

DÙNG PROGESTERON KÍCH THÍCH ẾCH (*Rana tigerina*) SINH SẢN USING PROGESTERONE IN INDUCED SPAWNING OF THE FROG *RANA TIGERINA*

Huỳnh Hữu Tín, Nguyễn Tường Anh
Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên TP.HCM
tiny2311@gmail.com, tuonganh5183@gmail.com

ABSTRACT

The experiments were conducted in order to determine the effect of progesterone (P) on maturation and ovulation of the frog *Rana tigerina*.

At the beginning of the rainy season, gonadosomatic index of the frog was 8.01 ± 0.91 %, relative fecundity: 9.86 ± 2.68 eggs per gramme of body weight and each gramme of ovary consisted of 509.44 ± 43.41 eggs.

Optimal dose of P that gave the spawning rate 100% was 15mg/kg of female body weight. The latency of P at temperature $28 - 29^{\circ}\text{C}$ was from 6h10' to 7h15'. Accordingly, fertilization rate was 92.31 ± 3.41 % , hatching rate was 97.17 ± 1.15 %. After having been progesterone – induced to spawn, the period of gonad recrudescence was approximately 60 days.

The above findings show that P is a very perspective spawning inducer for frog *Rana tigerina* in southern Vietnam.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ thần kinh nội tiết điều khiển sự phát triển tuyến sinh dục của cá (Nguyễn Tường Anh, 1999a) và của động vật lưỡng cư (Browne và Zippel, 2007) là rất giống nhau. Trong khi hàng loạt steroid C^{21} là có hiệu quả kích thích sinh sản ở cá (Nguyễn Tường Anh, 1999b) và nhiều công trình chứng minh được là progesteron (P) có khả năng gây chín *in vitro* cho noãn bào lưỡng cư (Masui, 1967; Schuetz, 1967; Goncharov – Гончаров, 1969; Browne và ctv., 2006a,b), rõ ràng việc thử nghiệm kích thích chín và rụng trứng cho ếch *in vivo* bằng progesteron là một đề tài lý thú và có ý nghĩa thực tiễn.

Trong thí nghiệm này progesteron được dùng để kích thích ếch Thái Lan *Rana tigerina* sinh sản.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) được chọn lọc từ nguồn ếch thương phẩm giữ lại làm giống bố mẹ và ếch bố mẹ đã sinh sản mùa trước từ trại thủy sản huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang và trại ếch giống huyện Thuận An, tỉnh Bình Dương.

Địa điểm nghiên cứu: trại nuôi ếch tại huyện Hóc Môn (Tp.HCM).



Hình 1: Ếch mẹ được nuôi trong bể xi măng

Thuốc kích thích chín và rụng trứng

- Progesteron dạng bột (hãng Sigma) được pha trong dầu ăn và tiêm vào xoang.
- Motilium – M dạng viên nén chứa 10mg hoạt chất domperidon - Antidopamin (hãng Janssen- Thái Lan), pha trong dung dịch sinh lý.
- LHRH – A chứa trong ampul, 200 μ g (xuất xứ Trung Quốc)

Phương pháp nghiên cứu



Hình 2: Ếch cái (trái), ếch đực (phải)

Hệ số thành thực và sức sinh sản của ếch cái

Hệ số thành thực là tỉ số giữa khối lượng buồng trứng so với trọng lượng toàn thân không bỏ nội quan ếch cái.

$$\text{Hệ số thành thực} = \frac{W_w}{W_t} \times 100\%$$

W_w : trọng lượng buồng trứng ếch cái (g).

W_t : trọng lượng toàn thân ếch cái (g).

Sức sinh sản tuyệt đối (Stt): tổng số trứng có trong mỗi cá thể cái trước khi sinh sản. Sức sinh sản tương đối (Std) là tỉ lệ sức sinh sản tuyệt đối của một cá thể và trọng lượng toàn thân (W_t).

$$\text{Std1} = \frac{\text{Stt}}{W_t}$$

Std: Sức sinh sản tương đối (trứng/g)

Stt: Sức sinh sản tuyệt đối (trứng)

Khảo sát tác dụng kích thích chín và rụng trứng của progesteron trên ếch

Chọn ếch cái có bụng to, đáng chậm chạp, hai bên sườn nhám. Chọn ếch đực to khỏe, kêu to, có chai tay và túi âm to. Ếch cái được tiêm sơ bộ Motilium M (Domperidone) với liều 10 mg cho kilogram ếch cái trước liều quyết định 48 giờ. Liều quyết định được tiêm như sau: lô 1 đối chứng (không tiêm); lô 2 đối chứng tiêm LHRH-A 80µg/kg; lô 3 progesteron 20mg/kg.

