

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00061

中华绒螯蟹胚胎的玻璃化冷冻保存

黄晓荣, 庄平, 章龙珍, 冯广朋, 刘鉴毅, 张涛, 赵峰

中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090

摘要: 研究了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)4 个不同发育时期胚胎对 A 号玻璃化液的耐受性和玻璃化冷冻保存。结果表明, 不同时期的胚胎对玻璃化液的耐受能力不同, 其中卵裂期胚胎对玻璃化液的耐受能力较差(20~30 min), 前无节幼体期和原蚤状幼体期胚胎在玻璃化液中的适应时间较长(40~60 min); 随着平衡时间的延长, 中华绒螯蟹各个时期的胚胎成活率逐渐下降。中华绒螯蟹前无节幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中平衡 40 min, 0.25mol/L 的蔗糖分别洗脱 5、10、15、20 min 后, 胚胎成活率无显著性差异($P>0.05$)。前无节幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中平衡 40 min, 在 -196°C 冷冻 40 min, 快速解冻后用 0.25 mol/L 的蔗糖洗脱 10 min, 有 8 个胚胎成活, 成活率为 $(9.3\pm2.5)\%$, 胚胎培养至第 4 天死亡; 原蚤状幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中平衡 40 min, 在 -196°C 冷冻 35 min, 经相同浓度的蔗糖洗脱相同的时间, 有 7 个胚胎成活, 成活率 $(11.3\pm3.6)\%$, 培养至第 6 天时, 1 个胚胎孵化出膜, 出膜胚胎成活 1 d 后死亡。

关键词: 中华绒螯蟹; 胚胎; 玻璃化; 冷冻保存

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0061-07

低温冷冻保存作为水生生物种质资源保存的一条途径, 日益受到人类的重视, 其中玻璃化冷冻保存是一条简捷而很有潜力的方法^[1]。玻璃化是将液体转变为非晶体的固化过程, 玻璃化固化引起细胞结构的变化小, 有利于冷冻胚胎的成活, 是一种有效的低温保存途径和方法^[2]。利用玻璃化方法冷冻保存胚胎率先在小鼠胚胎保存中获得成功^[3], 随着这种方法在哺乳动物胚胎冷冻保存上的应用, 在牛、羊、马等胚胎保存中也取得了成功^[4-6]。

水生动物胚胎具有体积大、卵黄颗粒多、水分含量多、卵膜通透性低、胚体组织复杂等特点, 其冷冻保存较哺乳动物难度大很多。国内外学者对一些水生动物如银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Bra-*

chydanio rerio)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)等胚胎的超低温冷冻保存进行了研究^[7-11], 但在玻璃化冷冻保存方面仅在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎上获得了成功^[12-15], 而在甲壳类动物的胚胎冷冻保存研究上, 迄今尚未见报道。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是农业部确定的中国水产养殖主导当家品种, 中华绒螯蟹天然蟹苗资源的蕴藏量以长江口居首位, 该产区年产蟹苗可以达到数千千克乃至数万千克。但自 20 世纪 90 年代以来, 一方面长江中下游水系的水利工程建设对其洄游的不利影响仍在延续, 水环境恶化也日趋严重; 另一方面对资源长期过度利用(亲

收稿日期: 2012-05-10; 修订日期: 2012-08-09.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项经费项目(201203065, 200903048-07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2011T04).

作者简介: 黄晓荣(1978-), 副研究员, 博士, 主要从事水生生物种质资源保存与低温生物学研究. E-mail: hxr828@126.com

通信作者: 庄平, 研究员, 博士生导师. E-mail: pzhuang@online.sh.cn

蟹、幼蟹和蟹苗三重捕捞),导致长江中华绒螯蟹资源急剧衰退,中下游蟹汛逐渐消失,现仅有长江口尚能形成亲蟹冬汛。通过首次开展甲壳动物——中华绒螯蟹胚胎的超低温冷冻保存研究,旨在有效保护这一优良水生生物资源,同时也为其他甲壳动物胚胎的超低温冷冻保存提供科学依据和参考。

