

동해안 북부 자망에서 어획된 명태(*Theragra chalcogramma*)의 생식소 성숙과 포획 후 경과시간에 따른 성숙란의 RNA/DNA ratio 및 냉장보관 정자의 활력

서주영 · 권오남^{1*}

강원도한해성수수산자원센터, ¹강원양식생물연구소(주)*

Gonadal Maturation, RNA/DNA Ratio of Mature Eggs, and the Effect of Refrigeration on Egg Viability and Sperm Motility in Korean Walleye pollock *Theragra chalcogramma*

Joo-Young Seo and O-Nam Kwon^{1*}

Fisheries Resource Center for Cold Water, Gosung 24747, Korea
¹Gangwon Aqua-cultural Biology Institute Co. Ltd., Gangneung 25435, Korea

We conducted a study to 1) determine the indicators of gonadal maturity in male and female Korean walleye pollock *Theragra chalcogramma* for the purposes of artificial insemination; 2) establish the RNA/DNA ratio of mature eggs in this species; and 3) monitor the effect of refrigerated storage on egg viability and the motility of sperm collected from dead adult males. During the spawning season, the color of female gonads changed from orange to transparent, and that of male gonads changed from pale orange to milky white. The DNA content and RNA/DNA ratio of mature eggs were maintained without significant changes for approximately 6 h when eggs were preserved at 4°C. Sperm could be obtained from both milt and undiluted semen. Sperm obtained from milt ceased moving on the second day after isolation, while over 60% of sperm obtained from semen showed movement until the 13th day. Seven attempts were made to artificially inseminate mature eggs, of which two resulted in successful fertilization. The successful inseminations produced 94,000 and 5,000 fertilized eggs, respectively. This study shows that artificial insemination of walleye pollock is a viable strategy when natural propagation is not possible.

Key words: Walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, Artificial fertilization, Viability, Sperm activity

서 론

어류의 정상적인 수정란을 얻기 위해서는 정상적으로 성숙된 복강 내 성숙란을 확보하여야 한다. 난낭에서 배란된 배란란은 산란되지 않으면 과숙으로 진행되어 수정되지 않는 과숙란이 된다(Lahnsteiner, 2000). 자연이나 수조 내에서 암수의 교미로 수정란을 확보하는 경우에는 난낭에서 배란된 배란란은 교미행동에 의해 체외로 산란되어 수정이 되지만, 인공번식을 통한 수정란 확보를 위해서는 인위적인 방법에 의해 채란 시간을 정해서 성숙란을 얻어야만 한다. 성숙란이 과숙으로 진행하게 되는 기간은 어종에 따라 다른데, sturgeon *Acipenser* sp.는 2일, Rainbow trout *Salmo gairdneri*는 성숙란이 산란되

지 않아도 7일까지 과숙으로의 이행이 안 된다(Rottmann et al., 1991). 하지만 bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis*, common carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idello*은 30분에서 80분 사이에 과숙으로의 이행이 매우 빠르게 진행된다. 심지어 Striped bass *Morone saxatilis*는 15-30분 이내에 과숙에 의해 수정이 되지 않는 상태가 된다. 인공성숙에는 최근 일본과 우리나라를 중심으로 중요생산되고 있는 극동산 뱀장어의 경우 수정시키기 가장 좋은 시간을 산정하기 위해 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) 주사 후 15시간으로 정하고 있다(Ohta et al., 1996). 하지만 확률을 보다 높이기 위해 성숙란을 가진 어미에 DHP 주사를 한 후 수컷과 합사하여 자연 채란이 유도된 직후 인공채란을 하기도 한다(No-

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0296>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(3) 296-301, June 2017

Received 20 September 2016; Revised 21 March 2017; Accepted 14 June 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 33. 610. 2038 Fax: +82. 33. 610. 2038

