

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CÁC CATION LÊN HOẠT LỰC TINH TRÙNG CẦU GAI (*Tripneustes gratilla*)

EFFECTS OF CATIONS ON SPERM MOTILITY OF SEA URCHIN (*Tripneustes gratilla*)

Mai Như Thủy¹, Trương Thị Mai Hương², Lục Minh Diệp¹, Lê Minh Hoàng¹

¹Viện Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

²Phòng Tổ chức nhân sự, Trường Đại học Nha Trang

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

Ngày nhận bài: 14/06/2022; Ngày phân biên thông qua: 24/06/2022; Ngày duyệt đăng: 28/06/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm ra được nồng độ các cation tối ưu cho hoạt lực tinh trùng cầu gai *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758). Tinh trùng cầu gai được pha loãng với các môi trường có chứa các cation $K^+/Na^+/Ca^{2+}$ hoặc Mg^{2+} với các mức nồng độ thí nghiệm 0,2M; 0,4M; 0,6M và 0,8M, ở tỷ lệ pha loãng 1:50 (tinh dịch: môi trường). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 9 lần. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt lực tinh trùng cầu gai tối ưu quan sát được khi pha loãng với môi trường có cation K^+ ở nồng độ 0,4M; môi trường có cation Na^+ ở nồng độ 0,2M; môi trường có cation Ca^{2+} ở nồng độ 0,8M và môi trường có cation Mg^{2+} ở nồng độ 0,2M. Tóm lại, sử dụng môi trường K^+ (0,4M), Na^+ (0,2M), Ca^{2+} (0,8M) và Mg^{2+} (0,2M) làm môi trường hoạt lực tinh trùng/thụ tinh nhân tạo có hiệu quả đối với việc thụ tinh của cầu gai.

Từ khóa: Tinh trùng, cation, hoạt lực tinh trùng, cầu gai *Tripneustes gratilla*

ABSTRACT

The objective of the present study was to assess the effects of cations on sperm motility of sea urchin *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758). Sperm was diluted in medium that contained cations as K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} with the concentration of each cation was 0.2M; 0.4M; 0.6M and 0.8M at the ratio of 1:50 (semen: medium). Each treatment was replicated nine times. The result showed that sperm motility of sea urchin was the best at the cation concentration of $K^+/Na^+/Ca^{2+}$ or Mg^{2+} at 0.4M/0.2M/0.8M or 0.2M, respectively. In conclusion, using K^+ (0.4M), Na^+ (0.2M), Ca^{2+} (0.8M) and Mg^{2+} (0.2M) as an artificial insemination medium/activation medium was effective for fertilizing/motility of sea urchin.

Key words: Sperm, sperm motility, cation, sea urchin, *Tripneustes gratilla*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tripneustes gratilla (Linnaeus, 1758) là loài cầu gai nhiệt đới có giá trị kinh tế với tốc độ tăng trưởng nhanh [12]; [16]. Nhiều nơi trên thế giới đã sử dụng tuyển 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 cầu gai có giá bán lẻ trung bình 75 USD/kg [15]. Ngoài giá trị thương mại, cầu gai còn có vai trò quan trọng trong hệ sinh thái, cùng với san hô, sao biển gai, cầu gai tạo nên mắt xích quan trọng của chuỗi thức ăn trong hệ sinh thái rạn san hô [4]. Tuy nhiên việc khai thác ồ ạt đã gây ra sự sụt giảm đáng kể sản lượng cầu gai trên toàn cầu [21]. Theo báo cáo của Guðmundur Stefánsson và cộng

sự (2017), sản lượng cầu gai năm 2017 chỉ đạt 75.000 tấn, đã giảm 37,5% so với năm 1995 (đạt sản lượng cao nhất với 120.000 tấn) [14]. Vì vậy, việc bảo vệ nguồn lợi, sản xuất giống và nuôi cầu gai đã và đang được nhiều quốc gia trên thế giới quan tâm nghiên cứu. Để sản xuất giống nhân tạo tại chỗ cần phải chủ động con giống có chất lượng đáp ứng nhu cầu nuôi thương phẩm. Để có con giống cầu gai 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 cầu gai. Nhiều công trình nghiên cứu trên cá cho thấy, hoạt lực của tinh trùng cá chịu ảnh hưởng bởi một

