

수컷 자바리 *Epinephelus bruneus*에 있어서 hCG 투여에 따른 혈중 성호르몬 및 정자 활성화도 변화

김효원 · 김정현 · 박진우 · 정민환 · 지승철 · 김재훈* · 서병부** · 김대중†
국립수산과학원(연구사) · *국립수산과학원(연구원) · **대구대학교(교수) · †국립수산과학원(연구관)

Changes in Sex Steroid Hormones and Sperm Quality of Male Longtooth Grouper *Epinephelus bruneus* by Injection with Human Chorionic Gonadotropin

Hyo-Won KIM · Jung-Hyun KIM · Jin Woo PARK · Min Hwan JEONG · Seung-Chul JI ·
Jae-Hoon KIM* · Byoung Boo SEO** · Dae-Jung KIM†

National Institute of Fisheries Science(researcher) · *National Institute of Fisheries Science(intern researcher)
· **Daegu University(professor) · †National Institute of Fisheries Science(senior researcher)

Abstract

This study compared the milt volume, spermatocrit, and sex steroid hormone levels in the blood, and sperm motility and velocity in male longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*), with the application of human chorionic gonadotropin (hCG). The experimental group was injected with 500 IU hCG/kg body weight, whereas the control group was injected with saline solution (0.9% NaCl). The results indicated the former showed significantly higher levels of milt volume and spermatocrit than the latter, whereas sperm motility and velocity showed no significant differences between the two groups.

Regarding the analysis of sex steroid hormone levels in the blood, the plasma testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) levels of the group with hCG was significantly higher than those of the control two and seven days after the injection respectively. Therefore, hCG administration increased the plasma sex steroid hormone levels (T and 11-KT) and sperm volume of male longtooth grouper, whereas it had no effect on the sperm quality (i.e., motility and velocity). In follow-up research, the fertilization and hatching rates based on the sperm analysis will be compared and investigated to provide basic data for breeding in this species.

Key words : *Epinephelus bruneus*, Human chorionic gonadotropin, Longtooth grouper, Sex steroid hormone, Sperm quality

I. 서론

자바리 *Epinephelus bruneus*는 농어목 바리과에 속하며, 한국, 일본, 중국 등에서 기호도가 높아

상업적으로 중요한 고부가가치 어종이다 (Heemstra and Randall, 1993). 국내에서는 제주도 와 남해안 연안에 분포하며, 아열대 및 열대 해역의 산호초와 암초지대에 서식한다고 알려져 있

† Corresponding author : 064-720-2430, djkim4128@korea.kr

* 이 논문은 국립수산과학원 연구사업(R2021039)에 의해 연구되었음.

다(Song et al., 2005a). 그러나 남획과 서식지 파괴 등으로 자원량이 감소하고 있으며, 국제 자연 보전 연맹(international union for conservation of nature and natural resources, IUCN)의 적색목록(red list)에서 취약종(vulnerable, VU)으로 분류되어 자원관리를 위해서 안정적인 종자생산이 요구되는 어종이다(Thierry et al., 2008).

자바리, 붉바리 *E. akaara*, 능성어 *E. septemfasciatus* 등 바리과 어류는 대부분 자성선 속형 자웅동체어(proto gynous hermaphrodite)로서(Boo et al., 2020), 자연 조건에서 능성어는 체중 6 kg 이상, 붉바리는 전장 25 cm 또는 체중 0.5 kg 이상, 자바리는 전장 63 cm 또는 체중 4.4 kg 이상으로 성장한 후 일부 개체가 수컷으로 성 전환한다고 알려져 있다(Hamamoto et al., 1986; Tsuchihashi et al., 2003; Oh et al., 2013). 이러한 생물학적 특성으로 종자생산이 수컷 친어 및 양질의 정자 확보가 힘들어 안정적인 종자생산에 어려움을 주고 있다. 이와 같은 문제 해결을 위해 수컷 유도자(male inducer)로 널리 사용되는 17 α -Methyltestosterone (17 α -MT)과 aromatase 저해제(aromatase inhibitor, AI)인 letrozole와 fadrozole 등을 단독 및 복합적으로 이용하는 양성화 유도 연구와 정자 동결보존 등의 연구들이 다양하게 수행되어져 왔으나(Chao and Chow, 1990; Song et al., 2005b; Garcia et al., 2013; Lim and Le, 2013), 양질의 정자 확보를 위한 성성숙 유도 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

