

붉바리의 Kisspeptin 유전자의 부분염기서열 cloning

이치훈¹ · 김병훈² · 이영돈^{2*}

¹주식회사 씨알 · ²제주대학교 해양과학연구소

Partial sequence identification of kisspeptin gene in the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*

Chi-Hoon Lee¹, Byeong-Hoon Kim² and Young-Don Lee^{2*}

¹CR Co., Ltd. · ²Marine Science Institute, Jeju National University

Kisspeptins are group of peptides that stimulate GnRH and GtH release and required for maintenance of reproductive function. In fish, studies have revealed the presence of multiple kisspeptin forms (Kiss1, Kiss2) in the brain. In this study, we identified of Kiss1 and Kiss2 partial sequence from the brain of red spotted grouper *Epinephelus akaara*. Kiss1 partial sequence composed total 249 base pairs fragments and 82 amino acids. Kiss2 partial sequence composed total 254 base pairs fragments and 84 amino acids. The amino acid sequence homology of red spotted grouper Kiss1 and Kiss2 investigated with other teleost fish. Red spotted grouper Kiss1 and Kiss2 showed high homology with longtooth grouper *Epinephelus bruneus* Kiss1 97.6 % and Kiss2 96.4%, respectively. Further we need to know relationship of Kisspeptin and reproductive activation in red spotted grouper.

Key words : kisspeptin, cloning, reproductive function, red spotted grouper

서론

어류를 포함한 대부분의 척추동물은 시상하부-뇌하수체-생식소 축을 중심으로 외부환경인자인 광과 수온에 의해 번식내분비계가 조절

된다. 외부환경인자는 시상하부의 Gonadotropin-releasing hormone(GnRH, 생식소자극호르몬방출호르몬) 분비를 자극하고, 뇌하수체의 두 종류의 서로 다른 Gonadotropin(GtH, 생식소자극호르몬), Follicle stimulating hormone(FSH, 여포자

극호르몬)과 Luteinizing hormone(LH, 황체 형성 호르몬)의 분비를 조절함으로써 생식소 발달과 성숙에 관여한다(Tena-Sempere and Huhtaniemi, 2003). 그러나 외부자극신호와 번식내분비 축의 활성화에 있어 Kisspeptin의 역할이 밝혀짐으로써 시상하부의 GnRH보다 상위인자로 Kisspeptin이 부각되고 있다(Dhillon, 2008). Kisspeptin의 구조와 역할에 대한 연구는 대부분 포유류를 중심으로 이루어져 왔으나, 제브라피쉬(Kitahashi et al., 2009; Servili et al., 2011), 송사리(Kitahashi et al., 2009), 유럽산 농어(Felip et al., 2009) 등 다양한 어류에서도 Kisspeptin에 대한 연구가 진행되었고, 특히 어류에서는 포유류와 달리 Kisspeptin1(Kiss1) 뿐만 아니라 Kisspeptin2(Kiss2)의 유전자도 동정되었다.

어류의 번식활동에 있어 Kisspeptin은 중요한 상위 인자로, 뇌의 시상하부의 GnRH neuron을 자극하여 GtH 분비를 촉진 시키며(Parhar et al., 2004; Li et al., 2009), 성 성숙개시에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Kiss1과 Kiss2의 번식활성에 미치는 영향은 어종마다 종 특이적으로 상이하기 때문에(Kitahashi et al., 2009; Li et al., 2009), 어종에 따른 Kisspeptin 작용에 대한 연구가 필요하다.

붉바리, *Epinephelus akaaka*는 다른 바리과 어류와 마찬가지로 양식산업에 있어 고부가가치가 높은 어종이나, 무분별한 남획으로 인해 자원이 고갈되어 국제자연보호기구(IUCN)와 국제식량기구(FAO)에서 멸종위험종으로 지정하고 있다(Annalie et al., 2000; Baillie et al., 2004). 고부가가치 양식대상 어종인 붉바리의 양식 상용화와 연안 자원 회복을 위해 붉바리를 대

상으로 번식생리에 정보 확보와 양식산업화 기술개발 등 많은 연구들이 진행되고 있다.

