

条斑星鲈精巢年周期发育规律和血液性 类固醇激素含量变化

李春广^{1,2} 柳学周^{1*} 徐永江¹ 王妍妍¹ 孙中之¹

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室

中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 采用组织学方法和放射免疫法(RIA)等技术方法,研究了人工养殖条件下条斑星鲈雄性亲鱼精巢发育规律和性类固醇激素的年周期变化规律。实验结果表明,条斑星鲈精巢中可见 5 个时相的生殖细胞类型,精巢发育可分为 5 期。条斑星鲈雄鱼 GSI 值自 10 月开始升高,12 月达峰值($P \leq 0.05$),之后显著下降并保持较低值至下一次生殖周期开始。HSI 值在 11~12 月保持较高表达值,其他各月份保持相对稳定水平。CF 值在 5~8 月保持较高水平,其他月份保持平稳状态。雄鱼血浆中睾酮(T)水平自 9 月开始升高并在 12 月(V 期精巢)达到峰值,其后显著下降并在其后的月份保持较低水平,而雌二醇(E_2)在 2 月出现峰值,其他月份保持相对稳定水平。

关键词 条斑星鲈 精巢发育 组织学 性类固醇激素

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0035-07

Annual maturation of testis correlated with sex steroids level in male barfin flounder broodstocks

LI Chun-guang^{1,2} LIU Xue-zhou^{1*} XU Yong-jiang¹

WANG Yan-yan¹ SUN Zhong-zhi¹

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

(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT The annual maturation cycle of testis and variation of sex steroids level in male barfin flounder were investigated by histological and radioimmunoassay methods. The results showed that gametes exhibited five different phases during the annual development cycle, accordingly the testis maturation cycle can be divided into five stages. The biological parameters including gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI), and condition factor (CF)

国家鲆鲽类产业技术体系建设项目(nycytx-50)、国家“863”计划项目(2010AA10A402;2006AA10A414)、公益性农业行业专项项目(nyhyzx07-046)和农业科技成果转化资金项目(2008GB23260382)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830506

收稿日期:2011-08-15;接受日期:2011-10-09

作者简介:李春广(1986-),男,硕士研究生,主要从事鱼类繁殖生理研究。E-mail:leechwngwang@163.com, Tel: 13475817851

were also recorded and they exhibited reasonable variation during the testis maturation. The GSI began to increase in October and peaked in December, and then dropped dramatically and maintained until the next maturation cycle. The HSI value was relatively low during the annual cycle except in November and December. The CF value stayed at a high level from May to August and maintained a relative low level at other months. The serum testosterone level increased from September and peaked in December, then dropped to a relatively lower level until the next maturation cycle. Meanwhile, the serum estradiol level peaked in February and maintained at a relatively low level during the annual maturation cycle. These results highlight the reproductive biology of male barfin flounder, and can serve as useful reference for maturation regulation of male broodstocks.

KEY WORDS *Verasper moseri* Testicular development Histology
Serum sex steroid level

条斑星鲆 *Verasper moseri* 属鲆形目 Pleuronectiformes、鲆亚目 Pleuronectoridei、鲆科 Pleuronectidae, 星鲆属 *Verasper*, 为大型冷温性底栖比目鱼种(李思忠等 1995), 主要分布在鄂霍次克海、日本西北海域、朝鲜半岛以东和西南海区及中国的黄渤海区。条斑星鲆具有生长快、耐低温、抗逆性强的优良特性, 是一种适宜于人工养殖和资源增殖开发的优良品种(柳学周等 2009)。国内外学者对条斑星鲆的繁殖特性已经进行了相关研究(金国雄 2010), 为了进一步认识条斑星鲆雄鱼的繁殖特性, 在 2010~2011 年繁殖季节, 利用组织学、放射免疫技术、形态测量方法系统研究了人工养殖条件下条斑星鲆精巢年周期发育的组织学特征、性类固醇激素(雌二醇和睾酮)的季节性变化规律及其与环境因子调控的关系, 以期深入认识条斑星鲆的精巢发育的生理学和内分泌机制, 为其繁殖生物学和人工调控成熟提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及取样方法

