

文章编号:1000-0615(2012)11-1717-08

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.28078

超低温冷冻对中华绒螯蟹胚胎形态结构的影响

黄晓荣, 庄平*, 章龙珍, 冯广朋, 刘鉴毅, 张涛, 赵峰, 侯俊利

(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: 为了解超低温冷冻对胚胎形态结构的影响, 以中华绒螯蟹为研究对象, 运用石蜡切片、扫描电镜和透射电镜观察细胞分裂期、原肠期和原溞状幼体期胚胎, 分别用玻璃化液处理和经超低温冷冻后外部形态和内部结构的变化。结果发现: (1) 显微观察表明, 细胞分裂期胚胎在玻璃化液中用二步平衡法处理后吸水膨胀明显, 三步平衡后胚胎形态无明显变化, 超低温冷冻后, 卵黄物质从细胞中溢出, 细胞破损严重; 原肠期胚胎在玻璃化液中用二步平衡法处理后, 外部形态与鲜胚无明显差异, 经过冷冻后, 所有胚胎内部变成粉红色, 胚体由原来的透明变成不透明状, 细胞膜边缘模糊似绒毛状; (2) 扫描电镜观察, 玻璃化液处理后的所有原肠期胚胎表面褶皱呈沟壑状, 形成一层网状结构; 透射电镜观察, 处理后胚胎细胞内出现白色团块, 细胞边缘变得粗糙有突起, 细胞内冰腔清晰可见, 空泡形成, 80% 以上线粒体解体, 细胞破裂明显; (3) 组织切片观察, 原肠期胚胎细胞外面的膜脱落破损, 胚层内有大小不一的冰腔, 细胞内出现明显的空泡。原溞状幼体期胚胎经过玻璃化液处理后, 外部形态与鲜胚间无明显区别, 但经过超低温冷冻后, 95% 以上胚胎组织呈弥散状, 部分卵黄物质碎裂成颗粒状, 胚胎的细胞膜脱落, 胚层内出现大量冰腔和空泡, 90% 胚胎表面皱缩凹陷, 但仍有 10% 的胚胎表面保持光滑完整, 表明原溞状幼体期胚胎是适合进行冷冻保存的时期。

关键词: 中华绒螯蟹; 胚胎; 形态结构; 超低温冷冻

中图分类号: S 917

文献标志码: A

超低温冷冻保存技术在牛和小鼠等哺乳动物胚胎冷冻保存上已获得成功。鱼类等水生动物胚胎体积大, 相对表面积小, 这使抗冻剂的渗入和水的渗出速率相对降低^[1]; 卵膜的通透率低, 也限制了抗冻剂和水的渗透; 鱼类等水生生物胚胎具有高度的冷冻敏感性, 容易造成胚胎冷冻损伤^[2]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国传统的名特优水产珍品, 也是农业部确定的我国主导水产养殖品种。20 世纪 80 年代后期, 长江水系天然蟹苗资源急剧衰退, 为了降低养殖成本, 许多生产单位开始选用小规格蟹种甚至外水系的蟹种用于苗种培育, 导致长江水系中华绒螯蟹种质退化、混杂情况越来越严重^[3-5]。20 世纪 80 年代后, 长江口

中华绒螯蟹天然蟹苗量急剧下降, 到 2000 年已基本不能形成汛期。因此急需开展中华绒螯蟹胚胎的种质保存研究。水生生物尤其是鱼类胚胎的超低温冷冻研究已取得了较大进展^[6-19], 但甲壳动物胚胎保存研究还未见报道, 有关水生生物胚胎冷冻损伤机理的研究也鲜有报道^[20-21]。本实验综合运用显微摄像、石蜡切片和电镜技术观察了中华绒螯蟹胚胎冷冻前后的显微结构、组织结构和超微结构的变化, 旨在了解超低温冷冻对中华绒螯蟹胚胎外部形态和内部结构的影响, 阐明超低温冷冻对胚胎的冷冻损伤机理, 为开展中华绒螯蟹胚胎超低温冷冻保存提供理论依据和参考。

