

Efecto de la radiación UV en la inactivación genética del esperma de botete diana
Sphoeroides annulatus (Jenyns, 1842)

Effect of UV radiation on the genetic inactivation of sperm of the bullseye puffer
Sphoeroides annulatus (Jenyns, 1842)

Lenin Arias-Rodríguez*
Luz Estela Rodríguez-Ibarra
Gabriela del Valle-Pignataro**

Laboratorio de Genética
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán
Sábalo-Cerritos s/n, Estero del Yugo
Apartado postal 711
Mazatlán, Sinaloa, México

*E-mail: larias@victoria.ciad.mx, **gvp@victoria.ciad.mx

Recibido en marzo de 2003; aceptado en marzo de 2004

Resumen

La inactivación genética (ADN) del esperma de peces se realiza mediante luz ultravioleta que, en irradiaciones crecientes, genera efectos paradójicos (efecto Hertwig) en los porcentajes de supervivencia. En este trabajo se diluyeron muestras de semen provenientes de diez machos de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) en solución extendora Cortland modificada en dilución 1:50, y se utilizaron para probar el efecto de nueve dosis de radiación ultravioleta ($0.2\text{--}1.0\text{ J cm}^{-2}$) sobre la duración de la motilidad en segundos, el índice de motilidad del esperma, y los porcentajes de supervivencia de embriones obtenidos de la fertilización de huevos provenientes de cinco hembras de la misma especie. Los tiempos de motilidad del esperma en las muestras irradiadas con $0.2\text{--}0.9\text{ J cm}^{-2}$ resultaron estadísticamente no diferentes de los controles, mientras que las muestras irradiadas con 1.0 J cm^{-2} fueron significativamente menores. El índice de motilidad (IM), por otra parte, permitió la diferenciación estadística de cuatro grupos en cuanto a su respuesta a diferentes dosis de radiación. El primer grupo se caracterizó por valores altos del IM, e incluyó a los controles y a las muestras irradiadas con $0.2\text{--}0.3\text{ J cm}^{-2}$; el segundo agrupó a las irradiaciones de $0.4\text{ a }0.7\text{ J cm}^{-2}$, en las cuales se observó un descenso del IM; en el tercer grupo ($0.8\text{--}0.9\text{ J cm}^{-2}$) el IM aumentó nuevamente; y en el último (1.0 J cm^{-2}) se observó el menor IM. En cuanto a los porcentajes de supervivencia, se observó una curva descendente con valores altos de supervivencia en los controles y en las muestras irradiadas con 0.2 J cm^{-2} , con un descenso en los tratamientos de $0.3\text{ a }0.4\text{ J cm}^{-2}$, y una recuperación significativa a partir del tratamiento de 0.5 y hasta 0.8 J cm^{-2} , observándose nuevamente un decremento en la supervivencia de los tratamientos de $0.9\text{ a }1.0\text{ J cm}^{-2}$. Ambos resultados, IM y supervivencia, indican que la dosis óptima para la producción de organismos haploides se encuentra cercana a 0.7 J cm^{-2} . En el tratamiento de 0.7 J cm^{-2} se observaron larvas con las características típicas del síndrome haploide, indicando nuevamente que ésta puede ser la dosis más adecuada para producir organismos ginogenéticos.

Palabras clave: *Sphoeroides annulatus*, semen, ultravioleta, Hertwig.

Abstract

Genetic (DNA) inactivation of fish sperm with ultraviolet irradiation is generally accompanied by a paradoxical effect on survival rates (Hertwig effect). In the present study, sperm samples from ten male bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) were diluted 1:50 using Cortland's extender solution and used to test the effect of nine ultraviolet doses ($0.2\text{--}1.0\text{ J cm}^{-2}$) on motility time in seconds, motility index, and embryo survival rate after fertilizing eggs from five bullseye puffer females. Motility time of sperm irradiated with $0.2\text{--}0.9\text{ J cm}^{-2}$ were not statistically different from the controls, but sperm irradiated with a dosage of 1.0 J cm^{-2} dosage had significant lower motility time. Motility indices (MI) allowed for the statistical differentiation of four groups in relation to their response to different radiation doses: the first had high MI, and included the controls and $0.2\text{--}0.3\text{ J cm}^{-2}$ treatments; the second had lower MI and included the $0.4\text{--}0.7\text{ J cm}^{-2}$ treatments; the third showed recovery of MI and included the $0.8\text{--}0.9\text{ J cm}^{-2}$ treatments; and the fourth showed the lowest MI with the 1.0 J cm^{-2} treatment. Embryo survival was highest for the controls and 0.2 J cm^{-2} treatment, decreasing in the $0.3\text{--}0.4\text{ J cm}^{-2}$ treatments, increasing again in the $0.5\text{--}0.8\text{ J cm}^{-2}$ treatments, until reaching lowest survival in the $0.9\text{--}1.0\text{ J cm}^{-2}$ treatments. These results indicate that the best

ultraviolet dosage to achieve genetic inactivation of sperm of this species is close to 0.7 J cm^{-2} , a dosage in which fish fry showed typical haploid syndrome characteristics.

Key words: *Sphoeroides annulatus*, sperm, ultraviolet, Hertwig.

Introducción

La fertilización externa en los peces facilita la manipulación de los gametos y las características genéticas que éstos portan (Purdom, 1983). Esto permite la inducción de la ginogénesis artificial, en la cual los huevos son activados por esperma que no contribuye genéticamente en el desarrollo de los embriones (Lasher y Rugh, 1962; Purdom, 1969; Thorgaard, 1983; Arai, 2000), produciéndose así haploides que no sobreviven más allá de la etapa de eclosión (Lasher y Rugh, 1962; Hussain *et al.*, 1993). El restablecimiento de la diploidía en huevos fecundados con esperma cuyo complemento genético ha sido inactivado se logra mediante la supresión de la segunda meiosis por retención del segundo cuerpo polar o de la primera división mitótica, aplicando choques de temperatura y presión hidrostática en las primeras etapas posteriores a la fertilización (Mair, 1993; Arai, 2000).

Para la inactivación genética del esperma se emplean diversas fuentes de radiación. Entre ellas se encuentran los rayos gamma, los rayos X y la radiación ultravioleta (UV) (Chourrout, 1982; Don y Avtalion, 1993; Galbusera *et al.*, 2000; Gomelsky *et al.*, 2000). Debido a que el empleo de radiaciones ionizantes como los rayos gamma y X generan individuos con características residuales de origen paterno (Chourrout, 1984), la inactivación completa del ADN de los espermatozoides se logra con luz UV (Jenneckens *et al.*, 1999). Este tipo de radiación produce la fragmentación del ADN y la formación de dímeros de timina. A pesar de existir estudios sobre inactivación de ADN en esperma en múltiples especies de peces, el empleo y optimización de esta metodología requiere del ensayo de las dosis para definir cuáles generan porcentajes de supervivencia adecuados a las condiciones particulares de cada especie. En forma general se sabe que el incremento de las dosis genera una disminución en la viabilidad de los embriones, hasta que con dosis altas se presenta una mortalidad total. Asimismo, un fenómeno paradójico conocido en este tipo de experimentos es el llamado efecto de Hertwig, en el cual se observa que con ciertas dosis de radiación intermedia la supervivencia de los embriones muestra una ligera recuperación con respecto a dosis menores. Este fenómeno ha sido explicado por la supervivencia de espermatozoides cuyo ADN ha sido fragmentado por la radiación (y digerido por las nucleasas del huevo fertilizado), pero que conservan, no obstante, la motilidad necesaria para activar el desarrollo del huevo, que porta únicamente material genético de procedencia materna (Purdom, 1969, 1983).

Esta técnica tiene aplicaciones importantes, como son la generación de cultivos monosexuales, y la selección de líneas puras (clones) (Taniguchi *et al.*, 1993) para caracteres de interés como resistencia a enfermedades, y para la mejora en el

Introduction

The external fertilization of fish facilitates the manipulation of gametes and their genetic characteristics (Purdom, 1983). This allows the artificial induction of gynogenesis, in which eggs are activated by sperm that does not contribute genetically to the development of embryos (Lasher and Rugh, 1962; Purdom, 1969; Thorgaard, 1983; Arai, 2000), producing haploids that only survive until hatching stage (Lasher and Rugh, 1962; Hussain *et al.*, 1993). Restoration of diploidy in eggs fertilized with sperm whose genetic complement has been inactivated is achieved through suppression of second meiosis by retention of the second polar body or first mitotic division, applying temperature and hydrostatic pressure shocks in the first stages after fertilization (Mair, 1993; Arai, 2000).

