

Luteinising Hormone Releasing Hormone Analogue과 Human Chorionic Gonadotropin 처리가 박대(*Cynoglossus semilaevis*)의 배정에 미치는 영향

임한규† · 박중열* · 강희웅**
(*국립목포대학교 · **국립수산과학원)

Effect of Luteinising Hormone Releasing Hormone Analogue and Human Chorionic Gonadotropin on Spermiation in the Tongue Sole, *Cynoglossus semilaevis*

Han-Kyu LIM† · Jung-Yeol PARK* · Hee-Woong KANG**
(*Mokpo National University · **National Fisheries Research & Development Institute)

Abstract

Experiments were carried out examine short-term effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and long-term effects of luteinising hormone releasing hormone analogue (LHRHa) on milt production of the tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. In the first experiment, each fish was implanted with a blank cholesterol pellet (control), 100 and 200 μ g LHRHa per kg body weight. In the second experiment, fish were injected with either 100, 200, 400 and 800 IU hCG per kg body weight or same volume of marine fish Ringer's solution. In the first experiment, milt volume was increased in male implanted with 200 μ g LHRHa pellet compared with other groups at day 10. Injection of 400 and 800 IU hCG resulted in an increase in the milt volume at hour 96 after the treatment. Although statistical difference is unable to confirm because of small milt volume, compared with the control group, hormone pellet-treated groups had a reduction in the mean spermatocrit (Sct) and sperm concentration (Sc). The results suggest that the increase in milt volume is at least partially gonadotropin (GtH)-dependent and increased milt volume has a relationship with milt hydration.

Key words : Tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, spermiation, hormone

I. 서론

박대(*Cynoglossus semilaevis*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 참서대과(Cynoglossidae)에 속하는 저서성 어류로 강물이 바다로 흘러 들어가는 기수역이나 담수지역에서도 서식한다(Kang et al.,

2012). 박대는 게와 조개류, 갯지렁이 등을 먹이로 하는 육식성 어류로 바닥이 펄로 이루어진 우리나라 서해와 남해 서부 해역 및 동중국해에서 발해 만에 이르는 해역에 분포하며(Overseas Fishery Cooperation Foundation of Japan, 2009), 참서대과 어류 중 가장 대형종으로 성장이 빨라 서

† Corresponding author: 061-450-2395, limhk@mokpo.ac.kr

* 이 논문은 2013학년도 목포대학교 교내연구과제 지원에 의하여 연구되었습니다.

해특산품종으로서 산업적으로 매우 유용한 종이다. 박대는 2000년대 초반까지 저서성 어류의 우점종으로 참서대와 함께 많은 양이 어획되었다. 그러나 남획과 불법어업에 의한 자원량 감소와 새만금방조제 건설 등 간척사업에 의한 산란장 파괴 및 연안오염 등의 원인으로 생산량이 급감하여 현재는 전라남도 신안지역에서만 일부가 어획되고 있는 실정이다(Kang et al., 2012). 현재 박대의 자연자원량이 급감하여 양식을 위한 인공종묘생산과 동시에 종 보존기술의 개발이 절실한 실정이다. 그러나 종묘생산을 위해 박대의 어미 관리 시 산란기에도 배정(spermiation)을 하지 않거나 소량의 정액만을 생산하여 종묘생산을 어렵게 하고 있다.

일반적으로 어류양식장에서 많은 어류의 수컷들은 산란기간이라도 배정에 실패하거나, 높은 점성과 낮은 활성을 가진 정액을 생산하여 종묘생산에 어려움을 주고 있는 경우가 많다. 따라서 최근까지도 많은 연구자들이 양식과정 중 발생하고 있는 생식장애현상을 해결하기 위하여 다각적인 측면에서 연구를 수행해 왔다. 이들 연구의 대부분은 생식내분비학적 방법으로 초기에는 다른 어류의 뇌하수체를 추출하여 이용하였고, 이후에는 정제된 생식선자극호르몬(gonadotropin, GtH)을 사용하였다(Zohar and Mylonas, 2001; Lim et al., 2004). 최근에는 기술이 발달하여 인위적으로 합성한 생식선자극호르몬 방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRHa) 등을 사용하고 있다(Zohar and Mylonas, 2001; Lim et al., 2004). GtH와 GnRH의 처리는 이미 많은 경골어류에서 정액의 질과 양을 향상시킨다는 사실이 입증되고 있다(Garcia, 1993; Harmin and Crim, 1993; Sorbera et al., 1996; Mylonas et al., 1997; Clearwater and Crim, 1998; Shangguan and Crim, 1999; Pankhurst and Poortenaar, 2000; King and Young, 2001; Mylonas and Zohar, 2001; Zohar and Mylonas, 2001; Lim et al., 2002; Mananos et al., 2002; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004). 위