1 材料和方法

1.1 材料来源及饲养方法

抱卵蟹来自江苏省启东金海岸水产研究所,共 20 只,平均体质量(352.6±6.8) g,饲养于直径 1.5 m 的圆形玻璃缸中,每个缸中 6~7 只蟹,保持水深 60 cm,缸内放砖块、瓦片提供隐蔽栖息场所,每天 24 h 增氧,12 h 光照。每天晚上按体质量的 5%~10%投喂小型贝类和鱼类,第 2 天早上清除缸底的残饵和粪便,循环水养殖,日均水体交换量为 70%~80%。YSI 水质分析仪监测和记录水体温度、盐度、溶氧和 pH,实验用水为经充分曝气的自来水,实验期间平均水温为(16.2±1.5)℃,盐度 15.1±0.5, pH 7.5~8.5, DO 保持 6 mg/L 以上。

1.2 实验设备和试剂

利用二甲基亚砜(DMSO)、1,2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)和二甲基甲酰胺(DMF)4 种抗冻剂,相互进行交叉组合,采用盐度 15 的海水分别配制最低浓度为 30%,最高浓度为 60%的 40 种抗冻剂,进行玻璃化液的筛选,玻璃化液的筛选方法同文献[16]。统计冷冻和解冻时玻璃化麦管数量,每组试验重复 3 次,选择冷冻和解冻过程中玻璃化次数最多的抗冻剂作为玻璃化液。经对比研究

并结合各时期胚胎在玻璃化液中平衡后的成活率结果,筛选出 A 号玻璃化液(30%PG+20%DMF)作为中华绒螯蟹胚胎的冷冻保存液,玻璃化液组成及筛选结果如表 1 所示。

1.3 中华绒螯蟹各期胚胎在玻璃化液中的适应性研究

将中华绒螯蟹不同时期的胚胎(卵裂期、原肠期、前无节幼体期和原溞状幼体期)在室温下利用五步法在玻璃化梯度液中逐步平衡,即将胚胎依次置于 1/4、1/3、1/2、2/3、1 倍的 A 号玻璃化液中平衡一段时间,不经冷冻,直接利用 0.25 mol/L 的蔗糖洗脱液洗脱 10 min,逐次加入 17~20℃盐度 15 的海水培养,每天更换 1/2 的海水,保证水体溶氧充足,在显微镜下观察胚胎发育情况,统计胚胎成活率,确定胚胎在 A 号玻璃化液中合理的平衡时间及可进行玻璃化处理的适宜胚胎时期。胚胎成活率用成活胚胎数量占全部胚胎数量的百分比表示,每个时期的样品进行 2 次重复实验,结果取平均值,每次实验胚胎数量 30~50 粒。

1.4 适宜洗脱时间的筛选

利用五步法在 A 号玻璃化液中平衡前无节幼体期胚胎 40 min,在 18℃室温下采用 0.25 mol/L 的蔗糖分别洗脱 5、10、15、20 min,逐次加入盐度 15 的海水,培养一定时间,统计胚胎的成活率,每个批次的样品进行 3 次重复实验,结果取平均值。

1.5 中华绒螯蟹胚胎的玻璃化冷冻方法

将中华绒螯蟹前无节幼体期和原溞状幼体期胚胎在室温下利用 A 号玻璃化液平衡一段时间,

表 1 玻璃化液组成及解冻温度
Tab. 1 Component of vitrification solutions and thawing temperature

代号 code	组成 component	玻璃化程度/% vitrification degree		解冻温度/℃ thawing temperature
		冷冻 cryopreservation	解冻 thawing	
A	30%PG+20%DMF	96.5	67.2	37-40
B	30%MeOH+20%DMF	72.4	42.8	37-43
C	30%PG+20% MeOH	65.3	52.6	35-37
D	30%PG+10% MeOH+10% DMF	78.2	54.5	39-42
E	30%PG+20%DMSO	61.4	58.3	35-39
F	30%MeOH+20% DMSO	43.8	41.5	36-40

