



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL
DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Evaluación de la calidad espermática de reproductores
cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*)
para optimizar el proceso de fertilización**

TESIS

Que presenta:

Biól. Mayra Lisbeth Peñaloza Camargo

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de Tesis: Dr. Antonio Campos Mendoza



Morelia, Michoacán. Agosto de 2009

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Calidad espermática	3
1.2. Evaluación de la calidad espermática en peces	4
1.3. Capacidad fertilizadora	7
1.4. Espermatocono y concentración espermática	8
1.5. Análisis de la motilidad espermática	9
1.6. Factores que regulan la motilidad espermática en peces	10
1.6.1. Osmolaridad	10
1.6.2. pH	12
1.6.3. Composición iónica	13
1.6.4. Temperatura	14
2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	15
3. OBJETIVOS	17
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Colecta de gametos	18
5.2. Evaluación de la viabilidad espermática	19
5.3. Dilución y cuantificación espermática	20
5.4. Evaluación del volumen y de la concentración espermática	21
5.5. Evaluación del tiempo y motilidad espermática	23
5.6. Determinación de la proporción espermatozoide/ovocito	24
5.7. Fertilización artificial	25
5.8. Evaluación del efecto de la salinidad sobre la tasa de fertilización	25
5.9. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
6.1. Dilución y concentración espermática	27

6.2. Evaluación del volúmen y concentración espermática -----	28
6.3. Viabilidad espermática -----	33
6.4. Evaluación de la motilidad espermática a diferentes salinidades en <i>M. estor</i> -----	35
6.5. Efecto de la salinidad en la fertilización -----	44
6.6. Proporción espermatozoide/ovocito -----	51
7. CONCLUSIONES -----	54
8. RECOMENDACIONES -----	57
9. LITERATURA CITADA -----	58

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Mamá a la que le doy las gracias por su apoyo y la confianza que siempre tuvo en mí. Gracias por el ejemplo de lucha y perseverancia que siempre nos has dado a mí y a mi hermana, los cuales me han servido de sostén para culminar este trabajo. Por enseñarme que las cosas que cuestan más trabajo son las que valen la pena, gracias....

A mi hermana Jeny, a mi sobrina Frida, a mis primas y tías que siempre tuvieron confianza en mí para culminar este trabajo.

AGRADECI MI ENTOS

A mi madre, por darme la libertad de realizarme en lo que más me gusta, por su apoyo y amor.

A mi hermana por el ejemplo de lucha y perseverancia que siempre me ha dado y por su apoyo incondicional.

A mi asesor, el Dr. Antonio Campos Mendoza, que más que un asesor fuiste un amigo que siempre estuviste dispuesto a apoyarme en todo momento. Gracias por la asesoría que me diste y por el apoyo que me brindaste durante todo este proceso.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por la disposición que siempre tuvo para apoyarme en todo lo que necesité, muchas gracias.

A la Dra. Rebeca Rueda, por su valiosa ayuda para la culminación del escrito y por las sugerencias tan atinadas que siempre me daba.

Al Dr. Jorge Fonseca, por sus comentarios y consejos para la elaboración de este trabajo y por siempre estar dispuesto a ayudar.

Al Dr. Carlos A. Martínez por su apoyo y por prestarme peces para la realización de mi experimento.

A mi gran amiga Pamela por su valiosa amistad, gracias por todo el apoyo, ayuda y consejos que siempre estuviste dispuesta a darme para la culminación de este trabajo, espero que nuestra amistad dure por muchos años más.

A mi amiga Mariela le doy las gracias porque además de que fuimos compañeras de trabajo en el laboratorio, hicimos muy buena amistad. Te agradezco porque siempre estuviste dispuesta a ayudarme, incluso con el trabajo duro.

RESUMEN

El pez blanco *Menidia estor* es una especie endémicas de México cuyas poblaciones naturales se ha reducido por factores antropogénicos. En la actualidad se ha logrado cerrar su ciclo de vida en condiciones de cultivo. Sin embargo, se ha observado problemas reproductivos en los machos mantenidos en cautiverio como volumen reducido de esperma, bajas tasas de fertilización y eclosión.

El objetivo del presente estudio fue determinar la calidad espermática de los reproductores cultivados de pez blanco (*M. estor*), y para ellos se evaluó la vitalidad, volúmen y la densidad espermática, además la evaluación de la motilidad espermática con diferentes concentraciones salinas y el efecto de la salinidad en la fertilización así como la determinación de la proporción esperma/huevo. El promedio de volúmen de esperma (μl), densidad espermática ($\times 10^9$ espermias ml^{-1}) y vitalidad espermática (% de espermias vivos) fue de 46.7 ± 3.8 , 2.44 ± 1.33 , 92.81 ± 1.11 , respectivamente. La motilidad espermática se inició inmediatamente después de que el esperma fue activado con soluciones salinas (5, 10, 15, 20, 25 y 30 ‰) en comparación con el agua dulce (0 ‰), prolongando su periodo de motilidad en salinidades de 25 y 15 ‰. El efecto que tuvo la salinidad en el porcentaje fertilización no fue bueno ya a medida que incrementaba la salinidad, el porcentaje disminuía drásticamente 0 ‰ (95.7 ± 0.88), 5 ‰ (32.3 ± 1.44), 10 ‰ (16 ± 1.0), 15 ‰ (4.66 ± 0.66), 20 ‰ (0), 25 ‰ (0), 30 ‰ (0). La proporción esperma/ovocito que se encontró para una adecuado porcentaje de fertilización fue de 5.22×10^8 espermatozoides por ovocito.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura o el cultivo de organismos acuáticos se ha practicado durante varios siglos; los primeros registros datan de más de mil años de actividad en el lejano oriente. En México el desarrollo de la acuicultura se ha basado principalmente en especies exóticas, de las cuales se cuenta con información básica para su cultivo, mientras que de las especies nativas se conoce muy poco sobre su biología y por ende el desarrollo de su cultivo es aún deficiente (Bardach *et al.*, 1972).

En el Estado de Michoacán, una de las especies nativas de mayor interés para su estudio y cultivo a nivel comercial es el pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*). Esta especie presenta un alto valor en el mercado además de ser una especie representativa de la región. Debido a lo anterior el cultivo del pez blanco además de ser una alternativa para su explotación, representa una fuente de empleos en la región e inclusive una estrategia para su conservación (Campos *et al.*, 2009).

Uno de los aspectos más importantes para fortalecer las estrategias de conservación y manejo en condiciones controladas del pez blanco es el conocer el ciclo gonádico de los reproductores e identificar la temporada reproductiva y evaluar la calidad de los gametos.

Debido a que los patrones reproductivos varían para cada especie y entre poblaciones; es importante evaluar la madurez gonádica de los reproductores, ya que dichas variaciones influyen directamente sobre las tasas de fecundidad, supervivencia y el reclutamiento de la especie (Rodríguez, 1992).

La evaluación de las células sexuales incluye, el conocimiento de la calidad espermática, la cual se define como la habilidad del esperma para fertilizar exitosamente un óvulo. Para determinar la calidad de los espermatozoides se evalúa el tiempo total de viabilidad, el porcentaje de motilidad, la concentración espermática, el porcentaje de fertilización, etc.). Esta evaluación puede aportar información de gran valor ya que las pruebas *in vitro* de esperma fresco pueden ser

utilizadas para estimar la calidad espermática y predecir el éxito de la fertilización (Jenkins, 2000). La producción de espermatozoides y en consecuencia el volumen está influenciado por un gran número de factores ambientales tales como la estación, la alimentación y por las diferencias individuales entre los organismos (variabilidad genética) (Peinado *et al.*, 1998).

La producción de esperma es un factor crucial para el potencial reproductivo de los machos en los vertebrados (Nakatsuru y Kramer, 1982), especialmente cuando se encuentran sometidos a una fuerte competencia espermática, un mayor número de espermatozoides eyaculados le asegura al macho el éxito en la fertilización (Parker *et al.*, 1996). La producción de esperma presenta limitaciones fisiológicas, como por ejemplo el tamaño del testículo; el cual con frecuencia depende del tamaño del cuerpo del macho (Schärer y Robertson, 1999). En varias especies de peces, machos grandes producen un mayor número de espermatozoides en comparación con machos pequeños (Petersen y Warner, 1998).

Los espermatozoides de los peces son almacenados en el plasma del fluido seminal en el tracto genital. En contraste con los mamíferos; la mayoría de los teleosteos presenta fertilización externa, ya que tienen un esperma que se encuentra inmóvil en el tracto genital, la carencia de motilidad es provocada por factores tales como la concentración de iones, el pH y la osmolaridad (Billard *et al.*, 1995), sin embargo, los espermatozoides adquieren el potencial para la motilidad durante su transferencia al ducto espermático, en donde solo son activados después de liberarse en el medio y al entrar en contacto con el agua y/o el fluido ovárico ((Morisawa y Morisawa, 1986).

Los espermatozoides al ser liberados al agua cuentan con un breve periodo de activación expresada en motilidad y velocidad de desplazamiento progresivo para lograr la fertilización. Al contrario de lo que sucede en mamíferos, los espermatozoides de los teleosteos no poseen acrosoma, por lo que penetran al óvulo a través de un orificio llamado micrópilo (Andrade *et al.*, 2001; Grassiotto *et al.*,

2001). Al ser liberados los huevos en el agua, se hidratan y cierran su micrópilo, por lo cual los espermatozoides liberados deben activarse y moverse en el agua para lograr la fertilización antes de que el micrópilo se cierre. En general, la motilidad espermática es inducida por la presión hiposmótica en peces de agua dulce y por presión hiperosmótica en peces marinos (Cosson *et al.*, 1999).

Existen especies de agua dulce, en las cuales los espermatozoides usualmente se mueven por menos de 2 min y en muchos casos solo presentan una alta actividad inferior a 30 segundos (Perchec *et al.*, 1993; Billard *et al.*, 1995; Kime *et al.*, 2001). Algunas especies de peces marinos, tales como el pez manchado (*Anarhichas minor*) y los peces espinosos (*Gasterosteus aculeatus*, *Spinachia spinachia*) se caracterizan por liberar sus huevos dentro de una masa adhesiva y gelatinosa y sus espermatozoides permanece motiles por un periodo de tiempo prolongado (1 a 2 días) después de ser liberados al agua (Kime y Tveiten, 2002; Elofsson *et al.*, 2003; 2003a;).

Los espermatozoides de estas especies presentan características especiales, las cuales difieren de la mayoría de las otras especies de teleósteos, ya que en estos peces los espermatozoides son motiles al momento de ser liberados y permanecen así alrededor de 1 a 2 días y llegan a ser inmóviles en contacto con el agua salada, esto se debe principalmente al fluido ovárico el cual les brinda los nutrientes necesarios para seguir activos. Los gametos de los peces condrósteos, tales como el esturión (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) y el pez espátula (*Polyodon spathula*) difieren del modelo general de los teleósteos. En el caso del esturión, el espermatozoide presenta un acrosoma y los huevos presentan múltiples micrópilos (Linhart y Kudo, 1997; Linhart *et al.*, 1995).

1.1. Calidad espermática

El uso de gametos viables y de alta calidad es de gran importancia para garantizar la producción de crías de buena calidad para la acuicultura. Las granjas acuícolas se han enfocado más en la calidad de los huevos y de las larvas que a la

calidad espermática, incluso aunque la calidad de los espermatozoides de los reproductores afecte la producción de larvas sanas (Bromage y Roberts, 1995).

Sin embargo, en granjas comerciales con frecuencia el esperma es inadecuado en términos de cantidad y calidad y no siempre tiene éxito en la fertilización, por lo que los procedimientos de fertilización artificial son usados comúnmente. Este es el caso de las especies que no liberan el esperma con facilidad, tales como el bagre africano (*Clarias gariepinus*), y especies que requieren inducción hormonal para inducir la espermiación o que el esperma suele quedar expuesto a la contaminación por orina durante la presión abdominal. No obstante, existen algunas especies de peces que liberan cantidades muy limitadas de esperma; como el caso del pez plano (*Psetta maxima*) y en el lenguado (*Pleuronectes ferrugineus*) que producen menos de 1 mL de esperma (Suquet *et al.*; 1992; Clearwater y Crim, 1998).

Una práctica muy común en el cultivo de muchas especies comerciales ha sido la mezcla de esperma de diferentes machos, de manera que mientras el proceso de fertilización parece ser exitoso, es posible que no todos los machos contribuyan igualmente al pool de genes debido a la competencia entre los espermatozoides (Bekkevold *et al.*, 2002; Vladic *et al.*, 2002; Wirtz y Steinmann, 2006).

1.2. Evaluación de la calidad espermática en peces

Históricamente el interés por desarrollar herramientas para evaluar la calidad espermática en peces ha sido motivado por varios factores entre los que se incluye la necesidad de mejorar los métodos de fertilización artificial y la criopreservación de los gametos con la finalidad de mejorar el proceso reproductivo e intensificar la producción de peces.

La calidad espermática usualmente se refiere a la motilidad, la cual es un factor que determina la habilidad fertilizadora del los espermatozoides (Billard 1978;

Cosson *et al.*, 1991; Lahnsteiner *et al.*, 1997a). La calidad espermática es una medida de la habilidad del espermatozoide para fertilizar un huevo. Cualquier parámetro físico cuantificable que se correlacione directamente con la capacidad fertilizadora del esperma puede ser usado como una medida de la calidad espermática. En circunstancias naturales los machos se encuentran compitiendo y dependen de una estrategia reproductiva. El resultado es que diferentes especies de teleósteos producen diferentes tipos y cantidades de esperma (Taborsky, 1998). En algunos casos, procesos tales como la competencia espermática puede provocar que los individuos produzcan un exceso de espermatozoides para garantizar la fertilización (Mjølnerod *et al.*, 1998).

Los estudios que describen las características del esperma (el cual puede influenciar la capacidad fertilizadora de los espermatozoides) han mostrado gran variación individual en los diferentes parámetros investigados esto hace difícil el uso de una variable única para definir la buena calidad del espermatozoide (Dreanno *et al.*, 1998).

En general, la motilidad espermática es difícil de analizar debido a que el movimiento inmediatamente después de la activación es muy rápido (mayor a 300 $\mu\text{m/s}$), declina gradualmente hasta detenerse por completo (Billard y Cosson, 1989); aunque en especies como la carpa común (*Cyprinus carpio*) se ha mostrado que hay una segunda fase de activación espermática (Linhart *et al.*, 2008).

Los espermatozoides de peces se han clasificado en aquaespermatozoides y en introespermatozoides, según su modo de fertilización externo o interno (Grassiotto *et al.*, 2001). El espermatozoide de los peces con fertilización externa tiene una estructura simple de tipo primitivo, el cual está compuesto de tres partes principales: la cabeza, la pieza media y el flagelo. La cabeza mide entre 2-4 micras y es casi esférica y en algunas especies de peces como el esturión y el pez espátula la cabeza del espermatozoide presenta un acrosoma, enseguida se encuentra la pieza media donde se encuentran los centriolos y esta presenta 2-9 mitocondrias y finalmente el

flagelo que por lo general está constituido por el axonema en un arreglo de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central. (Fig. 1). El flagelo de algunos peces neotropicales de agua dulce como el denton (*Bryconops affinis*) mide entre 20 y 100 μm (Cosson *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001).

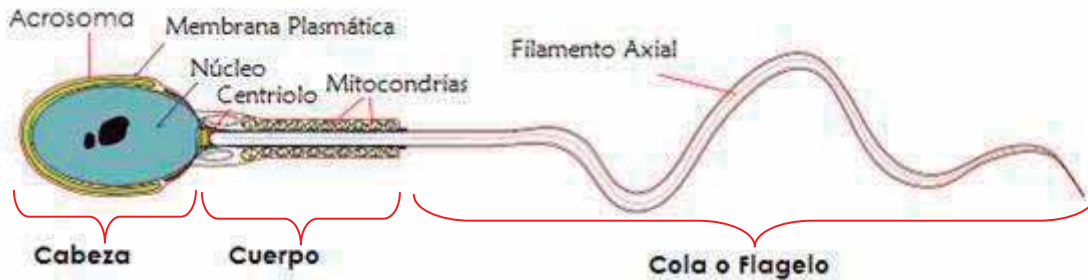


Fig. 1. Estructura del espermatozoide.

La estructura responsable de la motilidad es el flagelo, el cual presenta mitocondrias que son las encargadas de proveer energía y de cubrir la demanda energética que necesita el espermatozoide. Se piensa que esta demanda energética de adenosina trifosfato (ATP) podría ser la responsable de la disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles (Jenkins, 2000).

La calidad final de los espermatozoides depende de una serie de factores, entre los cuales destacan las condiciones de espermatogénesis y el tiempo de almacenamiento de los espermatozoides dentro del aparato reproductor del macho (Ciereszko *et al.*, 2000). Aún si la calidad del espermatozoide es excelente, regularmente el procedimiento de colecta de los espermatozoides puede ser susceptible a la contaminación. Un corto tiempo de exposición de los espermatozoides a pequeñas concentraciones de impurezas tales como la orina o heces pueden tener un significativo efecto sobre la habilidad fertilizadora del espermatozoide (Ciereszko *et al.*, 2000).

Una de las estructuras involucradas en la calidad de los espermatozoides es la membrana plasmática; dado que es una de las principales estructuras que son afectadas en el momento en el que el espermatozoide es liberado al medio acuático

debido al choque osmótico, además la membrana es una estructura importante para el mantenimiento de la viabilidad del espermatozoide. En pruebas morfológicas que impliquen tinciones diferenciales, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar intacta para excluir al tinte. Estas pruebas morfológicas también han sido utilizadas para diferenciar a las células muertas de las vivas (Jenkins, 2000).

1.3. Capacidad fertilizadora

La medición indirecta de la calidad espermática, utilizando su capacidad fertilizadora puede no ser muy confiable ya que además de la calidad del espermatozoide también se tiene que tomar en cuenta la calidad del huevo, la cual es variable y puede afectar el proceso de fertilización. Otros factores tales como el número de espermatozoides por huevo, la duración del contacto entre los gametos o el protocolo de fertilización utilizado, pueden influir en el proceso de fertilización (Suquet *et al.*, 1995; Cherenguini *et al.*, 1999).

Se han buscado la medición de otros parámetros o indicadores de la calidad espermática que se encuentran relacionados directamente con la capacidad fertilizadora del espermatozoide. Los biomarcadores de calidad espermática hasta ahora documentados incluyen

- A. El espermatocrito
- B. La densidad espermática
- C. La osmolaridad y el pH del plasma seminal
- D. La composición química del plasma seminal
- E. La actividad enzimática
- F. La concentración de adenosina trifosfato (ATP)
- G. La motilidad
- H. La morfología y la ultraestructura
- I. La capacidad fertilizadora

entre otros (Billard y Cosson, 1992; Cierezko y Dabrowski, 1993; Billard *et al.*, 1995; Fauvel *et al.*, 1998; Lahnsteiner *et al.*, 1998; Geffen y Evans, 2000).

1.4. Espermatocrito y concentración espermática

La concentración de espermatozoides en el plasma seminal se ha usado tradicionalmente para evaluar la calidad espermática en peces. El método estándar para la determinación de la densidad espermática (células/mL) ha sido el espermatocrito, ya que determina la proporción de células espermáticas con relación al plasma seminal. Este protocolo es útil cuando se desea determinar de manera rápida la densidad espermática (Buyukhatipoglu y Holtz, 1984).