E-mail address: onkwon@gab-i.net

mura et al., 2013). 그리고 인공채란을 위해 암수를 별도 관리한다면 성숙란의 확보도 중요하지만 활성을 갖는 정충을 성숙란이 확보된 그 시점에 가질 수 있어야만 한다. 명태(*Theragra chalcogramma*)는 1981년 16만 6천톤의 어획고를 보였고 이후 급격히 감소하여 2000년 이후 완전히 자취를 감추었다(Kang et al., 2013). 그리고 이 자원의 변화는 1970년대 후반부터 감소경향이 확인되어(Lee, 1991) 현재에는 방류와 같은 적극적인 자원회복을 위한 노력이 필요하게 되었다. 현재 우리나라 명태는 자연채란을 위해서 확보된 어미의 양과 암수비율이 맞지 않고, 암컷의 수조 내 폐사로 지속적인 수정란 확보가 불확실한 것이 현실이다. 결국 매년 400-600마리 정도(1톤 가량)의 성어가 자망에 잡히는데 산란기에 잡히는 100여 마리의 명태 선어에서도 수정란을 확보하려는 노력도 해야 할 필요가 있다. 하지만 명태는 다회산란 어종으로 10-20회에 걸쳐 산란기 동안 나뉘어서 산란하기 때문에(Bachelier et al., 2010) 성숙란을 가지고 있는 명태의 비율은 그만큼 줄어들게 된다. 또한 자망에 포획되어 폐사한 시간의 경과에 따라 성숙란이라고 해도 수정율이 낮아지는 과속으로 진행되어 버린다. 2014년 이후 국내외에서 명태 선어로부터 수정란을 확보하려는 많은 노력이 있었지만 수정란이 원활히 확보되지 못한 이유가 여기에 있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 암수생식소의 상태를 Williams (2007)의 형태와 조직학적 발달양상을 바탕으로 채란/채정 가능 여부를 확인하고, 폐사한 암컷으로부터 채취한 성숙란을 4°C 저장 시간의 경과에 따른 활력 평가(Buckley, 1984)를 RNA, DNA 함량과 RNA/DNA ratio를 통해 확인하였다. 그리고 채취한 정충의 활력을 현미경상에서 확인하였고, 최종적으로 명태 선어로부터 확보한 성숙란과 냉장 보관된 정충을 이용한 수정을 통해 부화 자어를 얻었다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 명태 어미는 2014년 2월에서 5월까지 포획된 총 203마리 중 성숙한 암컷 7마리와 수컷 45마리였다. 암컷으로부터 복부 압박법에 의해 성숙란을 채취하였다. 그리고 수컷으로부터 암컷과 동일한 방법으로 정액을 얻은 후 복개하여 생식공 근처의 정소 일부를 채취하여 정자의 활력을 보았다. 채취한 성숙란은 압박법에 의한 채란으로 생식소 내에서 투명하게 변한 알만을 사용하였으며, 냉장보관(4°C) 경과시간별 10개 내외의 알로 핵산함량과 단백질량을 측정하였다. DNA와 RNA가 산(acid)과 염기(base)에 각각 추출되는 원리를 이용한 Kwon and Adachi (2008)의 방법과 수용성 단백질 측정을 위한 Bradford (1976)의 방법을 이용하여 pg/mg protein의 단위로 계산하여 표시하였다. 3마리 암컷의 성숙란을 이용하였으며 3회 이상 분석하여 결과로 나타내었다. 그리고 전체 45마리 수컷의 정액에서 정충 활성이 있었던 10마리와 정소의 표면과 내부에서 활성이 있었던 7마리를 사용하였다. 이들로부터 확보된 정충의 정액 내 밀도는 개체별로 차이는 있었지만 $600-800 \times 10^4$

