

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC SINH SẢN VÀ QUÁ TRÌNH TRƯỞNG THÀNH NOÃN BÀO HẢI SÂM ĐEN (HOLOTHURIA LEUCOSPILOTA) BẰNG DUNG DỊCH TÁCH CHIẾT TỪ DÂY THẦN KINH HẢI SÂM

HOÀNG ĐÌNH CHIỀU^{1*}, BÙI MINH TUẤN¹, LƯU XUÂN HÒA¹, DƯ VĂN TOÁN²

¹ Viện Nghiên cứu hải sản, Bộ NN&PTNT

² Viện Khoa học môi trường, biển và hải đảo, Bộ TN&MT

Tóm tắt:

Hải sâm là loài có giá trị kinh tế cao và có vai trò quan trọng trong làm sạch môi trường nước. Hiện nay, hải sâm đen (*Holothuria leucospilota*) đang được thử nghiệm sản xuất giống ở Việt Nam và việc nắm bắt các đặc điểm sinh học sinh sản và chất kích thích sinh sản, quá trình trưởng thành tuyến sinh dục là rất quan trọng. Từ các cá thể hải sâm đen được thu thập tại vùng biển Cát Bà, Hải Phòng, các thí nghiệm trong ống nghiệm (*in vitro*) đã được triển khai thông qua sử dụng các phương pháp: Kiểm tra giới tính hải sâm; tách chiết dung dịch từ dây thần kinh hải sâm (RNE); nhận biết noãn bào đã trưởng thành và thí nghiệm kích thích trưởng thành noãn bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tuyến sinh dục cái của hải sâm đen ở giai đoạn IV (hoàn toàn trưởng thành) có các tế bào trứng/noãn bào đồng đều và đạt 170 - 180 μm đường kính, giọt phôi có kích thước 50 - 60 μm đường kính và nhân con có kích thước 7 - 10 μm đường kính. Sau khi trứng đã được đẩy ra khỏi ống tuyến sinh dục, 99% trứng đã được kích hoạt vỡ màng nhân và trưởng thành. Nghiên cứu đã đưa ra một phương pháp thụ tinh nhân tạo mới bằng dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm (RNE). Phương pháp này có thể thay thế cho phương pháp kích thích sinh sản thông thường trong trường hợp hải sâm bố mẹ chưa đạt trưởng thành thành thực tuyến sinh dục. Đây là cơ sở khoa học quan trọng cho những nghiên cứu về hormone sinh sản, các thí nghiệm *in vitro* về trưởng thành noãn bào hải sâm và nâng cao hiệu quả của trong sản xuất giống hải sâm ở Việt Nam.

Từ khóa: Hải sâm đen, noãn bào trưởng thành, RNE, sinh học sinh sản.

Ngày nhận bài: 19/3/2024; Ngày sửa chữa: 24/4/2024; Ngày duyệt đăng: 23/5/2024.

Reproductive biology characteristics and oocyte maturation in sea cucumbers (*Holothuria leucospilota*) using their own radial nerve extract (RNE)

Abstract:

The article describes sea cucumbers as species with high economic value and an important role in cleaning the water environment. Currently, black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) is being tested for seed production in Viet Nam and understanding the biological characteristics of reproduction, reproductive stimulants, and gonad maturation process is very important. From individual black sea cucumbers collected in the waters of Cat Ba islands, Hai Phong city, *in vitro* experiments were carried out using the following methods: Checking the sex of sea cucumbers; Extraction of solution from sea cucumber nerves (RNE); Identify mature oocytes and experiment with stimulating oocyte maturation. Research results show that the female gonads of black sea cucumbers at stage IV (fully mature) have uniform egg cells/oocysts and reach 170 - 180 μm in diameter, with embryonic drops measuring 50 - 60 μm in diameter and the nucleus is 7 - 10 μm in diameter. After the eggs have been pushed out of the gonadal duct, 99% of the eggs have been activated to break the nuclear membrane and mature. Research has proposed a new artificial insemination method using sea cucumber nerve tissue extraction (RNE) solution. This method can replace the conventional method of stimulating reproduction in cases where the parent sea cucumbers have not yet reached gonadal maturity. This is an important scientific basis for research on reproductive hormones, *in vitro* experiments on sea cucumber oocyte maturation and improving the efficiency of sea cucumber seed production in Viet Nam.