경골어류의 정자형성(spermatogenesis) 및 배정(spermiation)은 어류의 뇌하수체 추출물(pituitary extract), 생식소자극호르몬방출호르몬(Gonadotropin releasing hormone, GnRH) 및 생식소자극호르몬(Gonadotropin, GtH) 등과 같은 다양한 호르몬들을 이용하여 유도하고 있다(Lim and Kim, 2007; Guzman et al., 2011). 이 중 GtH의 일종인 인간 태반성생식선자극호르몬(hCG)는 구입이 쉽고 비교적 저렴하여 어류의 성성숙 유도를 위해 널리 이용되고 있으며(Lam, 1982), 강도다리 *Platichthys*

stellatus (Lim and Kim, 2007), 복섬 *Takifugu niphobles* (Goo et al., 2015), 박대 *Cynoglossus semilaevis* (Lim et al. 2016), 뱀장어 *Anguilla japonica* (Kim et al., 2018) 등 다양한 어종에서 정자형성 및 배정을 효과적으로 유도한다고 보고되었다. 최근 바리과 어류인 능성어(Park et al., 2016)와 붉바리(Boo et al., 2020)에서도 종자 생산 시 수컷 친어에게 hCG를 500 IU/kg body weight 농도로 투여하여 정자형성 및 배정을 유도하고 있으나, 이에 따른 성성숙 유도 효과는 조사된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 수컷 자바리를 대상으로 hCG에 의한 성성숙 유도 효과를 조사하고자 hCG 투여에 따른 배정량, spermatocrit, 정자 운동성(sperm motility), 운동속도(sperm velocity) 및 혈중 성호르몬(testosterone; T, 11-ketotestosterone; 11-KT) 농도 변화를 비교 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 실험디자인

실험어는 국립수산물과학원 제주수산연구소 위미시험포에서 사육중인 수컷 자바리(n=10, 평균 체중 7.6 \pm 1.7 kg)를 선별하여 2 ton FRP 수조 2개에 나누어 수용하였다. hCG (Daesung Microbiological Labs. Co., Korea) 실험구(n=5)는 500 IU/kg body weight (BW)의 농도로 복강 주사하였고, 대조구(n=5)는 생리식염수(0.9% NaCl)만 주사하였다. 샘플링은 실험시작시(Initial), 투여 2일 및 7일 후에 실시하였으며, 샘플링시 핸들링에 의한 어체 스트레스를 최소화하기 위해서 2-phenoxyethanol (200 ppm, Sigma, USA)를 이용하여 마취 후 수행하였다. 실험기간 동안 광주기 및 수온은 자연 상태를 유지하였다.

2. 배정량 및 Spermatocrit

hCG 투여에 따른 배정량 및 spermatocrit 변화

를 조사하기 위해 투여 2일 후, 마취된 개체의 생식공 주위를 깨끗하게 닦은 후 복부를 부드럽게 압박하여 채정하였고 배정량을 조사하였다. 채정된 정자는 포르말린에 1:3 비율로 희석시켜 microhematocrit (VS-12000, Vision Scientific Co., Ltd., Daejeon, Korea)을 이용하여 spermatocrit 측정에 이용하였다. 그 측정은 12,000 RPM에서 0~60분간 10분단위로 원심분리를 실시하여 spermatocrit 값이 안정되는 40분을 측정 기준으로 설정하였고, 각 정자의 spermatocrit는 3 반복으로 측정하였다.

