

MOTILIDAD, MORFOLOGIA, CONCENTRACION Y NUMERO DE ESPERMATOZOIDES EN REPRODUCTORES DE TRUCHA ARCO IRIS *ONCORHYNCHUS MYKII* (PISCES: SALMONIDAE)

por

Renán Piñeros-Piñeros & Plutarco Cala-Cala*

Resumen

Piñeros, R. & P. Cala: Motilidad, morfología, concentración y número de espermatozoides en reproductores de trucha Arco Iris *Oncorhynchus mykii* (Pisces: Salmonidae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 18 (68): 75-81, 1991. ISSN 0370-3908.

Siete días después de la extracción manual del semen en 66 padrotes mantenidos en una temperatura del agua cercana a los 12°C, fue posible una nueva extrusión de semen. Los peces se dividieron en tres grupos según el peso: menores de 350 gr, entre 350-500 g y con más de 500 g. La concentración de espermatozoides varió entre 1.650 y 25.780 millones por mm de semen. No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a la concentración de esperma, la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides.

Abstract

From 66 male trout classified according to weight (less than 350 g, 350-500 g and large than 500 g) a second sperm extrusion was obtained seven days after the first one. The total concentration of spermatozoa varied from 1.650 to 25.780 million per millimeter in the second extrusion. No significant differences in concentration, motility and viability of spermatozoa were found when comparing the three groups.

La trucha "arco iris", *Oncorhynchus mykii*, es un salmónido propio de los ríos de la cuenca del Pacífico de América del Norte que habita desde Alaska hasta el sur de Oregon y California. En Colombia esta especie fue introducida en 1939 con ejemplares provenientes del río Sacramento (Del Real, 1976). Se cultivó por primera vez en la Estación de las Cintas en el Lago de Total (Boyacá). Esta estación al igual que la de los Pozos fue construida por el Ministerio de Economía (actualmente M. de Desarrollo) (Ramos, 1973).

Fenotípicamente la trucha arco iris, a diferencia de otros salmónidos que tienen la piel cubierta de puntos rojos, presenta numerosos puntos negros estrellados en estado adulto, posee sobre los flancos una banda rosada con reflejos irisados particularmente visible en los machos durante la época de la reproducción.

Los machos presentan prognatismo mandibular, más evidente en estado adulto. Su color es más oscuro, generalmente son de menor tamaño. Al llegar al año ya producen semen, pero sólo se emplean como reproductores entre los 2 y los 5 años (Pons Rosello, 1979), las hembras alcanzan su madurez sexual a los 2 años.

* Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.E.

En estado natural las truchas sexualmente maduras inician su reproducción cuando la temperatura aumenta en la primavera, influyendo también en ello el fotoperíodo (e. g. **Stevenson, 1987**). En el trópico, la maduración puede tener lugar en cualquier época del año, con máximo de maduración gonadal hacia los meses de septiembre-noviembre.

Los espermatozoides, una vez activados por el contacto con el agua, presentan motilidad de su cola la cual decae rápidamente. La supervivencia del espermatozoide en el agua depende principalmente de la diferencia de contenido de sales entre el agua y el cuerpo del pez; a mayor diferencia menor será su tiempo de vida (**Lagler et al., 1977**).

Estos espermatozoides no poseen acrosoma, hecho posiblemente asociado con la presencia de micrópilo en el oocito (**Zanuy y Carrillo, 1987**). Son corpúsculos móviles de 25–50 micras de longitud diferenciados en una cabeza bastante gruesa y una cola filiforme.

Se ha demostrado en el laboratorio que con el uso de un diluyente, se requieren 2×10^5 espermatozoos por óvulo para fecundaciones superiores al 90% (**Blanco Cachafeiro, 1977**). Otros estudios señalan que al utilizar semen congelado, son necesarios 3×10^6 espermatozoides por óvulo, para obtener una fecundidad satisfactoria (**Stoss y Holtz, 1981**).

La recolección de muestras se efectuó en la Estación Piscícola del Neusa (CAR) a orillas del embalse del mismo nombre, Depto. de Cundinamarca a 3.000 m.s.n.m., y con una temperatura promedio del agua de 12°C. Se seleccionaron 78 machos sexualmente maduros, hecho que se verificó extrayéndoles semen por medio de extrusión.

