

뱀장어(*Anguilla japonica*) 정자 활성에 따른 정액 분석 및 인공정액 개선

김한식^{1,2} · 김신권¹ · 이배익¹ · 유용운³ · 신민규¹ · 박수진⁴ · 최윤희^{5*}

¹국립수산과학원 양식연구과, ²경상남도 수산자원연구소, ³국립수산과학원 제주수산연구소, ⁴국립수산과학원남해수산연구소, ⁵부경대학교 수산생명과학부

Semen Analysis and Improvement of Artificial Seminal Plasma According to Sperm Activity in Eel *Anguilla japonica*

Han-Sik Kim^{1,2}, Shin-Kwon Kim¹, Bae-Ik Lee¹, Yongwoon Ryu³, Min-Gyu Shin¹, Su-Jin Park⁴ and Youn-Hee Choi^{5*}

¹Aquaculture Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

²Gyeongsangsam-do, Fisheries Resources Research Institute, Tongyoung 53080, Republic of Korea

³Jeju Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Busan 63068, Republic of Korea

⁴Southeast Sea Fisheries Research Institute National Institute of Fisheries Science, Busan 53085, Republic of Korea

⁵Division of Fisheries Life Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

This study examined the characteristics of eel *Anguilla japonica* sperm using the CASA (computer-assisted sperm analysis) system and attempted to provide the composition for artificial seminal plasma by regulating of inorganic elements. Sperm samples were first divided into four groups based on motility and progressive motility: (A) 0–10%, (B) 10–40%, (C) 40–70%, and (D) 70–100%. For observing sperm velocity variations, VCL, which is curve motion velocity, showed the highest values in all groups. The directional factor, beat cross frequency, was lower in higher activity groups, showing an opposite correlation with sperm activity. The head sizes of spermatozoa in higher activity groups were significantly larger than those in lower activity groups. The Na⁺ and K⁺ ions were important in the inorganic composition of seminal plasma in this species. Furthermore, regulating the composition in artificial seminal plasma improved the formula compared to the existing element, exhibiting 120 mM Na and 30 mM K when the sperm was conserved for a long time and 120 mM Na and 40 mM K when the sperm was conserved for a short time.

Keywords: Eel, Spermatozoa, Semen, Seminal plasma, Artificial seminal plasma

서론

어류의 종 보존 또는 양식생산 및 관리를 위하여 인공수정란을 생산하는 기술은 중요하며 다양한 연구가 수행되어 왔다. 인공수정란 생산을 위해서는 난과 정자가 필수적이며, 수정 및 부화의 성공을 결정짓는 요소는 배우자의 건강도이다. 하지만, 지금까지 다양한 관점과 방법으로 어류의 난질을 향상시키기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있는 반면에, 정자의 질을 평가하고 향상시키는 것에 초점을 맞춘 연구들은 부족한 실정이다 (Rurangwa et al., 2004). 어류의 정액은 정자와 정장액으로 이루어져 있으며, 정장액에는 지방산, 단백질, 무기원소 등이 구

성되어 있어, 정자가 생존하고 활성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그 중, 무기원소는 정자의 활성·억제와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있어(Morisawa, 2008), 경골어류의 정장액 내 무기원소 조성은 정자의 활성 평가에 이용되고 있다. 하지만, 다양한 수중환경에 적응하여 진화한 어류들은 종에 따라 각기 다른 무기원소 조성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Morisawa, 1983; Le et al., 2007; Jeong and Chang, 2011). 각 무기원소들이 어떻게 정자의 활성에 영향을 미치는지에 대한 명확한 메커니즘은 밝혀지지 않았지만, 해수어의 정자는 해수의 높은 삼투압에 의해 정자의 칼륨 농도가 증가하게 되면서 정자의 활성이 유발된다고 보고된 바 있으며(Takai and Morisawa,

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 254. 3436 Fax: +82. 55. 254. 3419

E-mail address: tgs0528@korea.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0401>

Korean J Fish Aquat Sci 56(4), 401-410, August 2023

Received 31 May 2023; Revised 27 July 2023; Accepted 16 August 2023

저자 직위: 김한식(연구사), 김신권(연구관), 이배익(연구사), 유용운(연구사), 신민규(연구사), 박수진(연구사), 최윤희(교수)

1995; Miura et al., 2013; Jeong et al., 2014), Asturiano et al. (2004)는 정장액의 칼륨 농도가 증가할수록, 마그네슘과 칼슘의 농도는 낮을수록 정자의 활성이 높아진다고 하였다. 즉, 정자의 활성제어는 어류 정장액 내 무기원소를 조절하는 것에 따라 제어가 가능하다는 것을 의미하며, 인위적으로 정장액을 제작하여 현장에서 활용되었다. 인공정장액은 수정 전까지 정자의 활성을 억제시키며, 생존능력과 형태를 유지하면서 보존 가능하다는 이점이 있다(Ohta and Izawa, 1996). 이에 따라, 정자의 단기간의 보존에 있어 정자의 동결과 해동 등의 과정이 없이 인공수정에 사용되어왔다. 포유동물인 돼지의 경우 수정에 필요한 대부분의 정자를 인공정장액에 희석하여 단기보존액과 장기보존액으로 분류하여 시판하고 있으며(Sa et al., 2011), 어류에서도 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 브라운송어(*Salmo trutta macrostigma*), 잉어(*Cyprinus carpio*) 등에서 인공정장액이 사용되고 있다(Kobayashi et al., 2004; Bozkurt et al., 2011; Cejko et al., 2018). 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)에서는 Ohta and Izawa (1996)는 인공정장액 관한 연구를 통해 인공종자생산에 기여한 바 있으나, 정자의 보존성이 안정적이지 않고, 활성이 빠르게 저하되는 등 문제가 있어 개선이 필요한 상황이다. 뱀장어는 독특한 생태·생리적 특성을 가지고 있어 다른 양식어류에서 적용 가능한 수온, 광주기 조절 등의 사육환경제어로 인공 성 성숙 유도가 어렵다(Kagawa et al., 1998). 암컷 뱀장어는 SPE (salmon pituitary extract)를 반복 투여하여 배란을 유도하고, 수컷 뱀장어는 인간의 태반용모성호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG)을 반복 투여하여 배정을 유도한다(Yamamoto et al., 1972; Miura et al., 1991; Ohta et al., 1996). 그러나, 위의 방법으로 얻어지는 배우자(gametes)의 질(quality)은 낮은 수준이며, 채정과 인공 산란이 동시에 이루어지지 않아, 인공정장액을 통한 장기간 정자를 보존해야 하는 등 어려움이 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 뱀장어 정자 활성에 따른 뱀장어 정자의 운동 속력인자, 방향성인자 및 형태 등을 분석하여 뱀장어 정자의 기초자료를 수집하였고, 정자의 활성에 영향을 미치는 정장액의 무기원소 조성을 비교 분석하여 효율적인 인공정장액 조성을 제시하여 뱀장어 인공수정란 생산기술의 개선을 도모하였다.

