

澳洲鳕鲈(*Maccullochella peelii peelii*)全人工繁殖技术研究*

刘美剑¹ 赵子明¹ 刘明² 陈苏南¹ 郑翔隆¹ 林阿朋¹ 宫庆礼²

(1. 江苏农牧科技职业学院 泰州 225300; 2. 中国海洋大学 青岛 266003)

摘要 澳洲鳕鲈(*Maccullochella peelii peelii*)为澳大利亚国宴用鱼,已引入国内开始工厂化养殖,但人工繁殖还有若干问题未解决。为实现其全人工繁殖,本研究就澳洲鳕鲈精卵同步、精子存活时间延长、选取室内工厂化养殖培育的个体作为亲本进行繁殖等人工繁殖过程中关键步骤进行了研究。结果表明精子样本常温保存 6h 后精子动性降低,存活时间显著缩短,96h 后未发现游动精子。添加 2.5%葡萄糖或 1.25%葡萄糖+2.25%氯化钠激活精子动性升高,存活时间得以延长,提示葡萄糖可能能够充当外源性能量来源,显著增强精子活力、提高繁殖效率。实验选取 6—8 龄室内工厂化养殖澳洲鳕鲈作为繁殖亲本,运用该方法最终获得 50 万尾鱼苗,证明了用室内工厂化养殖的个体作为亲本进行人工繁殖是可以满足工厂化养殖苗种需求的。

关键词 澳洲鳕鲈; 人工繁殖; 亲本; 精子动性; 存活时间; 葡萄糖

中图分类号 S961.2; S965 **doi:** 10.11693/hyhz20191100214

澳洲鳕鲈(*Maccullochella peelii peelii*)又称墨瑞鳕或澳洲虫纹斑,属暖水性鱼类(Lake, 1971),主要分布于澳大利亚墨瑞-达令河流域,是澳大利亚土著鱼类,素有澳大利亚国宝鱼之称。澳洲鳕鲈体型较大,野生捕获最大个体体重可达 113.6kg (Noble, 1955),寿命可达 48 年(Lintermans, 2007; Koehn *et al.*, 2012)。由于栖息环境恶化、迁徙受阻、水质恶化、非法捕捞等诸多因素(Koehn, 2004; Rowland, 2004; Koehn *et al.*, 2012),澳洲鳕鲈原产地野生资源量急剧减少,现已被列为渐危种(Brazil *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2007)。澳大利亚政府采取了一系列措施,如全国范围内禁止商业捕捞、开展增殖放流活动等(Lintermans *et al.*, 2004)。澳洲鳕鲈人工繁殖研究始于 1903 年(Dannevig, 1903),Rowland 于 1985 年初步实现了采用野生亲本土池自产方式进行人工繁殖(Rowland, 1985)。

澳洲鳕鲈繁殖具有明显的周年周期特征,雌鱼约 6 龄性成熟、雄鱼 3—4 龄性成熟(Gooley *et al.*,

1995)。每年春季至初夏穆瑞河水温达到 20°C 时开始产卵(Rowland, 1998),产卵前澳洲鳕鲈能够逆流而上 120km (Koehn *et al.*, 2009),产卵时一般成对出现,卵具黏性,需附着于硬基质上。人工育苗土池中水温同样需达到 20°C 澳洲鳕鲈才能产卵,需在水中放置管道或者空心原木等供卵子附着(Lake, 1967; Rowland, 1988; Lintermans, 2007)。据报道,澳大利亚相关专家 40 年来通过此种方式获得的种苗量不超过 1300 万尾(Forbes *et al.*, 2015)。因此,这种人工繁殖方式,亲本来源受限,且效率低下。

澳洲鳕鲈已经成为澳大利亚国宴用鱼(廖静, 2019),其含肉率高、无脊间刺、味道鲜美,富含四种呈味氨基酸、EPA 和 DHA 等营养物质(Gunasekera *et al.*, 1999; 宋理平等, 2013)。此外,澳洲鳕鲈形似鳕鱼,口感和鲜度比鳕鱼更好,其大型个体可替代三文鱼供应鱼片,契合我国人民对鱼类消费升级的需求(Abery *et al.*, 2005)。在 2001 年引入国内进行人工养

* 江苏省三新工程资助项目, Y2017-42 号; 农业部 948 资助项目, 2016-X27 号; 江苏农牧科技职业学院大学生创新项目, 201912806027Y 号。刘美剑, 硕士, 讲师, E-mail: 2013020238@jsahvc.edu.cn