vài thông số trong môi trường hoạt động của chúng như nồng độ các cation (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), nồng độ thẩm thấu, nhiệt độ, pH và tỉ lệ pha loãng [1]; [9]; [10]; [11]. Hiểu biết các thông số này có thể giúp tạo ra được môi trường hoạt lực tối ưu cho tinh trùng của cầu gai, giúp nghề sản xuất giống nhân tạo cầu gai đạt hiệu quả cao. 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* [18], cá bon Đại Tây Dương (*Hippoglossus hippoglossus*) [15], cá chêm môn nhọn (*Psammoperca waigiensis*) [5], hà Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* [6]. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực của tinh trùng cầu gai đã được Hoàng Hà Giang và Lê Minh Hoàng thực hiện (2021) [2]. Tuy nhiên, nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ các cation lên hoạt lực của tinh trùng trên đối tượng cầu gai vẫn còn hạn chế.

Nghiên cứu “Ảnh hưởng của nồng độ các cation lên hoạt lực tinh trùng cầu gai *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758)” được thực hiện nhằm đánh giá nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ các cation 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

2.1. Thu mẫu

Tiến hành thu mẫu 3 đợt, 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 và 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 huyệt 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 dịch có màu trắng sữa hoặc vàng nhạt không bị lẫn tạp chất (nước biển, nhớt, rong ...)

2.2. Kiểm tra đánh giá các thông số hoạt lực tinh trùng

Tinh dịch được pha loãng với môi trường hoạt động ở tỷ lệ 1:50 (tinh dịch: môi trường) trong các ống nhựa enpendoff và đưa lên lam kính quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 400 lần. Các thông số như hoạt lực và vận tốc tinh trùng được đánh giá 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. Vận tốc tinh trùng được tính bằng khoảng cách vận động của tinh trùng trên một giây.

2.3. Ảnh hưởng của nồng độ cation (K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+}) lên hoạt lực tinh trùng

Để xác định ảnh hưởng của nồng độ ion lên hoạt lực của tinh trùng, thí nghiệm sử dụng bốn loại ion bao gồm: K^+ , Ca^{2+} , Na^+ và Mg^{2+} ở các nồng độ khác nhau: 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M và 0,8 M đối với mỗi loại ion. Ion K^+ trong dung dịch KCl, ion Ca^{2+} trong dung dịch $CaCl_2$, ion Mg^{2+} trong dung dịch $MgCl_2$ và ion Na^+ trong dung dịch NaCl. Các dung dịch được pha loãng với tỉ lệ 1:50 (tinh dịch: dung dịch chứa cation). Mỗi nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 9 lần. Kiểm tra hoạt lực tinh trùng tương tự như được trình bày ở trên. Phân tích các kết quả để chọn ra nồng độ cation tốt nhất.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

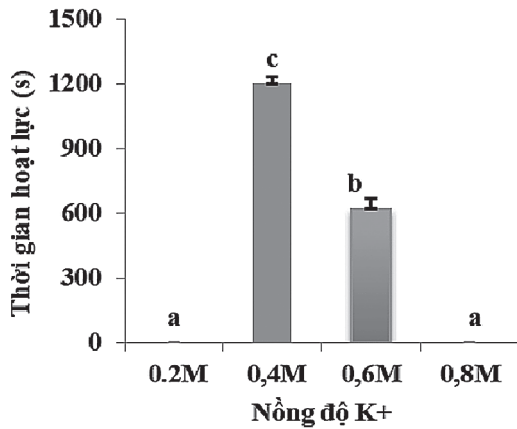
Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm sai số chuẩn. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Ảnh hưởng của nồng độ các cation được xử lý theo phép phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) bằng kiểm định Duncan với mức ý nghĩa $P < 0,05$ thông qua phần mềm SPSS version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

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của ion K^+ lên hoạt lực tinh trùng cầu gai