El espermatocrito y la viscosidad de la muestra espermática varían entre organismos y especies y a través de la estación reproductiva (Christ *et al.*, 1996; Rakitin *et al.*, 1999). En el caso de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) la concentración de espermatozoides disminuye conforme la estación de desove avanza (Buyukhatipoglu y Holtz, 1984) tanto que en la carpa común, (*C. carpio*) (Christ *et al.*, 1996; Lubzens *et al.*, 1997) y en el esturión (*Acipenser fluvescens*) se presentan cambios en el espermatocrito de un año al otro (Toth *et al.*, 1997).

En diferentes especies de peces marinos se han realizado estudios para conocer la concentración espermática, tal es el caso del bacalao silvestre y cultivado (*Melanogrammus aeglefinus*) (Rideout *et al.*, 2004), de los peces planos como el halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Tvedt *et al.*, 2001) y de agua dulce como la perca (*Perca fluviatilis*) (Alavi *et al.*, 2007), la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) tanto aclimatada a agua dulce como marina (Linhart *et al.*, 1999).

La concentración espermática es calculada también por el número de células espermáticas colectadas por kilogramo de peso corporal (cel/kg), por gramo de testículo o por pez (cel/pez). Aunque el número de espermatozoides por mL de esperma es el más apropiado, este a su vez puede ser complementado por el volumen total de esperma producido. El esperma altamente concentrado no siempre

presenta la mayor tasa de motilidad ni la mayor tasa de fertilización (Geffen y Evans, 2000; Williot *et al.*, 2000).

1.5. Análisis de la motilidad espermática

Varios parámetros han sido utilizados para evaluar la motilidad, el más usado en el pasado fue la duración total del periodo de motilidad espermática (Stoss, 1983). Estudios más recientes utilizan al porcentaje de espermatozoides móviles observados en el campo visual del microscopio (Cosson *et al.*, 1999). Estas evaluaciones han dependido de estimaciones subjetivas de las características de motilidad (McMaster *et al.*, 1992), tales como el porcentaje de células espermáticas móviles (Levandusky y Cloud, 1988), la duración total del movimiento (Duplinsky, 1982) y/o la combinación de estos parámetros (Baynes *et al.*, 1981). El porcentaje de espermatozoides móviles y el vigor de nado han sido evaluados por medio de una escala arbitraria que va de 0 (inmóviles) a 5 (todos los espermatozoides se mueven vigorosamente) (Guest *et al.*, 1976).

Algunas escalas subjetivas menos descriptivas han definido la motilidad en términos de porcentaje de movimiento de los espermatozoides en el campo de visión (McMaster *et al.*, 1992). Este tipo de escalas evalúan el porcentaje de células en movimiento como: 0, cuando no se observa movimiento; 1, cuando el movimiento se encuentra por arriba de 25% de células; 2, cuando el movimiento es por arriba de 50% de células moviéndose; 3, cuando el 75% de células están en movimiento y 4, cuando hay más del 75% de células en movimiento (Viveiros *et al.*, 2003).

Aproximaciones más cuantitativas de la motilidad espermática utilizan un sistema más sofisticado el cual por sus siglas en inglés se conoce como sistema computarizado asistido para el análisis de esperma (CASA). Para este protocolo se requiere un equipamiento y sistemas más sofisticados, así como de un programa especializado y un sistema cerrado de video (Toth *et al.*, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1996; Cosson *et al.*, 1997; Dreanno *et al.*, 1999; Kime *et al.*, 2001).

1.6. Factores que regulan la motilidad espermática en peces

En peces ovíparos, la fecundación externa está sometida al estrés del medio ambiente. La manipulación del esperma *in vitro* para almacenaje y fertilización requiere de la determinación de las condiciones óptimas de temperatura, pH, osmolaridad, cationes y sustratos metabolizables para la iniciación y mantenimiento de la motilidad espermática (Goodall *et al.*, 1989; Billard y Cosson, 1995; Cosson *et al.*, 1999).

Los espermatozoides de los peces muestran diferencias en el inicio (Cosson *et al.*, 1995) en su duración (Billard y Cosson, 1992) y el patrón de motilidad (Ravinder *et al.*, 1997). Las diferencias en la concentración de iones Potasio (K^+) (en salmónidos) o la presión osmótica (en ciprínidos e ictalúridos) entre el plasma seminal y el agua, se dispara la iniciación de los movimientos (Billard, 1986). La presión osmótica parece ser el mayor factor que controla la motilidad en ciprínidos (Redondo-Müller *et al.*, 1991; Billard *et al.*, 1995) y en parte controla la motilidad en el espermatozoide del pez espátula (*Polyodon spathula*) (Linhart *et al.*, 1995). El periodo tan corto de motilidad espermática y el tiempo que tiene este para entrar al micrópilo es limitado (Kime *et al.*, 2001). Los principales factores que regulan la motilidad espermática se describen a continuación.

1.6.1. Osmolaridad

Todos los organismos acuáticos se enfrentan con problemas osmóticos en alguna etapa de su ciclo de vida. Por esto, han desarrollado una variedad de mecanismos que emplean para mantener las concentraciones osmóticas internas apropiadas y prevenir el desarrollo de presiones osmóticas que puedan provocar problemas. La osmorregulación implica el mantenimiento de una concentración osmótica interna diferente de la del medio, además de la regulación de la composición y de las concentraciones iónicas en diversos compartimentos para asegurar el funcionamiento correcto de las células y tejidos. Algunas investigaciones han evaluado el efecto de la osmolaridad y de los iones en la iniciación y duración de la motilidad espermática en los peces, encontrándose que participan en la

prolongación y duración de la motilidad espermática, además de mejorar la reproducción. Algunos ejemplos son el caso de los salmónidos (Morisawa y Susuki, 1980; Billard y Cosson, 1992), los ciprínidos (Morisawa *et al.*, 1983; Krasznai *et al.*, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1996) y en peces marinos como el halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), el rodaballo (*Lota lota*) y la lamprea marina (*Petromyzon marinus*) (Billard *et al.*, 1993; Lahnsteiner *et al.*, 1997a; Ciereszko y Dabrowski, 2002).

Varios estudios han enfatizado los efectos de la osmolaridad en la motilidad espermática en teleósteos marinos, de agua dulce y de especies vivíparas como los poecílidos (Cosson *et al.*, 1999; Darszon *et al.*, 1999). La presión osmótica del plasma seminal es más alta en los peces marinos que en los peces de agua dulce, además cabe mencionar que la presión osmótica puede variar entre individuos y está correlacionada con la hidratación del espermatozoide (Morisawa *et al.*, 1979).

Los espermatozoides de teleósteos marinos, tales como el pez globo (*Tetraodon pustulatus*), la dorada (*Sparus aurata*), el lenguado (*Ancylopsetta dendritica*) y de peces dulceacuícolas como la carpa (*C. carpio*), el pez cebra (*Danio rerio*) y el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) se ha encontrado que permanecen inmóviles en soluciones con o sin electrolitos cuando la osmolaridad es isotónica con el plasma seminal de 300 mOsmol Kg⁻¹. La motilidad sólo comienza cuando los espermatozoides son diluidos en una solución hipotónica para el caso de peces de agua dulce y con una solución hipertónica para peces de agua salada (Morisawa, 1994). Para el caso de la carpa (*C. carpio*) la motilidad es iniciada por completo en un medio con una presión osmótica por debajo de 150-200 mOsmol Kg⁻¹ (Perchec *et al.*, 1997).

En el bagre (*Silurus glanis*) la presión osmótica del fluido seminal es de 280 mOsmol Kg⁻¹ y la activación ocurre en agua dulce o en soluciones salinas si la concentración osmótica es más baja que 70 mOsmol Kg⁻¹ (Billard *et al.*, 1997).

En salmónidos, las altas presiones osmóticas ($400 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$) inhiben la motilidad espermática (Billard y Cosson, 1992), en tanto que en la perca (*Amphistichus argenteus*) la motilidad espermática es suprimida por altas osmolaridades (Lahnsteiner *et al.*, 1995). Un mecanismo similar de inhibición osmótica de la motilidad espermática se encuentra en los ciprínidos (Morisawa *et al.*, 1983), y en la lamprea marina (*Petromyzon marinus*) especies en las que la motilidad espermática es inhibida a altas osmolaridades (80 mMol NaCl o KCl) (Cieresko y Dabrowski, 2002).

1.6.2. pH

El pH intra o extra celular de teleósteos marinos y dulceacuícolas es reconocido como un importante regulador de la motilidad espermática (Márian *et al.*, 1997). El pH en las soluciones activadoras de la motilidad espermática también afecta de distintas maneras la actividad flagelar del espermatozoide dependiendo de la especie (Cosson *et al.*, 1999). Se ha determinado que el espermatozoide de la perca (*Perca fluviatilis*) tiene un pH óptimo en un intervalo de 7,0 a 8,5 (Lahnsteiner *et al.*, 1995).

En salmónidos y ciprínidos el pH óptimo para la motilidad y fertilidad es de 9,0 (Billard y Cosson, 1989). En trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) un pH inferior a 7.8 no induce la motilidad espermática (Baynes *et al.*, 1981). La aplicación de bicarbonato (NaHCO_3) extra celular y un elevado pH es necesario para la activación de la motilidad espermática en trucha arco iris (*O. mykiss*) y el salmón (*Oncorhynchus keta*) (Morisawa *et al.*, 1993). Para el caso de la lamprea marina (*P. marinus*) la duración de la motilidad espermática disminuye con el incremento en el pH (Ciereszko y Dabrowski, 2002). El pH en el conducto seminal (pH 8) del salmón (*Oncorhynchus keta*) es más alto que el pH en los testículos (pH 7,5), haciendo que adquiera mayor potencial de motilidad en el desplazamiento desde el testículo al conducto seminal (Morisawa, 1994). Mientras que los espermatozoides de especies marinas como la lisa (*Mugil capito*), son activados a pH entre 5.5 y 10.0; siendo el óptimo 7,0 (Hines y Yashov, 1971).

1.6.3. Composición iónica

Darszon *et al* (1999), enfatiza la importancia de la composición iónica del medio externo sobre la motilidad espermática y cómo los canales iónicos son un elemento esencial en la motilidad. La disminución en las concentraciones del ion potasio (K^+) inhibe la motilidad espermática (Lin y Dabrowski 1996). Scheuring (1925) fue el primero en observar que en la trucha arcoiris los espermatozoides permanecían inmóviles después de una dilución con soluciones que contenían altas concentraciones de potasio. En salmónidos, la dilución del fluido seminal en soluciones con potasio inhibe la motilidad espermática (Billard, 1988; Cussac y Maggese, 1988; Billard y Cosson, 1995; Darszon *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 1999; He y Woods, 2003).

El efecto del potasio en otros peces teleósteos es menos claro, pero se ha determinado que no inhibe la motilidad flagelar en algunas especies (Morisawa, 1994). En el bagre (*Rhadmia sapo*) la presencia de potasio en distintas concentraciones no afecta la motilidad espermática (Cussac y Maggese, 1988). De igual manera ocurre para especies de agua dulce tales como el pez dorado (*Carassius auratus*) y el pez cebra (*D. rerio*) (Darszon *et al.*, 1999).

El potasio puede incrementar la velocidad y frecuencia de la motilidad de los espermatozoides de la carpa común (*C. carpio*) (Billard y Cosson, 1992) y otros peces (Lin y Dabrowski, 1996). La presencia de K^+ es necesaria para la iniciación de la motilidad espermática en la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Ohta *et al.*, 1997). Cosson *et al* (1999) reportan que la presencia del ion K^+ en muy bajas concentraciones de aproximadamente 0.01 mM, muestra un control sobre la activación espermática en el pez espátula (*P. sphenotula*) y el esturión (*Acipenser baeri*).

Además del K^+ existen otros iones que influyen en la motilidad espermática. Sheuring (1924) fue el primero en reportar que iones como el sodio (Na^+), calcio (Ca^{++}) y magnesio (Mg^{++}) reducían el efecto inhibitorio del K^+ . En la actualidad se sabe

que la presencia de Ca^{++} es importante para la iniciación de la motilidad espermática en salmónidos al contrarrestar el efecto inhibitor del K^+ , también en el pez espátula (*P. sphenoclitus*) y en el esturión (*A. baeri*) la presencia de Ca^{++} es importante para la iniciación de la actividad espermática (Billard y Cosson, 1989; 1995; Cosson *et al.*, 1999; Darszon *et al.*, 1999).

En contraste con lo observado en salmónidos, los espermatozoides de carpa presentan una independencia del ion Ca^{++} un efecto similar es observado en varios peces teleósteos como el rodaballo, peces planos como el halibut del Atlántico, los silúridos y las anguilas (Cosson *et al.*, 1999). Asimismo, los iones sodio juegan un papel central en la percepción o transducción de la señal osmótica para la activación de los espermatozoides (Krasznai *et al.*, 1995; Perchec *et al.*, 1997). Los iones de sodio y potasio participan en una cascada de eventos, sin embargo, los detalles de estas cascadas aún no se comprenden del todo (Morisawa *et al.*, 1993.). Por otro lado, la dilución en un medio isotónico de cloruro de sodio (NaCl) dispara de inmediato la activación de la motilidad en salmónidos (Billard, 1978; Gatti *et al.*, 1990).

1.6.4. Temperatura

La temperatura es otro factor importante que incide en el metabolismo de los espermatozoides, dado que bajas temperaturas prolongan la motilidad a través del tiempo y reducen la velocidad de desplazamiento (Billard y Cosson, 1988). En especies como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha marrón (*Salmo trutta*) la fertilización puede ocurrir en intervalos más amplios de temperatura (2 a 16 °C) (Vladic y Järvi, 1997). En el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) la mayor motilidad espermática ocurre a una temperatura de 7°C.

La fertilización artificial es usada ampliamente para especies de peces de agua dulce tal como los cláridos (Hogendoorn y Vismans, 1980), salmónidos y ciprínidos (Billard, 1988, 1990), pero el éxito de la fertilización en granjas comerciales y laboratorios es altamente variable. La motilidad, la tasa de fertilización y la tasa de

eclosión han sido usadas como criterio de la calidad espermática, sin embargo, la proporción esperma/ovocito es muy poco utilizada.

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El pez blanco del Lago de Pátzcuaro (*M. estor*) es una de las especies más representativas de la cultura purépecha y del estado de Michoacán, por su gran importancia histórica, ecológica y económica, el pez blanco ha sido la base de la pesquería artesanal de este lago; sin embargo a mediados de la década de 1980 se registró por primera vez una reducción en su captura, debida principalmente a la degradación ambiental del lago, la explotación irracional y la introducción de especies exóticas, posteriormente en los años posteriores esta disminución se incrementó considerablemente (Marez-Báez y Morales-Palacios, 2003). Por todo ello, se ha optado por el uso de la acuicultura como una estrategia de conservación para y así evitar que el pez blanco desaparezca por completo.

A pesar de que existen algunos trabajos referentes a la reproducción de *M. estor*, hasta la fecha no se cuentan con estudios de calidad espermática, ni se cuenta con la descripción morfológica de los espermatozoides; que es de gran importancia para su manejo en cautiverio.

En la planta de producción de pez blanco se ha logrado reproducir a esta especie bajo condiciones de cultivo, a través de diversos experimentos se han tenido avances importantes en la utilización del fotoperiodo, se ha controlado en su totalidad el ciclo reproductivo, por lo que ahora se obtienen larvas y juveniles de pez blanco en cualquier época del año (Campos-Mendoza *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que el pez blanco es una especie que se estresa muy fácilmente con el manejo, por ello se han propuesto métodos en los cuales se utiliza la salinidad para disminuir el estrés y proporcionarle a los peces un ambiente más isotónico que les permite disminuir las pérdidas osmóticas (Pickering, 1993). Por lo

tanto, una de las soluciones que son utilizadas en la planta de producción para disminuir el estrés es mantener a los peces en agua con salinidad (5-7‰) lo cual a su vez permite tener un mejor manejo de los reproductores.

A pesar de que la salinidad resulta benéfica para el manejo del pez blanco, se ha observado que cuando los reproductores son mantenidos en un medio con salinidad (5-7‰), el porcentaje de ovocitos fertilizados que son recolectados es nulo y muchas de las veces las hembras no llegan a desovar bajo estas condiciones; y cuando los peces son transferidos a agua dulce (0‰), las hembras comienzan a desovar y por lo tanto hay mayor número de ovocitos fertilizados. Sin embargo, aun cuando se mantiene a los reproductores en agua dulce, los porcentajes de fertilización siguen siendo bajos (□ del 50%). Por lo tanto con este trabajo se pretende incrementar el porcentaje de fertilización de los ovocitos y por consiguiente mejorar la producción de crías de pez blanco, teniendo un mejor manejo de las condiciones que son más adecuadas para los gametos, tanto de machos como hembras.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar diversos indicadores de calidad espermática, así como el efecto de la salinidad en el esperma de reproductores de pez blanco (*Menidia estor*) bajo condiciones controladas.

3.2. Objetivos específicos.

- Determinar el volúmen y la concentración espermática (cel/mL) de reproductores cultivados de pez blanco.
- Evaluar la viabilidad espermática en reproductores cultivados de pez blanco.
- Evaluar la motilidad espermática a diferentes salinidades (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ‰) en reproductores cultivados de pez blanco *M. estor*.
- Determinar la proporción espermatozoide/ovocito para una adecuada fertilización de desoves de pez blanco.
- Evaluar el efecto de la salinidad en el proceso de fertilización *in vitro* de desoves de pez blanco.

4. Hipótesis de trabajo

Los ambientes salobres afectan la motilidad espermática, ocasionando bajas tasas de fertilización en los reproductores de pez blanco.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los diversos experimentos que incluye este trabajo se utilizaron individuos adultos de pez blanco del Lago de Pátzcuaro (*Menidia estor*), sexualmente maduros cultivados en la planta de producción del Laboratorio de Acuacultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Los reproductores de 2 años, fueron mantenidos durante todo el periodo experimental en tanques circulares de 3 m de diámetro, a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas oscuridad. Los peces fueron alimentados a saciedad 5 veces al día de 9-1 pm, con intervalos de una hora entre cada alimentación, la rutina de alimentación consistió en dar las primeras cuatro alimentaciones con un alimento artificial (AZOO) y la última alimentación consistió de adultos de artemia (*Artemia franciscana*).

5.1. Colecta de los gametos

Previo a la colecta de la muestra de esperma, los machos fueron anestesiados por inmersión durante 3-5 minutos en una solución de una sal de etil 3-aminobenzoato metenesulfonato (MS 222, Sigma) a una concentración de 0.05 g/L; una vez que los peces fueron anestesiados se retiraron inmediatamente de la solución tranquilizadora; posteriormente el pez fue secado cuidadosamente para evitar el contacto del esperma con agua durante la obtención de la muestra, ya que el agua activa la motilidad de los espermatozoides.

Las muestras de esperma fueron obtenidas mediante un ligero masaje del abdomen en dirección cráneo-caudal. Para evitar al máximo la contaminación con agua, orina o heces, el esperma inicial que se obtuvo fue descartado y el poro urogenital fue limpiado con una toalla de papel absorbente. Una vez que el esperma quedó nuevamente expuesto se extrajo con ayuda de una punta de pipeta con capacidad de 200 μl unida a una jeringa tipo insulina de (1 mL) y se almacenó en

tubos Eppendorf de 0.6 mL a temperatura ambiente para su posterior utilización (Fig. 2).



Fig. 2. Proceso de obtención de la muestra de esperma.