이 연구는 산업적 가치가 높은 붉바리, *Epinephelus akaaka*의 번식생리에 대한 기초 자료를 확보하기 위해 번식내분비계의 상위인자인 Kisspeptin 유전자의 cloning을 수행하였다.

재료 및 방법

1. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA를 추출하기 위하여 붉바리 뇌 조직을 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 뇌 조직에 RiboEx™ Reagent (GeneAll) 500 μ l를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 완전히 분쇄하였다. Chloroform 100 μ l를 첨가하여 혼합하여 원심분리 한 후, RNA가 포함된 상층액을 튜브로 옮겨 동일량의 iso-propanol을 첨가하여 12000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 침전시켰다. DEPC가 첨가된 75% 에탄올을 이용하여 RNA pellet을 수세한 후 에탄올을 제거하여 RNase-free 증류수로 RNA pellet을 용해시켜 total RNA를 얻었다. 이후 Total RNA 2.0 μ g 을 주형으로 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA)를 이용하여 DNase 처리를 하였다. Total RNA와 증류수를 첨가하여 7.5 μ l 부피를 맞추고 RQ RNase-Free DNase 10×Reaction buffer 1 μ l, RQ RNase-Free DNase 1.5 μ l를 총 부피 10 μ l가 되도록 첨가하였다. 이후 37°C에서 30분간 반응 후 1 μ l의 Stop Solution을 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다. total RNA

는 Nano Vue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 농도를 측정하였고, A260/A280nm의 비율이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA만을 선택하여 실험에 사용하였다. cDNA는 DNase 처리된 total RNA 0.5 µg을 주형으로 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. 합성이 끝난 후 각각의 cDNA에 40 µl의 Nuclease-free 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 µl가 되게 희석하였다.

2. Kisspeptin cDNA 분석

붉바리의 Kisspeptin cDNA를 분리하기 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 다른 어종들의 Kisspeptin cDNA 정보를 이용하여 degenerate primer를 제작하였다(Table 1). Degenerate primer를 PCR 기법을 통하여 유전자를 증폭시켰으며 증폭된 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 통하여 확인하였다. PCR 산물이 포함된 agarose gel을 DNA purification system (Promega, Madison WI USA)을 이용하여 PCR 산물을 획득한 후,

T-blunt vector (Solgent, Daejeon, Korea)에 삽입하여 competent cell 에 형질전환 시켰다. 배양된 competent cell에서 Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였고, Genotech (Korea)에 의뢰 후 부분염기서열을 분석하였다. 부분염기서열은 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 확인하였다.

3. 염기서열 분석

붉바리 Kisspeptin의 중간계통유연관계 분석은 PHYLIP 프로그램을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된 다른 어종들의 아미노산 서열 Multiple alignment는 Clustal Omega 프로그램을 이용하여 분석하였고, BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000 set은 PRODIST 프로그램을 이용하여 distance matrices를 계산하였다. 계산된 distance matrices는 NEIGHBOR 프로그램의 tree 작성 input 데이터로 이용하였고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 consense tree를 작성하였다.

Table 1. Sequence of primers used in the identification of Kisspeptin cDNA in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*

Primers	Sequence
Degenerate primers	
Kiss1 F	5'-ACAGAGGACACCGTGCAACAG-3'
Kiss1 R	5'-CGAACGGGTTGAAGTTGAAT-3'
Kiss2 F1	5'-TCAACAGAGGTCTGCACCAC-3'
Kiss2 F2	5'-TGGTCTGAGGGAAGATCACCT-3'
Kiss2 R1	5'-TGGTGACTCTGGTTGTGGTG-3'
Kiss2 R2	5'-GCTGCTCCTCATTCTCCCTC3'

각 유전자의 multiple alignment에 이용된 종과 유전자는 Table 2, 3에 나타내었다.