实验于 2010~2011 年在青岛忠海水产有限公司进行。实验用性成熟雄性亲鱼取自青岛忠海水产有限公司培育的 3 龄以上的人工亲鱼。每月取样 1 次, 每次取样 3~5 尾, 取满一周年。实验用亲鱼全长 39~53 cm, 体重 1 000~1 400 g。亲鱼周年培育水温 7~18 °C, 盐度 29~31, pH 7.8~8.2, 溶解氧 6 mg/L 以上, 日换水率 400%~600%。亲鱼饵料为新鲜杂鱼。日投喂两次, 投喂量为鱼体重的 1%~2%, 及时清除残饵、排污。亲鱼年周期培育水温和光照时间变化见图 1。

实验鱼使用 300 mg/L 的 MS222 麻醉后测量其生物学特征, 取性腺在波恩氏固定液中固定 24 h 后转入 70% 酒精保存。实验鱼每月抽血取样 1 次, 每次 5~7 尾, 取样与性腺取样同步, 满一周年。采用背面尾部静脉抽血方法取血, 使用 1 ml 无菌注射器, 每尾亲鱼抽血 1.5 ml, 保存在 1.5 ml Eppendorf 离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min 后, 分离上层血清, 保存在 -40 °C 冰箱备用。

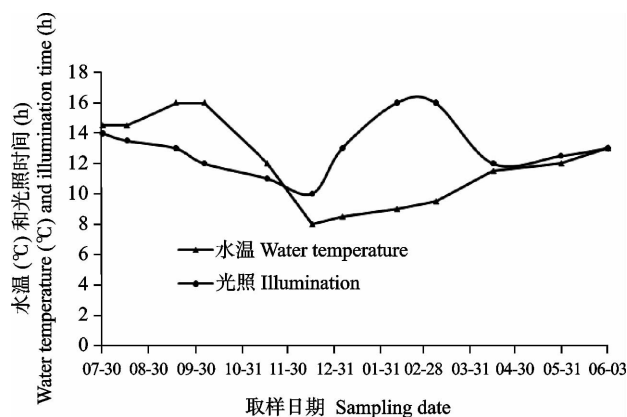


图 1 人工养殖条斑星鲆雄鱼的水温和光周期调控促熟
Fig. 1 The photothermal schedule for conditioning cultured male barfin flounder

1.2 组织切片、观察

固定的性腺组织经梯度酒精脱水、透明、包埋,切成 $5\sim 8\ \mu\text{m}$ 的切片,H.E染色,中性树胶封片,在显微镜(NIKON 90i)下拍照观察。用目微尺测量各种雄性生殖细胞大小。每尾鱼的性腺样品均做连续切片,随机选取30个视野,分析并测量每个视野中所有生殖细胞类型及组成。根据精母细胞发育的结构特点和每月切面上各种类型生殖细胞的比例,对精巢发育进行分期。

1.3 性类固醇激素测定

采用温海深等(2006)的放射免疫法(RIA)并适当进行修改来测定血浆中雌二醇(E_2)和睾酮(T)的表达含量,测定数据以平均值 \pm 标准差来表示。实验所用 γ 免疫计数器(SN695B6)购于上海日环光电有限公司。

1.4 测量和数据统计分析

对实验鱼进行生物学测量[体重(BW)、体长(BL)、内脏重(VW)、性腺重(GW)、肝脏重(LW)]。

性腺发育指数(GSI)= $(GW/BW - VW) \times 100$;

肝重指数(HSI)= $(LW/BW - VW) \times 100$;

肥满度(CF)= $(BW/BL^3) \times 100$ 。

采用Duncan's test对 E_2 和T表达水平、 GSI 值、 HSI 值、 CF 值进行单因素方差(ANOVA)分析(SPSS软件,V16.0),检测各月份间变化差异的显著性,取差异显著性水平(P)为0.05, $P < 0.05$ 视为差异显著,反之为不显著。

2 结果

2.1 精巢外部结构

条斑星鲷雄鱼精巢位于腹腔后方,消化道的腹面,不沿体侧向后延伸,左右各1片,呈半月状,非生殖季节颜色为淡的暗红色且萎缩,生殖季节颜色变得亮而丰满。精巢以较长系膜与生殖孔连接,两片精巢间以较为丰富的系膜连接在一起。精巢腹面表面可见较为粗大的血管和较多的毛细血管(图2-A,B,C,D)。性成熟亲鱼的精巢长 $2.9\sim 5.9\ \text{cm}$,宽 $1.8\sim 3.3\ \text{cm}$,生殖季节轻压精巢可见有乳白色精液流出,解剖精巢可见乳白色精液充满精巢。