5.2. Evaluación de la viabilidad espermática

Para la evaluación de la viabilidad espermática se utilizaron 30 machos sexualmente maduros, a los cuales se les extrajo el esperma mediante el método anteriormente descrito.

Previo a la obtención de la muestra de esperma se preparó un colorante especial de acuerdo con la técnica de eosina-nigrosina para teñir a los espermatozoides, este protocolo fue diseñado para ser usado en humanos (Björndahl *et al.*, 2003). El colorante contenía 0.67 g de eosina amarilla (Hicel de México) y 0.9 g de cloruro de sodio (Baker) los cuales fueron disueltos en 100 mL de agua destilada en una placa de calentamiento. Una vez disuelta la eosina se agregó 10 g de nigrosina (Hicel del México) finalmente la mezcla se dejó enfriar y se pasó por un papel filtro y se almacenó en un frasco ámbar de vidrio a temperatura ambiente.

De las muestras de esperma se obtuvieron alícuotas de 20 μ L, las cuales se coloraron en tubos Eppendorf de 0.6 mL y posteriormente se les adicionaron 20 μ L del colorante, posteriormente, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 segundos. Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 12 μ L, las cuales fueron transferidos a un portaobjetos de vidrio, en el cual se impregnó la muestra con

ayuda de un cubreobjetos. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los portaobjetos impregnados con el colorante y la muestra fueron secados al aire y examinados directamente bajo un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Axioscop 2 plus) con un aumento de 100X. Los espermatozoides observados blancos fueron clasificados como vivos y aquellos que mostraron coloración rosa o roja en el interior del citoplasma fueron clasificados como muertos. De manera que el porcentaje (%) de viabilidad se determinó observando la proporción de espermatozoides muertos (%) con respecto al total de espermatozoides observados. Las muestras de esperma fueron evaluadas dentro de la primera hora después de su extracción.

5.3. Dilución y cuantificación espermática

Para el experimento se utilizaron 30 peces, los cuales se seleccionaron al azar; las muestras de esperma se tomaron de acuerdo al protocolo previamente descrito, una vez obtenidas las muestras estas se colocaron en tubos Eppendorf de 0.6 mL a temperatura ambiente y se realizaron las siguientes diluciones de esperma/agua (1:10, 1:100, 1:500 y 1:1000), utilizando las cantidades presentadas en el Tabla 1.

Tabla 1. Tasas de dilución utilizadas para la cuantificación espermática.

DILUCIÓN	1:10	1:100	1:500	1:1000
Cantidad de agua	9	99	499	999
Cantidad de esperma	1	1	1	1

*Las unidades son expresadas en μL

Para realizar las diluciones, las cantidades de esperma y agua se tomaron con una micropipeta y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían la cantidad de agua correspondiente para cada una de las diluciones.

El tubo que contenía la mezcla de esperma/agua se agitó por un espacio de 5 segundos con la finalidad de homogeneizar la mezcla. Posteriormente, se tomó una cantidad suficiente para cargar la cámara de Neubauer y observarla en un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Axioscop 2 plus) con un aumento de 20X y de

esta manera se determinó cuál era la dilución más adecuada que nos permitió contar las células espermáticas.

5.4. Evaluación del volumen y de la concentración espermática

Para determinar el volumen total de esperma se seleccionaron 30 peces reproductores al azar con un peso promedio de 41.96 ± 3.2 g y una longitud total promedio de 17.32 ± 0.42 cm, los cuales se dividieron en grupos de acuerdo a las tres tallas (chicos, medianos y grandes). Posteriormente se les extrajo la muestra de esperma de la forma anteriormente descrita, la cual fue colectada directamente en tubos capilares de vidrio graduados. Cada tubo permitió determinar el volumen total de esperma producido por pez (Fig. 3).



Fig. 3. Determinación del volumen espermático.

Para la determinación de la concentración espermática se utilizaron dos métodos a) Evaluación del espermatocrito y b) Conteo celular en hematocitómetro.

Para la medición del espermatocrito se prepararon 30 muestras de esperma contenidas en tubos capilares de 75.0 mm de largo y 0.2 mm de diámetro interno, los cuales se llenaron aproximadamente en un 90% con esperma y posteriormente se sellaron uno de sus extremos con plastilina. Seguidamente los capilares se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos en una centrífuga para microhematocritos (Insesa, Mod. 2). Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación se sacaron los tubos e inmediatamente después se midió la altura del paquete

celular (columna blanca) y se calculó su proporción (%) con relación a la altura total de la columna de esperma (Fig. 4).



Fig. 4. Procedimiento para la determinación del espermatozoides.

Para el método del hematocitómetro se evaluó la densidad espermática que fue evaluada bajo un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Axioscop 2 plus) con un aumento de 40X usando una cámara de Neubauer. El esperma de cada macho fue diluido en una proporción de 1:500 con una solución a base de formol (formol al 37% + 5 g de bicarbonato de sodio) la cual inhibe la motilidad de los espermatozoides en la solución. Para obtener una solución homogénea, las muestras fueron mezcladas en un vórtex por 10 segundos para evitar la aglutinación de los espermatozoides. Las diluciones se hicieron por triplicado para cada muestra, para cada dilución se hicieron tres conteos de cinco cuadrantes (1 mm^2). El promedio de los tres conteos de cada dilución fue calculado, y después el promedio de estos dos valores fue usado para determinar la densidad espermática (cel/mL) por macho (Fig. 5).

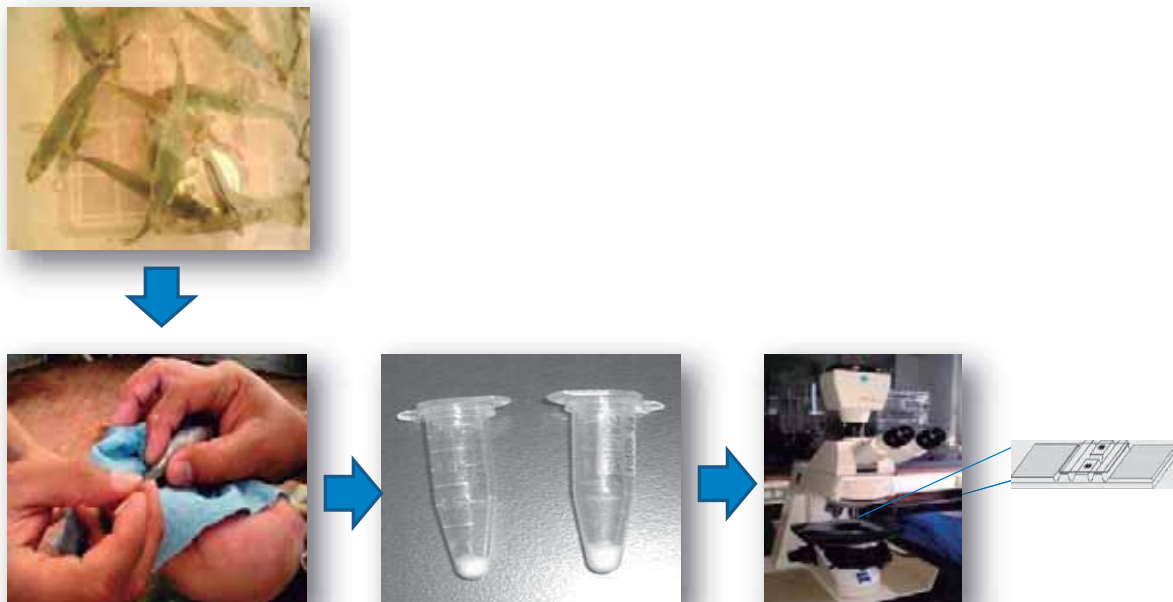


Fig. 5. Evaluación de la concentración espermática.

El número total de espermatozoides se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración espermática} = (X_{\text{cel}}) (10,000) (d) (2)$$

X_{cel} : Promedio del número de espermatozoides observados.

d: Tasa de dilución.

5.5. Evaluación del tiempo y motilidad espermática

La motilidad espermática fue examinada después de activar la muestra con diferentes soluciones salinas (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ‰). Se utilizaron diluciones de 1: 250, esta dilución se eligió ya que fue la que mostró mejores resultados en cuanto a la duración de la motilidad en comparación con las diluciones de 1:3, 1:80, 1:100, 1:200 y 1:300 en una prueba preliminar.

La motilidad fue evaluada sobre un portaobjetos de vidrio con y sin cubreobjetos bajo un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Axioscop 2 plus) con un

Aumento de 20 X en un cuarto a temperatura ambiente. El grado de motilidad fue estimado usando una escala de unidades arbitrarias de 0 a 5 propuesta por Sánchez-Rodríguez y Billard (1977) (Tabla 2). La estimación de la motilidad espermática fue iniciada inmediatamente (aproximadamente 30 seg) después de la dilución. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado con el espermatozoide de 30 machos (Fig. 6).

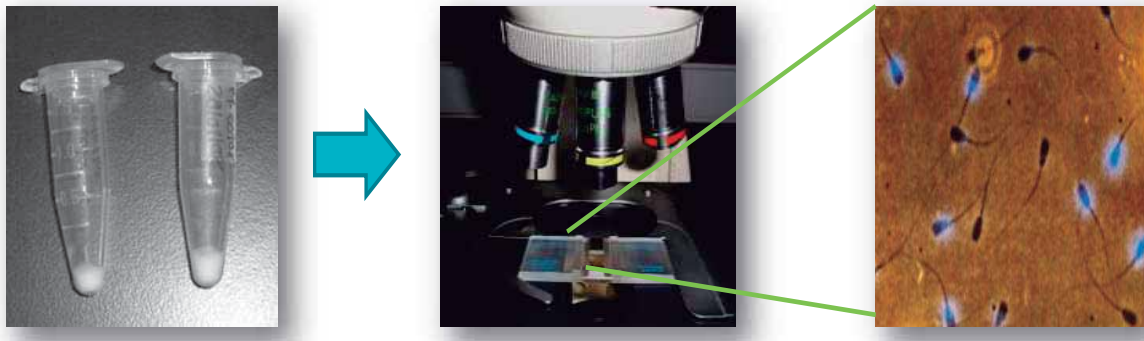


Fig. 6. Procedimiento para la determinación de la motilidad espermática.

Tabla 2. Índice numérico para la evaluación de la motilidad espermática.

Índice	Características de motilidad
5	La mayoría de los espermatozoides muestran movimiento rápido, es imposible seguir la trayectoria de cualquier espermatozoide.
4	Muchos espermatozoides se mueven rápidamente mientras que algunos se mueven lentamente.
3	Tres clases de espermatozoides pueden ser encontrados en números equivalentes: espermatozoides con movimiento rápido, espermatozoides con movimiento lento o vibratorio, y aquellos que permanecen inmóviles.
2	Muchos espermatozoides tienen vibración o están inmóviles, mientras que algunos presentan movimiento hacia adelante.
1	Muchos espermatozoides son inmóviles y algunos presentan vibración lateral.

Todos los espermatozoides están inmóviles

Adaptado de Sánchez-Rodríguez y Billard, 1977.

5.6. Determinación de la proporción espermatozoide/ ovocito

Para este experimento se utilizaron 3 hembras y 8 machos. Para la obtención de los ovocitos, las hembras anestesiadas que mostraron signos de ovulación, tales como el alargamiento del abdomen se les extrajeron los ovocitos mediante presión a

lo largo de la cavidad abdominal hacia la abertura del poro genital. Los gametos obtenidos se almacenaron en una caja de Petri cubierta, para protegerlos de la luz solar y posteriormente se utilizaron.

5.7. Fertilización artificial

Una vez que los ovocitos fueron colectados, se mezclaron para formar una mezcla, una vez hecho esto se colocaron 100 ovocitos (100 ± 1 ovocito) dentro de cajas de Petri de 55 x 12 mm utilizando para ello una pequeña espátula de metal. Los ovocitos fueron fertilizados con distintas concentraciones de esperma; $1:1.74 \times 10^7$, $1:3.48 \times 10^7$, $1:6.96 \times 10^7$, $1:1.04 \times 10^8$, $1:1.39 \times 10^8$, $1:1.74 \times 10^8$, $1:3.48 \times 10^8$, $1:5.22 \times 10^8$, $1:8.70 \times 10^8$, para cada concentración de esperma se hicieron triplicados. Las adiciones de las concentraciones de esperma se realizaron con ayuda de una micropipeta con un volumen de esperma conocido (ajustada de acuerdo a la densidad espermática requerida). Inmediatamente después de que el esperma sin diluir fue adicionado a las cajas de Petri con los ovocitos, se agregaron 10 mL de agua dulce a cada una de las cajas de Petri. Después de 5 minutos los huevos fueron enjuagados con agua (0‰) en una malla de nylon de 150 μm , para eliminar el exceso de esperma y fluido ovárico. Después los huevos fueron transferidos a un recipiente que contenía 27 divisiones con agua dulce (0‰) en las cuales se colocaron los huevos para ser incubados a una temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con una luz constante por aproximadamente 4 horas.

5.8. Evaluación del efecto de la salinidad sobre la tasa de fertilización

Para este experimento se utilizaron 13 machos y 3 hembras, los gametos se extrajeron de la manera anteriormente descrita. Una vez obtenidos los ovocitos, estos fueron colocados en cajas de Petri de 55 x 12 mm utilizando una pequeña espátula de metal. Posteriormente, se procedió a la obtención del esperma, para ello se realizó una ligera presión abdominal en el vientre del macho y con ayuda de una micropipeta ajustada al volumen deseado (de acuerdo a la proporción esperma/ovocito obtenida anteriormente) se extrajo el esperma, el cual fue colocado dentro de cada una de las cajas de Petri que contenían los ovocitos e

inmediatamente se agregó el agua que contenía las diferentes concentraciones de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ‰), después los ovocitos con el espermatozoides fueron mezclados ligeramente para obtener una mezcla homogénea. A continuación se dejaron 5 minutos en las cajas de Petri y posteriormente los huevos fueron enjuagados con una malla de nylon 150 µm para eliminar el exceso de fluido ovárico, espermatozoides y sal de los huevos ya fertilizados. Seguidamente los huevos fueron colocados en un recipiente que contenía 27 divisiones para cada uno de los grupos de huevos tratados con diferentes salinidades; el recipiente se mantuvo en $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con una luz constante por aproximadamente 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los huevos fueron observados en un microscopio compuesto (Carl Zeiss, AxioStar) con un aumento de 10X para evaluar la tasa de fertilización (%), la cual se determinó a partir de que los huevos empezaron la división celular hasta el estadio de mórula. Solamente los huevos claros y transparentes se consideraron como fertilizados.

5.9. Análisis estadístico.

Los resultados fueron comparados por medio de un análisis de varianza de una vía y las diferencias entre las medias de los tratamientos se identificaron con la prueba de rangos múltiples de Tukey con una confiabilidad ($\alpha = 0.05$) con ayuda del paquete estadístico Minitab versión 13.2. Todos los resultados son expresados como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm \text{S.E.}$)

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1. Dilución y concentración espermática

Aunque se prepararon cuatro diluciones, 1:10, 1:100, 1:500 y 1:1000, finalmente solo se observaron tres, ya que la dilución de 1:10 era imposible de realizar la cuantificación debido al gran número de células espermáticas que presentaba. La mejor dilución que se encontró fue la que permitió realizar un mejor conteo celular que fue de 1:500.

En la figura 7 se presenta el número de células espermáticas por mm^3 en la cual se observa que la dilución 1:500 es la que presenta el número de células espermáticas más adecuado de acuerdo al número de células mínimo para poder llevar a cabo el conteo. En tanto la dilución de 1:100 presenta un gran número de células que hacen muy difícil la cuantificación y finalmente en la dilución 1:1000 el número de células que se observan son muy pocas y no son las mínimas requeridas para realizar la cuantificación en la cámara de Neubauer.

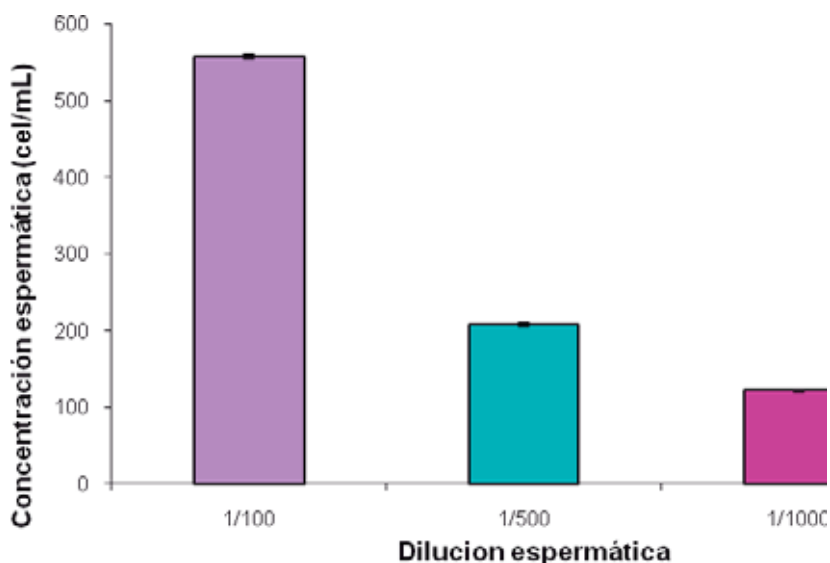


Fig. 7. Concentración espermática (cel/mL) en las diferentes diluciones.

6.2. Evaluación del volumen y concentración espermática

El pez blanco (*M. estor*) es una especie que presenta un esperma muy concentrado en muy poco volumen, por lo que las unidades de esperma que se obtienen son en microlitros, en comparación con otras especies de peces en las que se obtienen volúmenes mayores (Tabla 3).

Tabla 3. Volumen de esperma obtenido en distintas especies de peces.

Especie	Volumen de esperma	Autor/año
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	1 – 60 mL	Methven y Crim, 1991
<i>Scophthalmus maximus</i>	1.6 mL	Suquet <i>et al.</i> , 1992
<i>Brycon amazonicus</i>	8.9 mL	Cruz-Casillas <i>et al.</i> , 2006
<i>Osmerus eperlanus</i>	10-100 μ l	Kowalski <i>et al.</i> , 2006
<i>Perca fluviatilis</i>	0.55 – 6.78 mL	Alavi <i>et al.</i> , 2007
<i>Diplodus puntazo</i>	50-100 μ l	Papadaki <i>et al.</i> , 2008
<i>M. estor</i>	11-101 μ l	Presente trabajo

La producción de esperma que presenta *M. estor* es muy variable (Fig. 8), dependiendo del peso de los organismos, dichas variaciones pueden estar relacionadas con las condiciones en las que han sido cultivados los reproductores, la duración y tiempo de espermiación dentro de la estación reproductiva (Alavi *et al.*, 2007a), así como a la frecuencia con la que los peces son muestreados, ya que la extracción continua reduce la cantidad de esperma producido, además de alterar la tasa de fertilización y la densidad espermática durante la temporada reproductiva (Aas *et al.*, 1991).