Liều quyết định được tiêm vào khoảng 16 - 17h chiều. Đồng thời tiêm kích thích ếch đực bắt cặp bằng LHRH-A với liều 80 µg/kg. Theo dõi tỉ lệ đẻ của từng lô thí nghiệm.

$$\text{Tỉ lệ đẻ (\%)} = \frac{\text{Số ếch đẻ}}{\text{Số ếch tiêm kích thích}} \times 100\%$$

$$\text{Tỉ lệ thụ tinh} = \frac{\text{Số trứng thụ tinh}}{100 \text{ trứng}} \times 100\%$$

$$\text{Tỉ lệ nở} = \frac{\text{Số nòng nọc nở}}{\text{Số trứng thụ tinh}} \times 100\%$$

Đánh giá thời gian tái thành thực

Ếch cái sau khi kết thúc sinh sản lần 1 được thả nuôi trong bể xi măng và được nuôi vỗ tích cực. Kích thích sinh sản lần 2 theo các nghiệm thức 15, 30, 45 và 60 ngày tính từ khi sinh sản lần 1 và đánh giá hiệu quả kích thích sinh sản bằng progesteron trên từng nghiệm thức. Theo dõi tỉ lệ sinh sản của từng nghiệm thức.

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Đánh giá sức sinh sản của ếch trước mùa sinh sản

Mức độ thành thực và điều kiện sinh sản của ếch bố mẹ là vấn đề tiên quyết ảnh hưởng đến quá trình sinh sản của ếch, đặc biệt đối với ếch bố mẹ mới sinh sản lần đầu tiên thì điều này còn quan trọng hơn.

Theo nghiên cứu của Prapree và cộng sự (2001), noãn bào trưởng thành (noãn bào cấp 6) chỉ quan sát thấy ở ếch trong mùa sinh sản, giai đoạn từ tháng 3 đến tháng 10 hàng năm, đối với ếch 11,12 tháng tuổi trở lên. Chỉ một lượng nhỏ noãn bào cấp 6 xuất hiện trước mùa mưa và khi kết thúc mùa mưa. Do đó, có thể thấy mùa sinh sản của ếch bắt đầu từ tháng 3 đến hết tháng 10 hàng năm. Sự phát triển của buồng trứng cũng tương quan với sự thay đổi điều kiện khí hậu đặc biệt là nhiệt độ và mưa.

Khảo sát hệ số thành thực, sức sinh sản của ếch cái trước mùa sinh sản giúp nhận biết và đánh giá được mức độ thành thực của ếch cái trước khi tiến hành các thí nghiệm.

Bảng 1. Hệ số thành thực và sức sinh sản của ếch cái trước mùa sinh sản.

Stt	Trọng lượng toàn thân W_t (g)	Trọng lượng buồng trứng W_w (g)	Hệ số thành thực (%)	Sức sinh sản tuyệt đối S_{tt} (trứng)	Sức sinh sản tương đối (S_{td})	Số lượng trứng trong 1g buồng trứng
1	441	32,5	7,37	16176	36,68	497,72
2	452	33,4	7,39	14105	31,21	422,31
3	486	35,2	7,24	18462	37,99	524,49
4	508	36,2	7,13	18324	36,07	506,19
5	486	35,9	7,39	18428	37,92	513,31
6	535	45,4	8,49	23693	44,29	521,87
7	320	40,5	12,66	12060	37,69	297,78
8	460	44,1	9,59	20166	43,84	457,28
9	450	45,2	10,04	21693	48,21	479,93
10	220	16,3	7,41	10424	47,38	639,51
11	410	32	7,80	16848	41,09	526,50
12	420	27,2	6,48	15102	35,96	555,22
13	372	24,1	6,48	14058	37,79	583,32
14	385	25,4	6,60	14176	36,82	558,11
15	435	35	8,05	19534	44,91	558,11
	Trung bình		$8,01 \pm 0,91$		$39,86 \pm 2,68$	$509,44 \pm 43,41$

Hệ số thành thực ếch thay đổi trong khoảng 6,48 – 12,66 %, trung bình là $8,01 \pm 0,91$ % (độ tin cậy 95%). Khi ếch cái thành thực, lượng trứng thành thực ở giai đoạn 5, 6 sẽ nhiều hơn, vì trọng lượng và kích thước của trứng thành thực (giai đoạn 5, 6) lớn hơn nhiều so với các giai đoạn trước, do đó trọng lượng buồng trứng tăng rất cao.