收稿日期: 2012-03-31 修回日期: 2012-08-28

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

通讯作者: 庄平, E-mail: pzhuang@online.sh.cn

<http://www.scxuebao.cn>

1 材料与方法

1.1 材料来源及饲养条件

从江苏省启东水产养殖场购买抱卵蟹 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, 第二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%。水质分析仪(YSI)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, 试验期间平均水温(16.2±1.5) °C, 盐度 15.1±0.5, pH 7.5~8.5, DO 6.0 mg/L 以上。

1.2 观察与记录

挑选质量好的抱卵蟹, 每隔 2 天用解剖针轻轻拨下 10~30 粒卵放入培养皿中, 在显微镜下观察拍照(Olympus), 记录胚胎发育时期。分别选取亲蟹抱卵后第 7 天、第 26 天和第 31 天所对应的细胞分裂期、原肠期和原蚤状幼体期胚胎作为研究时期。

1.3 胚胎冷冻过程

前期预实验表明, A 号玻璃化液(30% 1,2-丙二醇+20%二甲基甲酰胺)较适宜于中华绒螯蟹胚胎的冷冻保存。将中华绒螯蟹不同时期的胚胎在 A 号玻璃化液中进行分步平衡处理, 将配制好的梯度平衡液预先放置于 4 °C 恒温培养箱中预冷, 然后将胚胎在 4 °C 下利用梯度的玻璃化液从低浓度向高浓度按照二步法和三步法逐步平衡。(1)二步法, 用盐度 15 的海水将玻璃化液稀释成 1/2 的浓度, 每个时期的胚胎在 1/2 浓度和玻璃化液中分别平衡 20 min; (2)三步法, 用盐度 15 的海水将玻璃化液分别稀释成 1/4 和 1/2 的浓度, 每个时期的胚胎在 1/4、1/2 浓度和玻璃化液中各平衡约 13 min。取两种方法平衡后的胚胎进行显微摄像, 取三步平衡后的胚胎进行组织切片和电镜样品的固定处理, 另取部分胚胎装入冷冻保存管中, 在距液氮口 20 cm 处平衡 1 min 后, 直接投入液氮中保存, 冷冻 3 天后, 将样品放置于液氮口约 20 cm 处再平衡 1 min, 然后利用 38 °C 的水浴快速解冻, 0.25 mol/L 的蔗糖洗脱 10 min, 逐次加入盐度 15 的海水中培养, 取出解冻后的部分胚胎再进行显微摄像和样品的固定处理。

1.4 形态结构观察方法

显微结构观察 将不同分步法处理后的胚胎和冻后胚胎在显微镜(Olympus)下观察, 用 Image-Pro-Plus 5.1 软件拍照。

石蜡切片观察 取波恩氏液固定的不同时期胚胎 4~6 粒, 置于 30% 的乙醇溶液中让卵块展开, 浸没 10 min 后, 进行一系列浓度梯度乙醇的脱水操作, 脱水后在包埋机上将样品包埋在 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm 的正方体蜡块中, 4 °C 冰箱冷藏过夜, 在手动切片机上切片, 切片厚度设定为 6 μm, 摊片机上摊片、烤片和烘片。摊片温度设定为 44 °C, 烤片温度 40 °C, 待载玻片上无水之后, 置于烤片箱中, 烤片温度 35 °C, 24 h 后染色。将染好色的载玻片取出, 每片滴 2 滴中性树胶, 盖上盖玻片, 在通风橱中风干, 显微镜下观察。

扫描电镜观察 取三步平衡后的对照组、处理组和冻后胚胎 5~10 粒, 分别用 2.5% 的戊二醛固定(1.5 h 以上), pH 7.4 的 PBS 液漂洗 3 次, 1% 的锇酸固定 1.5 h, PBS 液洗一次, 梯度酒精脱水, 醋酸异戊酯过渡, 自然干燥, JEOL-6380LV 扫描电镜观察。

透射电镜观察 取三步平衡后的对照组、处理组和冻后胚胎 5~10 粒, 分别用 2.5% 的戊二醛固定, 保存在 4 °C 下备用。样品经 PBS 液漂洗 3 次后, 用 2% 的锇酸固定, 各级酒精梯度脱水, Epon812 树脂包埋, ULTRACUTE 超薄切片机切片, 厚度为 70~80 nm。样本经醋酸铀和柠檬酸铅染色, 置 HITACHI H-600 型透射电镜观察并拍照。

