

# L'INSEMINATION ARTIFICIELLE DE LA TRUITE *Salmo Gairdneri* Richardson

## IV - Effets des ions $K^+$ et $Na^+$ sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes

R. BILLARD

avec la collaboration technique de Anne-Marie ESCAFFRE et Pierrette REINAUD

Laboratoire de Physiologie des Poissons  
Institut National de la Recherche Agronomique  
78350 — JOUY-EN-JOSAS

---

### RESUME

L'expérimentation a consisté :

1°) à diluer avant insémination le sperme ou les ovules dans des dilueurs (dNa-K) constitués de quantités variables de KCl et NaCl (Tableau 1) ou  
2°) à pratiquer l'insémination directement dans ces mêmes dilueurs. Après insémination et avant transfert en eau douce, les gamètes peuvent être laissés simplement dans le dNa-K (*technique de simple dilution*). On peut aussi ajouter le dilueur d'insémination standard (dNa : dilueur n° 1, tableau 1) (*technique de double dilution*).

Après dilution les spermatozoïdes restent immobilisés lorsque la concentration en KCl du dilueur dépasse 10 mmol/l. Cette immobilisation est réversible pour des concentrations en KCl comprises entre 10 et 30 mmol/l. Au contraire la fécondabilité des ovules est légèrement diminuée lorsque la concentration en KCl du dilueur atteint 10 mmol/l. Cependant des possibilités d'utilisation de la technique de double dilution lors de l'insémination artificielle de la Truite sont envisageables.

## SUMMARY

### ARTIFICIAL INSEMINATION OF THE TROUT *SALMO GAIIRDNERI* RICHARDSON IV — EFFECTS OF $K^+$ AND $Na^+$ IONS ON GAMETE FERTILIZING ABILITY

Sperm or ovules are diluted before insemination in different media containing NaCl (dNa) or variable amount of NaCl and KCl (dNa-K) (Tabl. 1). After insemination and before transfer to freshwater, gametes are left in dNa-K (*simple dilution method*); alternatively dNa (or coelomic fluid) is added (*double dilution method*). Spermatozoa are immobilized when KCl concentration in the diluent is higher than 10 mmol/l. This immobilization is reversible for KCl concentrations between 10 and 30 mmol/l. Ovule fertilizing ability decreases slightly when KCl diluent concentration reaches 10 mmol/l. Possibilities of using this double dilution method in the practice of artificial insemination in trout are discussed.

## INTRODUCTION

Des travaux précédents ont montré qu'un dilueur d'insémination à base de NaCl développant une pression osmotique (posm) de 150 à 250 milliosmoles (mosm) et tamponné à un pH variant de 8,5 à 9,5 à l'aide de tampons organiques ou minéraux permettait, surtout pour les faibles concentrations de sperme, une élévation notable du pourcentage d'œufs fécondés, par rapport à la méthode sèche (BILLARD *et al.*, 1974, 1973; PETIT *et al.*, 1973). Cependant, ce milieu ne constitue qu'un dilueur d'insémination utilisable seulement au moment précis de la mise en présence des gamètes, mais il ne permet pas de maintenir et de prolonger leur pouvoir fécondant en particulier pour les spermatozoïdes.

Par contre, un milieu reproduisant la composition minérale du liquide séminal de Salmonidés (MMLS) immobilise les spermatozoïdes et permet de conserver leur pouvoir fécondant après dilution, pendant plusieurs dizaines de minutes (BILLARD et JALABERT, 1974). De même, un milieu fortement enrichi en potassium a permis à TRUSCOTT *et al.* (1968) de conserver pendant un mois chez le Saumon, la fécondance de sperme dilué 10 fois.

Le présent travail est consacré à l'étude des effets des ions  $K^+$  et  $Na^+$  sur la conservation de la fertilité des gamètes, en exposant avant insémination les gamètes aux différents dilueurs ou en réalisant l'insémination proprement dite avec ces dilueurs dont les concentrations en NaCl et KCl sont variables.

## MATERIEL ET METHODES

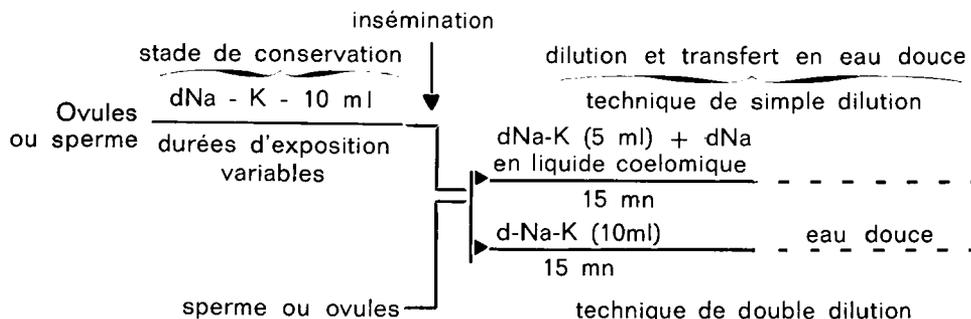
Le matériel animal et les conditions de l'expérimentation ont été décrits dans les travaux précédents (PETIT *et al.*, 1973; BILLARD *et al.*, 1973). Des dilueurs (dNa-K) contenant les quantités variables de NaCl et KCl (Prolabo RP) ont été réalisés tout en maintenant la posm totale finale constante (150 ou 250 mosm). (tableau 1). En outre, le dilueur d'insémination à base de NaCl (dNa) (dilueur n° 1, tableau 1) et le milieu reconstituant la composition minérale du liquide séminal (MMLS) ont été utilisés comme référence (BILLARD et JALABERT, 1974). Tous les milieux ont été tamponnés à pH 9,0, tampon Tris-HCl 0,02M, ou carbonate-bicarbonate 0,02M. (concentration finale).