2.2 精巢分期和发育特征

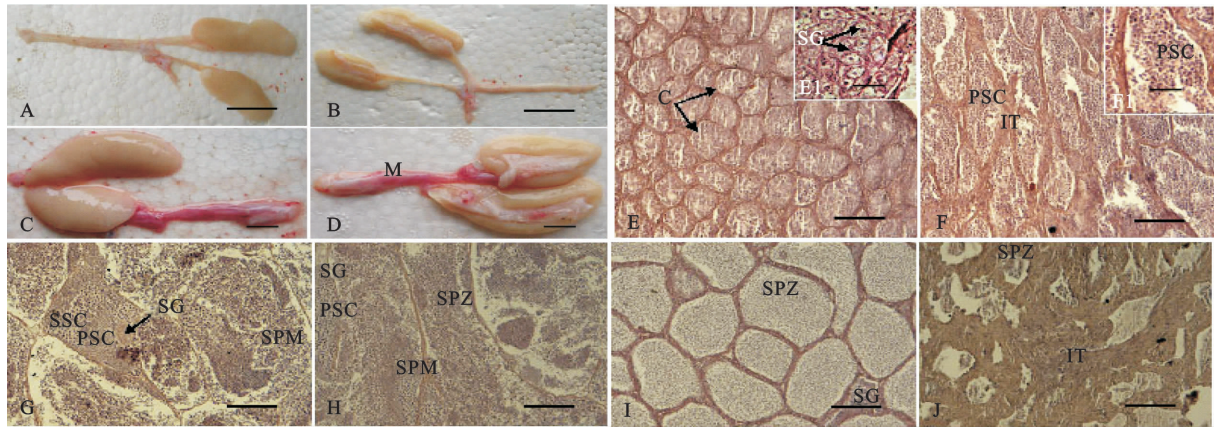
条斑星鲷精巢属小叶型结构。年周期发育过程中精巢中可见5个发育时期的生殖细胞类型:精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子。根据不同月份精巢中生殖细胞类型和所占比例,精巢年周期发育划分为5个时期:精原细胞增殖期(Ⅱ期),精母细胞生长成熟期(Ⅲ期)、精细胞变态期(Ⅳ期)、精子成熟期(Ⅴ期)、精巢退化期(Ⅵ期)。

2.2.1 精原细胞增殖期(Ⅱ期)

研究表明,Ⅱ期精巢分为两种,一种是繁殖后再待成熟个体中的Ⅱ期精巢,另外一种为初次进入生殖周期个体中的Ⅱ期精巢。本研究取样鱼为繁殖后再待成熟个体。精小叶蜂窝状界限明显,小叶中主要是精原细胞,占据50%以上的精巢切面,细胞直径约 $1.2\sim 1.7\ \mu\text{m}$ 。胞核明显,大核仁1个,染色较深(图2-E)。

2.2.2 精母细胞生长成熟期(Ⅲ期)

精巢体积开始增大。初级卵母细胞直径 $0.9\sim 1.3\ \mu\text{m}$,次级精母细胞直径 $0.3\sim 0.6\ \mu\text{m}$,精细胞直径 $0.06\sim 0.1\ \mu\text{m}$ 。本期精巢可见精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞共存,精巢切面上,初级精母细胞可占切面面积20%以上,次级精母细胞较少,精细胞数量较多,约60%(图2-F)。



A. 排精后精巢(背面观),比例尺=2 cm; B. 排精后精巢(腹面观),比例尺=2 cm; C. 排精期精巢(背面观),比例尺=2 cm; D. 排精期精巢(腹面观),比例尺=2 cm; E. II期精巢,示精原细胞(SG)和精小囊(C),比例尺=20 μm ; E1 示放大的精原细胞,比例尺=10 μm ; F. III期精巢,示初级精母细胞(PSC),精原细胞和间质组织(IT),比例尺=20 μm ; F1 示放大的初级精母细胞,比例尺=10 μm ; G. IV期早精巢,示精原细胞(SG)、初级精母细胞(PSC)、次级精母细胞(SSC)、精细胞(SPM)共存,比例尺=20 μm ; H. IV期晚精巢,示精原细胞(SG)、初级精母细胞(PSC)、次级精母细胞(SSC)、精细胞(SPM)和小量精子(SPZ)共存,比例尺=20 μm ; I. V期精巢,示精原细胞(SG)和精子(SPZ),比例尺=20 μm ; J. VI期精巢,示间质组织(IT)和残留精子(SPZ),比例尺=20 μm

