

ẢNH HƯỞNG CỦA TỶ LỆ PHA LOÃNG VÀ NỒNG ĐỘ THẨM THẤU LÊN HOẠT LỰC TINH TRÙNG CẦU GAI *Trippneustes gratila* (Linnaeus, 1758)

EFFECTS OF DILUTION RATIO AND OSMOLALITY ON SPERM MOTILITY OF SEA URCHIN *Trippneustes gratila* (Linnaeus, 1758)

Hoàng Hà Giang¹, Lê Minh Hoàng²

Phòng Đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Nha Trang

Viện Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Lê Minh Hoàng (Email: hoanglm@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 15/09/2021; Ngày phản biện thông qua: 25/9/2021; Ngày duyệt đăng: 29/09/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm ra được tỷ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng của cầu gai *Trippneustes gratila* (Linnaeus, 1758). Tinh dịch cầu gai được pha loãng trong nước biển nhân tạo (ASW) ở các tỷ lệ 1:1; 1:25; 2:50; 1:100 và 1:200 (tinh dịch: ASW) để xác định tỷ lệ pha loãng tối ưu cho hoạt lực tinh trùng. Sau đó, tỷ lệ tối ưu được sử dụng cho các thí nghiệm nồng độ thẩm thấu (nồng độ 100, 200, 300, 400 và 500 mOsm/kg). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm cho thấy hoạt lực tinh trùng cầu gai tối ưu quan sát được khi pha loãng ở tỷ lệ 1:50 và nồng độ thẩm thấu 500 mOsm/kg. Các kết quả này chỉ ra rằng tinh trùng của cầu gai có thể hoạt lực tốt ở môi trường có nồng độ thẩm thấu 500 mOsm/kg khi được pha loãng ở tỷ lệ 1:50 (tinh dịch:môi trường).

Từ khóa: Tỷ lệ pha loãng, tinh dịch, nồng độ thẩm thấu, hoạt lực tinh trùng, cầu gai *Trippneustes gratila*

ABSTRACT

The objective of the present study was to assess the effects of dilution ratios, osmolality and cations on sperm motility of sea urchin *Trippneustes gratila* (Linnaeus, 1758). Sperm was diluted in artificial seawater (ASW) at ratios of 1:1; 1:25; 2:50; 1:100 and 1:200 (sperm: ASW) to determine the best ratio dilution for sperm motility. Then, the best ratio was used for the osmolality experiment (100, 200, 300, 400 và 500 mOsm/kg). Each treatment was replicated three times. The result showed that sperm motility of sea urchin was the best dilution ratio and osmolality at 1:50 and 500mOsm/kg, respectively. These results indicate that the sperm of sea urchin can be active at an osmolality medium of 500 mOsm/kg when diluted at the ratio of 1:50 (semen:medium).

Keywords: Dilution ratio, osmolality, sperm motility, sea urchin, *Trippneustes gratila*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trippneustes gratila (Linnaeus, 1758) là loài cầu gai nhiệt đới có giá trị kinh tế với tốc độ tăng trưởng cao [10, 12]. Nhiều nơi trên thế giới người ta đã biết sử dụng tuyến sinh dục cầu gai để chế biến các món ăn có lợi cho sức khỏe, cầu gai được chế biến thành các món ăn như ăn sống với chanh, hay các món sashimi, sushi. Tại Nhật Bản, trứng của nó có thể giá bán lên tới 450\$/kg (https://en.wikipedia.org/wiki/Sea_urchin). Ngoài giá trị thương mại, cầu gai còn có vai trò quan trọng trong hệ sinh thái, cùng với san hô, sao biển gai chúng tạo nên mắt xích quan trọng trong chu trình thức ăn của rạn san hô [4]. Tuy nhiên việc khai thác ồ ạt đã

gây ra sự sụt giảm đáng kể năng suất của cầu gai toàn cầu [15]. Sự suy giảm trong khai thác ngoài tự nhiên đã cho thấy sự quan tâm ngày càng tăng trong việc tăng giá trị thương mại của cầu gai thông qua việc nuôi trồng và bảo vệ nguồn lợi, đặc biệt là việc nghiên cứu quy trình sản xuất giống nhân tạo cầu gai. Để sản xuất giống nhân tạo tại chỗ cần phải chủ động con giống có chất lượng đáp ứng nhu cầu nuôi thương phẩm, ngoài chất lượng trứng thì chất lượng tinh trùng cũng rất quan trọng.