sperms/mL로 조사되었다. 정충은 해수에 노출 후 1분 이내에 대부분 활력을 잃어 버리기 때문에 해수에 노출 후 5초 이내의 순간 활력을 현미경(Olympus CH40, Olympus, Japan)으로 확인하여 100%에서 5%까지 5%단위로, 5% 이하에서는 1% 단위로 기록하여 결과로 정리하였다. 그리고 인공수정은 활력을 갖는 정액을 가지고 있을 때 성숙한 암컷으로부터 성숙란을 확보한 당일 인공수정에 의해 7회에 걸쳐 실시하였다. 단 매 수정 시 정자 활성을 현미경으로 확인하고 10% 이상의 활력을 보이는 정충을 사용하였다. 통계처리는 채취 후 경과시간에 따른 성숙란의 RNA, DNA 함량과 이들의 ratio의 평균값에 대해서 one-way ANOVA test를 실시하고, Duncan (1955)의 다중검정으로 처리, 평균 간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계처리는 유의확률 95% 범위에서 SPSS 프로그램(Ver. 20.1)을 이용하여 분석하였다.

결 과

고성, 속초 지역에서 2014년 1-3월 동안 포획된 명태 암컷 생식소는 Fig. 1과 같다. 산란기 직전 성숙란(A)은 연한 고동색(간혹 선홍색)으로 생식소 표면에 혈관이 선명하게 보이고, 내부 성숙란은 분리되지 않았다. 성숙하여 산란기 직전의 생식소(B)는 선홍색으로 성숙과정에서 투명한 구멍이 난 것과 같았고, 내부 알은 뭉쳐있다. 그리고 산란 중인 생식소(C)는 투명한 반점들이 많아졌으며 생식소를 절개하였을 때 내부에서 투명한 알이 분리되어 있었으며, 생식소 표면은 선홍색을 띄었다. 산란 후의 생식소(D)는 크기가 줄어들어 있으며 외부는 반투명하고 내부는 투명하고 선홍색의 알이 혼재되어 있었다. 같은 지역과 시기에 포획된 명태 수컷 생식소는 Fig. 2와 같다. 산란기 전 수컷의 생식소(A)는 연한 선홍색으로 꼬여있다. 성숙하면서 정소(B)는 희어지고 주위 혈관들로 인해 붉은 빛이 있다. 그리고 정세포(정충)가 만들어지는 유백색의 정액이 흘러내리는 완속 정소(C)에서 정액을 확인할 수 있다(C의 화살표). 같은 지역에서 2014년 2월에 포획된 암컷의 완속란은 채취 후 4°C에서 저장시간에 따른 핵산(RNA와 DNA)함량과 비율(ratio)의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 완속란 내 RNA 함량은 1.0 ± 0.03 pg/mg protein으로 채취 후 16시간 경과 시까지 1.0 ± 0.01 pg/mg protein으로 유의적인 차이가 없었지만($P > 0.05$), 이후 유의적으로 감소하였다. DNA 함량은 채취 직후 1.4 ± 0.01 pg/mg protein으로 채취 후 2시간까지 유의적인 차이를 보이지 않았지만($P > 0.05$), 이후 감소하여 채취 후 8시간째 완속란 마다 차이를 보여 0.9 ± 0.26 pg/mg protein으로 확인되었다. 이후 24시간 경과 시 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). RNA/DNA ratio는 함량이 낮아지는 DNA 함량에 반비례하여 8시간까지 0.76-0.80의 비율을 보였고($P > 0.05$), 이후 유의적으로 증가하여 24시간 경과 시 2.2 ± 0.29 로 나타났다($P < 0.05$).