A. Testis after spermiation (front view), bar=2 cm; B. Testis after spermiation (ventral view), bar=2 cm; C. Testis in spermiation (front view) bar=2 cm; D. Testis in spermiation (ventral view), bar=2 cm; E. Testis at stage II, upper right, bar=20 μm (E1), showing the magnification of spermatogonia, bar=10 μm ; F. Testis at stage III, upper right, bar=20 μm (F1), showing the magnification of primary spermatocyte, bar=10 μm ; G. Testis at early stage IV, showing the coexistence of spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte and spermatid in the testis, bar=20 μm ; H. Testis at late stage IV, synchronicity of gametes is obvious, some spermatozoa appeared, bar=20 μm ; I. Testis at stage V, spermatozoa occupied most of the testis and some spermatogonia were also seen, bar=20 μm ; J. Testis at stage VI, the interstitial tissue proliferated and some residual spermatozoa still being seen in the cyst. M: Mesentery; C: Cyst; IT: Interstitial tissue; SG: Spermatogonia; PSC: Primary spermatocyte; SSC: Secondary spermatocyte; SPM: Spermatid; SPZ: Spermatozoa, bar=20 μm

图2 条斑星鲷精巢年周期发育规律

Fig. 2 Testicular development during the annual sexual cycle of the cultured male barfin flounder

2.2.3 精子细胞变态期(IV期)

本期精巢的发育同步性相对较高,特别是晚期。早中期精巢可见精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和精细胞共存(图2-G)。本期后期,精子细胞和正在形成的精子数量急剧增多,进可见少量精原细胞和初级精母细胞,同步性增强。精细胞圆形小粒状,体积在所有精细胞中最小,细胞核大、染色深,整个精巢看到的是染成深蓝色的精细胞胞核,而看不到明显的细胞质。精巢切面上,初级精母细胞可占切面面积少于20%,次级精母细胞较少,精细胞多,约60%(图2-H)。

2.2.4 精子成熟期(V期)

精巢颜色变为亮乳白色,解剖精巢可见流动的精液。成熟的精子占据精巢切面90%以上,仍可见少量初级精母细胞和精原细胞(图2-I)。轻轻挤压雄鱼腹部可见乳白色精液自生殖孔排出,镜检精子活力达90%以上,可用于人工授精。此期雄鱼精液采集量最大,精子质量最高。

2.2.5 精巢退化期(VI期)

排完精子的精巢体积明显减小,颜色变得黯淡。精巢中可见精子排出留下许多囊腔,仍可见少量精原细胞(少于5%)(图2-J)。

根据切片观察和生产实践的结果,发现性成熟的条斑星鲷雄鱼精巢发育保持在II期(5~7月)以上水平,生殖季节前期达到IV期(8~10月),生殖过程保持V期(11月~翌年3月),繁殖季节结束后,精巢退化吸收,达到VI期(4月)。一年中,雄鱼性腺中可检测到精子及可采集到精液的时间约为6~7个月(10月~翌年3、4

月),其中以 11 月~翌年 2 月早间精液质量较高,3 月下旬~8 月雄鱼采集不到精液,10 月开始精液开始生成,至 11 月后精子活力明显上升。雄鱼可采集到精液的时间随着环境调控和亲鱼的发育状况各年度有所差异,因此良好的营养和环境因子调控是获得优质精子的重要保障。

2.3 生物学指数的变化

条斑星鲷雄鱼 GSI 值自 10 月(水温快速下降,光照时间缩短)开始升高,随着光照时间的缩短而快速增长,12 月 GSI 值(排精期)达峰值($P < 0.05$),1~3 月仍保持相对较高水平,之后显著下降并保持相对较低水平至下一次生殖周期开始(图 3)。HSI 值在 11~12 月保持较高表达值,其他各月份保持相对稳定的水平(图 3)。CF 值在 5~8 月保持较高水平,其他月份保持相对稳定的水平(图 3)。

