

大黄鱼胚胎在不同稀释液及抗冻剂中的成活及超低温冷冻保存试验

杨海燕¹, 高心明¹, 杜晨¹, 程顺^{1,2}, 沈伟良^{1,3*}, 竺俊全¹

(1.宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315832; 2.浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001; 3.宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012)

摘要: 为了解大黄鱼胚胎在不同稀释液与抗冻剂中的成活及超低温冷冻保存的效果, 开展了大黄鱼胚胎在不同稀释液及抗冻剂中的成活试验。结果表明, 大黄鱼原肠期胚胎在 BS2 稀释液中培育 30 min 后的成活率与对照组无显著差异, 说明 BS2 可能适合作为胚胎冷冻保存用稀释液; 单一抗冻剂对大黄鱼胚胎的毒性依次为丙二醇(PG)<甲醇(MeOH)<二甲基亚砷(DMSO)<二甲基甲酰胺(DMF)<乙二醇(EG), 抗冻剂使部分胚胎的卵黄囊皱缩, 胚体发生损伤, 影响胚胎的成活率及孵化率; 混合抗冻剂 PMD (PG:MeOH:DMSO=9:6:5)对大黄鱼心跳期胚胎的毒性较小, 不影响胚胎的成活率及孵化率。以 BS2 为稀释液, 40% PMD 为抗冻液, 采用两步降温法进行超低温冷冻保存大黄鱼胚胎试验, 解冻后成功复活卵裂期及尾芽期冻胚各 1 粒, 原肠期冻胚 2 粒, 心跳期冻胚 3 粒。

关键词: 大黄鱼; 胚胎; 稀释液; 抗冻剂; 冷冻保存

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2020) 03-0007-06

胚胎超低温冷冻保存技术在鱼类养殖、遗传育种及种质资源保存等方面具有应用价值^[1-2]。迄今为止, 研究者已对多种鱼类的胚胎进行了超低温冷冻保存研究, 并在部分鱼类中获得了复活胚胎。如章龙珍等^[3]在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)胚胎的超低温冷冻保存试验中获得了复活胚胎; 武鹏飞等^[4]用显微注射技术将抗冻剂注入牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎进行冷冻保存试验, 解冻后获得复活胚胎并部分孵化出膜; Tian 等^[2]进行云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎冷冻保存试验, 获得了复活胚胎并部分孵化出仔鱼苗。由于鱼类胚胎体积较大, 卵膜较厚, 卵黄物质多, 阻碍了水和抗冻剂的出入, 因而相较于哺乳动物, 鱼类胚胎冷冻保存更困难^[2,5], 复活率及孵化率较低。筛选出胚胎冷冻保存用适宜的稀释液及抗冻剂, 确定

适宜冷冻的胚胎发育时期、冷冻降温方法、解冻及解冻后处理方法等是提高胚胎复活率及孵化率并取得胚胎冷冻保存成功的关键^[1]。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属鲈形目(Perciformes), 石首鱼科(Sciaenidae), 黄鱼属(*Larimichthys*), 是我国主要海产经济鱼类及增养殖种^[6]。开展大黄鱼胚胎的超低温冷冻保存研究, 建立胚胎超低温冻存库, 对其种质资源的保护具有重要意义。目前, 国内外对大黄鱼胚胎冷冻保存的研究较少, 尚无成熟的胚胎冷冻保存技术, 仅见陈雄芳^[7]运用程序化降温法对大黄鱼胚胎进行过超低温冷冻保存研究, 但解冻后未获得复活胚胎。本文开展了大黄鱼胚胎在不同稀释液及抗冻剂中的成活试验研究, 筛选出了胚胎冷冻保存可能适用的稀释液 BS2 及抗冻剂 PMD, 并在此基础上进行了两步降温法超

收稿日期: 2019-07-04.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省科技计划重大项目(2016C02055-7); 宁波市农业重大专项(2015C110005); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-7-2); 国家海水鱼产业技术体系(CARS-47-Z08)。

第一作者: 杨海燕(1990-), 女, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产生物学。E-mail: 1402851835@qq.com

