

文章编号:1000-0615(2005)02-0275-06

·研究简报·

大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存

田永胜, 陈松林, 于过才, 季相山

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

关键词:大菱鲆;胚胎;玻璃化;冷冻保存

中图分类号:S984.1

文献标识码:A

Cryopreservation of *Scophthalmus maximus* embryos by vitrification

TIAN Yong-sheng, CHEN Song-lin, YU Guo-cai, JI Xiang-shan

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Vitrification solutions were examined for their suitability of cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. PMP1 gave higher survival rate (75.68%) than other vitrification solutions and was considered to be suitable for the cryopreservation of turbot embryos. The freezing point of the vitrification solutions consisted of PG and MeOH in the proportion of 3:2 was measured when the vitrification solutions were cryopreserved. It showed that the vitrification solutions with a cryoprotectant concentration of over 41% have no freezing point and the freezing points of vitrification solutions containing 33.33% - 40% cryoprotectants were between -32.4°C and -65.4°C. The freezing point decreased with the increase of cryoprotectant concentration. The resistance of turbot embryos at different stages to the cryoprotectants was studied. It was found that the turbot embryos from 4-5 pairs somite to tail bud were more resistant to cryoprotectants and suitable to vitrify. A live embryo was obtained after cryopreservation in liquid nitrogen for 14h and was hatched out.

Key words: *Scophthalmus maximus*; embryos; vitrification; cryopreservation

大菱鲆隶属于鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*),自然分布于大西洋东侧欧洲沿岸以及黑海和地中海沿岸,是欧洲的重要养殖鱼类之一,1992年黄海水产研究所自英国引进这一鱼种^[1],目前已在我国山东、辽宁、福建等沿海地区推广养殖,成为我国工厂化海水养殖的名贵鱼种之一。对于这一引进的新鱼种,在其胚胎和仔稚幼鱼的发育^[1],体表皮素细胞形态^[2],卵膜对DMSO的渗透性^[3]等生物学方面进行了一定的研究,而做为一个新的鱼种资源,对其种质资源的保存研究,目前国内还未有报道。冷冻保存是长期保存鱼类种质资源和遗传多样性的有效手段^[4],但鱼类胚胎由于体积大(直径为1~6mm),膜通透性低及含有卵黄结构等,其冷冻保存较哺乳动物胚胎困难得多,迄今鱼类胚胎冷冻保存尚未完全成功^[4]。玻璃化冷冻保存作为种质资源保存的一条重要途径,在哺乳动物胚胎的保存和移植上已经取得了一定的成绩,在牛^[5]、羊^[6]、

马^[7]、小鼠^[8]等动物胚胎的冷冻保存及移植方面已取得成功。但在鱼类胚胎玻璃化冷冻保存方面成功的例子很少。在国内只在泥鳅^[9]、鲈^[10]胚胎的冷冻方面做过研究。本文利用玻璃化法对大菱鲆胚胎的冷冻保存进行了一系列研究,对适合于大菱鲆胚胎冷冻保存的玻璃化液进行了筛选,对二种成分玻璃化液冰点进行了测定,对不同时期胚胎对玻璃化液的耐受能力进行了研究,利用筛选的玻璃化液对大菱鲆胚胎进行了冷冻保存实验,获得了成活胚并孵化出膜。

1 材料和方法

1.1 鱼类和胚胎

利用黄海水产研究所海阳科学实验基地培育的大菱鲆亲鱼,进行人工繁殖授精,采集受精卵,在室温(15~17°C)下培育,利用发育到神经期、肌节期、尾芽期、心跳期、

收稿日期:2003-08-05

资助项目:国家“十五”863项目(2001AA621100);农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室开放课题(2002-03)

作者简介:田永胜(1964-),男,甘肃会宁人,高级工程师,博士研究生,从事鱼类低温生物学研究。

通讯作者:陈松林, Tel:0532-5844606, E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

出膜前期胚胎进行玻璃化冷冻保存实验。

1.2 抗冻剂及化学药品

利用 1,2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)、乙二醇(EG)、甘油(Gly)、二甲亚砜(DMSO)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、葡萄糖(Glucose)配制玻璃化液,利用 NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、MgCl₂·6H₂O、NaHCO₃ 配制基础液。

