

TỔNG QUAN CÁC PHƯƠNG PHÁP KÍCH THÍCH SINH SẢN Ở LỚP CHÂN BỤNG (GASTROPODA)**Lê Văn Bình*, Ngô Thị Thu Thảo*****Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ*****Tác giả liên hệ: lvbinh654@gmail.com*

Ngày nhận bài: 13.12.2021

Ngày chấp nhận đăng: 27.05.2022

TÓM TẮT

Mục tiêu của bài viết là tổng hợp một số vấn đề về cơ chế kích thích sinh sản ở động vật thân mềm Chân bụng sống trong môi trường nước mặn và nước ngọt. Các yếu tố dinh dưỡng, môi trường (chiếu sáng, nhiệt độ và chu kỳ thủy triều) ảnh hưởng đến việc thay đổi hệ thống nội tiết ở các loài động vật thân mềm Chân bụng, những thay đổi trong điều kiện môi trường tác động đến sự thay đổi của cấu trúc sinh sản. Kích thích sinh sản bằng chu kỳ chiếu sáng, nhiệt độ, thay đổi nguồn nước, dung dịch oxy già (H_2O_2) đều ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương, kích thích quá trình đẻ trứng của đa số các loài động vật thân mềm Chân bụng. Đối với các loài thuộc Lớp Chân bụng sống trong nước mặn, phương pháp kích thích bằng H_2O_2 , tia cực tím hay sốc nhiệt đều cho hiệu quả sinh sản tốt. Trong khi đó các loài Chân bụng sống trong nước ngọt được kích thích sinh sản bằng phương pháp mang lại hiệu quả là thay đổi chiều cao cột nước hoặc kết hợp với phun mưa, tiêm não thủy và cắt xúc tu.

Từ khóa: Cơ chế kích thích sinh sản, điều kiện môi trường, lớp Chân bụng, phương pháp kích thích sinh sản.

Methods of Spawning Induction In Gastropoda - A Review**ABSTRACT**

The goal of this article was to summarize some of the mechanisms of spawning induction in gastropoda in the marine and freshwater environment. Nutritional and environmental factors (lighting, temperature, and the tidal cycle-for marine species) affected the changes of the endocrine system in gastropoda. The changes in environmental conditions also affected the change of reproductive structure. Illumination cycle, temperature, change of water source, and hydrogen-peroxide solution (H_2O_2) affected the central nervous system, stimulating the egg-laying process of most gastropoda. For marine gastropods, using H_2O_2 solution and ultraviolet or heat shock all gave good spawning efficiency. However, other methods such as changing the water depth or combined with rain spraying, pituitary gland injections, and tentacle cutting were more effective in spawning induction for freshwater gastropoda.

Keywords: Environmental conditions, fertility, stimulation mechanism, gastropoda, methods of spawning induction.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chân bụng Gastropoda là lớp có thành phần loài phong phú nhất, chiếm khoảng 75-80% số loài trong ngành động vật thân mềm hiện nay (McArthur & Harasewych, 2003). Ở Việt Nam có khoảng 70.000 loài thuộc lớp Chân bụng đang hiện hữu. Trong đó có khoảng 45.000 loài sống dưới nước ở cả 3 loại thủy vực nước mặn, lợ, ngọt (Nguyễn Chính, 1996). Đến nay, các nghiên cứu về sản xuất giống nhân tạo các loài thuộc lớp Chân bụng mới chỉ tập trung vào một số đối tượng có giá trị kinh tế cao như ốc

hươu, bào ngư, ốc nhảy và ốc đĩa (Moss & cs., 1995; Nguyễn Thị Xuân Thu & cs., 2004; Sreejaya, 2008; Hà Văn Ninh, 2015). Theo Visser & cs. (2010), các yếu tố môi trường bên ngoài (nhiệt độ, ánh sáng, hàm lượng oxy hòa tan, thức ăn, dòng chảy, mực nước và mùa vụ) kết hợp với yếu tố bên trong đóng vai trò thiết yếu trong việc điều chỉnh sinh sản ở động vật thân mềm Chân bụng và có thể tương tác với nhau cũng như với các cơ chế nội tiết và thần kinh điều khiển hệ thống sinh sản (Koene, 2010). Những thay đổi của điều kiện môi trường dẫn đến sự thay đổi của cấu trúc sinh sản

(Gomot, 1990) và có tác dụng kích thích màng tế bào thần kinh nội tiết kích thích quá trình đẻ trứng (Dogterom & cs., 1983; Joosse, 1984). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng chu kỳ chiếu sáng, thay đổi nguồn nước và hàm lượng oxy hòa tan sẽ kích thích chức năng sinh sản, trong khi thức ăn và mùa vụ có tác dụng ức chế khả năng sinh sản của một số loài thuộc lớp Chân bụng (Dogterom & cs., 1983); mặt khác, cường độ và thời gian chiếu sáng có tác dụng kích thích màng tế bào thần kinh nội tiết tiết ra caudodorsal kích thích quá trình đẻ trứng (Joosse, 1984) hay nhiệt độ là yếu tố hạn chế sự phát triển của tinh trùng trong quá trình ngủ đông ở một số loài Chân bụng (Gomot & cs., 1989; Hunter & Stone, 1986). Bài báo này trình bày tổng quan các thông tin về hệ thống nội tiết, cơ chế sinh sản và các phương pháp kích thích sinh sản của động vật thân mềm Chân bụng.

2. HỆ THỐNG NỘI TIẾT VÀ CƠ CHẾ KÍCH THÍCH SINH SẢN Ở ĐỘNG VẬT THÂN MỀM CHÂN BỤNG

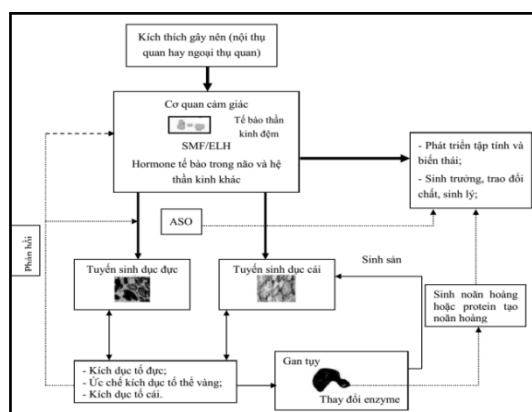
2.1. Hệ thống nội tiết ở động vật thân mềm Chân bụng

Hệ thần kinh trung ương của động vật thân mềm (ĐVTM) tương đối đơn giản, do tế bào thần kinh của ĐVTM có kích thước lớn (một số có đường kính tới 1mm) và có thể biểu hiện các phản ứng sinh lý tế bào (sinh lý sinh sản) đối

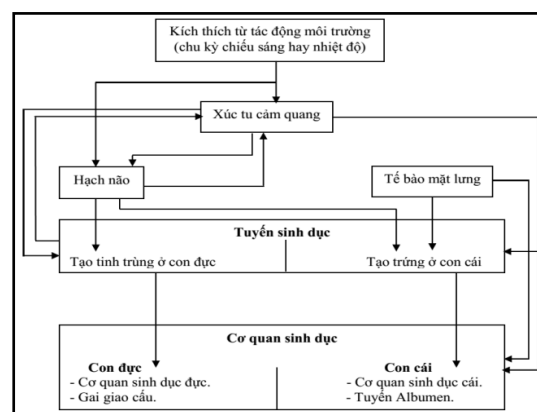
với các tín hiệu môi trường (Hình 1A, B) so với động vật có xương sống (Joosse, 1984).