재료 및 방법

친어관리 및 배정 유도

실험개체는 2019년 전라남도 영광에 위치한 뱀장어 양만장에서 구입하여 국립수산물과학원 진해 첨단양식실증센터의 담수수조에 수용, 관리한 개체를 사용하였다. 일정기간 컨디션을 회복한 개체는 부산에 위치한 국립수산물과학원 본원 양식관리과로 이송하여 해수에서 1일 5 ppt씩 증가시키며 점진적으로 순치시킨 후 완전히 해수로 순치되었을 때 인공적으로 성 성숙을 유

도하였다. 실험개체는 500 L의 fiber reinforced plastics 수조에 30마리 수용하였고 사육수온 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며, 어두운 조건에서 성숙기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

각 실험어는 개체식별을 위해 동물주입형 microchip (Taechang Industrial Co., Gumi, Korea)을 등 근육에 삽입한 후, hand reader (RT160; Covis., Busan, Korea)로 각 개체를 식별하여 성숙 및 채정기간 동안 추적·관리하였다. 배정유도를 위하여 eel ringer (150 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 5.0 mM CaCl_2 , 3.5 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) 10 mL에 hCG (10,000 IU; Daesung Microbiological Labs Co., Uiwang, Korea)를 녹여 1,000 IU/mL의 농도로 준비하였다. 실험개체는 2-phenoxyethanol (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 300 ppm 농도로 마취시켜 hCG 1 IU/g BW (body weight)의 농도로 복강 내에 호르몬 주사하였다. 그 후 포비돈(GUMI Pharma Co., Gimpo, Korea)으로 주사부위를 소독하였다.

채정 및 정장액 분리

채정은 호르몬 투여 8주 후 생식공에서 배정이 확인된 개체를 실험에 이용하였다. 마취는 2-phenoxyethanol (Sigma Co.)를 300 ppm 농도로 하였고, 채정 전에 천을 이용하여 생식공 주위의 해수 및 오염물을 제거하여 오염원에 의한 정자활성 저하를 방지하였다. 채정 시 복부를 압박한 후에 1 mL 주사기를 사용하여 생식공에서 채정하였다. 채정된 정액은 즉시 활성분석에 사용한 뒤 7,000 g로 4°C 에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. 분리된 상층액을 다시 4,000 g로 4°C 에서 10분간 원심분리하여 상층의 정장액을 분리하였다. 정장액은 구성성분 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

정자의 활성 분석

정자의 활성도 분석은 CASA (computer-assisted sperm analysis) system (integrated visual optical system, IVOS-II; Hamilton Throne Inc., Beverly, MA, USA)을 사용하였다. 채정된 정액은 2 μL 를 덜어 1 mL의 활성유도제(450 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5; Ohta and Izawa, 1996)에 약 500배 비율로 희석하여 정자의 활성을 유도하였다. 20 μm 깊이의 slide (Leica, Wetzlar, Germany)에 활성이 유도된 정자 2 μL 를 넣어 15초 내에 총 5프레임을 촬영하여 정자의 활성을 분석하였고, 각 3회 반복 측정하여 평균값을 사용하였다.

CASA system으로 관측된 활성인자 중 Mot (motility; %), Pmot (progressive motility; %), VAP (average path velocity; $\mu\text{m/s}$), VSL (straight line velocity; $\mu\text{m/s}$), VCL (curvilinear velocity; $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude of lateral head displacement; μm), LIN (linearity VSL/VCL; %), STR (straightness VSL/VAP; %), BCF (beat cross frequency; Hz)를 측정하였다(Fig. 1).

정자의 형태학적 분석

CASA system으로 촬영한 영상을 바탕으로 뱀장어 정자의 형

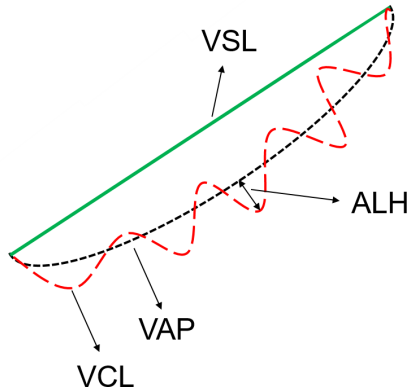


Fig. 1. Illustration showing CASA system of spermatozoa trajectory. CASA, Computer-assisted sperm analysis; VAP, Average path velocity; VSL, Straight line velocity; VCL, Curvilinear velocity; ALH, Amplitude of lateral head displacement.

태학적 분석을 하였다. 20개의 다른 정액을 Pmot 활성도를 기준으로 (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%의 4개의 그룹으로 5개씩 분류하여 활성별 형태학적 차이를 비교하였다. 각 프레임의 정자들을 정지상태(static) 개체들 및 활동적인(motile) 개체로 분류하여 그룹간(inter), 그룹내(intra)에 활성에 따른 형태적 차이를 관찰하였다. 정자 두부의 높이, 길이, 면적, 둘레를 측정하였고, 촬영한 5프레임 중 첫 번째 프레임에서 10개의 정자를 임의로 선택하여 총 30개체를 3번 반복하여 측정하였다.

정장액 내의 무기원소 조성 분석

뱀장어 정자의 무기원소 함량 분석을 위하여 Mot을 기준으로 (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100% 4그룹으

로 분류하였다. 정장액 내의 무기원소 함량은 원자흡광분석기 (Atomic absorption spectrometry) Nova 300 (Analytikjena, Germany)을 이용하여 분석하였고, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 철, 구리, 아연을 측정하였다.

뱀장어 인공정장액 제작

Ohta et al. (1997)가 보고한 뱀장어 인공정장액 조성(NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgCl₂ 1.6 mM, NaHCO₃ 20 mM, pH 8.2)을 바탕으로, 이번 연구에서 얻어진 활성 별 무기원소 조성 분석결과를 이용하여 주요 무기원소들의 농도조절에 따른 정자의 활성변화를 분석하였다. 뱀장어 인공정장액 내 주요 무기원소인 나트륨과 칼륨의 조성비를 다음의 표와 같이 조절하였다(Tables 1, Table 2). 정액과 인공정장액을 1:50 비율로 희석하여 50 mL tube에 보관하였으며, 4°C 냉장고에 보관하였다.

통계 분석

측정값은 평균±표준오차로 나타났다. 유의성 확인을 위하여 SPSS software ver. 18.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 One-way ANOVA test를 실시하였다. 등분산성 검정을 위해 Levene test를 실시하였다. 등분산이 가정되었을 때 Tukey HSD로 사후검정을 실시하였다. 등분산이 가정되지 않았을 때 Dunnett T3를 이용하여 사후 검정하였다(P<0.05).