Keywords: Black sea cucumber, mature oocyte, reproductive biology, RNE.

JEL Classifications: P48, Q56, Q57.



1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hải sâm là loài có giá trị kinh tế cao do hàm lượng dinh dưỡng cao, chứa nhiều hoạt chất dược học và có vai trò quan trọng làm sạch môi trường nước (Olivera-Castillo, Davalos et al. 2013). Ở Việt Nam, một số loài hải sâm có giá trị kinh tế cao như hải sâm vú (*Holothuria fuscogilva*), hải sâm cát (*H. scabra*), hải sâm đen (*H. leucospilota*)... Đặc biệt, hải sâm đen (*H. leucospilota*) còn được nhắc đến với vai trò là nguồn thực phẩm tốt cho những người béo phì do hàm lượng lipid tổng số thấp nhất (4,6%), hàm lượng protein cao (43,23 - 48,27%) và hàm lượng carbonhydrates cao (44,62 - 48,56%) (Nahla 2013). Tuy nhiên, do giá trị kinh tế cao, nguồn lợi các loài hải sâm ở Việt Nam đang bị khai thác cạn kiệt, cần có những biện pháp phục hồi quần đàn trong thời gian tới.

Một trong những biện pháp giảm sức ép khai thác và khôi phục quần đàn tự nhiên là sinh sản nhân tạo để cung cấp con giống cho nuôi trồng thủy sản và thả phục hồi quần đàn tự nhiên. Từ năm 1991 đến nay, Viện Nuôi trồng thủy sản 3 đã bắt đầu sản xuất giống nhân tạo một số loài hải sâm như *H. scabra*, *A. echinites*, *H. fuscogilva*. Năm 2014 - 2015, Viện Nghiên cứu Hải sản cũng đã tiến hành thử nghiệm sinh sản nhân tạo hải sâm đen (*H. leucospilota*) tại vùng biển Hải Phòng. Trong quá trình sản xuất giống, những đặc điểm sinh học sinh sản và chất kích thích sinh sản, quá trình trưởng thành tuyến sinh dục là rất quan trọng. Tuy nhiên, những đặc điểm sinh học sinh sản và cấu tạo của noãn bào hoặc quá trình chuyển trạng thái của noãn bào từ chưa trưởng thành sang trưởng thành còn chưa được nghiên cứu sâu trong loài hải sâm đen (*H. leucospilota*).

Bài báo trình bày về đặc điểm phân biệt tuyến sinh dục đực và tuyến sinh dục cái loài hải sâm đen; đặc điểm cấu tạo của noãn bào hải sâm đen; kết quả kích hoạt quá trình trưởng thành noãn bào bằng dung dịch tách chiết từ dây thần kinh hải sâm (RNE - Radial Nerve Extract); tiềm năng áp dụng phương án này trong sản xuất giống. Đây là cơ sở khoa học quan trọng cho những nghiên cứu về hormone sinh sản, các thí nghiệm in vitro về trưởng thành noãn bào hải sâm và nâng cao hiệu quả của trong sản xuất giống hải sâm ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

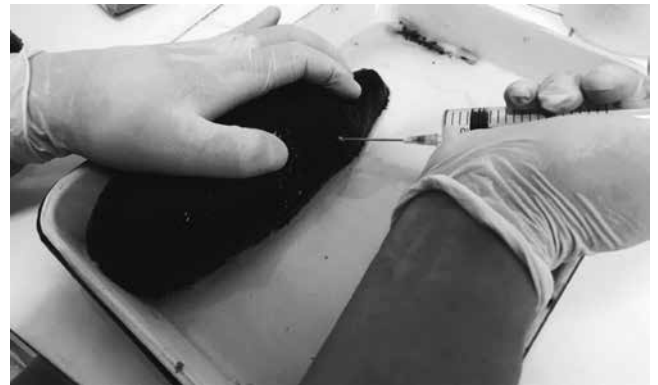
- *Đối tượng nghiên cứu:* Loài hải sâm đen (*Holothuria leucospilota*), trong đó có sử dụng tuyến sinh dục và noãn bào để nghiên cứu về quá trình chuyển trạng thái từ chưa trưởng thành sang trưởng thành của noãn bào bằng dung dịch tách chiết từ chính mô dây thần kinh loài hải sâm đen này.

