

文章编号: 1000-0615(2005)04-0433-08

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

舒 琥^{1,2}, 刘晓春¹, 林浩然¹

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 广州大学生物与化学工程学院生物系, 广东 广州 510405)

摘要: 研究了促黄体生成素释放激素类似物(LHRH-A)不同处理方式对雄性赤点石斑鱼性类固醇激素分泌和精子生成及精子排放的影响。对照组在 0、7 d 二次注射生理盐水($50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{BW}$), 注射组在 0、7 d 二次注射 LHRH-A($50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{BW}$), 埋植组在 0 d 埋植 LHRH-A 缓释剂($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{BW}$)。结果表明, 通过埋植 LHRH-A 缓释剂, 血清睾酮(T)和 11-酮基睾酮(11-KT)水平快速增加, 显示血清睾酮和 11-酮基睾酮水平与赤点石斑鱼精子生成和精子排放有密切关系。组织学观察表明, 在 21 d, 对照组和注射组精巢充满了精子细胞、精母细胞和精原细胞, 而在同一时间, LHRH-A 埋植组精巢含有大量精子, 表明精子排放仍在进行。在 40 d 期间采集精液总量为对照组 < 注射组 < 埋植组, 差异显著。当注射组在处理 14 d 后精液量逐渐回落到对照组水平时, 埋植组仍然维持较高精液量水平。各组采集的精子的活力与采集的精液量呈正相关, 而精子密度没有显著差异。数据显示, LHRH-A 缓释剂能显著增加赤点石斑鱼的精液量及延长精子排放时间而不改变精子的质量。

关键词: 赤点石斑鱼; 促黄体生成素释放激素类似物; 性类固醇激素; 精巢发育; 缓释; 排精

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Sustained administration of LHRH-A promotes sex steroid hormone secretion, testicular development and spermiation in male *Epinephelus akaara*

SHU Hu^{1,2}, LIU Xiao-chun¹, LIN Hao-ran¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animal and Key Lab of Guangdong for Improved Variety Reproduction of Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Biology, School of Biology and Chemistry Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract: This study examined the effects of different mode of administration of LHRH-A on spermiation in the red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Groups of red spotted grouper received either saline injection on 0, 7 day (C, $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight [BW]) or LHRH-A injection on 0, 7 day (IN, $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight [BW]) or a slower-releasing implant (IM, $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight [BW]). Serum levels of the androgens testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) were significantly affected by the sustained LHRH-A delivery systems, serum T and 11-KT levels increased rapidly after being implanted. These results indicated a close correlation between sustained stimulation of T and 11-KT release, achieved by LHRH-A delivery systems, and long-term enhancement of milk production. Histological evaluation of the testes indicated that, by day 21, control and injection fish testes contained almost exclusively spermatozoa. At the same time, testes from LHRH-A implanted fish still contained large numbers of spermatozoa in the testes, indicating that spermiation was still underway. Over 40 days experimental period a total of milk volume as follows: controls < injection < implantation. LHRH-A treatments stimulated a significant increase in total milk volume. While milk

收稿日期: 2004-09-14

资助项目: 国家海洋 863 项目(2001AA621010, 2003AA603011); 国家自然科学基金项目(39970586); 广东省科技计划项目(A3050201, 2003C20308); 教育部科学技术研究重点项目(02150)

作者简介: 舒 琥(1965-), 男, 湖南溆浦人, 副教授, 博士研究生, 从事鱼类生殖生理学研究。E-mail: shuhu001@126.com

通讯作者: 林浩然, E-mail: l32@zsu.edu.cn

volumes in injected males returned to control values by day 14, implanting treated with sustained LHRH-A delivery systems maintained significantly elevated milt volumes for 40 days. Sperm motility tended to be positively correlated with milt volume, and there were no significant differences in sperm counts. These data show that sustained administration of LHRH-A significantly increases and prolongs spermiation in the red spotted grouper without altering sperm concentration or quality.

Key words: *Epinephelus akaara*; luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRH-A); sex steroid hormone; testicular development; sustained release; spermiation

赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)为名贵海水经济鱼类,具有病害少,生长快,肉质鲜美、营养丰富等特点,是很好的养殖品种,深受各地消费者的喜爱。目前,赤点石斑鱼养殖所需的种苗主要依靠捕捞天然苗或进口,由于种苗供不应求,赤点石斑鱼养殖受到极大的限制。从20世纪70年代开始,国内外不少学者都致力于石斑鱼的人工繁殖研究,但大多集中在石斑鱼的性转化方面^[1,2],有关诱导雄性成熟及提高精子质量方面的报道极少,尤其是利用LHRH-A缓释剂诱导雄性赤点石斑鱼排精的研究尚未见报道。利用外源激素处理是控制养殖鱼类繁殖成熟的重要方法,最常用的是利用促性腺激素释放激素的类似物(GnRH_a)刺激脑垂体释放促性腺激素(GtH),诱导精巢性类固醇激素的生成和精子的排放^[3,4]。对鱼类直接注射或投喂外源激素,会很快被代谢清除,如反复注射或投喂,对鱼刺激大,也浪费药品。若使用LHRH-A缓释剂,既能加快性腺发育,又能减少操作次数,减轻对鱼体的刺激,节约药品。在实际生产中,雄性赤点石斑鱼排精量少且持续排精的时间短,影响受精质量。本研究试图通过埋植LHRH-A缓释剂,诱导雄性赤点石斑鱼增加精液量和延长排精时间。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