通信作者: 林阿朋, 博士, 副研究员, E-mail: 2018010382@jsahvc.edu.cn; 宫庆礼, 教授, E-mail: qingli@vip.sina.com

收稿日期: 2019-11-13, 收修改稿日期: 2019-12-30

殖后, 受到市场青睐, 但养殖产量较低, 年产只有约 20t, 其原因主要是人工繁殖效率低下。刘怡(2014)曾报道在广东利用全人工繁育技术获得 6 万多尾 4—10cm 种苗, 但这对于人工养殖来说还远远不够。繁殖效率低、获得种苗数量少, 一方面是由于澳洲鳕鲈本身繁殖力不高(Rowland, 1985), 更重要的是人工繁殖过程中诸多问题如精卵同步、精子入卵时间的确定、授精时最佳精卵比例、受精成功与否的判别等, 还有待深入研究。

通过常规按压取精方法采集澳洲鳕鲈精液后, 多数精子即被激活, 且活性降低较快, 导致人工授精精卵难以同步, 极大地影响后期孵化率(Billard *et al.*, 1992; Daly *et al.*, 2008); 精子质量直接影响能否成功入卵完成受精(Legendre *et al.*, 1980; Stoss *et al.*, 1981); 卵子受精成功与否还缺乏明确、具体的衡量指标。这一系列的问题都需要进一步研究、探索。本研究主要针对澳洲鳕鲈全人工繁殖过程中精卵同步、精子活力延长等关键环节进行了研究, 通过 94 对、188 尾室内工厂化养殖亲鱼, 经过 2 个月的培育, 获得 52.3 万尾鱼苗, 证明了用室内工厂化养殖的个体作为亲本进行人工繁殖是可以满足工厂化养殖苗种需求的。

1 材料与方法

1.1 亲本与精液收集、精液动性分析

澳洲鳕鲈亲本取自青岛七好饲料科技有限公司室内工厂化养殖基地。在 3 月下旬至 4 月初的繁殖季节, 选取体表无外伤、发育良好的 6—8 龄澳洲鳕鲈亲本, 其中雌、雄鱼各 94 尾(体重 5.2—11.3kg, 体长 42—75cm)。用丁香酚麻醉后, HCG 催产, 雄鱼 1000IU/kg, 雌鱼剂量减半(Rowland, 1988), 48h 后, 将鱼腹部朝上倒放在产卵架上, 擦干鱼体表面, 将近生殖孔处水排除, 通过按压取精、卵。收集精液样本时, 为避免采集过程中尿液污染可能对后续实验数据带来的潜在影响(Billard *et al.*, 1992), 取精时直接用预装有 4mL 人工精浆(ASP)的 5mL 不带针头注射器吸取 1mL 精液。将所取样品混匀后取 0.1mL 混合液用 2mL 蒸馏水激活(Rowland, 1988), 用 CASA 精子分析软件检测精子动性, 低于 90% 的样本丢弃, 收集三个以上动性超过 90% 的样品并将其混匀, 常温 [(19.5±0.5)°C] 放置备用。动性分析时取 ASP-精液混合液 0.1mL, 用 2mL 蒸馏水或实验设置所需激活液稀

释激活, 读数、记录。操作时间 15—20s, 每组实验重复三次。

1.2 溶液配置

据 Ohta 等(1998)配置 ASP 溶液 1L (NaCl 55mmol/L, KCl 82.4mmol/L, CaCl₂ 2.0mmol/L, MgCl₂ 0.8mmol/L, NaHCO₃ 20mmol/L, TAPS 20mmol/L), 调节 pH 至 8.0。为避免细菌影响实验结果, ASP 溶液中额外加入青霉素 1000IU/L、硫酸链霉素 0.1g/L (Oplinger *et al.*, 2015), 溶液放置 4°C 冰箱备用, 使用前先将溶液平衡至常温。所用试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 方法