3. 정자 운동성 및 운동속도

정자의 운동성 및 운동속도를 측정하기 위해 채정한 정자와 필터된 해수를 1:99의 비율로 섞어 정자의 활성을 유도한 후, 정자 화상분석기 (Hamilton Thorne, IVOS II)를 이용하여 정자의 운동성과 평균운동속도(the average path velocity, VAP), 직선운동속도(the straight line velocity, VSL) 및 나선운동속도(the curvilinear velocity, VCL)를 각 3반복으로 측정하였다.

4. 성호르몬 분석

hCG 투여에 따른 혈중 성호르몬 농도변화를 조사하기 위해서 실험시작시(Initial), 투여 2일 및 7일 후에 heparin 처리된 주사기를 이용하여 미부 혈관에서 혈액을 채취하였다. 채혈한 혈액은 원심분리(6,000 RPM, 15 min, 4°C) 후 혈장을 분리하여 성호르몬 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다.

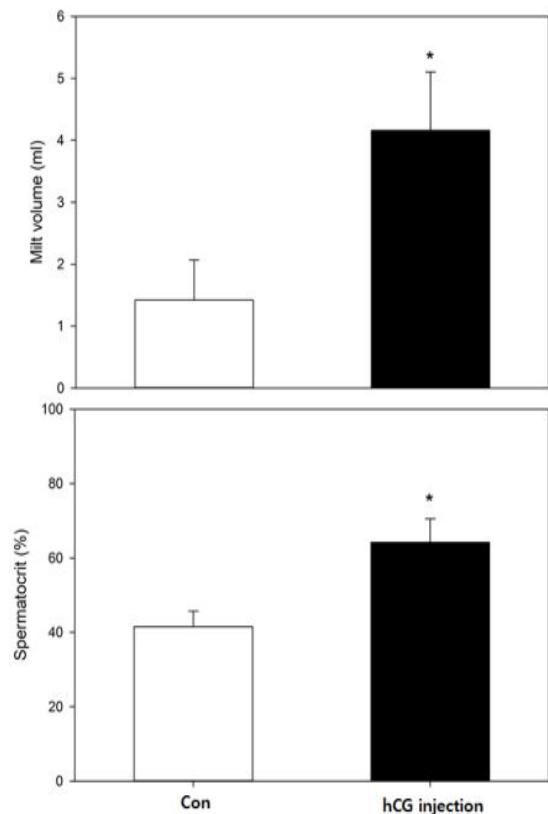
혈중 성호르몬은 T (EIA-1559, DRG, USA)와 11-KT (582751, Cayman, USA) kit를 이용하여 효소면역측정법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 측정하였다. 일련의 반응과정을 거친 후 Microplate reader (Sunrise, Tecan, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정한 후 Magellan (v17.2, Tecan, Switzerland)를 이용하여 결과 값을 계산하였다.

5. 통계분석

모든 결과값은 평균±SEM으로 나타냈다. 실험 결과는 SPSS program (Ver 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 정규성 및 등분산 검정을 실시한 후 독립변인 t-test로 실험구 사이의 유의성을 검정하였다($p < 0.05$).

Ⅲ. 결 과

1. 배정량 및 Spermatocrit



[Fig. 1] Change in the milt volume and spermatocrit of male longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) after injecting hCG 500 IU hCG/kg body weight. The data represents mean±SEM (n=5). * indicates significant differences between the groups ($p < 0.05$).

대조구와 hCG 투여구의 채정 결과, 대조구는 5마리중 4마리가 배정되었고, hCG 투여구는 5마리 모두 배정되었다. 대조구와 hCG 투여구의 배정량은 각각 1.4 ± 0.7 ml과 4.16 ± 0.9 ml로 나타났고, spermatocrit는 각 $41.5 \pm 4.2\%$ 와 $64.2 \pm 6.4\%$ 로 나타나 hCG 투여구에서 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.05$, [Fig. 1]).

