnh khoảng 30 phút cho mẫu parafin đông cứng lại. Dùng dao gọt khối parafin chứa mẫu thành hình thang hoặc hình chữ nhật để dễ cắt lớp. Gắn khối parafin lên đế gỗ và dán nhãn. Gắn đế gỗ có mẫu vào máy microtom, cắt lát có độ dày 5 - 7 micron. Đưa lát cắt vào nước ấm (40 - 45°C) khoảng 1 - 2 phút để lát cắt giãn ra. Dùng lam sạch

lấy lát cắt ra khỏi nước và sấy trên máy sấy ở nhiệt độ 45 - 60°C trong 1 - 4 giờ.

Sau khi được sấy khô, tiếp theo, mẫu được khử parafin bằng cách ngâm trong dung dịch xilen và làm trương nước bằng cách nhúng trong dung dịch ethanol ở các nồng độ khác nhau khoảng 2 - 3 phút. Cuối cùng mẫu được nhuộm trong dung dịch Hematoxylin - Mayer (4 - 6 phút) và Eosin (2 phút) để khô và đặt lamên bằng keo dán. Ghi nhãn lên lamên là khâu cuối cùng của quy trình.

### 3. Xác định GSI và các giai đoạn phát triển tinh sào

Tiêu bản tổ chức học được đọc trên kính hiển vi Zeiss Axioskop 2-Plus light (Zeiss Inc., Vienna, Austria) và chụp hình bằng máy Nikon Camera Head DS-5M và Nikon Camera Control Unit DS-L1. Bậc thang phân biệt các giai đoạn phát triển tinh sào trong nghiên cứu này dựa theo tiêu chuẩn của Nikolski (1963); Sakun (1954) và Sakun & Butskaya (1968) [6; 8; 9]. Hệ số thành thực (GSI - Gonado Somatic Index) là tỷ lệ phần trăm giữa khối lượng tuyến sinh dục và khối lượng toàn bộ cơ thể.

### 4. Xác định thành phần sinh hóa trong tinh sào cá khế vằn

Thành phần sinh hóa tinh sào (các chỉ tiêu ẩm, tro, protein và lipid) ở các giai đoạn phát triển khác nhau được phân tích tại phòng thí nghiệm Công nghệ cao, Trung tâm Thí nghiệm Thực hành - Trường Đại học Nha Trang.

- *Xác định hàm lượng ẩm và tro:* Theo phương pháp sấy khô ở 105°C (độ ẩm) và nung ở 550°C (tro) đến khối lượng không đổi.

- *Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Dumas (TCVN 11604: 2016).* Phương pháp đốt cháy Dumas để xác định protein thô. Quy trình dùng một thiết bị lò điện đun nóng mẫu phân tích lên đến 600°C trong một lò phản ứng được bịt kín với sự hiện diện của oxy. Hàm lượng nitơ của khí đốt sau đó được đo bằng cách dùng máy dò dẫn nhiệt.

- *Xác định lipid bằng thiết bị chiết Soxhlet:* Dựa vào tính tan hoàn toàn của chất béo vào dung môi hữu cơ. Dùng dung môi hữu cơ trích ly chất béo có trong tuyến sinh dục cá. Sau đó làm bay hơi hết dung môi, cân chất béo còn lại, tính ra hàm lượng chất béo có trong tuyến sinh dục cá.

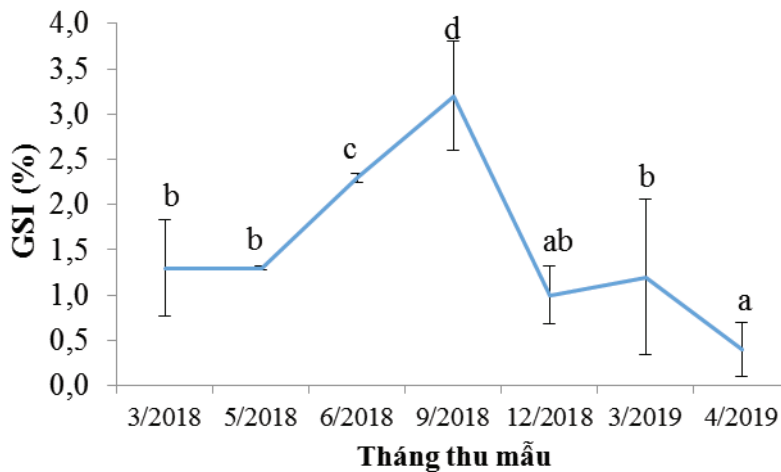
**5. Xử lý thống kê**

Số liệu được trình bày dưới dạng TB ± SD. Sự khác nhau về các đặc điểm sinh sản giữa các tháng hay các giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA) với kiểm định Duncan's multiple range test trên phần mềm SPSS có ý nghĩa ở mức  $P < 0,05$ .