Hoạt lực của tinh trùng là một trong những thông số cơ bản để đánh giá chất lượng tinh dịch và khả năng thụ tinh của các loài động vật thủy sản. Tuy nhiên, hoạt lực của tinh trùng của động

vật thủy sản bị ảnh hưởng của một vài thông số trong môi trường hoạt động của chúng như nồng độ thẩm thấu, nhiệt độ, các cation (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), pH và tỉ lệ pha loãng [6-9]. Hiểu biết các thông số này có thể giúp tạo ra được môi trường hoạt lực tối ưu cho tinh trùng của động vật thủy sản nói chung và của cầu gai nói riêng, giúp quá trình sinh sản nhân tạo được tốt hơn [9]. Điều này đã được chứng minh qua các nghiên cứu ở một số đối tượng như: cá tầm Ba Tư *Acipenser persicus* [7], cá đù vàng *Larimichthys polyactis* [13], cá bơn Đại Tây Dương *Hippoglossus hippoglossus* [16], cá chêm mõn nhọn *Psammoperca waigiensis* [14], hào Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* [5]. Tuy nhiên nghiên cứu ảnh hưởng về tỉ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu trên đối tượng cầu gai vẫn còn hạn chế. Vì thế, nghiên cứu “Ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cầu gai *Trippneustes gratila* (Linnaeus, 1758)” được thực hiện nhằm đánh giá nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của các yếu tố môi trường gồm tỉ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu ở các mức thí nghiệm khác nhau để xác định môi trường tối ưu cho hoạt lực của tinh trùng cầu gai. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở cho việc nâng cao chất lượng thụ tinh trong sản xuất giống loài này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu mẫu

Tiến hành thu mẫu 3 lần, cầu gai bố mẹ được thu mua lúc 5 – 6 giờ sáng, sau đó được đặt trong bể sục khí để giữ cầu gai sống. Đặt cầu gai lên các đĩa nhỏ, dùng khăn thấm nước cho khô và sạch nhớt hay các chất bám bên ngoài bề mặt cầu gai, để tránh ảnh hưởng tới chất lượng tinh trùng và trứng. Chuẩn bị dung dịch KCl 0,5M để kích thích sinh sản. Dùng kim tiêm rút 5ml dung dịch KCl 0,5M tiêm vào hai bên đối xứng quanh miệng cầu gai bố mẹ, sau đó lật ngược lại trên mặt đĩa và đợi khoảng từ 5 – 10 phút. Trứng và tinh trùng được phát tán ra bên ngoài thông qua lỗ huyết sinh dục, dùng pipet lấy tinh dịch cho vào enpendoff tube, bỏ một hoặc hai giọt đầu tiên để tránh lẫn tạp chất và giữ trong thùng xốp đựng

đá bào. Yêu cầu chất lượng tinh: tinh trùng có màu trắng sữa hoặc vàng nhạt không bị lẫn tạp chất (nước biển, nhớt, rong...)

2. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng lên hoạt lực tinh trùng

Sử dụng nước biển nhân tạo (gồm 27g NaCl; 0,5g KCl; 1,2g $CaCl_2$; 4,6g $MgCl_2$; 0,5g $NaHCO_3$ trong 1 lít nước cất có pH 7,8) để xác định ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng lên hoạt lực tinh trùng cầu gai, kiểm tra bốn tỉ lệ 1: 1, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 (tinh trùng: nước biển nhân tạo). Tinh dịch được pha loãng theo các tỉ lệ trên trong enpendoff tube và đưa lên lam kính quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 400 lần. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Các thông số như hoạt lực và vận tốc tinh trùng được đánh giá qua các mốc thời gian 3s, 60s, 120s, 180s sau khi pha loãng. Thời gian hoạt lực tinh trùng được tính từ lúc pha loãng cho đến khi 100% tinh trùng ngừng vận động.

3. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng

Để xác định ảnh hưởng của nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng thì sử dụng dung dịch NaCl ở các mức thẩm thấu: 100, 200, 300, 400 và 500 mOsm/kg. Tinh dịch được pha loãng với các nồng độ thẩm thấu ở tỉ lệ 1:50 (tinh dịch:dung dịch). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Kiểm tra các thông số hoạt lực tinh trùng tương tự như được trình bày ở trên. Sau đó phân tích chọn ra mức thẩm thấu tối ưu cho hoạt lực tinh trùng cầu gai.

