

外源激素诱导对条斑星鲈(*Verasper moseri*) 精子质量的影响*

徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2} 王妍妍^{1,2} 刘新富^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071)

提要 采用注射外源激素——鲑鱼促性腺激素释放激素类似物(sGnRHa)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)的诱导方法,研究了外源激素对条斑星鲈雄鱼精子质量的影响。结果表明:外源 sGnRHa 和 HCG 诱导后条斑星鲈精子质量明显提升,主要表现为精液粘稠度大为降低、精液流动性和液化能力增强、精子激活率和快速激活率显著提高、快速活动时间和精子寿命延长。同时,血浆性类固醇激素——睾酮(T)和雌二醇(E₂)表达水平明显升高,在 96h 达到峰值。比较两种激素的诱导效果,以 sGnRHa 对雄鱼精子质量的改善效果为好,但与 HCG 无显著差异。本研究表明,缓释激素诱导可有效提升和改进条斑星鲈雄鱼的精子质量,研究结果对条斑星鲈人工繁育具有重要的指导意义。

关键词 条斑星鲈, 外源激素诱导, 精子质量
中图分类号 S965

条斑星鲈(*Verasper moseri*), 属鲈形目(Pleuronectiformes)、鲈亚目(Pleuronectoridei)、鲈科(Pleuronectidae)、星鲈属(*Verasper*), 为大型冷温性底栖比目鱼种, 主要分布于日本茨城县以北的太平洋沿岸和若狭湾以北的日本海沿岸, 在黄海和渤海也曾有分布, 但近年来已难见渔获。条斑星鲈具有生长快、耐低温、抗逆能力强的优良特性, 是一种适宜于人工养殖和增殖开发的新海水鱼类资源。

在海水鱼类特别是鲈鱼类人工繁殖过程中, 雄性配子的质量直接影响到优质受精卵的获取, 特别是在人工养殖条件下, 雄性个体配子最终成熟程度和精液量多少是决定人工繁殖能否成功的关键因素。先前对鲈类的研究表明, 人工养殖条件下鲈鱼类雄性时常出现生殖障碍(不能排精, 精液量少, 精子活动率低等)的情况, 如黄盖鲈(*Pleuronectes ferrugineus*)和大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)(Zohar

et al, 2001), 其主要的症状包括在繁殖季节只能产生不具运动能力的精子(Berlinsky *et al*, 1997)或者是精液的粘稠度过高以至于不能有效用水激活受精(Vermeirssen *et al*, 2000)。为了解决这一问题, 研究者采用各种方法试图提高人工养殖条件下雄鱼的精液质量, 其中外源激素诱导如促性腺激素释放激素(GnRH)可显著提升精液质量, 包括雄鱼排精量和降低精液粘稠度及增加精液液化能力, 从而保证优质精子和受精卵的获得, 特别是针对那些不能自然产卵受精的鱼类(Clearwater *et al*, 1995; Vermeirssen *et al*, 1998; Pankhurst, 1994)。利用外源激素诱导来提高雄性硬骨鱼类精液质量和产量的研究已经在多种鲈鱼类中报道, 如冬鲈(*Pleuronectes americanus*) (Harmin *et al*, 1993)、大菱鲈(Alveríño *et al*, 1993)、黄盖鲈(Larsson *et al*, 1997)、漠斑牙鲈(*Paralichthys lethostigma*)(Berlinsky *et al*, 1996)、大西洋牙鲈(*Paralichthys dentatus*)

* 国家鲈类现代产业技术体系项目, CARS-50 号; 国家 863 计划项目, 2012AA10A413 号; 中央级公益性事业单位基本科研业务费项目, 20603022012022 号; 国家留学人员科技活动项目择优资助经费资助, 2011—2013。徐永江, 博士, 助理研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

通讯作者: 柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-04-15, 收修改稿日期: 2012-06-16