*通信作者: 沈伟良(1983-), 男, 浙江桐乡人, 博士, 主要研究方向: 鱼类繁殖生理与遗传育种。E-mail: sweleon@163.com

低温冷冻保存大黄鱼胚胎试验,初步探索了大黄鱼胚胎的超低温冷冻保存方法,并获得了复活胚胎,可为后续大黄鱼胚胎超低温冻存技术改进提供有用参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用大黄鱼取自浙江宁波象山港湾苗种有限公司养殖基地,雄鱼体重 600~800 g,雌鱼体重 800~1 200 g。挑选性成熟度良好的个体,用促黄体释放激素类似物(LRH-A3)进行催产,自然产卵方式获得受精卵,在水温 23.0~24.0 °C、盐度 22、pH 8.0~8.3、微充气、弱光条件下孵育,取卵裂期、原肠期、尾芽期及心跳期胚胎进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 稀释液对原肠期胚胎成活的影响试验

在 23.0~24.0 °C 条件下,取 80~100 粒原肠期胚胎,吸干水分后分别置于 BS2^[8]、Cortland^[9]、HBSS^[10]及 D-154^[11]等 4 种稀释液中(BS2: NaCl 24.72 g·L⁻¹, KCl 0.86 g·L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 1.46 g·L⁻¹, MgCl₂·6H₂O 4.86 g·L⁻¹, NaHCO₃ 0.19 g·L⁻¹; Cortland: NaCl 7.25 g·L⁻¹, KCl 0.38 g·L⁻¹, CaCl₂ 0.18 g·L⁻¹, NaHCO₃ 1.00 g·L⁻¹, NaH₂PO₄·2H₂O 0.41 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.23 g·L⁻¹, C₆H₁₂O₆ 1.00 g·L⁻¹; HBSS: NaCl 8 g·L⁻¹, KCl 0.4 g·L⁻¹, Glucose 1 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 60 mg·L⁻¹, Na₂HPO₄ 47.5 mg·L⁻¹, NaHCO₃ 0.35 g·L⁻¹; D-15: NaCl 8 g·L⁻¹, KCl 1 g·L⁻¹, Glucose 15 g·L⁻¹),平衡 30 min 后加 0.25 mol·L⁻¹ 的蔗糖(Sucrose)溶液洗脱 10 min,在过滤海水(盐度 23)中孵育 1 h,然后统计胚胎成活率(复活率)(成活卵数/总卵数)。对照组为不经过稀释液处理,在过滤海水中孵育的胚胎。试验重复 3 次。

1.2.2 单一抗冻剂对胚胎成活的影响试验

将渗透性抗冻保护剂 PG(丙二醇)、MeOH(甲醇)、DMSO(二甲基亚砷)、DMF(二甲基甲酰胺)及 EG(乙二醇)分别与 BS2 配成质量分数为 20% 的混合液,取卵裂期、原肠期、尾芽期和心跳期胚胎各 80~100 粒,置于混合溶液中平衡 30 min,加 0.25 mol·L⁻¹ 的蔗糖溶液洗脱 10 min,在过滤海水中孵育 1 h,然后统计胚胎成活率,出膜后统计孵化率(出膜鱼苗数/成活卵数)。平衡处理 30 min

后分别在显微镜(Olympus)下观察卵裂期、原肠期、尾芽期胚胎的形态特征并拍照记录。对照组为不经过抗冻剂处理,在稀释液中培养的胚胎。试验重复 3 次。

1.2.3 混合抗冻剂对胚胎成活的影响试验

选取低毒性抗冻剂 PG、MeOH 与 DMSO,将 PM(PG:MeOH=3:2)与 DMSO 分别以 1:0、4:1、3:1、2:1、1:1 比例混合配制成 40% 的混合抗冻液。在 23.0~24.0 °C 条件下,将 80~100 粒心跳期胚胎吸干水分后置于上述不同溶液中,通过一步法平衡 30 min 后,加 0.25 mol·L⁻¹ 的蔗糖溶液洗脱 10 min,加过滤海水培养 1 h 后统计成活率,出膜后统计孵化率。对照组为不经过抗冻剂处理,在稀释液中培养的胚胎。试验重复 3 次。

1.2.4 胚胎的超低温冷冻及复活试验

以 BS2 为稀释液,40% PMD(PG:MeOH:DMSO=9:6:5)为抗冻液,两步降温法^[9]超低温冷冻保存大黄鱼卵裂期、原肠期、尾芽期及心跳期胚胎各 80 粒,即将平衡 30 min 后的胚胎装入体积为 0.25 mL 的麦细管中,每支装约 0.2 mL,将盛卵麦细管平放于自制简易降温装置的液氮面上方 3~5 cm 处,平衡 3~5 min 后迅速转入液氮中保存,1 h 后将麦细管从液氮中快速取出,置于 40 °C 水浴中摇动融化,随后加 0.25 mol·L⁻¹ 的蔗糖溶液洗脱 10 min,最后在过滤海水中孵育 1 h 并统计胚胎复活数,出膜后统计孵化数。海水培养期间显微观察受精卵形态特征并拍照。试验重复 3 次。