试验用雄鱼购于广东大亚湾水产试验中心附近海域的网箱,共60尾。平均体重560.6 g (318~854 g),平均体长27.5 cm (23.5~33.5 cm)。饲养在广东大亚湾水产试验中心的网箱中,海水盐度32~33,水温20~30℃,自然光照。

1.2 实验设计

实验鱼被随机分为3组,每组20尾。各组处理如下:对照组(C)在0、7 d分别注射500 μL·kg⁻¹生理盐水,注射组(IN)在0、7 d分别注射LHRH-A 50 μg·kg⁻¹,埋植组(IM)在当天埋植含LHRH-A 100 μg·kg⁻¹的缓释药丸。

1.3 缓释剂制备和埋植

实验用促黄体生成素释放激素类似物(LHRH-A)为宁波激素制品厂产品。药丸制作参照本实验室方法并加以修改,将一定量的LHRH-A与一定比例的胆固醇、纤维素的混合物混合均匀后,制成直径为2 mm的圆柱型颗粒,储于冰箱中备用。用抄网将亲鱼从水池中捞起,用经消毒的解剖刀在鱼体背部与侧线之间的肌肉划一小口,然后用一支特制的推进器将缓释剂药丸埋植进去,伤口涂四环素或红霉素软膏以防感染。LHRH-A埋植剂量为100 μg·kg⁻¹。

1.4 精液的采集和精液质量的检测

雄鱼在实验开始(注射或埋植)后0、2、7、10、14、21、30、40 d用挤压法采集精液,用去离子水洗净生殖孔,再用干毛巾擦去生殖孔周围及体表的水分,轻压腹部,用一次性注射器将精液移入冰浴的1.5 mL离心管,要求无污染。精液质量用精液量、精子密度和精子活力评价。精液量用体积表示,误差±0.01 mL;精子密度用人工精浆(100 mmol·L⁻¹NaCl+13.4 mmol·L⁻¹KCl+83.3 mmol·L⁻¹glycine+26.2 mmol·L⁻¹NaHCO₃)将精液稀释1000倍后,用血球计数板在显微镜(×400)下观察计数,再算出精液密度。

精子活力的计算参照文献[5]的方法稍加修改,以精子在自然海水(盐度为33)中激活比例表示,即任意记数100个以上的精子,根据活动精子数占精子总数的比例将精子活力分为6个等级:Ⅰ级,活动精子比例<1%;Ⅱ级,活动精子比例为1%~25%;Ⅲ级,活动精子比例为25%~50%;Ⅳ级,活动精子比例为50%~75%;Ⅴ级,活动精子比例为75%~90%;Ⅵ级,活动精子比例为90%~100%。每次实验取5尾石斑鱼的精液,每个精液样品重复观察3~5次,取平均值。

1.5 血清性类固醇激素含量测定

血清性类固醇激素雌二醇(E₂)、睾酮(T)水平采用放射免疫测定方法(RIA),11-酮基睾酮(11-KT)采用酶联免疫测定方法(EIA)。E₂、T放

射免疫测定试剂盒购自中国北方生物技术研究所(北京), 11- KT 试剂盒购自美国化学试剂公司。E₂ 的测量灵敏度为 2 pg·mL⁻¹, 批内变异系数(CV)小于 10%, 批间变异系数小于 15%; 在血清样品中加入低、中、高已知浓度的 E₂, 测定回收率为 101.5%~ 114%。T 的测量灵敏度为 0.02 ng·mL⁻¹, 批内变异系数(CV) 小于 10%, 批间变异系数小于 15%, 回收率为 107%~ 110%。11-KT 的测量灵敏度为 8 pg·mL⁻¹, 批内变异系数(CV) 小于 11.4%, 批间变异系数小于 27%。样品测定均采用双管平行。

1.6 数据处理

数据用平均值±标准差表示, 两个平均值之间的差异用 Student 氏 t 检验, 两个以上平均值之间的差异用 Duncan 氏新复极差法检验各组数据之间的差异。

2 结果

2.1 血清性类固醇激素含量的变化

在第 1 次注射 LHRH-A 后 7 d 和第 2 次注射后 3 d (第 10 天), 赤点石斑鱼血清 T 含量比对照组有明显升高, 并且在第 2 次注射后 3 d 达到最高峰(1.71±0.20 ng·mL⁻¹, n= 5, 下同), 然后逐渐降低, 在 14 d 后逐渐降低到对照组的水平; 而 LHRH-A 缓释剂埋植组在埋植后逐渐升高, 第 14 天达到最高值(2.16±0.25 ng·mL⁻¹), 埋植后的第 7、14、30、40 天血清 T 含量不仅显著高于对照组, 而且也显著高于注射组(P< 0.05)(图 1)。