의 연구들에서 수컷에 GnRH의 처리는 체내에서 GtH의 생산을 촉진하여 지속적으로 정액량 증가를 유도하였다. 또한 GtH의 처리는 배정의 유도(Linhart et al., 1995; Sorbera et al., 1996; Mylonas et al., 1997)와 수화(hydration) 과정(Ueda et al., 1985; Clearwater and Crim, 1998, Vermeirssen et al., 2000)을 통하여 정액생산을 촉진하는 것으로 추정된다. 또한 수컷에서의 수화현상은 progestin인 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta$ P) 또는 유사한 progestin들에 의해 조절된다(Pankhurst, 1994). 지금까지 이들 외인성 호르몬의 처리는 주로 주사하는 방법과 체내에 펠렛이나 캡슐을 이식하는 방법이 많이 사용되었다. 주사하는 방법은 정액증산이나 혈중 호르몬 변화에 영향을 미치는 시간이 짧음(Garcia, 1991; Harmin and Crim, 1993; Linhart and Billard, 1994; Pankhurst, 1994; Mylonas et al., 1997; Pankhurst and Poortenaar, 2000; Zohar and Mylonas, 2001; King and Young, 2001)반면, 외인성 호르몬 펠렛의 체내 이식 방법은 장기간 효과를 발휘하는 특성이 있다(Lim et al., 2002; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004).

이 연구는 박대의 종묘생산을 어렵게 하는 요인 중 하나인 배정의 실패나 적은 정액량으로 인해 발생하는 문제점을 극복하기 위해 현재 양식 어류의 배란을 유도하기 위하여 가장 많이 이용하고 있는 human chorionic gonadotropin (hCG)의 주사와 luteinising hormone releasing hormone analogue (LHRHa) 펠렛의 근육 삽입에 의한 단기와 장기적인 정액 증산효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 사육 및 정액 채취

실험 어류는 국립수산물과학원 서해수산연구소의 양식연구센터에서 사육중인 수컷을 사용하였으며, 실험 전 모든 어류들은 등 근육에 PIT tag

(Identification Devices, USA)를 삽입하여 각 개체를 구별할 수 있도록 하였다.

실험어는 약 20톤 용량의 사각형 콘크리트수조에 수용하여 자연 수온과 광주기 조건 아래에서 사육하였으며, 시판되는 넙치용 배합사료(수협사료, 한국)를 1일 1회 반복 공급하였다.

정액의 채취는 정액이 해수나 배설물에 의해 오염되지 않게 하였으며, 정액 채취 전 실험어들을 ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (Sigma, USA) 200 ppm에 마취시킨 다음, 복부를 부드럽게 압박하여 흘러나오는 정액을 1 mL 주사기로 채취하였다. 정액량(milt volume: Mv)은 정액 채취 전과 후 주사기 무게의 차이를 이용하여 채취한 정액의 무게를 구하였고 이것을 부피로 환산하였다. 정자농도(sperm concentration: Sc)는 2% eosin 용액으로 염색한 후 광학현미경 아래에서 혈구계산판을 이용하여 계수하였고, spermatocrit (Sct)는 일반적인 혈액분석 방법인 micro-hematocrit법을 변형하여 측정하였다. 총 정자수(total sperm number: TSN)는 Mv와 Sc를 곱하여 구하였다.

2. LHRHa 처리 및 실험조건

LHRHa 펠릿 처리효과 실험은 박대의 자연 산란기 초기인 9월 초에 시작하였다. 전장 29.6±0.3cm, 체중 158.8±5.4g 박대 수컷 24마리에 Lee et al. (1986)의 방법을 변형하여 제작한 LHRHa (des-Gly¹⁰[D-Ala⁶]-luteinising hormone releasing hormone ethylamide; Sigma, USA) 펠릿을 등 근육에 삽입하였다. 실험구들은 호르몬이 함유되지 않은 대조구 펠릿을 투여한 실험구 (control)와 어체중 1kg당 LHRHa 100 µg과 200 µg 펠릿을 투여한 실험구 (100, 200 LHRHa) 등 3개로 설정되었다. 각 실험구는 8마리의 수컷으로 구성되었다. 채취된 정액은 LHRHa 처리 후 10일 간격으로 30일간 채취되었고, Mv, Sct, Sc 및 TSN이 측정되었다.