결 과

뱀장어 정자의 활성 평가

정자의 운동속력을 측정한 결과는 Fig. 2과 같다. Mot 기준으로 활성이 낮은 A, B 그룹의 VAP는 42.8±6.1 μm/s, VSL은 30.8±5.3 μm/s, VCL은 104.0±14.1 μm/s으로 측정되었다. 활성이 높은 C, D 그룹에서 VAP 75.2±3.3 μm/s, VSL 59.8±3.4

Table 1. Regulation of Na⁺ in formula for eel's *Anguilla japonica* artificial seminal plasma

Group (mM)	Ion composition	pH
120	NaCl 120 mM, KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2
130	NaCl 130 mM, KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2
140	NaCl 140 mM, KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2
150	NaCl 150 mM, KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2

Table 2. Regulation of K⁺ in formula for eel's *Anguilla japonica* artificial seminal plasma

Group (mM)	Ion composition	pH
10	NaCl 120 mM, KCl 10 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2
20	NaCl 120 mM, KCl 20 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2
30	NaCl 120 mM, KCl 30 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2
40	NaCl 120 mM, KCl 40 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM	8.2

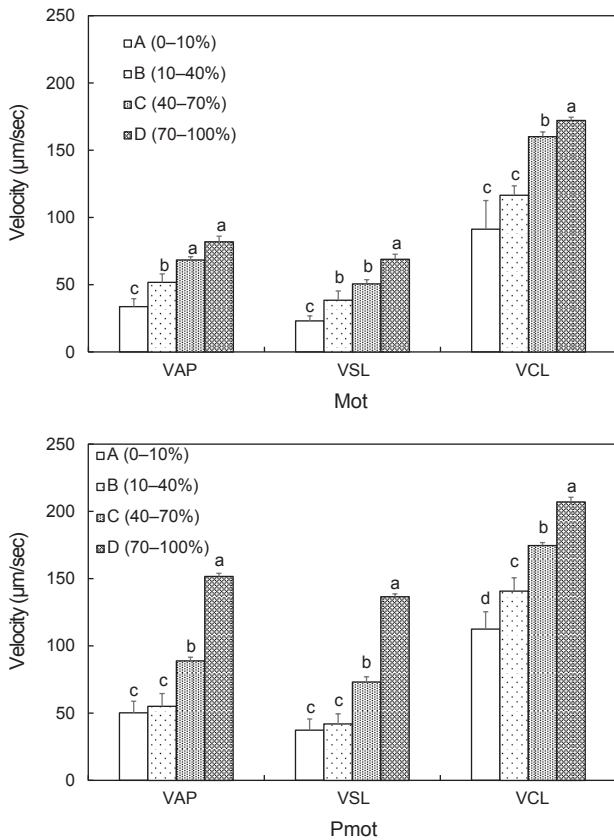


Fig. 2. Comparisons of velocity with motile and progressive motile of (A) 0–10%, (B) 10–40%, (C) 40–70% and (D) 70–100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicates significant. VAP, Average path velocity; VSL, Straight line velocity; VCL, Curvilinear velocity.

µm/s, VCL 166.1 ± 3.0 µm/s로 측정되었다. Pmot 기준으로 활성이 낮은 A, B 그룹의 VAP는 52.6 ± 9.1 µm/s, VSL 39.6 ± 7.9 µm/s, VCL 126.6 ± 11.4 µm/s로 측정되었고, 활성이 높은 C, D 그룹에서는 VAP 120.3 ± 2.5 µm/s, VSL 104.9 ± 3.0 µm/s, VCL 190.8 ± 2.8 µm/s로 Mot와 Pmot 기준 모든 그룹에서 활

성이 증가함에 따라 운동속력 인자(VAP, VSL, VCL)는 증가하는 경향이 보였다. 또한, 높은 활성으로 분류된 C그룹과 D 그룹이 모든 항목에서 유의하게 높게 측정되었고(P<0.05), Mot과 Pmot 둘 다 모든 그룹에서 VCL이 높은 속력을 나타냈다. 관측된 운동성 인자인 Mot와 Pmot의 활성별 속력을 분석하였을 때 Mot 기준의 그룹보다 Pmot를 기준으로 분류한 그룹이 높게 나타났다. 정자의 방향성 인자인 ALH, BCF, LIN, STR를 나타낸 결과는 Table 3과 같다. Mot 기준 그룹에서 ALH 값은 활성이 증가할수록 유의하게 증가하였으며(P<0.05), BCF, LIN, STR은 모든 그룹에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(P>0.05). Pmot 운동성 그룹에서 ALH은 활성이 가장 낮은 A 그룹에서 4.15 ± 0.32 µm로 가장 낮게 나타났고, 활성이 가장 높은 D그룹에서 5.40 ± 0.07 µm로 가장 높게 나타나 활성이 높아질수록 유의하게 증가하였다(P<0.05). LIN와 STR은 활성이 가장 높은 D그룹에서 64.36 ± 0.79%, 87.31 ± 0.43%로 가장 높았으며, ALH와 동일하게 활성이 높을수록 유의하게 증가하였다(P<0.05). 반면, BCF의 값은 활성이 가장 높은 D그룹에서 43.35 ± 0.74 Hz로 유의하게 가장 낮게 나타났고(P<0.05), 다른 방향성 인자(ALH, LIN, STR)들과 반대 경향이 보였다.

뱀장어 정자의 형태 변화

뱀장어 정자의 형태를 측정한 결과는 항목에 따라 Fig. 3, Fig. 4에서 나타냈다. 활성이 낮은 A, B그룹의 static 정자의 두부 높이는 3.77 ± 0.09 µm, 폭은 2.51 ± 0.05 µm, 둘레는 10.94 ± 0.20 µm, 넓이는 7.11 ± 0.26 µm²로 측정되었으며, motile 정자의 두부 높이는 4.37 ± 0.13 µm, 폭은 2.70 ± 0.08 µm, 둘레는 12.29 ± 0.33 µm, 넓이는 8.64 ± 0.47 µm²로 motile 정자에서 높은 값이 확인되었다. 활성이 높은 C, D그룹에서 static 정자의 높이는 3.93 ± 0.12 µm, 폭 2.60 ± 0.12 µm, 둘레 11.34 ± 0.36 µm, 넓이 7.69 ± 0.57 µm²로 측정되었으며, motile 정자의 두부 높이 4.57 ± 0.19 µm, 폭 2.90 ± 0.10 µm, 둘레 12.83 ± 0.60 µm, 넓이 9.62 ± 0.90 µm²로 static 정자보다 모두 유의하게 높았다(P<0.05). Motile 정자가 static 정자보다 높이, 폭, 둘레 넓이의 형태적으로 모두 유의하게 높았으며(P<0.05), 활성이 증가할수록 정자 두부의 크기가 증가하였다.