(Berlinsky *et al.*, 1997)、大西洋拟庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*)(Vermeirssen *et al.*, 2000)等。在激素催产方法方面, 以往研究表明, 单独一次的注射或诱导的效果对某些鱼种不甚理想, 多次的连续注射诱导是较为理想的稳定获得优质精液的方法(Weil *et al.*, 1983)。我国学者在外源激素对海水鱼类精巢发育和精子活力的影响方面也做了一些研究, 包括鳗鲡(*Anguilla marmorata*)(齐鑫等, 2010)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)(舒琰等, 2005)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(温海深等, 2006), 使用的激素种类主要包括人绒毛膜促性腺激素(HCG)、促黄体生成素释放激素类似物(LHRH-a)、甲基睾酮等, 主要研究焦点集中在外源激素如何促进雄性性腺发育成熟、促进性类固醇激素表达等方面。目前, 国内尚未见外源激素对雄性海水鱼类精液流动性、精子激活率和精子寿命的影响等方面的报道。

人工养殖条件下, 条斑星鲈繁殖周期中存在雄鱼成熟度不高、精液质量低等问题, 具体表现为精液粘稠度高、流动性低、精子激活率低、运动时间和寿命短等, 严重影响了优质受精卵的获取和苗种生产的顺利进行。为了探索解决这一问题的可行方法, 提升养殖条斑星鲈雄鱼的精子质量, 笔者于 2009—2010 年繁殖季节研究了外源激素对雄鱼精子质量的影响, 以期在繁殖季节获取高质量条斑星鲈精子提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

实验在青岛忠海水产有限公司进行。选用年龄为 3 龄以上的达性成熟的条斑星鲈(*Verasper moseri*)雄性亲鱼, 全长 25—33cm, 体重 540—680g。

1.2 亲鱼培育及选择

亲鱼培育水温 8—10℃, 盐度 29—31, pH 7.8—8.2, 溶解氧 6mg/L 以上, 日换水率 400%—600%。亲鱼饵料为新鲜杂鱼。日投喂 2 次, 投喂量为鱼体重的 1%—2%, 及时清除残饵、排污。

亲鱼选择: 挑选人工温光调控下正处于排精期(3 月)可采得乳白色精液的 3 龄以上的条斑星鲈雄鱼 9 尾。亲鱼以 MS222 (150mg/L)麻醉后人工采得精液, 镜检发现精液粘稠度高, 精子激活率在 30%—40%, 精子寿命 1—6min, 每尾可获取精液量为 3—6ml。

1.3 激素诱导实验设计

将实验用亲鱼自培育池取出后置入 4m³ 方形水

泥池中开展实验。实验设置 3 个组, 共使用水泥池 3 个, 每个水泥池放置 3 尾, 实验鱼培育条件同 1.2。本研究使用的激素种类包括人绒毛膜促性腺激素(HCG)和复方鲑鱼促性腺激素释放激素类似物(sGnRH_a)(宁波第二激素厂), 对照组实验鱼以生理盐水注射诱导, 具体的实验组别、使用激素种类、注射剂量及使用亲鱼数量见表 1。实验共持续 15d。实验鱼在实验池中适应 3d 后开始实验, 实验开始时(0h)每尾鱼按照设计剂量(表 1)注射生理盐水及激素, 使用 1ml 注射器, 在靠近头部侧线上方约 2cm 处肌肉注射。激素注射诱导前, 实验鱼先以 180mg/L 的 MS-222 麻醉。在 48h 时进行二次注射, 剂量与第一次相同。

表 1 实验设计用激素种类及注射剂量和亲鱼使用数量表

Tab.1 Hormones, dosages and number of experimental broodstocks used in this study

组别	激素种类	激素剂量	亲鱼数量(尾)
对照组	生理盐水(0.85%)	0.5ml/kg	3
sGnRH _a 组	sGnRH _a	0.5ml/kg	3
HCG 组	HCG	400IU/kg (0.5ml)	3