Nồng độ ion K^+ trong nước biển bình thường ở mức 10 mM, khi tăng nồng độ ion K^+

lên 50 mM kéo dài tuổi thọ của tinh trùng, tại mức pH 8, nồng độ ion K⁺ tối đa cho hoạt lực của tinh trùng từ 50-75 mM [8]. Đối với tinh



Hình 1. Ảnh hưởng của ion K⁺ lên hoạt lực tinh trùng

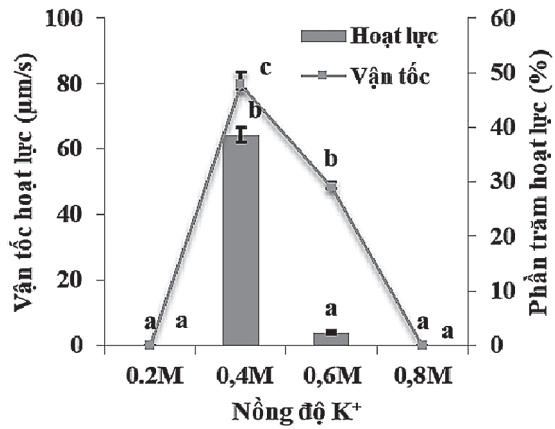
Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Trong nghiên cứu này, tại nồng độ 0,2M và 0,8M, tinh trùng cầu gai bị bất hoạt. Tuy nhiên tại mức nồng độ 0,4M, quan sát thấy hoạt lực của tinh trùng với phần trăm tinh trùng hoạt lực là $38,67 \pm 1,33\%$ và vận tốc của tinh trùng ghi nhận được là $79,67 \pm 3,84 \mu\text{m/s}$, tinh trùng hoạt lực trong khoảng thời gian $1200 \pm 36,64\text{s}$ (Hình 1). Tại nồng độ 0,6M, hoạt lực của tinh trùng giảm chỉ còn $2,33 \pm 0,33\%$ và vận tốc của tinh trùng giảm còn $48,33 \pm 1,86 \mu\text{m/s}$, thời gian hoạt lực của tinh trùng là $620 \pm 52,92\text{s}$, vận động của tinh trùng bị ức chế tại mức nồng độ này, tinh trùng chỉ lắc lư tại chỗ, và một phần rất nhỏ tinh trùng có khả năng di chuyển. Đối với thang nồng độ này, ion K⁺ nồng độ 0,4M là tốt nhất cho hoạt lực của tinh trùng. Nồng độ này cũng là nồng độ tối ưu cho hoạt lực tinh trùng hầu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* [6], tinh trùng cá mú cọp *Epinephelus fuscoguttatus* [3] và tinh trùng cá hồng *Lutjanus argentimaculatus* [19]. Tuy nhiên đối với tinh trùng cá chẽm mõm nhọn *Psammoperca waigiensis* thì nồng độ tốt nhất là 0,6M [20].

3.2 Ảnh hưởng của ion Ca²⁺ lên hoạt lực tinh trùng

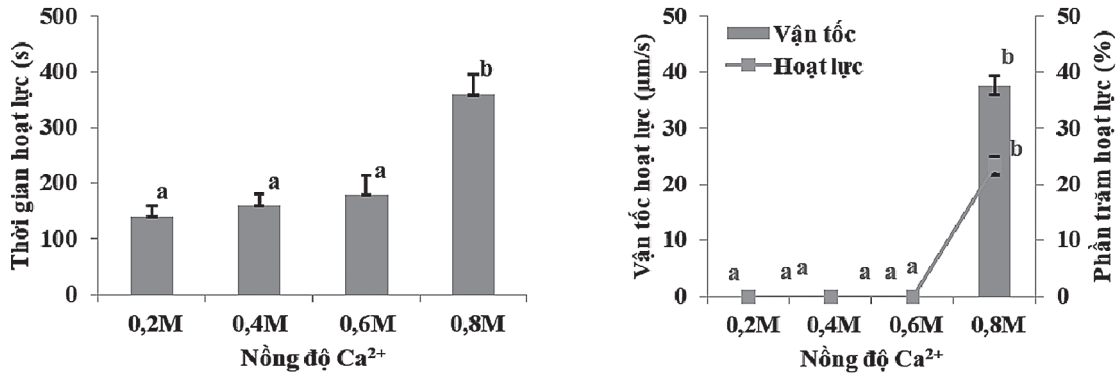
Ca²⁺ và K⁺ là hai ion quan trọng, hiện diện trong huyết tương của tinh dịch và được coi là ion chìa khóa để kích hoạt vận động của tinh trùng [10]. Nghiên cứu này sử dụng các mức