4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm sai số chuẩn. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu được xử lý theo phép phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) bằng kiểm định Duncan với mức ý nghĩa $P < 0,05$ thông qua phần mềm SPSS version 22.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng lên hoạt lực tinh trùng

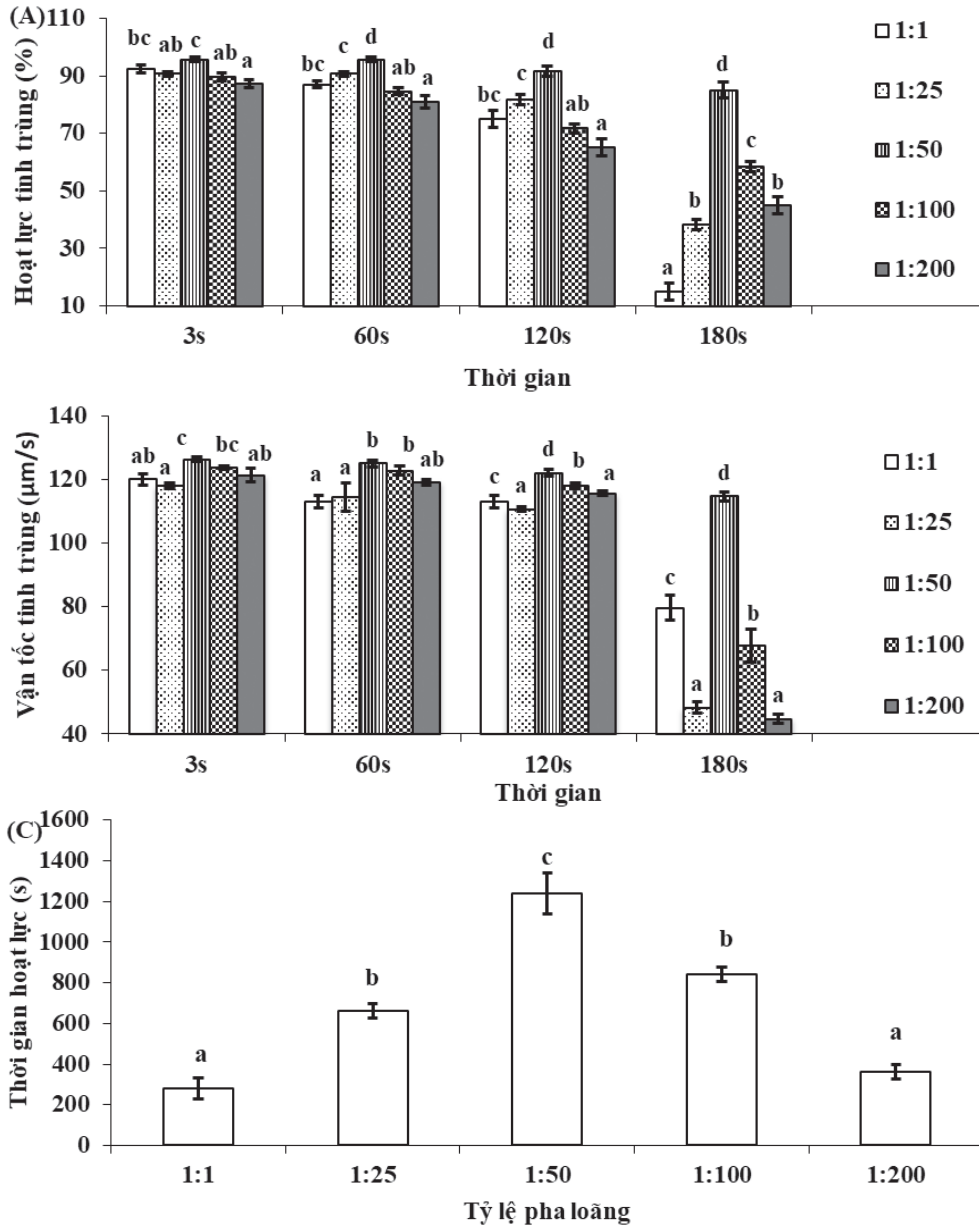
Tỉ lệ pha loãng là yếu tố quan trọng để kích thích sự hoạt động và duy trì khả năng thụ tinh

của tinh trùng. Tỷ lệ pha loãng tối ưu có thể giúp chúng ta kiểm soát sự đồng nhất của tinh trùng về hoạt động [7, 8, 13, 14].