2.2. Một số cơ chế tác động đến quá trình sinh sản của lớp Chân bụng

Các yếu tố môi trường bên ngoài (nhiệt độ, ánh sáng, hàm lượng oxy hòa tan, thức ăn, dòng chảy và mùa vụ) kết hợp với yếu tố bên trong đóng một vai trò thiết yếu trong việc điều chỉnh sinh sản (Hình 2) ở động vật thân mềm Chân bụng (Goldman & cs., 2004; Visser & cs., 2010). Các yếu tố môi trường và sinh học có thể tương tác với nhau (Hình 2), cụ thể như: ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự hoà tan oxy làm thay đổi khối lượng trứng (Kranenbarg & cs., 2001), ánh sáng có ảnh hưởng đến khối lượng cơ thể (Biermann & cs., 1992) hay ánh sáng có ảnh hưởng đến tập tính ăn của loài (Williamson & cs., 1999),... và cũng như với các cơ chế nội tiết và thần kinh điều khiển hệ thống sinh sản (Koene, 2010; Visser & cs., 2010). Các điều kiện môi trường thay đổi sẽ dẫn đến sự thay đổi của cấu trúc sinh sản (Gomot, 1990). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng chu kỳ ánh sáng, thay đổi nguồn nước và oxy hòa tan sẽ làm kích thích chức năng sinh sản, trong khi thức ăn và mùa vụ có tác dụng ức chế khả năng sinh sản của ốc *Lymnaea stagnalis* (Dogterom & cs., 1983). Ánh sáng có tác dụng kích thích màng tế bào thần kinh nội tiết tiết ra caudodorsal kích thích quá trình đẻ trứng (Joosse, 1984; Goldman, 2001).



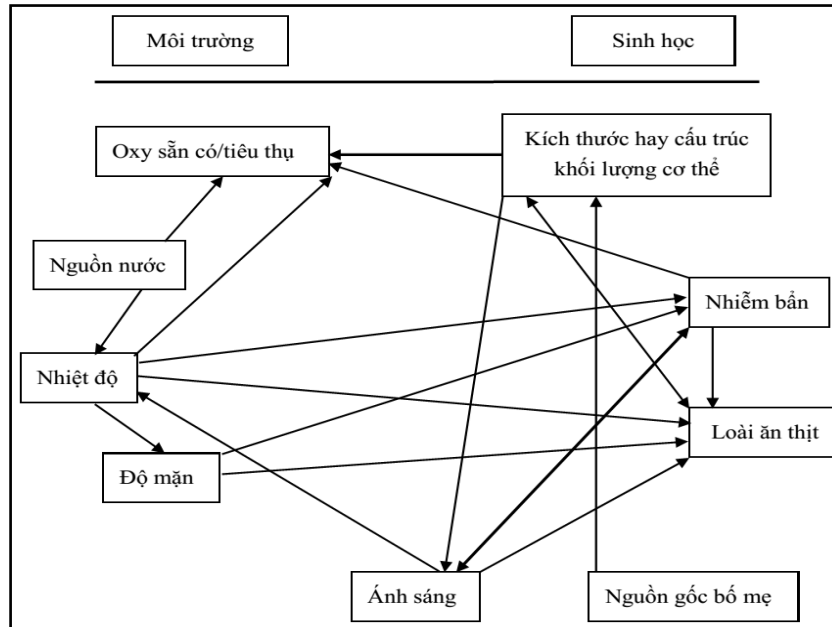
(A)



(B)

Nguồn: Joosse & Geraerts (1983); Ruppert & cs. (2004)

Hình 1. Mô hình điều hòa thể nội tiết của động vật thân mềm Chân bụng, chuyển hóa và các quá trình sinh lý



Ghi chú: →: Chỉ ảnh hưởng một bên; ↔: Hai bên ảnh hưởng lẫn nhau.

Nguồn: Przeslawski (2004)

Hình 2. Mối liên hệ giữa các yếu tố môi trường và sinh học có thể ảnh hưởng đến sự phát triển trứng ở lớp Chân bụng

2.2.1. Phương pháp kích thích sinh sản bằng chu kỳ chiếu sáng

Thời gian chiếu sáng ảnh hưởng đến hầu hết các chu kỳ sinh sản của động vật ở các vùng ôn đới. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến quá trình sinh sản đã được nghiên cứu ở các loài thuộc họ Lymnaeidae và Planorbidae, ở một số loài ốc *Melampus* sp., ốc ma *Lymnaea stagnalis* và ốc *Bulinus truncatus* (Joosse, 1984; Bayomy & Joosse, 1987), trong khi Sokolove & McCrone (1978) cho thấy vai trò chính của thời gian chiếu sáng (ngày dài) đến sự trưởng thành của hệ thống sinh dục ở ốc *Limax maximus*. Nghiên cứu trên loài ốc sên *Helix aspersa* có phân bố địa lý rộng, cho thấy tầm quan trọng của thời gian chiếu sáng đối với quá trình sinh sản. Ở ốc *Helix aspersa* nhiệt độ thấp là yếu tố hạn chế sự phát triển tinh trùng trong quá trình ngủ đông, nhưng sự ức chế sinh sản bởi nhiệt độ thấp ở loài này có thể được khắc phục bằng cách kéo dài chu kỳ chiếu sáng (Gomot & cs., 1989)

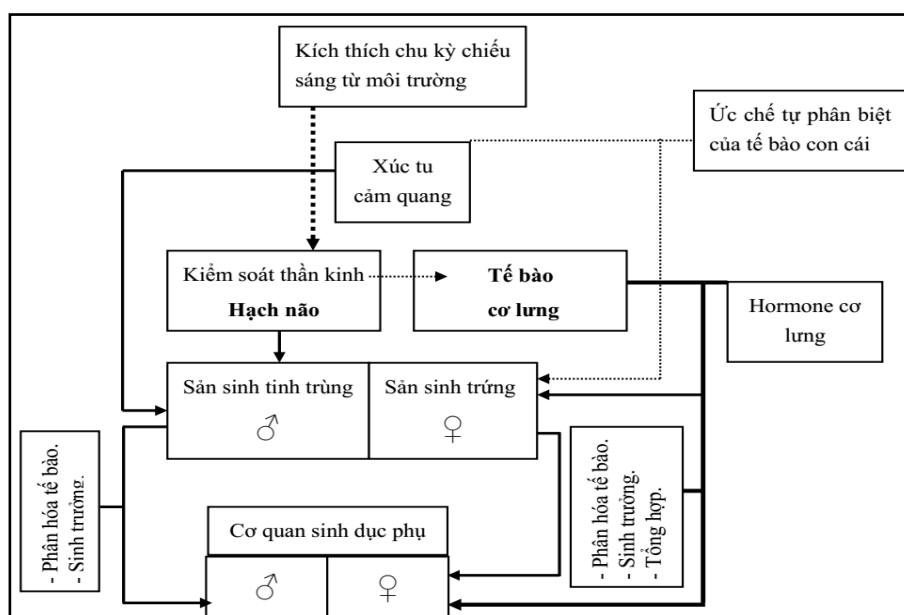
Trong nghiên cứu của Hunter & Stone (1986), thời gian chiếu sáng hầu như ít có hiệu