1.3 玻璃化液的筛选

利用自制的 BS2(2.472% NaCl, 0.0865% KCl, 0.146% CaCl₂·2H₂O, 0.486% MgCl₂·6H₂O, 0.019% NaHCO₃)为基础液,首先在其中加入 22.5% PG 和 15% MeOH,再分别加入 7.5%的 EG、Gly、DMSO、PVP 和葡萄糖,配制成比例为 3:2:1 的 5 种不同的玻璃化液。在 17.5℃ 室温下,将以上各玻璃化液分别吸入 3×100 mm 麦管 250 μL ($n=10$),直接投入液氮,冷冻 5min,在 38℃ 水浴中解冻,观察并统计冷冻和解冻时玻璃化概率。

然后,在 BS2 中将 PG、MeOH、PVP 按 3:2:0.1(0.3、0.5、0.7、0.9)的比例配制成为 5 种浓度为 45% 的玻璃化液,采用五步法^[10]平衡大菱鲆尾芽胚 40min, 0.125 mol·L⁻¹蔗糖洗脱 10 min,过滤海水(16℃)培养一定的时间,观察统计成活率。

1.4 玻璃化液冰点的测定

利用 PG:MeOH=3:2 的比例,在基础液 BS2 中配制成为浓度 35%~45% 的 11 种玻璃化液,分别吸入 3×100 mm 的麦管中,每管吸入 250 μL,一端封口,将温度探头插入溶液中。利用上海理工大学低温生物工程研究室研制的微机控制降温仪,控制降温和测定冰点。降温程序为:在 10℃ 以 5℃·min⁻¹ 的降温速率降至 -196℃。观察记录仪显示的温度变化,记录温度反弹点和反弹幅度,获得玻璃化液的过冷点、冰点和过冷度。

1.5 大菱鲆不同时期胚胎对玻璃化液的适应性

利用 PMP1 分别平衡处理大菱鲆不同时期的胚胎(4~5 对肌节胚、16~20 对肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜前胚) 20~50 min,不经冷冻,直接用 0.125 mol·L⁻¹ 的蔗糖洗脱 10 min,统计成活率。

1.6 大菱鲆胚胎冷冻、洗脱、培养

利用 PMP1 五步法处理大菱鲆不同时期胚胎一定的时间,吸入麦管,每管吸入 250 μL,含胚胎 5~10 余粒,尽量使其分布均匀,在室温下直接投入液氮(-196℃)冷冻保存一定的时间,将麦管移出,快速进入 40℃ 水浴中摇动解冻 9~10 s。麦管移出液氮至水浴中的时间不能超过 2 s,剪去封口,快速用 0.125 mol·L⁻¹ 的蔗糖 2 mL 洗脱 10 min,加入过滤海水,之后将成活卵移入烧杯,在室温下(15~17℃)培养,每天换水 1/2。

1.7 数据处理

实验数据利用单因素方差分析中最小显著极差法(LSR法),进行多重比较,比较结果用字母标记法(a、b、c、d...),在同一系列中字母相同表示差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2 结果

2.1 玻璃化液的筛选结果

从表 1 可见,利用 7 种抗冻剂按 3:2:1 的比例配制而成的 5 种玻璃化液 PME、PMG、PMD、PMP、PMGL 的总浓度都为 45%,在 17.5℃ 室温下,利用麦管对其进行冷冻和解冻实验,在冷冻时 5 种玻璃化液都可保持较高的玻璃化程度,玻璃化率分别为 80%、100%、60%、90%、90%,但在此室温下,在 38℃ 水浴中解冻时,只有 PMP 能保持较高的玻璃化率,为 40%;其它玻璃化液不易保持玻璃化,其玻璃

表 1 玻璃化液的组成和玻璃化程度

Tab.1 Composition and vitrification degree of vitrification solutions

玻璃化液 VS	组成 composition	玻璃化程度(%, $n=10$) vitrification degree	
		冷冻 cryopreservation	解冻 thawing
PME	22.5% PG + 15% MeOH + 7.5% EG	80	10
PMG	22.5% PG + 15% MeOH + 7.5% Gly	100	0
PMD	22.5% PG + 15% MeOH + 7.5% DMSO	60	10
PMP	22.5% PG + 15% MeOH + 7.5% PVP	90	40
PMGL	22.5% PG + 15% MeOH + 7.5% Glucose	90	0

化率为 0 或 10%。

由表 2 可见,以 PG:MeOH:PVP=3:2:0.1(0.3、0.5、0.7、0.9)配制而成的浓度为 45% 的玻璃化液 PMP1~5 平衡大菱鲆尾芽胚,随着 PVP 在玻璃化液中比例升高,胚胎的成活率降低, PMP1 处理胚胎的成活率较高,为 75.68%。不加 PVP 的 PM 成活率为 82.10%。对表 2 结果