评估常温下保存时间对精子初始动性的影响: 0h、6h、12h、24h、48h、96h 六个不同时间点取样用蒸馏水激活, 记录精子初始(激活后 20s 时)动性。

分析其动性及存活时间变化规律, 设置了: 0h、6h、12h、24h 四个不同时间点取样, 分别每隔 20s 记录其动性变化。

评估添加葡萄糖作为激活剂对精子动性的影响, 设置了蒸馏水、1.25%、2.50%、5.00%葡萄糖溶液(分别记为 DW、G1、G2、G3)作为激活剂, 记录 20s 动性, 然后每隔 1min 记录一次; 不同浓度葡萄糖-氯化钠混合液作为激活剂激活精子, 葡萄糖注射液与生理盐水等体积混合, 再进行梯度稀释, 分别设置了蒸馏水、0.625%葡萄糖+1.125%氯化钠、1.25%葡萄糖+2.25%氯化钠、2.50%葡萄糖+4.50%氯化钠四种激活剂(分别记为 DW、G1-SC、G2-SC、G3-SC), 激活 20s 记录动性, 然后每隔 1min 记录一次。

1.4 数据分析

实验数据用“平均值±标准误”表示($n=3$), 数据采用 SPSS 23.0 软件进行样本检验分析, 并进行 one-way ANOVA 分析, 多重比较处理组与对照组之间的差异性, 采用 Origin Pro 2018 作图, 取 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 保存时间对精子初始激活动性的影响

如图 1 所示, 保存不同时间激活后精子初始激活动性均超过 90%, 未见显著差异。激活保存 0h、6h、12h、24h、48h 精子, 初始动性分别为 94.00%±1.27%、96.15%±1.50%、92.00%±1.27%、93.00%±2.58%、92.00%, 保存 96h 后未见游动精子。

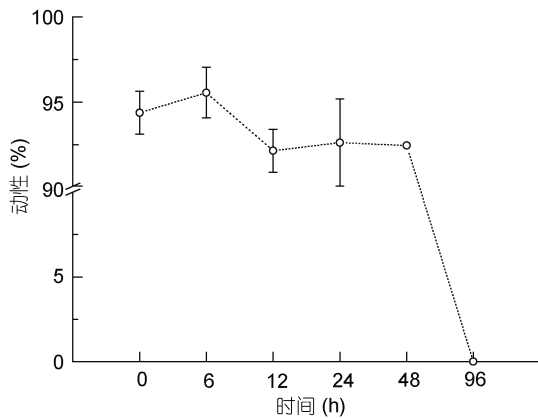


图1 精子在 ASP 中保存不同时间后精子动性

Fig.1 Sperm motility after preserved at ASP for different time

2.2 保存时间对精子激活后不同时间点动性的影响

由图 2 可知, 精子在 ASP 中保存 6h 即对精子活力有显著影响($P<0.05$), 保存 6h、12h、24h 后动性及存活时间均显著低于 0h 组($P<0.05$), 激活后 1min 动性降低 20%以上, 6h、12h、24h 三组间差异不显著。保存 6h、12h、24h 后 40s、60s、80s、100s 精子动性均显著低于保存 0h 组($P<0.05$); 保存 6h、12h、24h 组激活后精子存活时间均小于 100s, 显著低于 0h 组(120s, $P<0.05$)。

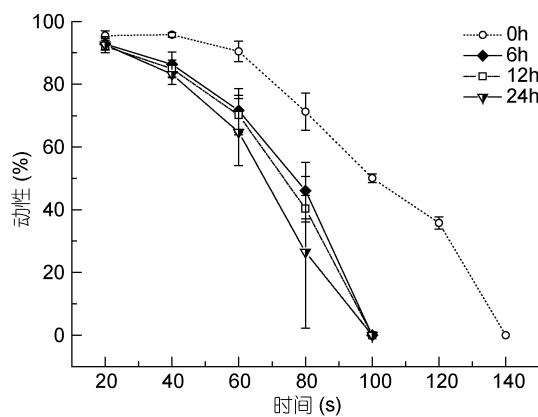


图2 保存不同时间对精子动性及存活时间的影响

Fig.2 Effect of different preservation time on sperm motility and survival time

2.3 添加葡萄糖(Glc)对精子活力的影响

如图 3 所示, 加入高浓度葡萄糖(G3 组)后精子初始动性受到抑制, 可显著延长精子存活时间。G3 激活精子 20s 时动性为 $48.89\% \pm 14.80\%$, 显著低于 DW、G1、G2 组(分别为 $87.61\% \pm 8.51\%$ 、 $93.60\% \pm 5.86\%$ 、 $92.10\% \pm 2.41\%$, $P<0.05$), DW、G1、G2 三组精子动性在 20s 未见显著差异; 激活后 1min

精子动性从高到低分别为 G2($75.73\% \pm 11.92\%$)、G1($62.14\% \pm 16.80\%$)、G3($54.98\% \pm 12.16\%$)与 DW 组($54.28\% \pm 16.61\%$), 四组未见显著差异。