Do trọng lượng của trứng thay đổi qua các giai đoạn phát triển nên trọng lượng buồng trứng cao không có nghĩa ếch có nhiều trứng hơn. Vì vậy, chúng tôi muốn đưa ra hai giá trị ước lượng: (1) sức sinh sản tương đối (so với trọng lượng ếch cái), biến thiên từ 30 – 45 trứng/g, trung bình $39,86 \pm 2,68$ trứng/g (độ tin cậy 95 %); (2) số lượng trứng trong một gam buồng trứng, biến thiên trong khoảng 297 – 640 trứng/g, trung bình $509,44 \pm 43,41$ trứng/g (độ tin cậy 95 %).

Khảo sát tác dụng gây chín và rụng trứng của progesteron trên ếch

Brown và Zippel (2007) cho rằng lưỡng cư cũng giống như cá, có ba nhóm chất có thể sử dụng kích thích sự chín của noãn bào là: não thụ, phức hợp hormon và thuốc antidopamin (pimozide). Hormon có ba nhóm chính được sử dụng là: LHRH-A, HCG, progesteron.

Tại Ấn Độ Trên ếch *Rana tigerina*, Hoque và ctv.,(1995) đã nghiên cứu sử dụng LHRH-A kích thích sự phát triển của trứng ếch chưa trưởng thành. Ngoài ra, tại Việt Nam Lê Thanh Hùng (2005) đã nghiên cứu sử dụng LHRH-A kích thích ếch *Rana tigerina* sinh sản và cho kết quả khả quan.

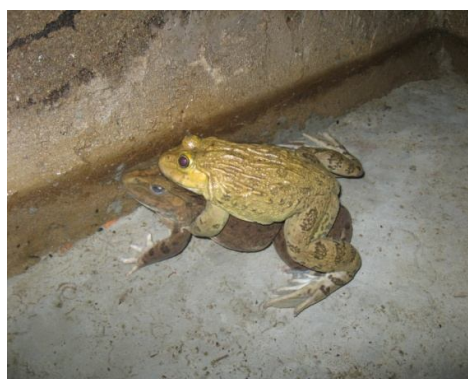
Từ giả thuyết của Wright đưa ra năm 1961, rằng việc kích thích rụng trứng lưỡng cư bằng kích dục tố đã gây ra sự hình thành progesteron và chất này kích thích trứng chín. Những công trình nghiên cứu về sau đã chứng minh được cơ chế này. Cũng nghiên cứu trên nhóm lưỡng cư, Brown và Zippel (2007) đã sử dụng progesteron kích thích sự chín và rụng trứng trên cóc *Bufo fowleri* với liều lượng 0,15mg/g cóc cái. Ngoài ra, progesteron còn được

sử dụng kích thích sự chín và rụng trứng trên ếch *Rana pipiens* kết hợp với nạo thùy ếch, liều sử dụng thay đổi tùy theo thời gian sinh sản trong năm (Masui, 1967; Schuetz, 1967)

Bảng 2. Kết quả khảo sát dùng progesteron kích thích ếch chín và rụng trứng với nhóm đối chứng không tiêm và nhóm đối chứng tiêm LHRH-A.

Nghiem thức	Đối chứng (không tiêm)	Đối chứng LHRH-A 80 µg/kg	Progesteron 20 mg/kg
Số ếch cái thí nghiệm	5	5	5
Số ếch cái đẻ	0	5	5
Tỉ lệ đẻ	0 %	100 %	100 %

Với liều progesteron 20mg/kg thể trọng ếch cái, ếch sinh sản với tỉ lệ rất cao (100%) tương đương với phương pháp kích thích bằng LHRH-A 80µg/kg (Lê Thanh Hùng, 2005). Do đó, có thể kết luận progesteron có tác dụng gây chín và rụng trứng đối với ếch Thái Lan *Rana tigerina*.



Hình 3: Ếch bắt cặp trong bể xi măng sau khi được tiêm kích thích.

Bảng 3. Kết quả khảo sát liều lượng progesteron kích thích ếch chín và rụng trứng với nhóm đối chứng không tiêm và nhóm đối chứng tiêm LHRH-A.