进行方差分析显示:PM 与 PMP1、2 之间无显著性差异($P>0.05$), PMP2、3、4 之间无显著性差异($P>0.05$), PMP3、4、5 之间无显著性差异($P>0.05$), PMP1 与 PMP3、4、5 之间有显著性差异($P<0.05$)。PVP 能有效的提高玻璃化程度,但是 PVP 的添加量过大将降低胚胎的成活率,一般 PVP 在玻璃化液中的添加量控制在 0.88%~2.55% 的范

围内,胚胎成活率可保持在 62.27% ~ 75.68%。

表 2 PMP1 ~ 5 平衡大菱鲆胚胎成活率 (n = 5)
Tab.2 Survival rate of turbot embryos after equilibration using PMP1 - 5

玻璃化液 VS	组成 (%) composition	胚胎成活率 (%) survival rate of embryos
	PG + MeOH + PVP	
PM	27 + 13 + 0	82.10 a ± 3.81
PMP1	26.5 + 17.6 + 0.88	75.68 ^a ± 17.78
PMP2	25.47 + 16.98 + 2.55	62.27 ^{ab} ± 14.29
PMP3	24.55 + 16.36 + 4.09	44.17 ^{bc} ± 11.5
PMP4	23.68 + 15.78 + 5.53	40.99 ^{bc} ± 19.83
PMP5	22.88 + 15.25 + 6.86	27.33 ^c ± 11.89

2.2 玻璃化液冰点的测定结果

由表 3 和图 1 可见,按 PG:MeOH = 3:2 的比例配制而成的不同浓度的玻璃化液,当浓度达到 41% 以上,以 5 °C · min⁻¹ 的降温速率冷至 -196 °C 时,玻璃化液一直保持透明,不产生白色的结晶,这一现象可以说明,41% 以上玻璃化液在投入液氮的过程中并不需要太快的速度。当玻璃化液浓度降至 40% 以下时,以较慢的降温速率在液氮蒸气中冷冻时,溶液产生冰点,冰晶首先在温度探头附近产生,然后在其它地方产生白色的结晶点,之后冰晶逐渐扩大,溶液全部结冰。说明 40% 以下的玻璃化液要使其玻璃化则必须要有快速的降温速率。

表 3 不同浓度玻璃化液过冷点、冰点的测定结果
Tab.3 The super-freezing point and freezing point determination results of different concentration vitrification solutions

玻璃化液浓度 (%) Cv	过冷点 (°C) super-freezing point	冰点 (°C) freezing point	过冷度 (°C) super-freezing degree
41 ~ 45	-	-	-
40	-66.4	-65.4	-1.0
39	-54.5	-54.2	-0.3
38	-38.3	-37.8	-0.5
37	-33.7	-33.5	-0.2
36	-31.9	-31.6	-0.3
35	-33.5	-33.0	-0.5
33.33	-32.7	-32.4	-0.3

图 2 显示了 41% 和 40% 两种玻璃化液在液氮蒸气中以 5 °C · min⁻¹ 降温时的温度变化,41% 玻璃化液降温时为平滑的曲线,40% 玻璃化液在过冷点出现了反弹。

从过冷点和冰点的产生可以看出,玻璃化溶液的浓度高,过冷点和冰点低。玻璃化溶液浓度低冰点和过冷点高。40% 的玻璃化液过冷点和冰点分别为 -66.4 °C 和 -65.4 °C,过冷度为 -1.0 °C;溶液浓度在 40% ~ 37% 时,冰点的升高很快,37% 的玻璃化液的过冷点和冰点分别为 -

33.7 °C 和 -33.5 °C;玻璃化液浓度在 37% ~ 33.33% 时过冷点和冰点的变化较平稳,在 -31.6 ~ -33.5 °C 之间。33.33% 的玻璃化液的过冷点和冰点分别为 -32.7 °C 和 -32.4 °C,过冷度为 -0.3 °C。