Los análisis del material se llevaron a cabo en los laboratorios de la Estación Piscícola del Neusa y de Genética de la Facultad de Medicina y del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá.

Se registraron el peso y la longitud total de cada uno de los peces, los cuales fueron marcados en la aleta dorsal con un dispositivo plástico numerado sucesivamente. El registro de las medidas, el marcado y la obtención de la muestra de semen no se hicieron en la misma jornada, para evitar la excesiva manipulación de los animales que puede causarles la muerte. Los especímenes seleccionados fueron separados de los demás reproductores de la estación. Con el fin de estimular la espermiogénesis (**Baurreau, 1984**) se colocaron de 2 a 3 hembras por cada 15 a 20 machos dentro de un mismo estanque. La temperatura promedio del agua del estanque fue de 12°C y la alimentación se les suministró a saciedad. Las muestras fueron obtenidas a los 7 días (84 grados/día) de reposo. Se utilizó éste período ya que se aproxima al descrito por **Huet (1983)** de 70 grados/día, en razón de lo impreciso

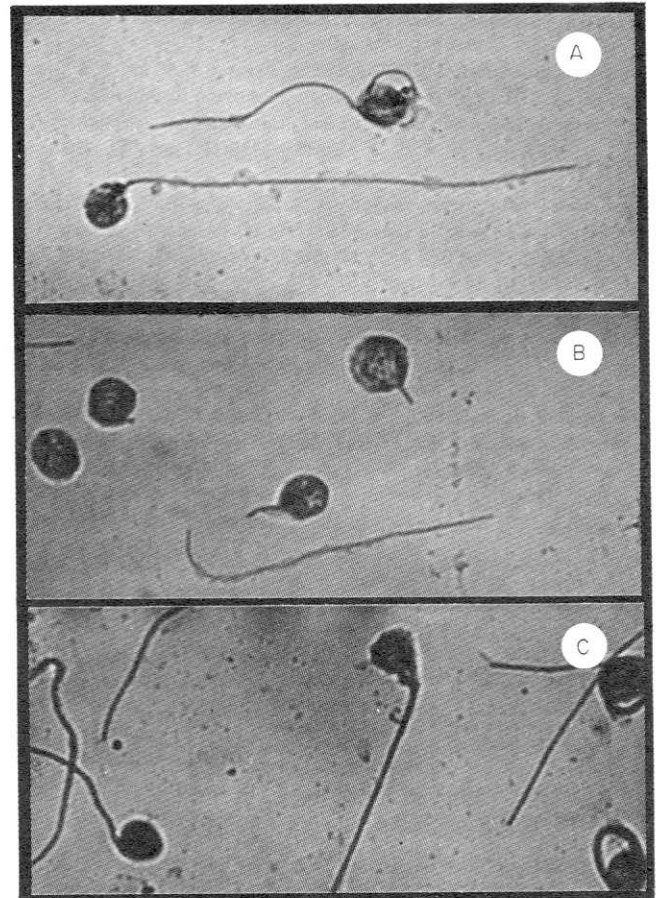


Figura 1. A. Espermatozoide normal de trucha arco iris (parte superior). Aumento 2000x. B. Espermatozoides con la cola fraccionada en un segmento diferente al de inserción y cabezas desprendidas de sus colas desde el segmento de inserción. Aumento 2000x. C. Espermatozoides con la cabeza elongada (centro). Cola doblada e inserción abaxial (izquierda). Aumento 2000x.

de los rangos mencionados por otros autores (e. g. **Bourreau, 1984; Stevenson, 1987**).

La obtención del semen se hizo mediante extrusión o masaje en dirección cráneo-caudal sobre la región abdominal.

Con el fin de garantizar muestras no contaminadas los machos fueron sometidos a ayuno dos días antes de la obtención de las mismas (**Bourreau, 1984; Huet, 1983**); no se utilizó anestésico y con el fin de evitar la activación del esperma al contacto con el agua se secó cuidadosamente el poro genital de cada pez.