将含有胚胎的玻璃化液装入 0.2 mL 的冷冻保存管, 置于冰瓶中预冷 10 min, 然后在液氮口约 20 cm 处平衡 1 min, 再迅速投入液氮, 冷冻一定时间后, 将样品放置于液氮口约 20 cm 处再平衡 1 min 后, 在 38℃ 的水浴中快速解冻, 0.25 mol/L 的蔗糖洗脱 10 min, 逐次加入盐度 15 的海水, 在盐度为 15 的海水中培养 2 h, 统计完整胚和透明胚的数量。完整胚指冷冻后胚胎无破裂, 外部形态完整, 透明胚指冷冻后胚胎除外部形态完整外, 胚体透明无发白现象。把透明胚转移到海水中培养观察, 每天早晚各换水 1 次, 每次换水量为一半, 及时清除其中的杂质和死卵。

1.6 数据处理

实验数据用 Statistica(Version 6.0)进行分析处理, 不同数据之间用 Duncan’s 多重比较法进行多重比较, 当 $P<0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 各期胚胎在玻璃化液中的平衡时间和玻璃化适宜时期的筛选结果

中华绒螯蟹各期胚胎在 A 号玻璃化液中的平衡时间及成活率如图 1 所示。从图中可见, 卵裂期胚胎在 A 号玻璃化液中的平衡时间较短, 耐受性较低, 平衡 20 min 后经蔗糖洗脱培养, 成活率为 $(22.15 \pm 5.16)\%$, 平衡 50 min 后经洗脱培养, 胚胎全部死亡。

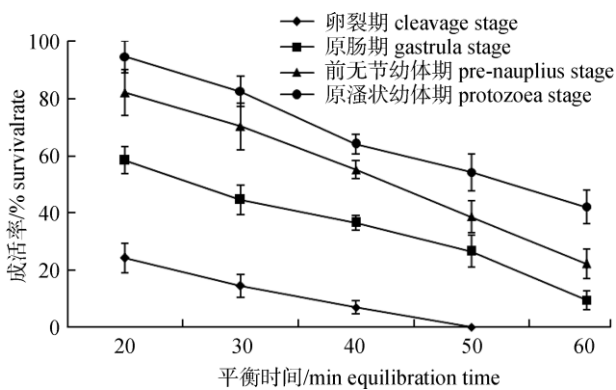


图 1 中华绒螯蟹各期胚胎在 A 号玻璃化液中平均成活率的变化

Fig. 1 The varying curve of survival rates of *Eriocheir sinensis* embryos in different stages in vitrifying solution of code A

原肠期胚胎利用五步法平衡 20、30、40、50 和 60 min 后, 成活率分别为 $(59.8 \pm 4.81)\%$ 、 $(42.5 \pm 5.23)\%$ 、 $(36.45 \pm 3.62)\%$ 、 $(24.45 \pm 5.59)\%$ 和 $(7.9 \pm 3.25)\%$, 随平衡时间的延长, 胚胎成活率逐渐下降。

前无节幼体期胚胎采用五步法平衡 20、30、40、50 和 60 min 后, 成活率分别为 $(81.9 \pm 8.06)\%$ 、 $(70.1 \pm 8.06)\%$ 、 $(55 \pm 3.11)\%$ 、 $(38.55 \pm 5.59)\%$ 和 $(22.1 \pm 5.23)\%$ 。前无节幼体期胚胎对 A 号玻璃化液有较强的耐受能力。

原溞状幼体期胚胎采用五步法平衡 20、30、40、50 和 60 min 后, 成活率分别为 $(94.55 \pm 5.59)\%$ 、 $(82.4 \pm 5.37)\%$ 、 $(63.95 \pm 3.46)\%$ 、 $(54.05 \pm 6.58)\%$ 和 $(42 \pm 5.94)\%$ 。与前面几个胚胎时期相比, 原溞状幼体期胚胎对玻璃化液的耐受能力最强。