3. Human chorionic gonadotropin (HCG) 처리 및 실험조건

박대의 자연 산란기 후기인 10월 말에 hCG 처리 후 정액 증산효과를 조사하였으며, 이 때 사용된 박대는 전장 29.5±0.4cm, 체중 157.1±5.2g 수컷 40마리였다. hCG (Sigma, USA)는 해산 어류용 생리식염수에 희석하여 등 근육에 주사하였으며, 8마리씩 5그룹으로 나누어 어체중 1kg당 100, 200, 400, 800 IU농도의 hCG와 같은 양의 생리식염수를 등 근육에 주사하였다. 주사 후 96시간에 정액을 채취하여 Mv, Sc, Sct 및 TSN을 측정하였다.

4. 통계처리

각 실험 결과로부터 얻어진 모든 측정값들은 평균±표준오차로 표시하였으며, 측정값들 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지(version 11.5)를 사용하여 95%의 신뢰수준에서 *t*-test와 ANOVA 및 Tukey's multiple range test로 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

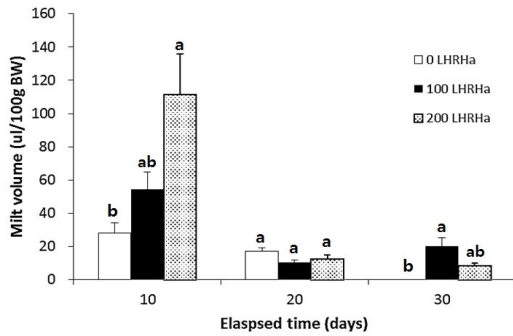
박대의 자연산란기 초반에 LHRHa 펠릿을 등 근육에 삽입하였을 때 정액의 증산 효과는 [Fig. 1]과 같다. LHRHa 펠릿 삽입 후 10일째 어체중 1 kg 당 LHRHa 200 µg 펠릿을 투여한 시험구의 Mv가 대조구에 비해 유의하게 증가하였으나 ($P < 0.05$), 20일째에는 LHRHa 펠릿 삽입 실험구도 Mv가 감소하여 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). LHRHa 펠릿을 처리한 실험어들 중에서는 30일까지 배정하는 개체가 있어 소량이거나 정액을 채취할 수 있었으나 대조구의 모든 실험어들은 배정이 끝나 정액을 채취할 수 없었다. LHRHa 펠릿 삽입 후 TSN은 Mv와 다소 다른 경향을 보였다([Fig. 2]). LHRHa 펠릿 삽입 후 10일째 LHRHa 200 µg 펠릿을 삽입한 시험구의 TSN이 대조구나 LHRHa 100 µg 펠릿 처리구보다

Luteinising Hormone Releasing Hormone Analogue과 Human Chorionic Gonadotropin 처리가
 박대(*Cynoglossus semilaevis*)의 배정에 미치는 영향

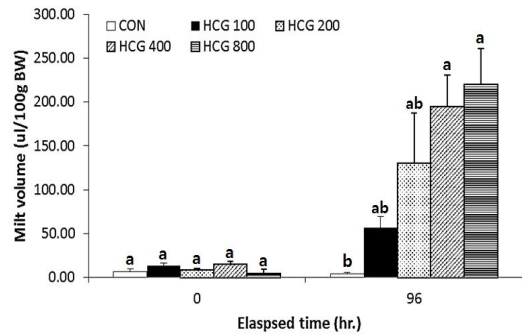
유의하게 높아졌다($P<0.05$). 그러나 20일째에는 LHRHa 펠릿처리구보다 대조구의 TSN이 더 높게 나타났다($P<0.05$).

hCG 처리한 실험구들에서 Mv와 TSN의 증가는 [Fig. 3과 4]에 나타내었다. 400과 800 IU hCG를 주사한 실험구들에서 96시간 후 Mv는 어체중