quả đối với hoạt động đẻ trứng của loài ốc *Cepaea nemoralis* so với loài *Helix aspersa*. Các tác giả cũng đã thu được kết quả là hoạt động đẻ trứng của loài ốc này trong các chu kỳ chiếu sáng là như nhau, tuy nhiên nếu thay đổi nhiệt độ từ 23-28°C thì kết quả sinh sản có sự khác biệt. Các cơ chế trung gian ảnh hưởng đến chu kỳ chiếu sáng và nhiệt độ có thể tác động đến hoạt động của hệ thống sinh dục của ốc *Helix aspersa* (Gomot & cs., 1989) hoặc mức độ sản sinh ra hormone đẻ trứng (chưa được xác định ở ốc sên). Tuy nhiên, ở ốc *Lymnaea stagnalis* sự tổng hợp của hormone này bị ức chế bởi chu kỳ chiếu sáng ngắn và nhiệt độ thấp (Joosse, 1984). Các chất trung gian khác được tiết ra ở mặt lưng của dạ dày (Saleuddin & cs., 1983) hoặc chất tiết prostaglandin có thể tham gia vào quá trình sinh sản ở ốc *Helisoma* (Kunigelis & Saleuddin, 1986), ngoài ra, chất này còn ảnh hưởng đến hệ thống thần kinh của ốc sên *Helix pomatia* (Gomot, 1990). Sokolove & cs. (1984) đã chứng minh rằng sự thành thực của hệ thống sinh sản ở giống ốc *Limax* phụ thuộc vào tín hiệu chu kỳ chiếu sáng (Hình 3). Ốc sên tiếp xúc

với chu kỳ chiếu sáng có ngày dài hơn sẽ tăng trưởng và phát triển tuyến sinh dục đực (mức độ thành thực của tinh trùng) và tuyến albumin cơ quan sinh dục cái. Các hạch não của động vật thân mềm thuộc lớp Chân bụng là trung tâm điều khiển và đóng vai trò trung gian ảnh hưởng đến hệ thống sinh sản của cả con đực và cái (McCrone & cs., 1981).

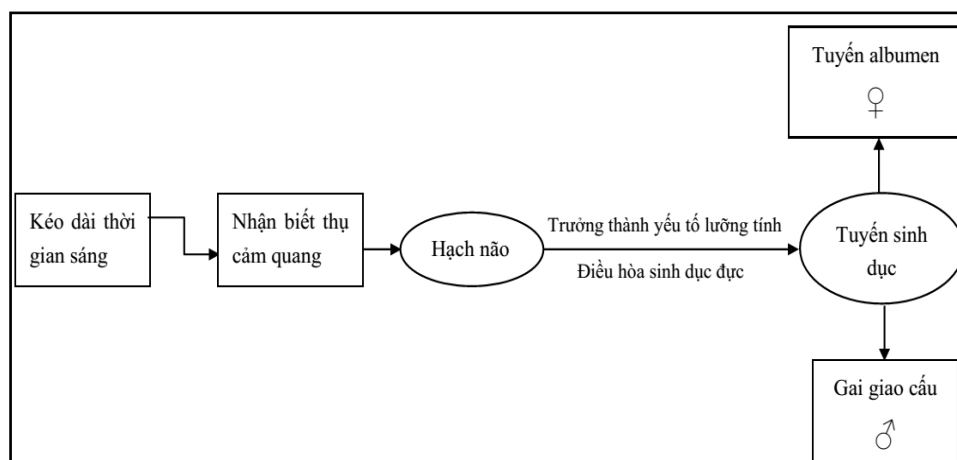
Chu kỳ chiếu sáng kích hoạt tế bào thần kinh trong não, kích hoạt các tuyến sinh dục, từ

đó kích thích sinh sản của các cơ quan sinh dục phụ. Chu kỳ chiếu sáng dài kích thích tế bào cảm quang, kích hoạt tế bào thần kinh trong hạch não tiết ra hoạt chất tác động đến tăng trưởng của tế bào sinh dục và hormon điều hòa sinh dục ở ốc *Limax* đực (Hình 4). Những tế bào tiết từ hạch não kích thích tuyến sinh dục giải phóng hormone kích thích hoạt động sinh sản của cơ quan sinh dục cái và đực (Wayne, 2001).



Nguồn: Joosse & Geraerts (1983)

Hình 3. Hệ thống nội tiết điều khiển hoạt động sinh sản ở lớp Chân bụng, chủ yếu là ốc *Helix aspersa* và ốc *Lymnaea stagnalis*



Nguồn: Wayne (2001)

Hình 4. Mô hình kích thích bằng chu kỳ chiếu sáng đến hệ thống sinh sản của ốc *Limax*

2.2.2. Phương pháp kích thích sinh sản bằng nhiệt độ

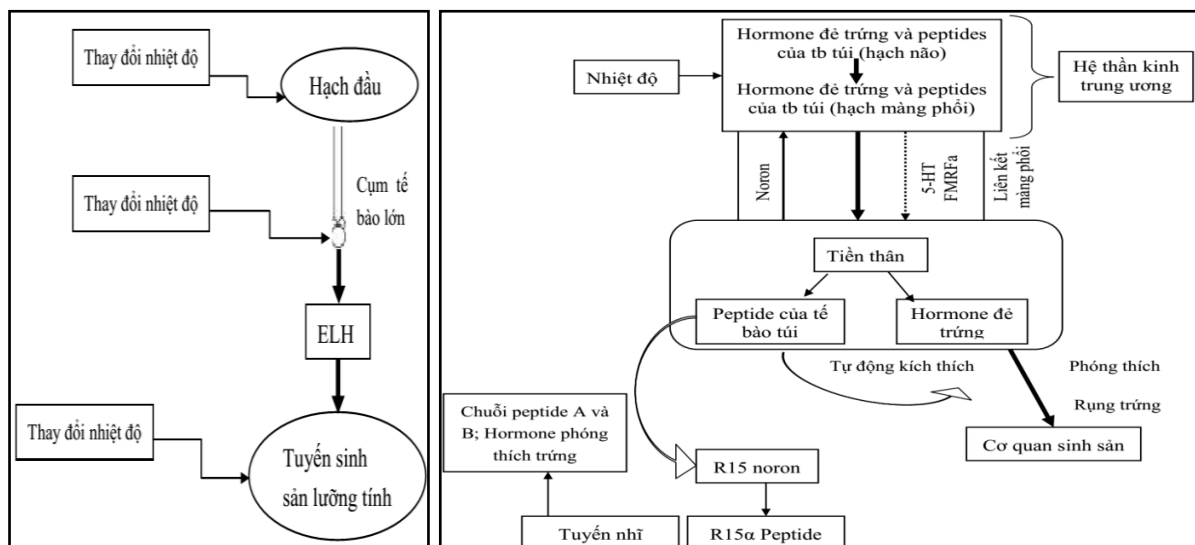
Đối với nhiều động vật Chân bụng sống trong nước, nhiệt độ nước được xem là yếu tố chính có vai trò điều chỉnh chu kỳ sinh sản (Wilson & Schiel 1995) và đã được ghi nhận trên ba loài bào ngư: *Haliotis australis*, *Haliotis discus*, *Haliotis hannai* (Hahn, 1994). Sự thay đổi nhiệt độ sẽ ảnh hưởng tới sự rụng trứng và hoạt động đẻ trứng (Caverivière & cs., 1999), quá trình này chủ yếu thông qua những thay đổi về kích thích của hạch đầu, sự kiểm soát các tế bào thần kinh túi sau khi được phóng ra. Tuy nhiên, tác động của nhiệt độ đến kích thích tế bào túi và tiết hormone đẻ trứng rất khác nhau.