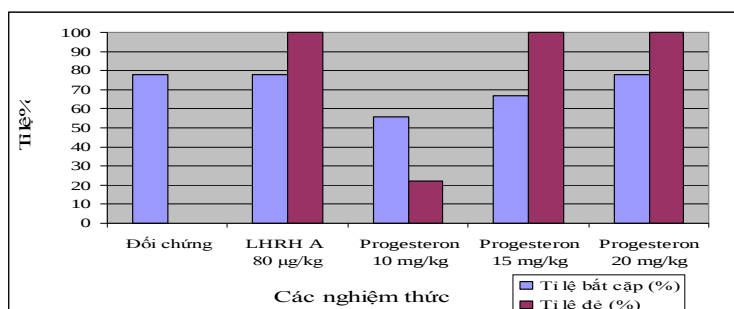
Liều quyết định	Số lượng cặp tiêm	Số ếch bắt cặp	Tỉ lệ bắt cặp (%)	Số cặp đẻ	Tỉ lệ đẻ (%)
Đối chứng	9	7	77,78	0	0,00
LHRH A 80 µg/kg	9*	7	77,78	9	100,00
Progesteron 10 mg/kg	9**	5	55,56	2	22,22
Progesteron 15 mg/kg	9	6	66,67	9	100,00
Progesteron 20 mg/kg	9	7	77,78	9	100,00

* trong số 9 ếch mẹ được tiêm LHRH-A có một ếch mẹ bị chết sau khi đẻ

** trong số 9 ếch mẹ được tiêm progesteron có hai ếch mẹ bị chết sau khi đẻ

Theo kết quả của bảng 3, liều progesteron 10mg/kg cho tỉ lệ đẻ rất thấp (22,22%). Ở nhóm đối chứng dù tỉ lệ bắt cặp cao (77,78%) nhưng ếch cái vẫn không đẻ. Trong khi đó ở nồng độ progesteron 15mg/kg, 20 mg/kg và LHRH-A 80µg/kg cho tỉ lệ đẻ cao, đạt 100%. Như vậy, tỉ lệ bắt cặp không ảnh hưởng đến tỉ lệ đẻ của ếch cái. Ếch cái sau khi được tiêm liều quyết định thích hợp dù không được ếch đực bắt cặp vẫn đẻ.

Hiện tượng ếch chết sau khi đẻ được ghi nhận có thể là do chưa có nhiều kinh nghiệm thực hiện kỹ thuật tiêm, làm tổn thương nội quan dẫn tới ếch chết.



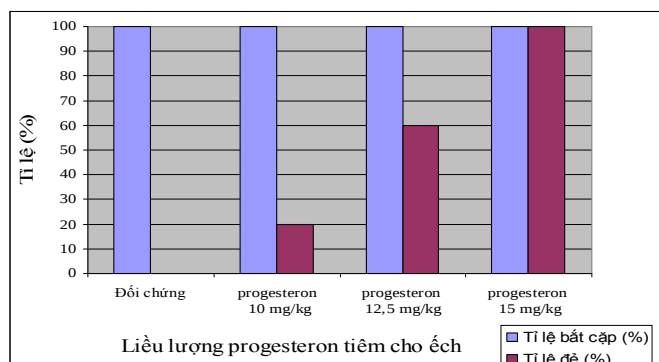
Hình 4: Biểu đồ tỉ lệ bất cập và tỉ lệ đẻ khi tiêm progesteron liều 10, 15, 20 mg/kg với nhóm chứng không tiêm và nhóm đối chứng tiêm LHRH-A

Biểu đồ hình 4 cho thấy tỉ lệ đẻ của hai liều lượng progesteron 10mg/kg và 15mg/kg chênh lệch nhau rất lớn. Smith và Ecker (1971) cho rằng có mối tương quan giữa lượng progesteron hấp phụ bởi các noãn bào và tỉ lệ chín. Theo Goncharov (1977) sự hấp thụ progesteron phụ thuộc trực tiếp vào nồng độ của nó trong môi trường, còn thời gian (từ khi progesteron tiếp xúc với noãn bào đến khi túi mầm tan biến) thì không thay đổi theo nồng độ hormon. Vì vậy, có thể liều lượng 10mg/kg chưa đủ lượng kích thích trứng rụng. Do đó, chúng tôi tiếp tục tiến hành khảo sát khoảng giữa hai mức liều là 10 mg/kg và 15 mg/kg (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả khảo sát liều progesteron kích thích ếch chín và rụng trứng