1.4 精液采集方法

在激素诱导后 48h、96h 和 192h 时分别取样精液约 0.5ml 用于精子活力、寿命和流动性水平等参数的测定。精液采集时, 将雄鱼以 180mg/L 的 MS-222 麻醉后置于干净的白色泡沫板上, 上铺浸过水的毛巾, 将实验鱼置于毛巾上, 并以毛巾将头部遮盖。用干毛巾擦干鱼体生殖孔周围的水分和粘附的麻醉剂, 然后轻压腹部生殖腺部位, 挤出精液, 用干净干燥的吸管吸取精液置于冰浴的 1.5ml 离心管中, 立即取样进行活力观察, 观察精液粘稠度并立刻在镜下检查记录精子密度、精子激活率、快速活动率和精子寿命。每尾鱼的精子质量相关数据(除精液流动性水平外)检测都设置一个重复。采精过程中应防止海水溅入精液, 避免实验鱼的粪便和尿液污染。

1.5 精子质量评价方法

精子活力观察方法参照潘德博等(1999)的方法并加以改进: 在 1 块载玻片上的 3 个位置滴加等量的相同处理的海水作为 1 个平行组, 然后用干净的注射器针头蘸取等量精液与载玻片上的海水混合, 同时开始计时, 显微镜下观察精子运动情况。

活力指标计算方法: 精子的激活率指激活起始时给定视野内被激活精子的数量占全部精子数量的

百分比;精子的活动时间指精子自激活开始至 90% 的精子原地颤动为止的时间;快速运动时间是指精子自激活开始到约 90% 原处颤动前的激烈运动;精子寿命指精子自激活开始至 90% 的精子停止运动所经历的时间。

精液可流动性水平的划分标准: 1 级(精液粘稠, 液化极少, 在载玻片上未见有流动, 精子激活率低于 30%)、2 级(精液较为粘稠, 在载玻片上可见部分流动, 精子激活率大于 50% 而小于 75%)、3 级(精液较为稀释, 流动性强, 精子激活率大于 80%)。每个处理重复 3 次。

实验结束时, 检查每尾鱼的总精液量, 以吸管定量其体积, 并与实验开始前进行比较。实验结束后 6d, 再次检查每尾实验鱼的精子质量特性。

1.6 血液样品采集方法及性类固醇激素测定

在实验开始前(0h)、第一次激素注射后的 6h、12h、24h、48h、96h(第二次激素注射后 48h)、192h(实验结束时)分别抽取血液样品, 检测血浆中性类固醇激素睾酮(T)和雌二醇(E₂)的表达水平。取血前实验鱼以 180mg/L 的 MS-222 麻醉。使用 1ml 无菌注射器, 采用背面尾静脉抽血方法, 每尾鱼抽血 1.5ml, 保存在 2.0ml Eppendorf 离心管中, 15 000r/min 离心 10min 后, 分离上层血清, 保存在 -40℃ 备用。

雌二醇(E₂)和睾酮(T)的测定采用放射免疫法(RIA)进行(林浩然等, 2007)。使用 ¹²⁵I 标记的哺乳动物 E₂ 和 T 放射免疫测定试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)。T 回收率 95%—108%, 灵敏度 1.9ng/dl, 批内变异系数 7.4%, 批间变异系数 9.8%, 其特异性表达为与双羟睾酮交叉反应率 1.6×10^{-4} , 雄烯二酮 2.1×10^{-6} , PROG 5.0×10^{-6} , E₃ (雌三醇) 5.2×10^{-8} , E₂ 5.0×10^{-4} 。E₂ 回收率 95%—104%, 灵敏度 2.1pg/ml, 批内变异系数 7.7%, 批间变异系数 8.9%, 其特异性表达为与 E₃ 交叉反应率 9.0×10^{-4} , PROG 1.0×10^{-4} , TESTO 1.0×10^{-4} , 雌酮 7.0×10^{-3} , 胆固醇 1.0×10^{-5} 。试剂盒非特异性结合率 3%, 特异性结合率 30%。

1.7 数据处理和统计分析

本研究结果均表示为平均值 ± S.D. 的形式, 使用 SPSS(16.0 版本)软件进行差异显著性分析。利用单因素方差分析法(ANOVA)检测血浆雌二醇、睾酮的表达水平变化, 取差异显著性(P)为 0.05, P < 0.05 视为差异显著, 反之不显著。