trùng cầu gai, nồng độ ion K⁺ cùng với Na⁺ còn ảnh hưởng tới khả năng hô hấp của tinh trùng khi phóng thích vào môi trường nước [22].



nồng độ 0,2M; 0,4M; 0,6M; 0,8M bằng cách dùng dung dịch CaCl₂. Kết quả cho thấy, chỉ có mức nồng độ 0,8M tinh trùng có khả năng vận động. Tuy nhiên hoạt lực rất yếu, chỉ có $23,33 \pm 1,67\%$ tinh trùng có khả năng hoạt lực, thời gian hoạt lực ghi nhận được là $360 \pm 34,64\text{s}$, và vận tốc của tinh trùng là $37,67 \pm 1,76 \mu\text{m/s}$ (Hình 2).

Ở các nồng độ còn lại, tinh trùng chỉ có khả năng lắc lư tại chỗ trong khoảng thời gian ngắn, tinh trùng tồn tại trong khoảng thời gian dao động từ $140 \pm 20\text{s}$ đến $180 \pm 34,64\text{s}$ (Hình 2). Đối với một số loài cá, Ca²⁺ ngoại bào được coi là điều kiện tiên quyết cho việc kích hoạt vận động của tinh trùng. Sự xâm nhập của ion Ca²⁺ ngoại bào vào tế bào chất của tinh trùng gây ra sự kích hoạt một số enzyme hoặc các protein gây ra sự kích hoạt tinh trùng [13]. Trong nghiên cứu này, với các mức nồng độ như trên, nồng độ 0,8M là tốt nhất cho hoạt lực tinh trùng. Kết quả của nghiên cứu này khác với các nghiên cứu trên các đối tượng khác như: cá chẽm mõm nhọn *Psammoperca waigiensis* và hầu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* (nồng độ tối ưu là 0,2M) [6]; [20], cá hồng *Lutjanus argentimaculatus* và cá mú cọp *Epinephelus fuscoguttatus* (nồng độ tối ưu là 0,4M) [3]; [19].

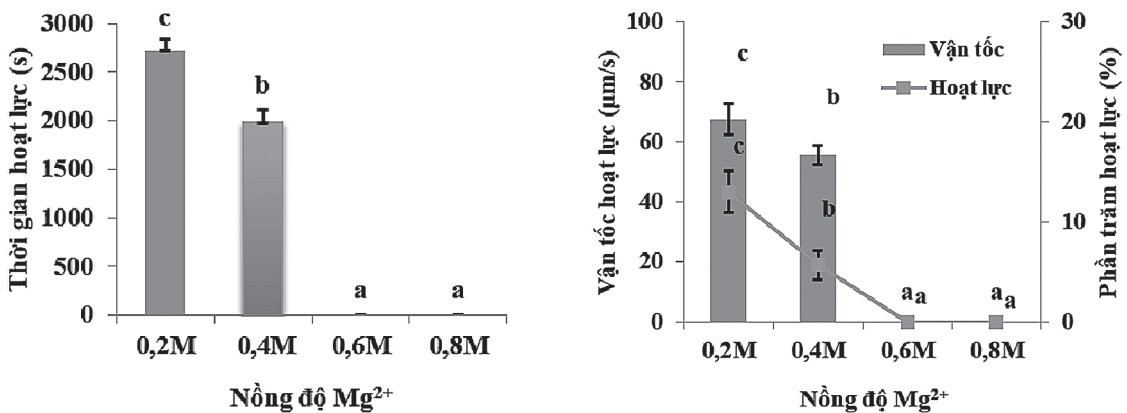


Hình 2. Ảnh hưởng của ion Ca²⁺ lên hoạt lực tinh trùng
 Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa (P<0,05).