Several radiation sources are used for the genetic inactivation of sperm, including gamma rays, X-rays and ultraviolet (UV) radiation (Chourrout, 1982; Don and Avtalion, 1993; Galbusera *et al.*, 2000; Gomelsky *et al.*, 2000). Since the use of ionizing radiation, such as gamma- and X-rays, produces individuals with residual characteristics of paternal origin (Chourrout, 1984), the complete inactivation of the sperm's DNA is obtained with UV light (Jenneckens *et al.*, 1999). This type of radiation produces DNA fragmentation and the formation of thymine dimers. Even though there are studies on DNA inactivation in sperm of many fish species, the use and optimization of this methodology requires testing the doses to determine the ones that produce survival rates appropriate to the particular conditions of each species. Increased doses tend to decrease the viability of the embryos, the high doses leading to total mortality. These experiments produce a paradoxical phenomenon known as the Hertwig effect, that is, survival of the embryos increases with certain intermediate radiation doses relative to lower doses. This phenomenon has been explained by the survival of spermatozooids whose DNA was fragmented by radiation (and digested by the nucleases of the fertilized egg), but that nevertheless conserve the motility needed to activate the development of the egg, which only carries genetic material of maternal origin (Purdom, 1969, 1983).

This technique has important applications, such as the generation of monosexual cultures, and the selection of pure lines (clones) (Taniguchi *et al.*, 1993) for traits of interest like resistance to illnesses and for improved growth of the manipulated species (Yamamoto, 1999; Arai, 2000).

These techniques have only recently been applied in Mexico. Research has been conducted on marine fish, including studies of genetic inactivation of sperm using UV light in spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus* (Huerta, 1999), and in bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Arias-Rodríguez, 2001). This latter species has been

crecimiento de las especies manipuladas (Yamamoto, 1999; Arai, 2000).

La aplicación de estas técnicas en México es reciente, habiendo algunos reportes en peces marinos entre los que se encuentra un estudio de inactivación genética de esperma mediante luz UV en cabrilla, *Paralabrax maculatofasciatus* (Huerta, 1999) y otro en botete diana, *Sphoeroides annulatus* (Arias-Rodríguez, 2001). Esta última especie se consume en la costa noroeste de México desde los años setenta (Castellanos *et al.*, 1982), alcanzando alto precio en los mercados locales debido a la blancura y excelente textura y sabor de su carne. Además, especies de la misma familia, como *Takifugu rubripes*, también tienen un alto valor en el mercado en Japón, Corea y China (Kanazawa, 1991), por lo que el potencial de exportación del botete diana es alto. Su cultivo se inició en Mazatlán, México, en 1996 en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), lográndose avances significativos a la fecha (Abdo-de la Parra *et al.*, 2001; Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de nueve dosis de radiación UV sobre el tiempo de movimiento (T) y el índice de motilidad (IM) de los espermatozoides del botete diana (*S. annulatus*), así como los porcentajes de supervivencia de los embriones a las 24, 48 y 72 h de incubación, como un primer paso en el establecimiento de las condiciones óptimas para producir organismos cromosómicamente manipulados.

Material y métodos

Los reproductores fueron capturados en la Bahía de Teacapan, municipio de Escuinapa (Sinaloa, México), durante los meses de reproducción (abril a junio de 2000), y transportados al CIAD, Unidad Mazatlán, donde fueron mantenidos bajo condiciones de cautiverio. Se seleccionaron diez machos, con longitud de 28.77 ± 2.32 cm y peso de 605.68 ± 143.04 g, y cinco hembras con 32.88 ± 3.56 cm de longitud y 1121.0 ± 402.91 g de peso, en promedio.

Para la recolección de los gametos los reproductores fueron anestesiados con 0.75 mL L^{-1} de 2-fenoxi-etanol, diluido en agua de mar. El esperma se recolectó en jeringas estériles de 5 mL, evitando la contaminación del semen con excretas u orina que debilitan la capacidad fecundante de los espermatozoides (Aas *et al.*, 1991; Satterfield y Flickinger, 1995). Los gametos femeninos fueron recolectados en recipientes de plástico, aplicando ligera presión abdominal a hembras inyectadas con LHRHa (Sigma Chemical®) (Duncan y Rodríguez, 2001).

Radiación de esperma con UV

Se utilizó la solución Cortland modificada (SCM) extendidora de la motilidad (Geffen y Evans, 2000) para comparar el efecto de nueve dosis de radiación UV en el semen de los diez reproductores. La SCM se compone de solución A: KCl (0.9095 g), NaCl (0.2337 g), CaCl_2 (0.0332 g),

consumed along the northwestern coast of Mexico since the 1970s (Castellanos *et al.*, 1982), and has a high local market value because of its white meat of excellent texture and taste. Species of the same family, like *Takifugu rubripes*, also have a high market value in Japan, Korea and China (Kanazawa, 1991), so considerable export potential exists for bullseye puffer fish. The Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) in Mazatlán, Mexico, initiated a rearing program in 1996, and significant advances have been achieved to date (Abdo-de la Parra *et al.*, 2001; Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003).

This study aims to determine the effect of nine doses of UV radiation on motility time and motility index of the spermatozooids of bullseye puffer, *S. annulatus*, and the survival rates of embryos at 24, 48 and 72 h of incubation, as a first step in establishing optimum conditions to produce genetically manipulated organisms.

Materials and methods

The broodstock were caught in Teacapan Bay, in the municipality of Escuinapa (Sinaloa, Mexico), during the breeding season (April–June 2000), and transported to CIAD (Mazatlán), where they were kept in captivity. Ten males, 28.77 ± 2.32 cm in length and 605.68 ± 143.04 g in weight, and five females, 32.88 ± 3.56 cm in length and 1121.0 ± 402.91 g in weight, were selected.

For the collection of gametes, the reproducers were anesthetized with 0.75 mL/L of 2-phenoxyethanol, diluted in seawater. Sperm was collected in 5-mL sterile syringes, avoiding contamination of the sperm by feces and urine that weaken the fertilizing capacity of the spermatozooids (Aas *et al.*, 1991; Satterfield and Flickinger, 1995). The female gametes were collected in plastic containers, applying slight pressure on the abdomen of females injected with LHRHa (Sigma Chemical®) (Duncan and Rodríguez, 2001).

UV Radiation of sperm

Cortland's extender solution (CES) (Geffen and Evans, 2000) was used to compare the effect of nine doses of UV radiation on the sperm of ten reproducers. CES is made up of solution A: KCl (0.9095 g), NaCl (0.2337 g), CaCl_2 (0.0332 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (0.0551 g), MgSO_4 (0.0739 g), and solution B: NaHCO_3 (0.4956 g), $\text{D-(+)-C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (0.5045 g) (each solution in 100 mL of distilled H_2O), mixed in a 4:1 ratio at pH 6.74 ± 0.11 and used fresh. A dilution of 1:50 (sperm:CES) was used in the experiments.

The experiment consisted of two control groups (A and B) and treatment C, each one with three replicas: A = 0.2 mL of undiluted sperm in CES per replica, B = sperm + CES, and C = sperm + CES + UV radiation. For B and C, 1.8 mL of sperm were mixed in 88.2 mL of CES (1:50), of which 10 mL were placed in each of three glass petri dishes of 8.8 cm interior diameter, allowing a film of 1.6 mm to be maintained

NaH₂PO₄H₂O (0.0551 g), MgSO₄ (0.0739 g), y solución B: NaHCO₃ (0.4956 g), D-(+)-C₆H₁₂O₆ (0.5045 g) (cada solución en 100 mL de H₂O destilada), mezcladas en proporción 4:1 a pH 6.74 ± 0.11 y empleadas en fresco. En los experimentos se empleó la dilución 1:50 (semen:SCM).

El experimento consistió de dos controles (**A** y **B**) y del tratamiento **C**, cada uno con tres réplicas: **A** = 0.2 mL de semen sin diluir en SCM por réplica, **B** = semen + SCM, y **C** = semen + SCM + radiación UV. Para **B** y **C** se mezclaron 1.8 mL de semen en 88.2 mL de SCM (1:50) de los que se colocaron 10 mL en cada una de tres cajas petri de vidrio de 8.8 cm de diámetro interior, lo que permitió mantener una película de 1.6 mm ($h = V/\pi r^2 = 10 \text{ mL}/3.1416 [4.4 \text{ cm}]^2 = 0.16 \text{ cm}$). En el tratamiento **C** se aplicaron nueve dosis de radiación UV de 0.2 a 1.0 J cm⁻² con intervalos de 0.1 J cm⁻². Debido al escaso volumen de semen recolectado, sólo se pudieron hacer por duplicado las dosis 0.6, 0.8 y 0.9.