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**1. Biến động hệ số thành thực**

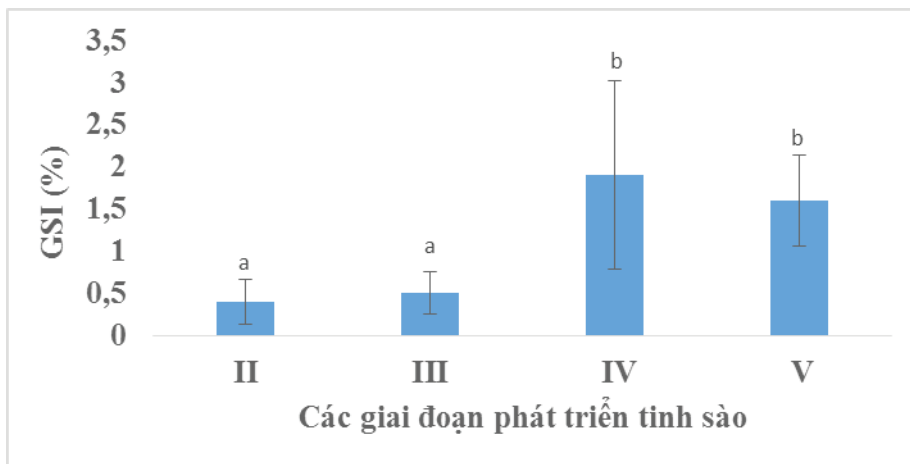
Hệ số thành thực (GSI) biến động khá lớn trong mùa vụ sinh sản (Hình 1). GSI đạt cao nhất vào tháng 9 (3,2%). GSI đạt giá trị thấp nhất vào tháng 4 (0,4%). Tuy nhiên quan sát sự phát triển của tinh sào cho thấy cá đực ở tháng 4 có tỷ lệ thành thực khá cao.



Hình 1. Biến động giá trị GSI trung bình qua các tháng

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị GSI trung bình của cá đực qua 7 tháng thu mẫu có sự dao động lớn từ  $0,4 \% \pm 0,30\%$  đến  $3,2\% \pm 0,58\%$ . Giá trị GSI ở tháng 3 và tháng 5 tương đương nhau. Sang tháng 6, GSI bắt đầu tăng và đạt giá trị cực đại vào tháng 9 khi toàn bộ

cá đực thu được đều có tinh sào ở giai đoạn IV, giai đoạn tinh sào đạt kích thước tối đa. GSI đạt giá trị cực đại (3,2%) sau đó giảm mạnh vào tháng 12 rồi tăng nhẹ vào tháng 3 năm 2019 và tiếp tục giảm và có giá trị nhỏ nhất vào tháng 4 năm 2019 (0,4%).



Hình 2: Hệ số thành thực ở các giai đoạn phát triển của tinh sào

Trong nghiên cứu này cho thấy cá khế vằn đực có giá trị GSI thay đổi theo giai đoạn phát triển của tinh sào, dao động từ 0,4 - 1,9%. Khi tinh sào ở giai đoạn II, III giá trị GSI nhỏ hơn và sai khác có ý nghĩa thống kê với GSI khi tinh sào ở giai đoạn IV, V (Hình 2). Điều này đúng với thực tế, ở giai đoạn IV và V cá bước sang giai đoạn thành thực sinh dục, buồng sẹ phát triển, khối lượng buồng sẹ tăng dẫn đến giá trị GSI cao.