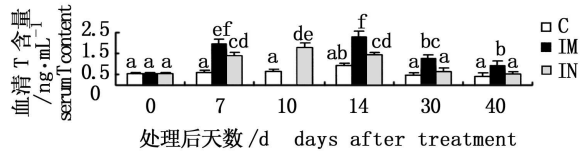


图 1 注射 LHRH-A 或埋植 LHRH-A 缓释剂后赤点石斑鱼血清 T 含量的变化

Fig. 1 Changes of serum T levels after LHRH-A injection or the implantation of sustained released LHRH-A in *E. akaara*

各值为平均值±标准差, 不同字母表示差异显著, P< 0.05, Duncan 氏检验, n= 5, 下同
data were represented as mean ± SE, values with different letters indicate significant differences(P< 0.05), Duncan's multiple range test, n= 5, the same below

注射或埋植 LHRH-A 后赤点石斑鱼血清 11-KT 含量的变化与 T 变化趋势相似(图 2)。在

第 1 次注射后 7d 和第 2 次注射后 3 d (第 10 天), 赤点石斑鱼血清 11-KT 含量比对照组明显升高, 第 2 次注射后 3d 达到最高峰(242.84±60.37 pg·mL⁻¹), 然后逐渐降低, 在 14 d 后迅速回到对照组的水平; 而 LHRH-A 缓释剂埋植组在埋植后逐渐升高, 第 14 天达到最高值(425.65±95.00 pg·mL⁻¹), 埋植后的第 7、14、30 天血清 11-KT 含量不仅显著高于对照组, 而且也显著高于注射组(P< 0.05)。

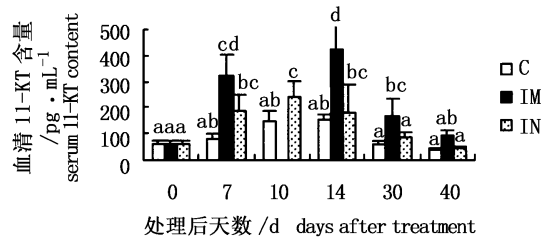


图 2 注射 LHRH-A 或埋植 LHRH-A 缓释剂后赤点石斑鱼血清 11-KT 含量的变化

Fig. 2 Changes of serum 11-KT levels after LHRH-A injection or the implantation of sustained released LHRH-A in *E. akaara*

在两次注射 LHRH-A 或埋植 LHRH-A 缓释剂后, 赤点石斑鱼血清 E₂ 含量与对照组没有显著差异(图 3)。

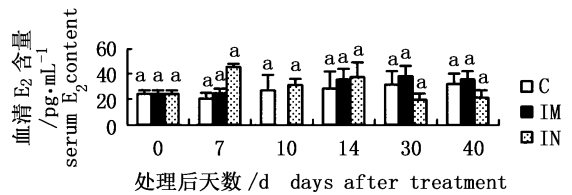


图 3 注射 LHRH-A 或埋植 LHRH-A 缓释剂后赤点石斑鱼血清 E₂ 含量的变化

Fig. 3 Changes of serum E₂ levels after LHRH-A injection or the implantation of sustained released LHRH-A in *E. akaara*

2.2 雄性赤点石斑鱼精液量的变化

在处理 2、7 和 10 d, 注射组和埋植组诱导产生的精液量均明显地增加, 注射组(IN) 在第 1 次注射(0 d) 和第 2 次注射(7 d) 后 2~ 3 d 出现了排精高峰(精液量分别为 0.6±0.05 mL·kg⁻¹和 0.86±0.06 mL·kg⁻¹), 14 d 后逐渐回到对照组水平(精液量小于 0.2 mL·kg⁻¹), 埋植组自埋植后 2~ 14 d 精液量逐渐升高, 在 14 d 时达到最高(1.2±0.1 mL·kg⁻¹), 然后逐渐降低, 但仍维持较高水平的精液量。

结果表明,自试验开始 21 d 后,在连续的取样时间里,对照组和注射组能采到精液的鱼数逐渐减少,比例分别为埋植组的 60% 和 70%,且能采到的精液量也逐渐减少。而埋植组直到处理后 40 d,每一尾鱼均能采到足够的精液,此时,对照组和注射组能采到精液的鱼数的比例仅分别为 20% 和 30% (图 4)。

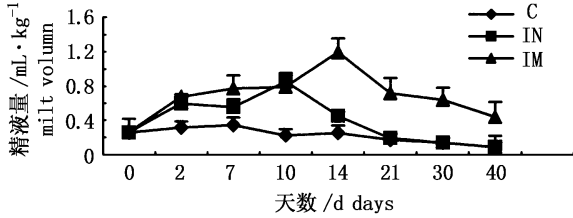


图 4 LHRH-A 处理后赤点石斑鱼精液量的变化(n= 5)
Fig. 4 Changes of total milt volume after LHRH-A treatment in *Epinephelus akaara* (n= 5)