Las muestras fueron irradiadas en una cámara de UV con lámpara germicida de 15 W (General Electric, modelo G15T8) y agitador orbital (Felisa, FE-315) de 100 rpm.

Los tiempos de exposición requeridos para estas dosis se calcularon aplicando el modelo sugerido por Christensen y Tiersch (1994):

$$E = (n) (w) (t)/(d^2) (\pi^2)$$

donde E es la exposición total en J cm⁻², n es el número de lámparas (1), w es el rendimiento de la lámpara a 254 nm (3.3 W), t es la duración de la exposición en segundos (x), d^2 es la distancia de la muestra en relación con la lámpara (10 cm), y π^2 (3.1416²). Por ejemplo, para alcanzar una dosis de 0.2 J cm⁻² fue necesario aplicar 60 s de exposición a la luz UV.

Calidad y motilidad de esperma

Se verificó la calidad del esperma observando su tipo de movimiento, de acuerdo con la escala gradual (4, 3, 2, 1, 0) señalada por Menkveld y Kruger (1996). El grado 4 indica el máximo desplazamiento de los espermatozoides, el grado 3 describe el descenso de su desplazamiento y el incremento de movimientos laterales, el grado 2 representa poco o nulo desplazamiento y la disminución de los movimientos laterales, el grado 1 indica muy poco movimiento de la cabeza de los espermatozoides, junto con el decremento del movimiento del flagelo, y el grado 0 representa nulo desplazamiento de los espermatozoides.

Simultáneamente fue examinado el porcentaje de células activas empleando el criterio sugerido por Aas *et al.* (1991), en una escala de 0% a 100%, con intervalos de 10 (p.e., 10%, 20%, 30%, 40%, etc.), y el tiempo del movimiento en segundos (T) de los espermatozoides desde la activación con agua de mar hasta el grado 3 de movimiento de la escala descrita. Únicamente fueron consideradas útiles para los experimentos las muestras de semen provenientes de machos con movimiento de

($h = V/\pi r^2 = 10 \text{ mL}/3.1416 [4.4 \text{ cm}]^2 = 0.16 \text{ cm}$). In treatment **C**, nine UV radiation doses of 0.2 to 1.0 J cm⁻² were applied, with intervals of 0.1 J cm⁻², but due to the scant volume of sperm collected, it was only possible to do doses 0.6, 0.8 and 0.9 in duplicate.

The samples were irradiated in a UV chamber with a 15-W germicide lamp (General Electric, model G15T8) and orbital agitator (Felisa, FE-315) of 100 rpm.

The exposure times required for these doses were calculated according to Christensen and Tiersch (1994):

$$E = (n) (w) (t)/(d^2) (\pi^2)$$

where E is total exposition in J cm⁻², n is the number of lamps (1), w is the lamp's yield at 254 nm (3.3 W), t is the length of exposure in seconds (x), d^2 is the distance of the sample relative to the lamp (10 cm), and π^2 is 3.1416². For example, to reach a dose of 0.2 J cm⁻² it was necessary to apply 60 s of exposure to UV light.

Quality and motility of sperm

The quality of the sperm was verified by observing its type of movement, according to the gradual scale (4, 3, 2, 1, 0) reported by Menkveld and Kruger (1996). Grade 4 indicates maximum displacement of the spermatozoids, grade 3 indicates decreased displacement of the spermatozoids and increased lateral movements, grade 2 represents little or null displacement of the spermatozoids and decreased lateral movements, grade 1 indicates very little movement of the head and decreased movement of the flagellum, and grade 0 represents null displacement of the spermatozoids.

At the same time, we determined the percentage of active cells according to Aas *et al.*'s (1991) criterion, using a scale of 0–100% with intervals of 10 (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, etc.), and the motility time (MT) in seconds of the spermatozoids from their activation with seawater to grade 3 movement (as described above). Only the sperm samples from males with grade 4 movement and 90–100% of active sperm cells were considered useful for the experiments (Aas *et al.*, 1991).

Based on these parameters, to estimate the motility index (MI) the graduation of the movement was multiplied by the percentage of active cells (e.g., 4×100 equals a MI of 400). A MI of 100% is considered the minimum necessary to fertilize an egg (Satterfield and Flickinger, 1995).

The parameters of sperm quality (MT, percentage of active cells and type of movement) were evaluated after activating 50 µL of sperm from each replica with one drop of seawater (UV-treated and filtered through cartridges of 10- and 1-µm pore size).

Artificial fertilization and incubation

The females used in the experiments were induced to spawn with LHRHa (Sigma Chemical®), following the

grado 4 en la escala descrita y con un 90% a 100% de células espermáticas activas (Aas *et al.*, 1991).

A partir de dichos parámetros se estimó el IM, multiplicando la graduación del movimiento por el porcentaje de células activas (p.e., 4×100 igual a un IM de 400). Un IM de 100% es considerado como el mínimo necesario para fertilizar un óvulo (Satterfield y Flickinger, 1995).

Los parámetros de calidad del semen (T, porcentaje de células activas y tipo de movimiento) fueron evaluados después de activar 50 μ L de semen de cada réplica con una gota de agua de mar (tratada con luz UV y filtrada con cartuchos de 10 y 1 μ m de diámetro de poro).

Fertilización artificial e incubación

Las hembras empleadas en los experimentos fueron inducidas al desove con LHRHa (Sigma Chemical®), siguiendo las recomendaciones de Duncan y Rodríguez (2001). Para la fertilización se utilizaron 1.67 ± 0.47 g (media $\pm$ desviación estándar) de huevos por cada réplica. La fertilización artificial se llevó a cabo mezclando los espermatozoides y los huevos suavemente, y activándolos con agua de mar. Las muestras (réplicas) de semen **A** y **B** fueron activadas con agua de mar en dilución 1:100, con 19.8 mL, y las del tratamiento **C** con 10 mL (Duncan y Rodríguez, 2001).

Debido a que los huevos de esta especie se adhieren y el vidrio resultó ser una superficie adecuada, se utilizaron tres portaobjetos por réplica. La incubación se realizó en cubetas de plástico oscuro con capacidad de 8 L, con flujo continuo de agua tratada con luz UV y filtros de cartucho de 20 y 5 μ m de diámetro de poro. El fotoperiodo fue controlado a 11 h de luz y 13 h de oscuridad.

En cada portaobjetos se hicieron tres conteos de huevecillos vivos y muertos en campos seleccionados al azar, de acuerdo a las características señaladas por Yamahira (1997), con ligeras modificaciones conforme a lo siguiente: los huevecillos vivos son esféricos y transparentes, con pequeños glóbulos de aceite en el citoplasma, muestran movimientos esporádicos a las 24 h de incubación, y los muertos son blanquecinos y opacos, en algunos casos con el saco de vitelo fragmentado.

Análisis estadísticos

Las variables consideradas fueron el IM (Satterfield y Flickinger, 1995), la duración del movimiento de las células espermáticas en segundos (T) y los porcentajes de supervivencia de los embriones a las 24, 48 y 72 h de incubación.

La supervivencia (*S*) fue calculada de acuerdo a la fórmula:

$$S = E_v / (E_v + E_m) \times 100$$

donde E_v es el número de embriones vivos por conteo a las 24, 48 y 72 h; E_m , los embriones muertos por conteo a las 24, 48 y 72 h; y 100, para obtener conversión porcentual.

recommendations of Duncan and Rodríguez (2001). For the fertilization, 1.67 ± 0.47 g (mean $\pm$ standard deviation) of eggs were used per replica. For the artificial fertilization, the spermatozooids were softly mixed with the eggs and activated with seawater. Sperm samples (replicates) **A** and **B** were activated with seawater diluted 1:100, with 19.8 mL, and those from treatment **C** with 10 mL (Duncan and Rodríguez, 2001).

Since the eggs of this species attached to the glass surface, three slides were used per replica. Incubation occurred in 8-L dark plastic buckets with continuous flow of UV-treated water, filtered through 20- and 5- μ m cartridges. The controlled photo-period was 11:13 h light:dark.

Three counts of live and dead eggs in random fields were done for each slide, according to the characteristics reported by Yamahira (1997), with slight modifications as follows: live eggs are spherical and transparent, with small oil globules in the cytoplasm, showing sporadic movements after 24 h of incubation; and dead eggs are whitish and opaque, in some cases with fragmented yolk sac.

Statistical analysis

The variables considered were the MI (Satterfield and Flickinger, 1995), MT and the survival rates of the embryos at 24, 48 and 72 h of incubation.

Survival (*S*) was calculated as follows:

$$S = E_v / (E_v + E_m) \times 100$$

where E_v is the live embryos per count at 24, 48 and 72 h; E_m , the dead embryos per count at 24, 48 and 72 h; and 100, percentage conversion.