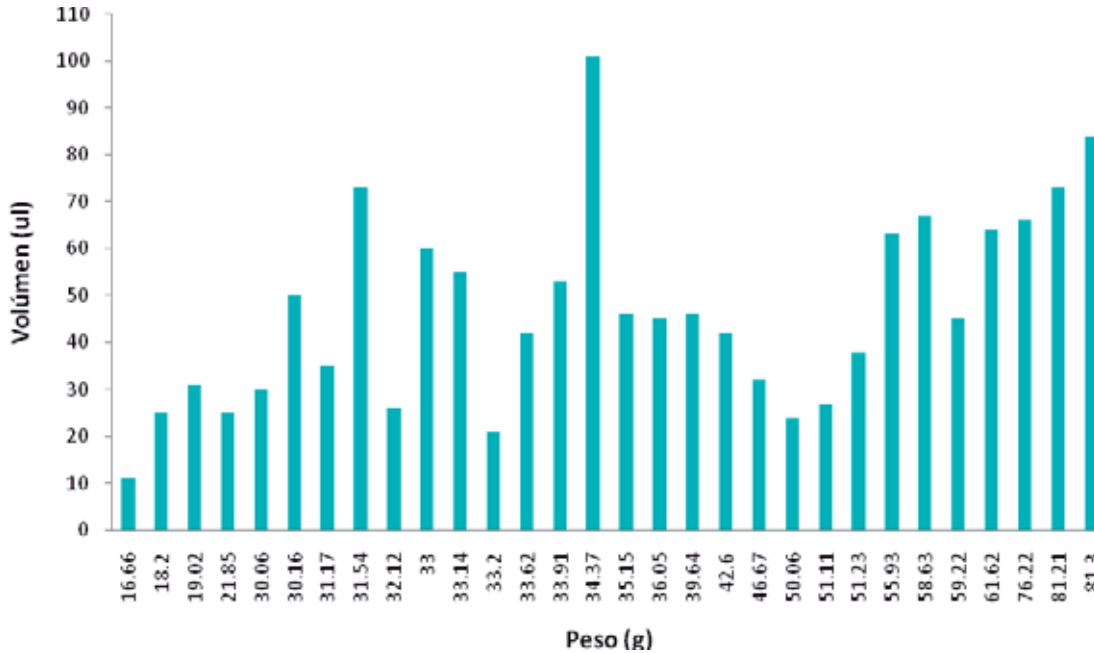


Figura 8. Volumen de esperma obtenido en reproductores de *M. estor*.

Al analizar si existe alguna relación entre el volumen de esperma producido y el peso de los reproductores de *M. estor* se encontró que existe una correlación positiva entre estas dos variables ajustándose al modelo de la recta, con un coeficiente de correlación bajo de 0.53; de manera que podemos decir de cierta manera, el volumen de esperma producido por reproductores de *M. estor* depende del peso de los individuos (Fig. 9).

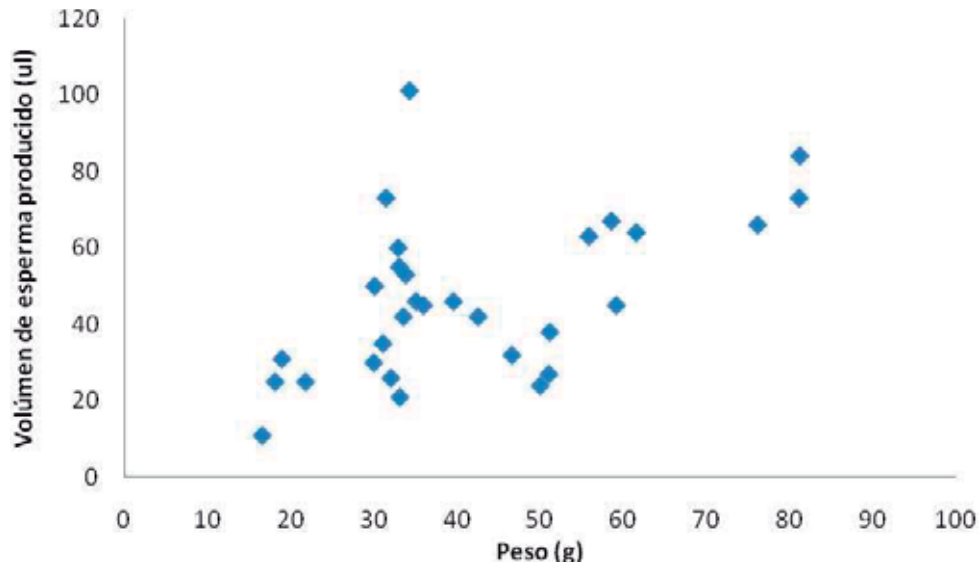


Figura. 9. Correlación entre el volumen de esperma producido y el peso de los reproductores de *M. estor*.

Al evaluar las muestras de esperma obtenidas de los 30 machos reproductores de *M. estor*, se encontró que la concentración espermática que presenta esta especie en promedio es de 2.44×10^8 cel/mL (Fig. 10).

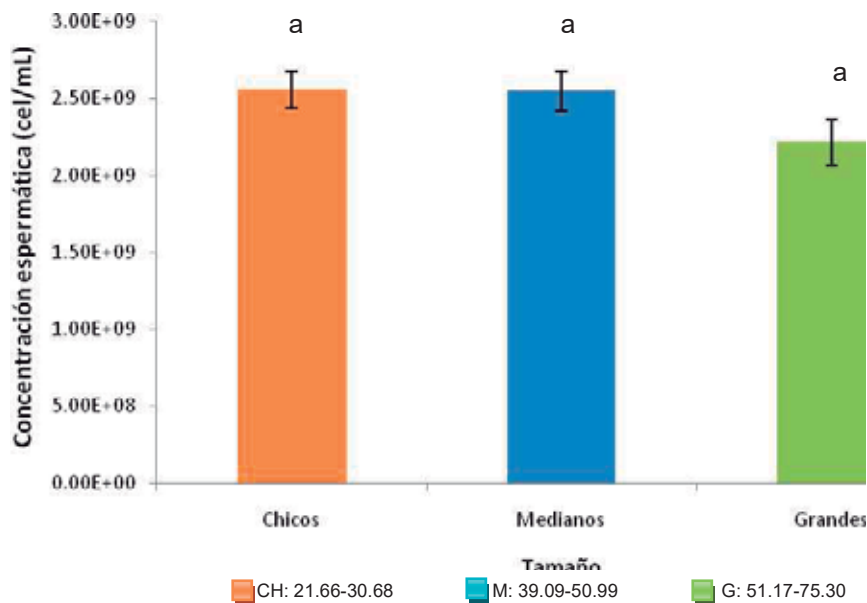


Figura 10. Concentración espermática en *M. estor*.

La concentración espermática observada para *M. estor* ($2.21 - 2.55 \times 10^9$) difiere a las de las otras especies de peces (Tabla 4), siendo mayor que la concentración mínima para el bacalao (*Melanogrammus aeglefinus*) (1.84×10^9) y menor a la concentración mínima para el pez plano (*Hippoglossus hippoglossus*) (2×10^{11}). Esto puede deberse a varios factores, uno de ellos es el tamaño que presenta *M. estor* en comparación con las demás especies.

Tabla 4. Concentración espermática en otras especies de peces.

Especie	Concentración espermática cel/mL	Referencia
<i>Salmo salar</i>	9.54×10^9	Aas <i>et al.</i> , 1991
<i>Scophthalmus maximus</i>	38.3×10^9	Suquet <i>et al.</i> , 1992
<i>O. mossambicus</i> (agua dulce)	9.9×10^9	Linhart <i>et al.</i> , 1999
<i>O. mossambicus</i> (agua salada)	4.9×10^9	Linhart <i>et al.</i> , 1999
<i>Gadus morhua</i>	$3.92 - 29.07 \times 10^9$	Rakitin <i>et al.</i> , 1999
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	$2 \times 10^{11} - 6 \times 10^{11}$	Tvedt <i>et al.</i> , 2001
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	$1.84 - 13.15 \times 10^9$	Rideout <i>et al.</i> , 2004
<i>Brycon amazonicus</i>	$4.8 - 14.2 \times 10^6$	Cruz-Casallas <i>et al.</i> , 2006
<i>Perca fluviatilis</i>	$18.8 - 127.5 \times 10^9$	Wirtz y Steinmann, 2006
<i>Perca fluviatilis</i>	$3.20 - 43.91 \times 10^9$	Alavi <i>et al.</i> , 2007
<i>M. estor</i>	$2.21 - 2.55 \times 10^9$	Presente trabajo

La concentración espermática en *M. estor* fue más baja que la reportada en otras especies de peces, a excepción del yamu (*Brycon amazonicus*), pero la magnitud de densidad espermática (10^9) fue similar a la mayoría de los otros teleósteos (Tabla 4).

M. estor es una especie que presenta una concentración espermática elevada ($2.21-2.55 \times 10^9$) en un volumen muy pequeño ($11-101 \mu\text{L}$) en comparación con su talla esto puede deberse a varios factores entre los que se encuentra la fuerte presión a la que se encuentra sometida la especie, así como a la competencia que se da entre los machos para llevar a cabo la fertilización de los ovocitos (Nakatsuru y Kramer, 1982) ya que el macho al liberar un gran número de espermatozoides está incrementando sus posibilidades de fertilización (Parker *et al.*, 1996).

En muchas especies de peces, machos más grandes producen un múltiple número de espermatozoides, comparado con machos más pequeños (Petersen y Warner, 1998). Sin embargo, la estrategia reproductiva puede variar de acuerdo al tamaño y estatus de un macho o a su cantidad de esperma disponible (Gross, 1996; Taborsky, 1998). Se han realizado alometrias en la producción de esperma y características de las gónadas entre machos pequeños y grandes en varias especies, los machos pequeños tienen relativamente testículos mas grandes o mayor densidad espermática en el fluido seminal (Leach y Montgomerie, 2000). Este podría ser el caso de *M. estor*, el cual al estar sometido a diversos tipos de presiones, compensa su tamaño pequeño produciendo poca cantidad de esperma pero sumamente concentrada lo cual favorece sus posibilidades de fertilizar la mayor cantidad de ovocitos.

La variación en cuanto a la concentración espermática en *M. estor* podría deberse a las condiciones en las que se mantienen los peces, el método de obtención del esperma, las condiciones de cultivo, el periodo de descanso que se les da a los machos entre un muestreo y otro, así como de la estación reproductiva como ocurre en otras especies de peces (Alavi *et al.*, 2007).

Por otro lado, al hacer la evaluación del espermatocrito se encontró que su valor es de $61.4 \pm 1.23\%$; este valor es similar al reportado en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) ($40.4 \pm 5.8\%$) (Suquet *et al.*, 1992) y mayor que el reportado para el yamu (*Brycon amazonicus*) ($13.6 \pm 0.6\%$) (Cruz-Casallas *et al.*, 2006), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (23.4%) (Aas *et al.*, 1991) y menor que en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (18-91.3%) (Rakitin *et al.*, 1999) ya que en esta especie el valor del espermatocrito va incrementando conforme avanza la estación reproductiva y lo mismo ocurre con el halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (23-99%) (Tvedt *et al.*, 2001). Pero hay otras especies como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Suquet *et al.*, 1992) en la que no existe una correlación directa entre el valor del espermatocrito y la estación reproductiva.

En varios trabajos se ha reportado una relación entre la concentración espermática y el espermatozoide (Rideout *et al.*, 2004; Rakitin *et al.*, 1999; Tvedt *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 1991; Cruz-Casillas *et al.*, 2006). En este trabajo no se estableció esta relación, pero podría esperarse que esta relación se deba a que el espermatozoide en esta especie es sumamente denso y muy concentrado.

Para el caso de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) que es una especie eurialina, la cual se reproduce en ambos ambientes tanto en agua dulce como en agua salobre (Chimists, 1955); al evaluar el efecto de estos distintos ambientes de cultivo sobre la concentración espermática se encontró que las tilapias aclimatadas a ambientes salinos su concentración espermática se ve disminuida (4.6×10^9), mientras que las aclimatadas a agua dulce su concentración espermática es superior (9.9×10^9) (Linhart *et al.*, 1999).

6.3. Viabilidad espermática

La vitalidad espermática es un parámetro importante ya que nos ayuda a conocer la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide y a descartar algún otro problema que pudiera estar relacionado con la integridad de la membrana. La membrana plasmática juega un papel fundamental en la respuesta del espermatozoide al entorno, las características propias de la membrana del espermatozoide le confieren la capacidad y la dinámica para regular diferentes actividades celulares y rutas de señalización que pueden resultar en la activación de la motilidad.

En la literatura existe nula o muy escasa información referente a este tipo de evaluación en los peces, siendo más frecuente en los análisis de calidad espermática en humanos, cerdos y ganado bovino (Gallardo, 2007; Björndahl *et al.*, 2003).

En la figura 11 se muestra la evaluación de la vitalidad espermática en la cual podemos observar que las muestras de espermatozoide obtenidas en *M. estor* presentan $92.14 \pm 1.14\%$ de células espermáticas vivas, lo que nos indica que la membrana

plasmática de la mayoría de los espermatozoides en esta especie no presenta ningún problema por el cual su motilidad se vea afectada al momento de ser activados. Un resultado similar fue reportado en bagre Africano (*Clarias gariepinus*) (Rurangwa *et al.*, 1998).

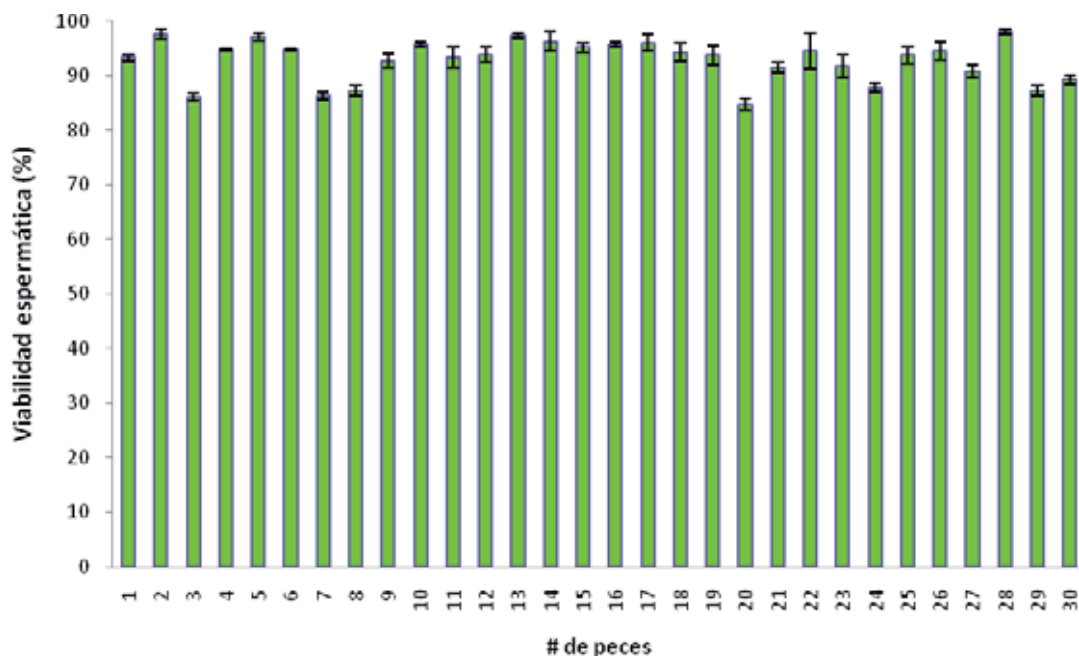
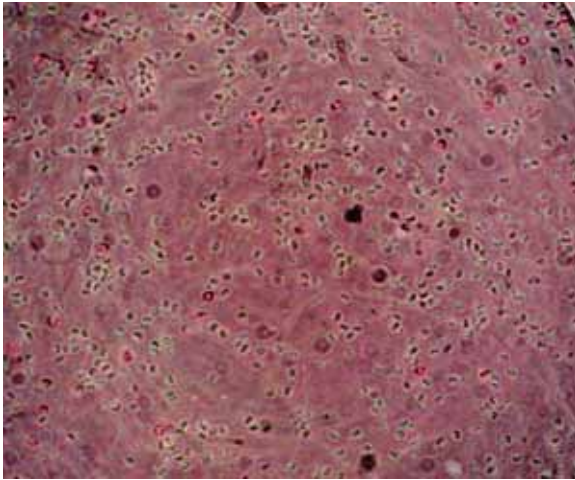
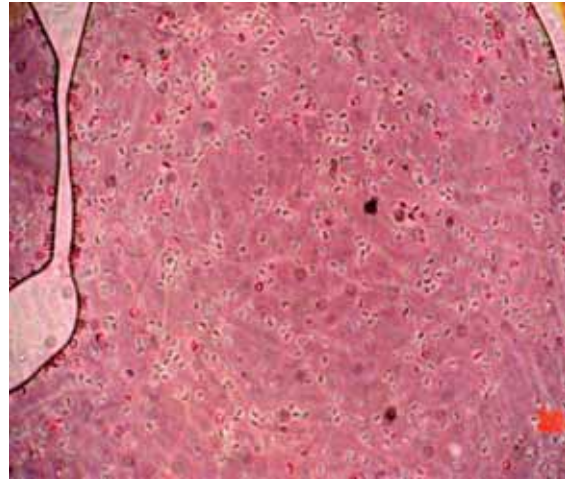


Figura 11. Viabilidad espermática en reproductores de *M. estor*.

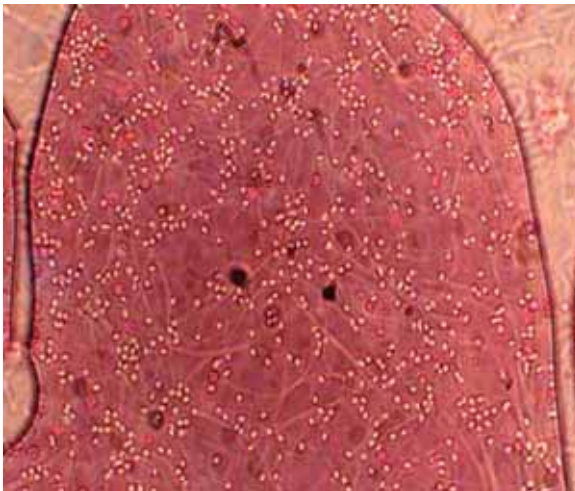
A continuación se muestran las imágenes obtenidas de las tinciones realizadas con la técnica eosina-nigrosina en las cuales se observan que la mayoría de los espermatozoides de *M. estor* están vivos (espermatozoides con citoplasma no teñido con el colorante) (Fig. 12).



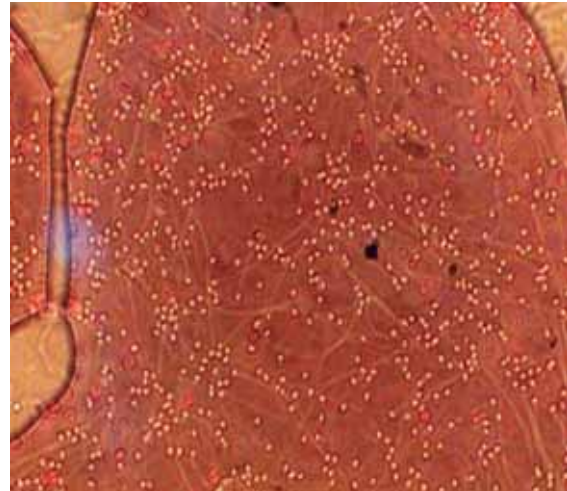
100X



100X



40X



40X

Fig. 12. Tinciones de espermatozoides de *M. estor* con la técnica eosina-nigrosina.

6.4. Evaluación de la motilidad espermática a diferentes salinidades en *M. estor*

Los resultados encontrados en este estudio muestran que *M. estor* es una especie que por sus orígenes marinos puede tolerar concentraciones de sal en el agua (Nelson, 1994) y esto se ve reflejado en sus gametos masculinos.