图 5-A 表示在 40 d 实验期间各组采集的总精液量。其中埋植组 (IM) 和注射组 (IN) 所产生的总精液量 (IM: $5.55 \pm 0.6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, IN: $3.19 \pm 0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 明显高于对照组 (C: $1.85 \pm 0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。而埋植组又显著高于注射组。当将精液采集的时间划分为两段(0、2、

7 和 10 d 如图 5-B 和 14、21、30 和 40 d 如图 5-C) 时,由于缓释剂延长了排精时间,精液量出现显著差异,在 0~ 10 d,埋植组和注射组的精液总量明显高于对照组 (图 5-B),而后段(14~ 40 d)是埋植组显著高于注射组和对照组 (图 5-C)。

2.3 精子的活力

各组(对照组、注射组和埋植组)的精子活力大多处在优良状态(活力为 75~ 100%,活力等级为 V, VI级),在第 10 天采集的各组精子的活力没有明显的差异 (图 6),在第 30 天采集的精子的活力检测表明,通过埋植 LHRH-A 缓释剂诱导的精子质量没有受到影响 (图 6-C),75% 仍处在优良状态(活力等级为 V, VI级),而在其它取样时间各处理组所采集的精子样品的质量差异不显著。在处理组和对照组精子快速运动时间没有显著差异,精子快速运动时间分别为注射组在 7~ 14 d 精子的活力较好 ($25.5 \pm 6.2 \text{ min}$),埋植组在 7~ 30 d 采集的精子的活力较好 ($27.4 \pm 7.6 \text{ min}$),对照组在 0~ 10 d 精子的活力较好 ($26.6 \pm 6.8 \text{ min}$)。结果表明通过缓释剂处理可以在较长时间内得到较好活力的精子。

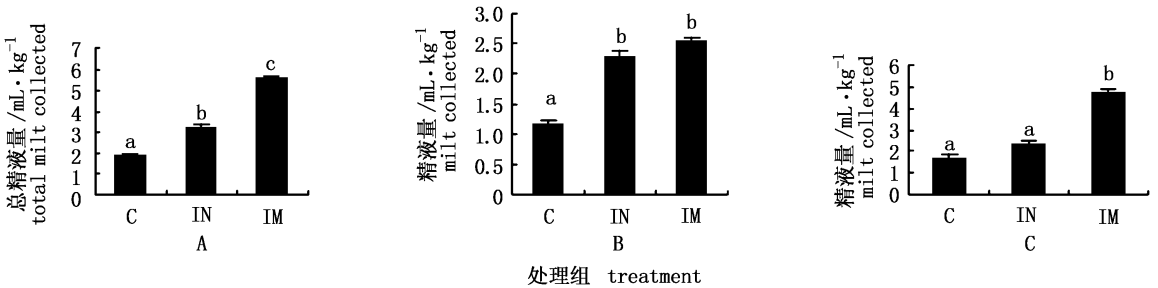


图 5 在 40d 实验期间 LHRH-A 处理对精液体积的影响(n= 5)

Fig. 5 Effects of LHRH-A treatments on the volume of total milt collected ($\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$)

over the 40 day experimental period for control (C), injected (IN), implanted (IM) treatment groups (n= 5)

A: 在 40 d 实验期间采集的总精液量; B: 在第 0、2、7 和 10 天采集的精液总量; C: 在第 14、21、30、40 天采集的精液总量

A: total milt collected over the entire sampling period; B: milt collected only on days 0, 2, 7 and 10; C: milt collected only on days 14, 21, 30, and 40

2.4 精子的密度

结果表明,在各处理组的不同取样时间里,对照组和 LHRH-A 处理组的精子密度差异不显著,各组精子密度平均值为对照组 (10.05 ± 0.5) $\times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、注射组 (9.48 ± 0.3) $\times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、埋植组 (12.975 ± 0.8) $\times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 精巢发育的组织学结构

在实验开始时,对照组雄鱼精巢里除了精子外,还包含处在精子发生各个时期的生精囊,生精囊含有精子细胞、精母细胞和精原细胞 (图版 I-1),实验开始 7 d,对照组鱼精巢结构同 0 d 基本相似 (图版 I-2),而 LHRH-A 埋植组精巢小叶里充满了许多精子,在生精囊仍包含许多精子细

胞和精母细胞(图版 I-3)。在实验开始 10 d, 即第 2 次注射后 3 d 的实验鱼精巢小叶里充满了精子(图版 I-4), 此时在注射组鱼中采集了大量精子。在实验开始 14 d, LHRH-A 埋植组精巢小叶里充满了大量精子, 在生精囊仍含有许多精子细胞和精母细胞(图版 I-5), 此时实验鱼采集精子量最多。在实验开始后 21 d, 对照组和注射组鱼精巢小叶内精子非常稀少, 精巢内主要是精母细