Les effets de dNa et dNa-K ont été testés sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes avant et après insémination.

### Expérience n° 1 : Effets de dNa-K utilisé comme dilueur de conservation

La méthodologie déjà utilisée (BILLARD et JALABERT, 1974) consiste à mélanger le sperme ou les ovules avec le dilueur à tester et à réaliser l'insémination après des temps d'exposition croissants avec des gamètes non dilués.

L'ensemble du protocole est schématisé ci-dessous :



Chaque lot expérimental comporte environ 200 œufs, 10ml de dilueur et des volumes de sperme variant entre  $0,1 \mu\text{l}$  ( $10^{-5}$ ) et  $10 \mu\text{l}$  ( $10^{-3}$ ). Après insémination dans le cas de la technique de simple dilution, les gamètes sont laissés en présence dans le dNa-K pendant 15 mn, puis transférés en eau douce dans les incubateurs. Dans le cas de la technique de double dilution 5 ml de dNa-K sont enlevés dans chaque lot, et remplacés par 5 ml de dNa ou de liquide coelomique lors de l'insémination. Les spermatozoïdes immobilisés dans les dNa-K par le potassium sont remis en mouvement - au moins lorsque l'inhibition de motilité est réversible - lors du passage en eau douce dans le premier cas, et lors de l'addition du dNa ou liquide coelomique dans le second cas (cf. BILLARD et JALABERT, 1974).

Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante (environ  $10$  à  $12^\circ\text{C}$ ). Les œufs sont incubés à la température de  $12 \pm 1^\circ\text{C}$ . Le pourcentage d'œufs embryonnés (qui sera considéré comme le pourcentage de fécondation) est établi après 10 jours d'incubation.

### Expérience n° 2 : Effets de dNa-K utilisé comme dilueur d'insémination

Les gamètes sont mis en présence directement dans dNa-K, sans exposition préalable aux dilueurs. Après insémination, le protocole expérimental est analogue à celui exposé ci-dessus et fait intervenir les techniques de simple et double dilution. Dans ce dernier cas, le dNa est ajouté au mélange dNa-K + gamètes 1, 20 et 40 mn après insémination.

Les intervalles de confiance des pourcentages selon FISHER et YATES ( $P = 95$  p. 100) sont reportés sur les graphiques et les comparaisons des pourcentages sont établis à l'aide des tests  $X^2$ , non paramétrique et analyse de variance avec transformation des données.

## RESULTATS

### Expérience n° 1 : Effets sur le sperme

#### A - Technique de simple dilution (Fig. 1)

Seuls les milieux n° 3, 5 et 7 prolongent la survie des spermatozoïdes de façon notable à la pression osmotique de 250 mosm, par rapport aux