2 结果

2.1 外部形态的变化

细胞分裂期 细胞分裂期胚胎为圆形或椭圆形, 卵径(367±6) μm, 外部形态规则, 卵膜表面较为光滑, 内部物质排列致密(图版 I-1)。在玻璃化液中经过二步平衡处理后, 胚胎吸水膨大, 在细胞膜和细胞质间形成一环形空腔, 胚胎卵径达到(382±4) μm(图版 I-2), 经过三步平衡处理后, 处理后胚胎与对照组胚胎在外部形态上无明显区别(图版 I-3)。经过超低温冷冻后, 细胞膜颜色变深, 细胞膜和细胞质分界清晰可见, 卵黄物质破裂, 部分胚胎破裂成空壳状, 内部物质完全溶解(图版 I-4)。

原肠期 胚胎的一端出现一个透明区域, 外部形态规则, 卵膜表面光滑(图版 I-5)。扫描电镜下, 胚胎表面较为光滑, 表皮细胞平整, 相临细胞

交界处略微隆起, 界限连续完整清晰, 细胞表面的嵴(一种条纹状结构)呈波纹状(图版 II-1)。胚胎在玻璃化液中经过二步法和三步法处理后, 与对照组相比, 胚胎的外部形态都无明显变化(图版 I-6, 7)。但在扫描电镜下观察, 胚胎的表面变得粗糙, 部分胚胎的细胞表皮起皱成沟壑状, 形成一层网状结构(图版 II-2), 经过冷冻保存后, 胚胎内部颜色由浅黄色变为粉红色, 细胞由原来的透明变成不透明, 细胞膜边缘模糊, 形成绒毛状, 胚体内部分卵黄物质碎裂成颗粒状(图版 I-8)。扫描电镜下, 与对照组相比, 胚胎表皮细胞从平展变得皱缩, 周缘下陷, 与处理组相比, 胚胎表面的褶皱加深, 细胞表面的部分嵴断裂, 细胞变形和破损明显(图版 II-3)。

原溞状幼体期 胚胎的透明区继续扩大, 约占 2/3~1/2, 复眼的发育基本完成, 卵黄收缩呈蝴蝶状, 卵黄囊的背部开始出现心脏原基, 不久心脏开始跳动(图版 I-9)。扫描电镜下, 表皮细胞排列紧密, 体表有均匀分布的小孔, 外表光滑完整(图版 II-4), 胚胎在玻璃化液中经过二步和三步平衡处理后, 与对照组相比, 胚胎外部形态无明显变化(图版 I-10, 11)。扫描电镜下, 胚胎外表保持光滑完整, 表面上的小孔清晰可见, 细胞上的嵴未见明显破损, 整个胚胎与对照组胚胎在外部形态上基本保持一致(图版 II-5)。经过超低温冷冻后, 胚体内原本透明的结构变得模糊, 部分组织呈弥散状, 部分卵黄物质碎裂成颗粒状(图版 I-12)。扫描电镜下, 大部分胚胎表皮凹陷皱缩, 但未见明显破损, 少数胚胎表面保持光滑完整(图版 II-6)。

2.2 内部结构的变化

原肠期胚胎 这个时期胚层分化完成, 各器官也逐步分化。胚胎纵切面可以看到, 胚胎表皮细胞排列紧密, 彼此界限清晰, 细胞内卵黄为颗粒状, 有膜包被, 周缘光滑, 彼此分离(图版 III-1)。透射电镜下观察, 胚胎细胞排列整齐, 边缘光滑, 细胞间分界清晰(图版 II-7)。经过玻璃化液处理后, 透射电镜下观察, 胚胎细胞内出现白色不规则团块, 细胞边缘变得粗糙有突起(图版 II-8, 9)。经过超低温冷冻后, 组织切片观察, 胚胎细胞外面的膜脱落破损, 胚层内有大小不一的冰腔, 细胞内出现明显的空洞(图版 III-2, 3)。透射电镜下, 细胞内形成冰腔清晰可见, 胚胎内出现黑色斑点和小空泡, 大部分线粒体解体, 细胞损伤明显(图版 II-10, 11, 12)。

原溞状幼体期 器官进一步分化定型。冷冻前胚胎内细胞排列较为紧密, 彼此界限清晰(图版 III-4)。经过超低温冷冻后, 胚胎的细胞膜破碎脱落, 胚层内出现很多冰腔和空泡, 胚胎内破裂清晰可见(图版 III-5, 6)。