胞、精原细胞及精子细胞, 而埋植组鱼除含精母细胞、精原细胞及精子细胞外, 精巢小叶仍充满许多精子(图版 II-1, 2, 3), 说明埋植组鱼仍能继续排精, 而对照组和注射组排精能力明显减弱。到实验开始后 40 d, 对照组和注射组鱼精巢小叶内主要是精原细胞和精母细胞, 而埋植组鱼除含精原细胞、精母细胞及精子细胞外, 精巢小叶仍充满许多精子(图版 II-4, 5, 6)。

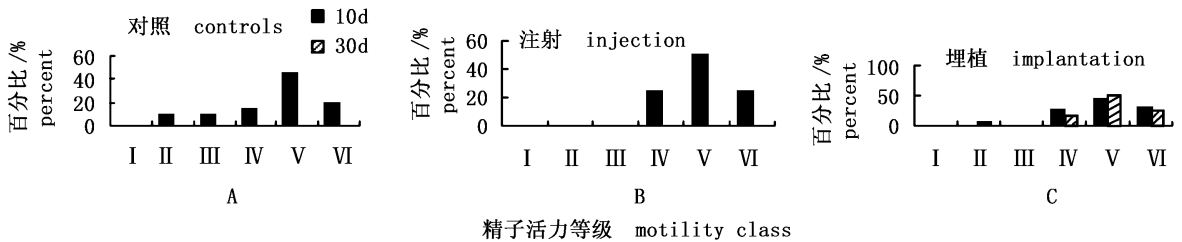


图 6 LHRH-A 处理和持续产精对精子活力的影响(n=5)

Fig. 6 Effects of LHRH-A treatments and sustained milt production on motility of the sperm

A~ C: 在第 10 天(实心柱)各组采集精子的活力等级和第 30 天(阴影柱)采集的精子的活力等级

A~ C: Percent of different sperm motility classes (I - VI) observed in milt collected from all treatment groups (controls, injected, implantation) on day 10 (solid bars), day 30 (hatched bars) is shown for implanted (IM) group where spermiation was prolonged

3 讨论

对雄性赤点石斑鱼处理结果表明, 注射和埋植 LHRH-A 均能诱导赤点石斑鱼排精, 并增加精液量。两次注射 LHRH-A 后 2~ 3 d, 赤点石斑鱼精液量迅速增加, 到 14 d 后逐渐回落到对照组水平, 而 LHRH-A 缓释剂不仅能促进赤点石斑鱼增加精液量, 延长排精时间, 而且不会影响精子的活力和精子质量, 从埋植后一直到 40 d 均能保持较高的精液量, 同 Mylonas 和 Zohar^[6]在条纹狼鲈的实验结果一致。本研究是首次应用含 LHRH-A 的胆固醇小丸埋植诱导雄性赤点石斑鱼排精, 与注射比较, 操作简便(只埋植 1 次即可), 减少了对鱼体的刺激, 还减少激素用量, 并且效果显著, 达到了实验目的。

相同的实验结果即使用 GnRH_a 缓释剂长时间(4~ 6 周)诱导增加雄鱼的精液量在一些重要的经济鱼类均有报道^[7-10], 在繁殖季节, 养殖鱼类排精失败和精子缺乏是由于脑垂体不能正常释放 GtH 的结果^[4], 而 GnRH_a 缓释剂在刺激雄性养殖鱼类的精子排放和增加快速精子精液量方面是有效的。因此精液量增加和排精时间延

长的原因可能是由于 LHRH-A 缓释剂能较长时间诱导脑垂体释放 GtH, 并使血液中 GtH 值在较长时间内维持较高水平的缘故或 GtH 作用于性腺刺激性类固醇激素生成的结果。这从本文测到的较高的性类固醇激素(T、11-KT 含量)得到证实。

本实验结果表明, 通过一次注射至少使雄性赤点石斑鱼的精液量在 7d 内增加, 同 Garcia 等^[8]在河豚注射 GnRH_a 一次仅在 24 h 内增加精液量有所不同, Garcia 等^[9]认为注射药物在鱼体内存留时间不长且易被降解, 要在长时间(4 周)内保持精液量持续增加, 多次注射是必要的。这同本实验结果基本一致。Harmin 和 Crim^[10]观察到在 GnRH_a 注射处理后血清中的 T 和 11-KT 的量持续升高几天, 我们在注射和埋植 LHRH-A 后也得到类似的结果。

本研究还说明, LHRH-A 处理不会改变精子的质量(根据精子的活力等级)、精子的密度和精子活动时间。通过 LHRH-A 缓释剂诱导产生的精子其活力和密度与对照组比较没有显著差异(图 6 和图 7), 只增加精液量和延长排精时间, 这与 Lisa 等^[11]对舌齿鲈的研究结果一致。