Sau khi pha loãng được 3s, không có nhiều sự khác biệt về vận tốc và phần trăm tinh trùng hoạt lực ở các tỷ lệ 1:1; 1:25; 1:50; 1:100 và 1:200. Với tỷ lệ 1:1 vận tốc của tinh trùng đạt $120 \pm 1,73 \mu\text{m/s}$ và phần trăm tinh trùng hoạt lực đạt $92,33 \pm 1,45\%$; tỷ lệ 1:25

là $118 \pm 1 \mu\text{m/s}$ và $90,67 \pm 0,67\%$; tỷ lệ 1:50 là $126,33 \pm 0,67 \mu\text{m/s}$ và $95,67 \pm 0,67\%$; tỷ lệ 1:100 là $123,67 \pm 0,67 \mu\text{m/s}$ và $89,67 \pm 1,45\%$ và tỷ lệ 1:200 là $121,33 \pm 2,19 \mu\text{m/s}$ và $87,33 \pm 1,45\%$. Sau 60s, vận tốc và hoạt lực của tinh trùng có sự suy giảm, nhưng vẫn không có nhiều khác biệt giữa các tỷ lệ (Hình 1A).

Sau khi pha loãng 120s, phần trăm tinh trùng hoạt lực có sự suy giảm, tỷ lệ 1:1 còn $75 \pm 2,89\%$,



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng lên hoạt lực tinh trùng (A), vận tốc tinh trùng (B) và thời gian hoạt lực tinh trùng (C) của cầu gai.

Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu hiện sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

thấp nhất là tỉ lệ 1:200 còn $65 \pm 2,89\%$, cao nhất là tỉ lệ 1:50 đạt $91,67 \pm 1,67\%$. 180s sau khi pha loãng, có sự khác biệt rõ ràng về vận tốc và hoạt lực tinh trùng (Hình 1 A, B). Tỉ lệ 1:1, tinh trùng hoạt lực với vận tốc $79,67 \pm 3,84 \mu\text{m/s}$ tuy nhiên phần trăm tinh trùng hoạt lực chỉ còn $15 \pm 2,89\%$. Với tỉ lệ pha loãng này, tinh trùng hoạt động mạnh nhưng thời gian hoạt lực ngắn chỉ $280 \pm 52,9\text{s}$ (Hình 1C). Vận tốc của tinh trùng thấp nhất được ghi nhận ở tỉ lệ 1:25 với $48,33 \pm 1,86 \mu\text{m/s}$ và tỉ lệ 1:200 với $44,67 \pm 1,45 \mu\text{m/s}$, sau 180s, tinh trùng ở hai tỉ lệ này chỉ vận động chậm, xoay tròn hoặc lắc lư với phần trăm tinh trùng hoạt lực ở tỉ lệ 1:25 là $38,33 \pm 1,67\%$ và tỉ lệ 1:200 là $45 \pm 2,89\%$. Tỉ lệ pha loãng quá thấp hoặc quá cao đều gây cản trở hoạt lực của tinh trùng, tỉ lệ 1:200 thời gian vận động của tinh trùng là $360 \pm 34,64\text{s}$ (Hình 1C). Tỉ lệ 1:100, sau 180s vận tốc tinh trùng còn $67,67 \pm 5,17 \mu\text{m/s}$, phần trăm tinh trùng hoạt lực còn $58,33 \pm 1,67\%$ và thời gian vận động của tinh trùng là $840 \pm 34,64\text{s}$. Tỉ lệ 1:50, sau 180s vận tốc của tinh trùng duy trì ở mức $114,67 \pm 1,45 \mu\text{m/s}$ và phần trăm tinh trùng hoạt lực là $85 \pm 2,89\%$. Ở tỉ lệ này thời gian vận động của tinh trùng đạt $1240 \pm 100\text{s}$. Đối với cầu gai *Tripneustes gratila*, tỉ lệ pha loãng 1:50 là tốt nhất cho hoạt lực của tinh trùng trong nghiên cứu này.

Kết quả này khác với nghiên cứu trên tinh trùng sò điệp *Pecten maximus* là 1:40 [11], tỷ lệ 1:200 đối với tinh trùng hầu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* [5], 1:100 ở tinh trùng cá mú cộp *Epinephelus fuscoguttatus* [2] và cá hồng bạc *Lutjanus argentimaculatus* [3].