2 结果

实验过程中, 未发现亲鱼有病态和死亡现象。各实验组雄鱼未观察到可采集总精液量的显著升高, 维持在 3—6ml/尾, 但是精液流动性水平显著提高。亲鱼血浆中性类固醇激素表达水平的变化见图 1A、图 1B。实验过程中精液流动性水平、精子激活率(运动率)、精子快速运动率、精子快速活动时间、精子寿命等数量特性的变化见图 1C、D、E、F。

2.1 外源激素诱导后精子质量变化

外源激素诱导后, 雄鱼体内血浆中性类固醇激素表达水平发生显著变化。

激素诱导 48h 后, HCG 组和 sGnRHa 组亲鱼精子质量的各项指标都已经高于对照组, 在激素注射 96h 后, 实验组和对照组的差异非常明显(P < 0.05)。在第二次激素诱导后, 一直到 192h, 实验组亲鱼的精子质量都维持较高的质量水平, 具体表现为: HCG 组亲鱼精液可流动性水平达到 3 级, 精液液化水平较高, 精子激活率提高到 85.0%—89.9%, 快速活动率提高到 82.0%—84.6%, 与对照组差异显著(P < 0.05), 精子寿命在 9.39—10.62min (图 1C, D, E, F)。

激素诱导 48h 后, sGnRHa 组亲鱼精液可流动性水平同样达到 3 级, 精液液化水平高于对照组, 精子激活率提高到 90.5%—98.2%, 快速活动率提高至 84.7%—92.1%, 与对照组差异显著(P < 0.05), 精子寿命 11.06—14.3min(图 1C, D, E, F)。实验结束后 6d, 再次检查实验鱼的精液质量, 发现精液的可流动性降低, 重新恢复到 2 级(图 1C), 个别甚至达到 1 级的水平, 同时精子激活率和快速活动时间也开始下降, 表明外源激素的效应逐渐减弱。

2.2 血浆性类固醇激素表达变化

外源生理盐水诱导后 6h 时, 对照组实验鱼的血浆 T 和 E₂ 的表达水平先有一个明显的下降(P < 0.05), 然后逐渐恢复到正常水平, 并在其后的实验过程中保持相对稳定的表达水平(P > 0.05)。

外源激素诱导后, HCG 组雄鱼血浆 T 表达水平在 6h 降低(P > 0.05), 自 12h 开始升高, 由 17.5ng/dl (12h) 上升到 49.31ng/dl (48h), 在 48h 二次激素诱导后于 96h 达到峰值 56.58ng/dl (P < 0.05), 而在 192h 下降至 37.33ng/dl 的水平。sGnRHa 组雄鱼血浆 T 表达水平在 6h 时与注射前未有明显变化, 自 12h 开始逐渐升高, 至 48h 达到峰值 78.13ng/dl, 与对照组差异显著(P < 0.05), 在第二次注射诱导后, 在 96h 血浆 T 表达