결과 및 고찰

붉바리의 뇌 조직을 대상으로 Kisspeptin1과 Kisspeptin2 cDNA를 분리하여 부분염기서열을

Table 2. Kisspeptin1 information of used for multiple alignment

Gene	Species	Accession number
Kiss1	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Epinephelus bruneus</i>	ADF59544
	<i>Sebastes schlegelii</i>	AIZ68243
	<i>Morone saxatilis</i>	ADU54200
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AFV25604
	<i>Sander vitreus</i>	ACM07422
	<i>Thunnus thynnus</i>	AGN05227
	<i>Scomber japonicus</i>	AEF32393
	<i>Seriola lalandi</i>	ADE21654
	<i>Chrysiptera cyanea</i>	BAO21623
	<i>Danio rerio</i>	ABR24159
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	AHA46378

Table 3. Kisspeptin2 information of used for multiple alignment

Gene	Species	Accession number
Kiss2	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Epinephelus bruneus</i>	ADF59545
	<i>Epinephelus coioides</i>	ACT65993
	<i>Pagrus major</i>	BAL44206
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	ACM07423
	<i>Seriola lalandi</i>	AEF32394
	<i>Thunnus thynnus</i>	AGN05228
	<i>Thalassoma bifasciatum</i>	AFU08233
	<i>Scomber japonicus</i>	ADE21655
	<i>Haplochromis burtoni</i>	AIT16226
	<i>Solea senegalensis</i>	ADK92427
	<i>Oreochromis niloticus</i>	AEX92979
	<i>Takifugu niphobles</i>	BAJ15497
	<i>Oncorhynchus masou</i>	BAN15751
<i>Danio rerio</i>	NP_001136057	

```

1  ATGCCACGACTCATTGTTGCTCTGATGATGGCTGCTTTGTCAACAGAGGCTGACACCACTGGCAGTTTGAATCC
   M P R L I V A L M M A A L S T E V C T T G S L K S
76  ACCTACCACAGTGAAGATCAGAGAGTACTCAAAGCTCTCAGAGATTTAAGCCATGCATCAATATCGCCATCAGGA
   T Y H S E D Q R V L K A L R D L S H A S I S P S G
151 AAGAGTTCGGTGAATTTACCTGCTGACAGGGTCCATTTCAGCTGATGGAAAGTTGCCAGGTGAGGATGGTGGATC
   K S S V N L P A D R V H S A D G K F P R S G W W I
226 TCAAAGGTGATCTTCCTCAG
   S K V I F P Q
    
```

Fig. 1. The Kisspeptin1 partial nucleotide and amino acid sequence obtained from the brain of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. It was 249 base pairs long and encoding 82 amino acids.

```

1  TTGGTGACTCTGGTGTGGTGTGGCCTGATTGTTGGACAGGATGGAGACAGTGTGGGAGCAGCTCTGCCGGGA
   L V T L V V V C G L I V G Q D G D S V G A A L P G
76  TTTGACTCTGTACAGAGGACACGTGCAACAGGGTCCATCCTGTCTGCACTGAGGAGAAGGAGTACAGGAGATTT
   F D S V Q R T R A T G S I L S A L R R R S T G E F
151 GTGGCGGAGGATACCAGCCCCTGTTTGTCCCTGAGCGAGAATGAGGAGCAGCGGCAGCTGCTATGTAACGACCGC
   V A E D T S P C L S L S E N E E Q R Q L L C N D R
226 AGGAGTAAATTCAACTTCAACCCGTTT
   R S K F N F N P F
    
```

Fig. 2. The Kisspeptin2 partial nucleotide and amino acid sequence obtained from the brain of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. It was 254 base pairs long and encoding 84 amino acids.