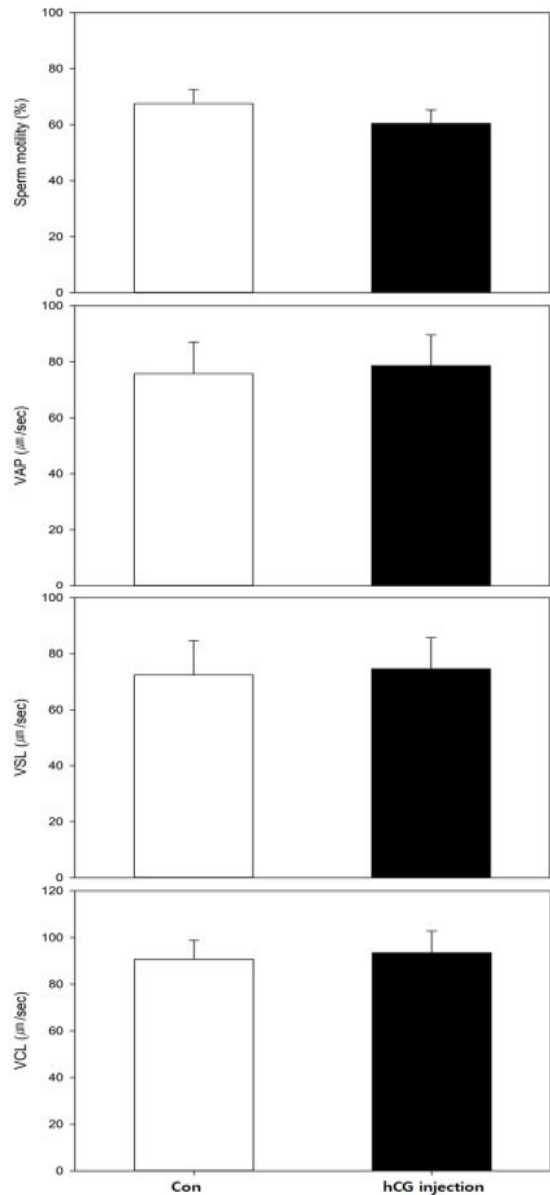
2. 정자 운동성 및 운동속도

자바리 정자의 운동성 및 운동속도 분석 결과, 대조구와 hCG 투여구의 정자 운동성은 각 $65.1 \pm 4.3\%$ 와 $60.4 \pm 4.9\%$, 평균운동속도(VAP)는 각 75.8 ± 11.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 와 78.6 ± 11.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$, 직선운동속도(VSL)는 각 72.4 ± 12.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 와 74.6 ± 11.1 $\mu\text{m}/\text{sec}$, 나선운동속도(VCL)는 각 90.7 ± 8.1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 와 93.5 ± 9.3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 로 나타나 호르몬 투여에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다([Fig. 2]).