Debido al elevado número de espermatozoides se hizo indispensable realizar una dilución del eyaculado. Tras determinar que una dilución de 1:450 a 1:500 era la adecuada para el recuento en cámaras con divisiones de $1/400$ de mm^2 por $1/10$ de mm de profundidad, utilizando solución salina al 0.8% como diluyente. La metodología de preparación y la técnica de recuento utilizadas fueron las descritas por **Sorensen (1982)**.

Las anomalías morfológicas de las células espermáticas se determinaron según las células normales utilizadas como referencia por **Lagler et al. (1977)**.

Debido a que no todos los espermatozoides que carecen de movimiento están muertos, se ha utilizado la prueba de viabilidad en la determinación del porcentaje de células vivas y muertas en el momento de la tinción, como una evaluación relativamente más fiel que la evaluación visual (Sorensen, 1982). La coloración diferencial es la base de éste análisis, ya que al igual que en mamíferos, los espermatozoides de la trucha resisten los colorantes supravitales (Sorensen, 1982).

La motilidad se expresa como el porcentaje de células vivas que se deslizan en cualquier dirección sin importar la velocidad en que lo hagan (Sorensen, 1982). Con el fin de asegurar una evaluación en la motilidad inicial, sólo se tuvieron en cuenta las muestras que a 200 aumentos presentaban motilidad muy escasa o nula. Ninguna muestra fue almacenada por más de 3 minutos. La observación se efectuó a 450 aumentos colocando sobre la lámina una gota de semen sin diluir y sobre ella una proporción 10 veces mayor de diluyente. Tras hacer un extendido se observó sin laminilla, siguiendo los parámetros señalados por Blanco Cachafeiro (1977) y Moreira (1988).

Se conformaron tres grupos según el peso, partiendo del rango normal para reproductores señalado por Huet (1983). Cada grupo se integró con un mínimo de 18 machos así: grupo 1 para menores de 350 gr; grupo 2 para los comprendidos entre 351 y 500 gr y grupo 3 para los mayores de 500 gr. El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}; \quad \begin{array}{l} i = 1 \dots t \\ j = 1 \dots n \end{array}$$

donde U es el efecto medio verdadero, T_i el efecto verdadero del i -ésimo grupo, y E_{ij} es el efecto verdadero de la j -ésima unidad experimental sujeta al i -ésimo grupo (Ostle, 1979).

Las variables volumen de eyaculado, concentración y número total de espermatozoides fueron sometidas a un análisis de varianza y a la prueba de Duncan con un grado de significancia ($\alpha = 0.05$). Estas variables fueron relacionadas empleando el índice de correlación de Pearson. Se considera aceptable el índice con valor igual o superior a 0.6. Además se establecieron las hipótesis: H_0 : No hay diferencia significativa en el resultado del análisis de espermatozoides entre los grupos. H_1 : Hay diferencia significativa en el resultado del análisis de espermatozoides entre los grupos.

Resultados

Motilidad. Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando como diluyente agua destilada con bicarbonato de sodio disuelto en concentración del 1% (Blanco Cachafeiro, 1977). Con solución salina del 0.7% (Moreira, 1988), el movimiento fue de menor intensidad y utilizando agua doblemente destilada con bicarbonato de sodio disuelto

en concentración del 1% (Blanco Cachafeiro, 1977) los movimientos se detenían en menos de 5 segundos corroborando lo descrito por Holtz et al. (1977) referente a la relación entre duración de la motilidad del espermatozoide y la concentración de electrolitos del medio. Los espermatozoides se movieron vigorosamente, haciendo imposible el fijar la vista en ninguno de ellos.

Para los tres grupos de peso (Tabla 1) la motilidad progresiva, es decir en la que los espermatozoides cruzan el campo en dirección rectilínea, fue superior al 90%. Los espermatozoides cruzaron con una velocidad muy superior a la del bovino y del humano, lo que hizo difícil que al evaluar cuantitativamente la motilidad se establecieran intervalos inferiores al 10%.

Esta posibilidad es considerada cualitativamente por Sánchez-Rodríguez y Pillard (1977) en la evaluación de la motilidad de espermatozoides congelados de trucha, asignándole la calificación máxima de 5. En nuestro caso de evaluación de semen fresco la motilidad se expresó en términos cuantitativos como superior al 90%.