3 讨论

水生生物胚胎的特点是原卵子的体积大, 卵黄多, 外面包被有两层不通透的卵膜, 在冷冻保存中难以达到抗冻剂的充分渗透和内外均衡冷冻, 保存难度较大。中华绒螯蟹胚胎属于小型卵, 但其体积也是哺乳动物胚胎的 7~8 倍大, 卵黄占大部分体积, 冷冻后卵黄颗粒容易破裂, 此外, 胚胎卵膜是半透性膜, 对一些大分子量的抗冻剂渗透性差, 因此冷冻保存较为困难。Harvey^[22]发现完整的斑马鱼(*Brachydanio rerio*)卵子在室温下 2 h 对 1 mol/L DMSO 的吸收率只有 2.5%, 但去掉卵膜后吸收率成倍增加, 达到 11%。这一研究结果证实, 水生生物胚胎卵膜对抗冻剂的渗透性差, 也可能是水生生物胚胎冷冻保存迄今为止尚未真正突破的原因之一。

有关超低温冷冻对胚胎形态结构影响的研究鲜有报道, 笔者通过扫描电镜观察了冷冻前后中华绒螯蟹胚胎外部形态的变化。冷冻前, 胚胎表皮细胞平整光滑, 细胞表面的嵴连续清晰, 细胞间相互连接, 冷冻后胚胎皱缩, 表面的嵴断裂, 细胞彼此分离, 这些变化明显是由细胞失水引起。青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)胚胎由于卵周隙大, 经冷冻复温后, 外包的卵膜破裂, 胚胎表皮细胞变形^[20], 与本研究结果相似。中华绒螯蟹胚胎体积大, 在冷冻保存过程中, 卵周隙中的大量水分来不及外渗, 造成卵周隙中冰晶形成, 胞外冰导致细胞和肌纤维的破裂、挤压和变形, 胞内冰导致细胞器和膜系统的破坏。泥鳅(*Misgurnus anquillicaudatus*)胚胎经过冷冻后, 胚体收缩, 卵黄颗粒破裂, 细胞里胞内冰和胞外冰都有发生, 冰腔出现^[21], 与本研究中中华绒螯蟹冻后胚胎出现冰晶的结果类似。低温也能对胚胎形成直接损伤, 泥鳅胚胎经过冷冻后, 冻后的肌原纤维和 A 带变得模糊^[21], 低温可使蛋白质分子解聚, 肌原纤维解体, 还可导致酶蛋白四聚体的解聚, 使之丧失生理机能。本研究中, 经过超低温冷冻后, 中华绒螯蟹胚胎的大部分线粒体解体, 组织结构松散易碎, 细胞膜严重脱落, 这些变