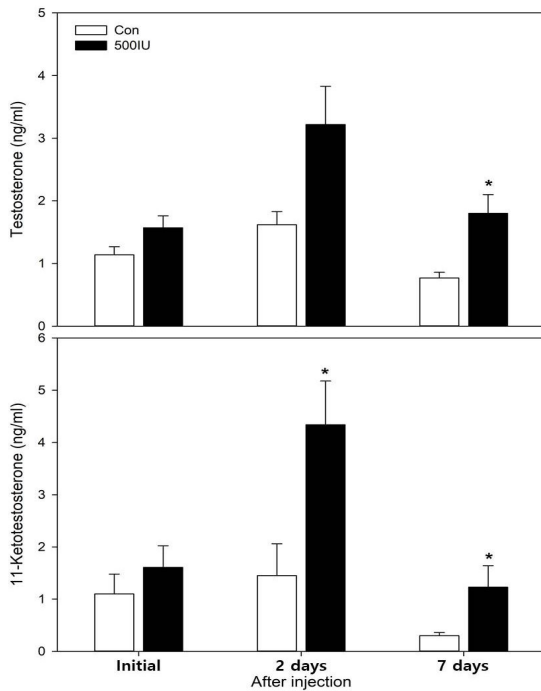
3. 혈중 성호르몬 농도 변화

실험시작시 대조구와 hCG 투여구의 혈중 T 농도는 각 1.14 ± 0.13 과 1.57 ± 0.19 ng/ml로 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다([Fig. 3]). 투여 2일 후, 대조구와 hCG 투여구의 혈중 T 농도는 각 1.62 ± 0.21 과 3.22 ± 0.61 ng/ml로 hCG 투여구에서 높은 경향을 보였고, 투여 7일 후는 각 0.77 ± 0.09 와 1.80 ± 0.30 ng/ml로 hCG 투여구에서 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$).

실험시작시 대조구와 hCG 투여구의 혈중 11-KT 농도는 각 1.10 ± 0.38 과 1.61 ± 0.41 ng/ml로 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다([Fig. 3]). 대조구와 hCG 투여구의 혈중 11-KT 농도는 투여 2일 후에 각 1.45 ± 0.61 과 4.34 ± 0.84 ng/ml, 투여 7일 후에 각 0.30 ± 0.06 과 1.23 ± 0.41 ng/ml로 실험기간동안 hCG 투여구에서 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$).



[Fig. 2] Changes in the sperm motility and velocity (average path velocity, VAP; straight line velocity, VSL; curvilinear velocity, VCL) of male longtooth grouper (*E. bruneus*) after injecting 500 IU hCG/kg BW. The data represents mean \pm SEM (n=5). There are no significant differences between the groups.



[Fig. 3] Changes in the sex steroid hormone (testosterone, T; 11-ketotestosterone, 11-KT) levels of male longtooth grouper (*E. bruneus*) after injecting 500 IU hCG/kg BW. The data represents mean±SEM (n=5). * indicates significant differences between the groups ($p < 0.05$).

IV. 고찰

본 연구는 hCG 투여가 수컷 자바리의 정자의 양과 질에 미치는 영향을 조사하기 위해 배정량, spermatocrit, 혈중 성호르몬 농도, 정자 운동성 및 운동속도의 변화를 비교 분석하였다.

본 연구 결과, hCG를 500 IU/kg BW 농도로 투여한 실험구의 배정량 및 혈중 성호르몬(T와 11-KT) 농도가 대조구보다 유의하게 높게 나타났다. 경골어류의 성성숙은 hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) 축에 의해 합성 및 분비되는 GnRH, GtH 및 sex steroid hormone에 의해 조절된다(Weltzien et al., 2004; Schulz et al., 2010).