从精巢发育的组织学结构看,在实验开始时(0 d)对照组鱼精巢里除了充满精子外,还包含精子发生时的各个时期,精子细胞、精母细胞和精原细胞,随着时间的推移和人工的不断采集精液,对照组和注射组鱼精巢里的精子数越来越少,尽管精巢充满精原细胞和精母细胞,但并不能长久地保持精子的生成而持续排精,而埋植组由于缓释药物的持续作用保证了精巢里精子的长期生成,从而增加精液量和延长排精时间。

显然精子排放是一种复杂的现象,而有关在精子排放过程中血清性类固醇激素水平变化的报道也各不一样。Woods 和 Sullivan^[12]观察到条纹狼鲈的血清 T、11-KT 水平是在精子排放前的 2 月末期达到最大值,然后逐渐减少;Mylonas 等^[13]认为条纹狼鲈精子的排放伴随着雄性激素(T、11-KT)的降低,即雄性激素(T、11-KT)主要在精子发生和精子形成阶段精子排放开始减少。Jackson 和 Sullivan^[14]在金眼狼鲈,Part 等^[15]在舌齿鲈观察到血清 T、11-KT 水平在精子排放中期显著增加;而 Berlinsky 等^[16]在金眼狼鲈观察到血清 T、11-KT 水平在精子排放停止之前达到最大值。本研究表明在繁殖季节,雄性赤点石斑鱼血清 T、11-KT 水平是与精子排放密切相关的,即 LHRHA 缓释剂能持续增加雄性赤点石斑鱼血清 T、11-KT 水平,促进精巢发育和排精。

参考文献:

- [1] 方永强,林秋明,齐 襄,等. 17 α - 甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响[J]. 水产学报, 1992, 16(2): 171- 174.
- [2] Kou C M, Ting Y Y, Yeh S L. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario* [J]. Aquac, 1988, 74: 113- 126.
- [3] Nagahama Y. Endocrine control of gametogenesis[J]. Int J Dev Biol, 1994, 38, 217- 229.
- [4] Zohar Y, Mylonas C C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish :from hormones to genes[J]. Aquac, 2001, 197: 99- 136
- [5] Chambeyron F, Zohar Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. Aquac, 1990, 90: 345

- 352

- [6] Mylonas C C , Zohar Y. Preparation and evaluation of GnRH α -loaded, polymeric delivery systems for the induction of ovulation and spermiation in cultured fish[A] .In: Goetz F W , Thomas P, eds. Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish [C]. The University of Texas at Austin Printing Department, Austin, 1995 .130
- [7] Mylonas C C , Zohar Y. Use of GnRH α -delivery systems for the control reproduction in fish[J]. Rev Fish Biol and Fisheries, 2001, 10: 463- 491
- [8] Garcia L M B. Spermatation response of mature rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, to luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRH-A) injection[J]. Aquac, 1991, 97: 291- 299.
- [9] Garcia L M B. Sustained production of milt in rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, by weekly injection of luteinizing hormone releasing hormone analogue (LHRH-A) [J]. Aquac, 1993, 113: 261- 267.
- [10] Hamin S A, Crim L W. Influence of gonadotropin hormone-releasing hormone analog (GnRH α) on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) [J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 10: 399- 407.
- [11] Lisa A S, Mylonas C C, Silvia Z, *et al.* Sustained administration of GnRH α increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass [J]. The Journal of Experimental Zoology, 1996, 276: 361- 368.
- [12] Woods L C, Sullivan C V. Reproduction of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock: monitoring maturation and hormonal induction of spawning[J]. Aquaculture and Fisheries Management, 1993, 21: 211- 222.
- [13] Mylonas C C, Zohar Y, Woods L C, *et al.* Hormone profiles of captive striped bass *Morone saxatilis* during spermiation , and long-term enhancement of milt production[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1998, 29: 379- 391.
- [14] Jackson L F, Sullivan C V. Reproduction of white perch: the annual gametogenic cycle [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1995, 124: 563- 577.
- [15] Part F S, Zamy M, Carillo A, *et al.* Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L[J]. Gen Comp Endocrinol, 1990, 78: 361- 373.
- [16] Berlinsky D L, Jackson L F, Smith T I J, *et al.* The annual reproductive cycle of the white bass *Morone chrysops* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1995, 26: 252- 260.