The MI estimated for each treatment and the survival percentages after 24, 48 and 72 h of incubation were arc-sine transformed in order to achieve additivity of effects (Zar, 1984). The MI, MT and survival rate data were compared by two-way analysis of variance carried out separately and according to the type of variable. The significance value was $P \leq 0.05$. The multiple comparison tests of Tukey and Dunn were applied (Zar, 1984; Daniel, 1990).

Results

Analysis of the irradiated samples showed significant differences for the duration of movement in seconds of the sperm cells (MT) ($P = 0.0017$). The multiple comparison indicated that these differences were due solely to the MT value from treatment **C** with 1.0 J cm^{-2} (12.0 ± 20.7 s; mean $\pm$ standard deviation). There were no significant differences between minimum and maximum MT values (21.0 ± 0.0 and 40.0 ± 0.0 s, respectively) of control groups **A** and **B**; the values (25.6 ± 2.3 and 42.3 ± 4.0 s, respectively) for the **C** samples irradiated with 0.2 – 0.9 J cm^{-2} were high in relation to those of the control samples, though there was no significant difference (fig. 1).

Los IM estimados de cada tratamiento y los porcentajes de supervivencia a las 24, 48 y 72 h de incubación fueron transformados a la función arcoseno con el propósito de lograr la aditividad de efectos (Zar, 1984). Los datos de IM, T y los porcentajes de supervivencia fueron comparados por análisis de varianza de dos vías realizados por separado y de acuerdo con el tipo de variable. Se estableció el valor de significancia a $P \leq 0.05$. Se aplicaron las pruebas de comparación múltiple de Tukey y Dunn (Zar, 1984; Daniel, 1990).

Resultados

Al analizar las muestras irradiadas se encontraron diferencias significativas en la duración del movimiento en segundos, T ($P = 0.0017$). La comparación múltiple indicó que dichas diferencias se deben solamente al valor T del tratamiento C irradiado con la dosis de 1.0 J cm^{-2} ($12.0 \pm 20.7 \text{ s}$; media $\pm$ desviación estándar). Las T mínima y máxima (21.0 ± 0.0 y $40.0 \pm 0.0 \text{ s}$, respectivamente) de los grupos controles A y B no mostraron diferencias significativas entre sí. Las muestras irradiadas con las dosis de 0.2 a 0.9 J cm^{-2} mostraron valores aparentemente altos (25.6 ± 2.3 y $42.3 \pm 4.0 \text{ s}$, respectivamente) comparados con los de las muestras control, aunque no hubo diferencias significativas (fig. 1).

En todos los tratamientos se observó esperma con grado 4 de movimiento al ser activado. Los IM (fig. 2) presentaron diferencias significativas entre grupos y entre tratamientos para el grupo tratado ($P = 0.001$). La comparación múltiple de Tukey mostró que el grupo C se caracterizó por cuatro respuestas en el IM observado. El índice de motilidad más alto correspondió a esperma sometido a las dosis de 0.2 a 0.3 J cm^{-2} , con

When activated, grade 4 sperm movement was observed in all treatments. The MI values (fig. 2) indicated significant differences among groups and among treatments for the group treated ($P = 0.001$). Tukey's multiple comparison test showed that the MI for treatment C were characterized by four groups depending on their response to the different radiation doses: the highest MI corresponded to sperm irradiated with $0.2\text{--}0.3 \text{ J cm}^{-2}$, with a MI not statistically different from the controls; the second group consisted of sperm irradiated with $0.4\text{--}0.7 \text{ J cm}^{-2}$, with MI similar among themselves but significantly lower than those of the controls; the third group corresponded to the sperm irradiated with $0.8\text{--}0.9 \text{ J cm}^{-2}$, with an increase in MI but still significantly different from the controls; and, finally, the fourth group corresponded to the sperm irradiated with 1.0 J cm^{-2} , which was significantly different from the controls (fig. 2).

The survival percentages showed a curve with four phases at 24, 48 and 72 h of incubation. The analysis of variance indicated significant differences ($P = 0.001$) only for treatment C and the incubation periods (24, 48 and 72 h) ($P = 0.001$). There were no significant differences between controls A and B, so they were treated as a single group in figure 3. Tukey's multiple comparison test showed that the first phase of the survival curve corresponds to embryos of control groups A and B, and to group C embryos irradiated with 0.2 J cm^{-2} , with survival rates ranging from $100 \pm 0.0\%$ (at 24 h) to $89.7 \pm 4.20\%$ (at 72 h), with no significant differences between them. The second phase of the curve shows decreased survival of the embryos exposed to $0.3\text{--}0.4 \text{ J cm}^{-2}$, ranging from $76.6 \pm 17.8\%$ (at 24 h) to $17.1 \pm 12.8\%$ (at 72 h). In the third phase there was a significant increase in survival rates corresponding

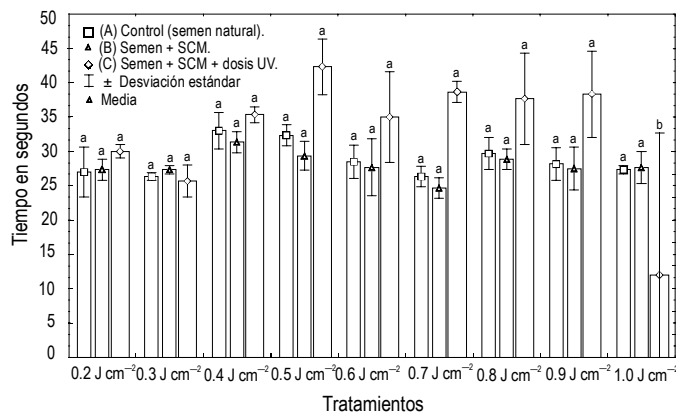


Figura 1. Efecto de los tratamientos A, B y C ($0.2\text{--}1.0 \text{ J cm}^{-2}$) en la duración del movimiento en segundos de las células espermáticas (letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas en los valores entre y dentro de cada tratamiento o grupo, respectivamente, mientras que las minúsculas diferentes indican valores con diferencias significativas entre y dentro de cada grupo).

Figure 1. Effect of treatments A, B and C ($0.2\text{--}1.0 \text{ J cm}^{-2}$) on motility time in seconds of the sperm cells (same lower case letters indicate that the values are not significantly different between and within each treatment or group, respectively, whereas the different lower case letters indicate significantly different values between and within each group).

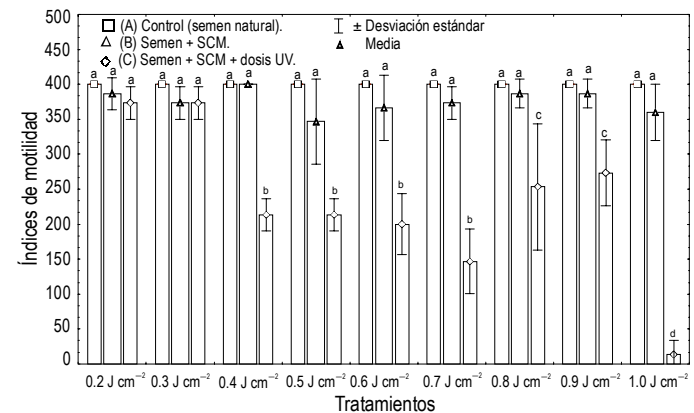


Figura 2. Efecto de los tratamientos A, B y C ($0.2\text{--}1.0 \text{ J cm}^{-2}$) en los índices de motilidad (letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas en los valores entre y dentro de cada tratamiento o grupo, respectivamente, mientras que las minúsculas diferentes indican valores con diferencias significativas entre y dentro de cada grupo).

Figure 2. Effect of treatments A, B and C ($0.2\text{--}1.0 \text{ J cm}^{-2}$) on motility indexes (same lower case letters indicate that the values are not significantly different between and within each treatment or group, respectively, whereas the different lower case letters indicate significantly different values between and within each group).

un IM no estadísticamente diferente de los controles. En un segundo grupo se encontraron los IM de esperma sometido a las dosis de 0.4 a 0.7 J cm⁻², con IM no diferentes entre sí, pero significativamente menores que los controles. La tercer respuesta correspondió a los IM de las dosis de 0.8 a 0.9 J cm⁻², observándose un aumento en los IM, pero siendo aún significativamente diferente de los controles. Por último, el cuarto grupo, en que el esperma fue sometido al tratamiento con una dosis de 1.0 J cm⁻², resultó significativamente diferente a los controles (fig. 2).