Thay đổi nhiệt độ trong nước có ảnh hưởng đáng kể đến tần suất, cũng như quá trình đẻ trứng ở một số loài thuộc giống ốc *Aplysia*, về sinh lý và hóa sinh của con đường dẫn truyền thần kinh của hành vi này. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng giống ốc *Aplysia* duy trì ở nhiệt độ 15°C đẻ nhiều trứng, tuy nhiên khi ốc được kích thích ở nhiệt độ 20°C chúng sẽ đẻ ít trứng hơn (Wayne & Block, 1992). Thay đổi nhiệt độ tác động đến hoạt động sinh sản có thể xảy ra ở một hoặc nhiều thành phần dọc theo trục sinh sản. Mô hạch đầu là mô có khả năng bị ảnh hưởng

bởi nhiệt độ, mô này truyền tín hiệu cho các tế bào túi, các tế bào túi tổng hợp và tiết ra hormone sinh sản và tuyến sinh sản, phóng thích hormone sinh sản vào ống dẫn cơ quan sinh sản con đực và cái (Wayne & Block, 1992). Một số đặc điểm của các tế bào thần kinh túi biểu hiện những thay đổi đáng kể để đáp ứng với nhiệt độ (Hình 5). Trong khi đó, ở ốc *Helix aspersa* nhiệt độ là yếu tố hạn chế sự phát triển tinh trùng trong quá trình ngủ đông, nhưng sự ức chế sinh sản bởi nhiệt độ thấp ở loài này có thể được bù đắp bởi một chu kỳ quang kéo dài (Gomot & cs., 1989).

2.2.3. Phương pháp kích thích sinh sản bằng thay đổi nguồn nước

Tình trạng rụng trứng và đẻ trứng phụ thuộc vào sự tiết hormone của tế bào nội tiết trực thuộc hệ thần kinh. Hoạt động tiết này ngay lập tức gây ra việc giải phóng hormone nội tiết và kích hoạt này được lặp đi lặp lại, có khoảng 100 tế bào nội tiết nằm ở hạch não và các norone hình thành mạng lưới các tế bào kết nối trong vòng 30 đến 60 phút. Sự rụng trứng có thể được kích hoạt ở 90% ốc sên trưởng thành đang sống trong điều kiện nước biển bằng cách cho chúng vào nước sạch trong thời gian 3 giờ (Ter & cs., 1983).



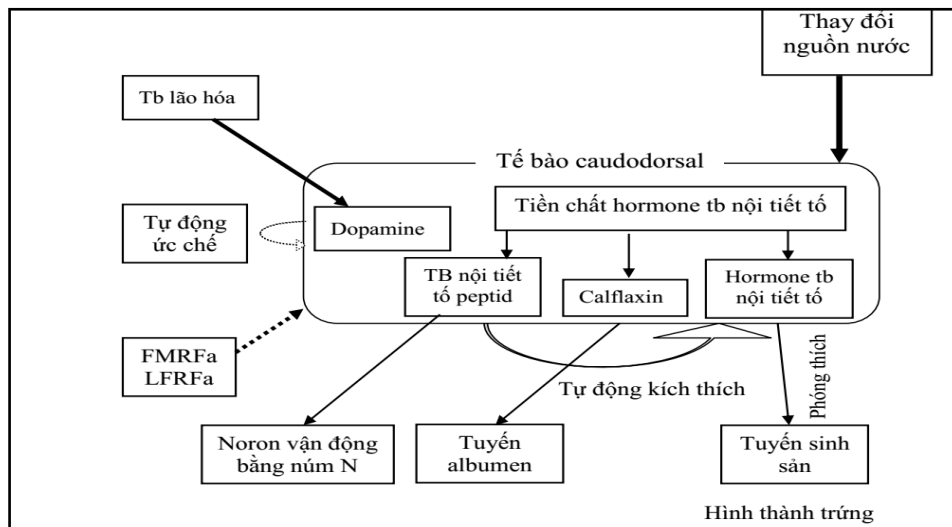
Nguồn: Wayne (2001); Morishita & cs. (2010).

Hình 5. Nhiệt độ ảnh hưởng đến sự rụng trứng và tập tính đẻ trứng của một số loài thuộc giống ốc *Aplysia*

Thời gian bắt đầu kích thích khoảng từ 15 phút đến 50 phút và sự rụng trứng xảy ra trong vòng 2 giờ. Hoạt động tiết của các tế bào sinh sản và các hành vi liên quan đến việc đẻ trứng rất giống nhau bất kể đã thay đổi điều kiện kích thích sinh sản: không thay đổi (cho đẻ tự nhiên), kích thích bởi nước sạch hoặc kích thích tia cực tím (Ter & cs., 1989). Sự thay đổi trạng thái sinh sản của các loài thuộc lớp Chân bụng đòi hỏi phải tiếp xúc với môi trường thích hợp, kích thích nước sẽ tạo ra những điều kiện thuận lợi để đẻ trứng (Hình 6).

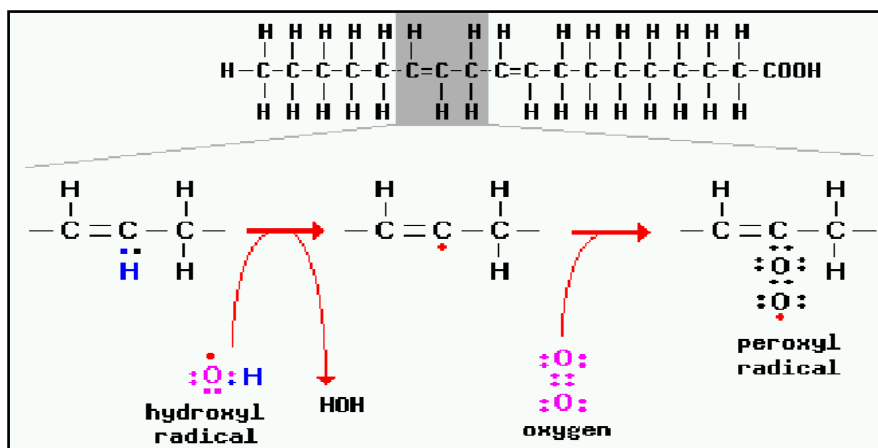
2.2.4. Phương pháp kích thích sinh sản bằng Oxy già (H_2O_2)

Khi cho dung dịch H_2O_2 vào môi trường nước (H_2O), gốc tự do phóng thích hydroperoxy ($HO\cdot$) và tạo ra peroxy diradical ($-OO\cdot$) (Hình 7), sự hiện diện của gốc ($HO\cdot$ và $-OO\cdot$) trong môi trường nước có vai trò quan trọng tác động đến quá trình sinh sản và đẻ trứng của lớp Chân bụng (Leighton, 2008). Morse & cs. (1977) ghi nhận nồng độ H_2O_2 cao (4.000-5.000 μ m) gây ra hoạt động đẻ trứng ở động vật thân mềm.



Nguồn: Morishita & cs. (2010)

Hình 6. Quá trình đẻ trứng bằng cách kiểm soát hoạt động tế bào nội tiết dưới ảnh hưởng của yếu tố môi trường ở ốc *Lymnaea stagnalis*



Nguồn: Morse & cs. (1977)

Hình 7. Oxy già (H_2O_2) giải phóng hydroxyl radical ($HO\cdot$) và peroxy radical ($-OO\cdot$) gây ra quá trình sinh sản và đẻ trứng của lớp Chân bụng

3. MỘT SỐ KẾT QUẢ VỀ KÍCH THÍCH SINH SẢN Ở ĐỘNG VẬT THÂN MỀM CHÂN BỤNG

Đến nay có rất nhiều nghiên cứu về kỹ thuật sản xuất giống động vật thân mềm chủ yếu là đối tượng hai mảnh vỏ như: Hàu (*Crassostrea belcheri*), vẹm xanh (*Perna viridis*), sò điệp (*Mimachlamys nobilis*), nghêu (*Meretrix lyrata*), sò huyết (*Anadara granosa*). Một số nghiên cứu tập trung vào các loài Chân bụng nước mặn bao gồm các loài như: bào ngư (*Haliotis asinina*), ốc hương (*Babylonia areolata*), ốc nháy (*Strombus canarium*), ốc đĩa (*Nerita balteata*) và các loài Chân bụng nước ngọt: ốc bươu vàng (*Pomacea urceus*), ốc bươu đồng (*Pila polita*), ốc bươu (*Pila globosa*), ốc sên (*Helix pomatia*). Các phương pháp kích thích sinh sản chủ yếu là: Gây sốc nhiệt hay độ mặn; Để khô trong tối sau đó kích thích bằng dòng chảy; Kích thích bằng ánh sáng mặt trời; Các phương pháp xử lý bằng hóa chất như dùng dung dịch NH_4OH , H_2O_2 hoặc chiếu tia cực tím kết hợp với nước chảy, thay đổi chiều cao cột nước.