Liều quyết định progesteron	Số lượng cặp tiêm	Số ếch bất cập	Tỉ lệ bất cập (%)	Số cặp đẻ	Tỉ lệ đẻ (%)
Đối chứng	5	5	100	0	0
10 mg/kg	5	5	100	1	20
12,5 mg/kg	5	5	100	3	60
15 mg/kg	5	5	100	5	100

Ở liều 12,5 mg/kg (điểm giữa hai nồng độ 10mg/kg và 15mg/kg) kết quả tỉ lệ đẻ trứng là 60% (biểu đồ hình 5), tỉ lệ này lớn hơn 50% nhưng so với tỉ lệ đẻ trứng 100% của liều 15mg/kg thì vẫn thấp. Như vậy, liều progesteron 15mg/kg được chọn là cho kết quả tốt nhất để kích thích ếch cái chín và rụng trứng.



Hình 5. Biểu đồ tỉ lệ bất cập và tỉ lệ đẻ của ếch được tiêm kích thích progesteron với liều 10; 12,5; 15 mg/kg.

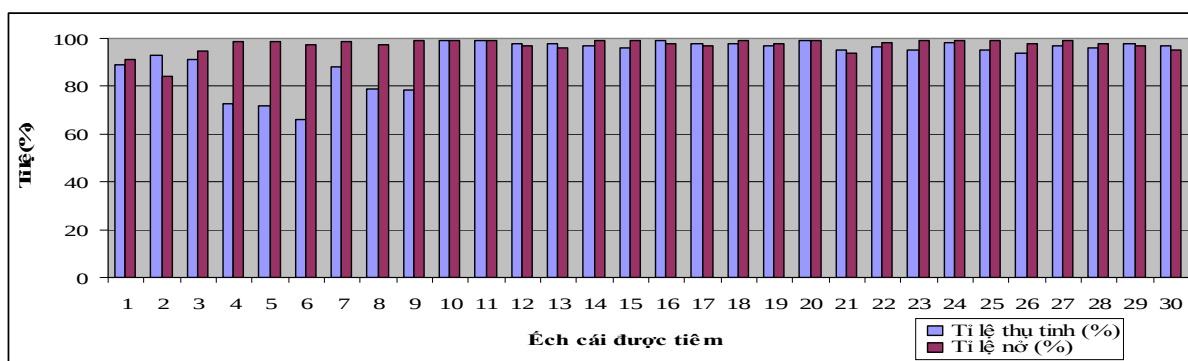
Theo dõi thời gian hiệu ứng và tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ nở khi kích thích ếch sinh sản bằng progesteron 15 mg/kg

Sau khi xác định liều progesteron 15mg/kg thích hợp để kích thích ếch cái sinh sản với kết quả rất khả quan, chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên một cỡ mẫu lớn nhằm đánh giá các chỉ tiêu sinh sản của ếch.

Bảng 5. Thời gian hiệu ứng, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ nở khi dùng progesteron liều 15mg/kg kích thích 30 ếch cái đẻ

Cặp	Trọng lượng ếch cái (g)	Thời gian hiệu ứng (giờ)	Số lượng trứng (trứng)	Tỉ lệ thụ tinh(%)	Tỉ lệ nở (%)
1	352	6h20	2136	89,11	91,11
2	298	6h55	1339	93,14	84,21
3	524	6h10	2982	91,26	94,68
4	360	6h10	1905	72,88	98,84
5	375	6h25	2063	72,00	98,61
6	380	6h12	2290	66,06	97,22
7	340	7h10	2170	88,24	98,89
8	372	6h45	2146	78,85	97,56
9	375	6h15	2063	78,40	98,98
10	430	6h24	2565	99,16	99,15
11	325	7h06	1788	99,00	98,99
12	380	6h20	2490	98,00	96,94
13	370	6h35	2235	98,00	95,92
14	382	6h22	2010	97,09	99,00
15	300	6h50	1608	96,00	98,96
16	395	6h38	2273	99,00	97,98
17	382	6h15	2191	98,00	96,94
18	365	6h40	2008	97,94	98,95
19	368	6h52	2124	97,03	97,96
20	371	6h42	2041	99,00	98,99
21	355	6h43	2153	95,10	93,81
22	361	6h15	1986	96,30	98,08
23	374	7h05	2157	94,95	98,94
24	340	6h35	1770	98,04	99,00
25	368	7h08	2124	95,05	98,96
26	354	6h53	1997	94,00	97,87
27	372	6h46	2846	97,00	98,97
28	390	7h15	2245	95,83	97,83
29	325	6h50	1788	97,94	96,84
30	355	6h45	1805	97,01	95,05
	Trung bình	6h39' ± 7,2'		92,31±3,41	97,17±1,15