Table 3. Motility characteristics of spermatozoa from (A) 0–10%, (B) 10–40%, (C) 40–70% and (D) 70–100% Japanese eel *Anguilla japonica* evaluated with the IVOS II

	MOT				Pmot			
	A	B	C	D	A	B	C	D
ALH (µm)	4.03±0.27 ^c	4.25±0.22 ^c	5.07±0.09 ^b	5.44±0.14 ^a	4.15±0.32 ^c	4.87±0.18 ^{bc}	5.22±0.06 ^{ab}	5.40±0.07 ^a
BCF (Hz)	67.3±11.85	54.88±5.16	73.20±9.05	56.19±3.73	55.12±5.21 ^a	64.44±5.11 ^a	55.60±4.20 ^a	43.35±0.74 ^b
LIN (%)	36.68±4.31	40.42±4	34.86±2.18	41.96±3.30	41.06±3.97 ^b	35.30±1.92 ^b	44.51±2.88 ^b	64.36±0.79 ^a
STR (%)	67.96±3.44	69.89±3.32	66.4±2.69	71.84±1.75	70.37±3.30 ^d	67.34±2.41 ^{bd}	75.53±1.82 ^{cd}	87.31±0.43 ^a

IVOS, Integrated visual optical system; ALH, Amplitude of lateral head displacement; BCF, Beat cross frequency; LIN, Linearity VSL/VCL; STR, Straightness VSL/VAP.

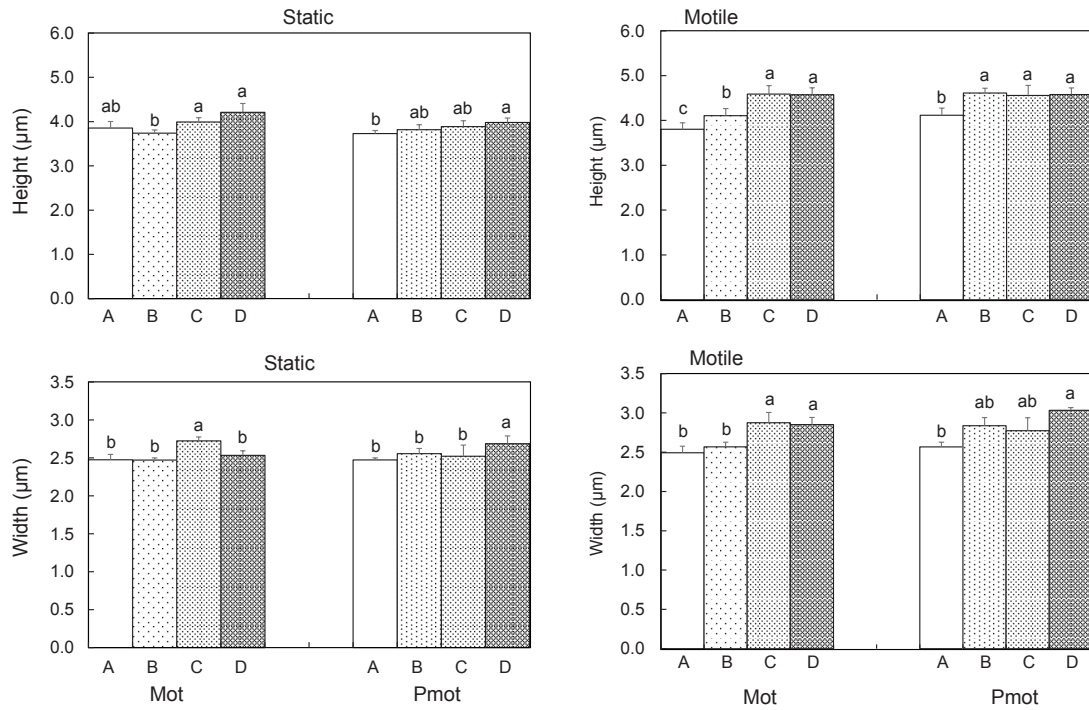


Fig. 3. Comparisons of spermatozoa head and width with motile and progressive motile of (A) 0–10%, (B) 10–40%, (C) 40–70% and (D) 70–100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicates significant ($P < 0.05$). Mot, Motility; Pmot, Progressive motility.

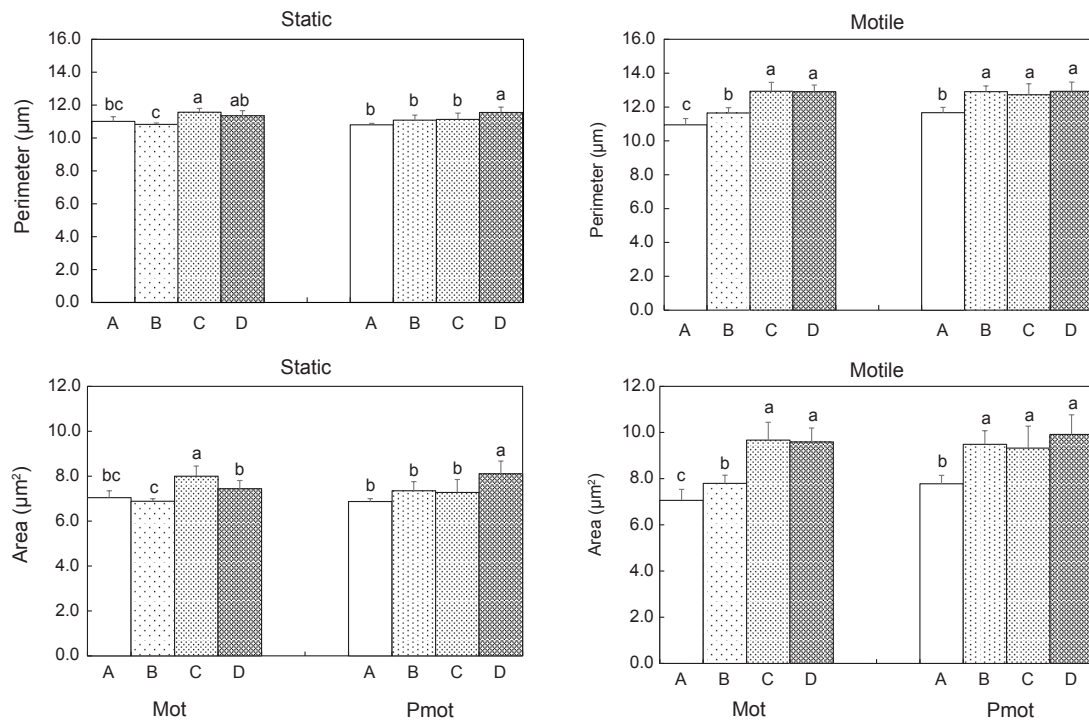


Fig. 4. Comparisons of spermatozoa perimeter and area with motile and progressive motile of (A) 0–10%, (B) 10–40%, (C) 40–70% and (D) 70–100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicates significant ($P < 0.05$).