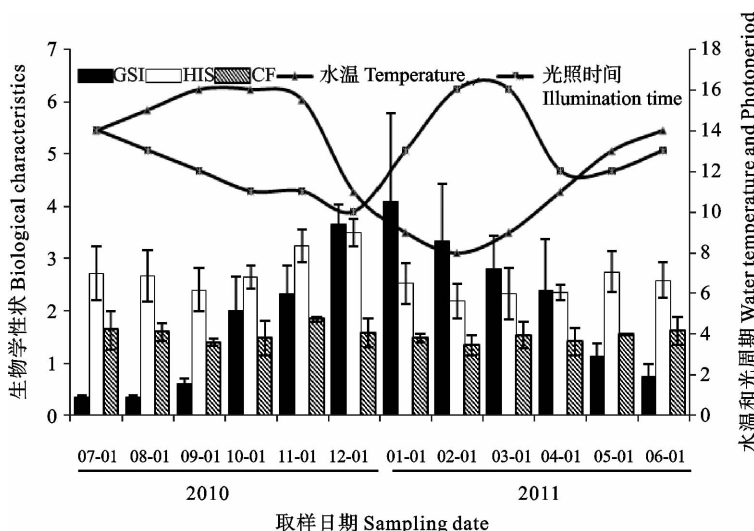


图 3 雄鱼生物学性状在精巢年周期发育过程中的变化

Fig. 3 The variation of biological characteristics of the male broodstock during annual maturation

2.4 性类固醇激素 T 和 E₂ 的周期变化

雄鱼血浆中睾酮(T)水平自 9 月(精巢发育开始期)开始快速升高并在 12 月(V 期精巢)达到峰值,其后显著下降并在其后的月份保持较低水平(图 4);而雌二醇(E₂)在 2 月出现峰值,晚于睾酮出现峰值的时间,其他月份保持相对稳定水平(图 5)。