G3 激活后精子存活时间达 8min 显著高于其余三组, G2 组次之(超过 2min, 未达 3min), 最低为 G1 与 DW 组(超过 1min, 未达 2min)。可见, 较高浓度葡萄糖能延长精子存活时间。

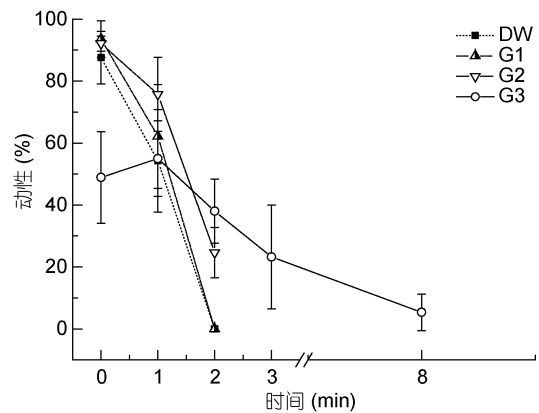


图3 不同浓度葡萄糖(Glc)作为激活剂对精子动性及存活时间的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of glucose (Glc) for activation on sperm motility and survival time

2.4 添加葡萄糖(Glc)和氯化钠(NaCl)对精子活力的影响

如图 4 所示, G2-SC 激活精子初始动性为 $92.55\% \pm 2.61\%$, 与 G1-SC ($88.09\% \pm 4.60\%$)和 DW 组($87.61\% \pm 8.51\%$)相比未见显著差异; G2-SC 激活后 1min 精子动性为 $87.96\% \pm 4.52\%$, 显著高于 G1-SC 组($69.06\% \pm 13.42\%$)和 DW 组($54.28\% \pm 16.60\%$) ($P<0.05$), 在 1min 时较 DW 组提升 62%; G2-SC 激活后 2min 精子动性降至 $50.39\% \pm 5.82\%$, 其余三组未见游动精子。G2-SC 激活后精子存活时间达 8min, 显著高于 G1-SC 组和 DW 组(<2 min)。

由此可见, 2.50%葡萄糖+4.50%氯化钠不能激活精子, 而 1.25%葡萄糖+2.25%氯化钠能显著增强精子活力、延长存活时间。

2.5 澳洲鳕鲈卵子成熟度、胚胎发育

选取的 6—8 龄雌性亲本, 注射催产针, 效应时间后泄殖孔处有卵自然流出, 即视为合格亲本, 解剖获取成熟卵子如图 5a 所示。按压取卵进行人工授精后受精卵如图 5b, 剔除白色、不透明的死卵(Rowland, 1988), 结果表明, 成功受精卵数量超过 80%, 能够满足人工繁殖要求。卵子受精后 3—4d 后即出现眼

点(图 5c), 8—9d 后发育成卵黄囊尚未被吸收初孵仔鱼(图 5d)。

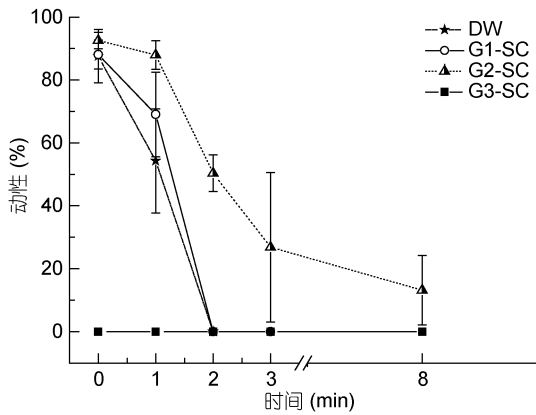


图 4 不同浓度氯化钠(NaCl)和葡萄糖(Glc)混合物作为激活剂对精子动性及存活时间的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of sodium chloride (NaCl) combined with glucose (Glc) for activation on sperm motility and survival time