3.1. Một số phương pháp kích thích sinh sản bào ngư

Đến nay, nghiên cứu ảnh hưởng các phương pháp kích thích sinh sản của lớp Chân bụng trên thế giới và Việt Nam còn rất hạn chế, mới chỉ tập trung nghiên cứu trên bào ngư là chủ yếu (Moss & cs., 1995; Wilson & Schiel, 1995; Lê Đức Minh, 2000; Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang, 2005; Nguyễn Văn Hùng, 2011; Đinh Thị Hải Yến, 2015). Một số phương pháp kích thích sinh sản bào ngư được mô tả như sau:

Phương pháp kích thích bằng cách chiếu tia cực tím: Theo Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang (2005), nguồn nước biển có nhiệt độ trung bình từ 27-29°C, được lắp đặt đèn và chiếu tia cực tím (đèn cực tím có công suất 10W) và cho chảy vào bể đẻ. Sau khoảng thời gian từ 10-20 phút bào ngư *Haliotis asinina* sẽ đẻ hoặc phóng tinh. Nếu bào ngư không sinh sản, thay nước bể đẻ và tiếp tục chiếu xạ. Nghiên cứu còn cho rằng, hầu hết bào ngư đẻ trứng hoặc phóng tinh sau khi thay nước lần thứ hai. Tuy nhiên, Moss & cs. (1995) thực hiện việc phơi khô bào ngư

Haliotis iris trong thời gian 30 phút, sau đó cho vào hệ thống chiếu tia cực tím có công suất 30W với lưu tốc dòng chảy 0,0067-0,0107 l/s, được kích thích liên tục trong 3 giờ, sau đó ngừng kích thích khoảng 15 phút đến 4 giờ và kiểm tra hoạt động đẻ trứng của bào ngư.

Phương pháp thay đổi nhiệt độ khô: Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang (2005) cho bào ngư *Haliotis asinina* bố mẹ thành thực vào một lớp gạch đã thấm nước biển và đặt ngửa trên khay phơi khô, sau khi tiếp xúc với không khí 30 phút đến 1 giờ, bào ngư được đưa vào bể đẻ (cấp nước biển đã được lọc sạch) và đậy kín, sau thời gian nhất định bào ngư đã sinh sản. Trong khi đó, Moss & cs. (1995) ghi nhận, bào ngư *Haliotis iris* phơi trong bóng râm với thời gian 30 phút, sau đó cho vào hệ thống sinh sản không có dòng chảy, bào ngư cái không tham gia sinh sản và chỉ có 2-4% con đực tham gia sinh sản.

Phương pháp thay đổi nhiệt độ nước: Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang (2005) duy trì nhiệt độ nước ban đầu là 27°C, sau đó nâng nhiệt độ nước dần dần lên 31°C trong thời gian 4 giờ, sau đó giảm đột ngột xuống 27°C (bằng cách thay nước mới hoặc sử dụng nước đá để giảm nhiệt độ), lặp lại vài lần, sau đó bào ngư *Haliotis asinina* sẽ đẻ trứng hoặc phóng tinh. Khi thay đổi nhiệt độ nước (nhiệt độ thấp) Moss (1998) cho rằng kích thích sinh sản bằng phương pháp sốc ở nhiệt độ 18°C thì bào ngư *Haliotis australis* bố mẹ tham gia sinh sản cao hơn (53-64%) so với 15°C (20-33%) và ở điều kiện nhiệt độ bình thường (24-25°C) bào ngư không tham gia sinh sản. Theo Nguyễn Văn Hùng (2011) khi nâng nhiệt độ nước lên 30-31°C trong thời gian 3 giờ, sau đó hạ nhiệt độ xuống đột ngột chỉ còn 27°C (bằng cách thay nước mới hoặc đá lạnh) làm cho bào ngư vánh tai (*Haliotis asinina*) không tham gia sinh sản.

Phương pháp kích thích bằng Oxy già H_2O_2 : Lê Đức Minh (2000) mô tả, bào ngư thành thực được rửa sạch cho vào một lớp gạch đã thấm nước biển và đặt ngửa trên khay phơi khô (trong 10 phút). Sau đó bào ngư bố mẹ được cho vào bể đẻ có nước biển lọc sạch chứa dung dịch H_2O_2 (4mm) từ 30 phút đến 1 giờ. Sau đó thay nước

cũ trong bể và cấp nước biển mới, bào ngư sẽ sinh sản sau khi cấp nước biển mới khoảng 30 phút; phương pháp này có độ tin cậy cao và kích thích sinh sản 100% nếu như bào ngư bố mẹ hoàn toàn thành thực. Trong khi đó, Moss & cs. (1995) nghiên cứu kích thích sinh sản bào ngư *Haliotis iris* bằng phương pháp ngâm trong dung dịch H_2O_2 6% trong khoảng 15 phút rồi chuyển sang bể cho bào ngư sinh sản, có tỉ lệ bào ngư cái tham gia sinh sản là 15% và đực là 43% và theo Nguyễn Văn Hùng (2011) kích thích bằng phương pháp sử dụng H_2O_2 tỉ lệ tham gia sinh sản chỉ có 6%. Tuy nhiên, H_2O_2 rất độc đối với tế bào trứng và tinh trùng, do vậy khi bào ngư bắt đầu sinh sản phải hút nước để loại bỏ H_2O_2 trong bể đẻ.

Phương pháp kích thích sinh sản bằng cách kết hợp giữa chiếu tia cực tím với kích thích khô và thay đổi nhiệt độ nước: Theo Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang (2005), bào ngư *Haliotis asinina* bố mẹ thành thực sinh dục được bọc một lớp gạch thấm nước biển, đặt ngửa trên khay phơi khô trong thời gian khoảng 30 phút đến 1 giờ. Sau đó cho bào ngư vào bể đẻ và cấp nước biển được chiếu tia cực tím, nâng nhiệt độ nước trong bể đẻ từ 27 lên 31°C trong thời gian 1 đến 4 giờ rồi hạ nhiệt độ đột ngột xuống 27°C (bằng cách thay nước mới hoặc sử dụng nước đá để giảm nhiệt độ), bào ngư sẽ sinh sản sau đó một thời gian, nếu trường hợp bào ngư không tham gia sinh sản, thì lặp lại một vài lần và bào ngư sẽ sinh sản. Theo Đinh Thị Hải Yến (2015) thì kích thích sinh sản bào ngư *Haliotis asinina* bằng đèn cực tím có công suất 10W kết hợp với nâng nhiệt độ nước lên 30-31°C trong thời gian 4 giờ, sau đó hạ nhiệt độ xuống đột ngột chỉ còn 27°C bằng cách thay nước mới hoặc đá lạnh) có tỉ lệ bào ngư tham gia sinh sản cao hơn (71,42%) so với kích thích sinh sản bằng đèn cực tím (công suất 10W).