中华绒螯蟹胚胎在 A 号玻璃化液中随着平衡时间的延长, 其成活率逐渐下降, 前无节幼体期和原溞状幼体期胚胎在玻璃化液中的适宜平衡时间最长。不同时期的胚胎对玻璃化液的耐受能力不同, 卵裂期胚胎对玻璃化液的耐受性最差, 发育至原溞状幼体期时, 胚胎的耐受能力最强。由此分析, 中华绒螯蟹原溞状幼体期胚胎最适合于进行玻璃化液的处理。各时期胚胎较适合的冻前平衡时间见表 2。

表 2 中华绒螯蟹各时期胚胎在 A 号玻璃化液中较适平衡时间

Tab. 2 The optimal equilibration time of *Eriocheir sinensis* embryos in code A vitrifying solution

胚胎时期 stage of embryos	较适平衡时间/min optimal equilibration time	成活率/% survival rate
卵裂期 cleavage stage	20–30	13.35–22.15
原肠期 gastrula stage	30–40	36.45–42.5
前无节幼体期 pre-nauplius stage	40–50	38.55–55
原溞状幼体期 protozoa stage	40–60	42–63.95

2.2 不同洗脱时间对胚胎成活率的影响

将中华绒螯蟹前无节幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中采用五步法平衡 40 min 后, 0.25 mol/L 的蔗糖分别洗脱 5、10、15、20 min 后, 培养成活率

分别为(41.4±6.93)%、(55±3.11)%、(50±5.94)%和(44±5.37)%,洗脱 10 min 时胚胎的成活率最高(图 2)。统计分析表明,洗脱时间在 5~20 min 之间胚胎的成活率无显著性差异($P>0.05$)。

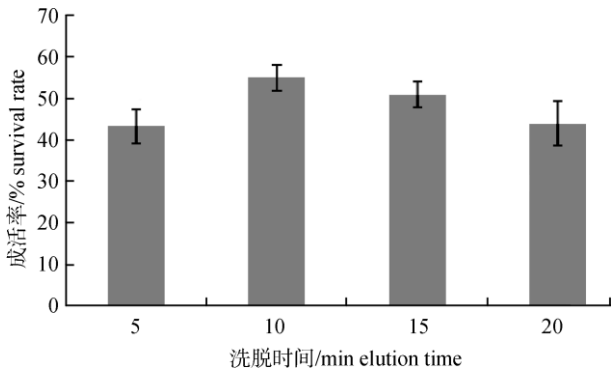


图 2 中华绒螯蟹前无节幼体期胚胎在不同洗脱时间下的成活率

Fig. 2 Survival rate of *Eriocheir sinensis* pre-nauplius stage embryos in different elution time

2.3 中华绒螯蟹胚胎玻璃化冷冻结果

中华绒螯蟹各期胚胎玻璃化冷冻保存结果如表 3 所示。卵裂期胚胎在 A 号玻璃化液中平衡 30 min,在-196℃冷冻 40 min 后,经解冻培养,胚胎透明率为(3.25±1.24)%;原肠期胚胎在 A 号玻璃化液中分别平衡 30、40、50、60 min 后,在-196℃冷冻 20、25、35、42 min 后,经解冻培养,胚胎透明率分别为(4.3±1.6)%、(15.6±3.5)%、(9.4±2.8)%和(8.2±3.4)%;前无节幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中分别平衡 40、50、60 min,在-196℃冷冻 40、48、56 min,解冻培养后胚胎透明率分别为(9.3±2.5)%、(5.6±1.8)%和(2.8±2.6)%;原溞状幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中分别平衡 40、50、60 min,在-196℃冷冻 35、45、72 min 后,解冻培养后胚胎透明率分别为(11.3±3.6)%、(8.9±2.4)%和(4.2±1.8)%。