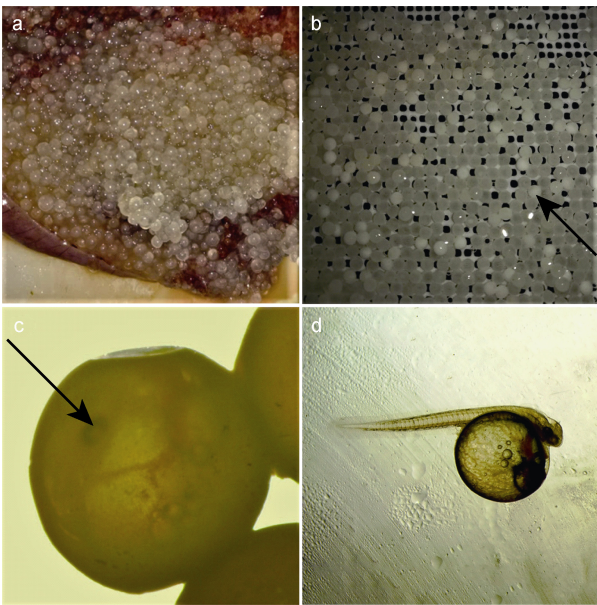


图 5 澳洲鳊鲈卵子及受精卵发育过程

Fig.5 Oocytes and development of fertilized oocytes of *M. peelii peelii*

注: a. 催产 48h 后卵子成熟情况, b. 受精卵(箭头所指为死卵), c. 眼点出现(3—4d, 箭头所指为眼点), d. 初孵仔鱼(8—9d)

3 讨论

3.1 亲本的选择

澳洲鳊鲈非常适合高密度尤其是封闭系统养殖 (Abery *et al*, 2005), 引入国内后主要进行室内工厂化



图 6 澳洲鳊鲈雌性亲本

Fig.6 Female broodstock of *M. peelii peelii*

养殖。已有研究表明澳洲鳊鲈在水温低于 16°C 时, 摄食减缓, 生长几乎停止, 水温高于 30°C 时开始死亡 (Boreham *et al*, 2004; Ingram, 2004), 因此, 澳洲鳊鲈在我国无法过冬和度夏完成生活史, 完全不必担心造成生态入侵的可能性。一般 2—3 龄养至 0.75—1.00kg 即可达商品规格, 养殖产量低的主要原因是苗种受限。

对于澳洲鳊鲈人工繁殖已经有了一些研究, 但仅限于生殖力的评估(Rowland, 1985)以及人工促熟、催产技术(Rowland, 1983, 1988)。因当地动物保护政策、海关、运输成本较高等诸多原因, 从澳大利亚引进达到性成熟的野生亲本用于人工繁殖还不现实, 只能通过养殖企业自身培育获得。苗种数量少、性成熟年龄时间长、养殖周期长等诸多因素导致养殖企业成熟亲本量极少。因此, 目前国内工厂化养殖企业多数通过从澳大利亚进口受精卵或鱼苗, 成本极高。

Rowland 等(1985)认为, 自然水体中 5 龄以上就能达到性成熟; Gooly 等认为野外条件下雄性亲本 3—4 龄、雌性亲本 6 龄即可达性成熟(Gooley *et al*, 1995)。但繁殖期前三个月捕捞已达性成熟的多数雌性个体(体重 3.1—34kg, 体长 600—1075mm)多数生殖细胞出现卵泡退化或卵子被重吸收的现象, 需进一步在土池中养殖 6 年, 性腺发育才能达到繁殖需求 (Rowland, 1988)。一般认为其性成熟需要经历季节变化(Gooley *et al*, 1995), 目前室内工厂化养殖水温一般控制在 20—26°C 之间(Ingram *et al*, 2005), 工厂化养殖培育亲鱼性腺发育能否满足繁殖要求还未明确。根据室内工厂化养殖的亲本性腺成熟度, 结合预实验结果以及生产成本等因素, 本实验选取了 6—8 龄

的室内工厂化养殖亲本作为人工繁殖使用, 雌性亲本性腺成熟度如图 5a。

3.2 常温保存对于精子活力的影响

澳洲鳕鲈孵化率偏低的重要原因是精子被提前激活。精子在由精巢至体外过程中遇到蒸馏水、池水、或者尿液(Ginzburg, 1972; Park *et al*, 2005), 因渗透压的突然改变致使精子被激活(Cosson, 2004; Alavi *et al*, 2005)。澳洲鳕鲈取精时, 精液必须经过较大的泄殖腔, 极易被污染, 精子被激活几乎无法避免, 而人工授精时精卵结合需要一定的时间。鲤科鱼类、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲟等种类在 ASP 中保存时间可达 7—14d (Gallego *et al*, 2019), 因此我们尝试用 ASP 对收集到的精液进行短期保存。结果表明保存 6h、12h、24h 均会造成精子活力过低。常温条件下细菌繁殖较快, 鱼类精子质量短时间内迅速恶化, 因此在配制 ASP 中添加抗生素(Oplinger *et al*, 2015)。本实验中 ASP 中加入青霉素、硫酸链霉素能在一定时间内保持精子活力, 但较建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian) (Saad *et al*, 1988)、匙吻鲟(*Polyodon spathula*) (Brown *et al*, 1995; Park *et al*, 2005)等短期保存效果差。