수컷 45마리 중 26마리에서 채취한 정액과 정소의 일부분에서 얻은 정충의 4°C에서 보관 시 경과시간에 따른 활력은 Fig. 4

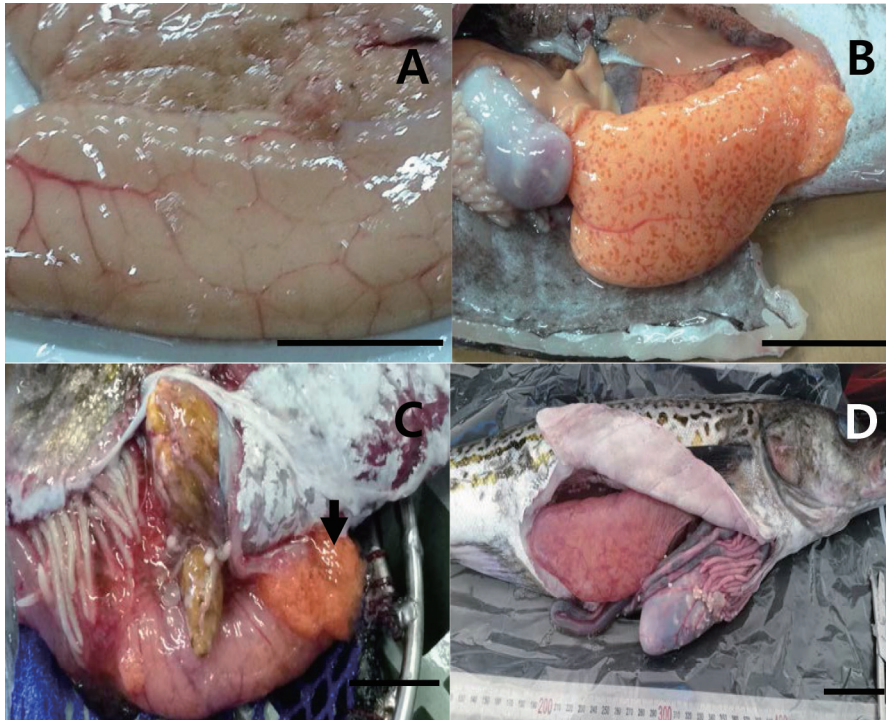


Fig. 1. Development from pre-spawning to spent ovary in Korean walleye pollock *Theragra chalcogramma* adult male caught Between January and March 2014 by gill net in nature. A, ovary opaque; B, just before spawning; C, spawning; D, spent. The arrow of "E" indicated the matured eggs inside ovary. Bar indicated 5 cm.



Fig. 2. Development from pre-maturation to ejaculation testicle in Korean walleye pollock *Theragra chalcogramma* adult male caught Between January and March 2014 by gill net in nature. A, before maturation stage; B, just before maturation; C, ejaculation stage. The arrow of E indicated the spermatogenesis inside testicle. Bar indicated 5 cm.

에 나타내었다. 4마리에서의 정액이 채취 당일 20% 이상의 활력을 보였고, 정소에서는 2마리가 20% 이상 활력을 보였지만, 2일 경과 후 활력이 급격히 줄었다. 반면 보관된 정액은 최대 13일까지 60% 이상의 활력을 보였다. 그리고 채취된 알과 보관된 정충을 이용해서 수정란의 확보 현황은 Fig. 5에 나타내었다. 1회에 약 15만개의 투명한 성숙란에서 9만 4천개의 수정란을 얻어서 7만마리의 부화자어를 얻었으며, 2회 차에는 5천마리의

부화자어를 얻었다. 하지만 3회 차부터는 성숙란은 확보했었지만, 정충의 양과 활력이 1% 이하로 낮아짐으로 인해 수정란을 전혀 얻지 못했다.