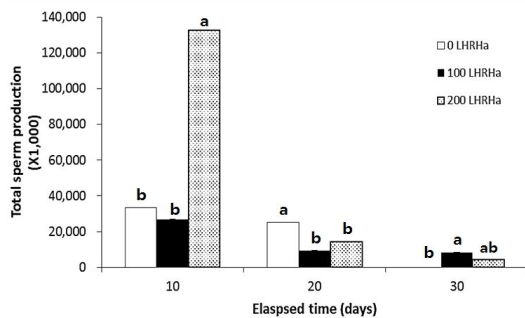
100 g당 각각 $194.6\pm 36.1 \mu\text{L}$ 와 $219.9\pm 41.2 \mu\text{L}$ 로 대조구의 $3.8\pm 2.3 \mu\text{L}$ 보다 월등히 많았다($P<0.05$). 96시간 후 대조구의 TSN는 배정된 정액량이 너무 적어 Sc를 측정할 수 없어 TSN을 계산할 수 없었으나, 400 IU hCG를 주사한 실험구가 $219,676\times 10^3$ sperms으로 가장 높은 값을 보였다.



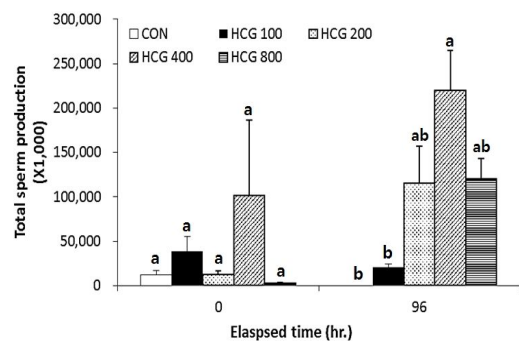
[Fig. 1] Effects of luteinising hormone releasing hormone analogue (LHRHa) pellet treatment on milt volume. Different alphabetical superscripts indicate significant difference by multiple comparison between treatments (Tukey's test, $P<0.05$)



[Fig. 3] Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) injection on total sperm production. Different alphabetical superscripts indicate significant difference by multiple comparison between treatments (Tukey's test, $P<0.05$)



[Fig. 2] Effects of luteinising hormone releasing hormone analogue (LHRHa) pellet treatment on total sperm production. Different alphabetical superscripts indicate significant difference by multiple comparison between treatments (Tukey's test, $P<0.05$)



[Fig. 4] Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) injection on total sperm production. Different alphabetical superscripts indicate significant difference by multiple comparison between treatments (Tukey's test, $P<0.05$)

LHRHa 펠릿 삽입 후 10일 간격으로 얻어진 Sct와 Sc는 <Table 1>과 같다. Sct의 경우, 20일째는 각 실험어 별로 채취된 정액량이 적어 혼합한 후 측정하였으며, LHRHa 처리 농도가 높아질수록 Sct는 낮아지는 경향을 보였다. Sc도 대조구와 비교하여 LHRHa 처리 실험구가 낮은 경향을 보였다.

hCG 주사 후 얻어진 정액의 Sct와 Sc는 <Table 2>와 같다. Sct의 경우, 전체적으로 호르몬 주사 전(0 hr.) 보다 주사 후(96 hr.) 측정값이 낮아졌으며, 호르몬 농도가 증가 할수록 측정값이 낮아지는 경향을 보였다. Sc도 Sct와 같은 경향을 보였으며 96시간 후 대조구에서는 배정이 일어나지 않아 정액이 채취되지 않았다.

<Table 1> Spermatoctrit and sperm concentration at 10th, 20th,30th days after LHRHa pellet implantation

Treatment	Spermatoctrit			Sperm concentration($\times 10^6$ sperm/mL)		
	10 th day	20 th day	30 th day	10 th day	20 th day	30 th day
Control (0 μ g LHRHa)	25 \pm 4	35	ND	753 \pm 144	1,029 \pm 326	ND
100 μ g LHRHa	19 \pm 8	22	9 \pm 3	363 \pm 77	590 \pm 255	272 \pm 66
200 μ g LHRHa	23 \pm 1	10	13 \pm 2	643 \pm 77	681 \pm 238	298 \pm 31

ND: not detectable.

<Table 2> Spermatoctrit and sperm concentration at 0 hr. and 96 hr. after hCG injection

Treatment	Spermatoctrit		Sperm concentration($\times 10^6$ sperm/mL)	
	0 hr.	96 hr.	0 hr.	96 hr.
Control (0 IU hCG)	21	ND	1,060	ND
100 IU hCG	24	15 \pm 4	1,167 \pm 103	294 \pm 161
200 IU hCG	23	18 \pm 2	1,060	681 \pm 55
400 IU hCG	19	11 \pm 2	712 \pm 98	434 \pm 89
800 IU hCG	ND	11 \pm 2	413	403 \pm 65

ND: not detectable.