hCG는 여포자극호르몬(Follicle-stimulating hormone, FSH)과 황체형성호르몬(Luteinizing hormone, LH)을 포함하는 GtH의 일종으로, 생식소에 GtH 수용체에 작용하여 estrogen 및 androgen과 같은 성호르몬(sex steroid hormone)을 합성에 관여한다(Schulz et al., 2010). 이 중 androgen (T와 11-KT)은 수컷의 정소발달을 조절하는 주된 성호르몬으로, 11-KT는 정자형성과정(spermatogenesis) 및 배정(spermiation)에 직접적으로 관여한다고 알려져 있다(Ueda et al., 1985; Miura et al., 1991a). 따라서 투여된 hCG에 의해 수컷 자바리의 체내 성호르몬 합성이 효과적으로 조절되어 혈중 성호르몬 농도가 증가하였고, 그 결과 정자형성과 배정이 촉진되어 배정량이 증가한 것으로 판단된다. 그러나 호르몬 투여에 의한 성성숙 유도 효과는 호르몬 투여 농도에 따라 차이를 보인다고 알려져 있어(Lin et al. 2016; Kim et al., 2018), 향후 호르몬 투여 농도에 따른 성성숙 유도 연구를 통해 효과적인 투여 농도의 구명이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구 결과, hCG 투여에 의해 수컷 자바리의 배정량과 함께 spermatocrit도 유의하게 증가하였다. Spermatocrit는 정자 밀도와 높은 연관성을 가지고 정자 밀도가 증가할수록 높은 수치를 보여, 다양한 어류의 정자 밀도 측정에 이용되고 있다(Rakitin et al., 1999). 따라서 hCG에 투여에 의해 증가된 혈중 성호르몬(T와 11-KT)이 정소의 정자형성을 촉진시켜 spermatocrit가 증가한 것으로 추정된다. 그러나, 배정량과 spermatocrit의 상관관계에 대한 타 어종의 연구에서 대서양 대구 *Gadus morhua* (Garber et al., 2009)는 배정량과 spermatocrit가 함께 증가하여 본 연구와 유사한 결과를 보였으나, 뱀장어와 white bass *Morone chrysops*에서는 배정량과 spermatocrit 사이에 상관관계를 보이지 않았고(Ohta et al., 1996; Mylonas et al., 1997), 강도다리, 박대 및 복섬 등의 경우 배정량이 증가함에 따라 spermatocrit가 감소하였다(Lim et al., 2002; Goo et al., 2015;

Lim et al., 2016). 이와 같은 차이는 채정빈도, 종 특이성, 호르몬 종류 및 처리방법 등에 의한 것으로 추정되고 있으나(Lim et al., 2016), 아직까지 명확한 원인은 밝혀지지 않았다.

본 연구에서 혈중 T 농도는 hCG 투여 2일 후부터 hCG 투여구에서 대조구보다 증가하는 경향을 보이고 투여 7일 후에 유의하게 높게 나타났으며, 혈중 11-KT는 실험기간동안 hCG 투여구에서 대조구보다 유의하게 높게 나타났다. hCG 투여에 따른 혈중 성호르몬 농도 변화에 대한 연구로 뱀장어는 hCG 투여 3일후 혈중 11-KT 농도가 최고치를 나타낸 후 감소하였으나, 투여 28일후까지 대조구보다 높은 농도를 보였고(Ohta and Tanaka, 1997), Walking catfish *Clarias batrachus*는 혈중 T와 11-KT 농도는 각 hCG 투여 18시간과 12시간 후에 최고치를 나타낸 후 감소하였다(Zairin et al., 1993). 반면 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli*의 경우 hCG 투여 6일후에 혈중 T 농도가 최고치를 보였다(Chang et al., 1991). 즉, hCG 투여에 의해 혈중 성호르몬 농도 증가하고 유지되는 기간은 체내 호르몬 대사능력에 따라 차이를 보이는 것으로 추정되며, 추후 장기적으로 호르몬 농도 변화 조사가 수행된다면 적합한 호르몬 투여 방법을 설정할 수 있을 것으로 생각된다.

hCG 투여에 따른 정자 운동성 및 운동속도의 분석 결과는 양실험구 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. 정자 운동성 및 운동속도는 높을수록 수정에 유리하여 정자의 질을 판단하는 중요한 요인이며(Linhart et al., 2000; Rurangwa et al., 2004), 혈중 17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregne-3-one (DHP), 11-deoxycorticosterone (DOC), 정장액의 이온 농도 및 pH 등 다양한 요인에 영향을 받는다고 알려져 있다(Miura et al., 1991b; Pankhurst and Poortenaar, 2000; Milla et al., 2008). Yellow flounder *Pleuronectes ferrugineus* 와 강도다리 등에서는 외재성 호르몬 투여에 의해 정자 운동성이 증가하였으나(Clearwater and Crim, 1998; Lim et

al., 2002), 뱀장어와 greenback flounder *Rhombosolea tapirina* 등의 경우는 외재성 호르몬 투여와 정자 운동성 사이에 연관성을 보이지 않았다(Lim et al., 2004; Kim et al., 2018). 따라서 정자 운동성 및 운동속도 증가를 위해서는 다양한 종류의 외재성 호르몬 투여와 그에 따른 DHP, DOC, 정장액 이온 및 pH 변화 조사를 함께 수행해야 할 것으로 생각된다.