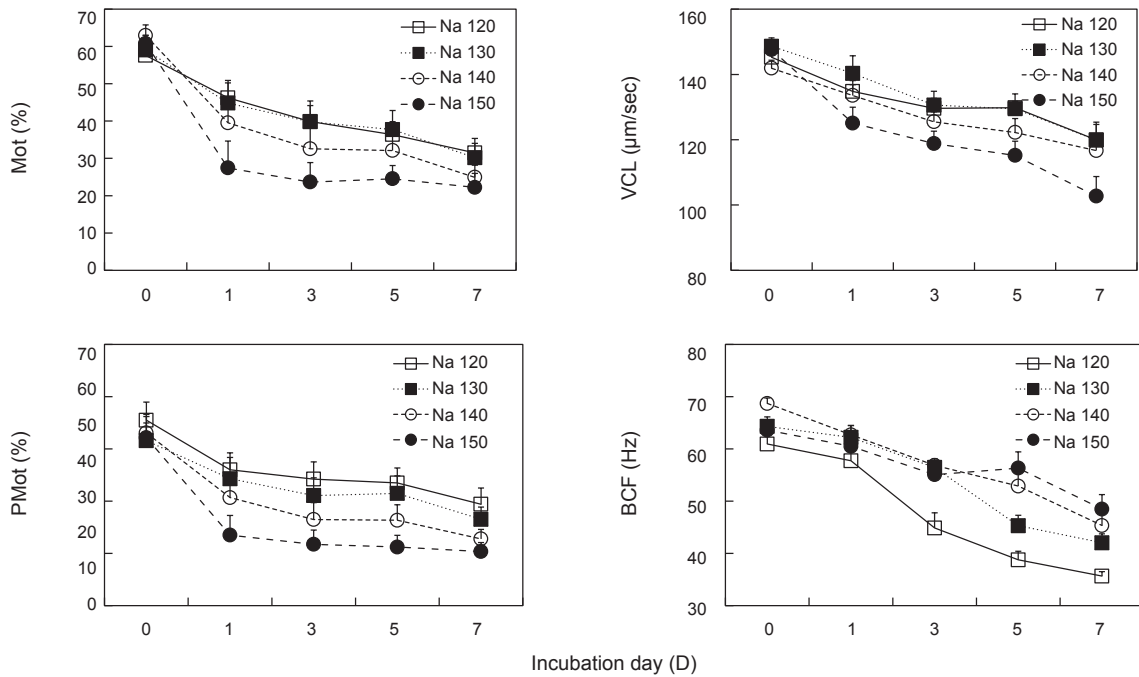


Fig. 5. Effects of variations in concentration of Na⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days. Mot, Motility; Pmot, Progressive motility; VCL, Curvilinear velocity; BCF, Beat cross frequency.

뱀장어 정장액의 무기원소 조성

활성별 정장액 내의 무기원소 조성차이를 나타낸 결과는 Table 4과 같다. 활성별로 나트륨 함량은 140–154.9 mM이었으며, 칼륨 함량은 12.6–18.8 mM으로 나타났다. 하지만 두 원소에서 정자의 활성별로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (P>0.05). 활성이 높은 D그룹에서 마그네슘은 미검출 되었고, 활성이 가장 낮은 A그룹에서 3.6 ± 1.5 mM으로 유의하게 높았으며 (P<0.05), 활성이 높아질수록 감소하였다. 활성이 높은 D

그룹에서 칼슘은 9.5 ± 0.3 mM으로 높게 나타났으며, 활성이 가장 낮은 A그룹에서 4.9 ± 0.6 mM으로 유의하게 낮게 나타내며 (P<0.05), 활성이 높아질수록 증가하였다. D그룹에서 철은 21.7 ± 1.1 mM으로 높게 나타났으며, 활성이 가장 낮은 A그룹에서 6.3 ± 1.1 mM로 유의하게 낮았고 (P<0.05), 활성이 높아질수록 증가하였다. A그룹에서 구리는 0.34 ± 0.04 mM으로 높게 나타났으며, 활성이 가장 높은 D그룹에서 0.06 ± 0.01 mM으로 유의하게 낮았고 (P<0.05), 활성이 높아질수록 감소하였다. 아연은 모든 실험구에서 검출되지 않았다.

인공정장액 내 무기원소 조성에 따른 정자활성 변화

인공정장액 내 나트륨의 농도를 조절한 후 활성변화를 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. Mot 값은 낮은 농도인 나트륨 120 mM에서 점차 감소하였고, 7일차에 31.5 ± 3.9%로 가장 높게 나타났다. 높은 농도인 150 mM에서는 1일차에 활성이 급격하게 감소하였고, 7일차에 22.2 ± 3.8%로 낮은 값이 나타났다. Pmot 또한 가장 낮은 농도인 120 mM에서 점차 감소하였으며, 7일차에 19.4 ± 3.1%로 높았다. 150 mM에서는 0일차 32.2 ± 2.8%에서 1일차 13.5 ± 3.8%로 급격하게 감소하였고, 7일차에 10.4 ± 1.7%로 유의하게 낮게 나타났다 (P<0.05). 운동속력인 VCL은 모든 조건에서 점차 감소하는 경향이 보였으나 가장 낮은 농도인 120 mM에서 7일차에 120.0 ± 4.8 μm/s로 유의하게 높았다 (P<0.05).

진동수를 나타내는 BCF는 120 mM에서는 0일차에 60.9 ± 1.9

Table 4. Ionic composition of Japanese eel *Anguilla japonica* seminal plasma in relation with sperm motile categories, (Group A) 0–10%, (Group B) 10–40%, (Group C) 40–70% and (Group D) 70–100%.

	Group A (mM)	Group B (mM)	Group C (mM)	Group D (mM)
Na	154.9±12.3	140±5.8	146.2±8.3	151.4±3.3
K	12.6±2.6	14.4±2.7	18.8±1	18.2±2.2
Mg	3.6±1.5 ^a	1.2±0.5 ^{ab}	0.6±0.4 ^{ab}	N.D
Ca	4.9±0.6 ^b	6.2±1 ^{ab}	8.1±0.3 ^a	9.5±0.3 ^a
Fe	6.3±1.1 ^b	9.8±1.4 ^b	17.1±1.4 ^a	21.7±1.1 ^a
Cu	0.34±0.04 ^a	0.18±0.03 ^b	0.09±0.01 ^{bc}	0.06±0.01 ^c
Zn	ND	ND	ND	ND

ND, Not detected.