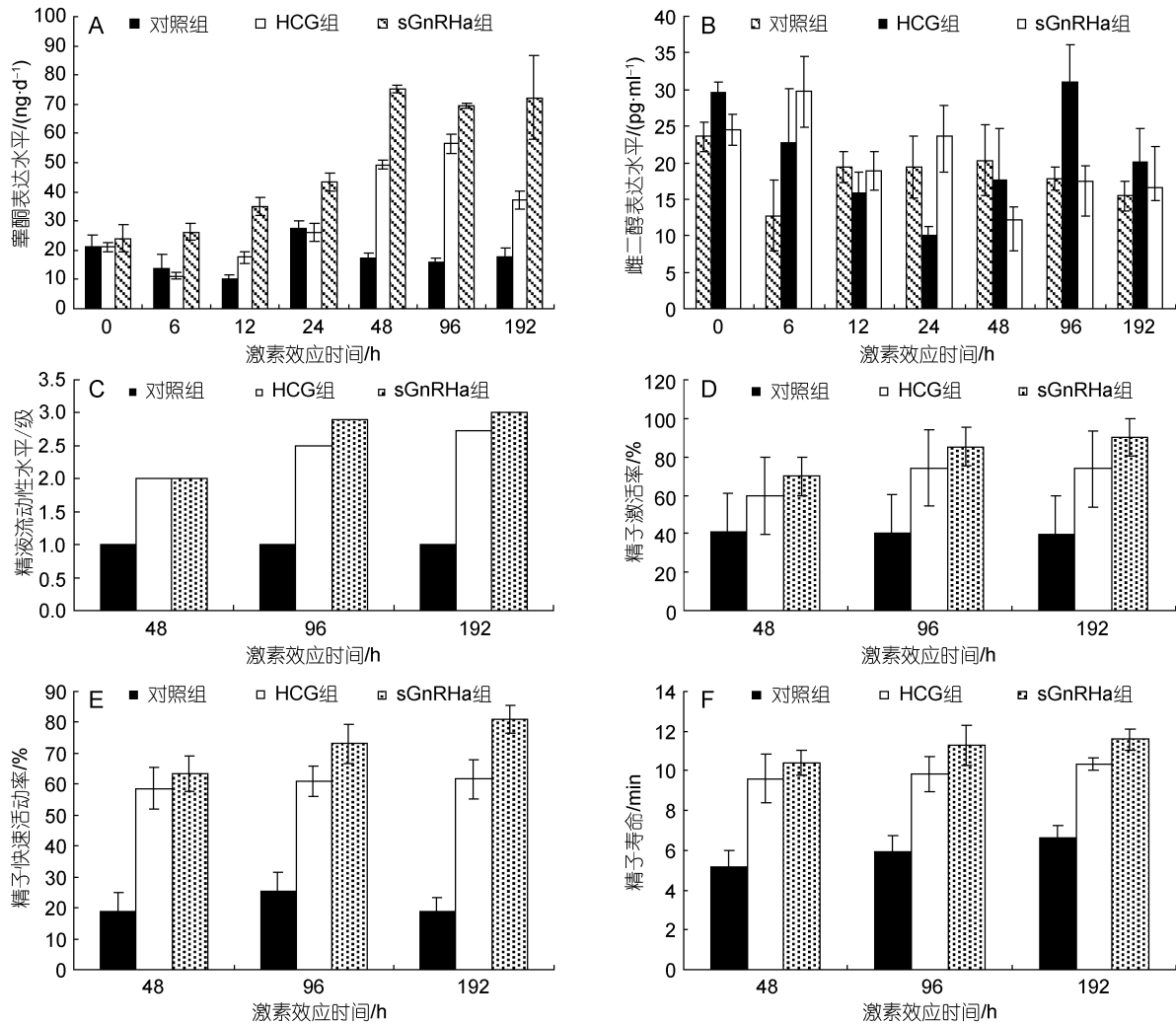


图1 外源激素诱导后血浆性类固醇激素表达水平和精子质量的变化

Fig.1 Changes of serum sex steroids levels and sperm quality after exogenous hormonal induction

A. 血浆睾酮表达水平变化, B. 血浆雌二醇表达水平变化, C. 精液流动性水平的变化, D. 精子激活率的变化, E. 精子快速活动率的变化, F. 精子寿命的变化

水平与 48h 相比略有下降($P>0.05$), 在 192h 时又升高至较高水平, 与对照组差异显著($P<0.05$)。除 192h 外(sGnRHa 组显著高于 HCG 组, $P<0.05$), sGnRHa 组血浆 T 表达水平与 HCG 组血浆 T 表达水平差异不显著($P>0.05$)。

在血浆 E_2 表达水平的变化方面, HCG 组雄鱼血浆 E_2 表达水平在 6h 时开始逐渐降低, 并在 24h 时表达水平达到最低值 10.12pg/ml, 与对照组和 sGnRHa 组差异显著($P<0.05$)。其后, 在 48h 血浆 E_2 表达水平逐渐升高, 在第二次注射诱导后, 96h 时突然显著升高($P<0.05$), 与对照组和 sGnRHa 组差异显著($P<0.05$), 而后在 192h 时又显著下降($P<0.05$)。sGnRHa 组血浆雌二醇表达水平在 6h 时升高, 其后下降并在 48h 达到最低至 10.15pg/ml, 其后在第二次激素诱导