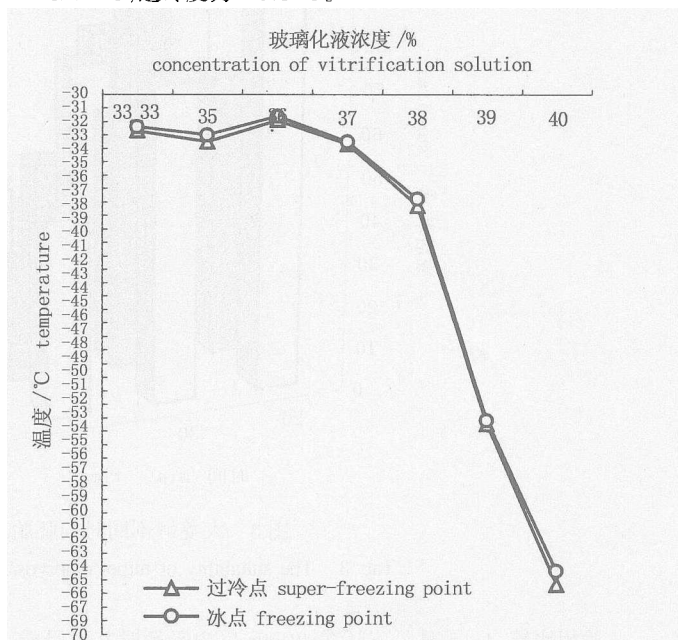


图 1 不同浓度玻璃化液过冷点和冰点变化曲线
Fig.1 The super-freezing point and freezing point variable curves of different concentration vitrification solutions

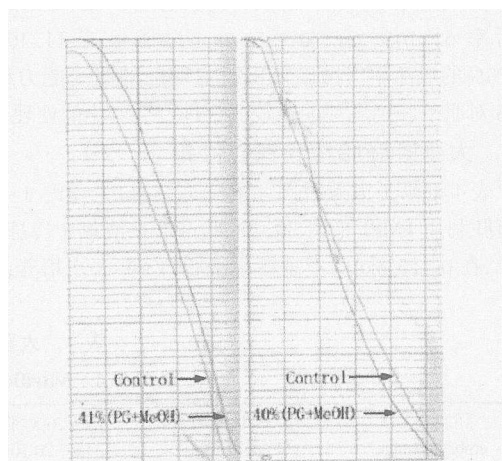
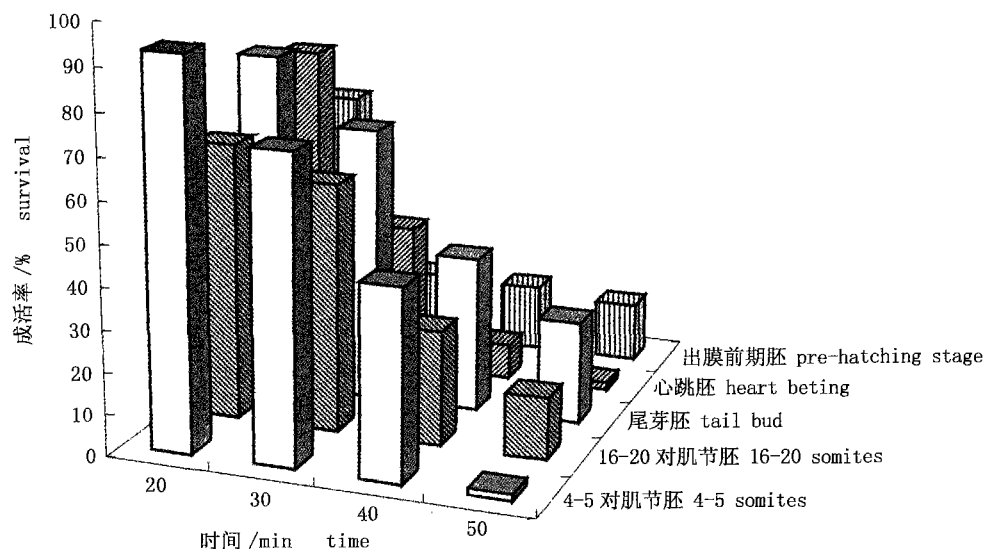


图 2 41% 和 40% 玻璃化液降温曲线
Fig.2 Freezing curve of 41% and 40% vitrification solutions

2.3 不同时期的胚胎对玻璃化液的耐受性

图 3 显示,利用 PMP1 对大菱鲆 4 ~ 5 对肌节胚、16 ~ 20 对肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜前胚分别处理 20、30、40、50 min,随着处理时间的延长,胚胎的成活率逐渐降低,处理 20 min 各期胚的成活率在 62.16% ~ 92.84%,处理 50 min 各期胚的成活率在 1.59% ~ 24.76%。不同时期的胚

图3 大菱鲂不同时期胚胎对玻璃化液的适应能力 ($n=3$)

Tab.3 The suitability of turbot embryos in different stages to the vitrification solutions