IV. 고찰

외인성 호르몬을 이용한 어류의 성숙, 배란 및 배정은 많은 경골어류에서 성공적으로 이용되어 오고 있다(Zohar and Mylonas, 2001; Lim et al., 2004). 호르몬 처리 방법 중 주사에 의한 방법은 호르몬이 단시간에 체내로 흡수되어 혈중 농도가 급격히 높아져 빠른 시간 내에 대사가 이루어지므로 비교적 단기간에 종료시킬 수 있는 성숙, 배란 및 배정 유도에 적합하다(Pankhurst and Poortenaar, 2000; Lim and Kim, 2007). 반면 펠릿의 처리 방법은 콜레스테롤이나 폴리머수지를 바탕으로 펠릿을 제조한 후 근육이나 복강에 삽입하는 방법이다. 펠릿처리는 주사와 반대로 장기간 서서히 체내에 흡수되는 효과를 얻을 수 있

므로 처리 횟수를 줄일 수 있으므로 노력과 어류에 대한 스트레스를 감소시키는 장점이 있다(Lim et al., 2002; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004; Lim, 2016).

많은 가자미류에서 배정을 유도하기 위하여 외인성 호르몬을 처리한 경우 처리방법에 상관없이 대부분 정액증산 효과를 관찰할 수 있었다(Harmin and Crim, 1993; Clearwater and Crim,1998; Shangguan and Crim, 1999; Pankhurst and Poortenaar, 2000; Zohar and Mylonas, 2001; Lim et al., 2002; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004; Lim and Kim, 2007). 본 연구에서 비록 외인성호르몬 처리 시기는 달랐지만 LHRHa 200 μ g 펠릿 처리 후 10일째 막대 정액량의 증가가 관찰되었으며, 400과 800 IU hCG 주사 후 96시간

에 채정하였을 때 대조구보다 정액량이 증가하였다. 박대는 우리나라 서해와 남해 서부해역 및 동중국해에서 발해만에 이르는 해역에 분포하는 종으로 참서대구 어류 중 가장 대형종이고 성장이 빨리 산업적으로 유용한 종이다(Kang et al., 2012). 따라서 중국과 한국에서는 박대양식을 위해 인공 종자생산 기술개발에 주력하고 있으나, 수컷 박대의 사육 시 성숙 지연, 배정의 실패 및 적은 정액 생산 등의 현상을 보임으로써 종자생산을 어렵게 하고 있다. 이 연구에서 hCG를 주사한 실험어와 GnRHα 펠릿을 이식한 실험어 모두에서 정액이 증가하였고, Sct는 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 이전의 연구(Lim et al., 2003; 2004)에서 언급한 것처럼 증가한 정액량과 감소한 Sct 사이에 연관성이 있음을 의미한다. 즉 정액량 증가와 주요 메커니즘은 수화현상에 의한 것임을 의미한다. 이 실험에서도 외인성 호르몬이 일부 배정을 유도하여 mL당 정자 수를 증가시켰지만, 수화현상에 따른 정장(seminal plasma) 성분의 양적 증가가 더 빠르게 일어난 것을 알 수 있었다. 호르몬처리 후 Sct의 감소는 이미 저자 등이 보고한 강도다리(Lim et al., 2002)와 greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*) (Lim et al., 2004) 및 winter flounder (*Pleuronectes americanus*)(Shangguan and Crim, 1999), plaice (*Pleuronectes platessa*)(Vermeirssen et al., 1998) 등에서 보고되었다. 그러나 winter flounder (Haemin and Crim, 1993), white bass (*Morone chrysops*) (Mylonas et al., 1997) 및 yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*)(Clearwater and Crim, 1998)에서는 정액량 증가가 Sct 감소와 연관성이 없었다. 이러한 차이는 산란시기의 차이, 정액 채취빈도, 호르몬 처리방법의 차이 또는 종 특이성 등에 의해 유발될 수 있지만 아직까지 그 원인은 명확하지 않다. 본 연구에서도 산란기 초기에 LHRHα 펠릿을 삽입한 경우와 산란 후기에 hCG를 주사한 경우 정액 증산 효과에서 차이를 보였다. 따라서 박대에서 정액 채취에 적합한 외인성호르몬 처리시

기, 정액 채취빈도 및 호르몬 처리 방법에 대한 체계적인 연구가 요구되며, 호르몬 처리 후 얻어진 정액의 질에 대한 평가도 검토되어야 하겠다.