后, 表达水平升高并保持相对稳定的水平至 192h ($P>0.05$)。sGnRHa 组亲鱼血浆的 E_2 表达水平与对照组雄鱼差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

本文采用外源激素注射诱导方法, 首次尝试改善人工养殖条件下条斑星鲃雄鱼的精子质量, 结果显示外源激素可明显提升精子质量, 包括精液粘稠度降低、流动性水平明显提高; 精子激活率、精子快速活动时间和精子寿命等指标都显著提高, 同时外源激素的诱导引发了血浆性类固醇激素水平的升高。这些结果为条斑星鲃人工受精技术提供了技术支撑。

目前, 条斑星鲃野生雄鱼尚未见有精液质量问题的报道。已有研究表明, 在鲆鲽鱼类中, 野生雄鱼

个体的精液质量(排精期、产精量、精子活动率和受精效率等)远高于人工养殖个体(Cabrita *et al*, 2006), 这种差异的原因可能在于与养殖个体相比, 野生个体经历了该鱼种精子成熟所必需的环境因子变化, 启动了内在的内分泌成熟调控机制, 从而达到更好的成熟(Zohar *et al*, 2001)。Vermeirssen 等(1998)报道, 在雄性鳟鱼, 血浆性类固醇激素(如 T 和 11-KT)浓度的变化可作为外源激素是否能诱导雄鱼精液质量提高的评价指标之一。然而在鲑鱼类雄性个体排精期间, 研究者发现其血浆中成熟诱导激素双羟孕酮 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P)的表达升高, 同时证实其可影响储精囊 pH 和精子活力(Nagahama, 1994)。目前为止, 有关性类固醇激素水平和其它激素与精液质量的关系尚未有定论。

早期研究指出, 在鲤鱼和鲑鱼雄性个体经 HCG 诱导后精液的水分含量增加, 同时精液总量增加, 保证了繁殖季节优质精液的获取(Billard *et al*, 1982), 同时舒琥等(2005)报道, 埋植 LHRH-A 缓释剂可促进雄性赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)排精量增加, 这在其它一些鱼种上也有类似报道(Mylonas *et al*, 2001)。另外, 以往的部分研究认为雄性亲鱼精浆粘稠度的下降伴随着精子密度的下降和精子数量的损失(Vermeirssen *et al*, 2000)。但本研究中观察到, 虽然条斑星鲈雄鱼在外源激素诱导有精液流动性和液化水平提高, 但是每尾鱼的总体精液量基本未变化, 这与一些其它硬骨鱼类雄鱼的研究报道有差异。先前对其它硬骨鱼类的研究表明, 外源激素诱导后雄鱼精液量一般会增加, 但对精液流动性影响不大(Mylonas *et al*, 1997)。雄鱼精液量的增加一般归因于精液水合作用的加强, 精浆的水合作用可能快于精子生成的速度(Lim *et al*, 2004), 其内分泌机制可能在于外源激素通过脑-垂体-性腺内分泌轴调控血浆促性腺激素(GtH, Gonadotropin Hormone)水平, 后者通过刺激雄鱼排精量(从精小囊排放精子)(Mylonas *et al*, 1997)和促进精液水合作用(Vermeirssen *et al*, 2000)来实现精液质量的提升。因本研究未能开展血浆 GtH 表达水平的测定, 外源激素调控条斑星鲈精液粘稠度的内分泌机理尚有待于深入研究。

先前研究表明, 大西洋拟庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*)(Vermeirssen *et al*, 2000)雄鱼经 sGnRHa 诱导后血浆睾酮表达水平立刻检测到突然升高, 在第 3 天降至低于对照组水平, 精子比容(spermatocrit)在第 3 天开始降低并持续约 30d。与之相反的结果是