表 3 中华绒螯蟹胚胎玻璃化冷冻结果

Tab. 3 Results of vitrifiable cryopreservation of *Eriocheir sinensis* embryos

胚胎时期 stage of embryos	平衡时间/min equilibration time	冷冻时间/min freezing time	总样本数 total specimens	透明胚率/% percentage of transparent embryos	成活胚数 number of alive embryos	成活率/% survival rate	成活时间 /d alive time
卵裂期 cleavage stage	30	40	45	3.25±1.24	0		
原肠期 gastrula stage	30	20	36	4.3±1.6	0		
	40	25	47	15.6±3.5	0		
	50	35	56	9.4±2.8	0		
	60	42	38	8.2±3.4	0		
前无节幼体期 pre-nauplius stage	40	40	86	9.3±2.5	8		
	50	48	52	5.6±1.8	0	9.3±2.5	4
	60	56	62	2.8±2.6	0		
原溞状幼体期 protozoa stage	40	35	62	11.3±3.6	7		
	50	45	56	8.9±2.4	0	11.3±3.6	7
	60	72	43	4.2±1.8	0		

卵裂期和原肠期胚胎经过不同时间的平衡和冷冻后,胚胎能保持一定比例的透明率,但未能成活。前无节幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中平衡 40 min,-196℃冷冻 40 min 后快速解冻,再用 0.25 mol/L 蔗糖洗脱 10 min(预实验结果),将胚胎移入盐度 15 的海水中培养,共有 8 个胚胎成活,成活率为(9.3±2.5)%,在显微镜下观察,胚胎发育正常(图版 I-A),培养 2 d 后心跳出现,心跳频率为 56

次/min(图版 I-B)。与对照组胚胎相比,冻后胚胎卵膜表面较粗糙。冻后胚胎培养 96 h 后发育至原溞状幼体前期,心跳正常,胚体转动,但浮力有所下降,身体稍有发白,卵膜边缘模糊(图版 I-C)。

原溞状幼体期胚胎在 A 号玻璃化液中平衡 40 min,-196℃冷冻 35 min 后快速解冻,经蔗糖洗脱海水培养,共有 7 个胚胎成活,成活率为(11.3±

3.6)%。显微镜下观察, 冻后培养第 2 天胚胎卵膜表面光滑完整, 与对照组胚胎外形上无明显区别(图版 I-D); 培养至第 3 天, 胚胎体内黑色素增加, 外部形态完整(图版 I-E); 培养至第 4 天时, 胚胎内卵黄物质减少, 复眼明显变大, 外部形态保持完整(图版 I-F); 培养至第 5 天时, 胚胎细胞膜变得稍有模糊, 胚体颜色加深, 心跳频率达到 150 次/min(图版 I-G); 培养至第 6 天, 胚体尾部从膜中脱出, 身体弯曲成一团, (图版 I-H), 尾部可以活动; 培养至第 7 天, 胚胎完全孵化出膜, 附肢可以自由活动, 但与对照组出膜幼体相比, 幼体颜色发黑, 表面较为模糊, 幼体全长 1.5 mm 左右(图版 I-I)。出膜后幼体存活了 1 d, 即冻后培养至第 8 天时死亡。

3 讨论

3.1 关于玻璃化液的筛选

本研究利用具有较低毒性和较强玻璃化形成能力的 1, 2-丙二醇^[17]与甲醇、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺在不同浓度下进行组合, 形成了 40 种浓度为 30%~60% 的抗冻剂。经冷冻和解冻, 对甲壳动物胚胎玻璃化液进行了系统的筛选, 结合各期胚胎在玻璃化液中平衡处理后的成活率结果, 筛选出 A 号玻璃化液作为最佳抗冻剂配方, 使用该玻璃化液保存中华绒螯蟹前无节幼体期和原溞状幼体期胚胎, 胚胎获得了成活, 成活率在 9.3%~11.3%, 原溞状幼体期冻后胚胎 1 个出膜。

3.2 胚胎最适平衡时间及最适宜胚胎玻璃化冷冻时期

本研究中, 中华绒螯蟹不同时期胚胎对玻璃化液的耐受性显著不同, 卵裂期胚胎对玻璃化液的耐受性最差, 适宜平衡时间最短, 随胚胎发育的进行, 胚胎对玻璃化液的适应性逐渐增强, 原肠期、前无节幼体期和原溞状幼体期对玻璃化液的适应能力较强, 适宜平衡时间增加, 这 3 个时期的胚胎都适合进行玻璃化处理, 但原溞状幼体期胚胎适宜平衡时间最长, 因此确定原溞状幼体期作为中华绒螯蟹最适宜玻璃化冷冻保存的胚胎发育时期。