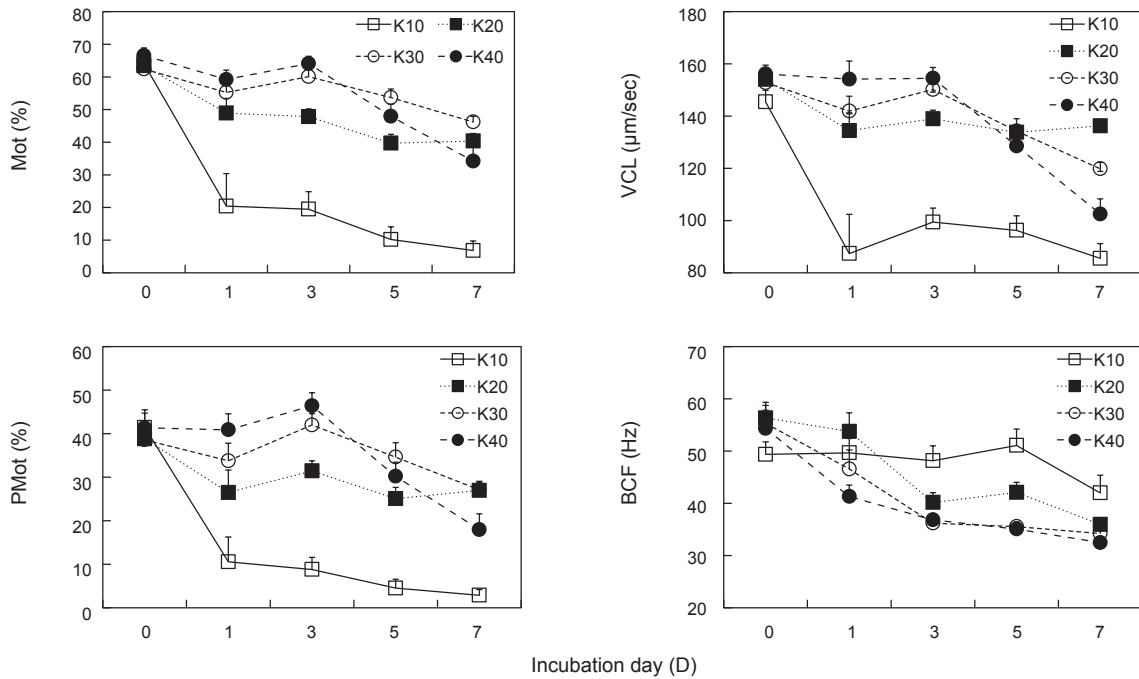


Fig. 6. Effects of variations in concentration of K⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days. Mot, Motility; Pmot, Progressive motility; VCL, Curvilinear velocity; BCF, Beat cross frequency.

Hz로 나타났고 7일차 35.6 ± 0.9 Hz로 감소하였다. 150 mM에서 0일차에 63.6 ± 1.6 Hz에서 7일차에 48.9 ± 2.8 Hz로 점차 감소하며 유의하게 낮았다(P<0.05).

인공정장액 내 칼륨 조성의 영향을 나타난 결과는 Fig. 6과 같다. Mot는 가장 농도인 10 mM에서 1일차에 급격히 감소하였고 7일차에 6.8 ± 2.7%로 모든 농도에서 유의하게 낮게 나타났었다(P<0.05). 그 이외의 농도들은 유사한 변화가 관측되었지만, 30 mM에서 7일차에 46.2 ± 1.8%로 높았다. Pmot 또한 가장 낮은 농도 10 mM에서 1일차에 급격하게 감소하였고 7일차에 2.9 ± 1.3%로 모든 농도에서 유의하게 낮았다(P<0.05). 40 mM에서 3일차 46.4 ± 3.0%로 측정되었으며, 30 mM에서 7일차 27.1 ± 1.8%로 높았다. 운동속력인 VCL은 모든 농도에서 감소하는 경향을 나타냈으나 10 mM에서 1일차 급격하게 감소하여 7일차에 85.5 ± 5.7 μm/s로 유의하게 낮았다(P<0.05). 방향인자인 BCF은 낮은 농도인 10 mM에서 0일차 49.4 ± 2.4 Hz에서 7일차 42.0 ± 3.4 Hz로 큰 차이를 보이지 않았고, 높은 농도인 30 mM과 40 mM에서 점차 감소하여 7일차에 34.2 ± 0.5 Hz, 32.5 ± 0.8 Hz로 유의하게 낮았다(P<0.05).

고 찰

본 연구에서는 CASA system을 이용하여 뱀장어 우량 수정란 생산에 있어 필수적인 운동성 배우자인 정자의 형태적 특성과 정액을 구성하는 정장액 내의 주요 조성 무기질들의 함량 변화

를 관찰하였다. 이러한 특성에 기반하여 활성유지에 적합하도록 인공정장액의 무기질 조성을 조절하여 활용성을 개선한 새로운 뱀장어 인공정장액의 조성비를 제시하고자 하였다.

CASA system을 통하여 산출되는 활성표지 인자(parameter)인 motility (Mot)와 progressive motility (Pmot) 운동성 기준으로 뱀장어 정자의 활성 차이를 비교한 결과, Mot 보다 Pmot를 기준으로 하였을 때 주요 운동속력인자들인 VAP, VSL, VCL이 활성변화에 따라 유의적인 차이가 나타났고(P<0.05), 평균 운동속력도 Mot를 기준으로 했을 때에 비해 25–75 μm/s 빠르게 나타났다. 또한, 모든 속력인자들의 값은 정자의 활성이 증가함에 따라 증가하였다. 이와 유사하게, 담수어인 잉어(*C. carpio*; Lahnsteiner et al., 1998) 및 무지개송어(*O. mykiss*; Linhart et al., 2000), 해수어인 spotted wolffish *Anarhichas minor* (Kime and Tveiten, 2002) 등에서도 정자의 운동속력이 높을수록 수정률이 증가한다는 보고가 있다. 해수어들의 정자는 낮은 평균 운동속력을 나타낸다고 알려져 있고 대구의 경우 평균 75 μm/s의 운동 속력이 보이나, 순간적으로 1,000 μm/s 이상의 속력을 나타내기도 한다고 보고된 바 있다(Trippel and Neilson, 1992). Spotted wolffish의 경우 VCL 40–50 μm/s, VSL 4–14 μm/s, VAP 13–20 μm/s로 낮은 운동 속력을 나타낸다고 보고되었으며(Kime and Tveiten, 2002), 대서양 연어(*Salmo salar*)는 약 VCL 178.4 μm/s, VSL 114.8 μm/s의 운동속력을 나타낸다고 보고된 바 있다(Dziewulska et al., 2011). 이번 연구에서 뱀장어 정자의 운동속력 인자인 VCL에서 모든 활성별로 가장

높은 값이 보였고, Pmot를 기준으로 가장 활성이 높은 그룹에서는 200 $\mu\text{m/s}$ 이상의 속력이 나타났다. 이상의 결과로 생각하면 뱀장어 정자의 운동속력은 보고되어진 해수어 정자들의 평균 VCL보다 높게 나타나, 뱀장어 종 특이적인 번식전략이 있을 것으로 추정되어진다.