3.3 葡萄糖延长精子存活时间

高质量的精子是影响人工繁殖效率的关键因素。有学者研究指出淡水鱼类精子存活时间一般不超过 2min (鲁大椿等, 1989; Rowland, 1998; Billard *et al*, 2004), 可能是因为细胞内线粒体 DNA 活动不足以补偿精子激活后 ATP 的利用(Perchec *et al*, 1995)。本实验中澳洲鳕鲈精子激活剂中添加葡萄糖后其存活时间延长, G2-SC 组(1.25%葡萄糖+2.25%氯化钠)精子动性在 1min 时相较于 DW 组(蒸馏水)提升 62.0%, 存活时间达 8min, 较 DW 组(2min)延长了 3 倍。表明适宜浓度的葡萄糖能够显著增强精子的活力, 延长存活时间。

鲤科鱼类和鲑鳟鱼类精子细胞中存在糖原物质(Lahnsteiner *et al*, 1992, 1993), 但这些糖原物质并不足以支持长时间消耗(Dadras *et al*, 2017)。Gardiner(1978)和 Stoss(1983)的研究表明一定浓度的外源性葡萄糖可以延长鲤科鱼类精子存活时间, 这与本实验结果类似, 提示澳洲鳕鲈精子可能具有利用外源性葡萄糖的能力。然而, 一般认为葡萄糖分子较大不能直接通过精子细胞膜进入细胞内部, 葡萄糖是怎样充当精子能量来源还有待进一步探究。

此外, 本实验发现不同批次对照组精子激活后

存活时间及精子动性存在差异, 可能是由于澳洲鳕鲈于室内工厂化养殖过程中, 温度、光照、饵料等人工因素对其造成胁迫, 影响精子质量(Bromage, 1995; Rowland, 1998; Izquierdo *et al*, 2001)。该现象同样在鲤鱼、罗非鱼中有发现(De W Kruger *et al*, 1984)。

4 结论

澳大利亚众多政府组织和企业经过 40 年的努力, 共培育了 1289 万澳洲鳕鲈鱼苗(Forbes *et al*, 2015), 本研究中一次人工繁殖就获得了 52.3 万尾的鱼苗, 高于刘怡(2014)的结果(6 万多尾, 4—10cm), 本研究使用延长精子活力的方法大大提高了育苗效率, 室内工厂化养殖所培育的亲本可以满足人工繁殖的要求。因此, 本研究解决了澳洲鳕鲈人工繁殖亲本来源问题, 有利于增加苗种供应规模, 可为澳洲鳕鲈工厂化养殖的大规模推广奠定基础; 与此同时, 通过该方法可以提高澳洲鳕鲈育苗效率, 降低生产成本, 使该品种的养殖更加经济可行; 此外, 添加糖类和氯化钠延长精子活力的方法为鳕鲈科鱼类人工繁殖提供了新思路。

参 考 文 献

- 刘 怡, 2014. 墨瑞鳕在广东全人工繁育成功. 海洋与渔业, (5): 28—30
- 宋理平, 冒树泉, 胡 斌等, 2013. 虫纹鳕鲈肌肉营养成分分析与品质评价. 饲料工业, 34(16): 42—45
- 鲁大椿, 傅朝君, 刘宪亭等, 1989. 我国主要淡水养殖鱼类精液的生物学特性. 淡水渔业, 19(2): 34—37
- 廖 静, 2019. 澳洲华侨结缘“国宝鱼”归乡开启养殖之旅. 海洋与渔业, (7): 72—74
- Abery N W, De Silva S S, 2005. Performance of murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) in response to different feeding schedules. Aquaculture Research, 36(5): 472—478
- Alavi S M H, Cosson J, 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. Cell Biology International, 29(2): 101—110
- Brazil P, Boreham K. 1999. Environment Protection and Biodiversity Conservation Act 1999 (Cth). Australian Mining & Petroleum Law Journal, 18(2): 183
- Billard R, Cosson J, Noveiri S B *et al*, 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture, 236(1—4): 1—9
- Billard R, Cosson M P, 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. Journal of Experimental Zoology, 261(2): 122—131
- Boreham S, Ingram B A, Jones P L *et al*, 2004. Water quality and intensive Murray cod aquaculture. In: Ingram B A, De Silva S S eds. Development of Intensive Commercial Aquaculture