通过研究胚胎在不同平衡时间中的成活率, 确立了中华绒螯蟹胚胎在玻璃化液中的最佳平衡时间为 40 min, 最适宜的平衡方法为五步法。目前为止, 尚未见甲壳动物胚胎玻璃化冷冻保存的报道, 难以进行相关结果的比较, 但与鱼类等水生生物胚胎冷冻保存研究结果比较, 花鲈出膜前期胚在玻璃化液中的最佳平衡时间为 70 min^[13], 大菱鲆 4~5 对肌节胚和牙鲆肌肉效应期胚胎最佳平衡时间均为 50 min^[14-15]。与这几种鱼类相比, 中华绒螯蟹胚胎适宜平衡时间较短, 原因可能是中华绒螯蟹胚胎内所含水分较少, 玻璃化液在短时间内可以完全脱除胚胎细胞内的水分达到渗透平衡。研究中也证实胚胎平衡时间过长, 胚胎成活率显著下降, 冷冻后胚胎不能成活, 延长胚胎在玻璃化液中的平衡时间可能导致脱水过度, 但有关胚胎在玻璃化液中的渗透脱水性还有待更进一步研究。

3.3 不同洗脱时间对胚胎成活率的影响

胚胎经过玻璃化液处理、冷冻解冻后, 玻璃化液的去除是非常重要的步骤。洗脱时间太短, 玻璃化液脱除不彻底, 对胚胎有一定毒性, 洗脱时间过长, 将会出现渗透失衡, 影响胚胎的成活率。学者研究表明在鲤(*Cyprinus carpio*)胚胎程序化冷冻中利用 0.1 mol/L 蔗糖洗脱抗冻剂后成活率最高^[18], 牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存中利用 0.125 mol/L 蔗糖洗脱效果最好^[15], 花鲈胚胎玻璃化冷冻保存中利用 0.5 mol/L 蔗糖洗脱效果最好^[19]。本研究利用 0.25 mol/L 蔗糖作为洗脱液, 开展了不同洗脱时间对胚胎成活率影响的研究, 发现洗脱 10 min 后胚胎成活率最高, 洗脱 5~20 min 内胚胎成活率无显著性差异。

3.4 中华绒螯蟹胚胎超低温冷冻保存

本研究利用自行筛选配制的 A 号玻璃化液对中华绒螯蟹卵裂期、原肠期、前无节幼体期和原溞状幼体期胚胎进行了玻璃化液适应性研究和超低温冷冻保存研究, 采用五步平衡法, 实现了中华绒螯蟹前无节幼体期和原溞状幼体期胚胎玻璃化冷冻后的成活, 其中前无节幼体期胚胎成活 8 个, 存活时间 4 d, 原溞状幼体期胚胎成活 7 个,

存活时间 7 d, 1 个胚胎孵化出膜, 成活率 9.3%~11.3%, 这在甲壳动物胚胎冷冻保存研究中尚属首次。水生生物胚胎冷冻保存已在多种鱼类中进行过实验, 泥鳅胚胎玻璃化冷冻后获得了成活, 但胚胎未能出膜^[12]; 牙鲆胚胎经玻璃化冷冻后共成活胚胎 5 粒, 其中 4 粒孵化出膜, 成活率为 1.64%~6.67%^[15]; 大菱鲆胚胎玻璃化冷冻后, 1 个胚胎孵化出膜^[14]; 花鲈胚胎冷冻保存后取得了 3 粒成活胚, 1 粒孵化出膜。与这些研究结果相比, 尽管中华绒螯蟹胚胎经玻璃化冷冻后只有 1 个孵化出膜, 但解冻后胚胎成活率较高, 冷冻后成活时间也较长(7 d), 表明采用这种冷冻保存方法效果较好, 但在后期的解冻培养过程中, 还需对培养方法进一步完善和改进, 以提高冻后胚胎的出膜率。