분석한 결과 Kisspeptin1은 총 249 bp 길이의 부분염기서열과 82개의 아미노산서열이 확인되었고(Fig. 1), Kisspeptin2은 총 254 bp 길이의 부분염기서열과 84개의 아미노산서열이 확인되었다(Fig. 2). 붉바리에서 확인된 Kiss1 cDNA와 다른 어종들의 Kiss1 cDNA를 비교하여 아미노산서열의 상동성을 분석한 결과 같은 바리와 어류인 자바리(*Epinephelus bruneus*)와 97.6% 가장 높은 상동성을 보였고, 담수어류인 *Danio rerio*와의 상동성은 13.4%로 매우 낮은 것을 확인하였다(Table 4). Kissp2 cDNA도 역시 다른 어종간의 아미노산 상동성 분석 결과 바리와 어류인 자바리와 *E. coioides*가 각각 96.4%와 95.2%로 매우 높은 상동성을 보였다(Table

5). 그리고 붉바리에서 확인된 Kissp1과 Kiss 2의 종간계통유연관계를 분석한 결과 자바리(*E. bruneus*)와 가장 인접한 유연관계임을 확인하였다(Fig. 3, 4):

Kisspeptin의 구조와 역할에 대한 연구는 대부분 포유류를 중심으로 이루어져 왔으나, GnRH와 GtH의 분비 자극 등 번식내분비 조절에 관여하는 것으로 밝혀졌다(Gottsch et al., 2004; Matsui et al., 2004; Messenger et al., 2005; Magee et al., 2009; Lens et al., 2008). 어류의 Kisspeptin 유전자에 대한 분자생물학적 동정과 기능에 대한 연구는 제브라피쉬, 송사리, 유럽산 농어, 홍바리 등에서 일부 확인되었고, 포유류에서는 존재하지 않는 Kiss1-like gene인

Table 4. Partial amino acid identities of Kisspeptin1 between of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and other fish

Species	Kiss1 Homology(%)
<i>Epinephelus akaara</i>	-
<i>Epinephelus bruneus</i>	97.6
<i>Sebastes schlegelii</i>	81.7
<i>Morone saxatilis</i>	75.6
<i>Dicentrarchus labrax</i>	73.2
<i>Sander vitreus</i>	70.7
<i>Thunnus thynnus</i>	69.5
<i>Scomber japonicus</i>	68.3
<i>Seriola lalandi</i>	65.9
<i>Chrysiptera cyanea</i>	61.0
<i>Danio rerio</i>	13.4

Table 5. Partial amino acid identities of Kisspeptin2 between of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and other fish

Species	Kiss2 Homology(%)
<i>Epinephelus akaara</i>	-
<i>Epinephelus bruneus</i>	96.4
<i>Epinephelus coioides</i>	95.2
<i>Pagrus major</i>	83.3
<i>Dicentrarchus labrax</i>	82.1
<i>Seriola lalandi</i>	76.2
<i>Thunnus thynnus</i>	71.4
<i>Thalassoma bifasciatum</i>	70.2
<i>Scomber japonicus</i>	66.7
<i>Haplochromis burtoni</i>	65.5
<i>Solea senegalensis</i>	63.1