1.2.5 数据处理

所有试验数据和组间单因素方差分析采用 Microsoft Excel 2013 和 SPSS 17.0 软件进行处理,统计结果以平均值±标准差表示,以 $P<0.05$ 为差异显著标准。

2 结果与分析

2.1 不同稀释液对大黄鱼原肠期胚胎成活的影响

如图 1 所示,原肠期胚胎在不同稀释液中培育 30 min 后胚胎的成活率不一致,成活率依次为 BS2>D-15>Cortland>HBSS。以 BS2 为稀释液,胚胎的成活率达(86.3±3.2)%,与对照组胚胎的成活率无显著差异。BS2 可能适宜作为大黄鱼胚胎冷冻保存用稀释液。

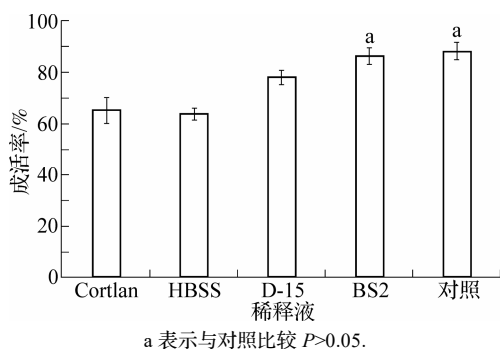


图1 原肠期胚胎在不同稀释液中的成活率

2.2 单一抗冻剂对大黄鱼胚胎成活的影响

如图2所示, 不同抗冻剂对胚胎成活的影响不同。卵裂期、原肠期、尾芽期及心跳期胚胎经20% PG处理30 min后, 成活率分别为(87.6±4.2)%、(79.8±3.7)%、(90.1±5.8)%及(91.1±3.5)%, 孵化率分别为(90.0±1.7)%、(70.1±2.6)%、(85.3±6.5)%及(86.7±6.0)%, 与对照组无显著差异。经20% MeOH处理后, 心跳期胚胎的成活率及卵裂期胚胎的孵化率分别为(72.6±5.9)%及(80.0±7.2)%, 与对照组无显著差异。经20% DMSO处理后, 尾芽期胚胎的成活率为(68.7±12.1)%, 与对照组无显著差异。经20% DMF及EG处理后, 各时期胚胎的成活率及孵化率均显著降低。