- *Địa điểm và thời gian nghiên cứu:* Các cá thể hải sâm đen được thu thập tại vùng biển Cát Bà, Hải Phòng vào thời điểm từ tháng 4 - 7 năm 2023. Các thí nghiệm được tiến hành trong khoảng thời gian từ tháng 5 - 8 năm 2023 tại Viện Nghiên cứu hải sản.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp kiểm tra giới tính hải sâm:

Sử dụng phương pháp sinh thiết Biopsy để kiểm tra giới tính của hải sâm đen. Một xi lanh được sử dụng để cắm vào bên thành cơ thể hải sâm, sau đó hút từ từ tuyến sinh dục ra khỏi thành cơ thể (Hình 1). Tuyến sinh dục sẽ được quan sát trên kính hiển vi điện tử để kiểm tra trứng hay tinh trùng. Từ đó có thể xác định được hải sâm đực/cái phục vụ cho các thí nghiệm in vitro tiếp theo.



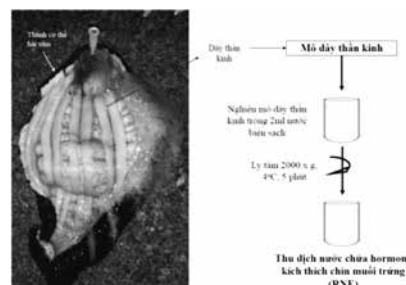
▲ Hình 1. Sử dụng phương pháp sinh thiết (Biopsy) để kiểm tra giới tính của hải sâm đen (*H. leucospilota*)

Phương pháp tách chiết dung dịch từ dây thần kinh hải sâm (RNE):

Các bước tách chiết dung dịch từ dây thần kinh hải sâm được thực hiện theo nghiên cứu của Chieu, Suwansard et al. 2018 cụ thể như sau:

- Hải sâm sẽ được mổ phẫu thuật và mở rộng thành cơ thể sang 2 bên để tiến hành thu mẫu mô dây thần kinh. Hải sâm có 5 dây thần kinh chạy dọc thành cơ thể từ miệng xuống hậu môn. Mỗi dây thần kinh này nằm giữa hai tuyến cơ bám vào thành cơ thể. Sử dụng một dao giải phẫu để tách các sợi dây thần kinh này và cho vào ống Eppendorf 2ml (Hình 2).

- Mô dây thần kinh sẽ được nghiền bằng chày nhỏ chuyên dụng trong ống Eppendorf 2ml với dung dịch nước biển lọc sạch. Sau khi nghiền tan mô, dung dịch nghiền này sẽ được ly tâm ở điều kiện 2.000 x g, 4°C trong 5 phút (Hình 2). Dung dịch trong suốt sau khi ly tâm chính là dung dịch chứa hormone kích thích trưởng thành trứng và sẽ được thu để trong tủ đông (-40°C) để sử dụng cho các thí nghiệm sau này. Nồng độ peptide trong dung dịch tách chiết mô thần kinh sẽ được đo bởi máy NanoDrop (Công ty ThermoFisher Scientific, Mỹ).



▲ Hình 2. Các bước thu mẫu và tách chiết dịch dây thần kinh ở loài hải sâm đen *Holothuria leucospilota*

Phương pháp nhận biết noãn bào đã trưởng thành:

Nhận biết sự trưởng thành của noãn bào thông qua hiện tượng vỡ màng nhân trứng (hiện tượng GVBD: Germinal Vesicle Breakdown) ở giai đoạn tiền giảm phân I (Kato, Tsurumaru et al. 2009, Fujiwara, Yamano et al. 2010).