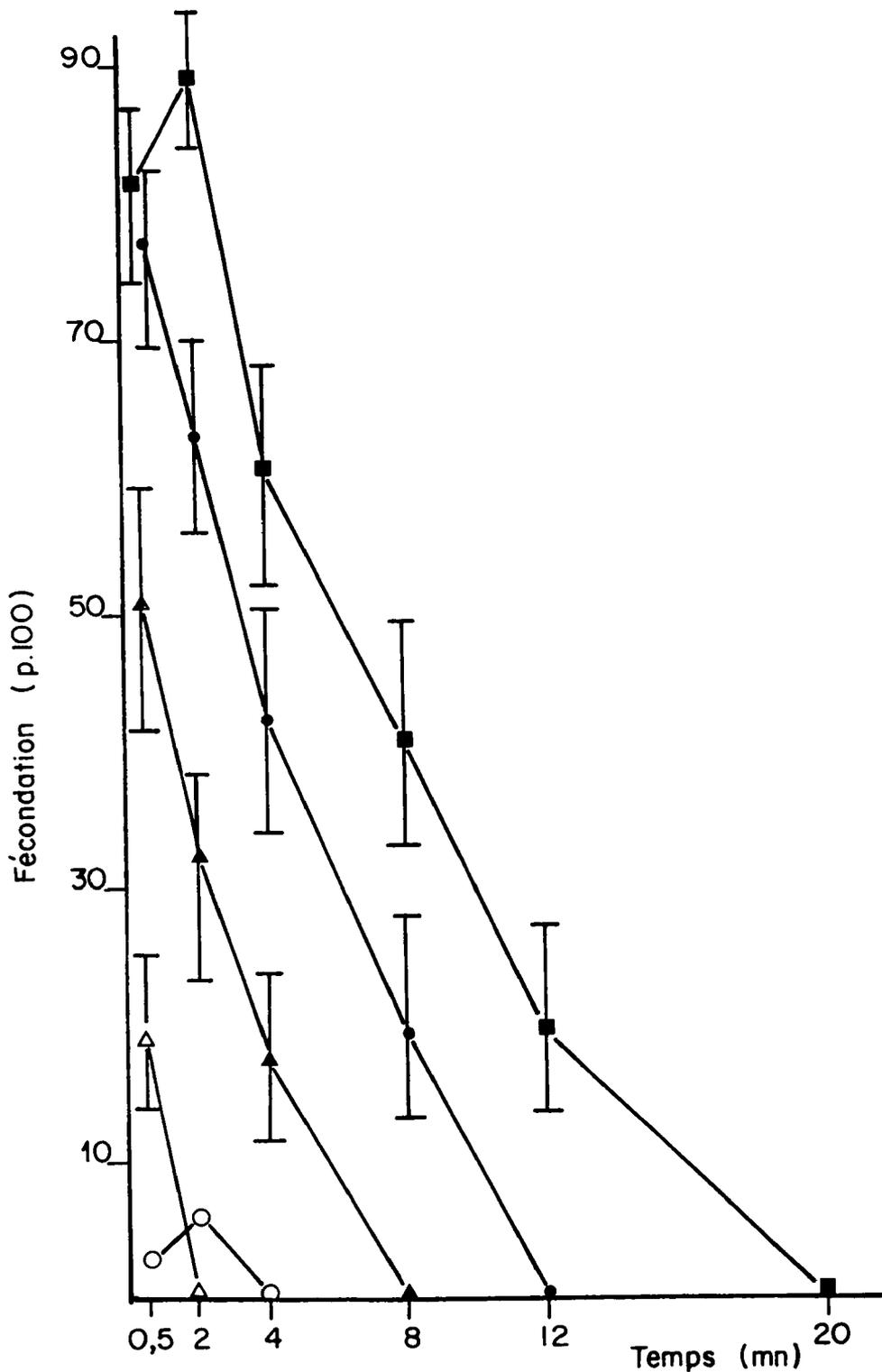


Fig. 1 : Effets de dilueurs à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  variable (dNa-K) sur la conservation du sperme. Le sperme est mélangé aux différents dilueurs au taux de  $10^{-3}$  pendant des temps variables 30 s. à 20 mn avant addition des ovules ; p.o. finale 250 mosm. N° des dilueurs (cf. Tabl. 1) :  $\Delta$ — $\Delta$  1 ;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$  3 ;  $\bullet$ — $\bullet$  5 ;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  7 ;  $\circ$ — $\circ$  9  
Méthode de simple dilution. Concentration du sperme  $10,5 \cdot 10^{-9}$  spermatozoïdes/ml. (Dans cette expérience un dNa-K sur deux a été testé ; les essais ont porté sur les nos pairs).

témoins dilués dans dNa (n° 1) où les taux de fécondation enregistrés sont très faibles. Les résultats sont les mêmes, que les dilueurs soient ajustés à 250 mosm ou à 150 mosm.

### B - Technique de double dilution

L'usage du système de double dilution permet de montrer que la fécondance du sperme peut-être maintenue pendant 20 et même 40 mn dans des milieux à forte concentration en potassium quelle que soit la posm. (tableau 2). Les meilleurs résultats sont obtenus avec les dilueurs n° 4 et 5 et avec le MMLS.

La technique de double dilution a été en outre pratiquée en remplaçant le dNa par le liquide coelomique. Dans ces conditions (Fig. 2) la fécondance