Los porcentajes de supervivencia mostraron una curva con cuatro fases a las 24, 48 y 72 h de incubación. El análisis de varianza indicó diferencias significativas ($P = 0.001$) sólo en el grupo C y entre periodos de incubación (24, 48 y 72 h) ($P = 0.001$). Los controles A y B no mostraron diferencias significativas entre sí, por lo que fueron considerados como un solo grupo en la figura 3 y de acuerdo con los periodos de incubación. La comparación múltiple de Tukey mostró que la primera fase de la curva de supervivencia corresponde a los embriones de los grupos controles A y B, y a los embriones del grupo C sometidos a la dosis de 0.2 J cm⁻², con porcentajes de supervivencia que variaron de 100 ± 0.0 (a las 24 h) a 89.7 ± 4.20 % (a las 72 h), sin diferencias significativas entre sí. La segunda fase de la curva muestra un descenso en la supervivencia de los embriones en las dosis de 0.3 a 0.4 J cm⁻², con intervalos de 76.6 ± 17.8 (a las 24 h) a 17.1 ± 12.8 % (a las 72 h). En la tercera fase se observó un incremento significativo en la supervivencia correspondiente a embriones fertilizados con esperma UV irradiado con dosis de 0.5 a 0.8 J cm⁻², con porcentajes de 99.8 ± 0.35 (a las 24 h) a 26.3 ± 19.8 (a las 72 h) (fig. 3). La cuarta fase, que corresponde a las dosis de 0.9 a 1.0 J cm⁻², mostró un descenso significativo en la supervivencia de embriones, con valores de 90.1 ± 3.18 (a las 24 h) a 0.0 % (a las 72 h) en la dosis de 1.0 J cm⁻² (fig. 3).

Se observó un descenso significativo en la supervivencia de 24 a 48 h y de 48 a 72 h, el cual fue causado principalmente por el incremento en mortalidad de los embriones del grupo C, observándose los efectos más drásticos cuando se considera la dosis de 1.0 J cm⁻² (fig. 3).

El análisis del desarrollo morfológico de los embriones fotografiados permitió identificar un patrón de desarrollo relativamente homogéneo con las dosis de radiación intermedia (0.5 a 0.8 J cm⁻²), el cual se caracterizó por la presencia de una columna vertebral doblada, cola reducida, saco vitelino grande en relación con el tamaño de los embriones, y ojos acromáticos (fig. 4a), características comúnmente observadas en embriones haploides. Los embriones diploides (controles) se presentan en la figura 4b, en la que se observa la columna vertebral recta y larga, saco vitelino proporcional al tamaño de los embriones (los glóbulos de aceite son aparentemente más pequeños y en mayor cantidad) y ojos cromáticos. Con las dosis menores a 0.4 J cm⁻² y mayores a 0.8 J cm⁻² el desarrollo morfológico de los embriones fue anormal y desordenado. Estas observaciones morfológicas coinciden con los porcentajes más altos de supervivencia a las 72 h, los cuales se obtuvieron utilizando una

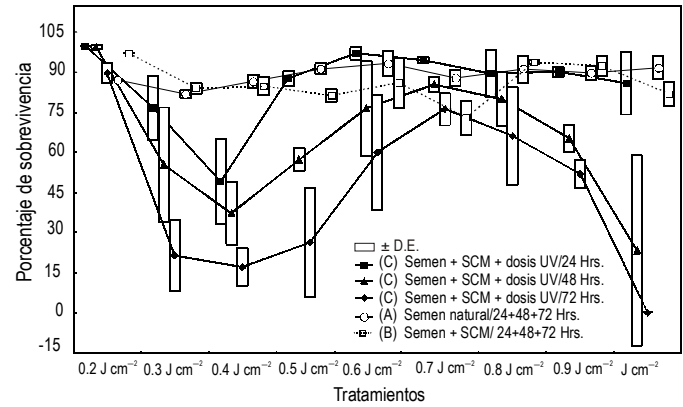


Figura 3. Efecto de nueve dosis de radiación UV (0.2–1.0 J cm⁻²) en la supervivencia de los embriones de *Spherooides annulatus* a las 24, 48 y 72 h de incubación. Los controles A y B fueron considerados como un solo dato a las 24, 48 y 72 h de incubación en las curvas de supervivencia (letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas en los valores entre y dentro de cada tratamiento o grupo, respectivamente, mientras que las minúsculas diferentes indican valores con diferencias significativas entre y dentro de cada grupo).

Figure 3. Effect of nine doses of UV radiation (0.2–1.0 J cm⁻²) on the survival of *Spherooides annulatus* embryos at 24, 48 and 72 h of incubation. Control groups A and B were considered together at 24, 48 and 72 h of incubation in the survival curves (same lower case letters indicate that the values are not significantly different between and within each treatment or group, respectively, whereas the different lower case letters indicate significantly different values between and within each group).

to embryos fertilized with UV-irradiated sperm with 0.5–0.8 J cm⁻², ranging from 99.8 ± 0.35% (at 24 h) to 26.3 ± 19.8% (at 72 h) (fig. 3). Doses 0.9–1.0 J cm⁻² in the fourth phase showed a significant decrease in the survival rate of embryos, with values of 90.1 ± 3.18% (at 24 h) to 0.0% (at 72 h) in the 1.0 J cm⁻² treatment (fig. 3).

There was a significant decrease in survival rate during 24–48 h and from 48–72 h, mainly due to the increase in mortality of group C embryos, and more drastic effects were apparent with the 1.0 J cm⁻² dosage (fig. 3).

Analysis of the morphological development of the embryos photographed revealed a pattern of relatively homogeneous morphological development in the intermediate radiation treatments (0.5–0.8 J cm⁻²), characterized by the presence of a bent spinal column, reduced tail, large yolk sac relative to the size of the embryos and acromatic eyes (fig. 4a), characteristics common to haploid embryos. The diploid embryos (control) are shown in figure 4b, with straight and long spinal column, yolk sac proportional to the size of the embryos (oil globules are apparently smaller and more abundant) and chromatic eyes. With dosages below 0.4 J cm⁻² and above 0.8 J cm⁻² the morphological development of the embryos was abnormal and disorderly. These morphological observations coincide with the highest survival percentages at 72 h, which were obtained using a dose of 0.7 J cm⁻². The hatched larvae (fig. 4c) had short and bent spinal columns, acromatic eyes, distorted yolk sacs and atrophied digestive tracts, i. e., the so-

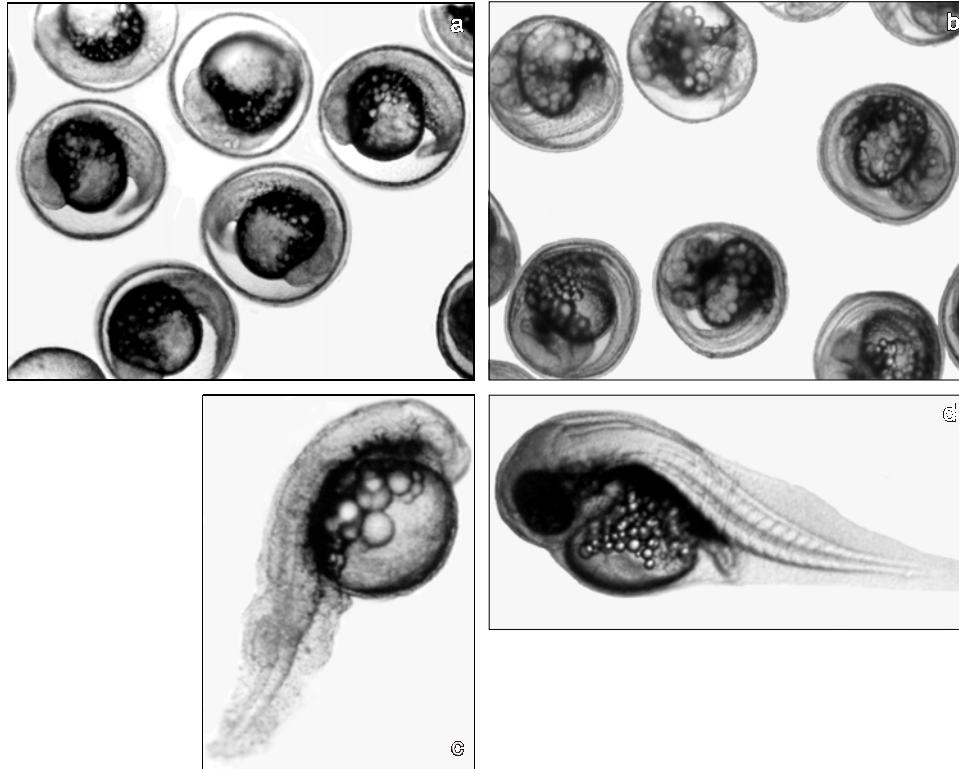


Figura 4. Patrones de desarrollo embrionario en *Sphoeroides annulatus*, mostrando: (a) embriones haploides con columna vertebral doblada y corta, ojos acromáticos; (b) embriones diploides normales con 72 h de incubación; (c) larva mostrando las características típicas del síndrome haploide, columna vertebral doblada y corta, ojos acromáticos y saco vitelino distorsionado; (d) larva diploide normal horas después de la eclosión.