Phân loại các giai đoạn của tuyến sinh dục hải sâm ví dụ theo một số nghiên cứu trước đây (Drumm and Loneragan 2005, Gaudron, Kohler et al. 2008, Fujiwara, Yamano et al. 2010, Morgan and Neal 2012), được chia 4 giai đoạn: Giai đoạn 0 (sau khi đẻ hoặc chưa xuất hiện trứng/tinh trùng); giai đoạn I (tuyến sinh dục bắt đầu hình thành trứng/tinh trùng); giai đoạn II (đang phát triển, tăng về số lượng và kích cỡ trứng/tinh trùng); giai đoạn III (bắt đầu trưởng thành, trứng/tinh trùng chứa đầy túi sinh dục); giai đoạn IV (hoàn toàn trưởng thành, trứng/tinh trùng chứa đầy tuyến sinh dục và đạt kích cỡ lớn nhất, đồng đều).

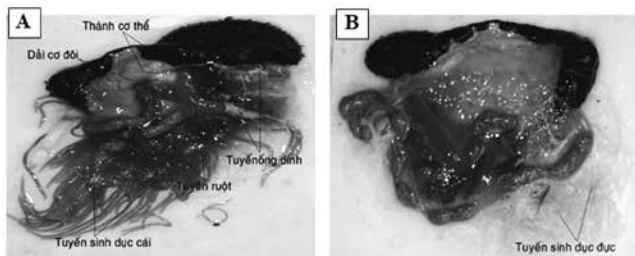
Thí nghiệm kích thích trưởng thành noãn bào:

Sau khi chọn được cá thể hải sâm cái bằng phương pháp sinh thiết Biopsy, các tuyến sinh dục cái đạt giai đoạn III và IV sẽ được thu, lưu giữ trong cốc thủy tinh có chứa nước biển lọc sạch. Các túi trứng sẽ được cắt thành các đoạn ngắn 1 - 5cm và cho vào các đĩa petri (là một loại đĩa được làm bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có dạng hình trụ mà các nhà sinh vật học sử dụng để nuôi cấy tế bào hay những cây rêu nhỏ). Thí nghiệm được bố trí 3 đĩa petri có chứa dung dịch tách chiết mô thần kinh và 3 petri chỉ chứa dung dịch nước biển sạch làm đối chứng âm. Peptide trong các đĩa petri được sử dụng theo hướng dẫn của (Chieu, Turner et al. 2019) với nồng độ là 0,2 µg/µl RNE. Định kỳ 30 phút, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi và chụp ảnh ống sinh dục và noãn bào.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hình thái cấu tạo của tuyến sinh dục hải sâm

Loài hải sâm đen là loài sinh sản đơn tính, có giới tính đực và cái phân biệt rõ ràng. Việc phân biệt giới tính hải sâm bằng mắt thường khi quan sát hình thái ngoài là rất khó, cần phải tiến hành giải phẫu hoặc sử dụng phương pháp sinh thiết Biopsy để kiểm tra tuyến sinh dục của con đực và cái. Hình thái giải phẫu của tuyến sinh dục loài hải sâm đen (*H. leucopilota*) được thể hiện trong Hình 3.