고 찰

어류 성숙란의 수정 후 정상적인 발생율은 배란 직 후 수정시키지 않는다면 노출 수온과 경과시간에 수정율이 영향을 받

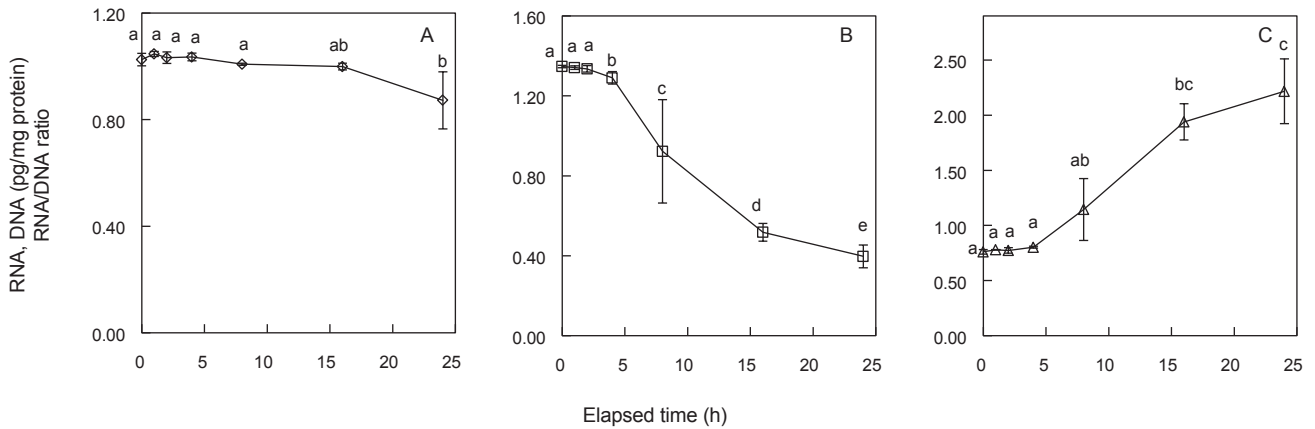


Fig. 3. Nucleic acids content (pg/mg protein) due to elapsed reservation time (hour) of matured Korean walleye pollock *Theragra chalcogramma* eggs reserved on 4°C. A, RNA content (pg/mg protein); B, DNA content (pg/mg protein); C, RNA/DNA ratio. Different superscripts on spots indicate a significant difference; double superscripts (like ab, bc) indicate no significant difference with either component: ab is not significantly different from either a or b, etc.

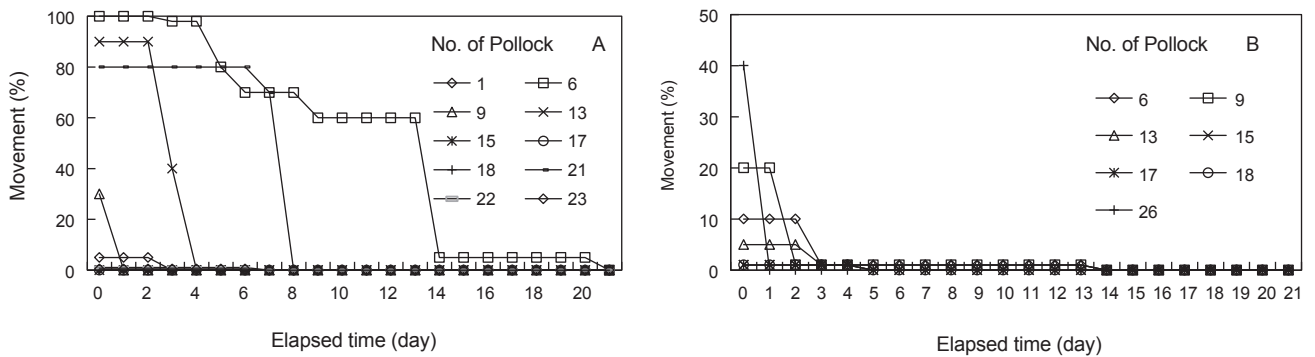


Fig. 4. Movability (%) due to elapsed reservation time (day) of spermatozoa obtained from semen (A) and milt (B) of matured Korean walleye pollock *Theragra chalcogramma* male.