Figure 4. Patterns of embryonic development of *Sphoeroides annulatus*, showing: (a) haploid embryos with bent and short spinal column, and acromatic eyes; (b) normal diploid embryos after 72 h of incubation; (c) larva with bent and short spinal column, acromatic eyes and distorted vitelline sac, typical characteristics of the haploid syndrome; (d) normal diploid larva hours after hatching.

dosis de 0.7 J cm^{-2} . Las larvas resultantes (fig. 4c) se caracterizaron por la presencia de una columna vertebral doblada y corta, ojos acromáticos, saco vitelino distorsionado y tubo digestivo atrofiado, esto es, con el llamado “síndrome haploide”. Comparativamente, las larvas de los controles mostraron columna vertebral recta y saco vitelino proporcional al tamaño de las larvas y los ojos mostraron pigmentación y tubo digestivo con desarrollo normal (fig. 4d).

Discusión

Los resultados de la duración del movimiento en segundos (T) con todas las dosis de radiación evaluadas (a excepción de 1.0 J cm^{-2}) no mostraron diferencias significativas con relación a los controles experimentales (A y B), lo que difiere de lo reportado en otros estudios. Se ha identificado que la radiación UV reduce el tiempo del movimiento de las células espermáticas (Don y Avtalion, 1993; Huerta, 1999), y en algunos casos (*P. maculatofasciatus*) a valores menores que los registrados en los grupos control (Huerta, 1999).

En *Oreochromis niloticus*, Don y Avtalion (1993) identificaron que la dosis de 0.09 J cm^{-2} no genera daños en las

called haploid syndrome. In comparison, the larvae from the control groups had straight spinal columns, yolk sacs proportional to their size of the larvae, pigmented eyes and normal development of the digestive tracts (fig. 4d).

Discussion

The results obtained for the duration of movement in seconds (T) with all the radiation doses evaluated (except for 1.0 J cm^{-2}) did not show significant differences in relation to the control experiments (A and B). This differs from that reported in other studies, as UV radiation has been found to reduce the time of movement of sperm cells (Don and Avtalion, 1993; Huerta, 1999), in some cases (*P. maculatofasciatus*) to values lower than those previously reported for control groups (Huerta, 1999).

Don and Avtalion (1993) identified that, for *Oreochromis niloticus*, the dose of 0.09 J cm^{-2} did not damage the sperm mitochondria, but that dosages from 0.27 to 0.57 J cm^{-2} did, appearing like empty capsules. Motility of the sperm cells was not significantly affected at radiation doses below 0.2 J cm^{-2} , whereas at doses above 0.9 J cm^{-2} the sperm cells were

mitocondrias espermáticas, mientras que las dosis de 0.27 a 0.57 J cm⁻² sí, observándose como cápsulas vacías. En las dosis de radiación menores a 0.2 J cm⁻² la motilidad de las células espermáticas no fue afectada significativamente, mientras que en dosis superiores a 0.9 J cm⁻² las células espermáticas fueron lesionadas en su totalidad siendo característica la pérdida del flagelo. En el presente trabajo, los valores extremadamente bajos de T en la dosis de 1.0 J cm⁻² (fig. 1) permiten inferir que los espermatozoides fueron dañados, aunque no se lograron hacer observaciones directas de los mismos.

El hecho de no encontrar un efecto sobre la motilidad de los espermatozoides en el presente estudio (dosis de 0.2 a 0.9 J cm⁻²) puede ser explicado con base en resultados previos en trucha y carpa, en las que se encontró que el movimiento de los espermatozoides no depende totalmente de la energía (ATP) proveniente de las mitocondrias (Billard y Cosson, 1992; Perchec *et al.*, 1995). En estas especies se ha identificado que el nivel de ATP intracelular disminuye en la fase activa de los espermatozoides, pero éste se incrementa gradualmente antes de que la motilidad se detenga (Billard y Cosson, 1992), en parte porque es almacenado en el citoplasma previamente a su utilización (Perchec *et al.*, 1995). La concentración de cationes como el Mg²⁺ (de la SCM) reducen la acción inhibitoria de la motilidad por parte del K⁺ como ha sido probado en *Takifugu niphobles* (Takai y Morisawa, 1995). También se ha demostrado que el fosfato de creatinina en semen de trucha ayuda a mantener la motilidad por un tiempo superior a los 30 s (Cosson *et al.*, 1991).

Con respecto a los IM, en el primer grupo con dosis de 0.2 y 0.3 J cm⁻², 100% y 93.3% de las células activas, respectivamente, presentaron valores más altos que los encontrados por Christensen y Tiersch (1994) en *Ictalurus punctatus* (77.0% y 64.0%, respectivamente). Las diferencias encontradas indican que la susceptibilidad de las células espermáticas a la radiación UV varía dependiendo de la especie y de las condiciones experimentales. Christensen y Tiersch (1994) emplearon testículos macerados de bagre en combinación con una solución extendidora, lo que no favoreció un decremento en la penetración de la radiación en los espermatozoides y causó que los porcentajes de células activas fueran bajos.

En el segundo grupo (0.4 a 0.7 J cm⁻²) se identificó un decremento en los IM, con células activas que mostraron valores de 83.3% a 43.3%, también superiores a los obtenidos por Christensen y Tiersch (1994), con un máximo (con 0.4 J cm⁻²) y mínimo (con 0.7 J cm⁻²) de 30% y 20% de células activas, respectivamente. En el tercer grupo (0.8 a 0.9 J cm⁻²) se observó el aumento de los IM y del porcentaje de células activas de 61.6% a 51.6%, valores que fueron altos en relación con la lisis de células espermáticas reportada por Don y Avtalion (1993) en *O. niloticus*. Los resultados con la dosis de 1.0 J cm⁻² fueron característicos del cuarto grupo, coincidiendo con los valores de 5.0% de células activas obtenidos por Christensen y Tiersch (1994).

severely affected, presenting the characteristic loss of the flagellum. In this study, the extremely low MT values obtained with the 1.0 J cm⁻² dosage (fig. 1) indicate that the spermatozooids were damaged, though direct observations of them were not possible.

The fact that there was no effect on the motility of spermatozooids (doses 0.2–0.9 J cm⁻²) in this study can be explained based on previous results obtained for trout and carp, showing that the movement of spermatozooids does not depend entirely on the energy (ATP) provided by the mitochondria (Billard and Cosson, 1992; Perchec *et al.*, 1995). In these species, the level of intracellular ATP decreases in the active phase of the spermatozooids, but gradually increases before motility ceases (Billard and Cosson, 1992), partly because it is stored in the cytoplasm prior to being used (Perchec *et al.*, 1995). The concentration of cations like Mg²⁺ (from CES) reduces the inhibitory action of K⁺ on motility, as has been shown for *Takifugu niphobles* (Takai and Morisawa, 1995). Creatinine phosphate in trout sperm has been found to help maintain motility for longer than 30 s (Cosson *et al.*, 1991).

Regarding the MI, the first group, irradiated with 0.2 and 0.3 J cm⁻², showed 100% and 93.3%, respectively, of active cells. These values are higher than those reported by Christensen and Tiersch (1994) for *Ictalurus punctatus* (77.0% and 64.0%, respectively). The differences found indicate that the susceptibility of the sperm cells to UV radiation varies depending on the species and experimental conditions. Christensen and Tiersch (1994) used macerated catfish testicles in combination with an extender solution, which did not favour a decrease in the penetration of radiation in the spermatozooids and resulted in low percentages of active cells.

The MI decreased in the second group (0.4–0.7 J cm⁻²), with values between 83.3% and 43.3% for the active cells; these values are also higher than those obtained by Christensen and Tiersch (1994), with a maximum (at 0.4 J cm⁻²) and minimum (at 0.7 J cm⁻²) of 30% and 20% active cells, respectively. In the third group (0.8–0.9 J cm⁻²), the MI and the percentage of active cells increased (from 61.6% to 51.6%); these values are high in relation to the sperm cell lysis reported by Don and Avtalion (1993) for *O. niloticus*. The results obtained for the 1.0 J cm⁻² dosage were characteristic of the fourth group, and coincided with the value of 5.0% of active cells obtained by Christensen and Tiersch (1994).