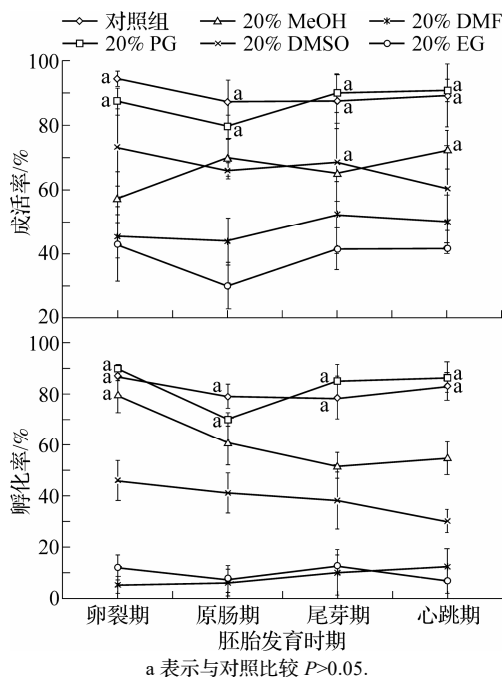
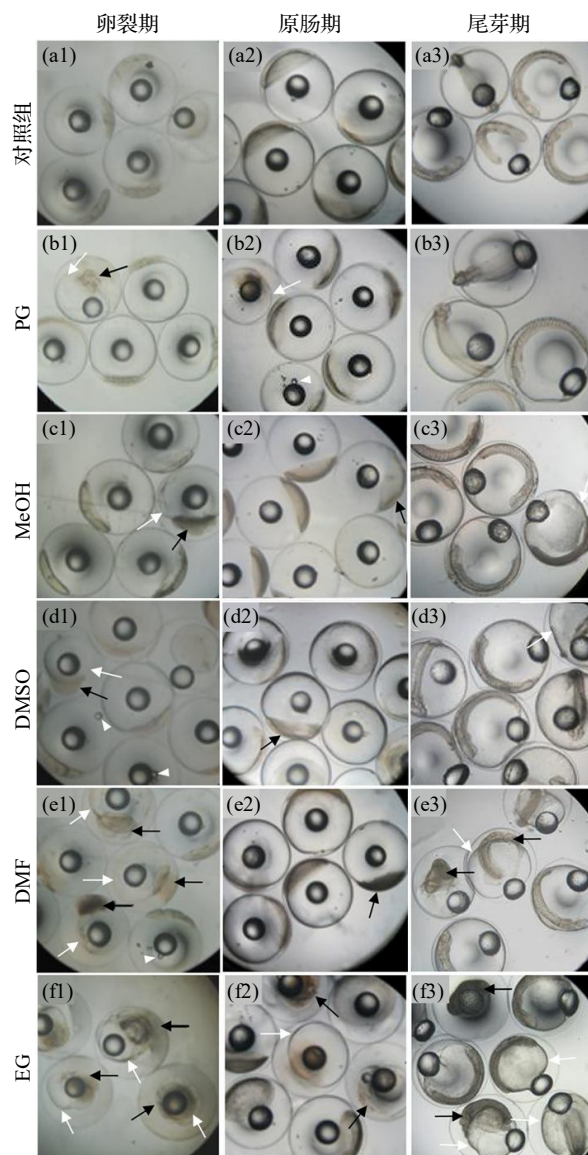


图2 抗冻剂对胚胎成活及孵化的影响

显微观察抗冻剂对胚胎形态特征的影响, 发

现胚胎经抗冻剂处理30 min后, 部分胚胎卵黄囊皱缩, 胚体损伤, 有的胚胎油球分离(图3)。DMF及EG对胚胎形态特征的影响较大, 体现在胚体损伤, 卵黄囊皱缩; PG、MeOH及DMSO对胚胎的影响较小, 大部分胚胎形态结构正常(图3)。抗冻剂造成的上述胚胎损伤可能是影响胚胎成活的主要原因。综合考虑5种抗冻剂对各时期胚胎成活的影响, 认为抗冻剂的毒性为: PG<MeOH<DMSO<DMF<EG。以5种抗冻剂分别处理胚胎30 min, 不同胚胎发育阶段的成活率及孵化率差异较小, 难以判断对抗冻剂耐受性最强的胚胎阶段。



a1~a3: 正常胚胎; b1~f3: 抗冻剂处理后的胚胎; 白色箭头: 卵黄囊皱缩; 黑色箭头: 分裂球或胚体损伤; 白色三角形: 分离的小油球。

图3 抗冻剂对大黄鱼胚胎形态特征的影响

2.3 混合抗冻剂对大黄鱼心跳期胚胎成活的影响

如图4所示, PM (PG:MeOH=3:2)与DMSO分别以1:0、4:1、3:1及2:1的比例混合配制成质量分数为40%的抗冻液来处理胚胎, 胚胎的成活率在80%左右; 以1:1的比例混合, 胚胎的成活率较低, 为 $(44.1 \pm 1.3)\%$ 。PM与DMSO以4:1或3:1比例混合, 胚胎的成活率达87%以上, 与对照组无显著差异; PM与DMSO以3:1或2:1比例混合, 胚胎的孵化率达80%以上, 与对照组无显著差异。综合分析结果, 认为PM与DMSO以3:1, 即PG、MeOH及DMSO以9:6:5混合配制的抗冻液(PMD)对胚胎的毒性最小, 胚胎的成活率及孵化率分别达 $(88.6 \pm 1.5)\%$ 和 $(81.4 \pm 4.0)\%$, 与对照组无显著差异, 可能适宜作大黄鱼胚胎冻存用抗冻剂。