胎相比较,4~5对肌节胚在40 min以内平衡时其耐受能力最强,40 min以后耐受能力下降较快。尾芽胚次之,在50 min时其耐受能力最强,成活率为24.76%。心跳胚在20 min以内平衡成活率比较高,为78.69%,平衡时间超过30 min后其成活率下降很快。出膜前期胚在20 min以内成活率62.16%,在30~50 min只能保持14.19%~16.75%的成活率。可以说出膜前期胚的耐受能力最低。4~5对肌节胚到尾芽期胚较适合进行玻璃化的处理。

2.4 大菱鲂胚胎冷冻保存结果

表4记录了大菱鲂胚胎的冷冻结果,大菱鲂4~5对肌节胚利用PMP1平衡30、40、50 min,在液氮中冷冻14 h解冻,在 $0.125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖中洗脱,15℃海水培养,处理

50 min的样本有1粒胚成活(图版-1)。发育10 h至尾芽胚(图版-2),发育21 h至心跳期(图版-3),发育28 h至出膜前期(图版-4),卵沉入水底,心跳正常。发育32 h 44 min孵化出膜,在水面上倒挂,体形正常,受惊后游动迅速,培育50 h,体长达3 mm(图版-5),体棕红色,卵黄囊明显变小。

20对肌节胚在PMP1中分别平衡30、40、50、60 min,在液氮中冷冻4 h,解冻后完整胚率分别为15.0%、15.0%、55.0%、10.0%;尾芽胚在液氮中冷冻3 h,完整胚率分别为50.0%、32.2%、70.0%、60.0%;心跳胚在液氮中冷冻18 h,完整胚率分别为40.0%、60.0%、41.67%、50.0%;出膜前胚在液氮中冷冻10 h,完整胚率分别为0.0%、50.0%、53.34%、50.0%。

表4 大菱鲂胚胎玻璃化冷冻结果

Tab.4 Vitrification results of turbot embryos

胚胎时期 embryos stage	4~5对肌节胚 4-5 somites	15~20对肌节胚 15-20 somites	尾芽胚 tail bud	心跳胚 heart beating	出膜前胚 pre-hatching
冷冻时间(h) time in LN2	14	4	3	18	10
平衡时间(min) equilibration time	成活胚数/样本数 (粒) survival embryos/ specimen no.	成活时间(h) survival time	完整胚率(%) uncracked rate		
30	0/10		15.0	50.0	40.0
40	0/10		15.0	32.2	60.0
50	1/5	50	55.0	70.0	41.67
60			10.0	60.0	50.0

3 讨论

玻璃化是液体转变为非晶态固化的过程,玻璃化液是胚胎超低温冷冻保存的介质,因此玻璃化液的筛选是胚胎冷冻过程的重要环节。在小鼠胚胎的冷冻中利用了玻璃化液 EFS40^[11],在牛卵母细胞的冷冻中利用了磷酸缓冲液配制而成的玻璃化液(4.5 mol·L⁻¹乙二醇 + 3.4 mol·L⁻¹ DMSO + 5.56 mmol·L⁻¹葡萄糖 + 0.03 mmol·L⁻¹丙酮酸钠 + 0.4%牛血清)^[12],在羊胚胎的冷冻中利用了 PBS 液配制成的含有 25%甘油和 25%的乙二醇玻璃化液^[13]。本实验利用 PG、MeOH、EG、Gly、DMSO、PVP、葡萄糖 7 种抗冻剂按一定的比例配制了一系列玻璃化液,利用大菱鲆胚胎进行了培养选择,其中 PMP 在解冻时能保持较高的玻璃化, PMP1 在平衡尾芽胚成活率可达到 75.38%。由于鱼类胚胎具有双层卵膜结构,卵粒大,大菱鲆受精卵的卵径为 0.96 ± 0.006 mm (n = 10),卵黄丰富,胚胎在玻璃化液中要平衡很长的时间才能保证在冷冻时不致破碎。渗透能力相对较高的玻璃化液,可以缩短胚胎在玻璃化中的平衡时间,但渗透能力高的玻璃化液毒性也相对较高,因此应合理掌握渗透时间。PMP1 在大菱鲆胚胎的处理上用 30 ~ 50 min 为宜。本实验用 PMP1 在大菱鲆肌节胚的冷冻保存中取得了成活胚,并孵化出膜。