Phương pháp kích thích bào ngư sinh sản bằng thay đổi chu kỳ ánh sáng nhân tạo: bào ngư *Haliotis asinina* bố mẹ thành thực được cho vào bể đẻ được sục khí mạnh và nước chảy với tốc độ ra vào là 10 lít/phút để kích thích sinh sản. Ban ngày bể được che kín hoàn toàn bằng vải bạt đen; ban đêm từ 16 giờ đến 6 giờ sáng, bể được mở bạt và chiếu sáng bằng đèn neon

(công suất 40w), sau một thời gian, bào ngư sẽ sinh sản (Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang, 2005). Theo Nguyễn Văn Hùng (2011), bể kích thích bào ngư *Haliotis asinina* được che kín từ 6 giờ sáng đến 18 giờ chiều và chiếu sáng từ 18 giờ chiều đến 6 giờ sáng hôm sau (công suất 40w), tỉ lệ bào ngư tham gia sinh sản đạt 50%.

Kích thích sinh sản bằng dung dịch H_2O_2 và phương pháp sốc nhiệt thì bào ngư bố mẹ tham gia sinh sản tốt, tuy nhiên sốc ở nhiệt độ thích hợp kích thích quá trình sinh sản tốt hơn so với nhiệt độ không thích hợp (Ví dụ như nhiệt độ quá nóng (> 33°C), quá lạnh (thấp hơn 15°C) hay tương đương với nhiệt độ phòng). Theo Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang (2005) nhận định, phương pháp thay đổi nhiệt độ không hiệu quả sinh sản (tỉ lệ tham gia sinh sản, số lượng trứng, phóng tinh) ít hơn so với phương pháp chiếu tia cực tím.

3.2. Một số phương pháp kích thích sinh sản ốc đĩa, ốc nháy và ốc đụn

Kích thích sinh sản của ốc nháy, ốc đĩa và ốc đụn chỉ mới được nghiên cứu lần đầu tiên ở Việt Nam (Đỗ Hữu Hoàng & cs., 2006; Hà Văn Ninh, 2015; Mai Đức Thao & Vũ Trọng Đại, 2018).

Hà Văn Ninh (2015) cho rằng ốc đĩa *Nerita balteata* bố mẹ kích thích sinh sản bằng phương pháp sốc nhiệt kết hợp thay nước, sốc nhiệt kết hợp chiếu tia cực tím hay sốc nhiệt kết hợp ngâm trong dung dịch oxi già (H_2O_2) đều có hiệu quả với sức sinh sản trung bình là 228 bọc trứng/đợt. Số lượng bọc trứng của ốc đĩa được kích thích bằng sốc nhiệt kết hợp thay nước (210 bọc trứng/đợt), sức sinh sản thực tế chỉ đạt (4,2 bọc trứng/ốc cái) là thấp nhất ($P < 0,05$) so với phương pháp kích thích sinh sản bằng sốc nhiệt kết hợp chiếu tia cực tím (235 bọc trứng/đợt; 4,7 bọc trứng/ốc cái) hay sốc nhiệt kết hợp với ngâm trong dung dịch H_2O_2 (239 bọc trứng/đợt; 4,8 bọc trứng/ốc cái). Tuy nhiên, tỉ lệ thụ tinh (90,6-93,6%) và tỉ lệ nở (80,0-81,0%) rất cao và không ảnh hưởng bởi các phương pháp kích thích sinh sản khác nhau.

Đỗ Hữu Hoàng & cs. (2006) nghiên cứu một số kết quả thử nghiệm sinh sản ốc đụn cái

Trochus niloticus bằng 3 phương pháp làm sạch và phơi khô, tăng nhiệt độ và đèn cực tím cho thấy kích thích bằng phương pháp làm sạch vỏ kết hợp với phơi khô có số trứng thu được dao động từ 630.000-1.850.000 trứng/10 con cái và kích thích bằng phương pháp đèn cực tím (nước được cấp liên tục chảy qua đèn cực tím trước khi vào bể đẻ, tốc độ nước cấp vào khoảng 4-8 lít/phút) dao động 320.000-850.000 trứng/con cái). Trong khi kích thích bằng phương pháp tăng nhiệt độ lên 3°C so với nhiệt độ phòng 28°C sẽ không thu được trứng. Các tác giả cho rằng có thể kích thích ốc đẻ sinh sản bằng cách làm sạch vỏ ốc kết hợp với phơi khô và sử dụng đèn cực tím đem lại hiệu quả tốt và có thể sử dụng để kích thích cho ốc đẻ bố mẹ sinh sản.

Mai Đức Thao & Vũ Trọng Đại (2018) nghiên cứu các phương pháp kích thích lên khả năng sinh sản của ốc nháy (*Strombus canarium*) với 3 phương pháp: (1) Sốc nhiệt (Ốc nháy bố mẹ được xếp vào khay nhựa có phủ một tấm khăn ẩm rồi phơi trong điều kiện bóng mát khoảng 30 phút ở nhiệt độ 30-32°C, sau đó được chuyển vào bể đẻ có nhiệt độ nước 26-27°C trong 30 phút; (2) Chiếu đèn tia cực tím (Ốc nháy bố mẹ được đựng trong thùng kín và chiếu đèn cực tím với công suất 60W trong thời gian 15 phút, sau đó ốc được chuyển vào bể đẻ) và (3) Ngâm trong dung dịch oxi già (Ốc nháy bố mẹ được ngâm trong xô nhựa có chứa dung dịch oxi già nồng độ 15ppm trong thời gian 30 phút, sau đó ốc bố mẹ được rửa sạch lại bằng nước biển trước khi chuyển vào bể đẻ). Cả ba phương pháp kích thích sinh sản đều có hiệu quả trên ốc nháy. Trong đó phương pháp kích thích bằng sốc nhiệt cho hiệu quả sinh sản tốt nhất về khối lượng trứng, sức sinh sản và tỉ lệ nở lần lượt là 3,13 g/ốc cái, 60.943,7 phôi/ốc cái và 94,3%.

3.3. Một số phương pháp kích thích sinh sản ốc nước ngọt

Đến nay, nghiên cứu ảnh hưởng các biện pháp kích thích sinh sản của ốc nước ngọt vẫn còn rất hạn chế. Các nghiên cứu chủ yếu về ảnh hưởng của chiều cao cột nước đến kết quả sinh sản của ốc bươu vàng (*Pomacea urceus*) và ốc

bươu đồng (*Pila polita*), ảnh hưởng của việc tiêm não thủy cá ở ốc bươu (*Pila globosa*), sự thay đổi thời gian chiếu sáng kết hợp với nhiệt độ ở ốc *Helix pomatia*.

Gomot (1990) thu được tỉ lệ ốc *Helix pomatia* bố mẹ tham gia sinh sản 100% khi kích thích sinh sản bằng phương pháp chiếu sáng ngày dài (18 giờ chiếu sáng và 6 giờ tối) kết hợp với nhiệt độ 20°C, trong khi đó chỉ đạt 27,5% khi thực hiện phương pháp chiếu sáng ngày ngắn (6 giờ sáng và 18 giờ tối) kết hợp với nhiệt độ 15°C.

Ramnarine (2003) đã cho mực nước ban đầu 10cm trong bể và để bốc hơi tự nhiên hoặc tháo cạn đến khi cột nước chỉ còn 2cm cho kết quả tỉ lệ ốc bươu vàng *Pomacea urceus* bố mẹ bắt cặp và đẻ trứng là 100%, ngược lại trong trường hợp mực nước được duy trì 10 cm thì không thu được ốc bố mẹ bắt cặp và đẻ trứng.