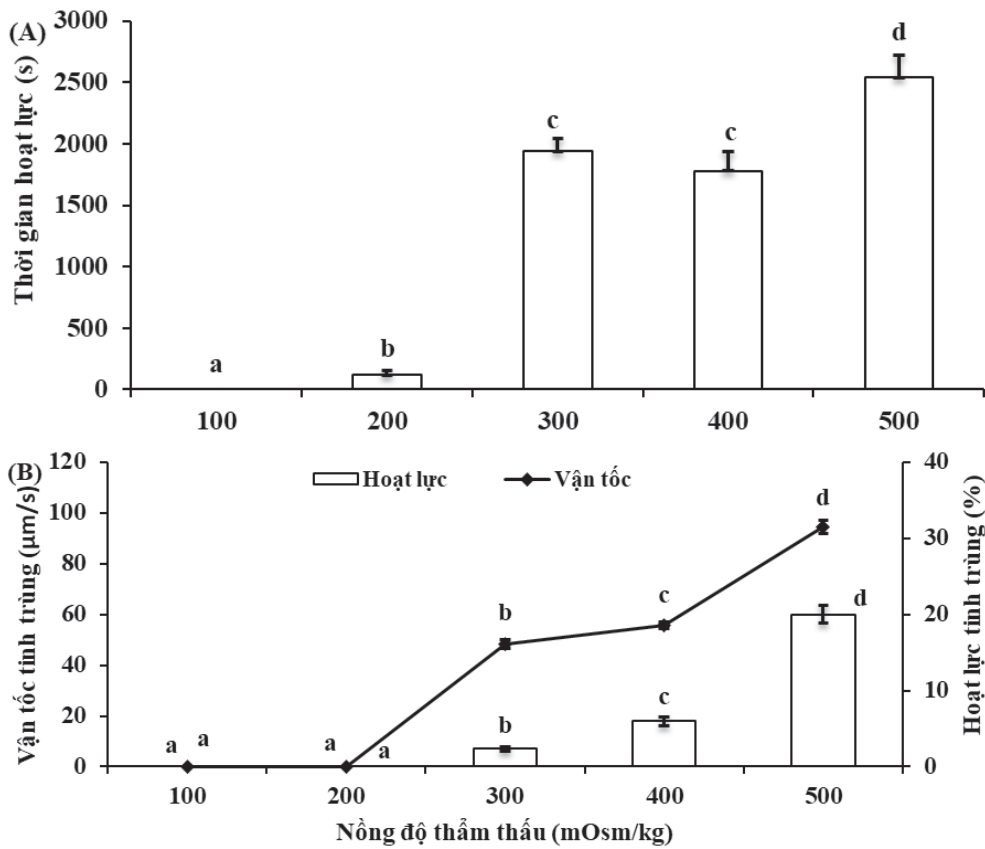
Tỷ lệ pha loãng 1:100 cũng là tỷ lệ pha loãng tốt nhất đối với hoạt lực tinh trùng cá đù vàng [13], cá chêm mõm nhọn *Psammoperca waigiensis* [14], cá mú cộp *Epinephelus fuscoguttatus* [2]. Trong khi đó, đối với tinh trùng cá rô châu Âu *Perca fluviatilis* [8] và cá diạ *Siganus guttatus* [1] thì hoạt lực tốt nhất quan sát được khi pha loãng ở tỷ lệ 1:50.

2. Ảnh hưởng của nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng

Tinh trùng của hầu hết những loài thủy sản là những tế bào có cấu tạo rất đơn giản, hiệu quả sản xuất năng lượng thấp và không có khả năng tồn tại lâu dài khi được phóng thích ra

môi trường bên ngoài. Vận động của tinh trùng phụ thuộc vào nồng độ thẩm thấu bên ngoài, sự thay đổi nồng độ thẩm thấu gây ra hiện tượng tế bào trương lên hoặc co lại dẫn đến sự điều chỉnh nồng độ thẩm thấu ở hầu hết tinh trùng của động vật thủy sản nước ngọt và nước mặn [9]. Ảnh hưởng của nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cầu gai được thể hiện ở Hình 2.