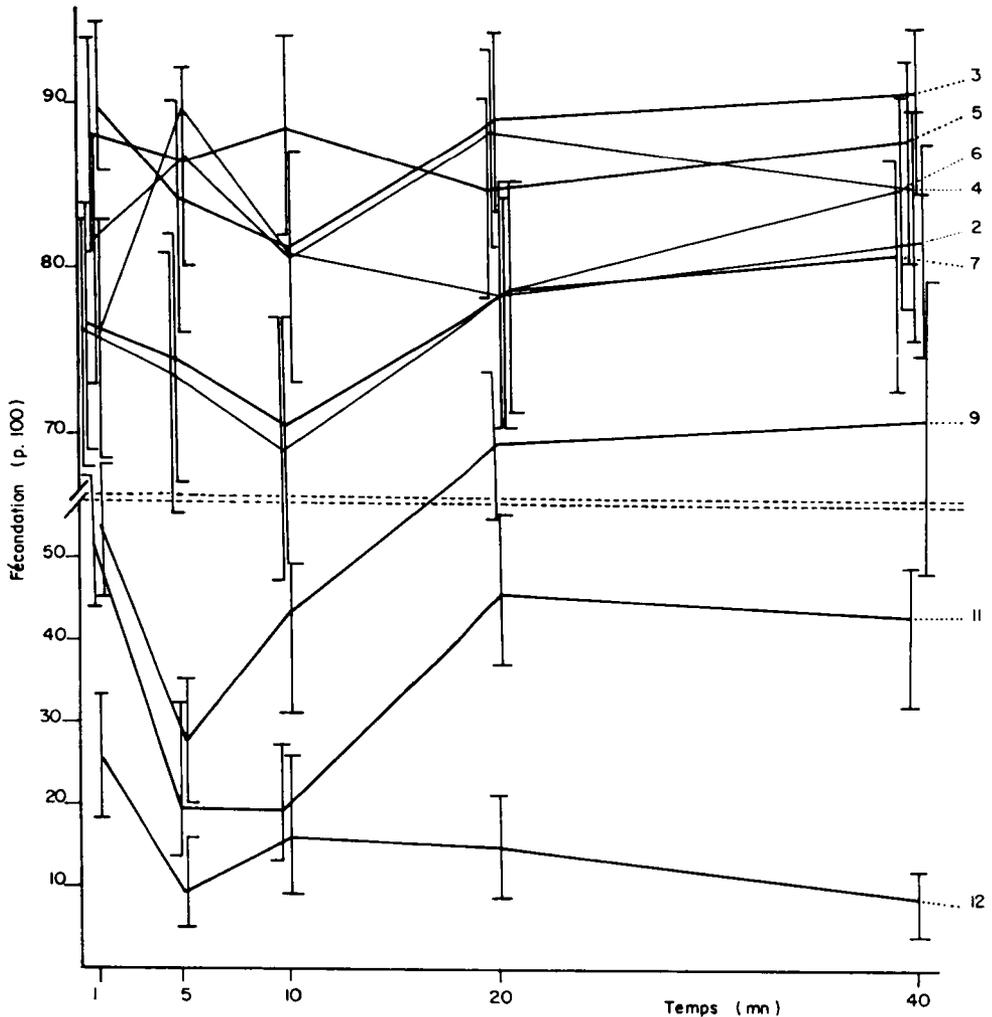


Fig. 2 : Effets de dNa - K (posm 250 mosm) sur la conservation de la fécondance du sperme. Même protocole que pour la figure 1, mais la technique de double dilution est utilisée avec l'emploi du liquide coelomique naturel comme 2<sup>e</sup> dilueur. Les chiffres correspondent aux numéros des dilueurs du tableau 1. Taux de fécondation après insémination au temps 0 avec le dilueur témoin n° 1 : 92 %

du sperme est maintenue à son niveau initial pendant 40 mn avec une large gamme de dilueurs (n° 2 à 7), dont la concentration en KCl est comprise entre 5 et 30 mmol/l et le rapport Na/K entre 14 et 2. Les pourcentages de fécondation obtenus avec les dilueurs 2 à 7 sont comparables entre eux ( $P > 0,01$ ) mais sont significativement plus élevés ( $F > 0,01$ ) que lorsque l'insémination est pratiquée avec les dilueurs 9, 11 et 12.

● Effets sur les ovules

A - Technique de simple dilution

La fécondabilité des ovules n'est maintenue au niveau du témoin (dilueur n° 1) que dans le cas des dilueurs n° 2 et 3 (Fig. 3). Cependant, compte tenu de la technique employée il est vraisemblable que l'effet inhibiteur du  $K^+$  des dilueurs sur la motilité des spermatozoïdes eux mêmes est en cause. Avec le dilueur n° 2, la fécondabilité des ovules est anormalement faible à 0,5 mn.