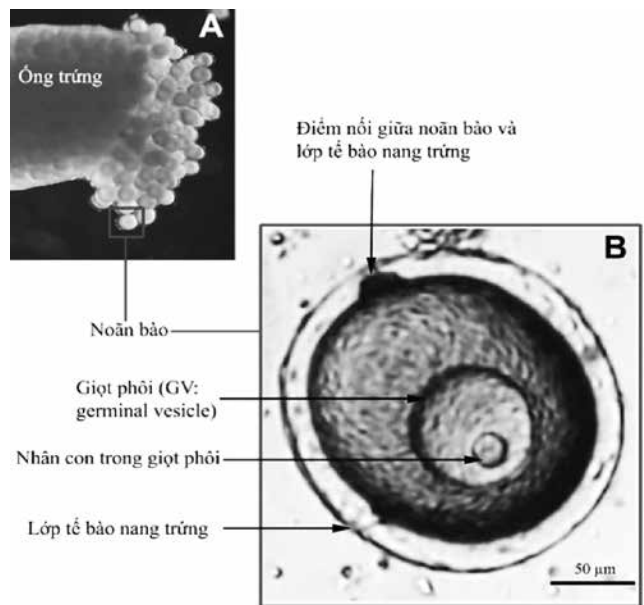


▲ Hình 3. Hình thái tuyến sinh dục cái (A) và tuyến sinh dục đực (B) của loài hải sâm đen (*H. leucopilota*)

Tuyến sinh dục của hải sâm là các ống phát triển thành từng nhánh như chùm rong biển, nằm cạnh màng treo ruột. Các nhánh này sẽ nối vào lỗ sinh dục để phóng trứng và tinh trùng ra môi trường ngoài khi đến giai đoạn sinh sản. Lỗ sinh dục này nằm ở mặt lưng, vị trí khoảng 1/3 chiều dài cơ thể tính từ đầu hải sâm. Bên trong các ống tuyến sinh dục có chứa trứng và tinh trùng, kích thước ống và trứng sẽ tăng dần theo giai đoạn phát triển của tuyến sinh dục. Khi tới giai đoạn thành thực, tuyến sinh dục cái có màu hồng nhạt cho đến đậm, tuyến sinh dục đực có màu vàng nhạt đến trắng sữa (Hình 3).

3.2. Hình thái cấu tạo của noãn bào hải sâm

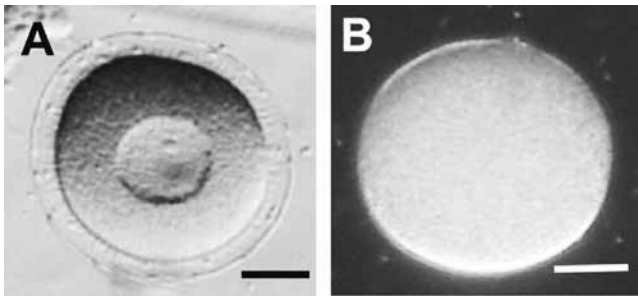
Khi tuyến sinh dục cái đạt đến giai đoạn IV (hoàn toàn trưởng thành), trứng phát triển chiếm đầy các ống dài/ống trứng (Hình 4A) và các tế bào trứng/noãn bào đồng đều và đạt kích cỡ lớn nhất 170 - 180 µm đường kính (Hình 4B).



▲ Hình 4. Hình thái cấu tạo của noãn bào hải sâm quan sát dưới kính hiển vi. A: Hình ảnh các noãn bào đang gắn kết trong ống trứng hải sâm. B: Hình ảnh phóng đại một noãn bào hải sâm

Lớp tế bào nang trứng: Noãn bào chứa trứng thành có 1 lớp tế bào nang trứng bao phủ xung quanh. Noãn bào có một điểm nhô ra và nối với lớp tế bào nang trứng (Hình 4B). Vai trò của lớp tế bào nang trứng đã được nghiên cứu ở một số loài thủy sản, tuy nhiên, ở hải sâm vẫn còn là một vấn đề cần nghiên cứu tìm hiểu sâu hơn.

Giọt phôi và nhân con: Trong noãn bào chứa trứng thành, giọt phôi và nhân con nằm trong giọt phôi có thể quan sát thấy trên kính hiển vi. Giọt phôi có kích thước đường kính khoảng 50 - 60 µm và nhân con có kích thước khoảng 7 - 10 µm khi tuyến sinh dục cái đang ở giai đoạn IV (hoàn toàn trưởng thành) (Hình 4B).