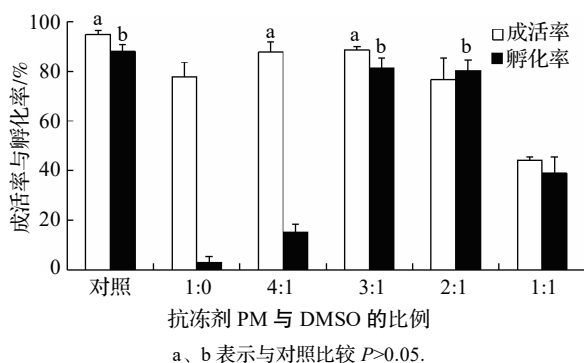


图4 混合抗冻剂处理下心跳期胚胎的成活率与孵化率

2.4 大黄鱼胚胎超低温冷冻后的复活效果

共获得7粒复活胚胎, 其中卵裂期胚胎1粒, 原肠期胚胎2粒, 均发育至尾芽期死亡; 尾芽期胚胎1粒, 发育至心跳期死亡; 心跳期3粒, 胚胎心跳正常, 发育至肌肉效应期死亡。复活胚胎在洗脱后始终漂浮于水面, 胚胎形态完整, 无破裂、发白现象, 显微观察卵黄囊、胚体和卵膜等部位基本完好, 但出现体节模糊、油球分离现象(图5)。

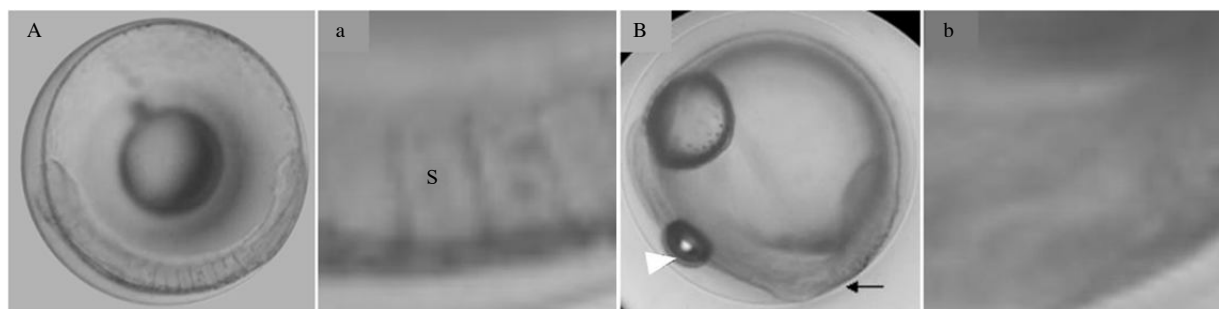


图5 胚胎冷冻对大黄鱼胚胎形态特征的影响

3 讨论

大多数抗冻剂对鱼类胚胎有毒害作用, 影响胚胎的成活率及孵化率, 筛选出低毒性抗冻剂是鱼类胚胎冷冻保存的关键技术之一^[1]。据报道, 抗冻剂对鱼类胚胎的毒性具有种属差异性, 如抗冻剂对牙鲆胚胎的毒性为 PG<MeOH<DMSO<Gly<EG^[12], 对中国花鲈(*Lateolabrax japonicus*)胚胎的毒性为 PG<MeOH<glycerol<DMF<EG<DMSO^[13], 对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎的毒性为 MeOH<PG 及 DMSO<EGP^[14], 对金头鲷(*Sparus aurata*)胚胎的毒性, EG 明显低于 MeOH、PG 及 DMSO^[15]。本文研究发现, 5 种常用抗冻剂对大黄鱼胚胎的毒性为 PG<MeOH<DMSO<DMF<EG。因此, PG、MeOH 及 DMSO 可能更适宜作为大黄鱼胚胎冷冻保存用的抗冻剂。

较高浓度的单一抗冻剂能达到理想的玻璃化冻存效果, 但浓度升高会增加抗冻剂毒性, 降低胚胎成活率; 混合抗冻剂可以降低抗冻剂使用浓度, 提高玻璃化率及胚胎冷冻保存成活率^[8,16-17]。本研究发现, 当抗冻剂 PG、MeOH 及 DMSO 以体积 9:6:5 混合时, 对大黄鱼胚胎的毒性较弱, 不影响胚胎的存活率及孵化率(图4), 可能较适宜用于胚胎冻存保存。

不同发育阶段胚胎对抗冻剂的耐受性存在差异, 赵燕等^[18]以 PMDD (添加 2% PVP) 为抗冻剂冷冻牙鲆胚胎, 发现尾芽期胚胎对抗冻剂的耐受性最强, 其次为原肠中期, 心跳期最弱; 田永胜等^[19]以 PMP1 为抗冻剂冷冻大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)胚胎, 发现 4~5 对肌节期胚胎的耐受能力最强, 尾芽期次之, 心跳期及出膜前期胚胎耐受性较弱。研究不同发育阶段胚胎对抗冻剂的耐受性,