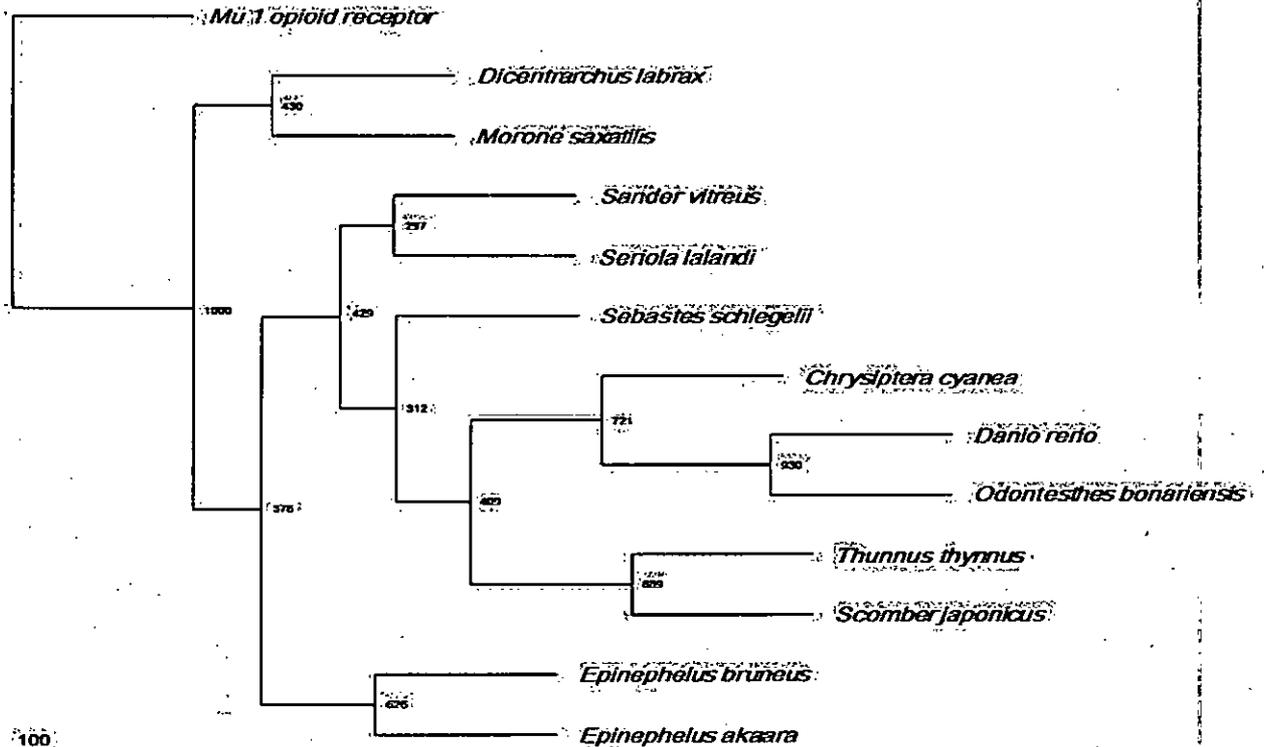


Fig. 3. Phylogenetic relationship of Kisspeptin 1 cDNA between red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and other fish species.