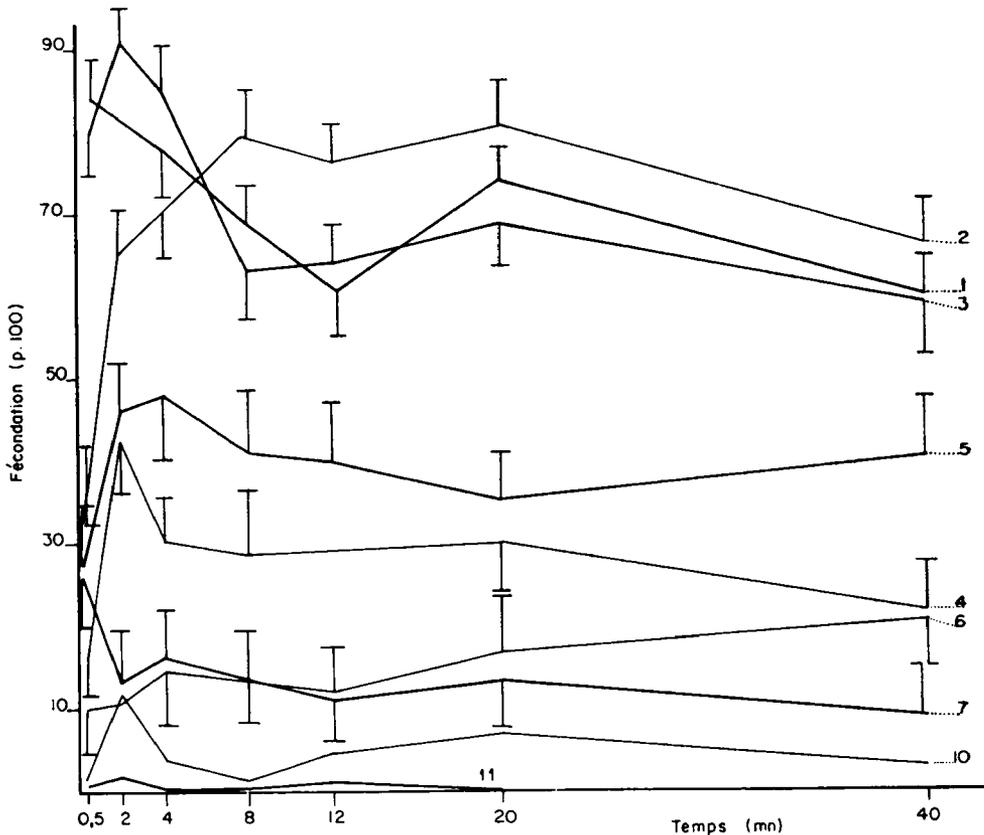
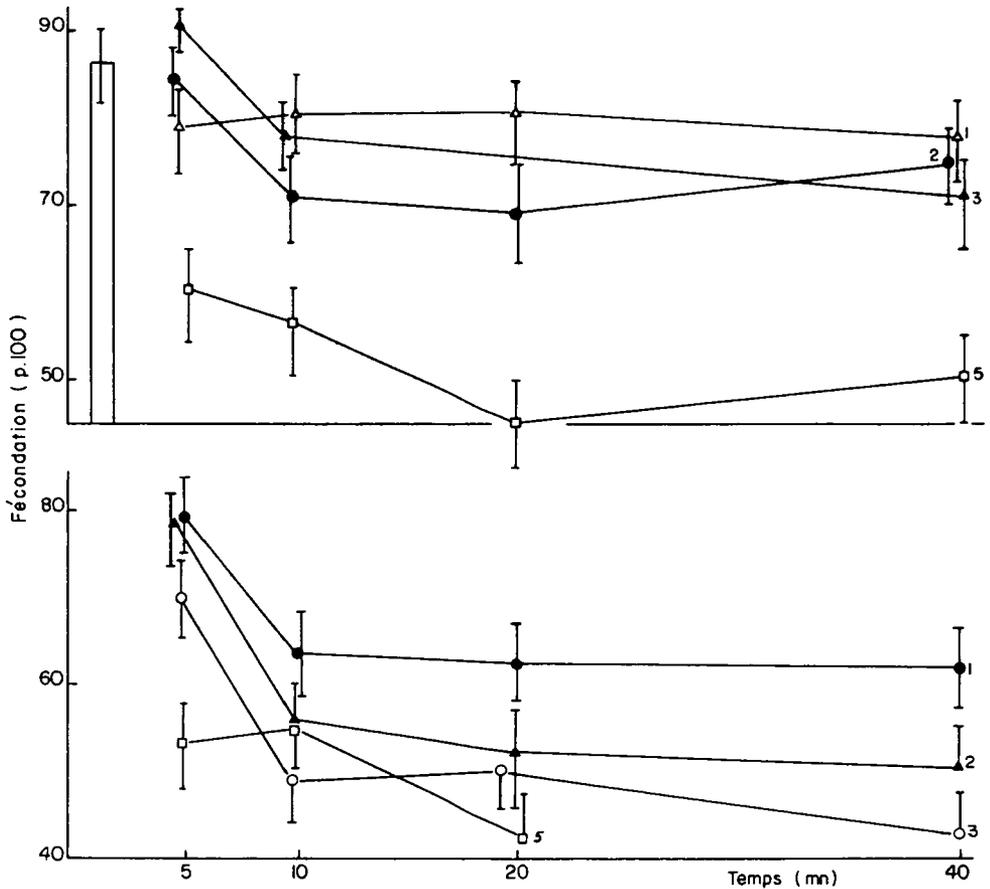


Fig. 3 : Effets des dNa - K (posm 250 mosm) sur la conservation de la fécondabilité des ovules. Les ovules sont mélangés aux différents dilueurs pendant des temps variables (entre 30 s. et 40 mn) avant insémination selon la technique de simple dilution. Concentration :  $14,7 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml. Taux de dilution final du sperme  $10^{-4}$ .

### B - Technique de double dilution (Fig. 4)

Par rapport à la technique de simple dilution, la technique de double dilution a un effet défavorable sur la fécondabilité des ovules, surtout au delà de 5 mn d'exposition. Les effets sont plus marqués avec le dilueur n° 5 plus riche en K<sup>+</sup>.