는다(Bahre Kazemi et al., 2009). 본 연구에서는 고성과 속초 지역의 자망에서 포획된 명태 어미로부터 성숙란과 정충을 확보하여 다화에 걸쳐 수정을 시도하였다. 어미로부터 채취한 성숙란은 일정시간이 경과하면 수정율이 떨어져서 더 이상 발생하지 못하는데, 어중에 따라 30분 이내에 과숙으로 진행되는 striped bass, *Morone saxatilis*도 있고, 7일이 경과해서야 과숙으로 진행되는 rainbow trout *Salmo gairdneri*도 있다(Rottmann et al., 1991). 우리나라 동해안에서는 산란기인 12-4월 사이에 비정기적으로 어획되는 관계로 수컷으로부터 정액을 채취하여 보존하고 암컷의 성숙란이 나오기를 기다려야만 하는 문제들이 있다. 또한 자망 명태 암컷이 폐사한지 몇 시간이 되었는지 확인이 안 되는 상황에서 모든 성숙란을 수정시켜 부화자어를 얻을 수는 없었다. 정상 성숙란을 확보하였다고 하여도 수정시킬 수 있을 정도의 활력을 가지고 있는 정충의 확보가 안되었다면 불가능한 일이다. 다행히 Rottmann et al. (1991)과 Bahre

Kazemi et al. (2009)의 낮은 수온에서 서식하는 어종에서 길지는 않지만 과숙으로의 이행이 느리다는 것에 착안하여 명태 채란과 수정작업을 할 수 있었다. Seoka et al. (2003)은 뱀장어 (*Anguilla japonica*)에서 수정 후 부상란과 침강란의 생화학적 특성을 밝혀 수정되지 않는 성숙란이 발달과정에서부터 문제가 있다는 것을 밝혔다. 과숙에 의한 변화는 결국 수정율에서 부화 후 기형율까지 영향을 미치는데(Mohagheghi Samarin et al., 2010; Samarin et al., 2011), 과숙이 진행되면서 난 내 ATPase의 활력이 높아지고(Sago, 2008), triglyceride, glucose의 함량이 낮아지면서 aspartate aminotransferase 활성이 급격히 높아지는 경향을 보이기도 하고(Mohagheghi Samarin et al., 2010), vitellogenin, lectin 및 apolipoprotein A 1-1과 같은 난 성숙란자의 축적도 있다(Rime et al., 2004). 하지만 수정율 저하로 오는 알의 과숙은 위와 같은 물질들의 함량 변화가 체강액에서 먼저 일어나게 된다. 한편 Nomura et al. (2013)은 뱀장어(A.

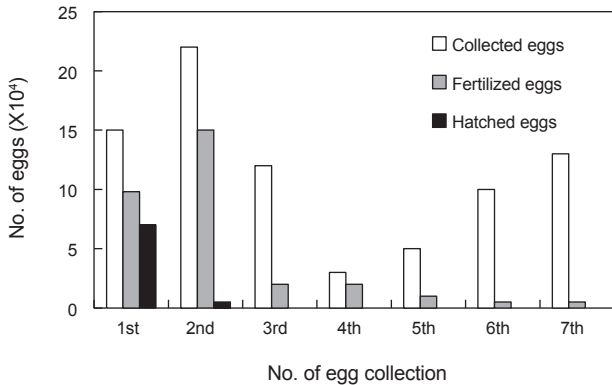


Fig. 5. Number of collected/fertilized/hatched eggs after artificial fertilization used matured eggs and reserved spermatozoa obtained from dead/fresh Korean walleye pollock *Theragra chalcogramma* adult.