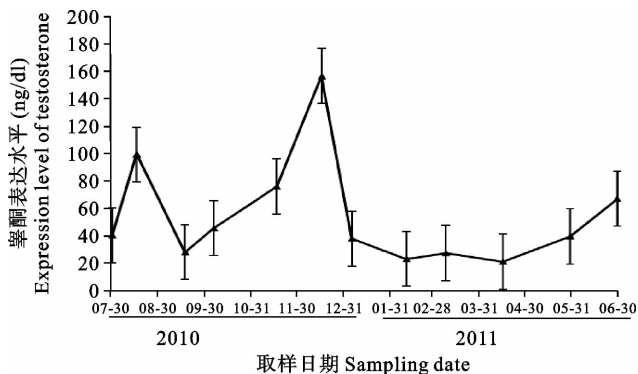


图 4 雄鱼血浆中睾酮(T)的周年变化

Fig. 4 The annual variation of plasma testosterone level in male barfin flounder

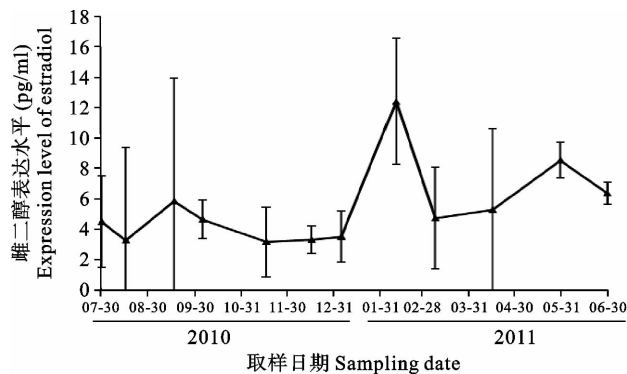


图 5 雄鱼血浆中雌二醇(E₂)的周年变化

Fig. 5 The annual variation of plasma estradiol level in male barfin flounder

3 讨论

本研究首次揭示了人工养殖条件下条斑星鲈雄鱼精巢的年周期发育规律和性类固醇激素的周期变化特性,为亲鱼的培育调控成熟和优质精子的获取提供了重要技术参考。

条斑星鲈的精巢结构与大多数硬骨鱼类一样,属于小叶型结构,特点为初级精原细胞在精小叶的所有部位都可存在,不同于小管型精巢的初级精原细胞只在小管的盲端分布(Billard *et al.* 1982)。精巢发育模式及其年周期变化规律与其他硬骨鱼类如石鲈 *Kareius bicoloratus* (高玲等 2006)、圆斑星鲈 *Verasper variegatus* (Koya *et al.* 2003)相似,生殖细胞经历了精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子5个典型发育阶段,且精细胞在发育过程中出现非同步现象。另外,其他鱼类精细胞发育表现出的同步-非同步-同步的“追赶”现象(林鼎等 1984)也在本研究中得到验证:Ⅱ期的精巢主要是精原细胞,同步性较好。Ⅲ期精巢中精原细胞、精母细胞和精细胞同时存在,发育非同步性明显,Ⅳ期晚精巢中精细胞的发育重新表现出高度一致,这为条斑星鲈分批同步型排精模式提供了保证。另外,本研究观察到的初级精母细胞在Ⅳ期和Ⅴ期精巢中都存在,表明精巢拥有持续产生精子的能力,也是生殖细胞分批成熟排放的证据之一,这与其同属鱼类圆斑星鲈的研究结果相似(Koya *et al.* 2003)。

硬骨鱼类的性腺都是在环境因子(温度、光照等)调控下逐渐达到成熟(Bye 1984)。本研究发现,条斑星鲈性腺发育随着水温的降低和光照时间的缩短后,再增加而逐渐加速(10月~翌年1月),这与圆斑星鲈性腺发育规律大致相同(徐永江等 2011)。适宜的水温使得亲鱼在排精期保持较高的精子质量。在排精结束后,精巢随着水温的升高而逐渐退化。这种水温和光周期调控与性腺发育的关系在其他硬骨鱼类中也得到验证,如在黑光鲈 *Pleuronectes obscura* (Yamamoto 1956)和冬鲈 *Pleuronectes americanus* (Harmin *et al.* 1995)中同样表现出类似的协同变化规律。多数研究指出性腺重新启动发育的关键外界因素是光周期和营养(Burton *et al.* 1984、1987),但是大多数研究主要集中在卵巢方面,关于鲈鲈类雄鱼配子发生发育与环境因子调控关系,国外学者研究指出还与背景色等外界因素有关(Amiya *et al.* 2008)。

条斑星鲈的GSI值在5~9月保持相对较低水平,自10月后显著上升并快速达到峰值,这段时期同时是精巢内生殖细胞变化最为剧烈的时期,精巢快速成熟,4月后GSI快速下降,此时雌鱼的繁殖也已结束,这种快速的下降可能与生精过程生殖干细胞胞质的退化有关(Billard 1987),这在其他鲈鲈类雄鱼的研究中也有类似报道(Wingfield *et al.* 1977)。另外,GSI峰值在年周期发育过程中仅出现一次,这也为条斑星鲈是分批同步排精类型鱼类提供了佐证。HSI和CF的变化都和性腺的发育紧密联系,HSI在11~12月保持相对较高水平,这段时间正是精巢快速发育成熟的关键阶段,说明肝脏在雄鱼的配子发育过程中也可能起着重要的支撑作用,但具体机理尚不明确。CF在早期增长较快,说明早期鱼类以长体为主,后期进入以性腺发育为主的阶段而使CF相对下降。