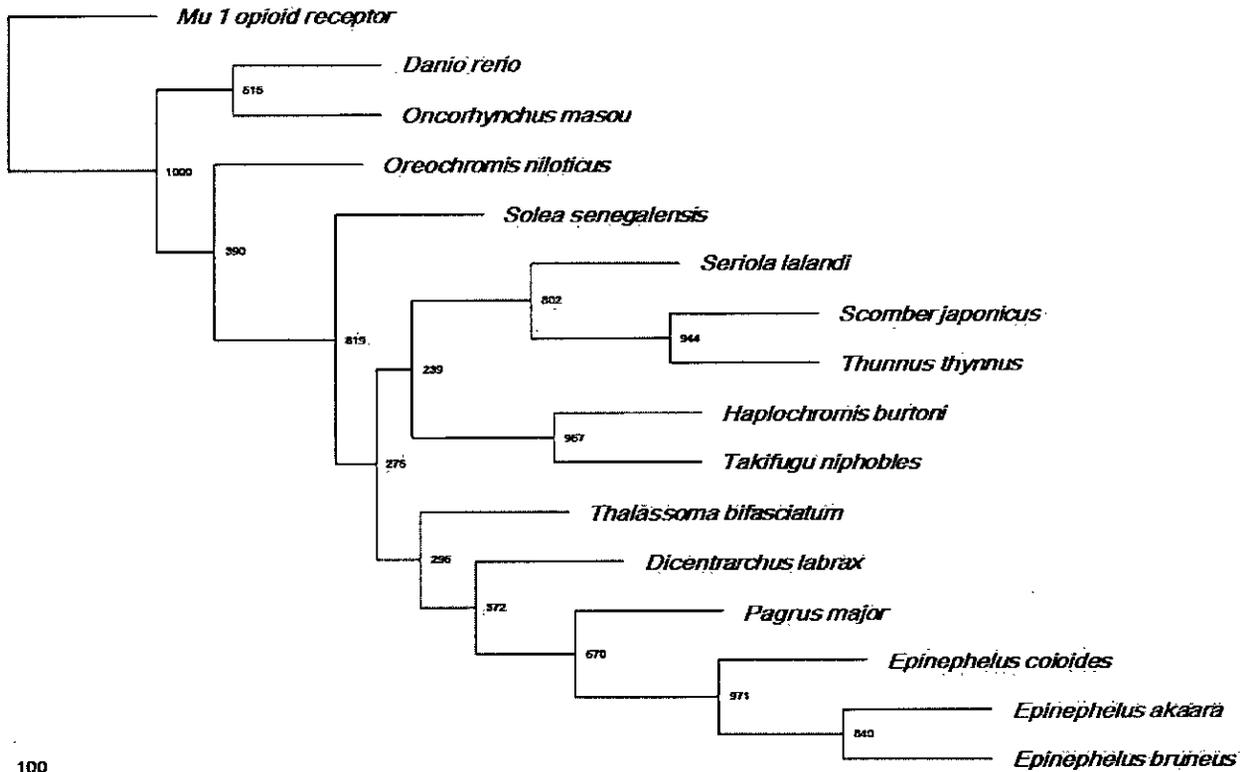


Fig. 4. Phylogenetic relationship of Kisspeptin 2 cDNA between red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and other fish species.

Kiss2의 존재가 경골어류를 중심으로 밝혀지고 있다(Kanda et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009). 어류에 있어 Kiss1과 Kiss2의 기능과 조직 내 발현 분포도 어종간에 차이가 있어, 어류의 뇌-뇌하수체-생식소 축을 중심으로 번식내분비계 제어에 있어 Kisspeptin 역할에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다(Zmora et al., 2012; Escobar et al., 2013). 특히, 합성 Kisspeptin 투여를 통한 어류의 번식활성에 미치는 영향을 조사한 연구를 보면, 제브라피쉬의 경우 Kiss1보다 Kiss2가 GtH의 발현 상승에 더 효과적이며(Kitahashi et al., 2009), goldfish, *Carassius auratus*의 암컷에 Kiss1과 Kiss2를 복강내 주입한 결과 혈액 내 LH 분비가 Kiss1

에서 더 많이 증가하였고(Li et al., 2009), orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*의 암컷인 경우 Kiss2가 뇌하수체에서 FSH 발현을 상승시켰으며(Matsui et al., 2004), European sea bass, *Dicentrarchus labrax*의 수컷인 경우 Kiss1과 Kiss2를 근육내 주사한 결과 Kiss2에서 LH의 분비가 더 증가하였다(Felip et al., 2009). 또한 Yellowtail Kingfish, *Seriola lalandi* 수컷의 FSH 분비 상승효과는 Kiss2 투여에서 높았고(Nocillado et al., 2012), Striped bass, *Morone saxatilis*의 LH분비 상승효과는 암컷의 경우 Kiss1, 수컷인 경우 Kiss2가 더 효과적이었다(Beck et al., 2012; Zmora et al., 2012). 그러나 European eel, *Anguilla anguilla* 암컷의 경우 Kiss1 투여는 LH 분비가

감소하는 경향을 보였다(Pasquier et al., 2011).

이와 같이 Kisspeptin은 어류의 번식에 밀접한 관련이 있으나, 어류의 종과 성별, 또는 생식소 발달 단계, Kisspeptin 종류에 따라 번식 활성에 미치는 영향이 다르기 때문에, 향후 불바리를 대상으로 성성숙 유도 및 번식 제어에 있어 Kisspeptin의 역할과 직접적인 작용을 확인할 수 있는 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 Golden Seed 프로젝트 사업의 지원을 받아 수행되었습니다(213004044CG600).