japonica) 성숙란의 채란 후 저장 시간 경과에 따라 낮아지는 수정율과 부화율을 보고 하면서 4시간 이후 정상 비율이 낮아지는 것이 체내에서 생식소로 지속적인 간 유래 vitellogenin의 공급(Kwon and Adachi, 2008)에 의해서 만의 원인은 아니라고 밝혔다. 또한 snapper *Pagrus auratus*의 성숙란의 과숙을 막기 위해 동물세포배양용 L-15 배지(L-15 Medium, Leibovitz)에 번식관련 호르몬(testosterone, 17α -hydroxyprogesterone, $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and human chorionic gonadotrophin)을 함께 처리하여도 수정율의 보존에는 효과가 없었다(Hobby and Pankhurst, 1997). 결국 과숙되면서 난 내 산화반응에 따라 polysaccharide acids와 lipid를 함유하는 수 많은 소낭(vesicle)의 생성(Lahnsteiner, 2000)이 되고 yolk mass와 perivitelline space (난황주위 간극)의 변화가 조직학적으로 관찰(Mohagheghi Samarin et al., 2010)되기 때문에 모든 과숙에 의한 결과들이 나오는 것으로 판단된다. 이와 같은 연구결과들을 바탕으로 본 연구에서의 Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 보면 명태 성숙란은 6시간 이후 급격히 DNA 손상(4시간째 1.29 ± 0.032 pg/mg protein, 8시간째 0.92 ± 0.259 pg/mg protein)에 의한 수정율 저하가 예상되고, 정충은 수컷의 상태에 따라 13일까지 60% 이상의 활력을 유지 시킬 수 있었다. 생산량도 많지 않은 수컷 배우체(정충)는 Routray et al. (2006)와 Kang et al. (2009)에서와 같이 동결 보존된 정충을 수정에 이용되기도 한다. 하지만 우리나라에서는 명태 인공정장 실험을 위한 충분한 정장액을 확보하지 못하고 삼투압, 이온 농도를 최적화시키지 못해서 소량의 정액을 원액 냉장 보존할 수밖에 없다. 하지만 성숙한 수정란이 확보되더라도 저장된 정충의 활력이 낮다면 Fig. 5의 3-7회 채란에서 부화율 “0%”는 당연한 결과라고 판단된다. 하지만 본 연구에서와 같이 폐사한 major carp, *Labeo rohita*에서 정충을 채취하여 0°C에서 8시간까지는 수정 가능한 정충을 얻을 수 있음이 Routray et al. (2006)에 의해 보

고되어 명태와 같이 다회산란으로 인해 한꺼번에 얻을 수 있는 정충의 양이 적은 종류에서는 기술개발의 필요성은 있다고 할 수 있다. 본 연구에서는 죽은 지 몇 시간이 되었는지 모르는 자망에서 잡힌 명태 선어를 이용한 것이고, 개체별로 실험이 되어서 통계처리 조차도 하지 못했지만, 전체 45마리의 수컷 중에 10마리에서 정충을 얻어서 실험할 수 있었다. 그리고 정원세포들 사이에 있는 정충들에서도 낮지만 채취 당일 사용할 수 있을 정도의 20% 이상의 활력을 갖는 정충들을 얻을 수 있었다. 하지만 Fig. 5에서와 같이 수정란 확보에 따라 부화까지 시킬 수 있는 수정란의 확보율이 저조한 이유는 수컷으로부터 확보한 정충의 양과 활력저하가 가장 큰 원인이었다고 판단되지만, 성숙란의 과숙 정도도 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. 결과적으로 확보되는 정충의 양과 성숙란의 과숙 정도에 따라 정상 수정란 확보량이 결정 날 수밖에 없다는 것이다. 이와 같은 과정을 거쳐 2014년도 명태 산란기에 9만 5천개의 수정란을 얻었고, 부화율은 계산되지 않았지만 부화자어를 확보하였다. 근본적으로 본 연구에서는 폐사체를 이용해서 인공채란을 하였지만 명태는 다회 산란 어종이기 때문에, 가능하다면 살아있는 명태 어미들을 이용해서 자연산란에 의한 수정란 확보가 가장 바람직한 명태의 종묘생산 방법이라고 판단된다.

사 사

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원 수산실용화기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(동해안 명태의 종묘생산 및 방류기술개발).