图5 胚胎冷冻对大黄鱼胚胎形态特征的影响

有助于筛选耐受性强的胚胎发育阶段,用于胚胎冷冻保存. 耐受性强的胚胎发育阶段因鱼的种类不同存在差异,也因抗冻剂种类及平衡时间的不同存在差异,如于过才等^[20]以 10% DMSO 为抗冻剂处理中国花鲈胚胎 60 min 时,肌肉效应期胚胎对抗冻剂的耐受性最强,原肠中期次之,胚孔封闭期和出膜前期胚胎耐受力最弱;但田永胜等^[13]以 VSD2 为抗冻剂处理中国花鲈胚胎 50 min 时,心跳期胚胎对抗冻剂的耐受性最强,其次为出膜前期,神经胚期胚胎的耐受能力最弱. 本研究发现,以 PG、MeOH、DMSO、DMF 及 EG 为抗冻剂处理大黄鱼胚胎 30 min,卵裂期、原肠期、尾芽期及心跳期胚胎对抗冻剂的耐受性差异不大.

Tian 等^[2]观察发现,经 40%抗冻剂 PMG3T 处理后,云纹石斑鱼胚胎卵黄膜皱缩,卵周隙扩大,孵出胚胎脊柱及尾部弯曲,不能正常发育. 本研究观察了大黄鱼卵裂期、原肠期及尾芽期胚胎经抗冻剂处理 30 min 后的形态特征,发现抗冻剂使胚胎卵黄囊皱缩,油球分离,胚体发生损伤,且抗冻剂毒性越大,胚胎损伤越严重(图 3). 此外,冷冻大黄鱼胚胎复活后体节模糊(图 5),与 Tian 等^[2]观察到的云纹石斑鱼冷冻复活后的胚胎畸形、体节模糊现象类似. 曾志强等^[21]利用透射电镜技术观察冷冻后的泥鳅胚胎,发现肌细胞线粒体解体,肌原纤维不可分辨. 姜静等^[22]发现七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)胚胎经冷冻后,MDA 活性显著升高,抗氧化酶活性显著降低,暗示冷冻使胚胎发生氧化损伤,导致胚胎不能正常发育. 推测冷冻可能导致胚胎线粒体受损,肌细胞发生氧化损伤,进而引起肌纤维模糊、体节形成异常、胚体畸形,胚胎复活后成活率低,难以孵化出膜.

目前,只有少部分海洋经济鱼类胚胎冷冻保存试验获得了复活胚胎并孵化出仔鱼,如王春花等^[23]利用程序降温法冷冻牙鲆胚胎,复活 12 粒并全部孵化出膜;Tian 等^[2]冷冻云纹石斑鱼胚胎,复活 190 粒,其中 44 粒孵化出膜;田永胜等^[13]超低温冷冻中国花鲈胚胎,复活 3 粒,其中 1 粒孵化出膜. 本研究冷冻保存大黄鱼胚胎,成功复活 7 粒冻胚,但均未能孵化出膜. 据研究,影响鱼类胚胎冻存成功的主要因子包括抗冻剂种类及浓度、卵膜的通透性、冷冻降温方法、解冻及冻后处理等^[1],上述因

子控制不当可能是导致本研究复活冻胚数少,未能孵化出膜的主要原因. 未来应筛选低毒或无毒抗冻剂(如抗冻蛋白),通过显微注射抗冻剂克服卵膜通透性差及平衡时间长的缺点,优化冻存方法及解冻过程,以提高大黄鱼胚胎冻存后复活及孵化出膜的成功率.