어류 정자의 실제이동경로와 평균이동경로와의 측방거리차인 측두거리를 나타내는 ALH값 및 정자의 운동 시 선형도를 나타내는 LIN과 STR값이 수정에 미치는 영향은 구체적으로 알려진 바가 없으나, 무지개송어의 ALH 값은 9.6 μm , 대서양연어에서는 5.7 μm , 대서양대구(*Gadus morhua*)는 7.3–9.1 μm 로 보고된 바 있으며(Tuset et al., 2008a; Dziewulska et al., 2011; Judycka et al., 2016), 대서양 대구에서는 정자의 활성이 높아질수록 LIN 값이 71.7–91.6% 증가한다는 보고되어졌다(Tuset et al., 2008a). 한편, 정자의 STR과 LIN 값이 높을수록 정자가 직선형 운동을 하는 것으로 보고되어져 있고, Felip et al. (2009)에 따르면 정자의 진동수는 수정과 관련이 있는 인자라고 언급하였다. 이번 연구에서 뱀장어의 정자는 활성이 높은 그룹에서 ALH 5.0 μm 이상 나타났으며, LIN은 45%, STR은 75% 이상으로 측정됐다. 이를 종합하면, 극동산뱀장어의 정자는 활성이 증가할수록 직선의 운동 방향성을 갖는 것으로 추정되며, 높은 활성에서는 진동수인 BCF가 50 Hz 이하로 측정되어 정자의 활성이 증가할수록 진동수는 감소하는 것으로 나타났다.

대부분의 경골어류들은 정자에 침체가 존재하지 않는 것으로 알려져 있으며, 다양한 수중환경에 적응하여 진화해왔기 때문에 종에 따라 정자두부(head)의 모양이 다양하다(Billard and Cosson, 1992). 또한, 정자형태의 기형은 정자의 활성과 수정에 영향을 끼친다고 보고가 되어있다(Rurangwa et al., 2004). Penaranda et al. (2010)에 따르면 유럽산 뱀장어(*Anguilla Anguilla*)에서는 정자의 활성이 감소할수록 정자 두부의 둘레와 면적이 감소한다고 하였으며, 포유류인 염소에서도 활성이 없는 정자의 크기가 활발한 정자보다 상대적으로 작다고 보고되어졌다(Hidalgo et al., 2006). 또한, 대서양대구와 무지개송어에서는 정자의 크기가 클수록 높은 함량의 ATP를 가지고 있어 정자의 운동속력이 증가한다고 보고되어졌다(Tuset et al., 2008a, 2008b). 이번 연구 결과에서는 정자의 활성이 감소할수록 정자의 두부의 폭, 높이, 면적, 둘레 또한 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 정자의 활성과 운동 속력에 정자의 두부크기가 미치는 것으로 생각된다.

정장액은 정자 보존에 있어 최적의 환경을 만들어주며, 정자의 생존율과 활성을 유지시켜주는 역할을 한다(Ohta and Izawa, 1996; Bozhurt et al., 2008). 또한, 정자의 기능에 영향을 주는 다양한 물질을 포함하고 있고, 그 중 무기원소는 정자의 활성에 중요한 역할을 가지고 있다(Rurangwa et al., 2004). 정장액의 무기원소 조성은 어류에 따라 다양하게 나타난다. 해수어인 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) 정장액

에는 나트륨 177.0 ± 3.0 mM, 칼륨 4.6 ± 0.1 mM, 마그네슘 0.3 ± 0.1 mM, 칼슘 1.3 ± 0.3 mM (Jeong and Chang, 2011)이 조성되어 있으며, 말쥐치(*Thamnaconus modestus*)는 나트륨 164.0 ± 4.0 mM, 칼륨 9.8 ± 0.9 mM, 마그네슘 7.2 ± 0.1 mM, 칼슘 14.9 ± 0.6 mM (Le et al., 2007)으로 나타났다. 극동산 뱀장어에서도 나트륨 149.3 ± 3.2 mM, 칼륨 15.2 ± 0.8 mM, 칼슘 1.3 ± 0.1 mM, 마그네슘 1.6 ± 0.3 mM로 정장액 내 무기원소 조성이 보고되어 졌으며(Ohta et al., 1997), 본 연구에서 분석한 활성그룹 C에서 나타난 조성과 유사한 결과였다. 이번 연구에서 비교적 높은 활성을 보인 D그룹의 조성(나트륨 151.4 ± 3.3 mM, 칼륨 18.2 ± 2.2 mM, 마그네슘 미검출, 칼슘 9.5 ± 0.3 mM)과 차이가 관찰되었다. Asturiano et al. (2004)에 따르면, 유럽산 뱀장어에서는 정장액 내 칼륨의 농도가 높아질수록 정자의 활성이 높게 나타나고, 마그네슘과 칼슘은 감소하는 경향이 나타난다고 하였다. 본 연구의 극동산 뱀장어에서는 정자의 활성별 조성에서 칼륨의 농도는 유의한 차이를 나타내지 않았지만($P < 0.05$), 활성이 높아질수록 칼륨 이온도 증가하는 경향을 보였다. Ohta et al. (2001)에 따르면, 칼륨 이온이 높을수록 활성이 증가하는 것을 확인하여 본 연구와 동일하였다. 따라서 칼륨이 뱀장어 정자의 활성을 조절하는데 있어 매우 중요함을 시사하는 결과이며 극동산 뱀장어와 유럽산 뱀장어에서 공통적으로 나타나는 현상으로 추정된다. 한편, 이번 연구에서 유럽산 뱀장어와 같이 정자 활성이 증가할수록 마그네슘 이온이 감소하는 경향을 보였으나, 반대로 칼륨의 농도는 유의적으로 증가하는 경향을 나타내($P < 0.05$), 뱀장어 종(species) 간의 조성차이가 나타났다. Wojtezak et al. (2007)의 보고에 따르면, 잉어에서 정장액 내 철 이온은 트랜스페린(transferrin)과 함께 분비되며, 정자의 활성과 관련이 있다고 하였다. 이번 연구에서도 정자의 활성이 증가할수록 철의 이온이 유의적으로 증가하였다($P > 0.05$). 추후, 트랜스페린과 뱀장어 정자 활성 사이의 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 정장액 내의 구리 이온에 대한 역할은 보고된 바가 없지만, 뱀장어에서는 정자의 활성이 높을수록 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 또한, 대부분 포유동물의 정장에 존재하는 아연의 경우(Hidiroglou, 1984), 이번 연구에서는 어떤 활성그룹에서도 검출되지 않아 뱀장어에서 아연의 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

이번 연구에서 뱀장어 정장액 내 나트륨은 정자 활성에 따라 유의한 차이가 관찰되지 않았지만, Asturiano et al. (2004)의 연구와 같이 인공정장액 내 나트륨 조성이 낮을 때 1주일간 정자의 운동속력과 활성이 높게 유지되며 보존이 되었으며, 기존에 보고되어진 Ohta and Izawa (1996)의 인공정장액 나트륨 농도(149.3 mM)와는 다른 120 mM이 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 한편, 이번 연구를 통하여 인공정장액 칼륨 농도는 단기(3일) 보존 시에는 칼륨 40 mM, 장기(7일) 보존 시에는 칼륨 30 mM로 보존 기간에 따라 칼륨 농도가 감소하는 것이 효과적인 것으로 나타났다. 하지만, Ohta and Izawa (1996)에서는 7일

보존에는 칼륨 15–45 mM, 28일 보존에는 칼륨 45–75 mM로 높은 농도가 좋다는 결과를 보고한 바 있다. 이러한 차이는 기존의 연구에서는 정자 활성 평가 기준으로 운동성만을 평가의 기준으로 사용하였고, 그 외의 인자인 운동속력 등은 고려하지 못하였기 때문으로 추측된다.