References

- Bachelor NM, Ciannelli L, Bailey K and Duffy-Anderson JT. 2010. Spatial and temporal patterns of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) spawning in the eastern Bering Sea inferred from egg and larval distributions. *Fish Oceanogr* 19, 107-120. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2419.2009.00531.x>.
- Bahre Kazemi M, Matinfar A, Soltani M, Abtani B, Pusti I and Mohagheghi Samarin A. 2009. The relation between egg viability, selected aspects of egg and ovarian fluid composition and time of stripping in endangered Caspian brown trout *Salmo trutta caspius*. *J Fish Aquat Sci e* 4, 306-315. <http://dx.doi.org/10.3923/jfas.2009.306.315>.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Buckley LJ. 1984. RNA/DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar Biol* 80, 291-298. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00392824>.
- Duncan DB. 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42.

- Hobby AC and Pankhurst NW. 1997. Post-ovulatory egg viability in the snapper *Pagrus auratus* (Sparidae). *Mar Fresh Res* 48, 385-389. <http://dx.doi.org/10.1071/MF96120>.
- Kang S, Park JH and Kim S. 2013. Size-class estimation of the number of walleye pollock *Theragra chalcogramma* caught in the Southwestern East Sea during the 1970s-1990s. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 445-453. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0445>.
- Kang X, Li G, Mu S, Guo M and Ge S. 2009. Acrosome reaction of Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda) spermatozoa: Promoted by long-term cryopreservation. *Aquaculture* 295, 195-199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.041>.
- Kwon ON and Adachi SJ. 2008. Biochemical characterization of artificially matured Japanese eel, *Anguilla japonica* egg. *J Aquaculture* 21, 176-180.
- Lahnsteiner F. 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiol Biochem* 23, 107-118. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007839023540>.
- Lee JU. 1991. Estimation on optimum fishing effort of walleye pollock fisheries in the east coast of Korea: Based on the economic analysis between Danish serine fishery and trawl fishery for walleye pollock. *J Fish Bus Adm* 22, 75-99.
- Mohagheghi Samarin A, Mojazi Amiri B, Bahre Kazemi M, Soltanio M, Matinfar A Abtahi B and Pusti I. 2010. Biochemical and histological studies of over-ripened oocyte in the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) to determine biomarkers for egg quality. *Iran J Fish Sci* 9, 33-48.
- Nomura K, Takeda Y, Unuma T, Morishima K, Tanaka H, Arai K and Ohta H. 2013. Post-ovulatory oocyte aging induces spontaneous occurrence of polyploids and mosaics in artificial fertilization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 404-405, 15-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.016>.
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K and Hirose K. 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139, 291-301. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01167-6](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(95)01167-6).
- Rime H, Guitton N, Pineau C, Bonnet E, Bobe J and Jalabert B. 2004. Post-ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reprod Biol Endoc* 2, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-2-26>.
- Rottmann WR, Shireman VJ and Chapman AF. 1991. Techniques for taking and fertilizing the spawn of fish. Southern Regional Aquaculture Center Publication 426, 1-8.
- Routray P, Choudhary AK, Dash SN, Verma DK, Dash C, Swain P, Jena JK, Gupta SD and Sarangi N. 2006. Cryopreservation of dead fish spermatozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful utilization in fish production. *Aquaculture* 261, 1204-1211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.029>.
- Sago K. 2008. Searching of new molecular marker protein for egg quality estimation, Master Thesis, Hokkaido University, Hakodate, Japan.
- Samarin AM, Amiri BM, Soltami M, Nazari RM, Kamali A and Naghavi MR. 2011. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality in Kutum *Rutilus frisii kutum*. *World Appl Sci J* 15, 14-18.
- Seoka M, Yamada S, Iwata Y, Yanagisawa T, Nakagawa T and Kumai H. 2003. Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 216, 355-362. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00459-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00459-3).
- Williams K. 2007. Evaluation of the macroscopic staging method for determining maturity of female Walleye pollock *Theragra chalcogramma* in Shelikof Strait, Alaska. *Alaska Fishery Research Bulletin* 12, 252-263.