3.3 Ảnh hưởng của ion Mg²⁺ lên hoạt lực tinh trùng

Ảnh hưởng của ion Mg²⁺ lên hoạt lực tinh trùng cầu gai được thể hiện qua Hình 3. Trong hầu hết các loài, năm ion chiếm ưu thế trong huyết tương tinh dịch bao gồm: natri, kali, magiê, canxi, và clorua, nồng độ của chúng khác nhau tùy theo loài, nhưng đều có một phạm vi phù hợp cung cấp điều kiện tốt nhất cho hoạt lực của tinh trùng. Sự thay đổi nồng độ các ion này sẽ ảnh hưởng đến tinh trùng. Khi được phóng thích vào môi trường nước, sự thay đổi của nồng độ ion ngoại bào sẽ dẫn đến sự thay đổi của các ion này trong nội bào tinh trùng [10]. Trong nghiên cứu này, với các mức nồng độ 0,2M; 0,4M; 0,6M và 0,8M tinh trùng cầu gai bị mất khả năng vận động tại mức

nồng độ 0,6M và 0,8M. Tinh trùng hoạt lực tốt nhất ở mức nồng độ 0,2M, với phần trăm tinh trùng hoạt lực là 13±2,08%, vận tốc đạt 67,67±5,17µm/s, thời gian hoạt lực của tinh trùng đạt 2720±121,66s. (Hình 3). Ở mức nồng độ 0,4M, chỉ có 5,67±1,45% tinh trùng hoạt lực, với thời gian hoạt lực 1980±124,9s. Đối với ion Mg²⁺, nồng độ càng cao càng ức chế hoạt lực tinh trùng, tại mức nồng độ 0,2M tinh trùng có khả năng hoạt lực, tuy nhiên vận động yếu và chỉ một phần nhỏ tinh trùng có khả năng dịch chuyển. Kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu trên tinh trùng cá chêm mồm nhọn *Psammoperca waigiensis* [20] và cá mú cộp *Epinephelus fuscoguttatus* [3], nhưng kết quả này khác với nghiên cứu trên tinh trùng cá hồng *Lutjanus argentimaculatus* (nồng độ tối



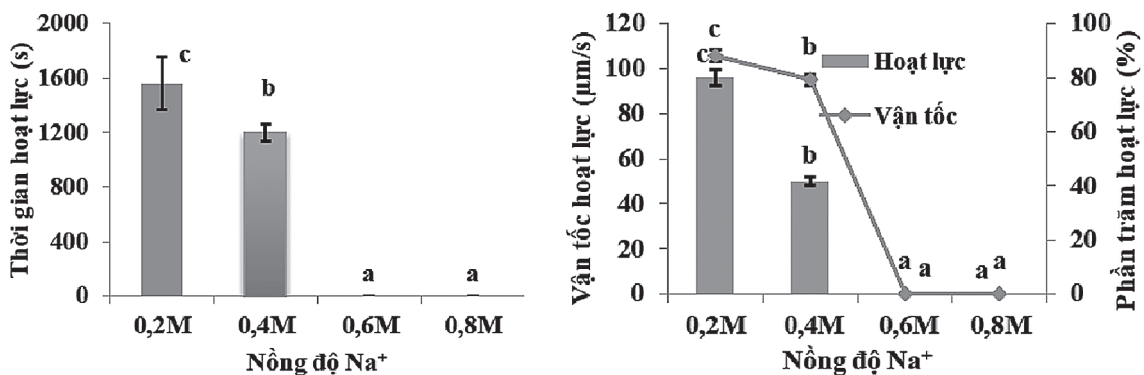
Hình 3. Ảnh hưởng của ion Mg²⁺ lên hoạt lực tinh trùng
 Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa (P<0,05).

uru là 0,4M) [19] và tinh trùng hầu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* (bị bất hoạt ở tất cả các nồng độ 0,2; 0,4; 0,6 và 0,8M) [6].