이번 연구 결과를 종합하여 보면, 극동산 뱀장어 정자의 활성화에 관련된 유의한 인자는 VCL의 속도, 정자의 진동수(Hz), 정자 두부 크기 등으로 나타났으며, 인공정장액 제작 시 단기(3일) 보존에는 나트륨 120 mM, 칼륨 40 mM이, 장기(7일) 보존에는 나트륨 120 mM, 칼륨 30 mM이 효과적인 것으로 생각된다. 따라서, 이번 연구의 결과, 뱀장어 정자 활성화에 따른 정자의 형태와 정장액 무기원소 특성을 확인하여 최적의 인공정장액을 조성하기 위한 기반 정보를 제공하였으며, 인공정장액 개선을 통하여 뱀장어 정자 질 향상을 통한 우량 수정란 생산기술개발에 기여하고자 하였다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원의 2023년도 수산과학연구사업인 “실뱀장어 대량생산 산업화 기반 연구(R2023026)”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Asturiano JF, Perez L, Garzon DL, Marco-Jimenez F, Penaranda DS, Vicente JS and Jover M. 2004. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiol Biochem* 30, 283-293. <https://doi.org/10.1007/s10695-005-1553-x>.

Billard R and Cosson J. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater. *J Exp Zool* 261, 122-131. <https://doi.org/10.1002/jez.1402610203>.

Bozkurt Y, Ogretmen F, Ercin U and Yldz U. 2008. Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) semen: With emphasis on sperm motility. *Aquac Res* 39, 1666-1672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02041.x>.

Bozkurt Y, Ogretmen F and Ercin U. 2011. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: With emphasis on sperm motility. *Czech J Anim Sci* 56, 355-364.

Cejko BI, Horvath A, Kollar T, Kasa E, Lujic J, Marinovic Z, Urbanyi B and Kowalski RK. 2018. Optimisation of sodium and potassium concentrations and pH in the artificial seminal plasma of common carp *Cyprinus carpio* L. *Fish Physiol Biochem* 44, 1435-1442. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0491-3>.

Dziewulska K, Rzemieniecki A and Domagala J. 2011. Sperm motility characteristics of wild Atlantic salmon (*salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) as a basis for milt selection. *J Appl Ichthyol* 27, 1047-1051. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01759.x>.

Hidiroglou M. 1984. Zinc in mammalian sperm: A review. *J Dairy Sci* 67, 1147-1156. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81416-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81416-2).

Hidalgo M, Rodriguez I and Dorado J. 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the sperm class analyzer. *Theriogenology* 66, 996-1003. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.039>.

Jeong MH and Chang YJ. 2011. Properties of semen and sperm motility of black porgy *Acanthopagrus schlegelii* acclimated in freshwater. *Dev Rep* 15, 151-158.

Jeong MH, Min BH, Park MS and Myeong JI. 2014. Cryopreservation of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer* sperm. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 39-44. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0039>.

Judycka S, Cejko BI, Dryl K, Dobosz S, Grudniewska J and Kowalski RK. 2016. The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. *Aquaculture* 465, 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.029>.

Kagawa H, Iinuma N, Tanaka H, Ohta H and Okuzawa K. 1998. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 64, 77-82. <https://doi.org/10.2331/fishsci.64.77>.

Kime DE and Tveiten HT. 2002. Unusual motility characteristics of sperm the spotted wolffish. *J Fish Biol* 61, 1549-1559. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02497.x>.

Kobayashi T, Fushiki S and Ueno K. 2004. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. *Environment Biol Fish* 69, 419-425.

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T and Patzner RA. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 163, 163-181. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00243-9).

Le MH, Lim HK, Min BH, Kim SY and Chang YJ. 2007. Milt properties and spermatozoa structure of filefish *Thamnaconus modestus*. *Devel Reprod* 11, 227-233.

Linhardt 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>.

Moriswa M. 1983. Effects of somolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Biol* 107, 95-103. <https://doi.org/10.1242/jeb.107.1.95>.

Morisawa M. 2008. Adaptation and strategy for fertilization

- in the sperm of teleost fish. *J Appl Ichthyol* 24, 362-370. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01126.x>.
- 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, 5774-5778. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5774>.
- Miura A, Nomura K, Imaizumi H, Jinbo T, Masuda Y, Tanaka H and Ohta H. 2013. Administration of 17 α -hydroxyprogesterone into mature male Japanese eel reduces sperm motility by decreasing potassium ion concentrations in the seminal plasma. *Aquaculture* 414-415, 217-223. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.011>.
- Ohta H and Izawa T. 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142, 107-118. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01246-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01246-X).
- 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. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01167-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01167-6).
- Ohta H, Ikeda K and Izawa T. 1997. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promoted acquisition of motility *in vitro* by Japanese eel spermatozoa. *J Exp Zool* 277, 171-180. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19970201\)277:2%3C171::AID-JEZ9%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19970201)277:2%3C171::AID-JEZ9%3E3.0.CO;2-M).
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H and Unuma T. 2001. Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture* 198, 339-351. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00597-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00597-4).
- Penaranda DS, Perez L, Gallego V, Barrera R, Jover M and Asturiano JF. 2010. European eel sperm diluent for short-term storage. *Reprod Domest Anim* 45, 407-415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01206.x>.
- 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>.
- Sa SJ, Kim MJ, Cho KH, Kim DW, So KM, Chung KH, Son JH and Kim IC. 2011. Effect of storage in different commercial semen extenders on the motility, viability and fertility *in vitro* of boar spermatozoa. *Reprod Dev Biol* 35, 203-207.
- Takai H and Morisawa M. 1995. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J Cell Sci* 108, 1175-1181. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.3.1175>.
- Trippel EA and Neilson JD. 1992. Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Can J Fish Aquat Sci* 49, 2118-2127. <https://doi.org/10.1139/f92-235>.
- Tuset VM, Trippel EA and Monserrat J. 2008a. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J Appl Ichthyol* 24, 398-405. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01125.x>.
- Tuset VM, Dietrich GJ, Wojtczak M, Slowinska M, Monserrat J and Ciereszko A. 2008b. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *J Appl Ichthyol* 24, 393-397. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01145.x>.
- Wojtczak M, Dietrich GJ, Imazarow I, Jurecka P, Slowinska M and Ciereszko A. 2007. Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 148, 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.011>.
- Yamamoto K, Hiroi O and Morioka T. 1972. Artificial maturation of cultivated male Japanese eels by synahorin injection. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 38, 1083-1090. <https://doi.org/10.2331/suisan.38.1083>.