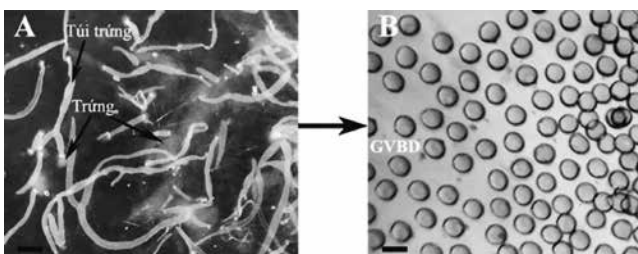


▲ Hình 5. Phân biệt noãn bào chưa trưởng thành (A) và noãn bào đã trưởng thành với màng nhân phôi vỡ ra tạo thành thể đồng nhất (B), thước trong hình biểu hiện 50 μm

Noãn bào chưa trưởng thành được đặc trưng bởi sự xuất hiện nguyên vẹn của giọt phôi, nhân con và có thể vẫn còn lớp tế bào nang trứng hoặc đã tự loại bỏ lớp tế bào nang trứng (Hình 4B và Hình 5A). Đặc điểm của noãn bào trưởng thành là có hiện tượng vỡ màng nhân (GVBD - Germinal Vesicle Breakdown), tức là giọt phôi và nhân con vỡ không quan sát thấy trên kính hiển vi và noãn bào tạo thành một thể đồng nhất (Hình 5B). Trong sinh sản, chỉ những noãn bào trưởng thành mới có khả năng thụ tinh tạo thành hợp tử. Chính vì vậy, noãn bào trưởng thành là yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của sinh sản nhân tạo hoặc sinh sản tự nhiên.

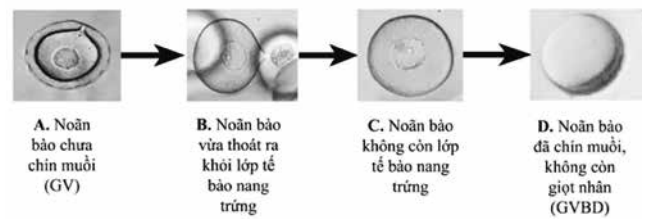
3.3. Kết quả kích hoạt sự trưởng thành của noãn bào

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 30 phút, trứng trong ống tuyến sinh dục cái (túi trứng) tự động được đẩy ra ngoài. Sau 60 phút, hầu hết trứng đã được đẩy ra ngoài ống tuyến sinh dục cái (Hình 6A). Sau khi trứng đã được đẩy ra khỏi ống tuyến sinh dục, 99% trứng đã trưởng thành, noãn bào không còn giọt nhân (hiện tượng vỡ màng nhân - GVBD) tạo thành một thể đồng nhất (Hình 6B). Tuy nhiên, cơ chế tác động của RNE đến ống tuyến sinh dục và tế bào trứng cần được nghiên cứu tiếp trong thời gian tới.



▲ Hình 6. Noãn bào được kích hoạt trưởng thành bởi dung dịch RNE. (A) Các ống tuyến sinh dục cái được ngâm trong dung dịch RNE, sau 30 phút trứng bắt đầu tự động được đẩy ra khỏi túi trứng. (B) Hình ảnh quan sát trên kính hiển vi thấy trứng đạt 99% trưởng thành sau khi thoát ra khỏi ống tuyến sinh dục. Thước đo trên hình A thể hiện 1cm; thước đo trên hình B thể hiện 200 μm

Bắt đầu từ điểm nối giữa noãn bào và lớp màng tế bào nang trứng xuất hiện sự dịch chuyển của noãn bào (Hình 7A), noãn bào bắt đầu tự động thoát ra khỏi màng tế bào nang trứng, màng tế bào nang trứng sẽ tụ lại thành một khối nhỏ nằm cạnh noãn bào (Hình 7B). Lúc này, noãn bào ở dạng không có lớp tế bào nang trứng nhưng giọt phôi và nhân con vẫn còn quan sát thấy (Hình 7C). Tiếp sau đó, giọt phôi và nhân con bắt đầu quá trình vỡ màng nhân GVBD, noãn bào quan sát thấy ở trạng thái đồng nhất (Hình 7D). Như vậy, noãn bào đã chuyển trạng thái từ chưa trưởng thành sang trưởng thành và sẵn sàng cho quá trình thụ tinh.