Jahan & cs. (2007) kích thích sinh sản ốc *Pila globosa* ở Bangladesh bằng 3 cách là (1) Cho đẻ tự nhiên; (2) Dùng não thủy của cá rô hu *Labeo rohita* (nghiên 3 não thủy hòa tan trong 5ml nước cất, tiêm 0,1 mL/con, liều lượng tiêm cho ốc đẻ và cái tương đương nhau) và (3) Cắt xúc tu của ốc bố mẹ. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, khi cho đẻ tự nhiên thì ốc *Pila globosa* có thời gian bắt cặp là 3,2 giờ, ngắn hơn so với tiêm não thủy và cắt xúc tu (3,5 giờ). Thời gian đẻ trứng của nhóm ốc đẻ tự nhiên là 5,4 giờ, số tổ trứng là 0,30 tổ/ngày, tỉ lệ đẻ là 20,9% và khối lượng tổ trứng là 8,4 g/tổ thấp hơn so với sử dụng não thủy (4,6 giờ; 0,43 tổ/ngày; 30,2%; 8,5 g/tổ) hay sử dụng phương pháp cắt xúc tu (4,8 giờ; 0,70 tổ/ngày; 48,8%; 8,5 g/tổ). Tác giả đề nghị có thể sử dụng não thủy của cá rô hu hay cắt xúc tu để kích thích ốc *Pila globosa* sinh sản.

Lê Văn Bình & Ngô Thị Thu Thảo (2019) cho thấy tăng 50% chiều cao cột nước sẽ thu được tỉ lệ ốc bươu đồng tham gia sinh sản, tần suất sinh sản và sức sinh sản cao hơn so với tăng 25% và 100% chiều cao cột nước. Trong khi đó, giảm 75% chiều cao cột nước sẽ thu được tỉ lệ ốc bươu đồng tham gia sinh sản, tần suất sinh sản và sức sinh sản luôn cao hơn so với giảm 25% và 100% chiều cao cột nước. Kích thích sinh

sản bằng các phương pháp tăng chiều cao cột nước thì tỉ lệ ốc bươu đồng tham gia sinh sản, tần suất sinh sản và sức sinh sản cao hơn hơn so với các phương pháp giảm chiều cao cột nước.

Kết quả các nghiên cứu trên cho thấy kích thích sinh sản bằng phương pháp thay đổi chiều cao cột nước hoặc thay đổi cột nước kết hợp với phun mưa, tiêm não thủy và cắt xúc tu có ảnh hưởng đến quá trình sinh sản của ốc bươu vàng (*Pomacea urceus*), ốc bươu đồng (*Pila polita*) và ốc *Pila globosa*.

4. KẾT LUẬN

Hệ thần kinh trung ương của động vật thân mềm tương đối đơn giản và có thể biểu hiện các phản ứng sinh lý sinh sản đối với các tín hiệu môi trường. Kết quả tổng hợp từ các tài liệu nghiên cứu cho thấy, các yếu tố dinh dưỡng, chiếu sáng, nhiệt độ và chu kỳ thủy triều (đối với loài sinh vật biển) ảnh hưởng đến việc thay đổi hệ thống nội tiết ở các loài thuộc lớp Chân bụng hay những thay đổi của điều kiện môi trường sẽ tác động đến sự thay đổi của cấu trúc sinh sản ở các loài này.

Hầu hết các phương pháp kích thích sinh sản bằng chu kỳ chiếu sáng, nhiệt độ, thay đổi nguồn nước, dung dịch Oxy già (H_2O_2) đều ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương, kích thích quá trình đẻ trứng của đa số các loài thuộc lớp Chân bụng. Theo đó, đối với Chân bụng nước mặn phương pháp kích thích bằng dung dịch H_2O_2 , chiếu tia cực tím hay sốc nhiệt đều cho hiệu quả sinh sản tốt. Trong khi kích thích sinh sản bằng phương pháp thay đổi chiều cao cột nước, hoặc kết hợp với phun mưa, tiêm não thủy và cắt xúc tu sẽ mang lại hiệu quả sinh sản tốt hơn đối với các loài Chân bụng nước ngọt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bayomy M.F.F. & Joosse J. (1987). Effects of temperature and photoperiod on egg laying, body growth and survival of *Bulinus truncatus*. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. 90: 243-256.
- Biermann C., Schinner G. & Strathmann R. (1992). Influence of solar radiation, microalgal fouling,

and current on deposition site and survival of embryos of a dorid nudibranch gastropod. Marine Ecology Progress Series. 86: 205-215.

- Caverivière A., Domain F. & Diallo A. (1999). Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). Aquatic Living Resources. 12(2): 151-154.
- Đinh Thị Hải Yến (2015). Một số kết quả sản xuất giống bào ngư vành tai (*Haliotis asinina*) tại Khánh Hòa. Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới. 9(12): 28-35.
- Đỗ Hữu Hoàng, Hứa Thái Tuyền & Hoàng Đức Lư (2006). Một số kết quả thử nghiệm sinh sản nhân tạo ốc đụn cái *Trochus niloticus* (linne, 1767). Tuyển tập nghiên cứu biển, lần thứ 15: 156-164.
- Dogterom G.E., Bohlken S. & Jooss J. (1983). Effect of the photoperiod on the time schedule of egg mass production in *Lymnaea stagnalis*, as induced by ovulation hormone injections. General and Comparative Endocrinology. 49(2): 255-260.
- Goldman B.D. (2001). Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. Journal of Biological Rhythms. 16(4): 283-301. doi: 10.1177/074873001129001980.
- Goldman B.D., Gwinner E, Karsc F.J., Saunders D., Zucker I. & Ball G.F. (2004). Circannual rhythms and photoperiodism. In: Chronobiology: biological timekeeping (Dunlap J. C., Loros J. J. & DeCoursey P. J., eds). Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp. 107-142.
- Gomot A. (1990). Photoperiod and temperature interaction in the determination of reproduction of the edible snail, *Helix pomatia*. Journal Reproduction Fertility and Development. 90(2): 581-585. DOI: 10.1530/jrf.0.0900581.
- Gomot P., Gomot L. & Griffond B. (1989). Evidence for a light compensation of the inhibition of reproduction by low temperatures in the snail *Helix aspersa*. Ovotestis and albumen gland responsiveness to different conditions of photoperiods and temperatures. Biology of Reproduction. 40(6): 1237-45. DOI: 10.1095/biolreprod40.6.1237.
- Hà Văn Ninh (2015). Nghiên cứu kỹ thuật nuôi thành thực, cho đẻ và theo dõi quá trình phát triển phôi, ấu trùng của ốc đĩa (*Nerita balteata* Reeve, 1855) tại Quảng Ninh. Luận văn thạc sĩ. Trường Đại học Nha Trang. 48tr.
- Hahn K.O. (1994). Gametogenic cycle of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, during conditioning with effective accumulative temperature. Aquaculture. 122(2): 227-236. DOI:10.1016/0044-8486(94)90512-6.