Se encontró que la salinidad tiene un gran efecto sobre la motilidad de los espermatozoides de *M. estor* además de que existe una gran diferencia entre utilizar o no el cubreobjetos en el momento de la evaluación (Fig. 13 y 14). Se observó que las muestras en las que se utilizó cubreobjetos el periodo de motilidad en el que el

esperma aún es capaz de fertilizar (índice 2) fue en promedio entre todas las salinidades de 3 minutos (180 s), mientras que en las muestras en las que no se utilizó el cubreobjetos el tiempo de motilidad promedio fue de 7 minutos (420 s), por lo que el periodo de motilidad de los espermatozoides en las muestras sin cubreobjetos se incrementó en un 200%. Esto se debe a que el cubreobjetos impide el libre movimiento de los espermatozoides debido al roce de éstos con el vidrio; además de que el cubreobjetos limita la incorporación de oxígeno a la muestra, es decir, al tener el cubreobjetos no hay oxígeno atmosférico que pueda ser utilizado por los espermatozoides y por lo tanto el periodo de motilidad se ve disminuido. Debido a los resultados obtenidos se decidió utilizar los datos de la motilidad sin cubreobjetos ya que mostraron tiempos de motilidad superiores (Fig. 13 y 14).

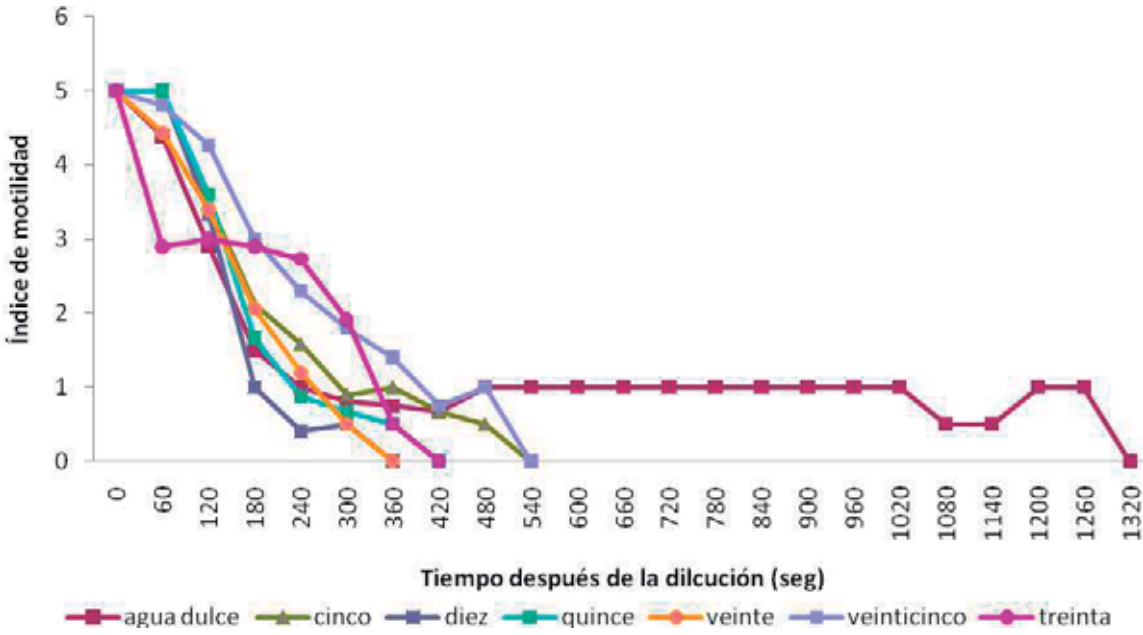


Figura 13. Motilidad espermática con diferentes soluciones salinas con cubreobjetos.

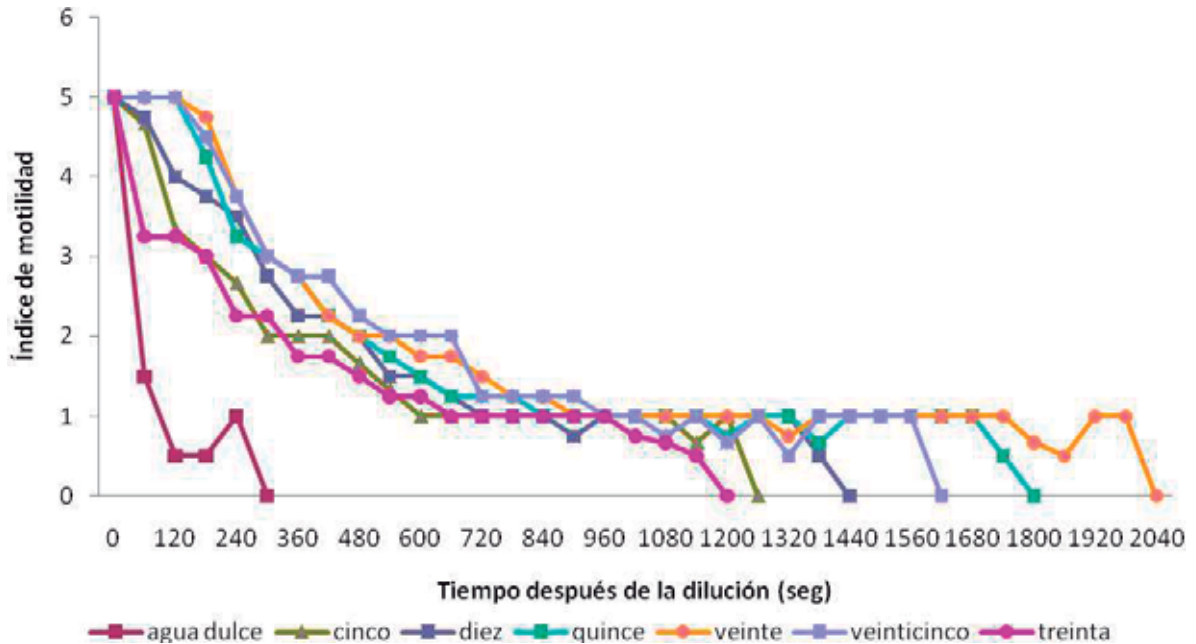


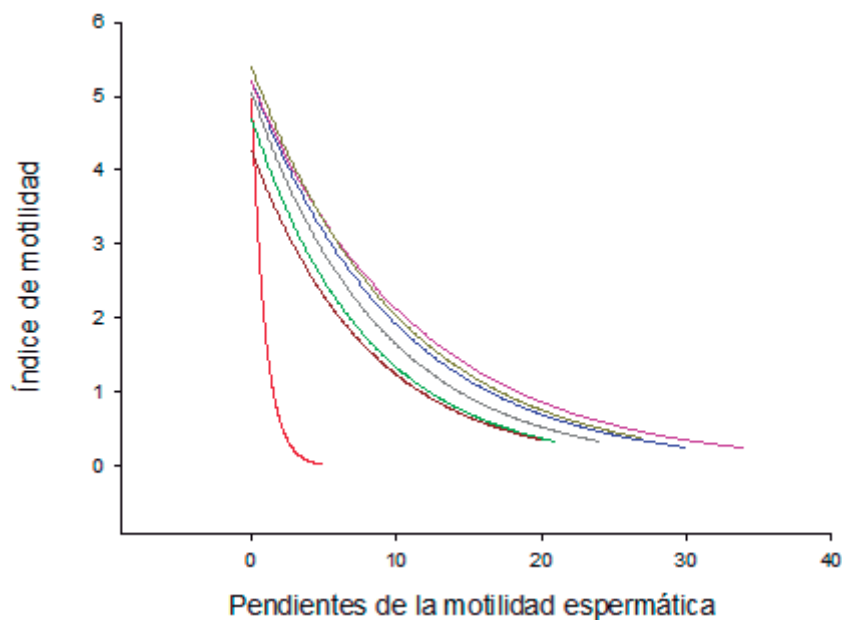
Figura 14. Motilidad espermática con diferentes soluciones salinas sin cubreobjetos.

Los espermatozoides de los peces son usualmente inmóviles en el fluido seminal (Ciereszko *et al.*, 2000) de manera que pueden ser transferidos a una solución que los active; esta solución activadora contiene solutos (iones o compuestos no ionizables) los cuales afectan la presión osmótica del fluido que rodea al espermatozoide por arriba o por debajo de la presión osmótica del fluido seminal ya sean especies marinas o de agua dulce. Lo que significa que la presión osmótica de la solución activadora es más alta o más baja que el fluido seminal en el caso de especies marinas o de agua dulce.

Los índices de motilidad disminuyeron rápidamente después de la dilución del esperma en agua dulce (0‰) a un índice de inmovilidad total, mientras que algunos otros todavía presentaban vibración lateral en un tiempo aproximado de 2 min (120 s), tal comportamiento persistió hasta el minuto 3 (170 s), mientras que al minuto 4 (240 s) hubo una ligera recuperación de algunos de los espermatozoides, pero finalmente alrededor del minuto 5 (300 s) todos se detuvieron. Al utilizar las soluciones salinas, el comportamiento de los espermatozoides cambió, ya que en

todas la salinidades (5 - 30‰) los índices de motilidad que son considerados apropiados para poder llevar a cabo la fertilización (índice del 5 al 2) se prolongaron hasta por 11 minutos (660s) en la salinidad de 25‰ (Fig. 14), lo cual es muy benéfico para el proceso reproductivo ya que los espermatozoides al encontrarse en un medio con salinidad les permite prolongar su periodo de motilidad y por lo tanto tener más posibilidades de fertilizar el ovocito.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de las pendientes de los datos de motilidad y se encontraron diferencias significativas entre los índices de motilidad de 0‰ y el resto de las salinidades (5, 10, 15, 20, 25 y 30 ‰) (Fig. 15) (Tabla 5) así mismo no se encontró diferencia significativa en los índices de motilidad entre las salinidades de 5, 10, 15, 20, 25 y 30‰, pero si se observó que la salinidad de 25‰ prolonga por más tiempo los índices de motilidad que son los adecuados para poder realizar la fertilización (índice del 5 – 2), mientras que con las salinidades de 5, 10, 15, 20‰ se observa como los índices de motilidad se prolongan por más tiempo conforme se incrementa la salinidad en el medio de dilución de los espermatozoides (Fig. 14).



— Agua dulce, $f = 4.9472 \cdot \exp(-1.0693 \cdot x)$
 — 5 ‰, $f = 4.6923 \cdot \exp(-0.1257 \cdot x)$
 — 10 ‰, $f = 5.0515 \cdot \exp(-0.1126 \cdot x)$
 — 15 ‰, $f = 5.2123 \cdot \exp(-1.003 \cdot x)$
 — 20 ‰, $f = 5.1900 \cdot \exp(-0.0893 \cdot x)$
 — 25 ‰, $f = 5.4030 \cdot \exp(-0.0980 \cdot x)$
 — 30 ‰, $f = 4.2618 \cdot \exp(-0.1238 \cdot x)$

Fig. 15. Pendientes de motilidad con diferentes soluciones salinas.

Tabla 5. Pendientes de la motilidad espermática.

Salinidad (‰)	Pendientes de la motilidad espermática
0	1.0693a
5	0.1257b
10	0.1126b
15	0.1003b
20	0.0893b
25	0.0980b
30	0.1238b

El pez blanco de Pátzcuaro aún conserva ciertas características de sus ancestros marinos ya que en el caso de los peces marinos, los espermatozoides inician su motilidad en respuesta a la presión hiperosmótica del agua marina; mientras que la mayoría de los espermatozoides de peces de agua dulce inician su motilidad en respuesta a una presión hiposmótica del medio en el que se encuentran (Cosson *et al.*, 1999).

La duración total de la motilidad de esperma se estimó por medio de observación visual de los movimientos del esperma hasta el cese total de su actividad. En el pez blanco se observó que la duración total de motilidad varió dependiendo de la salinidad que se presentaba el medio de activación (Tabla 6). Encontrándose que en salinidades bajas el tiempo total de motilidad es menor, en comparación con salinidades mayores, así como también se observó que en la salinidad más alta (30 ‰) el tiempo de motilidad empezó a disminuir, esto debido probablemente a la elevada presión osmótica que ejercía el medio sobre los espermatozoides lo cual provocó que los espermatozoides acortaran su periodo de

motilidad, así como sus índices de motilidad, los cuales fueron disminuyendo rápidamente en el primer minuto (Fig. 14).

Tabla 6. Periodo de motilidad total en *M. estor*.

Salinidad ‰	Duración total de motilidad (min)
0	5
5	21
10	24
15	30
20	34
25	27
30	20

El tiempo de motilidad total en *M. estor* es superior al reportado para otras especies de peces (Tabla 7), incluso es mayor que el tiempo reportado para las especies marinas. Por lo general el tiempo de motilidad espermática en peces de agua dulce es menor que en los peces marinos (Lahnsteiner *et al.*, 1997b; Alavi y Cosson, 2006) pero existen excepciones como el jurel del Mediterráneo (*Trachurus mediterraneus*) y el salmonete de fango (*Mullus barbatus*) las cuales son especies marinas y presentan un periodo de motilidad muy corto (menos de 1 min) (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Tabla 7. Duración de la motilidad espermática en varias especies de peces marinos y de agua dulce.

Especies de peces	Motilidad alcanzada (s)	Referencia
Lenguado spp.	110-120	Billard <i>et al.</i> , 1993
Jurel del mediterráneo (<i>Trachurus mediterraneus</i>)	Menor de 60 s	Lahnsteiner y Patzner, 1998
Salmonete de fango (<i>Mullus barbatus</i>)	90	Lahnsteiner y Patzner, 1998
Mero (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	50-60	Dreanno <i>et al.</i> , 1999
Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	7-800	Cosson <i>et al.</i> , 2008 ^a
Merluza (<i>Merluccius merluccius</i>)	4-500	Cosson <i>et al.</i> , 2008 ^a
Atún sp.	140	Cosson <i>et al.</i> , 2008b
Anguilas	Mayor a 20 minutos	Cosson <i>et al.</i> , 2008b
Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	35	Alavi <i>et al.</i> , 2007
Espáridos y Lábridos	Mayor a 15 minutos	Lahnsteiner y Patzner, 2008; Cosson <i>et al.</i> , 2008b
Boga (<i>Boops boops</i>)	Menor de 60 s	Lahnsteiner y Patzner, 2008

Al evaluar las diferencias en la activación de la motilidad espermática en el pez lanco con el agua con respecto a las soluciones salinas se ha encontrado que la duración de la motilidad cuando los espermatozoides son activados con agua dulce es generalmente muy corta, incluso menor de 60 segundos, en muchas especies incluyendo a los salmónidos, carpa, esculpínidos de agua dulce, lubina, como se mencionó anteriormente (Billard, 1978; Scott y Baynes, 1980; Cosson *et al.*, 1985; Christen *et al.*, 1987; Lahnsteiner *et al.*, 1997b y He y Woods, 2003).

La corta duración de la motilidad en el agua dulce ha sido reportada para otros atherinópsidos como el Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) en el cual se observó una disminución en el índice y tiempo de motilidad de los espermatozoides al ser activados con agua corriente (2 min) hasta llegar al índice 2 (Strüssman *et al.*, 1994).

Los espermatozoides de salmónidos, ciprínidos e ictalúridos muestran que la corta duración de la motilidad en el agua dulce está asociada con una gran pero no completa depleción de los niveles de ATP (Christen *et al.*, 1987; Billard y Cosson, 1992; Fauvel *et al.*, 1999). La motilidad en estas especies puede ser reiniciada después de la activación por medio de una dilución con salinidad (Redondo-Müller *et al.*, 1991; Perchech *et al.*, 1995) indicando que la corta duración en agua dulce no es el resultado de daños osmóticos irreversibles. De manera similar, la motilidad del espermatozoide de la perca y el pez plano son muy cortos en agua dulce y la activación en soluciones salinas no incrementa la motilidad (Lahnsteiner *et al.*, 1995, 1997a).

En la lisa (*Mugil cephalus*), se probaron 5 diferentes salinidades (10, 15, 20, 25 y 32‰) para evaluar la motilidad espermática y se encontró que conforme incrementaba la salinidad del medio de activación incrementaba la duración de la motilidad de los espermatozoides. La motilidad máxima fue observada a 25 y 32 ‰ con una duración de 108.33 y 117.5 s. Sin embargo en esta especie la salinidad de 10‰ no inducía el inicio de la motilidad espermática (Yeganch *et al.*, 2008).

Los resultados nos indican que los espermatozoides de *M. estor* no tienen problema alguno con la salinidad y que por el contrario requieren de esta para tener un mejor desempeño. En otras especies de peces también se ha reportado los beneficios de la salinidad en la producción de esperma como en el caso del arenque del Ártico, en el cual se encontró que la salinidad fue un factor clave para asegurar la reproducción de los machos, ya que cuando estos eran mantenidos en agua marina presentaban un mayor número de espermatozoides y una osmolaridad más alta que la del plasma seminal (Atse *et al.*, 2002).

En el caso del salmón del Atlántico (*Salmo salar*), se encontró una osmolaridad en el plasma seminal significativamente más alta en machos que fueron mantenidos en agua con sal (347 mOsmol Kg⁻¹) comparados con machos mantenidos en agua dulce (265 mOsmol Kg⁻¹). Sin embargo, el esperma de los machos que estuvieron en agua salada mostraron una baja capacidad fertilizadora (Haffray *et al.*, 1995). Linhart *et al.* (1999) confirmó la alta osmolaridad del plasma seminal en tilapias aclimatadas a agua marina (351 mOsmol Kg⁻¹) comparado con machos aclimatados a agua dulce (336 mOsmol Kg⁻¹). Estas diferencias pueden ser atribuidas de manera parcial a las diferencias en la osmolaridad de la orina entre los machos aclimatados a agua marina (305 mOsmol Kg⁻¹) y los machos aclimatados a agua dulce (78 mOsmol Kg⁻¹) ya que en este trabajo se reportó la contaminación del esperma con orina.

Los espermatozoides de la tilapia nilótica (*Oreochromis nilotica*) son activos a varios intervalos de salinidad, tal como 0-0.5‰ y de 0-1.5‰ para la tilapia (*Tilapia zilli*) (Chao *et al.*, 1987).

Al evaluar el efecto combinado del pH y la salinidad sobre la motilidad espermática de la tilapia roja se encontró que más del 75% de la muestra espermática mantuvo una buena motilidad por 8 minutos a un pH de 7 y 8 (Chao *et al.*, 1987). En la tilapia mosambica (*Oreochromis mossambicus*) aclimatados a 0 y

3‰ de salinidad la inhibición de la motilidad espermática ocurre en niveles de salinidad menores a 1.5 y 4‰ respectivamente (Wee y Lam, 1996).