Thời gian hiệu ứng của progesteron 15mg/kg kích thích ếch cái đẻ thay đổi từ 6 giờ 10 phút đến 7 giờ 15 phút ở nhiệt độ 28 – 29°C, trung bình là 6 giờ 39 phút, sai số là 7,2 phút (độ tin cậy là 95%), dài hơn so với thời gian hiệu ứng của LHRH-A (5 – 6 giờ).



Hình 6: Biểu đồ biểu diễn tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ nữ của 30 ếch cái được kích thích bằng progesteron liều 15mg/kg

Theo Browne và Zippel (2007), LHRH-A được tiêm vào kích thích tuyến yên tiết kích dục tố (LH và FSH). Các hormon này tác động lên buồng trứng để sản xuất progesteron, là chất kích thích trứng chín và rụng. LHRH-A có tác dụng không có tính chọn lọc, để tuyến yên tiết ra LH và FSH kích thích lên buồng trứng, gây ra sự chín và đặc biệt là rụng trứng hàng loạt, bất kể trứng đó đã thành thực hay chưa. Chính những trứng non này làm cho tỉ lệ thụ tinh thấp hơn so với con số cùng loại khi sử dụng progesteron. Tỉ lệ thụ tinh khi kích thích bằng progesteron cho kết quả khá cao (trung bình 92,31%) so với kết quả thu được khi sử dụng LHRH-A (60,23%), (Lê Thanh Hùng, 2005). Trong khi đó, tỉ lệ nữ không chênh lệch nhiều giữa hai nghiệm thức dùng hormon (vì tỉ lệ này được tính từ số trứng đã thụ tinh). Tỉ lệ nữ của phương pháp kích thích bằng progesteron trung bình là 97,17 % ($\pm 1,15$ %), không khác nhiều so với phương pháp kích thích bằng LHRH-A là 95,97 % (Lê Thanh Hùng, 2005).

Thời gian tái thành thực và sinh sản trở lại của ếch cái

Thí nghiệm thực hiện trên nhóm ếch đã sinh sản một lần với những thời điểm khác nhau kể từ lần sinh sản thứ nhất nhằm đánh giá mức độ tái thành thực và khả năng sinh sản của ếch.

Bảng 6: Kết quả thí nghiệm khảo sát thời gian tái thành thực trên ếch cái đã sinh sản một lần.

Lô	Khoảng thời gian giữa hai lần sinh sản	Ếch tham gia sinh sản (cặp)	Số ếch cái sinh sản	Tỉ lệ sinh sản (%)
1	15 ngày	5	0	0
2	30 ngày	5	1	20
3	45 ngày	5	4	80
4	60 ngày	5	5	100

Sau 30 ngày, ếch có thể đẻ tiếp lần hai nhưng tỉ lệ đẻ rất thấp (20%) so với trường hợp sau 45 ngày (80%) và 60 ngày (100%). Ếch không đẻ lại sau 15 ngày kể từ lần đẻ trước (lô 1).

Ở ếch cái, buồng trứng phát triển không đồng đều, các noãn bào lệch pha nhau nên trong năm ếch thường sinh sản nhiều lần. Trong điều kiện tự nhiên, ở ếch cái sau khi đẻ xong nguồn kích dục tố nội sinh chứa trong các tế bào tạo kích dục tố của tuyến yên cạn kiệt. Do đó ếch cần phải có thời gian để phục hồi trở lại và cả để tích lũy dưỡng chất cho sự tạo noãn hoàng. Thường trong tự nhiên, lượng thức ăn cho ếch không đầy đủ nên ếch chỉ có thể sinh sản 2 – 3 lần, và còn tùy theo điều kiện thời tiết đặc biệt là yếu tố nhiệt độ và tình trạng

mưa nắng. Trong môi trường nuôi nhân tạo, ếch được cung cấp đầy đủ thức ăn và tích lũy dinh dưỡng nhanh hơn, đồng thời sự sinh sản được kích thích bằng kích dục tố hoặc progesteron từ bên ngoài (không phải bằng GnRH như LHRH-A) nên lượng kích dục tố nội sinh được bảo toàn giúp cho quá trình tạo noãn hoàng tiếp theo được liên tục. Như vậy, nếu ếch cái được nuôi vỗ tốt, thời gian tái thành thực sẽ ngắn và có thể sinh sản được nhiều lần hơn so với ếch sống và sinh sản trong điều kiện tự nhiên cũng như ếch được kích thích bằng LHRH-A là hoạt chất làm kiệt quệ nguồn kích dục tố nội sinh.