3.4 Ảnh hưởng của ion Na^+ lên hoạt lực tinh trùng

Không nhiều tài liệu nói về ảnh hưởng của ion Na^+ lên hoạt lực của tinh trùng cầu gai. Tinh trùng của các loài cầu gai nói chung, cũng giống như các loài động vật biển khác là bất hoạt trong tinh sào, khi phóng thích vào nước biển, vận động của tinh trùng được bắt đầu, sự trao đổi Na^+/H^+ qua màng tế bào dẫn đến sự thay đổi độ pH bên trong tế bào, lần lượt kích hoạt các phản ứng sản sinh năng lượng, kích thích tinh trùng vận động [13]. Nghiên cứu các mức nồng độ 0,2M; 0,4M; 0,6M và 0,8M cho thấy, tinh trùng cầu gai hoạt lực tốt nhất ở mức

nồng độ 0,2M, với vận tốc đạt $106 \pm 2,64 \mu\text{m/s}$ và phần trăm tinh trùng hoạt lực đạt $80 \pm 2,89\%$, thời gian hoạt lực của tinh trùng là $1560 \pm 192,9\text{s}$ (Hình 4). Tại mức nồng độ 0,4M, hoạt lực của tinh trùng suy giảm, với thời gian hoạt lực là $1200 \pm 60\text{s}$, vận tốc là $95 \pm 2,51 \mu\text{m/s}$ và phần trăm tinh trùng hoạt lực là $41,67 \pm 1,67\%$. Khi nâng nồng độ lên 0,6M và 0,8M thì tinh trùng bất hoạt. Như vậy với ion Na^+ , nồng độ 0,2M là tốt nhất cho hoạt lực của tinh trùng cầu gai. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy, có sự khác biệt về nồng độ ion Na^+ tối ưu cho hoạt lực tinh trùng cầu gai (0,2M) so với tinh trùng hầu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* và tinh trùng cá hồng *Lutjanus argentimaculatus* (0,4M) [6]; [19], tinh trùng cá mú cộp *Epinephelus fuscoguttatus* (0,6M) [3].



Hình 4. Ảnh hưởng của ion Na^+ lên hoạt lực tinh trùng
 Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Tinh trùng cầu gai được pha loãng với các môi trường có chứa các cation $K^+/Na^+/Ca^{2+}$ hoặc Mg^{2+} với các nồng độ khác nhau, cho thấy: Ion K^+ 0,4M; Ion Ca^{2+} 0,8M; Ion Mg^{2+} 0,2M và Ion Na^+ 0,2M là tốt nhất cho hoạt lực của tinh trùng cầu gai, với tỷ lệ tinh trùng hoạt lực lần lượt là $38,67 \pm 1,33\%$; $23,33 \pm 1,67\%$; $13 \pm 2,08\%$ và $80 \pm 2,89\%$; thời gian hoạt lực của tinh trùng tương ứng là $1200 \pm 36,64\text{s}$; $360 \pm 34,64\text{s}$; $2720 \pm 121,66\text{s}$ và $1560 \pm 192,9\text{s}$; vận tốc của tinh trùng ghi nhận được lần lượt là $79,67 \pm 3,84 \mu\text{m/s}$; $37,67 \pm 1,76 \mu\text{m/s}$;

$67,67 \pm 5,17 \mu\text{m/s}$ và $106 \pm 2,64 \mu\text{m/s}$.

2. Kiến nghị

Cần tiến hành thêm các nghiên cứu về sinh lý, sinh hóa của huyết tương tinh trùng cầu gai để tìm ra môi trường tối ưu hơn cho hoạt lực của tinh trùng.