性类固醇激素尤其是睾酮(T)和酮基睾酮(11-KT)等在雄鱼的配子发生过程中起着主要的调控作用(Billard *et al.* 1982),但关于哪种类固醇激素在硬骨鱼类雄性配子发育成熟中起主要调节作用,至今仍存在分歧(Miura *et al.* 1991; Matsuyama *et al.* 1991)。在其他鲈鲈类雄鱼配子成熟研究中,这两种激素在成熟过程中表达水平都显著上升(Liu *et al.* 1991; Sol *et al.* 1998)。本研究中也观察到T类似的表达规律,T表达水平自9月开始显著升高,这正是组织学观察到的精母细胞成熟期,其后生殖细胞不断变态成熟,T表达水平也不断升高并在精巢成熟期达峰值,同时GSI的变化与T的变化呈现协同一致的关系,这些都证明了T在精巢成熟过程中具有重要的生理调控功能。已有研究表明, E_2 可在芳香化酶的介导下转化为T(Chang *et al.* 1999),本研究中 E_2 在T峰值之后达到峰值,可能表明雄鱼在排精盛期过后,生精干细胞的退化导致了对T的需求降低,从而导致了芳香化酶介导的转化过程逐渐减弱, E_2 表达水平升高,具体的内分泌机理尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 李思忠,王惠民. 1995. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲷形目. 北京:科学出版社, 251~253
- 林 鼎,林浩然. 1984. 鳗鲡繁殖生物学研究Ⅲ. 鳗鲡性腺发育组织学和细胞学研究. 水生生物学集刊,8(2): 157~170
- 金国雄. 2010. 条斑星鲷雄性繁殖内分泌机理初步研究. 见:中国海洋大学硕士研究生学位论文,14~24
- 柳学周,徐永江,刘新富,陈 超,王妍妍,马爱军. 2009. 条斑星鲷(*Verasper moseri*)的早期生长发育特征. 海洋与湖沼,40(6):699~706
- 高 玲,温海深,马学坤,王连顺. 2006. 野生石鲷精巢发育及注射 LHRH-A 对血浆 T 水平的影响研究. 中国水产科学,13(5):845~851
- 徐永江,柳学周,王清印,赵 明,王妍妍,曲建忠. 2011. 养殖圆斑星鲷血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系. 中国水产科学,18(4):836~846
- 温海深,宋海霞,杨立廷,马学坤,高 玲. 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(4):115~120
- Amiya, N., Amano, M., Yamanome, T., Yamamori, K., and Takahashi, A. 2008. Effects of background color on GnRH and MCH levels in the barfin flounder brain. *General and Comparative Endocrinology*, 155(1):88~93
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., and Breton, B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39(1): 65~79
- Billard, R. 1987. Testis growth and spermatogenesis in teleost fish: the problem of the large interspecies variability in testis size. In: Idler, D. R., Crim, L. W., Walsh, L. W. (eds). *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish; 27 August, Memorial University of Newfoundland, St John's, Canada. Memorial University Press, St John's, Canada*, 183~186
- Burton, M. P., and Idler, D. R. 1987. An experimental investigation of the non-reproductive, post-mature stage in winter flounder. *J. Fish Biol.* 30(6): 643~650
- Burton, M. P., and Idler, D. R. 1984. The reproductive cycle in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Can. J. Zool.* 62(12): 2563~2567
- Bye, V. J. 1984. The role of environmental factors in the timing of reproductive cycles. In: Potts, G. W., Wootton, R. J. (eds). *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, London, 187~222
- Chang, C. F., Hung, C. Y., Chiang, M. C., and Lan, S. C. 1999. The concentration of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 177(1-4):37~45
- Harmin, S. A., Crim, L. W., and Wiegand, M. D. 1995. Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Mar. Biol.* 121(4): 601~610
- Koya, Y., Watanabe, H., Soyano, K., Ohta, K., Aritaki, M., and Matsubara, T. 2003. Testicular development and serum steroid hormone levels in captive male spotted halibut *Verasper variegatus*. *Fisheries Science*, 69(4): 792~798
- Liu, H., Stickney, R., and Dickoff, W. 1991. Changes in plasma concentrations of sex steroids in adult Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. *J. World Aquacult. Soc.* 22(1): 30~35
- Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Kitajima, C., and Matsuura, S. 1991. Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of captive Japanese sardine. *Jpn. J. Ichthyol.* 37(4): 381~390
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., and Nagahama, Y. 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88(13): 5774~5778
- Sol, S. Y., Olson, O. P., Lomax, D. P., and Johnson, L. L. 1998. Gonadal development and associated changes in plasma reproductive steroids in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington. *Fish. Bull. (Wash. D. C.)*, 96(4): 859~870
- Wingfield, J. C., and Grimm, A. S. 1977. Seasonal changes in plasma cortisol, testosterone and oestradiol-17 β in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 31(1): 1~11
- Yamamoto, K. 1956. Studies on the maturity of marine fishes. 1. Seasonal cycle in the spermary of the flounder, *Liopsetta obscura*. *Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst.* 8: 52~64