化可能会影响冻后胚胎的成活和继续发育,这也有待于更进一步研究。

本研究中,中华绒螯蟹细胞分裂期胚胎在玻璃化液中经过二步法平衡后,胚胎吸水膨胀明显,三步法处理后胚胎外形与对照组无明显区别,表明二步平衡法不适合细胞分裂期的处理。原肠期胚胎采用二步法平衡后,胚胎外部形态与对照组胚胎无明显变化,表明原肠期胚胎对玻璃化液的耐受性比细胞分裂期强。扫描电镜下观察,中华绒螯蟹原肠期胚胎经过玻璃化液处理后,胚胎的表面粗糙不平,部分胚胎的细胞表皮似沟壑状,冷冻后细胞破损严重;原蛻状幼体期胚胎经过玻璃化液处理后,胚胎与鲜胚在外部形态上无明显变化,经过超低温冷冻后,部分胚胎的表面保持光滑完整,与鲜胚外形无明显区别,这一研究结果也表明中华绒螯蟹原蛻状幼体期胚胎对玻璃化液和低温的耐受性高于原肠期和细胞分裂期胚胎。在前期的研究中,用中华绒螯蟹原蛻状幼体期胚胎作为保存时期,经过超低温冷冻后成功获得出膜幼体,结果与本研究保持一致,表明中华绒螯蟹原蛻状幼体期胚胎对玻璃化液和低温的耐受性较强,是适合进行冷冻保存的时期。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Wallace R A, Selman K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians [J]. Journal of Electron Microscopy Technology, 1990, 16(3): 175-201.
- [3] 李晨虹, 李思发. 中国大陆沿海六大水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: 形态判别[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 337-342.
- [4] 李晓辉, 许志强, 葛家春, 等. 长江水系中华绒螯蟹种质资源研究进展[J]. 水产养殖, 2009, 30(10): 42-47.
- [5] 张代臻, 孙红英, 张华彬, 等. 绒螯蟹的分类与中华绒螯蟹种质资源研究进展[J]. 广西科学院学报, 2007, 23(2): 129-132.
- [6] 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.
- [7] Chen S L, Tian Y S. Cryopreservation of flounder embryos by vitrification [J]. Theriogenology, 2005, 63(4): 1207-1219.
- [8] 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): 81-86.
- [9] 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): 320-327.
- [10] 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): 81-86.
- [11] 田永胜, 陈松林, 严安生. 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 275-280.
- [12] Chao N H, Lin T L, Chen Y J, et al. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam [J]. Aquaculture, 1997, 155: 31-44.
- [13] Paredes E, Bellas J. Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies[J]. Cryobiology, 2009, 59 (3): 344-350.
- [14] Stoss J, Donaldson E M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout and coho salmon [J]. Aquaculture, 1983, 31(1): 51-65.
- [15] Zhang T, Rawson D M, Morris G J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Aquatic Living Resource, 1993, 6(2): 145-153.
- [16] Strussmann C A, Nakatsugawa H, Takashima F, et al. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: Effects of cell stage, cryoprotectant concentration and cooling rate on postthawing survival[J]. Cryobiology, 1999, 39(3): 252-261.
- [17] 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.
- [18] Zhang T, Rawson D M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos [J]. Cryobiology, 1995, 32(3): 239-246.
- [19] Robertson S M, Lawrence A L. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, ethylene glycol, methanol, sucrose and sea salt solutions to the embryos of red drum [J]. The Progressive Fish-Culturist, 1988, 50(3): 148-154.
- [20] 赵维信, 姜任良, 刘修英, 等. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究[J]. 淡水渔业, 1992, 5: 3-5.
- [21] 曾志强, 张轩杰. 泥鳅胚胎冷冻前后生物学性状变化研究[J]. 湖南师范大学学报:自然科学版, 1995, 18(4): 40-44.
- [22] Harvey B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms and intact embryos of the zebrafish to -196 °C [J]. Cryobiology, 1983, 20(4): 440-447.

Effects of cryopreservation on exterior shape and interior structure of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) embryos

HUANG Xiao-rong, ZHUANG Ping*, ZHANG Long-zhen,

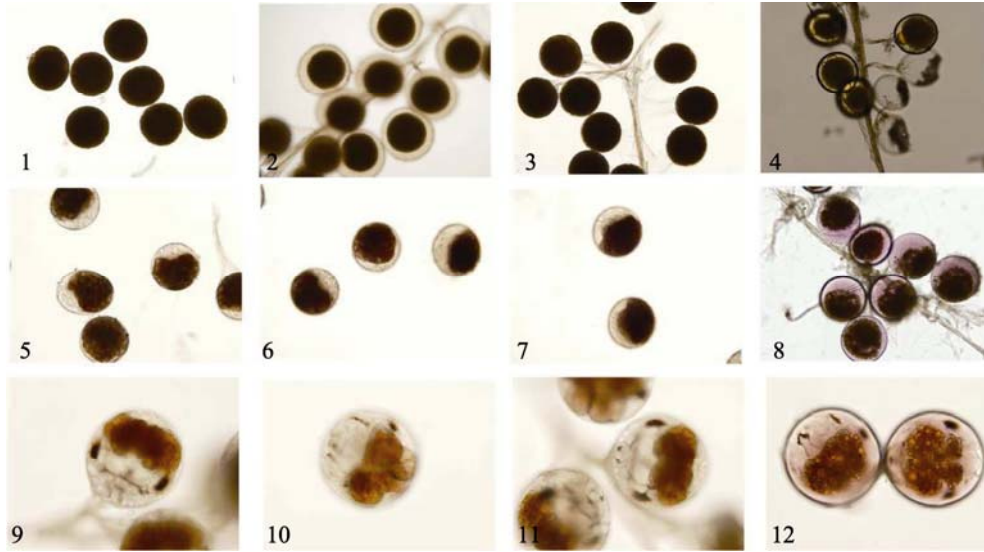
FENG Guang-peng, LIU Jian-yi, ZHANG Tao, ZHAO Feng, HOU Jun-li