Se efectuó una evaluación computarizada en el equipo Cell-software, en el cual fue indispensable utilizar laminilla cubreobjetos, lo que afectó negativamente el movimiento de los espermatozoides, siendo evidente la reducción del movimiento progresivo a un movimiento de escaso cambio de posición. Con el fin de ilustrar la forma en que se afecta la motilidad progresiva superior al 90% debido al uso de cubreobjetos, se tomó una evaluación seleccionada al azar de uno de los diez análisis hechos a igual número de ejemplares, dada la similitud entre éstos (Tabla 2).

En razón de que en todas las muestras de semen no contaminadas y sin almacenar, los resultados, luego de evaluar la motilidad inicial, fueron invariablemente óptimos, no se justificó incluirlos en el análisis de varianza ni en el de correlación.

Morfología. En total se evaluaron 10 muestras de cada grupo. Se utilizaron 5 técnicas de tinción. Los resultados obtenidos con cada una de ellas fueron:

Con Giemsa, solución salina al 0.8% como diluyente y fijación de 24 horas. La cabeza difusa y la cola invisible; con Eosina Hematoxilina, solución salina al 0.8% como diluyente y fijación de 24 horas, se observó mayor definición de la cabeza, cola difusa, aunque más nítida que con Giemsa; con Eosina, solución salina al 0.8% como diluyente con fijación de 3 minutos, se observó la cabeza con mayor nitidez, y cola ligeramente apreciable; con Eosina, solución salina al 0.8% bufferizada como diluyente, sin fijación (el colorante y el diluyente fueron mezclados en partes iguales y en forma simultánea con el semen; posteriormente se efectuó un frotis), la cabeza y la cola fueron visibles y aptas

Tabla 1

Medidas de peso, longitud, volumen y concentración de espermatozoides del eyaculado, de una población de 66 machos de trucha arco iris, agrupada por rangos de peso. El grupo 1 reúne animales de menos de 350 g, el grupo 2 de más de 350 g y menos de 500 g y el grupo 3 de más de 500 g de peso.

Variable	No. de peces	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	66	24	24	18
Longitud (cm)				
Media	33.62	28.50	33.60	40.42
Rango de variación	25 - 44.5	25 - 33.2	30.5 - 36.5	37 - 44.5
Desviación estándar	5.24	2.67	2.35	2.03
Peso (g)				
Media	427.95	272.08	393.75	681.39
Rango de variación	180 - 800	180 - 325	350 - 460	520 - 800
Desviación estándar	174.427	46.70	30.81	95.88
Volumen (ml)				
Media	4.15	2.83	3.98	6.14
Rango de variación	0.6 - 15	0.6 - 7.2	1 - 8	1 - 15
Desviación estándar	3.33	2.14	2.48	4.49
Concentración (millones/ml)				
Media	9.482	8.584	10.184	9.741
Rango de variación	1.650 - 25.780	1.650 - 19.220	2.400 - 25.700	2.850 - 22.000
Desviación	5.093.75	5.033.08	5.454.48	4.463.94

Tabla 2

Resultados de la evaluación computarizada de la motilidad de los espermatozoides de una trucha arco iris, utilizando laminilla cubre objetos. Del total mótil, sólo se tuvieron en cuenta las células que presentaron desplazamiento en su centro de gravedad, el cual el computador observó 30 veces durante un segundo antes de adjudicarle la calificación de 0 a 4. El ejemplar pesó 369 y midió 33 cm. La dilución utilizada fue de 1:50.

Número de espermatozoides evaluados	300	Volumen del eyaculado (ml)	4
Número de espermatozoides mótiles	234	Total de espermatozoides (millones)	960
Número de espermatozoides no mótiles	66	Calificación promedio de la motilidad	1.5
Porcentaje de espermatozoides mótiles	78		
Concentración de espermatozoos (millones/ml)	240		
Concentración de espermatozoides mótiles (millones/ml)	187.2		

calificación de la motilidad (de 0 a 4)	Espermatozoides contados (N = 234)	% del total
de 0 a 1	103	44
de 1 a 2	79	34
de 2 a 3	52	22
de 3 a 4	0	0

para identificar diferencias morfológicas; pasados tres días la lámina se tornó difusa y fue imposible utilizarla para ésta evaluación.