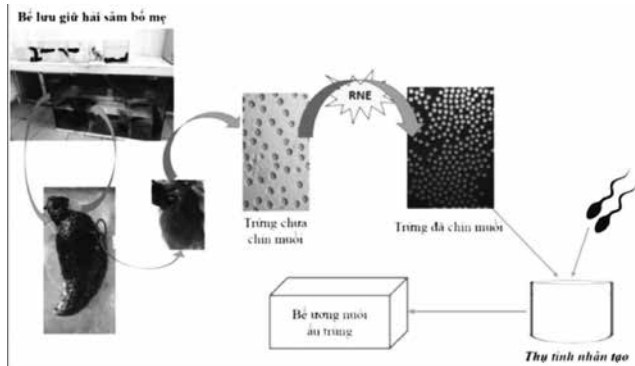
▲ Hình 7. Quá trình chuyển trạng thái trưởng thành noãn bào hải sâm khi được kích hoạt bởi dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm (RNE)

Trong khi đó, ống tuyến sinh dục cái được ngâm trong dung dịch nước biển và không có dung dịch RNE nên không có hiện tượng trứng tự động đẩy ra ngoài. Khi lấy trứng trong ống tuyến sinh dục và kiểm tra trên kính hiển vi cho thấy, noãn bào chưa trưởng thành, vẫn còn nguyên giọt phôi và nhân con trong giọt phôi.

3.4. Tiềm năng ứng dụng trong sản xuất giống

Kết quả nghiên cứu về cấu tạo của trứng hải sâm và sự khác biệt giữa trứng chưa trưởng thành và trưởng thành làm cơ sở khoa học quan trọng cho việc sinh sản nhân tạo trong các khu sản xuất. Để thụ tinh nhân tạo thành công, việc đầu tiên phải thu được trứng trưởng thành, có hiện tượng vỡ màng nhân (GVBD). Vì vậy, trong các khu sản xuất, việc quan sát hiện tượng GVBD của trứng là khá quan trọng trước khi tiến hành thụ tinh nhân tạo.

Đồng thời, kết quả kích thích trưởng thành noãn bào bằng dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm cho thấy đây là giải pháp thay thế trong trường hợp các phương pháp kích thích sinh sản thông thường (kích thích bằng sốc nhiệt, phơi khô - phun nước, sử dụng dung dịch tinh trùng...) không đạt hiệu quả cao. Từ kết quả này có thể đưa ra một phương pháp thụ tinh nhân tạo mới bằng dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm (RNE). Theo đó, nhóm nghiên cứu đề xuất quy trình này gồm: (1) Sử dụng phương pháp sinh thiết Biopsy để phân tách, lưu giữ hải sâm đực, cái; (2) Sử dụng phương pháp vi mổ bên thành cơ thể để thu gom tuyến sinh dục từ hải sâm bố mẹ. Hải sâm bố mẹ được đưa lại bể lưu giữ, chăm sóc để phục hồi tuyến sinh dục mới; (3) Kích thích trưởng thành noãn bào bằng dung dịch RNE; (4) Trộn trứng trưởng thành và tinh trùng để thụ tinh nhân tạo; (5) Thu gom và ương nuôi ấu trùng hải sâm thành con non (Hình 8).



▲ Hình 8. Đề xuất phương án sinh sản nhân tạo hải sâm bằng dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm (RNE)

Hiện nay, người dân đang nuôi hải sâm ở các ao đầm bờ hoang ven biển hoặc các vũng vịnh ven bờ biển Việt Nam. Nhu cầu con giống hải sâm đang rất lớn, đặc biệt là các tỉnh miền Trung với diện tích ao đầm bờ hoang ven biển nhiều. Việc sinh sản nhân tạo hải sâm đã được triển khai tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 3, Viện Nghiên cứu Hải sản và một số khu sản xuất, tuy nhiên, vẫn chưa cung cấp đủ con giống như nhu cầu của thị trường. Để đẩy mạnh hiệu quả hơn nữa trong sản xuất giống hải sâm, phương pháp sinh sản nhân tạo hải sâm bằng dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm (RNE) cũng là phương án tốt trong trường hợp hải sâm bố mẹ chưa đạt trưởng thành thành thực để có thể kích thích bằng phương pháp thông thường.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã mô phỏng chi tiết hình thái cấu tạo của noãn bào hải sâm và sự khác biệt giữa noãn bào chưa trưởng thành và noãn bào trưởng thành làm cơ sở khoa học cho các bước thử nghiệm sinh sản nhân tạo in vitro ở các loài hải sâm.