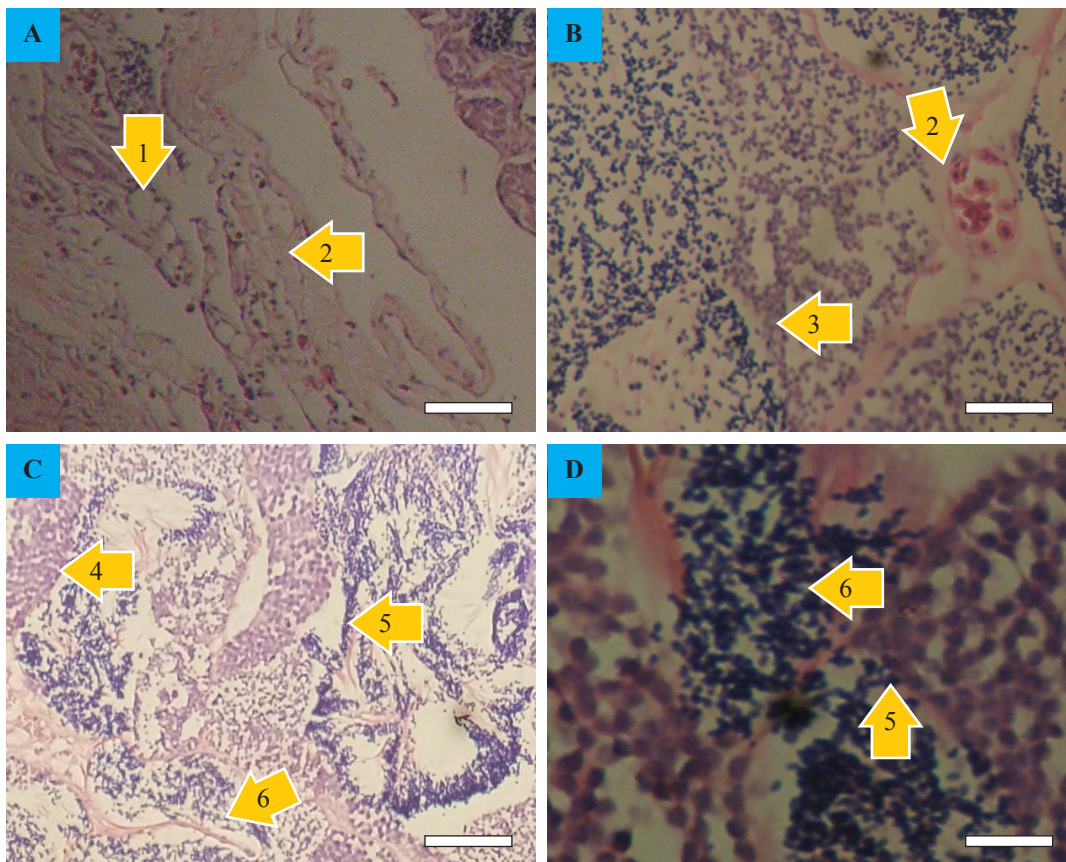
GSI là một chỉ số quan trọng đánh giá mức độ chín muồi của tuyến sinh dục. Vì vậy, khi nghiên cứu quá trình phát triển của tuyến sinh dục, người ta không thể không đề cập GSI. Thông qua GSI, chúng ta có thể dự báo, theo dõi quá trình phát triển và chín muồi của các tế bào sinh dục [2; 5; 14]. Tuy nhiên GSI đôi khi

không phản ánh đầy đủ trạng thái thực của các sản phẩm sinh dục, đặc biệt đối với các loài cá đẻ nhiều lần trong năm [2; 5]. Tuy vậy GSI là một phần bổ sung quan trọng cho sơ đồ chín muồi sinh dục ở cá.

## 2. Các giai đoạn phát triển tinh sào

### Về tổ chức học

Ở cá khế vằn đực, quá trình tạo tinh thể hiện khá phức tạp. Trong tinh sào tồn tại nhiều giai đoạn phát triển khác nhau của tinh bào. Qua Hình 3 có thể thấy, ở giai đoạn thành thực sinh dục, tinh sào cá tồn tại nhiều giai đoạn phát triển khác nhau của tinh bào gồm tinh nguyên bào; tinh bào đang phân chia; tinh bào cấp I, II; tinh tử và tinh trùng. Điều này chứng tỏ đây là loài cá thành thực liên tục hay nói cách khác là loài sinh sản nhiều lần trong năm.