References

- Clearwater, S. J. & Crim, L. W.(1998). Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*, Fish Physiol. Blochem. 19, 349~357.
- Garcia, L. M. B.(1991). Spermiation response of mature rabbitfish, *Siganus guttatus* bloch, to luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHα) injection, Aquaculture 97, 291~300
- Garcia, L. M. B.(1993). Sustained production of milt in rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, by weekly injection of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHα), Aquaculture 113, 261~267.
- 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, 399~619.
- Kang, H. W. · Lim, H. K. · Kang, D. Y. · Han H. S. · Do, Y. H. & Park, J. S.(2012). Maturation and spawning of the female Tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* in the West Coast of Korea, Dev. Reprod. 16, 87~93.
- King, H. R. & Young, G.(2001). Milt production by non-spermiating male Atlantic salmon (*Salmo salar*) after injection of a commercial gonadotropin releasing hormone analog preparation, 17-dihydroxy-4-pregnen-3-one, alone or in combination, Aquaculture 193, 179~195.
- Lee, C. S. · Tamaru, C. S. · Kelley, C. D. & Banno, J. E.(1986). Induced spawning of milkfish, *Chanos chanos*, by a single application of LHRH-analogue, Aquaculture 58, 87~98.
- Lim, H. K.(2016). Effects of exogenous hormones on ovulation and gonadal steroid plasma levels in starry flounder, *Platichthys stellatus*, Aquaculture International, DOI 10.1007/s10499-016-9971-6.
- Lim, H. K. · Han, H. S. & Chang, Y. J.(2002).

- Effects of gonadotropin-releasing hormone analog on milt production enhancement in starry flounder *Platichthys stellatus*, Fisheries Science 68, 1197~1204.
- Lim, H. K. & Kim, S. Y.(2007). Effect of exogenous hormones on spermiation in the starry flounder *Platichthys stellatus*, J. Kor. Fish. Soc. 40(6), 374~379.
- 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.
- Linhart, O. & Billard, R.(1994). Spermiation and spermquality of European catfish (*Silurus glanis* L.) after implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract, J. Appl. Ichthyol. 10, 182~188.
- Linhart, O. · Peter, R. E. · Rothbard, S. · Zohar, Y. & Kvasnicka, P.(1995). Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract, Aquaculture 129, 119~121.
- Mananos, E. · Carrillo, M. · Sorbera, L. A. · Mylonas, C. C. · Asturiano, J. F. · Bayarri, M. J. · Zohar, Y. & Zanuy, S.(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.
- Moon, S. H. · Lim, H. K. · Kwon, J. Y. · Lee, J. K. & Chang, Y. J.(2003). Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus*, Aquaculture 218, 703~716.
- Mylonas, C. C. · Gissis, A. · Magnus, Y. & Zohar, Y.(1997). Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRH-a-delivery system, Aquaculture 153, 301~313.
- Mylonas, C. C. & Zohar, Y.(2001). Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*, Aquaculture 202, 205~220.
- Overseas Fishery Cooperation Foundation of Japan (2009). Names and illustrations of fishes from the East china Sea and Yellow Sea, Nihon Shiko Printing Co. LTD, 784.
- 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. Fresh. Behav. Physiol. 33, 141~159.
- Shangguan, B. & Crim, L. W.(1999). Seasonal variations in sperm production and sperm quality in male winter flounder, *Pleuronectes americanus*: the effects of hypophysectomy, pituitary replacement therapy, and GnRH-A treatment, Mar. Biol. 134, 19~27.
- Sorbera, L. A. · Mylonas, C. C. · Zanuy, S. · Carrillo, M. & Zohar, Y.(1996). Sustained administration of GnRH-a increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass, J. Exp. Zool. 276, 361~368.
- Ueda, H. · Kambegawa, A. & Nagahama, Y.(1985). Involvement of gonadotropin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus* and goldfish, *Carassius auratus*, Gen. Comp. Endocrinol. 59, 24~30.
- Vermeirssen, E. L. M. · Shields, R. J. · Mazorra de Quero, C. & Scott, A. P.(2000). Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), Fish Physiol. Biochem. 22, 77~87.
- Zohar, Y. & Mylonas, C.(2001). Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes, Aquaculture 197, 99~136.

-
- Received : 21 March, 2016
 - Revised : 07 April, 2016
 - Accepted : 11 April, 2016