본 연구결과, hCG를 500 IU/kg BW 농도로 투여한 실험구의 배정량, spermatocrit, 혈중 T 및 11-KT 농도가 대조구보다 유의하게 증가하였으며, 혈중 T와 11-KT 농도는 hCG 투여 7일 후에도 대조구보다 유의하게 높게 유지되었다. 반면에 정자 운동성, 평균운동속도(VAP), 직선운동속도(VSL) 및 나선운동속도(VCL)는 실험구 사이에 차이를 보이지 않았다. 향후 채정 빈도, 적정 호르몬 농도 및 투여 방법 등의 연구가 수반된다면 자바리 종자 생산 현장에서 수정률 및 부화율 향상을 위한 기초자료로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

References

- Boo MS, Lee CH, Kim BH, Kim MS, Kim DG, Baek HJ and Lee YD(2020). Management and development of seed rearing in red spotted grouper *Epinephelus akaara*. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 53(4), 506~514.
<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0506>
- Chang CF, Yueh WS and Lee MF(1991). Effects of LHRH-a and hCG on the steroid profiles of bisexual and mature male and female protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Aquaculture. 92, 83~92.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90010-5)
- Chao TM and Chow M(1990). Effects of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). Singapore J. Pri. Ind. 18, 1~14.
- Clearwater SJ and Crim LW(1998). Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases

- sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 349~357.
<https://doi.org/10.1023/A:1007759620936>
- Garber AF, Fordham SE, Symonds JE, Trippel EA and Berlinsky DL(2009). Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture.* 296(1-2), 179~183.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.009>
- Garcia CEO, Araujo BC, Mello PH, Narcizo AM, Rodrigues-Filho JA, Medrado AT, Zampieri RA, Floeter-Winter LM and Moreira RG(2013). Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 170~180. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.012>
- Goo IB, Park IS, Gil HW and Im JH(2015). Stimulation of spermiation by human chorionic gonadotropin and carp pituitary extract in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *Dev. Reprod.* 19(4), 253~258. <https://doi.org/10.12717/DR.2015.19.4.253>
- Guzman JM, Ramos J, Mylonas CC and Mananos EL(2011). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH_a) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture.* 316, 121~128.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.014>
- Hamamoto S, Yokogawa K and Tochino M(1986). Several problems on cultivating the parent fish of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schlegel) and judging the qualities of eggs obtained from them. *Bull Kagawa Pref Fish. Exp. Sta.* 2, 13~22.
- Heemstra PC and Randall JE(1993). Groupers of the world (family Serranidae, subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. In: *FAO Species Catalogue.* FAO, Rome, Italy, 125~382.
- Kim HW, Kim JH, Kim DG, Jung MH, Ji SC, Yang SG, Ahn CM, Myoung JI and Kim DJ(2018). Effect of artificially sexual maturation by hCG dose and injection interval in cultured male eel, *Anguilla japonica*. *J. Kor. Fish. Mar. Sci. Edu.* 30(5), 1578~1586.
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2018.10.30.5.1578>
- Lam TJ(1982). Application of endocrinology of fish culture. *Can. J. Aquat. Fish. Sci.* 39, 111~137.
<https://doi.org/10.1139/f82-013>
- Lim HK, Pankhurst NW and Fitzgibbon QP(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.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.017>
- Lim HK and Kim SY(2007). Effect of exogenous hormones on spermiation in the starry flounder *Platichthys stellatus*. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 40(6), 374~379.
<https://doi.org/10.5657/kfas.2007.40.6.374>
- Lim HK, Han HS and Chang YJ(2002). Effects of gonadotropin-releasing hormone analog on milt production enhancement in starry flounder *Platichthys stelatus*. *Fish. Sci.* 68, 1197~1204.
<https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00555.x>
- Lim HK and Le MH(2013). Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. *Therigenology.* 79, 867~871.
<https://doi.org/10.1016/j.therigenology.2013.01.004>
- Lim HK, Park JY and Kang HW(2016). Effect of luteinising hormone releasing hormone analogue and human chorionic gonadotropin on spermiation in the Tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *J. Kor. Fish. Mar. Sci. Edu.* 28(2), 596~602.
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2016.28.2.596>
- Linhart O, Rodina M and Cosson J(2000). Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology.* 41, 241~250.
<https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2284>
- Milla S, Terrien X, Sturm A, Ibrahim F, Giton F, Fiet J, Prunet P and Gac FL(2008). Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermiation: implication with 17 α ,20 β -dihydroxyprogesterone on the milt fluidity?. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6(1), 19.