Methven 等(1992)观察到大西洋拟庸鲈雄鱼在外源激素诱导下血浆雄激素水平升高到一定水平以上时, 精液的粘稠度降低, 精液流动能力和液化能力显著增强, 精子激活率显著升高。这与本研究的结果一致, 在外源激素诱导条件下, 条斑星鲈血浆 T 表达水平先在短期内(6h)下降然后不断升高并在 96h 时达到峰值, HCG 组在 96h 后有所下降而 sGnRHa 仍保持相对较高水平, 同时精液粘稠度大大降低, 流动性水平和液化水平、精子活动力以及精子寿命显著增加。另外, 这种现象在其它硬骨鱼类中也有类似报道, 外源激素诱导后血浆性类固醇激素水平升高, 同时伴随着精液流动性和精子活动率显著提高, 如黄盖鲈(Harmin *et al*, 1993)、美洲鲈(Vermeirssen *et al*, 1998)等。温海深等(2006)报道雄性牙鲆单独注射促黄体激素释放激素类似物(LHRH-A)或人绒毛膜促性腺激素(hCG), 血浆 T 含量在注射后 6h 大幅度降低, 12h 时达到最低值, 以后逐渐回升, 这与本研究结果基本类似。舒琥等(2005)报道, 通过两次埋植 LHRH-A 缓释剂, 雄性赤点石斑鱼血清 T 和 11-酮基睾酮(11-KT)表达水平快速增加, 这与本研究结果类似。对绿背鲈(*Rhombosolea tapirina*)雄鱼的研究表明, 虽然埋植 GnRHa 但对其精子活动率影响不大。而本研究中, 激素诱导后, 雄鱼的精子激活率和活动率显著提高。笔者认为, 精子的激活率和活动率与精液粘稠度具有直接的联系, 对条斑星鲈而言, 外源激素诱导带来的精浆粘稠度下降和精子活动率升高可能是由于外源激素诱导内源性 GtH 作用导致精子水合作用启动和能量代谢加速引起的。另外, 本研究中观察到的血浆 E₂ 的变化与 T 水平的变化呈现此消彼长的对应关系, 可能与亲鱼繁殖期在芳香化酶介导下的雌雄激素转换有关(Chang *et al*, 1999), 提示雌二醇同样在雄鱼繁殖过程中起着重要的生理调节作用。

本研究观察到, 实验过程中观察到激素诱导结束 6d 后精液粘稠度重新升高, 这可能与激素类型和诱导方法有关。在国外早期的研究中, 已经证实采用注射方法注射外源激素可获得相对短期的精子质量的提升(Pankhurst *et al*, 2000)。因此, 目前的研究者多倾向于采用胆固醇纤维素包埋缓释体系, 使得外源激素在雄鱼体内缓慢释放, 从而获得长期的精子质量提升的效应(Mañanós *et al*, 2002)。本研究采用了两次注射的方式进行外源激素诱导尝试, 并获得了较好的结果, 但由于使用外源激素的液态形式和注射的方法, 可能会引起外源激素在体内的快速代谢完

毕, 从而导致激素诱导结束后短期内精子质量再次下降。在今后条斑星鲈人工繁殖过程中, 将采用缓释系统对雄鱼进行诱导, 控制外源激素在体内的释放速度, 延长激素效应时间, 长效地提升精液质量, 这对获得稳定的优质精液用于人工受精研究具有重要的实际意义。