Racota, 2009 reportó la osmolaridad que presentan las distintas concentraciones salinas (0, 5, 10, 15, 20 y 25 ‰) y al realizar la comparación de las osmolaridades con las salinidades utilizadas en este trabajo se encontró que en osmolaridades bajas (25 mOsmol Kg⁻¹) como la del agua dulce, la motilidad se ve afectada ya que dura muy poco (2 min) hasta llegar al índice 2; mientras que a osmolaridades de 280 mOsmol Kg⁻¹ (10‰), el periodo de motilidad se prolonga por mas tiempo (8 min), a 575 y 725 mOsmol Kg⁻¹ (20 y 25‰) la motilidad es mucho mejor (9 y 11 min respectivamente) hasta el índice 2. Estos resultados son distintos a los reportados para otro atherínido como el Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), en el que se encontró que al incrementar la presión osmótica del medio diluyente, los índices de motilidad se ven disminuidos (Strussman *et al.*, 1994), en el pez blanco ocurre lo opuesto, ya que al incrementar la presión osmótica, la motilidad se ve favorecida. Los resultados de este estudio sugieren que la presión osmótica del medio puede regular el inicio de la motilidad de espermatozoides de pez blanco. Un incremento progresivo en la salinidad y por consiguiente en la presión osmótica del medio diluyente provoca un aumento paulatino en la motilidad, pero no más allá de 25‰ (725 mOsmol Kg⁻¹), ya que por arriba de esta osmolaridad, la motilidad se ve afectada.

La motilidad fue mantenida por más tiempo en salinidades altas (20 y 25‰) que en agua dulce; lo que nos indica que el agua dulce no es un diluyente adecuado para el esperma del pez blanco.

Las soluciones salinas han mostrado que maximizan la motilidad espermática y consecuentemente las tasas de fertilización en peces de agua dulce como los salmónidos (Billard *et al.*, 1974), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Guest *et al.*, 1976) y carpa común (*Cyprinus carpio*) (Billard *et al.*, 1986). El efecto favorable de las soluciones salinas puede deberse a la acción protectora de las condiciones

isomólicas, las cuales ayudan a prevenir la entrada excesiva de agua y por consecuencia la ruptura la membrana plasmática del espermatozoide (Morisawa *et al.*, 1983; Billard, 1978).

Se ha visto que los espermatozoides de *M. estor* no tienen problema alguno con la salinidad y que por el contrario requieren de esta para tener un mejor desempeño. En otras especies de peces también se han reportado los beneficios de la salinidad en la producción de esperma como en caso del Arenque del Ártico (*Salvelinus alpinus*), en el cual se encontró que la salinidad fue un factor clave para asegurar la reproducción de los machos, ya que cuando estos se encontraban en agua marina presentaban un mayor número de espermatozoides y una osmolaridad mas alta que la del plasma seminal (Atse *et al.*, 2002).

6.5. Efecto de la salinidad en la fertilización

La tolerancia de los huevos de *M. estor* fertilizados en diferentes salinidades no fue buena ya que el porcentaje de fertilización de los huevos disminuyó conforme se incrementaba la salinidad; mientras que en las salinidades más altas (20, 25 y 30‰) no se registró fertilización alguna (Fig.16).

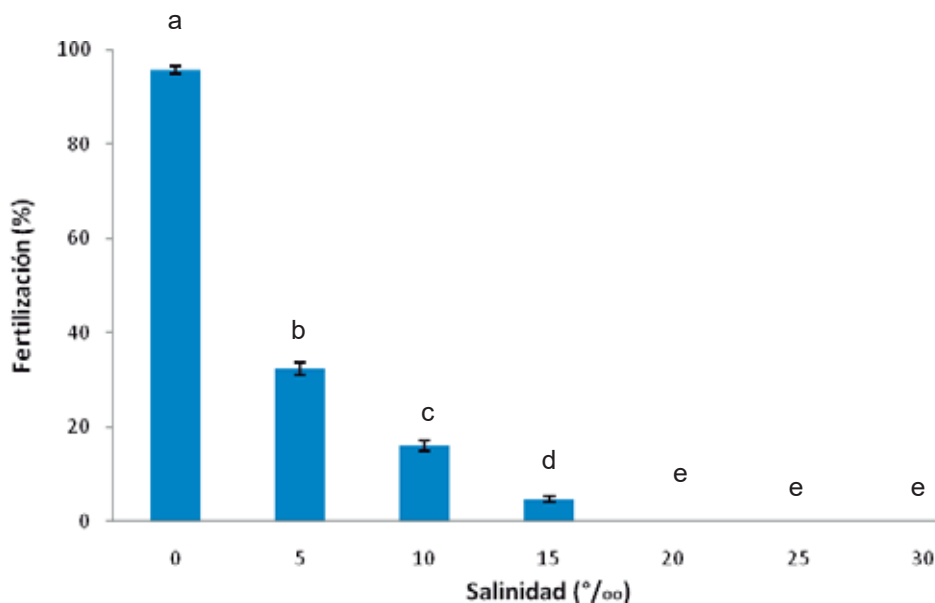


Figura 16. Porcentaje de fertilización con diferentes concentraciones salinas.

Se encontró que existe una correlación negativa entre el porcentaje de fertilización y la salinidad con un valor de coeficiente de correlación de -0.81, lo cual nos indica que conforme la salinidad en el medio se va incrementando, el porcentaje de fertilización va disminuyendo (Fig. 17).

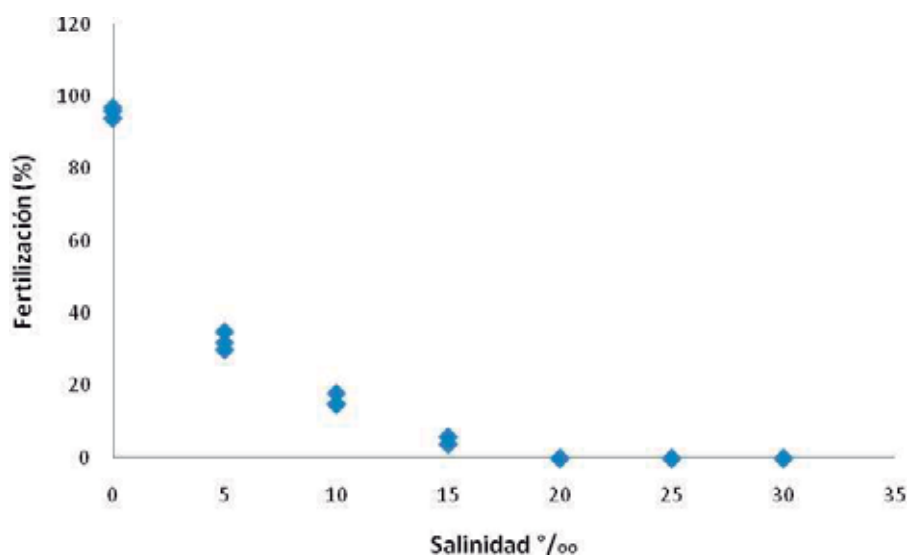


Figura 17. Correlación entre la salinidad y el porcentaje de fertilización.

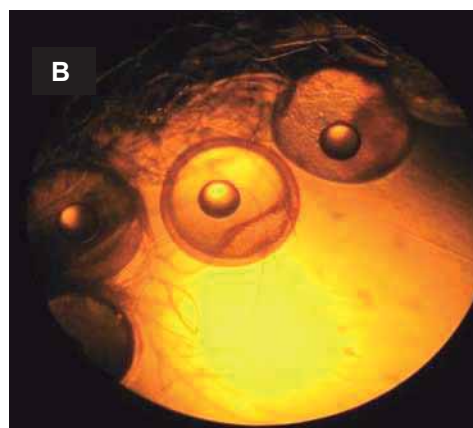
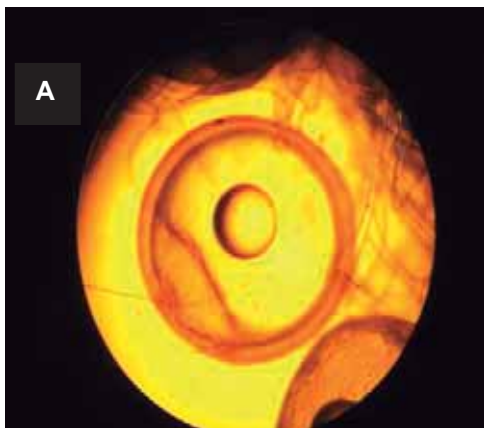
El mayor porcentaje de fertilización se registró en la salinidad de 0‰ (agua dulce) con un 95.66%; al momento de incrementar la salinidad a 5‰ el porcentaje de fertilización disminuyó considerablemente a 32.33%, posteriormente a 10‰ el porcentaje de fertilización fue de 16%, en la salinidad de 15‰ el porcentaje de fertilización fue de 4.66% y finalmente en las salinidades de 20, 25 y 30‰ no hubo fertilización (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de fertilización a diferentes salinidades en *M. estor*.

Salinidad	% Fertilización
0	95.66 ± 0.88
5	32.33 ± 1.44
10	16.0 ± 1
15	4.66 ± 0.66
20	0
25	0
30	0

Se puede observar que conforme se incrementa la salinidad el porcentaje de fertilización disminuye (Fig. 16), esto probablemente puede deberse a que el ovocito al encontrarse en salinidades más elevadas se enfrenta a un medio más agresivo para el y por lo tanto comienza a perder agua y por lo tanto a secarse lo que propicia a su vez que el micrópilo se cierre y que las posibilidades de fertilización sean muy bajas.

Durante el proceso de fertilización que se llevó a cabo, en el cual todos los huevos fueron incubados en agua dulce, se observó que los huevos se infectaron rápidamente con *Saprolegnia*, esta infección fue mayor en aquellos huevos que se fertilizaron con salinidad esto debido a hubo un mayor número de ovocitos no fertilizados (Fig. 18). Por otro lado en trabajos realizados en la misma especie (*M. estor*) se encontró que la salinidad es útil para evitar el ataque de los huevos con *Saprolegnia* (salinidad por arriba de 10‰). Además la salinidad tuvo un efecto importante en el porcentaje de huevos oculados con un máximo registrado a 10‰; en altas salinidades el porcentaje de huevos oculados se redujo marcadamente. En salinidades por arriba de 15‰ los huevos se encontraban en un medio osmóticamente adverso, lo que resultó en altas mortalidades. Por el contrario el agua dulce tuvo un efecto benéfico en la eclosión, el cual se reflejo en el alto porcentaje de eclosión, lo que indica que los huevos pierden progresivamente la capacidad para soportar el estrés osmótico por arriba de 15 ‰ (Martínez-Palacios *et al.*, 2004).



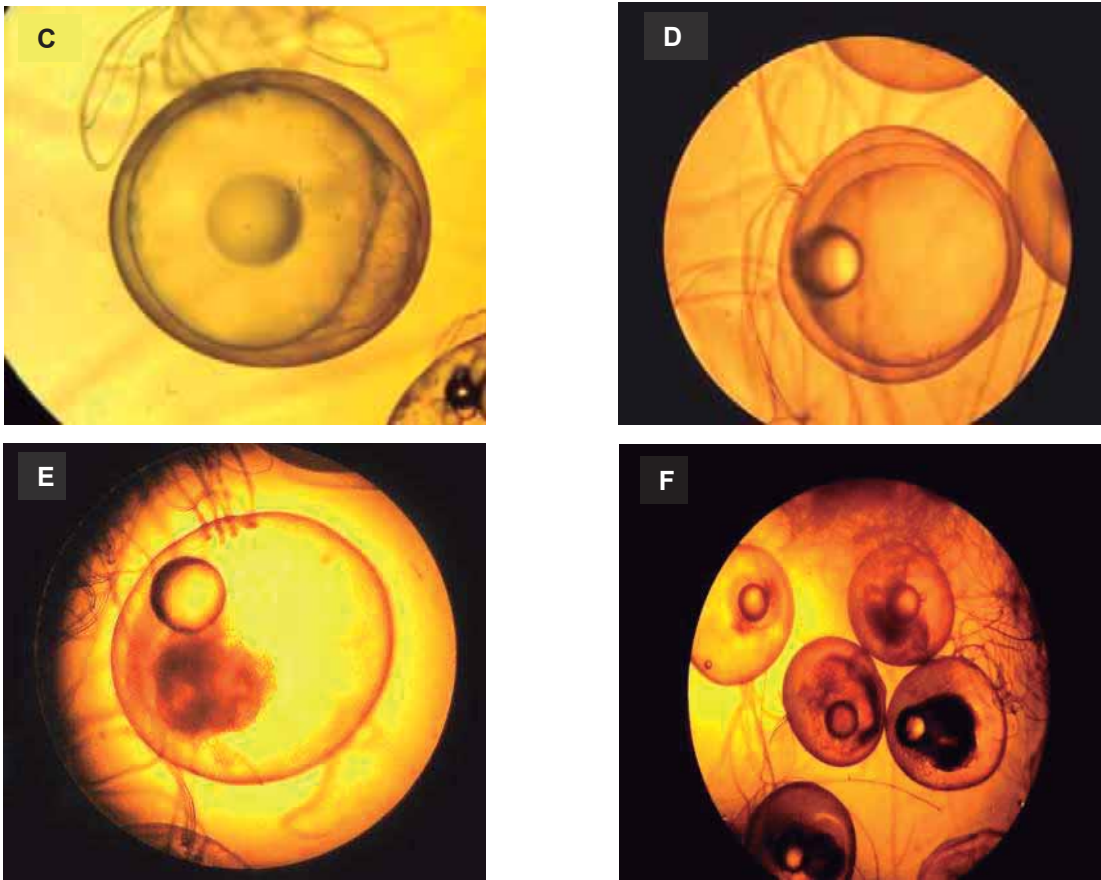


Fig. 18. A, B, C y D, huevos de *M. estor* fertilizados; E y F, huevos no fertilizados y atacados por *Saprolegnia* sp.

Tsuzuki *et al* (2000) mostro que las especies de atherínidos como *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835) y *O. hatcheri* (Eigenmann 1909) son eurihalinos, aunque las más altas tasas de eclosión fueron obtenidas en salinidades intermedias (5 a 20‰).

Aunque la mayoría de los miembros de la familia de los Atherinidos son marinos (Bera, 1981) muchos son eurihalinos y este caso aplica al pez blanco, incluso después de muchos años de aislamiento en ambientes de agua dulce.

Las observaciones hechas en este estudio muestran que *M. estor* es una especie que tiene problemas para reproducirse en ambientes que contengan salinidad, por lo que el proceso de fertilización es más efectivo en agua dulce.

Haynes (1940) y Holliday (1969) encontraron que antes del desove de los gametos de los teleósteos, estos gametos son isosmóticos o hiposmóticos al fluido del cuerpo de los padres. Como se mencionó anteriormente, la mortalidad de los huevos registrada en las salinidades más altas puede ser atribuida a la deshidratación de estos.

Las especies que invierten parte de su vida en agua marina y posteriormente migran a agua dulce para la reproducción, la salinidad del agua durante la estación reproductiva puede afectar de manera significativa el proceso reproductivo. En el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) las hembras que permanecen en agua salada durante la estación reproductiva retardan o bloquean la ovulación (Haffray *et al.*, 1995). Sin embargo, los ovocitos puestos por la hembra y mantenidos en agua marina y agua dulce presentan tasas de ovulación similares. En contraste, cuando los ovocitos son fertilizados dos semanas después de la ovulación, la calidad de los ovocitos se ve significativamente reducida en los ovocitos puestos por hembras mantenidas en agua marina. Estudios en el Salmon *Oncorhynchus kisutch*) muestran un resultado similar (Sower *et al.*, 1982). Otro estudio mostró que en hembras de Salmón (*O. kisutch*) y Salmón rosa (*Oncorhynchus gorbuscha*) capturadas en estuarios o agua dulce y colocadas en agua marina presentan una limitada pero significativa disminución en el porcentaje de ovulación (Werthemer, 1984).

Existen trabajos de salinidad que se han realizado en ovocitos de *M. estor*, en este trabajo los ovocitos una vez que fueron fertilizados se colocaron en distintas salinidades (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30‰), los resultados que se encontraron muestran un patrón similar al reportado en el presente trabajo, los huevos mantenidos en agua dulce y en las salinidades más bajas (5 y 10‰) presentaron el mayor porcentaje de ovulación (superior al 80%), por lo tanto se puede decir que el desarrollo de huevos oculados fue mayor en agua dulce que en salinidades (Martínez-Palacios *et al.*, 2004). Los porcentajes de ovulación reportados en este trabajo son superiores a los porcentajes de fertilización que se obtuvieron en este trabajo para el pez blanco en las distintas salinidades, pero cabe mencionar que el ovocito una vez que es

fertilizado despliega una serie de reacciones corticales dentro de las que se encuentran la formación de una membrana de fecundación, la cual impide la polispermia, además de que esta reacción cortical provoca que el corion del huevo se modifique de manera que se hace más resistente al medio exterior.

En especies de agua dulce como el bagre africano (*Heterobranchus longifilis*) se evaluó el efecto de distintas concentraciones salinas (0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12, 13.5 y 15‰) sobre el porcentaje de eclosión y se encontró que el porcentaje de huevos eclosionados e incubados a 3 ‰ de salinidad fue de 75%, y en las salinidades de 1.5 y 0‰ fue de 74 y 71% respectivamente. A 4.5‰ de salinidad la tasa de eclosión fue de 53%, mientras que a 6 y 7.5‰ fue de 45 y 41% respectivamente, sin embargo en las salinidades de 9, 10.5, 12, 13.5 y 15‰, no se observó eclosión (Fascina-Bombata y Busari, 2003).

En la platija (*Rhombosolea tapirina*) un pez marino, la tasa de fertilización de los huevos fue significativamente afectada por la salinidad. En esta especie la salinidad óptima para la fertilización estuvo entre 35-45‰, mientras que a bajas salinidades el porcentaje fue menor (Hart y Purser, 1995).

Estudios realizados en el cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) con soluciones salinas de 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 y 64‰ muestran que los huevos mantenidos a 32 ‰ de salinidad presentan la mejor tasa de eclosión (80.7%), cabe mencionar que los ovocitos fueron fertilizados a una salinidad de 40‰ y posteriormente incubados en las salinidades. Los huevos mantenidos en salinidades de 0 y 64‰ tuvieron una tasa de eclosión de 0 (Gracia-López *et al.*, 2004).

En el lenguado brasileño (*Paralichthys orbignyanus*) se probaron distintas soluciones salinas (10, 15, 25 y 30 ‰) con las cuales fueron fertilizados los ovocitos y se encontró que los huevos fueron fertilizados en un intervalo de salinidad de 15 a 35‰. La tasa de fertilización estuvo directamente relacionada con la salinidad,

aunque la tasa más baja de fertilización se obtuvo a 15‰, pero no se encontraron diferencias significativas entre las salinidades de 25 y 35‰ (Sampaio *et al.*, 2007).

En el sargo dorado (*Sparus sarba*) se probaron 12 salinidades, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 y 52‰ de salinidad en la incubación de los huevos, en el cual se encontró entre 20 y 36‰ (Mihelakakis, A y Kitajima, C. 1994).

En el sigano rayas doradas (*Siganus guttatus*), la incubación de los huevos en diferentes salinidades (4, 8, 16, 24, 32, 40, 50, 58, 66, 72, 78, 86 y 95‰) se encontró que la mejor salinidad para la incubación estuvo entre 7- 77‰ con un 90% de los huevos eclosionados, encontrándose que a salinidades muy elevadas de 95‰, al colocar los huevos fertilizados a incubar en esta salinidad, inmediatamente comenzaban a morir, al igual que a 78 y 86‰ (Young y Dueñas, 1993).

La salinidad no solo tiene un efecto sobre la tasa de fertilización o eclosión en los peces, sino que también interviene en

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento de motilidad espermática en el que se demuestra que la salinidad no afecta a la motilidad espermática, sino que por el contrario le resulta benéfica, en el momento de la fusión de los gametos en distintos ambientes salinos los porcentajes de fertilización disminuyen a medida que la salinidad se incrementa, de manera que posiblemente las bajas tasas de fertilización que se presentan en salinidades se deben a un problema que existe con los ovocitos del pez blanco para mantenerse viables en soluciones salinas, tal vez debido a que el ovocito experimenta una serie de reacciones al momento de encontrarse en un medio que le resulta agresivo y por ello no logre ser fertilizado por el espermatozoide.