- Production Technology for Murray cod. Final Report to the Fisheries Research and Development Corporation (Project No.1999/328). Alexandra, Victoria, Australia: Primary Industries Research Victoria, DPI, 113—128
- Bromage N, 1995. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: Bromage N R, Roberts R J eds. Broodstock Management and Egg and Larval quality. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1—24
- Brown G G, Mims S D, 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *The Progressive Fish-Culturist*, 57(1): 64—69
- Cosson J, 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12(1): 69—85
- Dadras H, Sampels S, Golpour A *et al*, 2017. Analysis of common carp *Cyprinus carpio* sperm motility and lipid composition using different *in vitro* temperatures. *Animal Reproduction Science*, 180: 37—43
- Daly J, Galloway D, Bravington W *et al*, 2008. Cryopreservation of sperm from Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture*, 285(1—4): 117—122
- Dannevig H C, 1903. Summary of Evidence Regarding the Murray Cod Fishes, with Notes. Sydney: Government Printer, 3—32
- De W Kruger J C, Smit G L, Van Vuren J H J *et al*, 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Fish Biology*, 24(3): 263—272
- Forbes J, Watts R J, Robinson W A *et al*, 2015. Assessment of stocking effectiveness for Murray cod (*Maccullochella peelii*) and golden perch (*Macquaria ambigua*) in rivers and impoundments of south-eastern Australia. *Marine and Freshwater Research*, 67(10): 1410—1419
- Gallego V, Asturiano J F, 2019. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(3): 697—724
- Gardiner D M, 1978. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 59(2): 165—168
- Ginzburg A S, 1972. Fertilization in Fishes and the Problem of Polyspermy. Jerusalem: Keter Press, 71—50111
- Gooley G J, Anderson T A, Appleford P, 1995. Aspects of the reproductive cycle and gonadal development of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) (Percichthyidae), in Lake Charlegrark and adjacent farm ponds, Victoria, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 46(4): 723—728
- Gunasekera R M, De Silva S S, Ingram B A, 1999. The amino acid profiles in developing eggs and larvae of the freshwater Percichthyid fishes, trout cod, *Maccullochella macquariensis* and Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquatic Living Resources*, 12(4): 255—261
- Ingram B A, 2004. Murray cod fingerling production and growout. In: Ingram B A, De Silva S S eds. Development of Intensive Commercial Aquaculture Production Technology for Murray cod. Final Report to the Fisheries Research and Development Corporation (Project No. 1999/328). Alexandra, Victoria, Australia: Primary Industries Research Victoria, DPI, 25—65
- Ingram B A, Gavine F, Lawson P, 2005. Fish Health Management Guidelines for Farmed Murray Cod. Snobs Creek: Fisheries Victoria
- Izquierdo M S, Fernández-Palacios H, Tacon A G J, 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1—4): 25—42
- Koehn J D, 2004. Threats to murray cod. In: Lintermans M, Phillips B eds. Management of Murray Cod in the Murray-Darling Basin: Statement, Recommendations and Supporting Papers. Canberra: Murray-Darling Basin Commission, 30—37
- Koehn J D, McKenzie J A, O'Mahony D J *et al*, 2009. Movements of Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in a large Australian lowland river. *Ecology of Freshwater Fish*, 18(4): 594—602
- Koehn J D, Todd C R, 2012. Balancing conservation and recreational fishery objectives for a threatened fish species, the Murray cod, *Maccullochella peelii*. *Fisheries Management and Ecology*, 19(5): 410—425
- Lahnsteiner F, Patzner R A, Weismann T, 1992. Monosaccharides as energy resources during motility of spermatozoa in *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae, Teleostei). *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(4): 283—289
- Lahnsteiner F, Patzner R A, Weismann T, 1993. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reproduction Nutrition Development*, 33(4): 349—360
- Lake J S, 1967. Rearing experiments with five species of Australian freshwater fishes. I. Inducement to spawning. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 18(2): 137—154
- Lake J S, 1971. Freshwater Fishes and Rivers of Australia. Sydney: Thomas Nelson
- Legendre M, Billard R, 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Developpement*, 20(6): 1859—1868
- Lintermans M, 2007. Fishes of the Murray-darling Basin: An Introductory Guide. Canberra: Murray-Darling Basin Commission, 157
- Lintermans M, Rowland S, Koehn J *et al*, 2004. The status, threats, and management of freshwater cod species *Maccullochella* spp. in Australia. In: Lintermans M, Phillips B eds. Management of Murray Cod in the Murray-Darling Basin: Statement Recommendations and Supporting Papers. Canberra: Murray-Darling Basin Commission, 15—29
- Noble W G, 1955. Murray Cod. Sydney: Sydney Morning Herald
- Ohta H, Tsuji M, 1998. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during *in vitro* storage. *Fisheries Science*, 64(4):