- <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-19>
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H and Nagahama Y(1991a). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5774~5778. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5774>
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H and Nagahama Y(1991b). Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Biomed. Res. 12(4), 241~248. <https://doi.org/10.2220/biomedres.12.241>
- Mylonas CC, Gissis A, Magnus Y and Zohar Y(1997). Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture. 153, 301~311. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00021-5)
- Oh SR, Kang HC, Lee CH, Hur SW and Lee YD(2013). Sex reversal and masculinization according to growth in longtooth grouper *Epinephelus bruneus*. Dev. Reprod. 17(2), 79~85. <https://doi.org/10.12717/DR.2013.17.2.079>
- Ohta H and Tanaka H(1997). Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture. 153, 123~134. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00020-3)
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K and Hirose K(1996). Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. Fish. Sci. 62(1), 44~49. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.44>
- Pankhurst NW and Poortenaar CW(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. <https://doi.org/10.1080/10236240009387087>
- Park JY, Kim NR, Park JM, Myeong JI and Cho JK(2016). The structure of digestive tract and histological features of the larvae in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Korean J. Ichthyol. 28(1), 9-18.
- Rakitin A, Ferguson MM and Trippel EA(1999). Spermatocrit and spermatozoa density in atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. Aquaculture. 170, 349~358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00417-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00417-7)
- Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F and Nash JP(2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234, 1~28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>
- Schulz RW, de Franca LR, Lareyre JJ, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH and Miura T(2010). Spermatogenesis in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 390~411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- Song YB, Baek HJ, Kim HB, Lee KJ, Soyano K and Lee YD(2005b). Induced sex reversal of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by 17alpha-methyltestosterone. J. Aquacult. 18(3), 167~172.
- Song YB, Oh SR, Seo JP, Ji BG, Lim BS and Lee YD(2005a). Larval development and rearing of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in Jeju island, Korea. J. World. Aquaculture. Soc. 36, 209~216. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00387.x>
- Thierry C, Sadovy Y and To AWL(2008). *Epinephelus bruneus*. The IUCN red list of threatened species. Version 2014.3. www.iucnredlist.org.
- Tsuchihashi Y, Tanaka H, Kuromiya Y, Kashiwagi M and Yoshioka M(2003). Control of induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Aquac. Sci. 51, 189~196. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.51.189>
- Ueda H, Kambegawa A and Nagahama Y(1985). Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 24~30. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(85\)90415-0](https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90415-0)
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen Ø, Shalchian-Tabrizi K and Norberg B(2004). The brain - pituitary - gonad axis in male teleosts, with

special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes).
Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.
137, 447~477.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.007>

Zairin JRM, Asahina K, Furukawa K and Aida
K(1993). Plasma steroid hormone profiles in
hCG-injection male walking catfish *Clarias*

batrachus. Zool. Sci. 10, 329~336.

-
- Received : 01 June, 2021
 - Revised : 23 June, 2021
 - Accepted : 01 July, 2021