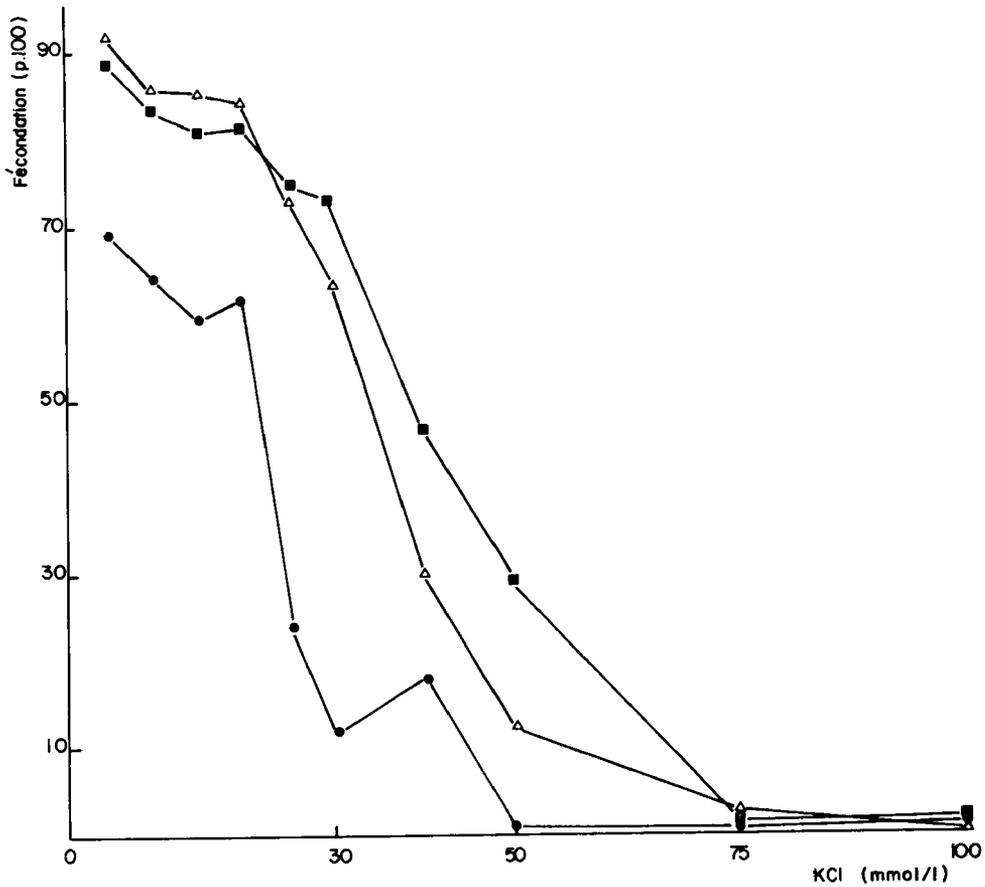


**Fig. 4** — Effets des dNa-K (250 mosm) sur la conservation de la fécondabilité des ovules. Comparaison des pourcentages de fécondation avec les techniques de simple (en haut) et double dilution (en bas) portant sur les dilueurs 1, 2, 3 et 5 (cf. Tabl. 1). Concentration du sperme  $12,4 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml. Taux de dilution final du sperme  $10^{-3}$ . Le taux de fécondation témoin (en haut à gauche) correspond à l'insémination pratiquée normalement avec le dilueur n° 1.

### Expérience n° 2

#### A - Technique de simple dilution

Lorsque le taux de KCl dans le dilueur à posm 250 dépasse 15 mmol/l (dilueur n° 4) le pouvoir fécondant du sperme ainsi dilué diminue rapidement et devient nul pour des concentrations en KCl de 75 mmol/l (Fig. 5). L'effet est d'autant plus marqué que la dilution du sperme est plus forte. Les résultats obtenus avec les dilueurs à posm. 150 sont analogues.



**Fig. 5** : Effets des dNa-K (p.o. 250 mosm) sur l'efficacité de la fécondation (l'insémination a lieu directement dans les dilueurs ; les œufs inséminés sont transférés dans les incubateurs en eau douce, après 15 mn, technique de simple dilution). Concentration  $13,3 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml, dilution finale du sperme : ■ — ■  $10^{-3}$  ; ▲ — ▲  $10^{-4}$  ; ● — ●  $10^{-5}$

**B - Technique de double dilution (Tableau 3)**

La fertilité des gamètes mis en présence directement dans les différents dNa-K se maintient pendant 20 mn pour des concentrations en KCl comprises entre 5 et 20 mmol/l (p.o. totale 250 mosm). Par contre dans dNa (dilueur n° 1 témoin), le niveau de fertilité est plus faible dès la première minute. Avec le MMLS, le pourcentage de fécondation demeure élevé après 40 mn d'exposition. Dans tous les autres cas les pourcentages de fécondation sont médiocres à 40 mn.

Pour les concentrations en potassium les plus fortes, — dilueurs 9 et 12 — (50 à 124 mmol de KCl) on observe un pourcentage de fécondation encore élevé après une durée d'exposition de 1mn, alors qu'aucune fécondation n'avait été observée avec la technique de dilution simple.

## DISCUSSION

La conservation de la fécondance du sperme pendant plusieurs dizaines de minutes après dilution dans des milieux dont la teneur en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  est variable, est plus directement liée à la concentration en KCl qu'au rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Par contre, les ions  $\text{Mg}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$  qui apparaissent en plus dans le MMLS semblent prolonger la conservation de la fertilité des gamètes (Tableau 3). L'action favorable du potassium est vraisemblablement due à des propriétés inhibitrices sur la motilité des spermatozoïdes de Truite (GASCHOTT, 1928 ; SCHLENK et KAHMANN, 1937 ; BILLARD et JALABERT, 1974). Ce rôle inhibiteur de la motilité par le potassium n'est cependant pas général chez les poissons téléostéens (BILLARD, non publié). Dans le liquide séminal des Salmonidés, la concentration en potassium varie entre 860 Mg/l pour *Salmo salar* (HWANG et IDLER, 1969),  $1\,106 \pm 52$  mg/l pour *Salmo gairdneri* (JALABERT et BILLARD, non publié) et 1 513 mg/l pour *Salmo clarki* (CRUEA, 1969). Dans d'autres espèces de poisson, les quantités de potassium signalées sont aussi élevées : 970 mg/l chez *Stizostédion* (GREGORY, 1970). Avec les dilueurs utilisés dans la présente expérience (technique de simple dilution) l'immobilisation des spermatozoïdes débute lorsque la concentration en KCl dépasse 10 mmol/l, ce qui confirme les résultats de SCHLENK et KAHMANN (1937). Dans les vingt premières minutes, l'inhibition de la motilité des spermatozoïdes est totale et entièrement réversible pour des teneurs en KCl comprises entre 10 et 50 mmol/l. Pour des expositions prolongées, 40 mn par exemple, la zone favorable est plus étroite — de 10 à 30 mmol/l de KCl — ce qui correspond à la concentration observée dans le liquide séminal naturel.