- 547—552
- Oplinger R M, Wagner E J, 2015. Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial Coldwater disease I: antibiotics in sperm extenders. *Journal of Aquatic Animal Health*, 27(1): 25—31
- Park C, Chapman F A, 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *North American Journal of Aquaculture*, 67(1): 52—57
- Perchee G, Jeulin C, Cosson J *et al*, 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 108(2): 747—753
- Rowland S J, 1983. Spawning of the Australian freshwater fish Murray cod, *Maccullochella peelii* (Mitchell), in earthen ponds. *Journal of Fish Biology*, 23(5): 525—534
- Rowland S J, 1985. Aspects of the Biology and Artificial Breeding of the Murray cod, *Maccullochella peelii*, and the Eastern Freshwater Cod, *M. ikei* sp. nov. (Pisces: Percichthyidae). Sydney: Doctor Dissertation of Macquarie University, 253
- Rowland S J, 1988. Hormone-induced spawning of the Australian freshwater fish Murray cod, *Maccullochella peelii* (Mitchell) (Percichthyidae). *Aquaculture*, 70(4): 371—389
- Rowland S J, 1998. Aspects of the reproductive biology of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 120: 147—162
- Rowland S J, 2004. Overview of the history, fishery, biology and aquaculture of Murray cod (*Maccullochella peelii*). In: Lintermans M, Phillips B eds. *Management of Murray Cod in the Murray-Darling Basin: Statement, Recommendations and Supporting Papers. Proceedings of a Workshop Held in Canberra, ACT, 3-4 June 2004*. Canberra: Murray-Darling Basin Commission and Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology, 38—61
- Saad A, Billard R, Theron M C *et al*, 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71(1—2): 133—150
- Stoss J, 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. *Fish Physiology*, 9: 305—350
- Stoss J, Holtz W, 1981. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, 22: 97—104
- Ye Q, Zampatti B, 2007. Murray Cod Stock Status-the Lower River Murray, South Australia. Stock Status Report to PIRSA Fisheries. Adelaide: South Australian Research and Development Institute (Aquatic Sciences)

ON PRACTICAL TECHNOLOGY FOR FULL ARTIFICIAL PROPAGATION OF MURRAY COD *MACCULLOCHELLA PEELII PEELII*

LIU Mei-Jian¹, ZHAO Zi-Ming¹, LIU Ming², CHEN Su-Nan¹, ZHENG Xiang-Long¹, LIN A-Peng¹,
GONG Qing-Li²

(1. Jiangsu Ari-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. China Ocean University, Qingdao 266003, China)

Abstract As state banquet fish of Australia, Murray cod *Maccullochella peelii peelii* has been introduced to China for indoor industrial culture. However, a series of problems remain unsettled. To achieve the full artificial propagation, the key steps in the process of artificial reproduction, such as the synchronization of sperm and egg, the prolongation of sperm survival time, and the selection of individuals cultured in factory as parents, were investigated. Results showed that the motility of spermatozoa decreased and the survival time of spermatozoa significantly shortened after 6 hours of normal temperature storage, and no motile spermatozoa was found after 96 hours. The addition of 2.5% glucose or 1.25% glucose plus 2.25‰ sodium chloride increased sperm motility and prolonged sperm survival time, suggesting that glucose may be used as an exogenous energy resource, significantly enhancing sperm motility, and improving reproductive efficiency. In the experiment, 6—8-year-old Murray cods were selected as the broodstocks, and 500 000 fry were finally obtained using this method. It was proved that using the indoor cultured individuals as broodstocks could meet the needs of fry for factory cultivation.

Key words Murray cod *Maccullochella peelii peelii*; artificial propagation; broodstocks; sperm motility; survival time; glucose