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): 161-168.
- [2] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998: 68-70.
- [3] Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. [J]. Nature, 1985, 313: 573-575.
- [4] 朱士恩, 曾申明, 安晓荣. 绵羊体内外受精胚胎玻璃化冷冻保存[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(3): 302-305.
- [5] Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, et al. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization[J]. Mol Reprod dev, 1993, 34: 266-271.
- [6] Hochi S, Fujimoto T, Choi Y H, et al. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification[J]. Theriogenology, 1994, 42: 483-488.
- [7] Stoss J, Donaldson E M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout and coho salmon [J]. Aquaculture, 1983, 31: 51-61.
- [8] Erdahl D A. Preservation of spermatozoa and ova from freshwater fish [M]. Minnesota, USA: Thesis of University of Minnesota, 1986: 120-125.
- [9] Zhang T, Rawson D M, Morris G J. Cryopreservation of pre-hath embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. Aquat Living Resour, 1993, 6(2): 145-153.
- [10] 张克俭, 楼允东, 张饮江, 等. 三种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温 and 复温速率的研究[J]. 水产学报, 1997, 21: 366-372.
- [11] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鱼类胚胎低温冷冻保存降温速率研究[J]. 淡水渔业, 1994, 24: 3-5.
- [12] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 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): 213-218.
- [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] 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.
- [15] 田永胜, 陈松林, 严安生. 牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(3): 105-110.
- [16] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 玻璃化液对鲢鱼胚胎成活的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(5): 7-10.
- [17] 华泽钊, 任丕盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 85-90.
- [18] Zhang X S, Zhao L, Hua T C, et al. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos [J]. Cryoletters, 1989, 10: 271-278.
- [19] 田永胜. 三种海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

Cryopreservation of *Eriocheir sinensis* embryos by vitrification

HUANG Xiaorong, ZHUANG Ping, ZHANG Longzhen, FENG Guangpeng, LIU Jianyi, ZHANG Tao, ZHAO Feng

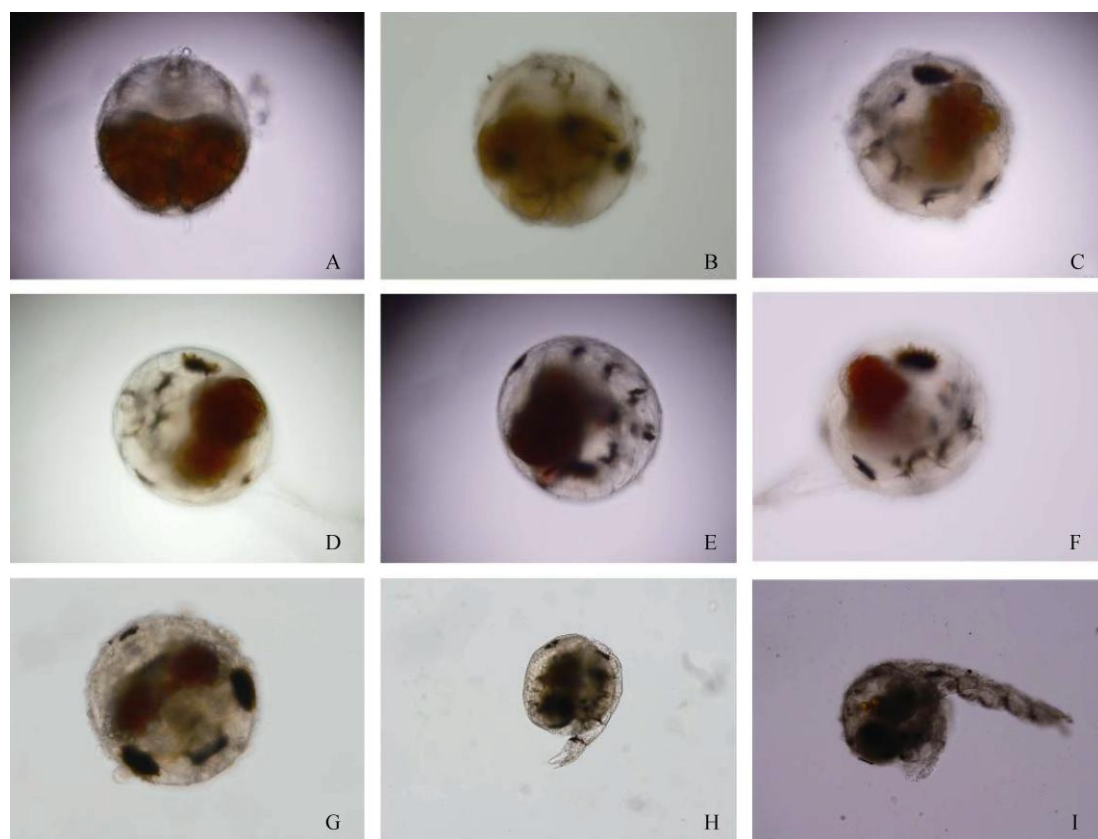
East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Shanghai 200090, China