参考文献:

- [1] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2):162-163.
- [2] Tian Y S, Zhang J J, Li Z T, et al. Effect of vitrification solutions on survival rate of cryopreserved *Epinephelus moara* embryos[J]. Theriogenology, 2018, 113:183-191.
- [3] 章龙珍, 鲁大椿, 柳凌, 等. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究[J]. 水产学报, 2002, 26(3):213-217.
- [4] 武鹏飞, 丁浩, 田永胜, 等. 显微注射抗冻剂对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎毒性及冷敏感性的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(16):301-308.
- [5] Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans F W, et al. New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation[J]. Cryobiology, 1997, 34(4):335-347.
- [6] 刘家富. 大黄鱼养殖与生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2013:1.
- [7] 陈雄芳. 大黄鱼精子和胚胎的超低温保存研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [8] Tian Y, Jiang J, Song L, et al. Effects of cryopreservation on the survival rate of the seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) embryos[J]. Cryobiology, 2015, 71(3):499-506.
- [9] 程顺, 闫家强, 竺俊全, 等. 甘油为抗冻剂超低温冷冻保存大黄鱼精子的 DNA 损伤[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(11):34-36.
- [10] Yang H, Daly J, Carmichael C, et al. A procedure-spanning analysis of plasma membrane integrity for assessment of cell viability in sperm cryopreservation of zebrafish *Danio rerio*[J]. Zebrafish, 2016, 13(2):144-151.
- [11] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, et al. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization[J]. Aquaculture, 2004, 241(1/2/3/4):517-528.
- [12] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos[J]. Theriogenology, 2005, 63(3):763-773.
- [13] 田永胜, 陈松林, 严安生, 等. 鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻

- 保存[J]. 动物学报, 2003, 49(6):843-850.
- [14] Plachinta M, Zhang T, Rawson D M. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes [J]. CryoLetters, 2004, 25(6):415-424.
- [15] Cabrita E, Robles V, Wallace J C, et al. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos[J]. Aquaculture, 2006, 251(2/3/4): 245-255.
- [16] 刘本伟. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎玻璃化冷冻保存方法及冷冻损伤机理研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [17] 沈蕾. 玻璃化冻存对鲫鱼卵细胞的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013.
- [18] 赵燕, 陈松林, 孔晓瑜, 等. 几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存的影响[J]. 动物学报, 2005, 51(2):320-326.
- [19] 田永胜, 陈松林, 于过才, 等. 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存[J]. 水产学报, 2005, 29(2):275-280.
- [20] 于过才, 陈松林, 孔晓瑜, 等. 鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(1):1-8.
- [21] 曾志强, 张轩杰. 泥鳅胚胎冷冻前后生物学性状变化的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, 18(4): 40-44; 87.
- [22] 姜静, 田永胜, 翟介明, 等. 超低温冷冻保存对七带石斑鱼胚胎酶活性的影响[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(4):476-485.
- [23] 王春花, 陈松林, 田永胜, 等. 牙鲆胚胎程序化冷冻保存研究[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(3):57-63.

Screening of optimal diluents and cryoprotectants for cryopreservation of *Larimichthys crocea* embryos and evaluation of preservation effect

YANG Haiyan¹, GAO Xinming¹, DU Chen¹, CHENG Shun^{1,2}, SHEN Weiliang^{1,3*}, ZHU Junquan¹

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 2.Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3.Ningbo Marine and Fisheries Research Institute, Ningbo 315012, China)

Abstract: To determine the optimal diluents and cryoprotectants for cryopreservation of *Larimichthys crocea* embryos, the survival rate of embryos under different diluents and cryoprotectants were analyzed. The results showed that there were no significant differences between control and experimental group treated by BS2 for 30 min in the survival rate of gastrula stage embryos. The results indicated that BS2 may be an optimal diluent for *L. crocea* embryos. The crumpled yolk sac and damaged embryonic body were observed in given embryos treated with five most commonly used cryoprotectants: 1,2-propylene glycol (PG), methanol (MeOH), dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF) and ethylene glycol (EG), causing reduction of the survival rate and hatching rate of embryos. The toxic effect of five cryoprotectants on *L. crocea* embryos was in the following sequence: PG<MeOH< DMSO<DMF<EG. The toxic effect of mixed cryoprotectants on the heart beating of *L. crocea* embryos was tested. The PMD (PG:MeOH:DMSO=9:6:5) was identified as suitable cryoprotectant for cryopreservation of *L. crocea* embryos because it did not significantly decrease the survival rate and hatching rate of embryos. The cryopreservation of embryos was finally implemented, using 40% PMD by two-step cooling method. A significant portion of frozen embryos were successful resurrected, including one frozen embryo in cleavage stage, two frozen embryos in gastrula stage, one frozen embryo in tail-bud stage and three frozen embryos in heart beating stage.

Key words: *Larimichthys crocea*; embryo; diluent; cryoprotectant; cryopreservation

(责任编辑 韩 超)