**Hình 3: Tổ chức học tinh sào cá khế vằn ở các giai đoạn khác nhau**

1: Tinh nguyên bào, 2: Tinh nguyên bào đang phân chia, 3: Tinh bào cấp I, 4: Tinh bào cấp II; 5: Tinh tử; 6: Tinh trùng; Scale bar: 100  $\mu$ m

### Về hình thái học

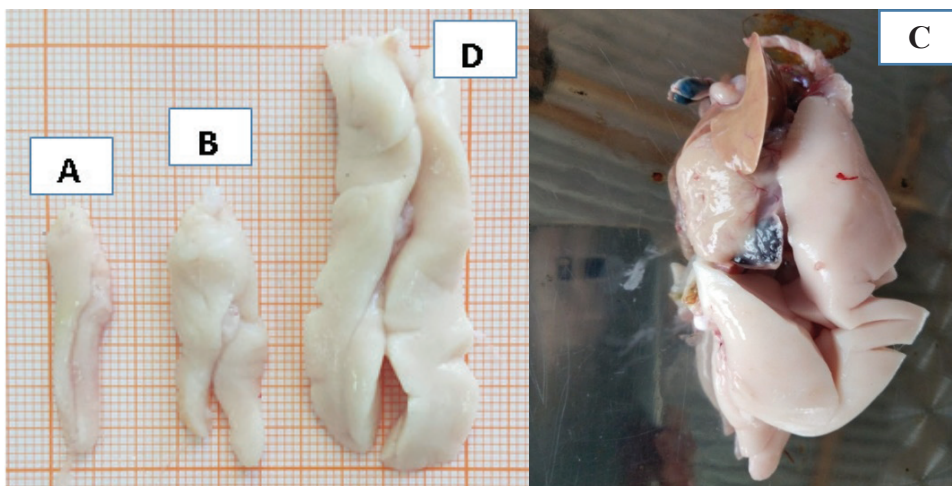
Trong nghiên cứu này, đàn cá được thu được có tinh sào ở giai đoạn II, III, IV và V. Tinh sào ở giai đoạn I và VI không bắt gặp trong quá trình thu mẫu. Trên thực tế, ở giai đoạn I, nhìn bên ngoài, tinh sào là những dải mỏng giống nõn sào ở giai đoạn I, chính vì thế rất khó để phân biệt được cái. Giai đoạn VI là giai đoạn sau khi cá tham gia sinh sản, tinh sào đã trở về giai đoạn II, III.

*Giai đoạn II:* Tinh sào có kích thước rất nhỏ, hai phần của tinh sào còn dính nhau bởi màng treo dài. Tinh sào có màu hồng là màu của các mạch máu chạy dọc và có những tia nhỏ chạy về các lườn bên (Hình 4A).

*Giai đoạn III:* Tinh sào tăng lên về mặt thể tích, hai phần tinh sào đã tách ra. Tinh sào có màu trắng, săn chắc và đàn hồi. Khi cắt ngang tinh sào, các mép của nó không tròn mà lại sắc cạnh và thấy xuất hiện sọc có màu trắng trong (Hình 4B)

*Giai đoạn IV:* Kích thước tinh sào đạt tối đa, màu trắng sữa, chứa đầy sẹ. Khi cắt ngang tinh sào, các mép tròn lại ngay và chỗ cắt có dịch nhờn chảy ra. Ở giai đoạn này, tinh trùng chín xuất hiện trong các bào nang và có xu hướng đi ra khỏi bào nang. Các tinh nguyên bào lớn đang phân chia giảm nhiễm. Ngoài ra, trong tinh sào còn có các tinh bào sơ cấp, tinh bào thứ cấp và các tinh tử nằm trên thành các ống sinh tinh dự trữ cho lần phát dục tiếp theo (Hình 4C)

*Giai đoạn V:* Tinh sào đang ở thời kì sinh sản. Tinh sào có màu trắng sữa. Bên trong ống sinh tinh chứa đầy các tế bào tinh trùng chín muồi (Hình 4D). Tuy nhiên, cá khế vẫn không như nhiều loài cá khác. Khi tinh sào ở giai đoạn V, vuốt vào bụng cá không có hiện tượng tinh dịch chảy ra. Vì thế, ở giai đoạn thành thực sinh dục nhìn từ bên ngoài rất khó để phân biệt được cá khế vẫn dục và cá khế vẫn cái.