Ở mức nồng độ thẩm thấu 100 mOsm/kg tinh trùng không hoạt lực. Ở mức nồng độ thẩm thấu 200 mOsm/kg, tinh trùng chỉ lắc lư tại chỗ, không có khả năng di chuyển và tồn tại trong khoảng thời gian $120 \pm 34,64\text{s}$. Do vậy không tính được vận tốc và phần trăm tinh trùng hoạt lực ở mức nồng độ thẩm thấu này. Tại nồng độ thẩm thấu 300 mOsm/kg, sau khi tiếp xúc với dung dịch từ 15-20 phút, tinh trùng có dấu hiệu hoạt lực mạnh hơn, vận động ghi nhận được chủ yếu là tinh trùng lắc lư tại chỗ, một số ít có khả năng dịch chuyển nhưng khoảng cách ngắn và chậm, đạt vận tốc $48,33 \pm 1,86 \mu\text{m/s}$ và phần trăm tinh trùng hoạt lực chỉ đạt $2,33 \pm 0,33\%$. Tuy nhiên, thời gian hoạt lực của tinh trùng kéo dài đến $1940 \pm 105,83\text{s}$. Ở mức nồng độ thẩm thấu 400 mOsm/kg, vận tốc của tinh trùng đạt mức $55,67 \pm 1,45 \mu\text{m/s}$, phần trăm tinh trùng hoạt lực đạt $6 \pm 0,58\%$, thời gian hoạt lực của tinh trùng là $1780 \pm 156,2\text{s}$. Tại mức nồng độ thẩm thấu này, tinh trùng cũng mất một khoảng thời gian 15-20 phút sau khi tiếp xúc với môi trường để kích hoạt vận động của tinh trùng. Tuy nhiên, hoạt lực tinh trùng vẫn còn yếu. Ở mức nồng độ thẩm thấu 500 mOsm/kg, 8-10 phút sau khi tiếp xúc với môi trường, tinh trùng có dấu hiệu hoạt lực mạnh hơn với vận tốc đạt $94,33 \pm 2,72 \mu\text{m/s}$ và phần trăm tinh trùng hoạt lực đạt $20 \pm 1,15\%$ với thời gian hoạt lực là $2540 \pm 177,76\text{s}$. Trong nghiên cứu này, mức nồng độ 500 mOsm/kg là tốt nhất cho hoạt lực tinh trùng. Tuy nhiên, mức nồng độ thẩm thấu phù hợp nhất cho hoạt lực của tinh trùng chưa dừng lại ở mức này. Vì thế cần có nghiên cứu tiếp theo ở các mức nồng độ thẩm thấu cao hơn để tìm ra được nồng độ thẩm thấu thích hợp cho hoạt động tinh trùng của cầu gai. Nồng độ thẩm thấu trong dịch khoang cơ thể cầu gai dao động từ 808 ± 7 mOsm/kg đến 839 ± 5 mOsm/kg tùy thuộc vào nồng độ các ion Mg^{2+} , Ca^{2+} và K^{+}



Hình 2. Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu lên thời gian hoạt lực tinh trùng (A), vận tốc tinh trùng và hoạt lực tinh trùng (B) của cầu gai.

Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu hiện sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

trong nước biển và trong khoang cơ thể, trong các loài rộng muối, tinh trùng sẽ được kích hoạt ở mức nồng độ thẩm thấu gần 1000 mOsm/kg [9]. Mức nồng độ thẩm thấu 500 mOsm/kg cũng là mức áp suất tối ưu cho hoạt lực tinh trùng hầu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* [5] và cá hồng bạc *Lutjanus argentimaculatus* [3], cá mú cọp *Epinephelus fuscoguttatus* [2]. Tuy nhiên đối với tinh trùng cá chẽm mõm nhọn và cá đĩa thì mức áp suất tối ưu cho hoạt lực tinh trùng lần lượt là 400 mOsm/kg và 300 mOsm/kg [1, 14]. Như vậy, tinh trùng của mỗi loài động vật thủy sản khác nhau có hoạt lực tối ưu ở những nồng độ thẩm thấu khác nhau.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Tinh trùng cầu gai pha loãng ở tỷ lệ 1:50 (tinh dịch: ASW) cho kết quả tốt nhất về phần trăm hoạt lực ($95,67 \pm 0,67\%$) cũng như thời

gian hoạt lực (1240 ± 100 s).

Nồng độ thẩm thấu tối ưu cho hoạt lực tinh trùng cầu gai là 500 mOsm/kg với phần trăm và thời gian hoạt lực lần lượt là: $20 \pm 1,15\%$ và $2540 \pm 177,76$ s.