Con Eosina, solución salina al 0.8% como diluyente, sin fijación, (mezclados en forma simultánea en proporción de una parte de semen por 25 de diluyente y 25 de colorante, el procedimiento restante igual al descrito para la coloración anterior), se obtuvieron los mejores resultados de tinción y

los espermatozoides permanecieron estables, bajo las mismas condiciones de almacenamiento (protegidos sólo de la humedad) que las láminas sometidas a la técnica anterior. A los 30 días de haber sido preparada la lámina conservó las mismas características que permitieron evaluar su morfología inicial. En todas las evaluaciones el fijador fue una dilución 2:1 de etanol y ácido acético, respectivamente.

El secado se efectuó dejando la lámina expuesta al medio ambiente.

Finalmente, los preparados fueron protegidos por una laminilla cubreobjetos utilizando entellan como adherente. El espermatozoide normal de trucha arco iris (Fig. 1-A) es un corpúsculo de cabeza ovoide, ligeramente más larga que ancha, achatada en el lugar de inserción de la cola y en el polo opuesto. La longitud de la cola es 9 a 10 veces mayor que la cabeza. Carecen de acrosoma y de región intermedia en el lugar de inserción de la cola. Aproximadamente la cabeza del espermatozoide mide 4.5 a 5 micras de ancho y 5.5 a 6 micras de largo, la cola mide 50 micras de largo por 0.5 micras de ancho. La anomalía más notable y frecuente es el espermatozoide fraccionado, es decir cabezas separadas de sus colas desde el lugar de inserción (Fig. 1-B). Esta malformación no se encontró en proporciones mayores al 10% en ningún caso. También el desprendimiento de la cola puede ser en un segmento diferente al de inserción en la cabeza (Fig. 1-C). Se encuentran otras anomalías menos frecuentes (inferiores al 5% en todas las muestras) como cabeza elongada, cola enrollada en su segmento medio e inserción abaxial de la cola del mismo espermatozoide (Fig. 1-C).

Viabilidad. En el caso específico de la evaluación de semen fresco con una motilidad superior al 90%, no se consideró importante su registro ya que las diferencias en el resultado serían las ocasionadas por la muerte de las células durante el proceso de coloración y no porque ya lo estuvieran al iniciar la evaluación. La coloración con que se obtuvieron los mejores resultados en la evaluación morfológica (giemsa sin fijador) puede ser utilizada para la viabilidad ya que ofrece una clara coloración diferencial.

Relación entre la concentración de espermatozoides y el peso de los peces. Para los animales que produjeron semen durante el término de reposo de 84 grados/día, la concentración de espermatozoides fluctuó entre 1.650 y 25.780 millones por mililitro (promedio 9.482 mill./ml). (Tabla 1). Schlenk & Kuhmann (citados por Huet, 1983) y Blanco-Cachafeiro (1977) reportan 1×10^{10} y 3×10^{10} espermatozoides por centímetro de semen, respectivamente.

La correlación entre el peso y la concentración de espermatozoides muestra que no existe ninguna asociación entre éstas dos variables; su valor fue igualmente bajo e insignificante para la longitud y la concentración de espermatozoides (Tabla 3). Igualmente, el análisis de varianza muestra que la concentración de espermatozoides es una variable que no depende del peso de la trucha. El coeficiente de variación del 56.37 señala una población muy dispersa en cuanto a concentración de espermatozoides se refiere.

La prueba Duncan, a pesar de señalar al grupo de peso 2 como el de mayor promedio de concentración y al 1 como el menor, no determinó diferencias significativas entre ninguno de ellos.

Relación entre el volumen de eyaculado y el peso de los peces. El volumen de eyaculado osciló entre 0.6 y 15 ml (promedio 4.5 ml, Tabla 1). El índice de correlación no sólo es de mayor magnitud (0.36) que el encontrado en la concentración de espermatozoides, sino que tiene alta significancia ($P < 0.01$) en lo referente a la población en general (Tabla 3). A pesar de lo anterior, sólo la correlación entre el volumen y el grupo de peso 1 (0.45) es significativa ($P < 0.02$), ya que para los grupos 2 y 3 la correlación es de escasa magnitud y significancia (Tabla 3). La prueba Duncan asoció al grupo 3 como el de los animales con mayor promedio del volumen de eyaculado y con diferencias significativas con los grupos 1 y 2. Entre los grupos 1 y 2 no hubo diferencias significativas.