Nghiên cứu đã khẳng định dung dịch tách chiết mô dây thần kinh hải sâm (RNE) có khả năng kích hoạt quá trình trưởng thành noãn bào hải sâm. Kết quả này làm cơ sở khoa học cho việc sử dụng dung dịch RNE như là chất kiểm chứng kích hoạt trưởng thành noãn bào hải sâm trong các thí nghiệm in vitro về hiện tượng GVBD ở các loài hải sâm. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế kích hoạt trưởng thành noãn bào của RNE và cấu trúc phân tử của loại peptide/hormone trong dung dịch RNE có thể gây ra cơ chế trưởng thành noãn bào.

Trên cơ sở kết quả kích hoạt quá trình trưởng thành noãn bào hải sâm, nghiên cứu đã đưa ra một phương pháp thụ tinh nhân tạo mới bằng dung dịch tách chiết mô dây thần kinh

hải sâm (RNE). Phương pháp này có thể thay thế cho phương pháp kích thích sinh sản thông thường trong trường hợp hải sâm bố mẹ chưa đạt trưởng thành thành thực tuyến sinh dục

Lời cảm ơn:

Bài báo được hoàn thành dựa trên kết quả nghiên cứu của đề tài khoa học cấp Bộ NN&PTNT “Nghiên cứu quy trình sản xuất hormone kích thích sinh sản một số loài hải sâm có giá trị kinh tế ở vùng biển Việt Nam” - thực hiện từ năm 2022 - 2024, mã số: 46/2022/HĐ-KHCN-TS và đề tài cấp TP. Hải Phòng “Nghiên cứu và đề xuất bảo tồn bãi giống định cư một số loài hải sản kinh tế, quý hiếm tại Hải Phòng”, thực hiện từ 2023 - 2024, mã số: 915/HĐ-ĐT.MT.2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chieu, H. D., et al. (2018). “In vitro oocyte maturation by radial nerve extract and early development of the black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*).” *Aquaculture* 495: 247-254.
- Chieu, H. D., et al. (2019). “Aquaculture Breeding Enhancement: Maturation and Spawning in Sea Cucumbers Using a Recombinant Relaxin-Like Gonad-Stimulating Peptide.” *Frontiers in Genetics* 10: 77.
- Drumm, D. J. and N. R. Lonergan (2005). “Reproductive biology of *Holothuria leucospilota* in the Cook Islands and the implications of traditional fishing of gonads on the population.” *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 39(1): 141-156.
- Fujiwara, A., et al. (2010). “Spawning induced by cubifrin in the Japanese common sea cucumber *Apostichopus japonicus*.” *Fisheries Science* 76(5): 795-801.
- Gaudron, S. M., et al. (2008). “Reproduction of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* in the Western Indian Ocean: biological and ecological aspects.” *Invertebrate Reproduction & Development* 51(1): 19-31.
- Kato, S., et al. (2009). “Neuronal peptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*.” *Developmental Biology* 326(1): 169-176.
- Morgan, A. and L. Neal (2012). “Aspects of reproductive ecology and benthic-pelagic coupling in the sub-antarctic sea cucumber *Pseudostichopus mollis* (Theel).” *Continental Shelf Research* 43: 36-42.
- Nahla, E. S. E. S. O. (2013). “Nutritional value of some Egyptian sea cucumbers.” *African Journal of Biotechnology* 12(35): 5466-5472.
- Olivera-Castillo, L., et al. (2013). “Diets Containing Sea Cucumber (*Isostichopus badiionotus*) Meals Are Hypocholesterolemic in Young Rats.” *Plos One* 8(11): e79446.