The survival rates for the incubation periods (24, 48 and 72 h) show the classic pattern of the Hertwig effect, characterized by four phases (fig. 3). In the first phase, high survival percentages were obtained for control groups A and B, and for the 0.2 J cm⁻² treatment of group C. According to Don and Avtalion (1993), sperm samples irradiated with 0.09–0.27 J cm⁻² show deficient condensation of sperm chromatin and partial destruction of the plasma and nuclear membranes, but no damage was found in the flagellum and only a small amount of damage to the mitochondria, resulting in high fertilization potential of spermatozooids.

Los porcentajes de supervivencia en los periodos de incubación (24, 48 y 72 h) muestran el patrón clásico del efecto Hertwig que se caracterizó por cuatro fases (fig. 3):

La primera mostró porcentajes de supervivencia altos en los controles **A** y **B**, y con la dosis de 0.2 J cm^{-2} del grupo **C**. De acuerdo con Don y Avtalion (1993), las muestras de semen que son irradiadas de 0.09 a 0.27 J cm^{-2} muestran una deficiente condensación de la cromatina espermática y destrucción parcial de la membrana plasmática y nuclear, pero sin daño del flagelo y con reducido número de mitocondrias dañadas, lo que produce un alto potencial de fertilización de los espermatozoides.

En la segunda fase (0.3 a 0.4 J cm^{-2}) hubo mortalidades masivas durante los periodos de incubación, probablemente por los efectos resultantes de la ruptura parcial del genoma paterno y por los efectos derivados de fragmentos grandes de dímeros de pirimidina; esto puede ocasionar la expresión inapropiada de genes paternos esenciales en los primeros estadios de desarrollo (Egami y Ijiri, 1979; Regan y Carrier, 1982; Don y Avtalion, 1993).

Adicionalmente a los efectos físicos directos de la radiación, Regan y Carrier (1982) y Don y Avtalion (1993) han señalado la posible interferencia de la cromatina, desorganizada por causa de la radiación UV, en la eficiencia de mecanismos de reparación existentes en los huevos de las especies manipuladas. Asimismo, los genes mutantes o los cromosomas anormales que se formen a consecuencia de la radiación o por una reparación incorrecta, pueden propiciar la aparición de productos letales.

Fue en la tercera fase (0.5 a 0.8 J cm^{-2}) en la cual se identificó un incremento en la supervivencia (fig. 3). Esto puede ser explicado sobre la base de las conclusiones de Don y Avtalion (1993). Estos autores encontraron que en dosis de 0.57 a 0.9 J cm^{-2} , las células espermáticas de *O. niloticus* presentan defectos en la membrana citoplásmica y nuclear, observándose cromatina dispersa y fragmentada. La ruptura de la membrana nuclear resulta en la exposición de la cromatina de origen paterno (del espermato radiado) a ser digerida por las nucleasas en el citoplasma del huevo, resultando esto en embriones que sólo expresan el complemento cromosómico materno (no irradiado), esto es, son haploides “completos” (Egami y Ijiri, 1979; Regan y Carrier, 1982; Don y Avtalion, 1993). El aumento en la viabilidad de los embriones en esta fase (periodo de eclosión 72 h de incubación) puede entonces ser el resultado de un incremento en los porcentajes de cigotos haploides (Don y Avtalion, 1993).

La cuarta fase (0.9 y 1.0 J cm^{-2}) (fig. 3), donde se observó la menor supervivencia en el presente estudio, puede ser explicada por el daño causado a las células espermáticas a consecuencia de la alta dosis de radiación. La motilidad fue la menor, lo que permite inferir que están totalmente lisadas y sin flagelo, de acuerdo con lo observado por Don y Avtalion (1993). Esto resultaría en muy baja eficiencia de fertilización y altas mortalidades en las primeras horas de incubación (Don y

In the second phase (0.3 – 0.4 J cm^{-2}), mass mortalities occurred during the incubation periods, probably due to the effects produced by the partial rupture of the paternal genome and by large fragments of pyrimidine dimers. This can cause the inappropriate expression of essential paternal genes in the first stages of development (Egami and Ijiri, 1979; Regan and Carrier, 1982; Don and Avtalion, 1993).

In addition to the direct physical effects from radiation, Regan and Carrier (1982) and Don and Avtalion (1993) have indicated that the disorganization of chromatin due to radiation quite possibly interferes with the recovery mechanisms in the eggs of the manipulated species. Furthermore, mutant genes or abnormal chromosomes formed as a result of the radiation or incorrect recovery, can contribute to the appearance of lethal products.

The third phase (0.5 – 0.8 J cm^{-2}) showed an increase in survival (fig. 3), which can be explained based on Don and Avtalion's (1993) conclusions. These authors also observed that at dosages of 0.57 – 0.9 J cm^{-2} , the sperm cells of *O. niloticus* present defects in the cytoplasmic and nuclear membranes, with scattered and fragmented chromatin. Rupture of the nuclear membrane exposes the chromatin of paternal origin (of the radiated sperm) to be digested by the nucleases in the egg's cytoplasm, producing embryos that only express the maternal chromosome complement (not irradiated), that is, they are “complete” haploids (Egami and Ijiri, 1979; Regan and Carrier, 1982; Don and Avtalion, 1993). The increased viability of the embryos in this phase (hatching period at 72 h of incubation) can thus be the result of an increase in the percentages of haploid zygotes (Don and Avtalion, 1993).

The fourth phase (0.9 and 1.0 J cm^{-2}) (fig. 3) had the lowest survival of this study and this can be explained by the damage to the sperm cells caused by the high radiation doses. Motility was lowest, indicating that they are completely damaged and without flagellum, in accordance with that observed by Don and Avtalion (1993). This results in low fertilization efficiency and high mortalities in the first hours of incubation (Don and Avtalion, 1993; Li *et al.*, 2000), and therefore in very low survival rates.

Regarding the larvae that hatched, the 0.7 J cm^{-2} dosage produced organisms with typical haploid syndrome characteristics, such as delayed development, distorted yolk sac, bent spinal column, reduced tail and acromatic eyes (fig. 4c), indicative characteristics of the inactivation or total destruction of the paternal genome (Suwa *et al.*, 1994; Valcárcel *et al.*, 1994). A comparison of the haploid embryos, generated by the intermediate radiation doses (e.g., 0.7 J cm^{-2}), and the possible aneuploids (embryos in which the number of chromosomes is not an exact multiple of the typical haploid set) probably generated by the low radiation doses and the unfertilized eggs in the high doses, clearly shows that most damage to the generation of haploid embryos occurs with low radiation doses, since the embryos do not survive even though they have been fertilized, nor do they hatch at the end of the incubation period (72 h). On the other hand, the haploid embryos hatched and

Avtalion, 1993; Li *et al.*, 2000), y por tanto en una muy baja supervivencia.

Con respecto a las larvas que eclosionaron, la dosis de 0.7 J cm^{-2} produjo organismos con las características típicas del síndrome haploide, como son retraso en el desarrollo, saco vitelino distorsionado, columna vertebral doblada, cola reducida y ojos acromáticos (fig. 4c), características indicativas de la inactivación o de la destrucción total del genoma paterno (Suwa *et al.*, 1994; Valcárcel *et al.*, 1994). Comparando los embriones haploides, generados mediante las dosis de radiación intermedias como la de 0.7 J cm^{-2} , con los posibles aneuploides (embriones en los que el número de cromosomas no es múltiplo exacto del juego haploide típico) probablemente generados con las dosis de radiación bajas y los huevos no fecundados de las altas, es claro que el mayor daño sobre la generación de embriones haploides está dado por las dosis de radiación bajas, ya que los embriones no sobreviven a pesar de haber ocurrido la fertilización, ni eclosionan al final del período de incubación (72 h). Por el contrario, los embriones haploides eclosionan, sobreviviendo hasta las 24 h. Estas observaciones coinciden con las presentadas por Fujioka (1993), Sumantadinata *et al.* (1990), Mair (1993), Valcárcel *et al.* (1994), Gomelsky *et al.* (2000) y Galbusera *et al.* (2000) para otras especies de peces.

En conclusión, los resultados de supervivencia obtenidos, en los que se observa un marcado decremento con las dosis de radiación de 0.3 a 0.4 J cm^{-2} , un incremento significativo con las de 0.5 a 0.8 J cm^{-2} y un nuevo decremento con la de 1.0 J cm^{-2} , demuestran en este estudio el comportamiento clásico del efecto Hertwig, de acuerdo con Purdom (1969, 1983), Egami e Ijiri (1979), Chourrout (1982) y Valcárcel *et al.* (1994).