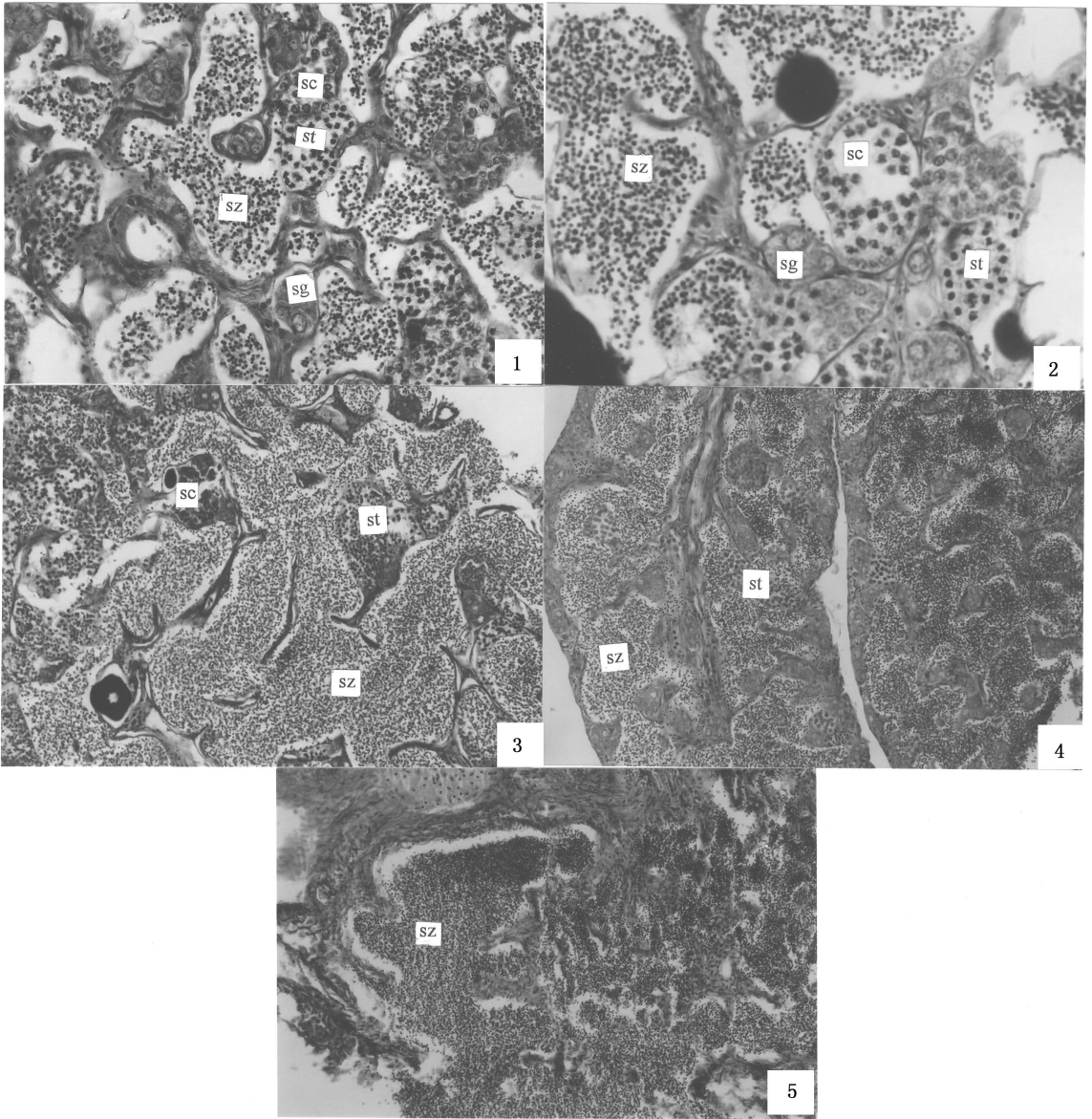
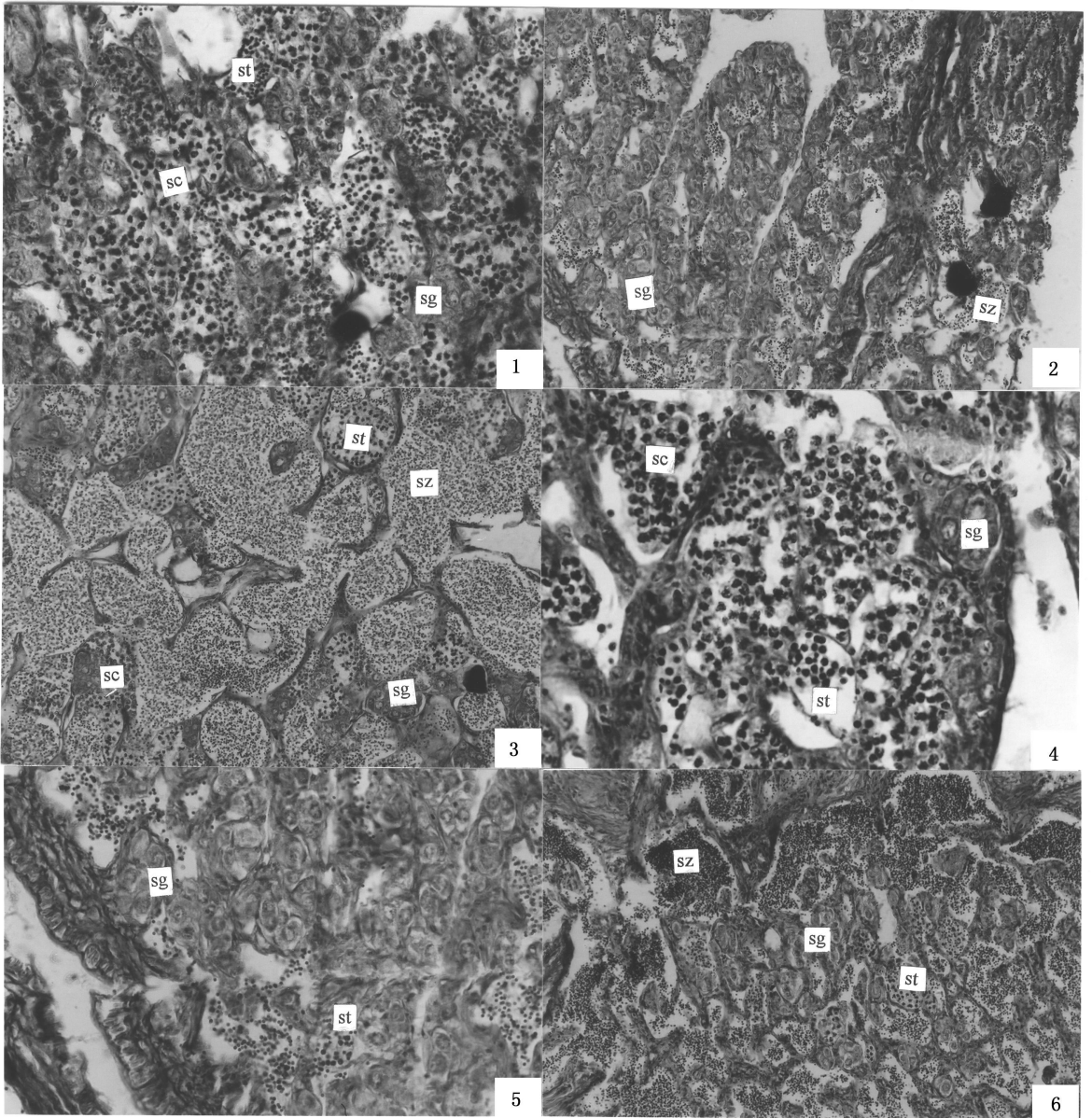