2. Kiến nghị

Nồng độ thẩm thấu ở nghiên cứu này tuy ở mức 500 mOsm/kg cho kết quả tốt nhất nhưng chưa phải là nồng độ thẩm thấu cho phần trăm hoạt lực tinh trùng cao. Vì thế cần có những nghiên cứu tiếp theo ở các mức nồng độ thẩm thấu cao hơn để tìm ra được nồng độ thẩm thấu giúp cho phần trăm hoạt lực tinh trùng cũng như thời gian hoạt lực tinh trùng cầu gai tối ưu hơn.

Nồng độ thẩm thấu cũng còn phụ thuộc vào thành phần các cation có trong môi trường. Vì thế các nghiên cứu tiếp theo cần được triển khai hàm lượng các cation khác nhau lên các thông số hoạt lực tinh trùng của cầu gai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Võ Thị Ngọc Giàu, Lê Minh Hoàng, Phan Văn Út & Phạm Quốc Hùng (2014), “Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng, pH và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cá diạ (*Siganus guttatus* Bloch, 1787)”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 3, pp. 26-30.
2. Lê Minh Hoàng, Hoàng Thị Hiền, Phạm Phương Linh & Phạm Quốc Hùng (2014), “Ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng, nhiệt độ, pH và áp suất thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cá mú cọp (*Epinephelus fuscoguttatus* Forskal, 1775)”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 1, pp. 19-23.
3. Lê Minh Hoàng & Nguyễn Địch Thanh (2015), “Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng, pH và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cá hồng bạc (*Lutjanus argentimaculatus* Forskal, 1775).”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 3, pp. 27-31.
4. Nguyễn Hữu Khánh (2009), *Nghiên cứu các đặc trưng sinh học của lớp sao biển và cầu gai trong các rạn san hô ở Vịnh Vân Phong - Bến Gỏi, tỉnh Khánh Hòa*, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Nha Trang.
5. Nguyễn Thị Tý Trâm, Trương Thị Bích Hồng, Mai Như Thủy & Lê Minh Hoàng (2018), “Ảnh hưởng tỉ lệ pha loãng, áp suất thẩm thấu và các cation lên hoạt lực tinh trùng hầu Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas* Thunberg 1973)”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 2, pp. 78-84.

Tài liệu tiếng Anh

6. Alavi S.M.H. & Cosson J. (2006), “Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review”, *Cell biology international*, 30(1), pp. 1-14.
7. Alavi S.M.H., Cosson J., Karami M., Amiri B.M. & Akhoundzadeh M.A. (2004), “Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality”, *Reproduction*, 128(6), pp. 819-828.
8. Alavi S.M.H., Rodina M., Policar T., Kozak P., Psenicka M. & Linhart O. (2007), “Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility”, *Theriogenology*, 68(2), pp. 276-283.
9. Cabrita E., Robles V. & Herráez P. (2008), *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*, CRC press.
10. Dworjanyan S.A., Pirozzi I. & Liu W. (2007), “The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Tripneustes gratilla*”, *Aquaculture*, 273(4), pp. 624-633.
11. Faure C., Devauchelle N. & Girard J.-P. (1994), “Ionic factors affecting motility, respiration and fertilization rate of the sperm of the bivalve *Pecten maximus* (L.)”, *Journal of Comparative Physiology B*, 164(6), pp. 444-450.
12. Lawrence J.M. & Agatsuma Y. (2007), Ecology of *Tripneustes*, in: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* Elsevier. pp. 499-520.
13. Le M.H., Lim H.K., Min B.H., Park M.S., Son M.-H., Lee J.U. & Chang Y.J. (2011), “Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis*”, *Journal of Environmental Biology*, 32(3), pp. 271.
14. Le M.H. & Pham H.Q. (2017), “Sperm motilities in waigieu seaperch, *Psammoperca waigiensis*: Effects of various dilutions, ph, temperature, osmolality, and cations”, *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(3), pp. 435-443.
15. Mos B., Cowden K.L., Nielsen S.J. & Dworjanyan S.A. (2011), “Do cues matter? Highly inductive settlement cues don't ensure high post-settlement survival in sea urchin aquaculture”, *PLoS One*, 6(12), pp. e28054.
16. Tvedt H.B., Benfey T.J., Martin-Robichaud D.J. & Power J. (2001), “The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*”, *Aquaculture*, 194(1-2), pp. 191-200.