Además, puede concluirse que estos resultados (aunados a los obtenidos con el IM) indican que la dosis óptima para la producción de larvas con las características típicas del síndrome haploide se encuentra cercana a 0.7 J cm^{-2} , indicando nuevamente que ésta puede ser la dosis más adecuada para producir organismos ginogenéticos.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con financiamiento del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán (proyecto fiscal 2000-6250-1) y del proyecto CONACYT J-28342B, cuyo responsable es Neil J. Duncan, a quien los autores agradecen su participación en el manejo reproductivo de los organismos. Fue también importante para el buen desempeño de este trabajo la valiosa participación del grupo de reproducción y nutrición. Se agradecen también las correcciones sugeridas por Ana María Ibarra Humphries, quien tuvo a bien revisar este documento.

Referencias

Aas, G.H., Refstie, T. and Gjerde, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125–132.

survived for 24 h. These observations coincide with those reported by Sumantadinata *et al.* (1990), Fujioka (1993), Mair (1993), Valcárcel *et al.* (1994), Gomelsky *et al.* (2000) and Galbusera *et al.* (2000) for other fish species.

In conclusion, the survival results obtained, showing a marked decrease with the radiation doses of 0.3 and 0.4 J cm^{-2} , a significant increase in survival rates with doses of 0.5 to 0.8 J cm^{-2} and another decrease with the dose of 1.0 J cm^{-2} , indicate a classic behaviour of the Hertwig effect, according to Purdom (1969, 1983), Egami and Ijiri (1979), Chourrout (1982) and Valcárcel *et al.* (1994).

Furthermore, the results obtained (together with those obtained for MI) indicate that the optimum dose for the production of larvae with typical characteristics of the haploid syndrome is close to 0.7 J cm^{-2} ; hence, this dose could be the most appropriate for the production of gynogenetic organisms.

Acknowledgements

This study received financial support from Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Mazatlán (project 2000-6250-1), and from CONACYT project J-28342B, headed by Neil J. Duncan, whom we thank for his participation in the reproductive handling of the organisms. We also thank the breeding and nutrition group for their valuable cooperation, and Ana María Ibarra-Humphries for the revision and corrections of the text.

English translation by Christine Harris.

-
- Abdo-de la Parra, M.I., García-Ortega, A., Martínez-Rodríguez, I., González-Rodríguez, B., Velasco, G. and Duncan, N.J. (2001). Larval rearing of the Mexican bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* under hatchery conditions. *Larvi 2001, 3rd Fish and Shellfish Larviculture Symposium*, Gent, Belgium, 663 pp.
- Arai, K. (2000). Chromosome manipulation in aquaculture: Recent progress and perspective. *Suisanzoshoku*, 48: 295–303.
- Arias-Rodríguez, L. (2001). Inactivación genética de esperma e inducción de ginogénesis y de triploidía en el botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México, 202 pp.
- Billard, R. and Cosson, M.P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.*, 261: 122–131.
- Castellanos, R.S., García R., J.L., Guevara O., J.L. y Franco A., F.C. (1982). Aportación al conocimiento de la especie *Sphoeroides annulatus* (Jenyns). Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa, México, 42 pp.
- Chourrout, D. (1982). Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm. *J. Exp. Zool.*, 223: 175–181.
- Chourrout, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36: 111–126.
- Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. (1994). Standardization of ultraviolet irradiation of channel catfish sperm. *J. World Aquacult. Soc.*, 25: 571–575.

- Cosson, M.P., Cosson, J. and Billard, R. (1991). Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence of movement parameters whatever the incubation medium. *Cell Motil. Cytoskel.*, 20: 55–68.
- Daniel, W.W. (1990). *Applied Nonparametric Statistics*. 2nd ed. PWS Kent Publishing Co., Boston, 635 pp.
- Don, J. and Avtalion, R.R. (1993). Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: Electron microscopic analysis. *J. Fish Biol.*, 41: 1–14.
- Duncan, N.J. and Rodríguez, M. de O.G.A. (2001). Induced spawning of the bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* using LHRHa. In: The International Triennial Conference and Exposition of World Aquaculture Society. Book of abstracts. Florida, 754 pp.
- Duncan, N.J., Rodríguez, M. de O., Alok, D. and Zohar, Y. (2003). Effects of controlled and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture*, 218: 625–635.
- Egami, N. and Ijiri, K.-I. (1979). Effects of irradiation on germ cells and embryonic development in teleosts. *Int. Rev. Cytol.*, 59: 195–248.
- Fujioka, Y. (1993). Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in Honmoroko *Gnathopogon caurulescens*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 493–500.
- Galbusera, P., Volckaert, F.A.M. and Ollevier, F. (2000). Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation. *Aquaculture*, 185: 25–42.
- Geffen, A.J. and Evans, J.P. (2000). Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mycosis*). *Aquaculture*, 182: 61–72.
- Gomelsky, B., Mims, S.D., Onders, R.J., Shelton, W.L., Dabrowski, K. and García-Abiado, M.A. (2000). Induced gynogenesis in black crappie. *N. Am. J. Aquacult.*, 62: 33–41.
- Huerta, B.M.A. (1999). Inactivación genética de esperma de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachnert, 1868) utilizando luz UV. Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México, 89 pp.
- Hussain, M.G., Penman, D.J., McAndrew, B.J. and Johnstone, R. (1993). Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.: A comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shocks. *Aquaculture*, 111: 263–270.
- Jennekens, I., Müller-Belecke, A., Hörstgen-Schwark, G. and Meyers, J.-N. (1999). Proof of the successful development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) clones by DNA fingerprinting. *Aquaculture*, 173: 377–388.
- Kanazawa, A. (1991). Puffer fish, *Fugu rubripes*. In: R.P. Wilson (ed.), *Handbook of Nutrient Requirements of Finfish*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 123–130.
- Lasher, R. and Rugh, R. (1962). The “Hertwig effect” in teleost development. *Biol. Bull.*, 123: 582–588.
- Li, Q., Osada, M., Kashiara, M., Hirohashi, K. and Kijima, A. (2000). Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquaculture*, 186: 233–242.
- Mair, G.C. (1993). Chromosome-set manipulation in tilapia, techniques, problems and prospects. *Aquaculture*, 111: 227–244.
- Martínez-Palacios, C.A., Chávez-Sánchez, M.C., Papp, G.S., Abdo-de la Parra, I. and Ross, L.G. (2002). Observations on spawning, early development and growth of the puffer fish *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1843). *J. Aquacult. Trop.*, 17 (1), 59–66.
- Menkveld, R. and Kruger, T.E. (1996). Basic semen analysis. In: A.A. Acosta and T.F. Kruger (eds.), *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*. 2nd ed. Parthenon Publishing Group, New York, pp. 53–72.
- Perchee, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F. and Billar, R. (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *J. Cell Sci.*, 108: 747–753.
- Purdom, C.E. (1969). Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*, 24: 431–444.
- Purdom, C.E. (1983). Genetics engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33: 287–300.
- Regan, J.D. and Carrier, W.L. (1982). Photoreactivation in two closely related marine fishes having different longevitys. *Mech. Ageing Dev.*, 18: 59–66.
- Satterfield, J.R. and Flickinger, S.A. (1995). Factors influencing storage potential of preserved walleye semen. *Prog. Fish-Cult.*, 57: 175–181.
- Sumantadinata, K., Taniguchi, N. and Sugama, K. (1990). The necessary conditions and the use of ultraviolet irradiated sperm from different species to induce gynogenesis of Indonesian common carp. In: R. Hirano and I. Hanyu (eds.), 2nd Asian Fisheries Forum, Asian Fisheries Soc., Philippines, pp. 539–542.
- Suwa, M., Arai, K. and Suzuki, R. (1994). Suppression of the first cleavage and cytogenetic studies on the gynogenetic loach. *Fish. Sci.*, 60: 673–681.
- Takai, H. and Morisawa, M. (1995). Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J. Cell Sci.*, 108: 1175–1181.
- Taniguchi, N., Han, H.S. and Tsujimura, A. (1993). Use of chromosome manipulated fish in aquaculture and related problems of conservation of wild stock. In: K.L. Main and E. Reynolds (eds.), *Selective Breeding of Fishes in Asia and USA*. Proc. of a workshop in Hawaii, Oceanic Institute, pp. 68–80.
- Thorgaard, G.H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.), *Fish Physiology*. Vol. IX, part B. Academic Press, New York, pp. 405–434.
- Valcárcel, A., Guerrero, G. and Maggese, M.C. (1994). Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of the catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae), and its photoreactivation. *Aquaculture*, 128: 21–28.
- Yamahira, K. (1997). Hatching success affects the timing of spawning by the intertidally spawning puffer *Takifugu niphobles*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 155: 239–248.
- Yamamoto, E. (1999). Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hiramé, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173: 235–246.
- Zar, J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*. 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 718 pp.