图 版 I Plate I

1. 实验开始时对照组赤点石斑鱼的精巢(0 d): 示精子、精子细胞、精母细胞和精原细胞, $\times 1000$; 2. 对照组鱼 7 d 的精巢: 示精子、精子细胞、精母细胞和精原细胞, $\times 1000$; 3. LHRH-A 埋植 7 d 后的精巢: 示精子、精子细胞、精母细胞, $\times 500$; 4. LHRH-A 注射后 10 d 的精巢: 示精子, $\times 1000$; 5. LHRH-A 埋植 14 d 后的精巢: 示精子、精子细胞, $\times 500$

1. The *E. akaara* testes at the onset of the experiment (day 0), showing spermatozoa (sz), spermatids (st), spermatocyte (sc) and spermatogonia (sg), $\times 1000$; 2. The control fish testes on 7 days, showing spermatozoa (sz), spermatids (st) and spermatocyte (sc) and spermatogonia (sg), $\times 1000$; 3. The *E. akaara* testes on 7 days after implanting with LHRHA. showing spermatozoa (sz), spermatids (st) and spermatocyte (sc), $\times 500$; 4. The *E. akaara* testes on 10 days after injection with LHRHA. Showing spermatozoa (sz), $\times 1000$; 5. The *E. akaara* testes on 14 days after implanting with LHRHA. Showing spermatozoa (sz), spermatids (st), $\times 500$



图版II Plate II

1. 对照组 21 d 的精巢: 示精子细胞、精母细胞和精原细胞, $\times 1000$; 2. LHRH-A 注射后 21 d 的精巢: 示精子、精原细胞, $\times 500$; 3. LHRH-A 埋植 21 d 后的精巢: 示精子、精子细胞、精母细胞、精原细胞, $\times 500$; 4. 对照组 40 d 的精巢: 示精母细胞和精原细胞, $\times 1000$; 5. LHRH-A 注射后 40 d 的精巢: 示精子细胞、精原细胞, $\times 500$; 6. LHRH-A 埋植 40 d 后的精巢: 示密集的精子、精子细胞、精原细胞, $\times 500$

1. The testes from control fish on 21 days, showing spermatogonia (sg), spermatocyte (sc) and spermatids (st), $\times 1000$; 2. The *E. akara* testes on 21 days after injection with LHRH-A. Showing spermatozoa (sz), spermatogonia (sg), $\times 500$; 3. The *E. akara* testes on 21 days after implanting with LHRH-A. Showing spermatozoa (sz), spermatids (st), spermatocyte (sc) and spermatogonia (sg), $\times 500$; 4. The testes from control fish on 40 days, showing spermatogonia (sg), spermatocyte (sc), $\times 1000$; 5. The *E. akara* testes on 40 days after injection with LHRH-A. Showing spermatids (st) spermatocyte (sc) and (sg), $\times 500$; 6. The *E. akara* testes on 40 days after implanting with LHRH-A. Showing large numbers of spermatozoa (sz), spermatids (st) and spermatogonia (sg), $\times 500$