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

Abstract: In order to deeply understand the effects of cryopreservation on the configuration of embryos, we chose the *Eriocheir sinensis* as the object, and observed the exterior shapes and interior structure of different developmental stages embryos after treatment with cryoprotectants and cryopreservation by means of microscope, slice and electron microscopy. Results showed that: (1) Cleavage embryos swelled clearly after treatment with vitrifying solutions by two-step methods, exterior shape of the embryos had no significant difference compared to the control group by three-step equilibration methods, some yolk overflowed from the inner cells and cells were damaged seriously after cryopreservation. (2) Exterior shape of gastrula stage embryos was similar to the control group after treatment with two-step equilibration methods, surface of gastrula stage embryo treated with cryoprotectants crinkled and shaped reticulation structure by scanning electron microscopy (SEM), white goblet appeared in cells of embryos and fringe of cell was coarse and protuberant by transmission electron microscopy (TEM). After cryopreservation, color of embryos was pink, cell became opaque, the brim of cell membrane was blurry and shaped floss, segmental yolk was disintegrated into granule, the surface of embryos was sunken and wrinkled. (3) Cell membrane of embryos broke off, ice holes of different size appeared inside embryos, visible vacuoles appeared inside cells by slice observation. Ice holes in cells were very clear and some vacuoles appeared, about 80% mitochondria dissolved, breach of cells was very obvious by TEM. Exterior shape of the original zoea stage embryos had no difference compared to that of the control group after treatment with cryoprotectants by microscope and SEM. After cryopreservation, above 95% tissues shaped dispersion, partial yolk was disintegrated into granule, cell membrane of embryos broke off, ice holes appeared inside embryos. Surface of 90% embryos was sunken and wrinkled, but the cuticle of 10% embryos retained slick and intact by SEM. The results implied that the original zoea stage of embryos was the appropriate stage for cryopreservation.