Relación entre la concentración de espermatozoides y el volumen de eyaculado. Entre estas dos variables existe una correlación que a pesar de no ser de gran magnitud (0.39) denota una relación directa entre ellas ($P < 0.01$).

La prueba de Duncan determinó que el mayor promedio en concentración de espermatozoides se halló en eyaculados con volúmenes entre 5.0 y 7.5 ml, rango dentro del que se encontró el 18% de la población ($N = 66$), el cual presentó diferencias significativas con respecto a los demás grupos (< 2.5 , 2.5 a -5 y > 7 ml) mientras que éstos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí (Tablas 1 y 3).

Número total de espermatozoides en relación con el peso de los peces. El índice de correlación entre el número total de espermatozoides y el peso presenta valores relativamente bajos al considerar la población en forma conjunta (0.23 $P < 0.06$). Entre la longitud y el número total de espermatozoides los valores de correlación y significancia presentan un comportamiento similar (0.27, $P < 0.02$) (Tabla 3). Al tratar la población agrupada por peso, el grupo 1 tiene el índice de correlación más alto (0.37) y con un índice de significancia de $P < 0.07$. En los grupos de mayor peso (2 y 3) éste índice tiende a establecer una relación inversa, aunque ni su magnitud ni su significancia, permiten hacer de esa tendencia una afirmación contundente (Tabla 3).

La prueba Duncan señaló diferencias significativas entre los rangos de peso 1 y 3, siendo éste último el que presentó un menor promedio en número total de espermatozoides, aunque no presentó diferencias significativas con el grupo 2.

Relación entre el número total de espermatozoides y el volumen de eyaculado. Estas dos variables presentan una correlación de (0.85, $P < 0.001$) con un coeficiente de variación de 60.6 (Tabla 3).

Tabla 3

Índices de correlación de Pearson de la población conjunta de trucha arco iris y por rangos de peso (descritos en la Tabla 1). Se presenta el índice de correlación de las variables peso, longitud, concentración de espermatozoides, volúmen y número total de espermatozoides del eyaculado. Junto con el índice de correlación se encuentran la probabilidad de encontrar un índice menor y el número de observaciones tenidas en cuenta.

	Longitud	Peso	Concentración	Volúmen	Número total
Longitud					
Correlación	1.00000	0.91283	0.04479	0.41869	0.26932
Probabilidad	0.0000	0.0001	0.7210	0.0005	0.0288
Observaciones	66	66	66	66	66
Peso					
Correlación	0.91283	1.00000	-0.00266	0.36967	0.23519
Probabilidad	0.0001	0.0000	0.9831	0.0023	0.0573
Observaciones	66	66	66	66	66
Concentración					
Correlación	0.04479	-0.00266	1.00000	0.39177	0.75882
Probabilidad	0.7210	0.9831	0.0000	0.0011	0.0001
Observaciones	66	66	66	66	66
Volúmen					
Correlación	0.41869	0.36967	0.39177	1.00000	0.85393
Probabilidad	0.0004	0.0023	0.0011	0.0000	0.0001
Observaciones	66	66	66	66	66
Número total					
Correlación	0.26932	0.23519	0.85393	0.85393	1.00000
Probabilidad	0.0288	0.0573	0.0001	0.0001	0.0000
Observaciones	66	66	66	66	66
GRUPOS DE PESO					
Grupo 1					
Correlación	0.88066	1.00000	0.21522	0.45836	0.37425
Probabilidad	0.0001	0.0001	0.3125	0.0243	0.0716
Observaciones	24	24	24	24	24
Grupo 2					
Correlación	0.54429	1.00000	-0.08011	-0.03541	-0.1109
Probabilidad	0.0060	0.0001	0.7098	0.8695	0.0716
Observaciones	24	24	24	24	24
Grupo 3					
Correlación	0.62926	1.00000	-0.60713	-0.10297	-0.24760
Probabilidad	0.0051	0.0001	0.0075	0.6843	0.3219
Observaciones	18	18	18	18	18

Los mejores promedios fueron obtenidos con rangos de volúmen superiores a 5 ml y los más bajos con rangos de volúmen inferiores o iguales a 2.5 ml rango que incluye el 45% de los peces evaluados.