参 考 文 献

- 齐 鑫, 黄 海, 周雯伊等, 2010. 激素诱导花鲮精巢发育成熟期间性激素水平及相关细胞的超显微结构. 热带海洋学报, 29(6): 130—136
- 林浩然, 刘晓春, 2007. 鱼类生理学实验技术和方法. 广州: 广东高等教育出版社, 80
- 舒 琥, 刘晓春, 林浩然, 2005. LHRH-A 缓释剂促进雄性赤点石斑鱼性类固醇激素分泌和精巢发育与排精的研究. 水产学报, 29: 433—439
- 温海深, 宋海霞, 杨立廷等, 2006. 外源激素对养殖牙鲆血浆睾酮和雌二醇含量的影响研究. 海洋学报, 28: 115—120
- 潘德博, 许淑英, 叶 星, 1999. 广东鲂精子主要生物学特性的研究. 中国水产科学, 6(4): 111—113
- Alverniño J M R, Peleteiro J B, 1993. Inducción y sincronización de la puesta en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) con LHRHa: influencia del estado de desarrollo gonadal. In: Cerviño A, Landín A, Coe A D *et al* ed. Proc IVth National Congress on Aquaculture. Spain: Illa de Arousa (Vilanova de Arousa), 31—36
- Berlinsky D L, William K, Hodson R G *et al*, 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. J World Aqua Soc, 28: 79—86
- Berlinsky D L, King V W, Smith T I J *et al*, 1996. Induced ovulation of southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. J World Aquacult Soc, 27: 143—152
- Billard R, Fostier A, Weil C *et al*, 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can J Fish Aquat Sci, 39: 65—79
- Cabrita E, Soares F, Dinis M T, 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. Aquaculture, 261: 967—975
- Chang C F, Hung C Y, Chiang M C, 1999. The concentration of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 177: 37—45
- Clearwater S J, Crim L W, 1995. Milt quality and quantity produced by yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) following GnRH-analogue treatment by microspheres or pellet. In: Goetz F W, Thomas P ed. Proc Vth Symp on the Reproductive Physiology of Fish. Austin: 13
- Harmin S A, Crim L W, 1993. Influence of gonadotropic hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Fish Physiol Biochem, 10: 399—407
- Larsson D G J, Mylonas C C, Zohar Y *et al*, 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) induces multiple ovulations of high-quality eggs in a cold-water, batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Can J Fish Aquat Sci, 54: 1957—1964
- Lim H K, Pankhurst N W, Fitzgibbon Q P, 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. Aquaculture, 240: 505—516
- Mañanós E, Carrillo M, Sorbera L A *et al*, 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. J Fish Biol, 60: 328—339
- Methven D A, Crim L W, Norberg B *et al*, 1992. Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Can J Fish Aquat Sci, 49: 754—759
- Mylonas C C, Scott A P, Vermeirssen E L M *et al*, 1997. Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. Biol Reprod, 57: 669—675
- Mylonas C C, Zohar Y, 2001. Use of GnRH-a-delivery systems for the control reproduction in fish. Rev Fish Biol and Fisheries, 10: 463—491
- Nagahama Y, 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int J Dev Biol, 38: 217—229
- Pankhurst N W, 1994. Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae). Aquaculture, 125: 185—197
- Pankhurst N W, Poortenaar C W, 2000. Milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* following treatment with exogenous hormones. Mar Freshw Behav Physiol, 33: 141—159
- Vermeirssen E L M, Scott A P, Mylonas C C *et al*, 1998. Gonadotropin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17, 20 β -dihydroxylated and 5 β -reduced, 3 α -hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). Gen Comp Endocrinol, 112: 163—177
- Vermeirssen E L M, Shields R, Mazorra de Quero C *et al*, 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish Physiol Biochem, 22: 77—87
- Weil C, Crim L W, 1983. Administration of LHRH analogues in

various ways: effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 35: 103—115

Zohar Y, Mylonas C, 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99—136

EFFECTS OF EXOGENOUS HORMONES INDUCTION ON THE SPERM QUALITY OF BARFIN FLOUNDER *VERASPER MOSERI*

XU Yong-Jiang^{1,2}, LIU Xue-Zhou^{1,2}, WANG Yan-Yan^{1,2}, LIU Xin-Fu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao, 266071)

Abstract The effects on exogenous hormones including human chorionic gonadotropin (HCG) and salmon gonadotropin releasing hormone analogue (sGnRH α) on sperm quality of male barfin flounder *Verasper moseri* were investigated in the present study. Results showed that exogenous hormone induction can greatly improve the sperm quality of males with milt of high viscosity, including increased milt fluidity, higher sperm motility and longer sperm life span, and these were associated with elevated serum sex steroids level. The increased expression level of sex steroid peaked at 9h post hormonal induction for both groups, which was in accordance with the sperm quality elevation. The sGnRH α induction beard better effect than that of HCG induction although there was no significant difference observed between sGnRH α and HCG induction. Results from this study can serve as useful tools in acquiring milt with high quality and could be beneficial for artificial insemination in barfin flounder culture.

Key words Barfin flounder *Verasper moseri*, Exogenous hormones induction, Sperm quality