**Hình 4: Tinh sào cá khế vẫn ở các giai đoạn phát triển**

A: Giai đoạn II; B: Giai đoạn III; C: Giai đoạn IV; D: Giai đoạn V

Kết quả trên cho thấy quá trình phát triển, thành thực, chín muồi và phóng thích tế bào sinh dục dục trong chu kỳ sinh sản của cá khế vẫn khá tương đồng với các loài cá biển nhiệt đới nói chung như cá chêm mõm nhọn, cá đĩa, cá bông và cá *Glossogobius giuris* [2; 4; 14; 15]. Sự mô tả chi tiết các giai đoạn phát triển của tinh sào cũng như tổ chức học ở từng giai đoạn phát triển, làm căn cứ hướng dẫn phân biệt các giai đoạn phát triển của tinh sào cá biển nhiệt đới nói chung.

### 3. Thành phần sinh hóa của tinh sào

Thành phần sinh hóa của tinh sào như protein, lipid, tro và độ ẩm được xem là các chỉ tiêu quan trọng, phản ánh mức độ tích lũy dinh dưỡng trong tinh sào, từ đó có thể dự báo được mức độ thành thực của cá [10]. Thành phần sinh hóa còn là nguồn năng lượng và chất dinh dưỡng cho quá trình tạo tinh ở cá. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 1.



Hình 5. Hình thái ngoài cá khế vằn

Bảng 1: Thành phần sinh hóa trong tinh sào cá khế vằn

Các chỉ tiêu	Giai đoạn tinh sào		
	Giai đoạn II	Giai đoạn III	Giai đoạn IV, V
Protein (%)	16,8	21,6	25,9
Lipid (%)	2,77	5,01	4,8
Tro (%)	2,2	1,3	1
Độ ẩm (%)	77	74,1	78,3

Kết quả phân tích cho thấy hàm protein đạt giá trị cao nhất khi tinh sào cá ở giai đoạn IV, V (25,9%). Hàm lượng tro và lipid thì ngược lại, giảm dần khi tinh sào chuyển từ giai đoạn chưa thành thực sang giai đoạn thành thực sinh dục. Điều này được cho là hợp lý vì khi cá bắt đầu tham gia sinh sản, những chất dự trữ tích lũy ở các cơ quan được huy động để tổng hợp thành protein nuôi dưỡng các tế bào sinh dục phát triển. Những chất dự trữ này chuyển vào tuyến sinh dục, làm cho protein trong tinh sào tăng lên (từ 16,8 % đến 25,9%). Bên cạnh đó, chất dinh dưỡng đưa vào tuyến sinh dục có nguồn gốc từ mô sinh dưỡng ở cá bố mẹ, ước tính có khoảng 7 - 8,7% lipid bị mất đi từ các tế bào sinh dưỡng và được chuyển vào tinh sào.

Protein được xem là thành phần quan trọng trong tuyến sinh dục cá. Đối với cá đực,

thành phần này có thể đóng một vai trò quan trọng bảo vệ cho tinh trùng và nó có chứa một số enzyme quan trọng của quá trình trao đổi chất [3; 10]. So với các loài động vật có xương sống khác, hàm lượng protein trong tinh sào cá là khá thấp. Trong nghiên cứu này, hàm lượng protein ở tinh sào cá cá khế vằn giai đoạn thành thực là 25,9% cao hơn nhiều so với hàm lượng protein của tinh sào cá dìa (*Siganus guttatus*) cùng giai đoạn đạt 14,8% [1]. Điều này có thể cho thấy ở mỗi loài cá khác nhau, hàm lượng protein trong tinh sào khác nhau.

#### IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Cá khế vằn là loài cá đẻ nhiều lần trong năm với mùa sinh sản chính kéo dài từ tháng 3 đến tháng 10. Tổ chức học của tinh sào thể hiện tính không đồng bộ với sự hiện diện các

tế bào sinh dục ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Quá trình phát triển tinh sào trải qua 6 giai đoạn giống như các loài cá biển nhiệt đới khác. Hệ số thành thực GSI ở cá khế đực dao động từ 0,4% đến 3,2%. Thành phần sinh hóa của tinh sào biến động theo giai đoạn phát triển. Hàm lượng protein và lipid ở giai đoạn tinh sào thành thực cao hơn so với giai đoạn chưa thành thực. Nhằm hoàn thiện quy trình

sản xuất giống, các nghiên cứu tương tự trên cá cái cần được thực hiện.

### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn công ty TNHH Phương Hải Nha Trang đã tài trợ đàn cá bố mẹ cho nghiên cứu; cảm ơn học viên cao học Nguyễn Thị Toàn Thư và sinh viên đại học Lò Thị Dương, Nguyễn Lập Đức (N58) đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

#### Tiếng Việt

1. Nguyễn Văn An, Nguyễn Văn Minh, Phạm Quốc Hùng, (2019). “Ảnh hưởng của hCG và LHRH-A lên thành phần sinh hóa của tinh sào cá đĩa (*Siganus guttatus*)”. *Tạp chí khoa học công nghệ thủy sản*; Số 3/2019, trang 3 - 8.
2. Phạm Quốc Hùng & Lê Hoàng Thị Mỹ Dung, (2011). “Nghiên cứu tổ chức học của tinh sào cá Chêm Mỡ Nhọn *Psammoperca waigiensis* (Cuvier 1828)”. *Tạp chí khoa học công nghệ thủy sản*, Số 2/2011, trang 19 - 27.
3. Phạm Quốc Hùng, Phạm Huy Trường, Nguyễn Văn An, (2018). “Ảnh hưởng của hCG, LHRH-A lên đặc điểm sinh lý sinh sản cá đĩa (*Siganus guttatus*)”. *Tạp chí khoa học công nghệ thủy sản*; Số 3/2018, trang 38 - 43.

#### Tiếng Anh

4. Hung Quoc Pham, Anh Tuong Nguyen, Elin Kjorsvik, Mao Dinh Nguyen and Augustine Arukwe, (2012). “Seasonal reproductive cycle in waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*)”. *Aquaculture Research* 43 (6): 815 - 830.
5. Hung Q. Pham, Hoang M. Le, (2020). “Seasonal changes in three indices of gonadal maturation in male golden rabbitfish (*Siganus guttatus*): implications for artificial propagation”. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46.
6. Nikolsky, G. V. (1963). “The Ecology of Fishes”. *Academy press, London and New York*. 352 pp.
7. Pham Quoc Hung, Le Thi Nhu Phuong, (2019). “Seed production technology of golden trevally (*Gnathanodon speciosus*)”. The International Fisheries Symposium (IFS) 2019. November 18 - 21, 2019, Kuala Lumpur, Malaysia.
8. Sakun O F, (1954). “Analysis of gonadal function in male and female *Vimba vimba* with special reference to the nature of spawning”. *Dokl Akad Nauk SSSR* 98: 505 - 507
9. Sakun, O F. & Butsakaia, (1968). “Analysis of gonadal function in male and female *Vimba vimba* L. with special reference to the nature of spawning”. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 98: 505 - 700.
10. Simpson, A., (1992). “Differences in body size and lipid reserves between maturing and non-maturing Atlantic salmon parr, *Salmo salar*”. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1737 - 1742.
11. Tony S Dharma, (2014). “The mass seed production of golden trevally fish (*Gnathanodon speciosus* forsskal) with different feed”. *Journal of Tropical Marine Science and Technology*, Vol. 6, No. 2, 383 - 390
12. Tony S Dharma, Gigih S Wibawa dan AA. Ketut A, (2017). “The hatchery technology of golden trevally fish (*Gnathanodon speciosus* forsskal) for the sustainable development of the aquaculture in the Indonesian”. *Asian-pacific aquaculture 2017*. World aquaculture society.
13. Weltzien F A, Taranger G L, Karlsten O, Norberg B, (2002). “Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*”. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology* 132: 567 - 575.
14. Zeyl J N, Love P O, Higgs M D, (2014). “Evaluating gonadosomatic index as an estimator of reproductive condition in the invasive round goby *Neogobius melanostomus*”. *Journal of Great Lakes Research* 40: 164 - 171.
15. Zutshi B, Murthy P S, (2001). “Ultrastructural changes in testis of gobiid fish *Glossogobius giuris* (Ham) induced by fenthion”. *Indian Journal of Experimental Biololy* 39: 170 - 173.