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

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

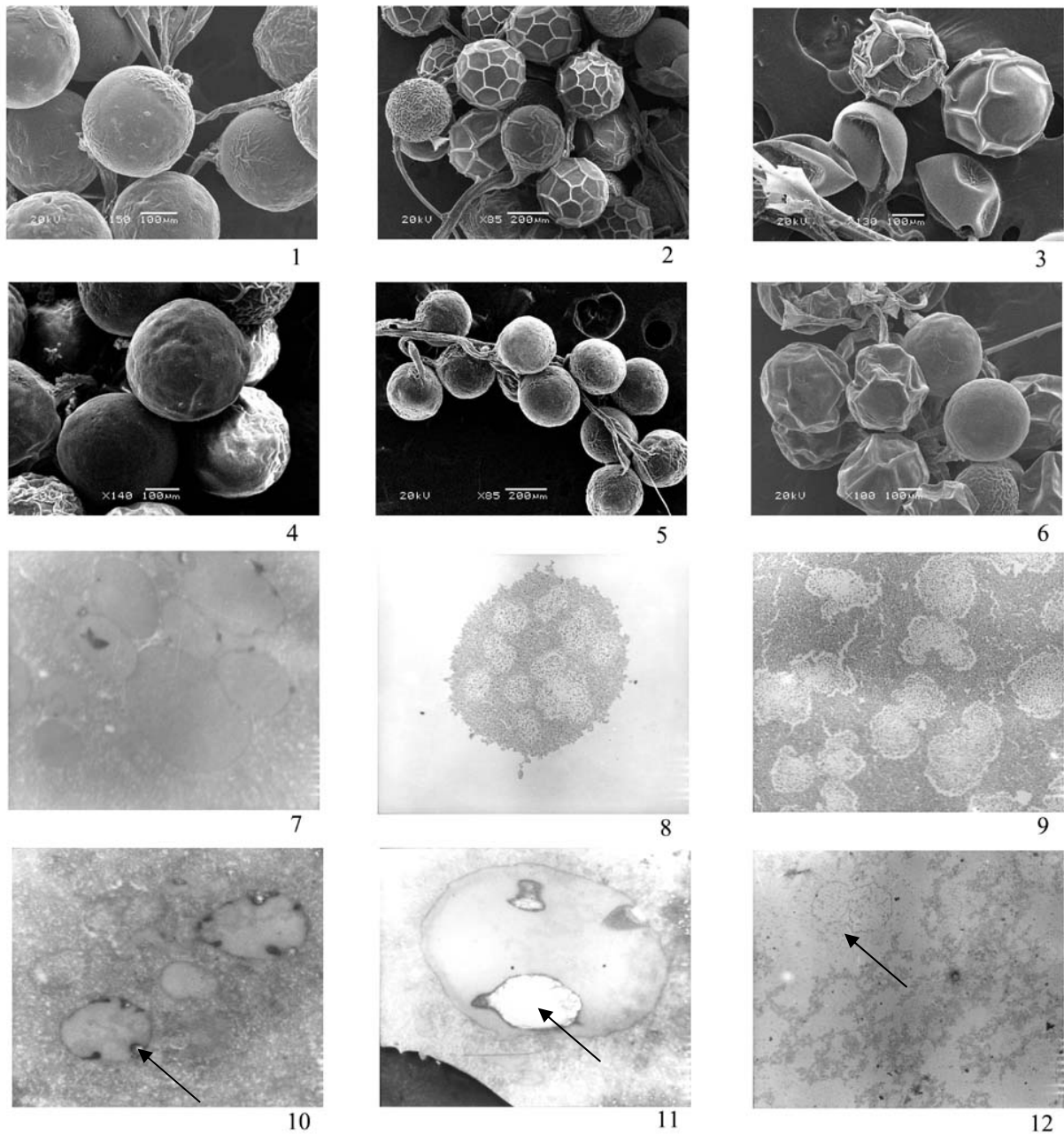


图版 I 胚胎冷冻前后的显微结构

1. 细胞分裂期胚胎 ($\times 100$); 2. 二步平衡处理后细胞分裂期胚胎 ($\times 100$); 3. 三步平衡处理后细胞分裂期胚胎 ($\times 100$); 4. 冷冻后细胞分裂期胚胎 ($\times 100$); 5. 原肠期胚胎 ($\times 100$); 6. 二步平衡处理后原肠期胚胎 ($\times 100$); 7. 三步平衡处理后原肠期胚胎 ($\times 100$); 8. 冷冻后原肠期胚胎 ($\times 100$); 9. 原溞状幼体期胚胎 ($\times 200$); 10. 二步平衡处理后原溞状幼体期胚胎 ($\times 200$); 11. 三步平衡处理后原溞状幼体期胚胎 ($\times 200$); 12. 冷冻后原溞状幼体期胚胎 ($\times 200$)。

Plate I Microstructure of embryos before and after cryopreservation

1. cleavage stage embryos ($\times 100$); 2. cleavage stage embryos treatment with 2 steps equilibration ($\times 100$); 3. cleavage stage embryos treatment with 3 steps equilibration ($\times 100$); 4. cleavage stage embryos after cryopreservation ($\times 100$); 5. gastrula stage embryos ($\times 100$); 6. gastrula stage embryos treatment with 2 steps equilibration ($\times 100$); 7. gastrula stage embryos treatment with 3 steps equilibration ($\times 100$); 8. gastrula stage embryos after cryopreservation ($\times 100$); 9. original zoea stage embryos ($\times 200$); 10. original zoea stage embryos treatment with 2 steps equilibration ($\times 200$); 11. original zoea stage embryos treatment with 3 steps equilibration ($\times 200$); 12. original zoea stage embryos after cryopreservation ($\times 200$).