La fécondabilité des ovules n'est légèrement affectée que lorsque la concentration KCl des dilueurs atteint 20 mmol/l. Il y a donc un effet toxique du potassium sur les ovules, effet qui semble atténué dans le MMLS où la teneur en KCl atteint 28 mmol/l (BILLARD et JALABERT, 1974). Cet effet favorable du MMLS pourrait être dû aux ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  qu'il contient.

Dans la pratique de l'insémination artificielle on peut donc envisager l'emploi de la technique de double dilution en utilisant un dilueur de conservation enrichi en  $\text{K}^+$  dans lequel il est possible de recueillir les ovules et le sperme de plusieurs géniteurs, et de procéder dans un délai maximum de 20 mn à l'insémination proprement dite par addition du dilueur d'insémination. Cependant, les effets des traitements subis par les gamètes n'ont été appréciés qu'en se référant au pourcentage de fécondation et plus précisément au pourcentage d'œufs embryonnés à 10 jours. Il reste à s'assurer que ces traitements n'augmentent pas la mortalité embryonnaire entre 10 jours et l'éclosion, et la mortalité post-embryonnaire.

Nous avons vu (Fig. 2) que le liquide coelomique naturel pouvait constituer dans le cadre du système de double dilution un dilueur permettant d'obtenir des pourcentages élevés de fécondation. Grâce à la double dilution, le pH du liquide coelomique qui n'est pas optimum pour la fécondation, se trouve augmenté du fait du pouvoir tampon du premier dilueur. Ce liquide coelomique, dont les effets favorables sur la survie des spermatozoïdes de Salmonidés ont souvent été signalés (ELLIS et JONES, 1939 ; HARTMANN, 1944 ; GINSBURG, 1963, 1968 ; NOMURA, 1964 ; YOSHIDA et NOMURA, 1972) est cependant de qualité hétérogène d'une femelle à l'autre, ainsi que l'a signalé DORIER (1959) en raison du phénomène d'hydropisie qui affecte toujours un certain nombre de femelles et des pollutions dues à l'urine dont il est difficile de se préserver lors du prélèvement des ovules. L'utilisation du liquide coelomique comme deuxième dilueur dans la technique de double dilution serait séduisante, mais cela supposerait un critère d'appréciation de sa qualité.

En conclusion, la concentration de l'ion potassium dans le liquide séminal de Truite peut expliquer à elle seule l'immobilisation des spermatozoïdes sans avoir recours à l'existence d'hypothétiques facteurs organiques. Ces propriétés peuvent être utilisées dans la mise au point de dilueur pour l'insémination artificielle.

Cependant le potassium ne prolonge pas la durée de motilité des spermatozoïdes : il y a seulement inhibition et l'effet de dilution se trouve différé dès que le mélange spermatozoïde dNa-K est remis en présence d'eau ou de solutions salines. La motilité intense et brève, caractéristique du sperme de Salmonidés, se développe alors vraisemblablement du fait de l'abaissement du taux de K<sup>+</sup> dans le milieu.

### REMERCIEMENTS

La responsabilité des installations a été assurée par M. MORDELET et les soins des animaux par M. BONICEL. La présentation dactylographique du manuscrit est due à Madame MARCEL. Mademoiselle SOLARI a effectué les calculs statistiques.

**TABEAU 1**

Caractéristiques des dilueurs à Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> variables (dNa-K). Dans tous les cas les dilueurs sont tamponnés au pH 9.0 avec un mélange Tris-HCl 0,02 M.

n° du dilueur	Pression osmostique finale des dilueurs					
	250			150		
	KCl mmol/l	NaCl mmol/l	Na/K	KCl	NaCl	Na/K
1	0	125		0	70	
2	5	120	14,3	5	65	7,6
3	10	115	6,8	10	60	3,6
4	15	110	4,3	15	55	2,15
5	20	105	3,1	20	50	1,5
6	25	100	2,4	25	45	1,06
7	30	95	1,9	30	40	0,79
8	40	85	1,25	40	30	0,44
9	50	75	0,9	50	20	0,24
10	75	50	0,4	60	10	0,10
11		25	0,15	70	0	
12	125	0				
MMLS*	28,3	110	2,9			

\* MMLS : Milieu minéral de liquide séminal ; seules les compositions en KCl et NaCl sont rapportées ici. Formule complète dans BILLARD et JALABERT, 1974.

**TABLEAU 2**

Effets des dNa-K sur la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes estimés d'après le pourcentage de fécondation. Après une durée d'exposition de 20 à 40 mn le sperme dilué au taux de  $10^{-3}$  est mis en présence des œufs et de 10 ml de dilueur n° 1 (technique de double dilution).

n° du dilueur	Pression osmotique finale des dilueurs			
	250		150	
	durée de séjour du sperme dans dNa-K		durée de séjour du sperme dans dNa-K	
	20 mn	40 mn	20 mn	40 mn
1	0	0	0	0
2	58,4	43,8	60,0	65,0
3	60,3	72,5	75,5	70,0
4	75,3	73,8	89,8	50,0
5	70,1	84,6	91,1	47,6
6	67,5	53,1	76,5	63,4
7	59,2	55,5	57,5	38,6
8	66,6	15,1	70,9	29,3
9	53,3	5,0	70,7	5,4
10	10,6	1,0	58,0	33,0
11	21,7	1,0	15,1	28,2
12	26,7	24,2		
MMLS	61,6	80,6		