Discusión

En condiciones favorables de alimentación y confinamiento, el tiempo requerido para la recupe-

ración de la trucha arco iris, en relación con la producción de semen o espermogénesis, luego de su extracción por extrusión, fue de 84 grados día para el 85% de la población.

Al diluir el semen en partes iguales con colorante giemsa y solución salina al 0.8%, se obtienen láminas aptas para la evaluación de la morfología de los espermatozoides, las cuales pueden ser utilizadas por un lapso aproximado de 30 días.

Al utilizar como diluyente agua destilada y bicarbonato de sodio al 1.5% y efectuar la observación sin laminilla cubreobjetos, se obtuvieron los mejores resultados en la observación de la motilidad del espermatozoide.

La baja motilidad o alta presencia de anomalías de los espermatozoides, en semen fresco, no fue superior al 10%. El desprendimiento de la cola desde el lugar de inserción es la anomalía más evidente y que se presenta con mayor frecuencia en todos los grupos; le siguen en proporción, malformaciones en la cabeza y colas fraccionadas en lugar diferente al de inserción.

El peso del pez, la concentración de espermatozoides y el número total de los mismos están relacionados en forma directa con el volumen de eyaculado ($r^2 = 0.37$, $P < 0.02$, $r^2 = 0.4$, $P < 0.01$ y $r^2 = 0.85$, $P < 0.01$, respectivamente) aunque éste no es el único factor que los afecta.

Teniendo en cuenta que el número total de espermatozoides determina la cantidad real de huevos que es posible fecundar con un eyaculado, y que éste no presenta una alta correlación con el peso, la selección de machos reproductores de trucha arco iris, puede basarse en la evaluación individual, en la cual eventualmente se pueden incluir animales con peso menor a 350 g y se puede prescindir de aquellos con peso superior a 500 g.

Bibliografía

- Blanco-Cachafeiro, M. 1977. Primera jornada nacional sobre la Trucha A.L.D., México. PR. 247-249.
- , 1984. La cría industrial de la Trucha. Acribia. España. 237 p.
- Bourreau, P. 1984. Cría rentable de la trucha y otros peces de agua dulce. De Vecchi S.A., España. 250 p.
- Del Real, M. 1976. Estado actual de la piscicultura en Colombia. Divulg. Pesquera. 7 (1-2): 1-15. Inderena, Colombia.
- Fribourgh, J.H. 1978. Espermatozoal morphology of brook trout. Prog. Fish Culture. 40 (1): 26-29.
- Holtz W., J. Stoss, S. Bucyuekha. 1977. Methods for the manipulation of trout semen. Zuchthygiene 12 (2): 82-88.
- Huet, M. 1983. Tratado de piscicultura (3ra. ed.). Mundi Prensa, Madrid. 490 p.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller, D.R.M. Passino. Ichthyology (2nd. ed.). John Wiley & Sons, New York. 506 p.
- Legrende, M., R. Billard. 1980. Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel. Bull. Franc. Piscic. 278 (3): 11-33.
- Moreira, R.S. 1988. Procedimiento Práctico, para observação da Motilidade do Esperma. Corporación Autónoma Regional. Inédito, Brasil.
- Ramos, H. 1973. Investigación sobre la piscicultura en Colombia. INDERENA, COLOMBIA.
- Smith, G. R. & R. F. Stearly. 1989. The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts. Fisheries 14 (1): 4-10.
- Sorensen, A. 1982. Reproducción animal. McGraw Hill. México, 525 p.
- Stevenson, J. P. 1987. Manual de la cría de trucha. Acribia, España. pp. 104-155.
- Stoss, J., W. Holtz. 1981. Cryopreservation of rainbow trout sperm. Aquaculture 22 (1-2): 97-104.
- Turli, P. 1970. Cultivo de la trucha. Acribia. España.
- Zanuy, S., M. Carrillo. 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. In J. Espinosa de los Monteros & U. Labarta (eds.) reproducción en acuicultura. CAYCYT, Madrid. pp. 1-131.