- Hunter R.D. & Stone L.M. (1986). The effect of artificial photoperiod on growth and reproduction in the land snail *Cepaea nemoralis*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. 9(3): 339-344.
- Jahan S.M., Islam M.R., Rahman M.R. & Alam M.M. (2007). Induced breeding of *Pila globosa* (Gastropoda: Prosobranchia) for commercial farming. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*. 26: 35-39.
- Joesse J. & Gerearts W.P.M. (1983). Endocrinology. In: *The Mollusca*, Vol. 4: Physiology Part 1 (Saleuddin A.S. M. and Wilbur K. M., eds.), Academic Press. pp. 317-406.
- Joesse J. (1984). Photoperiodicity, rhythmicity and endocrinology of reproduction in the snail *Lymnaea stagnalis*. In *Photoperiodic Regulation of Insect and Molluscan Hormones*, Ciba Foundation Symposium. pp. 204-220.
- Koene J. M., Brouwer A. & Hoffer J.N.A. (2009). Reduced egg laying caused by a male accessory gland product opens the possibility for sexual conflict in a simultaneous hermaphrodite. *Animal Biology*. 59: 435-448.
- Koene J.M. (2010). Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: mechanisms and evolution. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 4: 1-17. DOI: 10.3389/fnbeh.2010.00167.
- Kranenbarg S., Verhagen J., Muller M. & van Leeuwen J. (2001). Consequences of forced convection for the constraints on size and shape in embryos. *Journal of Theoretical Biology*. 212: 521-533. doi:10.1006/JTBI.2001.2391.
- Kunigelis S.C. & Saleuddin A.S.M. (1986). Reproduction in the freshwater Gastropod *Helisoma*: involvement of prostaglandin in egg production. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. 10(2): 159-167. DOI:10.1080/01688170.1986.10510239.
- Lê Đức Minh & Nguyễn Văn Giang (2005). Hoàn thiện kỹ thuật nuôi vỗ thành thực bào ngư vành tai bố mẹ. *Tuyển tập Hội thảo toàn quốc về nghiên cứu và ứng dụng khoa học công nghệ trong nuôi trồng thủy sản - Bộ Thủy sản*. tr. 597-603.
- Lê Đức Minh (2000). Sinh học và kỹ thuật sản xuất giống bào ngư vành tai (*Haliotis asinina*). Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. 52tr.
- Lê Văn Bình & Ngô Thị Thu Thảo (2019). Nghiên cứu kích thích sinh sản ốc bươu đồng (*Pila polita*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 17(5): 360-370.
- Leighton P. (2008). Abalone hatchery manual. Aquaculture Technical Section, Aquaculture Development Division, Bord Iascaigh Mhara, Crofton Road, Dun Laoghaire. 95p.
- Mai Đức Thao & Vũ Trọng Đại (2018). Ảnh hưởng của thức ăn và phương pháp kích thích lên khả năng sinh sản của ốc nháy (*Strombus canarium* Linnaeus, 1758) tại Khánh Hòa. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54 (Số chuyên đề: Thủy sản): 59-64.
- McArthur A.G. & Harasewych M.G. (2003). Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Washington: Smithsonian Books. pp. 140-160.
- McCrone E.J. & Sokolove P.G. (1986). Photoperiodic activation of brains in castrates and the role of the gonad in reproductive maturation of *Limax maximus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 158: 151-158. DOI: 10.1007/bf01338558.
- McCrone E.J., van Minnen J. & Sokolove P.G. (1981). Slug reproductive maturation hormone: In vivo evidence for long-day stimulation of secretion from brains and cerebral ganglia. *Journal of Comparative Physiology*. 143: 311-315.
- Morishita F., Furukawa Y., Matsushima O. & Minakata H. (2010). Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs. *Canadian Journal of Zoology*. 88(9): 825-845. doi.org/10.1139/Z10-041.
- Morse D.E., Duncan H., Hooker N. & Morse A. (1977). Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*. 196(4287): 298-300. DOI: 10.1126/science.403609.
- Moss G.A., Lennard J.I. & Tong J. (1995). Comparing two simple methods to induce spawning in the New Zealand abalone (paua), *Haliotis iris*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 29: 329-333. DOI:org/10.1080/00288330.1995.9516667.
- Nguyễn Chính (1996). Một số loài động vật thân mềm (Mollusca) có giá trị kinh tế ở biển Việt Nam, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội. 96tr.
- Nguyễn Thị Xuân Thu, Hứa Ngọc Phúc, Mai Duy Minh, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Văn Hà, Phan Đăng Hùng & Kiều Tiên Yên (2004). Nghiên cứu đặc điểm sinh học, kỹ thuật sản xuất giống nhân tạo và nuôi thương phẩm ốc hương *Babylonia areolata*. *Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học công nghệ (1984 - 2004)*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh: 267-321.
- Nguyễn Văn Hùng (2011). Kết quả nuôi phát dục bào ngư vành tai (*Haliotis asinina*) trong bể xi măng và phương pháp kích thích bào ngư sinh sản nhân tạo. *Hội thảo Động vật thân mềm toàn quốc lần thứ 2*. tr. 143-148.

- Przeslawski R. (2004). A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal Gastropod egg masses. *Molluscan Research*. 24(1): 43-63. DOI:10.1071/MR04001.
- Ramnarine I.W. (2003). Induction of spawning and artificial incubation of eggs in the edible snail *Pomacea urceus*. *Aquaculture*. 215(1): 163-166. DOI:10.1016/S0044-8486(02)00364-2.
- Ruppert E.E., Fox R.S. & Barnes R.D. (2004). *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*. Seventh Edition. Thomson. New York. 963p.
- Saleuddin A.S.M., Farrel C.L. & Gomot L. (1983). Brain extract causes amoeboid movement in vitro in oocytes in *Helix aspersa* (Mollusca). *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 6(1): 31-34. doi.org/10.1080/01651269.1983.10510021.
- Sokolove P.G. & McCrone E.J. (1978). Reproductive maturation in the slug *Limax maximus* and the effects of artificial photoperiod. *Journal of comparative physiology*. 125: 317-325. DOI:10.1007/BF00656866.
- Sokolove P.G., McCrone E.J., van Minnen J. & Duncan W.C. (1984). Reproductive endocrinology and photoperiodism in a terrestrial slug. In *Photoperiodic Regulation of Insect and Molluscan Hormones*, Ciba Foundation Symposium. 104: 189-203.
- Sreejaya R.M. (2008). Studies on spawning and larval rearing of the whelk, *Babylonia spirata* (neogastropoda: buccinidae). Doctor of philosophy thesis. Department of Post Graduate Studies and Research in Biosciences Mangalore University, Mangalagangothri Karnataka, India.
- Ter Maat A, Pieneman A.W., Goldschmeding J.T., Smelik W.F.E. & Ferguson G.P. (1989). Spontaneous and induced egg-laying behavior of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Comparative Physiology A*. 164(5): 673-683. DOI:10.1007/BF00614510.
- Ter Maat A. Lodder J.C. & Wilbrink M. (1983). Induction of egg-laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis* by environmental stimulation of the release of ovulation hormone from the Caudo-Dorsal Cells. *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 6(4): 239-247. doi.org/10.1080/01651269.1983.10510048.
- Visser M.E., Caro S.P., Van Oers K., Schaper S.V. & Helm B. (2010). Phenology, seasonal timing and circannual rhythms: towards a unified framework. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. 365(1555): 3113-27. DOI:10.1098/rstb.2010.0111.
- Wayne N.L. & Block G.D. (1992). Effects of photoperiod and temperature on egg-laying behavior in a marine mollusk, *Aplysia californica*. *The Biological Bulletin*. 182(1): 8-14. DOI: 10.2307/1542176.
- Wayne N.L. (2001). Regulation of seasonal reproduction in mollusks. *Journal of Biological Rhythms*. 16(4): 391-402. DOI: 10.1177/074873001129002097.
- Wilson N.H.R. & Schiel D.R. (1995). Reproduction in two species of abalone (*Haliotis iris* and *H. australis*) in Southern New Zealand. *Marine and freshwater research*. 46(3): 629-638. doi.org/10.1071/MF9950629.
- Woods A. (1999). Egg-mass size and cell size: effects of temperature on oxygen distribution. *American Zoologist*. 39: 244-252.