Debido a cuestiones de manejo para que se lleve a cabo el desove de las hembras y por consecuencia la fertilización de los ovocitos los reproductores deben mantenerse en un medio libre de salinidad ya que si esto no sucede las hembras no

desovan o si lo llegan a hacer, los ovocitos no son fertilizados por lo que debido a los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda que la fertilización se lleve a cabo en un intervalo de salinidad de 0- 5‰ para asegurar un mayor porcentaje de fertilización.

6.6. Proporción espermatozoide/ovocito

La fertilización artificial es un requisito para optimizar el uso de gametos viables en las granjas de cultivo de peces. La determinación de la proporción mínima de espermatozoide/huevo nos permite la fertilización de todos los huevos. El establecimiento de una tasa óptima puede ser útil para lograr tener éxito en el proceso de fertilización. El espermatozoide de los peces tiene una mínima posibilidad de alcanzar el micrópilo y fertilizar el ovocito debido a la presencia de solamente un micrópilo en la superficie del ovocito, así como de la corta trayectoria del espermatozoide en comparación con el diámetro del ovocito (Billard, 1992); sin embargo, el número de espermatozoides necesarios para fertilizar con éxito un ovocito es relativamente alto.

El número de espermatozoides por ovocito puede ser incrementado cuando se han observado factores que pueden reducir la calidad del espermatozoide, tales como la contaminación por orina, contaminación por agua.

Diferentes proporciones de espermatozoide/ovocito han sido sugeridas para diferentes especies (Tabla 9).

Tabla 9. Proporción óptima espermatozoide/ovocito en algunas especies de teleosteos.

Especie	Espermatozoides por ovocito	Referencia
Lucio europeo (<i>Esox lucius</i> L.)	2.6×10^4	Erdhal y Gram., 1987
Trucha café (<i>Salmo trutta</i> L.)	4.3×10^4	Erdhal y Gram., 1987
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	6×10^3	Suquet <i>et al.</i> , 1995
Bagre asiático (<i>Clarias macrocephalus</i> Günther)	$4-8 \times 10^3$	Tambassen-Cheong <i>et al.</i> , 1995

Bagre africano (<i>Clarias gariepinus</i>)	1.5 x 10 ⁴	Rurangwa <i>et al.</i> , 1998
Lamprea marina (<i>Petromyzon marinus</i>)	5.0 x 10 ⁴ – 1.0 x 10 ⁵	Cierieszko <i>et al.</i> , 2000
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	8.5 x 10 ³	Linhart <i>et al.</i> , 2003
Bagre europeo (<i>Silurus glanis</i> L)	8 x 10 ²	Linhart <i>et al.</i> , 2004
Walleye (<i>Sander vitreus</i>)	2.5x10 ⁴	Rinchard <i>et al.</i> , 2005
Bacalao del Atlántico (<i>Gadus morhua</i> L.)	1.0 x 10 ⁵	Butts <i>et al.</i> , 2009
Pez blanco (<i>Menida estor</i>)	5.1x 10 ⁵	Presente trabajo

Nuestros resultados muestran que a medida que se incrementa la proporción esperma/ovocito, el porcentaje de fertilización también aumenta (Fig. 19). De acuerdo a los resultados obtenidos existe diferencia significativa en las proporciones de esperma/ovocito utilizadas, las proporciones de 1.74 x 10⁴ nos dan porcentajes de fertilización bajos (20%); en cambio en proporciones mayores (3.48 x 10⁵, 5.22 x 10⁵ y 8.70 x 10⁵) los porcentajes de fertilización son mejores (90%).

En las proporciones mayores no se encontró diferencia significativa, por lo que podemos utilizar lo que se decidió utilizar la proporción de 5.22 x 10⁵, para asegurar la máxima fertilización y evitar el uso excesivo de esperma. Cabe mencionar que la calidad del esperma puede variar entre los machos o que tal vez pueda existir una ligera contaminación del esperma con orina, pero incluso aunque el esperma tenga una calidad baja puede contener suficientes espermatozoides viables para producir altas tasas de fertilización.

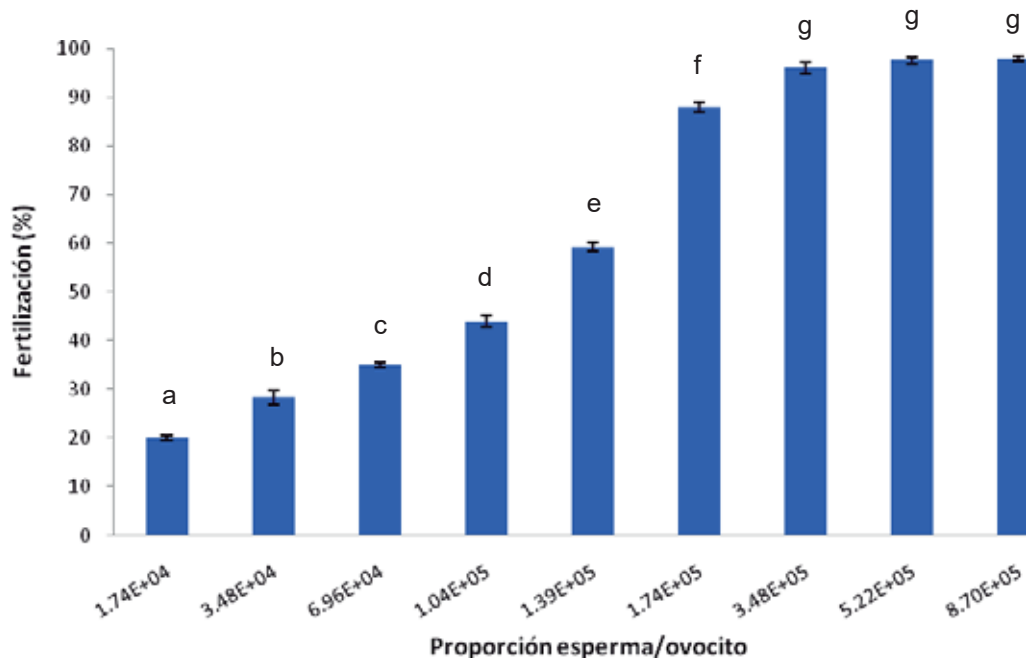


Figura 19. Fertilización con distintas proporciones esperma/ovocito.

El número de espermatozoides para fertilizar un ovocito es relativamente alto, este elevado número de espermatozoides es necesario ya que cada ovocito presenta un punto único para la penetración del espermatozoides, que es el micrópilo, y debido a esto el espermatozoide tiene muy pocas posibilidades de alcanzar el micrópilo si la concentración espermática es muy baja (Billard, 1988).

La proporción esperma/ovocito encontrada para el pez blanco es muy elevada, en comparación con otras especies de peces (Tabla 8), lo cual nos podría indicar que el pez blanco presenta una baja capacidad fertilizadora debida a la corta duración de la motilidad espermática ya que la fertilización se llevo a cabo en agua dulce y este medio no es muy benéfico para los espermatozoides.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir:

La mejor dilución para realizar el conteo de los espermatozoides fue la dilución de 1:500.

El volumen de esperma producido en el pez blanco presentó grandes variaciones entre los organismos en un intervalo de 11-101 μ l. A pesar de las variaciones observadas entre las muestras, se encontró que existe una correlación muy baja entre la producción de esperma y la talla de los peces, esto debido como ya se mencionó a la gran variación en cuanto a volumen que presentaron los machos.

Los tres tamaños de peces que se utilizaron en este trabajo (CH: 21.66 - 30.68, M: 39.09 - 50.99, G: 51.77 - 75.30 g) no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto a la concentración espermática, con un intervalo de 2.21–2.55 $\times 10^9$ espermatozoides por mililitro. Cabe mencionar que la concentración espermática en esta especie es baja en comparación con otras especies de peces (Tabla 4). La concentración espermática en el pez blanco no muestra variación significativa entre los tamaños muestreados; de manera que para análisis futuros se puede elegir cualquier tamaño de pez sin el riesgo de algún cambio en la concentración espermática, pero teniendo en cuenta que existe una tendencia en los peces de menor tamaño de presentar concentraciones espermáticas mayores.

Con respecto a la vitalidad espermática se encontró que el 92.14 ± 1.14 % de los espermatozoides del pez blanco se encuentran vivos y con la capacidad de ser activados, ya que su membrana plasmática se encuentra intacta y libre de daños. En el caso de los espermatozoides teñidos, estos también están vivos, solo que su viabilidad es limitada.

En cuanto a la activación de la motilidad espermática con las distintas concentraciones salinas se encontró que los espermatozoides de pez blanco al activarse con agua dulce (25 mOsmol^{-1}), el agua provoca una reducción en el tiempo y porcentaje de espermias móviles; en cambio al activar los espermatozoides con las soluciones salinas de 5, 10, 15, 20, 25‰ ($150, 280, 445, 575$ y $725 \text{ mOsmol K}^{-1}$) respectivamente, la motilidad se prolongó por más tiempo. En cambio, al activar los espermatozoides con 30‰, el comportamiento de la motilidad en esta salinidad fue muy similar al de 5‰. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que a medida que se incrementa la salinidad y por consiguiente la presión osmótica en el medio de dilución, la motilidad espermática se incrementa, lo que los espermatozoides del pez blanco se comportan más como los de un pez marino que como los de un pez de agua dulce ya que incrementan su periodo de motilidad en respuesta a un medio hiperosmótico, lo que no sucede con la mayoría de las especies de agua dulce.

El efecto de la salinidad en el proceso de fertilización no fue muy exitoso, ya que a medida que la salinidad del medio se incrementó, el porcentaje de fertilización disminuyó drásticamente, encontrándose que en salinidades de 0‰ (agua dulce) el porcentaje de fertilización fue de 95.66 ± 0.88 , en 5 ‰ fue de 32.33 ± 1.44 , en 10‰ fue de 16.0 ± 1 , en 15‰ fue de 4.66 ± 0.66 y en las salinidades de 20, 25 y 30‰, el porcentaje de fertilización fue de 0%. Al parecer existe un problema con los ovocitos del pez blanco en el medio salino, ya que los espermatozoides no presentan inconvenientes en salinidades, la reacción de los ovocitos ante el incremento de la salinidad en el medio puede resultar probablemente en un desecamiento del ovocito debido a la elevada presión osmótica que el medio ejerce sobre el.

La proporción espermatozoide/ovocito encontrada en este estudio nos indica que para conseguir obtener el mayor porcentaje de fertilización se requiere de una proporción espermatozoide/ovocito de 5.1×10^5 ; que en comparación con otras especies de peces resulta ser mayor, lo cual nos podría que posiblemente el pez blanco presenta una baja capacidad fertilizadora debida posiblemente a la activación insuficiente de

los espermatozoides ya que la fertilización se llevo a cabo en agua dulce y este medio no es muy benéfico para los espermatozoides.

RECOMENDACIONES

- Debido a que en este trabajo no se evaluó la correlación del espermatozoides con la densidad espermática se recomienda repetir el experimento para determinar si existe algún tipo de correlación entre estos dos.
- Con respecto a la fertilización con diferentes salinidades, se sugiere realizar más pruebas de fertilización con las mismas salinidades e incluso utilizar salinidades menores a 5‰ y su efecto en la fertilización.
- Evaluar el efecto de la salinidad en la supervivencia de las larvas fertilizadas con las diferentes salinidades.
- Evaluar si existe alguna variación en la producción de esperma durante la estación reproductiva.

LITERATURA CITADA

Alavi, S. M. H y J. Cosson. 2005. **Sperm motility in fishes. I. Effects of pH and temperature.** *Cell Biology International* 29: 101-110.

Alavi, S. M. H y J. Cosson. 2006. **Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality.** *Cell Biology International* 30: 1-14.

Alavi, S. M. H., M. Rodina, T. Policar, P. Kozak, M. Psenicka y O. Linhart. 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: 276-283.

Alavi, S. M. H., O. Linhart, K. Coward y M. Rodina. 2007a. **Fish spermatology: implications for aquaculture management.** En: Alavi S, M, H, J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee (Ed.) **Fish Spermatology.** Alpha Science Ltd. Oxford. pp. 397-461.

Andrade, R. F., N. Bazzoli, E. Rizzo y Y. Sato. 2001. **Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:characidae).** *Tissue and Cell* 33: 524-532.

Aas, G. H., T. Refstie y B. Gjerde. 1991. **Evaluation of milt quality of Atlantic salmon.** *Aquaculture* 95: 125-132.

Atse, C. B., C. Audet y J. Moüe. 2002. **Effects of temperature and salinity on the reproductive success of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). egg composition, milt characteristics and fry survival.** *Aquaculture research* 33: 299-309.

Bath, R. N y F. B. Eddy. 1979. **Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water.** *Journal of experimental biology* 83: 193-202.

Bardach, J. E., J. H. Ryther y W. O. Mc-Larney. 1972. **Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater And marine organism.** John Wiley and Sons, Inc. USA. 868 pp.

Baynes, S. M., A. P. Scott y A. P. Dawson. 1981. **Rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility.** *Journal Fish Biology* 19: 259-267.

Bekkevold, D., M. M. Hansen y V. Loeschcke. 2002. **Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua* L.)**. *Molecular Ecology* 11: 91-102.

Bera, T. M. 1981. An Atlas of Distribution of the Freshwater Fish Families of the World. University of Nebraska Press, Lincoln. 197 pp.

Billard, R., J. Petit, B. Jalabert y D. Szollosi. 1974. **Artificial insemination in trout using a sperm diluant**. En: J. H. S. Blaxter (Ed.) **The Early Life History of Fish**. Springer-Verlag, Berlín. pp. 715-723.

Billard, R. 1978. **Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities**. *Aquaculture* 14: 187-198.

Billard, R., J. L. Gatty, M. G. Hollebecq, J. Marcel y A. Sadd. 1986. **Biology of gametes, eggs, and embryos**. En: Billard, R, J. Marcel (Ed.) **Aquaculture of Cyprinids**. INRA. Paris. pp. 151-164.

Billard, R. 1986. **Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species**. *Reproduction Nutrition Development* 26: 877-920.

Billard, R. 1988. **Artificial insemination and gamete management in fish**. *Marine Behavior Physiology* 14: 3-21.

Billard, R y J. Cosson. 1988. **Sperm motility in Rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature**. En: Breton B, Y. Zohar (Ed.) **Reproduction in fish Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics**. INRA, Paris. pp. 161-167.

Billard, R. 1990. **Spermatogenesis in teleost fish**. En: Lamming, G. E (Ed.) **Marshall's Physiology of Reproduction**. Vol. II. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 183-212.

Billard, R. 1992. **Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology, and preservation of gametes**. *Aquaculture* 100: 263-298.

Billard, R. y J. Cosson. 1989. **Measurement of sperm motility in trout and carp**. *Aquaculture* 132: 499-503.

Billard, R. y J. Cosson. 1992. **Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fishes.** *Journal of Experimental Zoology* 261: 122-131.

Billard, R., J. Cosson y L. W. Crin. 1993. **Motility and survival of halibut sperm during short term storage.** *Aquatic Living Resource* 6: 67-75.

Billard, R. y J. Cosson. 1995. **Sperm physiology and Quality.** En: Bromage, N y R. Roberts (Ed.) **Broodstock Management and egg and larval quality.** Blackwell Sciences. Ltda. Cambridge. 414 pp.

Billard, R., J. Cosson, L. W. Crimm y M. Suquet. 1995. **Sperm physiology quality.** En: Bromage, N. y R. J. Roberts (Ed.) **Bloodstock Management and Egg and Larval Quality.** Blackwell Science. UK. pp. 424.

Billard, R., J. Cosson, G. Perchec y O. Linhart. 1995. **Biology of sperm and artificial reproduction in carp.** *Aquaculture* 129: 95-112.

Billard, R., O. Linhart, F. Fierville y J. Cosson. 1997. **Motility of european catfish *Silurus glanis* spermatozoa in testes and milt.** *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 44:115-122.

Björndahl, L., I. Söderlund y U. Kvist. 2003. **Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment.** *Human Reproduction* 18: 813-816.

Bromage, N. R y R. J. Roberts. 1995. **Broodstock Management and Egg and Larval Quality.** Blackwell Science Ltd. Oxford, 429 pp.

Butts, I. A. E., E. A. Tripel y M. K. Litvak. 2009. **The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L.** *Aquaculture* 286: 89-94.

Buyukhatipoglu, S y W. Holtz. 1984. **Sperm output in rainbow (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females.** *Aquaculture* 37: 63-71.

Campos-Mendoza, A., J. C. Chávez-Sosa, V. O. Santoyo-Guzmán, C. A. Martínez-Palacios y L. G. Ross. 2004. **The effect of photoperiod on reproduction of pez blanco (*Chirostoma estor estor*) of Lake Pátzcuaro.** Jornadas del Pejerrey, IIB.INTECH, Chascomús, Argentina.

Chao, H. N., C. T. Tsai, W. Hsu y T. T. Linn. 1987. **The properties of tilapia sperm and its cryopreservation.** *Journal of Fish Biology* 30: 107-118.

Cherenguini, O., I. García de la Banda, I. Rasines y A. Fernandez. 1999. **Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*: different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio.** *Aquaculture* 30: 319-324.

Chimits, L. 1955. **Tilapia and its culture.** FAO. *Fish Bulletin* 8: 1-33.

Christ, S. A., G. P. Toth, H. W. McCarthy, J. A. Torsella y M. K. Smith. 1996. **Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA).** *Journal of Fish Biology* 48: 1210-1222.

Christen, R., J. L. Gatti y R. Billard. 1987. **Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement.** *European Journal of Biochemistry* 166: 667-671.

Cierieszko, A y K. Dabrowski. 1993. **Estimation of sperm concentration of rainbow trout , whitefish and yellow perch using spectrophometric technique.** *Aquaculture* 109: 367-373.

Cierieszko, A., J. Glogowski y K. Dabrowski. 2000. **Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes.** En: Tiersch, T.R. y P.M. Mazik (Ed.) **Cryopreservation in Aquatic Species.** World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. pp. 20-48.

Cierieszko, A. y K. Dabrowski. 2002. **Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea lamprey spermatozoa.** *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 193-202.

Clearwater, S. J y L. W. Crim. 1998. **Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasmaph and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*.** *Fish Physiology Biochemical* 19: 349-357.

Cosson, M. P., R. Billard, J. L. Gatti y R. Christen. 1985. **Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy.** *Aquaculture* 46: 71-75.

Cosson, J., R. Billard, C. Redondo-Muller y M. P. Cosson. 1991. **In Vitro incubation and maturation of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa.** *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica Monograph* 16: 249-261.

Cosson, M. P., J. Cosson, F. André y R. Billard. 1995. **cAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility-their interaction in membrane deprived models and in live spermatozoa.** *Cell Motile and Cytoskeleton* 14: 424-434.

Cosson, J., R. Billard, C. Cibert, C. Dreanno, O. Linhart y M. Suquet. 1997. **Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis.** *Poliskic Archiwum hydrobiologii* 10: 518-527.

Cosson, J., R. Billard, C. Cibert, C. Dreanno y M. Suquet. 1999. **Ionic factors regulating the motility of fish sperm.** En: Cagnon, C (Ed.) **The Male Gamete: From Basic Knowledge To Clinical Applications.** Cache River Press: 161-186.