참고 문헌

- Andrade, A.B., L.F. Machado, M. Hostim-Silva and J.P. Barreiros. 2003. Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Braz Arch Biol Technol.*, 46(3): 373-382.
- Baillie, J., C.H. Taylor and S.N. Stuart. 2004. The 2004 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Glands, Switzerland.
- Beck, B.H., S.A. Fuller, E. Peatman, M. McEntire, A. Darwish and D. Freeman. 2012. Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus *Morone*. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol.*, 162: 265-273.
- Dhillon, W.S. 2008. Kisspeptin: A novel regulator of reproductive function. *J Neuroendocrinol.*, 20: 963-970.
- Escobar, S., A. Felip, M.M. Gueguen, S. Zanuy, M. Carrillo, O. Kah and A. Servili. 2013. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol.*, 521: 933-948.
- Felip, A., S. Zanuy, R. Pineda, L. Pinilla, M. Carrillo, M. Tena-Sempere and A. Gomez. 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol.*, 312: 61-71.
- Gottsch, M.L., M.J. Cunningham, J.T. Smith, S.M. Popa, B.V. Acohido, W.F. Crowley, S. Seminara, D.K. Clifton and R.A. Steiner. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145, 4073-4077.
- Kanda, S., Y. Akazome, T. Matsunaga, N. Yamamoto, S. Yamada, H. Tsukamura, K. Maeda and Y. Oka. 2008. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*, 149: 2467-2476.
- Kitahashi, T., S. Ogawa, and I.S. Parhar. 2009. Cloning and expression of kiss2 in the

- zebrafish and medaka. *Endocrinology*, 150: 21-831.
- Lents, C.A., N.L. Heidorn, C.R. Barb and J.J. Ford. 2008. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction*, 135: 879-887.
- Li, S., Y. Zhang, Y. Liu, X. Huang, W. Huang, D. Lu, P. Zhu, Y. Shi, C.H. Cheng, X. Liu and H. Lin. 2009. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol.*, 201: 407-418.
- Magee, C., C.D. Foradori, J.E. Bruemmer, J.A. Arreguin-Arevalo, P.M. McCue, R.J. Handa, E.L. Squires and C.M. Clay. 2009. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology*, 150: 2813-2821.
- Matsui, H., Y. Takatsu, S. Kumano, H. Matsumoto and T. Ohtaki. 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.*, 320: 383-388.
- Messenger, S., E.E. Chatzidaki, D. Ma, A.G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, R.R. Thresher, I. Malinge, D. Lomet, M.B.L. Carlton, W.H. Colledge, A. Caraty and S.A. Aparicio. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 102: 1761-1766.
- Nocillado, J.N., J. Biran, Y.Y. Lee, B. Levavi-Sivan, A.S. Mechaly, Y. Zohar and A. Elizur. 2012. The Kiss2 receptor (Kiss2r) gene in Southern Bluefin Tuna, *Thunnus maccoyii*, and in Yellowtail Kingfish, *Seriola lalandi* - functional analysis and isolation of transcript variants. *Mol Cell Endocrinol.*, 362: 211-220.
- Parhar, I.S., S. Ogawa and Y. Sakuma. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, 145: 3613-3618.
- Pasquier, J., A.G. Lafont, J. Leprince, H. Vaudry, K. Rousseau and S. Dufour. 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol.*, 173: 216-225.
- Servili, A., Y. Le Page, J. Leprince, A. Caraty, S. Escobar, I.S. Parhar, J.Y. Seong, H. Vaudry and O. Kah. 2011. Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology*, 152: 1527-1540.
- Tena-Sempere, M. and I. Huhtaniemi. 2003. Gonadotropins and Gonadotropin receptors. In Fauser B.C.J.M. (ed.) *Reproductive Medicine-Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals*. Parthenon Publishing, New York, USA, pp 225-244.
- Zmora, N., J. Stubblefield, Z. Zulperi, J. Biran,

B. Levavi-Sivan, J.A. Munoz-Cueto and Y. Zohar. 2012. Differential and gonad stage-dependent roles of Kisspeptin1 and Kisspeptin2 in reproduction in the modern teleosts. Morone species. *Biol Reprod.*, 86: 177.