Cần bố trí thêm các thí nghiệm về ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt lực tinh trùng cũng như các nghiên cứu về sinh lý, sinh hóa tế bào trứng để hoàn thiện nghiên cứu về sinh lý sinh sản ở cầu gai, cũng như tiến hành thêm thí nghiệm về tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ nở để đánh giá chính xác hơn về hoạt lực tinh trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Lưu Thị Dung và Phạm Quốc Hùng (2005), *Môi trường học thủy sản*. Nhà xuất bản nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh.
2. Hoàng Hà Giang, Lê Minh Hoàng (2021), *Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng và nồng độ thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cầu gai *Trippneustes gratila* (Linnaeus, 1758)*. Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản – Trường Đại học Nha Trang, 3, 21-26.
3. 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 cộp (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775)*. Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản – Trường Đại học Nha Trang, 1, 19-23.
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 Hồng Nhung (2012), *Nghiên cứu đánh giá chất lượng tinh trùng và ảnh hưởng của một số yếu tố lên hoạt lực tinh trùng cá chêm mõm nhọn *Psammoperca waigiensis* (Cuvier & Valenciennes, 1828)*. Luận văn thạc sĩ, Đại học Nha Trang.
6. 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 hàu Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas* Thunberg 1973)*. Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản, 2, 78-84.

Tài liệu tiếng Anh

7. Alavi, S.M.H., J. Cosson, M. Karami, B.M. Amiri, et al. (2004), *Spermatozoa motility in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*): effects of pH, dilution rate, ions and osmolality*. Reproduction. 128 p. 819-828.
8. Alavi, S.M. and Cosson, J. (2006), “Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review”, *Cell Biol Int.* 30.
9. Brain, Dale. (1985), “Sperm receptivity in sea urchin oocytes and eggs”, *J. exp. Biol.* 118, pp. 85-97
10. Cabrita, E., Robles, V. and Herráez, P. (2009), “Sperm quality assessment”, in Elsa, Cabrita., Vanesa, Robles. , and Paz, Herráez., Editors, *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*, CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 93-149.
11. Carolina, A. Freire., Ivonete, A. Santos. and Denilton, Vidolin (2011), “Osmolality and ions of the perivisceral coelomic fluid of the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) upon salinity and ionic challenges”, *Zoologia.* 28 (4), pp. 479-487.
12. Dworjanyan, S.A., Pirozzi, I. and Liu, W.S. (2007), “The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Trippneustes gratilla*”, *Aquaculture International.* 273, pp. 624-633.
13. Ferdi, A. van DORSTEN., Markus, WYSS., Theo WALLIMANN. and Klaas, NICOLAY (1997), “Activation of sea-urchin sperm motility is accompanied by an increase in the creatine kinase exchange flux”, *Biochem. J.* 325, p. 411±416.
14. Guðmundur Stefánsson, Holly Kristinsson, Nikoline Ziemer, Colin Hannon and Philip James (2017), *Markets for Sea Urchins: A Review of Global Supply and Markets*. DOI: [10.13140/RG.2.2.12657.99683](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12657.99683)
15. Harald, B.T., J.T. Benfey, D.J. Martin-Robichaud, and J. Power (2001), *The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus**. *Aquaculture.* 194 (1-2): p. 191-200.
16. James, P., Evensen, T., and Samuelsen, A. 2017), *Commercial scale sea urchin roe enhancement*

- in Norway: Enhancement, transport, and market assessment.* Tromsø: Nofima AS (ISBN: 978-82-8296-490-6).
17. Lawrence, J.M. and Agatsuma, Y. (2001), “*Ecology of Tripneustes*”, in Lawrence, J.M., Editor, *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 499-520.
 18. Le, M.H., H.K. Lim, B.H. Min, M.S. Park, et al., (2011), *Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish Larimichthys polyactis*. *Environmental Biology*. 32 p. 271-276.
 19. Minh Hoang Le, Vu Thai Hoa (2017), *Effect of cations on sperm motility of mangrove red snapper Lutjanus argentimaculatus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5, 10-14.
 20. Minh Hoang Le, Hung Quoc Pham (2017), *Sperm Motilities in Waigieu Seaperch, Psammoperca waigiensis: Effects of Various Dilutions, pH, Temperature, Osmolality, and Cations*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48, 435-443.
 21. Mos, B., Cowden, K.L., Nielsen, S.J. and Dworjanyn, 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).
 22. Richard, Christen., Robert, W. Schackmann. and Bennett, M. Shapiro. (1982), “*Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus*”, *The Journal of biological chemistry*. 257(25), pp. 14881-14890.