**TABLEAU 3**

Pourcentage de fécondation obtenu après mélange des gamètes dans dNa-K (pH 9,0, tampon Tris-HCl 0,02M (p.o. et 250 et 150 mosm) : Le dNa (p.o. 250, pH 9,0, tampon bicarbonate — bicarbonate 0,02M) est ajouté au mélange à des temps variables (1,20 et 40 mn) (technique de double dilution). Taux de fécondation après insémination normale avec dNa : 82,5 p. 100.

n° du dilueur	Pression osmotique finale des dilueurs					
	250 mosm			150 mosm		
	Durée d'exposition des gamètes au dNa-K			Durée d'exposition des gamètes au dNa-K		
	1 mn	20 mn	40 mn	1 mn	20 mn	40 mn
1	41,6	55,1	18,2	40,7	20,8	11,2
2	74,2	76,1	47,7	59,3	84,3	30,8
3	61,1	73,8	45,0	38,8	74,7	33,6
4	62,1	78,1	58,1	36,6	51,1	37,2
5	68,7	51,1	25,9	64,4	50,3	56,7
6	49,7	15,7	25,0	66,9	33,3	41,7
7	44,0	29,6	21,5	73,3	47,7	22,1
8	42,0	20,4	14,0	57,3	12,2	4,0
9	39,1	16,8	16,2	45,2	11,3	4,8
10	25,8	3,0	2,4	33,0	0,0	4,0
11	18,1	0,5	1,6	33,5	0,4	6,1
12	11,3	0,1	0,8			
MMLS	60,0	45,8	77,5			

## BIBLIOGRAPHIE

- BILLARD R., PETIT J., JALABERT B., SZOLLOSI D., 1974. Artificial insemination in Trout using a sperm diluant. 715-723 in J.H.S. BLAXTER Early life History of Fish, Springer Verlag Heidelberg.
- BILLARD R., JALABERT B., 1974. L'insémination artificielle de la Truite *Salmo Gairdneri* Richardson. II - Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation de la fertilité des gamètes avant et après insémination. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14, 601-610
- BILLARD R., JALABERT B., BRETON B., 1974. L'insémination artificielle de la Truite *Salmo Gairdneri* Richardson. III - Définition de la nature et de la molarité du tampon à employer avec les dilueurs d'insémination et de conservation. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14, 611-621.
- CRUEA D.O., 1969. Some chemical and physical characteristics of Fish sperm. Trans. Amer. Fish. Soc., 98, 785-788.
- DORIER A., 1949. Action du liquide coelomique sur les spermatozoides de Truite arc-en-ciel. Trav. Lab. Hydrobiol. Pisc. Université Grenoble, 41, 69-73.
- ELLIS W.G., JONES J.W., 1939. The activity of the spermatozoa of *Salmo salar* in relation to osmotic pressure. J. Exp. Biol., 16 530-534.
- GASCHOTT O., 1928. Beiträge zur Reizphysiologie des Forellenspermas. Arch. Hydrobiol., suppl. 4, 441-478.
- GINSBURG A.S. 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the Egg in Salmonid Fishes. J. Embryol. exp. Morph., 11, 13-33.
- GINSBURG A.S., 1968. Differences in morphology and properties of gametes in fishes and their importance for the elaboration of adequate methods of artificial insemination. Congr. int. Reprod. anim. Insem artif., Paris, 2, 1037-1040.
- GREGORY R.W., 1970. Physical and chemical properties of Walleye Sperm and seminal plasma. Trans. Amer. Fish. Soc., 99, 518-525.
- HARTEMANN M., 1944. Befruchtungsstoffe (Gamone) bei Fischen (Regenbogenforelle). Naturwiss., 32, 231.
- HWANG P.C. IDLER D. R., 1969. A study of major cations, osmotic pressure and pH in seminal components of atlantic Salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada, 26, 413-419.
- MANN T., 1964. The biochemistry of Semen of the male reproductive tract. Methuen, London.
- MIESCHER F., 1864. Histochemische und physiologische Arbeiten Leipzig Vogel, cité par MANN 1964.
- NOMURA M., 1964. Studies on reproduction of rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*, with special reference to egg taking. VI - The activities of spermatozoa in different diluents, and preservation of semen. Bull. Japan. Soc. Scient. Fish., 30; 723-733.
- PETIT J., JALABERT B., CHEVASSUS B., BILLARD R., 1973. L'insémination artificielle de la Truite *Salmo Gairdneri* Richardson. I - Effets du taux de dilution, du pH et de la pression osmotique du dilueur sur la fécondation. Ann. Hydrobiol., 4, 201 - 210.

SCHLENK W., KAHMANN H., 1937. Die chemische Zusammensetzung des Spermaliquors und ihre physiologische Bedeutung. Untersuchung am Forellensperma. *Biochem. Z.*, 295, 283-301.

TRUSCOTT B., IDLER D.R., HOYLE R.J., FREEMAN H.C., 1968. Subzero preservation of Atlantic Salmon sperm. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 25, 363-372.

YOSHIDA T., NOMURA M., 1972. A substance enhancing sperm motility in the ovarian fluid of Rainbow Trout. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.*, 38, 1073.