Abstract: We evaluated the tolerance of *Eriocheir sinensis* to code A vitrifying solution and vitrification cryopre-

servation at four stages of embryonic development. Resistance to the vitrifying solution varied during embryonic development, being lowest among cleavage stage embryos (20–30 min) and highest for pre-nauplius and protozoa stage embryos (40–60 min). Embryo survival decreased as the equilibration time in code A vitrifying solution increased. The survival of pre-nauplius stage embryos was not different when embryos were equilibrated for 40 min in code A vitrifying solution then eluted for 5, 10, 15, or 20 min using 0.25 mol/L sucrose. We measured survival of pre-nauplius stage embryos that were equilibrated for 40 min in code A vitrifying solution, frozen for 40 min at -196°C , then thawed rapidly and eluted for 10 min with sucrose. Eight embryos ($9.3 \pm 2.5\%$) survived this process, but died on 4 d after undergoing the freeze/thaw treatment. The experiment was repeated using protozoa stage embryos, although each embryo was only frozen for 35 min at -196°C . Seven embryos ($11.3 \pm 3.6\%$) survived and one embryo hatched on the sixth day post freeze/thaw. This individual died 1 d after hatch.

Key words: *Eriocheir sinensis*; embryo; vitrification; cryopreservation

Corresponding author: ZHUANG Ping. E-mail: pzhuang@online.sh.cn



图版 I 超低温冷冻后中华绒螯蟹胚胎发育

A. 前无节幼体期胚胎在A号玻璃化液中平衡处理40 min, 在 -196°C 冷冻40 min, 洗脱培养第2天; B. 前无节幼体期胚胎冷冻后第3天; C. 前无节幼体期胚胎冷冻后第4天; D. 原溞状幼体期胚胎在A号玻璃化液中平衡处理40min, 在 -196°C 冷冻35min后, 洗脱培养第2天; E. 原溞状幼体期胚胎冷冻后第3天; F. 原溞状幼体期胚胎冷冻后第4天; G. 原溞状幼体期胚胎冷冻后第5天; H. 原溞状幼体期胚胎冷冻后第6天, 尾部出膜后弯曲; I. 原溞状幼体期胚胎冷冻后第7天, 胚胎孵化出膜。

Plate I Embryonic development of *Eriocheir sinensis* after cryopreservation

A. the second day of pre-nauplius stage embryo after elution. It was equilibrated for 40 min in code A vitrifying solution and frozen for 40 min in liquid nitrogen; B. the third day of frozen pre-nauplius stage embryo; C. the fourth day of frozen pre-nauplius stage embryo; D. the second day of protozoa stage embryo after elution. It was equilibrated for 40 min in "A" vitrifying solution and frozen for 1h in liquid nitrogen; E. the third day of frozen protozoa stage embryo; F. the fourth day of frozen protozoa stage embryo; G. the fifth day of frozen protozoa stage embryo; H. the sixth day of frozen protozoa stage embryo, the tail curved; I. the seventh day of frozen protozoa stage embryo, the embryo hatched.