Cosson, J., A. L. Groison, M. Suquet y C. Fauvel. 2008a. **Motility characteristics of spermatozoa in cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*).** *Cybium* 32:176-177.

Cosson, J., A. L. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno y R. Billard. 2008b. **Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers.** *Reproduction* 136: 277-294.

Cussac, V. y M. Maggese. 1988. **Effects of salt solutions on the fertilizing ability and activation of gametes in the catfish, *Rhadmia sapo* (Pisces, pimelodidae).** *Revista Brasileira Biological* 48: 203-211.

Cruz-Casallas, P. E., Y. M. Velazco-Santamaria y V. M. Medina-Robles.2006. **Determinación del Espermatozoo y efecto del volumen de la dosis semiente sobre la fertilidad en yamu (*Bricen amazonicus*).** *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19: 140-145.

Darszon, A., P. Labarca, N. Takuya y F. Espinoza. 1999. **Ion channels in sperm physiology.** *Physiological Reviews* 79: 486-502.

Dreano, C., M. Suquet, E. Desbruyeres, J. Cosson, H. Delliou y R. Billard. 1998. **Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*).** *Aquaculture* 169: 247-262.

Dreanno, C., J. Cosson, M. Suquet, C. Cibert, C. Fauvel, G. Dorange y R. Billard. 1999. **Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa.** *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 113-125.

Duplinsky, P. D. 1982. **Sperm motility of northern pike and cahin pickerel at various pH values.** *Transactions of the American Fisheries Society* 111: 768-771.

Elofsson, H., B. G. McAllister, D. E. Kime, I. Mayer y B. Borg. 2003. **Long lasting sticklebacks sperm; is ovarian fluid a key to success in freshwater.** *Journal of Fish Biology* 63: 240-253.

Elofsson, H., K. Van Look, B. Borg, I. Mayer. 2003a. **Influence of salinity and ovarian fluid on sperm motility in the fifteen spinned stickleback.** *Journal of Fish Biology* 63: 1429-1438.

Erdhal, A. W. y E. F. Graham. 1987. **Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking médium.** *Aquaculture* 60: 311-321.

Fashina-Bombata, H. A y A. N. Busari. 2003. **Influence of salinity on the developmental stages of African catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840).** *Aquaculture* 224: 213-222.

Fauvel, C., O. Savoge, C. Dreanno, J. Cosson y M. Suquet. 1998. **Characteristics of sperm of captive seabass (*Dicentrarchus labrax*) in relation to its fertilization potential.** *Journal of Fish Biology* 54: 346-369.

Gallardo, J. M. 2007. **Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal.** *Revista de Investigación Clínica* 59: 42-47.

Gatti, J. K., R. Billard y R. Christen. 1990. **Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: role in the initiation of the sperm motility.** *Journal of Cellular Physiology*. 143: 546-554.

Geffen, A. J y J. P. Evans. 2000. **Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture* 182: 61-71.

Guest, W. C., J. W. Avault, y J. D. Roussel. 1976. **Preservation of channel catfish sperm.** *Transactions of the American Fisheries Society* 3: 469-474.

Goodall, J.A., A. W. Blackshaw y M. F. Capra. 1989. **Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*).** *Aquaculture* 77: 243-250.

Grasioto, Q., J. N. Negrão, E. D. Carvalho y F. Foresti. 2001. **Ultraestructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae).** *Journal Fish Biology* 59: 1494-1502.

Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez y M. Maldonado-García. 2004. **Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*.** *Aquaculture* 237: 485-498.

Gross, M. R. 1996. **Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes.** *Trends in Ecology & Evolution* 11: 92-98.

Haffray, P., A. Fostier, Y. Normant, A. Faure, M. Loir, B. Jalabert, G. Maise y F. Legac. 1995. **Impact of sea-water rearing or fresh-water transfer on final maturation and on gamete quality in Atlantic salmon *Salmo salar*.** *Aquatic Living Resource* 8:135-145.

Hart, P. R y G. J. Purser. 1995. **Effects of salinity and temperature on eggs and yolk sac larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*).** *Aquaculture* 136: 221-230.

Hayes, O. A. 1940. **Excretion, Ionic Regulation and Metabolism.** En; Hoar, W. S, d. J. Randal (Ed.) **Fish Physiology, Vol I.** Academic Press. New York, USA. 294 pp.

He, S. y C. Woods. 2003. **The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass *Morone saxatilis* sperm motility.** *Journal of the World Aquaculture Society* 34: 255-265.

Hines, R y A. Yashov. 1971. **Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil cephalus* Cuvier, a grey mullet.** *Aquaculture* 3:123-129.

Hogendoorn, H y M. Vismans. 1980. **Controlled propagation of the African catfish (*Clarias gariepinus*). II. Artificial reproduction.** *Aquaculture* 21: 39-53.

Holliday, F. G. T. 1969. **Effect of salinity on the eggs and larvae of Teleost.** En: Hoar, W. S, D. J. Randall (Ed.) **Fish physiology.** vol 1. Academic Press. New York. pp. 293-311.

Jenkins, A. J. 2000. **Minimizing microbial contamination of sperm samples.** En: Tiersch, T. R y P. M. Mazik (Ed.) **Cryopreservation in Aquatic Species.** World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. pp. 343-363.

Kime, D. F., K. J. W. Van Look, B. G. McAllister, G. Huyskens, E. Rurangwa y F. Ollevier. 2001. **Computer-assited sperm analysis CASA as a tool for monitoring sperm quality in fish.** *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C: 425-433.

Kime, D. E y H. Tveiten. 2002. **Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish.** *Journal of Fish Biology* 61: 1549-1559.

Kowalski, R. K., P. Hliwa, A. Androsnowska, J. Król, G. J. Dietrich, M. Wojtczack, R. Stabinski y A. Cieresko. 2006. **Semen biology and stimulation of milt production in the European smelt (*Osmerus eperlanus* L.).** *Aquaculture* 261: 760-770.

Krasznai, Z., T. Marian, L. Blakay, R. Gaspar y L. Tron. 1995. **Potassium channels regulate hypo-osmotic- shock - induced motility of common carp *Cyprinus carpio* sperm.** *Aquaculture* 129: 123-128.

Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann y R. Patzner. 1995. **Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch.** *Journal of Fish Biology* 47: 492-508.

Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann y R. Patzner. 1996. **Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism.** *Journal of Fish Physiology and Biochemistry* 15: 167-179.

Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann y R. A. Patzner. 1997a. **Sperm motility and seminal composition in the Turbot (*Lota lota*).** *Journal of Applied Ichthyology* 13: 113-121.

Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann y R. A. Patzner. 1997b. **Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio*.** *Journal of Fish Biology* 50: 564-574.

Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismanu, R. A. Patzner. 1998. **Evaluation of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism.** *Aquaculture* 163: 163-181.

Lahnsteiner, F y R. A. Patzner. 1998. **Sperm motility of the marine teleost *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* y *Trachurus mediterraneus*.** *Journal of Fish Biology* 52: 726-742.

Lahnsteiner, F y R. A. Patzner. 2008. **Sperm morphology and ultrastructure in fish.** En: Alavi, S. M. H, J. Cosson, K. Coward y C. Raffie (Ed.) **Fish spermatology.** Alpha Science. Oxford. pp 1-61.

Leach, B y R. Montgomerie. 2002. **Sperm characteristics associated with different male reproductive tactics in bluegills (*Lepomis macrochirus*).** *Behavioral ecology and sociobiology* 49: 31-37

Levanduski, M. y J. Cloud. 1988. **Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of non-motile sperm on fertility.** *Aquaculture* 75: 171-179.

Lin, F. y K. Dabrowski. 1996. **Characteristics of muskellunge spermatozoa. In: Effects of ions and osmolality on sperm motility.** *Transactions of the American Fisheries Society* 125: 195-202.

Linhart, O., S. D. Mims y W. L. Shelton. 1995. **Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon and paddlefish.** *Journal of Fish Biology* 47: 902-909.

Linhart, O y S. Kudo. 1997. **Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization.** *Journal of Fish Biology* 51: 573-582.

Linhart, O., J. Wolford, B. Sivaloganathan y T. J. Lam. 1999. **Effects of osmolality and ion on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater-and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*.** *Journal of Fish Biology* 55: 1344-1358.

Linhart, O., M. Rodina, D. Gela, M. Kocour y M. Rodríguez. 2003. **Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness.** *Aquatic Live Resource* 16: 450-456.

Linhart, O., M. Rodina, D. Gela y M. Kocour. 2004. **Optimalization of artificial propagation in European catfish, *Silurus glanis* L.** *Aquaculture* 235: 619-632.

Linhart, O., S. M. H. Alavi, M. Rodina, D. Gela y J. Cooson. 2008. **Alter finishing of motility, common carp (*Cyprinus carpio*) sperm is able to re-initiate a second motility period and to fertilize eggs.** *Cybium* 32: 187-188.

Lubzens, E., N. Daube, I. Pekarsky, Y. Magnus, A. Cohen, F. Yusefovich, P. Feigin. 1997. **Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks – strategies in research and application.** *Aquaculture* 155:13-30.

Mares-Báez, L. G y J. J. Morales-Palacios. 2003. **Contribución al estudio del cultivo del pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el Centro Regional de Investigación Pesquera de Pátzcuaro, Michoacán.** En: Rojas Carrillo, P (Ed.) *Historia y avances del cultivo de pescado blanco.* Sagarpa-INP.

Marian, T., Z. Krasznai, L. Balkay, M. Balazs, M. Emri, L. Bene y L. Tron. 1993. **Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 41: 291-297.

Márian, T., Z. Krasznai, L. Balkay, M. Emri y L. Trón. 1997. **Role of extra-and intracellular pH in the sperm motility. Hyperosmosis modifies regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger.** *Cytometry* 27: 374-382.

Martínez-Palacios, C. A., M. J. Comas; J. A. Tello-Ballinas, C. M. Toledo y G. L. Ross. 2004. **The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae).** *Aquaculture* 238: 509-522.

Methven, D. A y L. W. Crim. 1991. **Seasonal changes in spermatocrit, plasma sex steroids, and motility of sperm from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*.** En: Scott, A. P; J. P. Sumpter, D. E. Kime, M. S. Rolfe, M (Ed.). **Proceeding Fourth International Symposium Reproduction physiology Fish,** Sheffield. p. 170.

McMaster, M. E., C. B. Portt, K. R. Munkittrick, D. G. Dixon. 1992. **Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft milt effluent.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 23: 103-117.

Mihelakakis, A y C. Kitajima. 1994. **Effects of salinity and temperature on incubations period, hatching rate, and morphogenesis of the silver sea bream, *Sparus sarba* (Forskál, 1775).** *Aquaculture* 126: 361-371.

Mjølnerod, I. B., I. A. Fleming, U. H. Refseth y K. Hindar. 1998. **Mate and sperm competition during multiple male spawning of Atlantic salmon.** *Journal of Zoology* 76: 70-75.

Morisawa, M., T. Hirano y K. Suzuki. 1979. **Changes in blood and seminal plasma composition of the mature salmon, *O. keta*, during adaptation.** *Compilation Biochemistry Physiology* 64: 325-329.

Morisawa, M y K. Suzuki. 1980. **Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleost.** *Science* 210: 1145-1147.

Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa y K. Yasuda. 1983. **Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes.** *Journal Experimental Biology* 107: 95-103.

Morisawa, S y M. Morisawa. 1986. **Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon.** *Journal Experiment of Biology* 126: 89-96.

Morisawa, S., K. Ishida, M. Okuno y M. Morisawa. 1993. **Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm. Motility during migration from the sea the river in chum salmon.** *Molecular Reproduction and Development* 34: 420-426.

Morisawa, M. 1994. **Cell signaling Mechanisms.** *Zoological Science* 11: 647-662.

Nakatsuru, K y D. L. Kramer. 1982. **Is sperm cheap limited male-fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces, Characidae).** *Science* 216, 753-755.

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World.** 3a. ed. Wiley, J (Ed.) New York. 600pp

Ohta, H., K. Ikeda y T. Izawa. 1997. **Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promotes acquisition of motility in vitro by japanese eel spermatozoa.** *Journal of Experimental Zoology* 277: 171-180.

Papadaki , M., M. Papadopoulou, I. Siggelaki y C. Mylonas. 2008. **Egg and sperm production and quality of sharpnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity.** *Aquaculture* 276: 187-197.

Parker, G. A., M. A. Ball, P. Stockley, y M. J. G. Gage. 1996. **Sperm competition games: individual assessment of sperm competition intensity by group**

spawners. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 263, 1291-1297.

Peinado, B. A., J. G. Poto y S. Ruiz. 1998. **Estudios preliminares en la criopreservación de espermatozoides porcinos de la raza chato murciano** archivos de zootecnia. *Fisiología animal* 47:178-179.

Perchec, G., J. Cosson, F. André y R. Billard. 1993. **Spermatozoa motility of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*)**. *Journal Ichthyology* 9: 129-149.

Perchec, G., C. Jeulin, J. Cosson, F. Abdré y R. Billard. 1995. **Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa**. *Journal of Cell Science* 108:747-753.

Perchec, G., J. L. Gatti, J. Cosson, C. Jeulin, F. Fierville y R. Billard. 1997. **Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa**. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 315-327.

Petersen, C. W. y R. R. Warner. 1998. **Sperm competition in fishes**. En: Birkhead, T. R. y A. P. Moller (Ed.) **Sperm Competition and Sexual Selection**. Academic Press. San Diego. CA. pp.228-226.

Rakitin, A. M., M. Ferguson y E. A. Trippel. 1999. **Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during spawning season**. *Aquaculture* 170: 349-358.

Ravinder, K., K. Nasaruddin, K. C. Majumdar y S. Shivaji. 1997. **Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen**. *Journal of Fish Biology* 50: 1309-1328.

Redondo-Müller, C., M. P. Cosson, J. Cosson y R. Billard. 1991. **In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa**. *Molecular reproduction and Development* 29: 259-270.

Richard, J., K. Dabrowski, J. J. Van Tassell y R. A. Stein. 2005. **Optimization of fertilization success in *Sander vitreus* is influenced by the sperm: egg ratio and ova storage**. *Journal of Fish Biology* 67: 1157-1161.

Rideout, R. M., E. A. Trippel y M. K. Litvak. 2004. **Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock.** *Journal of Fish Biology* 65: 319-332.

Rodríguez, G., M. 1992. **Técnicas de evaluación de la madurez gonádica en peces.** AGT editor, México. 79pp.

Rurangwa, E., I. Roelants, G. Huyskens, M. Ebrahimi, D. E. Kime y F. Ollevier. 1998. **The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*.** *Journal of Fish Biology* 53: 402-413.

Sánchez- Rdodríguez, M. Y R. Billard. 1977. **Conservation de la motility et du pouvoir fecondant du sperme de truite arc en ciel maintenu a des temperatures voisines de 0°C.** *Bull. Fran. Piscic.* 265: 143-152.

Sampaio, L. A., L. S. Freitas, M. H. Okamoto, L. R. Louzada, R. V. Rodrigues y R. B. Robaldo. **Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement.** *Aquaculture* 262: 340-346.

Schärer, L. y D. R. Robertson. 1999. **Sperm and milt characteristics and male y female gametic investment in the Caribbean reef fish, *Thalassoma bifasciatum*.** *Journal of Fish Biology* 55:329-343.

Scheuring L. 1925. **Biologische und physiologische untersuchungen am Forellen sperma.** *Archive of Hydrobiology* 4: 187-318.

Scott, A. P y S. M. Baynes. 1980. **A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa.** *Journal of Fish Biology* 17: 707-739.

Stoss, J. 1983. **Fish gamete preservation and spermatozoan physiology.** En: Hoar, W.S, D. J. Randall y E.M. Donaldson (Ed.) *Fish Physiology.* Academic Press. New York. pp. 305-350.

Strüssman, C. A., P. Renard, H. Ling y F. Takashima. 1994. **Motility of Pejerrey *Odontesthes bonariensis* Spermatozoa.** *Fisheries Science* 60: 9-13.

Suquet, M., M. H. Omnes, Y. Normant, C. Fauvel. 1992. **Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*).** *Aquatic Fish Management* 23: 217-225.

Suquet, M., R. Billard, J. Cosson, Y. Normant y C. Fauvel. 1995. **Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact.** *Aquaculture* 133: 83-90.

Sower, S. A., C. B. Schreck, E. M. Donaldson. 1982. **Hormone induced ovulation of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) held in seawater and fresh water.** *Journal Fish Aquatic Science* 39: 627-632.

Taborsky, M. 1998. **Sperm competition in fish: “bourgeois” males and parasitic spawning.** *Trends Ecology* 13: 222-227.

Tambassen-Cheng, M. V. T., J. D. Tan-Fermin, L. M. B. Garcia y R. B. Valdevarona. 1995. **Milt-egg ratio in artificial fertilization of the Asian freshwater catfish (*Clarias macrocephalus*) injected salmon gonadotropin-releasing hormone and domperidone.** *Aquatic Live Resource* 8: 303-307.

Toth, G. P., S. A. Christ, H. W. Mc Carthy, J. A. Torsella y M. K. Smith. 1995. **Computer-assisted motion analysis of sperm from the common carp.** *Journal of Fish Biology* 47: 986-1003.

Toth, G. P., A. Ciereszko, S. A. Christ, K. Dabrowski. 1997. **Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions.** *Aquaculture* 154: 337-348.

Tsuzuki, M. Y., H. Aikawa, C. A. Strussman y F. Takashima. 2000. **Comparative survival and growth of embryos, larvae and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatchery* at different salinities.** *J. Appl. Ichtyol.* 16: 126-130.

Tvedt, H. B., T. J. Benfey, D. J. Martin-Robichaud y J. Power. 2001. **The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*.** *Aquaculture* 194: 191-200.

Vekkevold, D., M. M. Hansen y V. Loeschcke. 2002. **Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*, L.).** *Molecular Ecology* 11: 91-102.

Viveiros, A. T. M., A. Jatzkowski y J. Komen. 2003. **Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*).** *Theriogenology* 59: 1905-1917.

Vladic, T.V y T. Järvi. 1997. **Sperm motility and fertilization time spawn in Atlantic salmon and brown trout: the effect of water temperature.** *Journal of Fish Biology* 50: 1088-1093.

Vladic, T.V, B. A. Afzelius, G. E. Bronnikov. 2002. **Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories.** *Biology of Reproduction* 66: 98-105.

Wee, Z. E y T. J. Lam. 1996. **Effect of acclimation of *Oreochromis mossambicus* broodstock at various salinities on their eggs and sperm.** En: *Proceedings of Science Research Congress 1995*, Singapore, Republic of Singapore: National University of Singapore. pp 222-234.

Werthemer, A. C. 1984. **Maturation success of Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) and Coho salmon (*O. kisutch*) held under three salinity regimes.** *Aquaculture* 43: 195-212.

Williot, P., E. F. Kopeika y B. F. Goncahro. 2000. **Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultures Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt).** *Aquaculture* 189: 53-61.

Wirtz, S y P. Steinmann. 2006. **Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L.** *Journal of Fish Biology* 68: 1896-1902.

Yeganch, S., B. Mojazi-Amiri y S. M. H. Alavi. 2008. **Motility of *Mugil cephalus* L. spermatozoa in celomic fluid, seminal fluid and saline media.** *Journal Applied Ichthyology* 24: 517-518.

Young, P. S. y C. E. Dueñas. **Salinity tolerance of fertilized eggs and yolk-sac larvae of the rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch).** *Aquaculture* 112: 363-377.