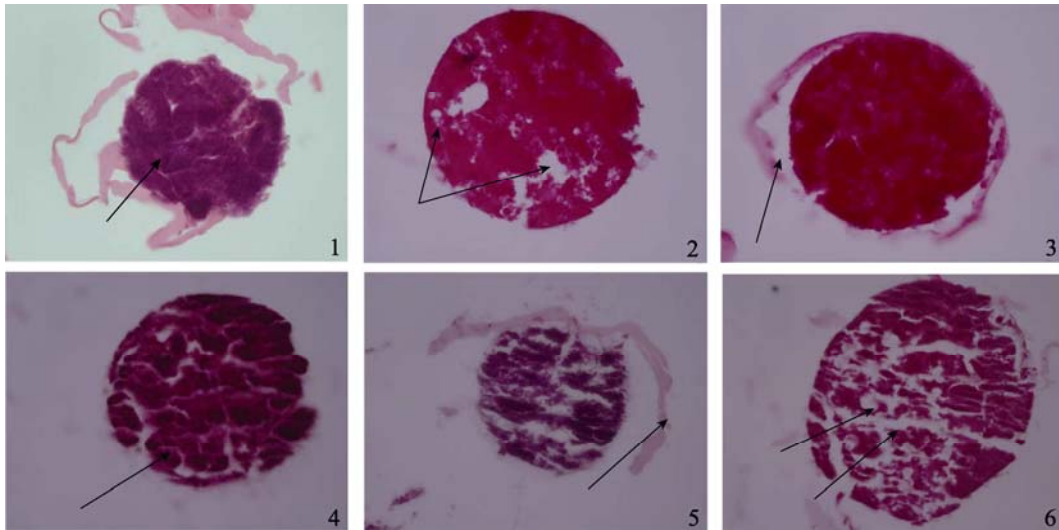


图版 II 胚胎冷冻前后超微结构

1.扫描电镜下原肠期胚胎; 2. 扫描电镜下抗冻剂处理后原肠期胚胎; 3. 扫描电镜下冷冻后原肠期胚胎; 4. 扫描电镜下原溞状幼体期胚胎; 5. 扫描电镜下抗冻剂处理后原溞状幼体期胚胎; 6. 扫描电镜下冷冻后原溞状幼体期胚胎; 7. 透射电镜下原肠期胚胎($\times 20000$); 8-9. 透射电镜下抗冻剂处理后原肠期胚胎($\times 17000$); 10-12. 透射电镜下冷冻后原肠期胚胎($\times 8000$), 10 中箭头示空泡, 11 中箭头示冰腔, 12 中箭头示线粒体溶解。

Plate II Ultrastructure of the embryos before and after cryopreservation

1. gastrula stage embryos with scanning electron microscope (SEM); 2. gastrula stage embryos by cryoprotectant with SEM; 3. gastrula stage embryos after cryopreservation with SEM; 4. original zoea stage embryos with SEM; 5. original zoea stage embryos by cryoprotectant with SEM; 6. original zoea stage embryos after cryopreservation with SEM; 7. gastrula stage embryos with transmission electron microscopy (TEM) ($\times 20000$); 8-9. gastrula stage embryos by cryoprotectant with TEM ($\times 17000$); 10-12. gastrula stage embryos after cryopreservation with TEM ($\times 8000$), the arrow in figure 10 showed the vacuole, the arrow in figure 11 showed ice hole, the arrow in figure 12 showed mitochondria dissolved.



图版 III 胚胎冷冻前后的组织结构

1. 原肠期胚胎组织结构, 箭头示卵黄颗粒($\times 200$); 2. 冷冻后原肠期胚胎组织结构, 箭头示冰腔和空泡($\times 200$); 3. 冷冻后原肠期胚胎组织结构, 箭头示细胞膜脱落($\times 200$); 4. 原蚤状幼体期胚胎组织结构, 箭头示卵黄颗粒($\times 200$); 5. 冷冻后原蚤状幼体期胚胎组织结构, 箭头示细胞膜脱落($\times 200$); 6. 冷冻后原蚤状幼体期胚胎组织结构, 箭头示冰腔和细胞碎裂($\times 200$)。

Plate III Tissue structure of embryos before and after cryopreservation

1. tissue structure of gastrula stage embryos ($\times 200$), arrow showed the yolk particles; 2. tissue structure of frozen gastrula stage embryos, arrow showed ice hole and vacuole ($\times 200$); 3. tissue structure of frozen gastrula stage embryos, arrow showed cell membrane break off; 4. tissue structure of original zoea stage embryos, arrow showed the yolk particles; 5. tissue structure of frozen original zoea stage embryos, arrow showed cell membrane break off; 6. tissue structure of frozen original zoea stage embryos, arrow showed ice hole and cracked cell.