KẾT LUẬN

Có thể kích thích ếch cái đẻ bằng những chất không có nguồn gốc là protein hay peptid như kích dục tố hay LHRH-A

Kết quả nghiên cứu cho thấy sau liều sơ bộ bằng domperidon (10mg/kg) progesteron ở liều 15mg/kg có thể kích thích ếch *Rana tigerina* chín, rụng trứng và cho tỉ lệ sinh sản, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ nở cao. Rất có thể những ếch sau khi đẻ nhờ được kích thích bằng các hoạt chất nói trên có thời gian tái thành thực ngắn hơn so với trường hợp đẻ tự nhiên hoặc được kích thích bằng LHRH-A.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Tường Anh, 1999a. Một số vấn đề về nội tiết học sinh sản cá. NXB Nông nghiệp. 238 tr.
- Nguyễn Tường Anh, 1999b. Triển vọng ứng dụng một số steroid C²¹ để kích thích cá sinh sản ở quy mô sản xuất. *Tập san Khoa học Kỹ thuật Nông - Lâm nghiệp*. 11: 33-40
- Nguyễn Tường Anh, 2004. *Kỹ thuật sản xuất giống một số loài cá nuôi*, Nxb Nông Nghiệp, 104 tr.: 32-43
- Lê Thanh Hùng, 2005. Thực nghiệm nuôi ếch thâm canh với thức ăn nhân tạo tại TP.HCM: xây dựng mô hình sản xuất giống và nuôi thâm canh. *Đề tài nghiên cứu khoa học, trường Đại học Nông Lâm TP.HCM*.
- Browne R K, Serrat J, Li H, Kouba A. 2006a. Progesterone improves the number and quality of hormonally induced Fowlers toad (*Bufo fowleri*) oocytes, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4: 3.
- Browne R K, Serrat J, Vance C, Kouba A., 2006b, Hormonal induction with priming and *in vitro* fertilization increases egg numbers and quality in the Wyoming toad (*Bufo baxteri*), *Reprod Biol Endocrinol.* 4: 34.
- Browne R K., Zippel K., 2007. Reproduction and larval rearing of amphibians, *ILAR Journal* 48(3): 214-234.
- Goncharov. B F., 1977. Sự điều khiển bằng hormon quá trình tạo noãn hoàng và thành thực ở cá và lưỡng cư. (bản dịch của Nguyễn Tường Anh). *Tập san Khoa học kỹ thuật nông nghiệp* 3, ĐH Nông Nghiệp 4 TP.HCM: 155-159.
- Hoque B., 1995. Induction of ovarian follicular development in the subadult frog *Rana tigerina* using luteinizing hormone releasing hormone-acetate, *J. Biosci.*, Vol.20, 4: 563 – 572.
- Masui Y, 1967. Relative role of the pituitary follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exptl. Zool.*, 166: 365-376.
- Prapee Sretaruga, Wattana Weerachatanukul, Jittipan Chavadej, Maleeya Kruatrachue, Prasert Sobhon, 2001. Classification of Developing Oocytes, Ovarian Development and Seasonal Variation in *Rana tigerina*, *Science Asia* 27: 1–14.

Schuetz A W, 1967. Mechanism of progesterone- and pituitary-induced germinal vesicle breakdown in oocytes of *Rana pipiens*. *J. Cell. Biol.* 35:123A

Smith L. D., Ecker R. E., 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Develop. Biol.* 25: 232-247.

Wright P A, 1961. Induction of ovulation in vitro in *Rana pipiens*. *Gen and Compar. Endocrinol.* 1: 20-23.

Гончаров Б Ф. 1969. Подавляющее действие гипофиза на созревание ооцитов лягушек и осетра. – Демонстрации на Международной эмбриологической Конференции. М. “Наука” с.27.