对于体积较大的鱼类胚胎要在低浓度、低毒性的玻璃化液中以高速冷却速率,实现胚胎玻璃化冷冻成活比较困难,因此探索实现玻璃化的合理浓度是一条重要的途径。抗冻剂的组成不同,其形成玻璃化所需浓度也不同,在常压下 1,2-丙二醇的玻璃化浓度为 44%,在 1 000 个大气压时浓度降为 39%^[14],各种抗冻剂混合使用可降低玻璃化浓度,并减小毒性^[14],本文通过对 33.33% ~ 45% (PG + MeOH)玻璃化液冰点的测定,在常压下缓慢降温时此玻璃化液形成玻璃化的浓度为 41%,较 PG 单独使用时浓度低。40%以下的此种混合玻璃化液在缓慢降温时无法实现玻璃化,必须以快速降温越过冰点,直接进入超低温区才能实现玻璃化。随着浓度的逐渐降低,其冰点逐渐升高,体现了较强的规律性。此实验为玻璃化液的配制和降温速率提供了一定的依据。

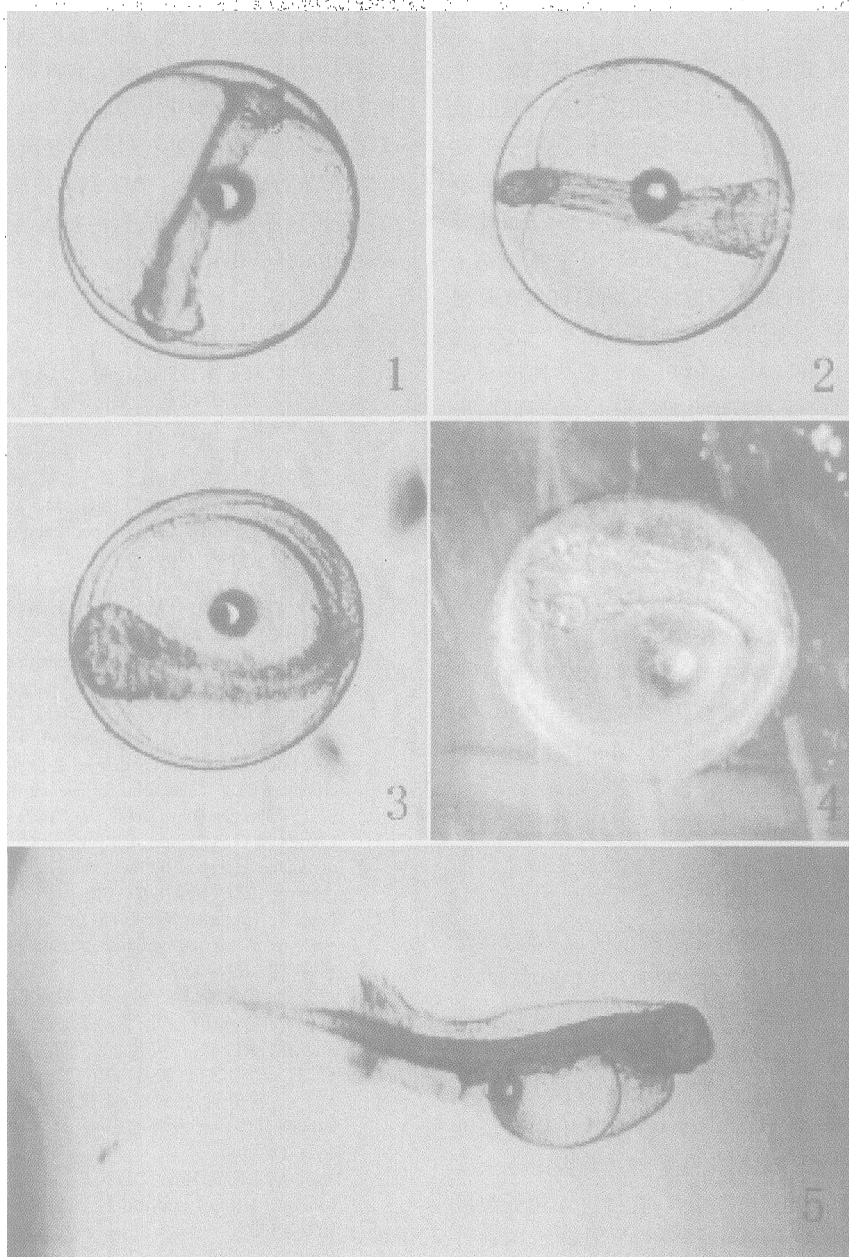
鱼类胚胎时期的选择在玻璃化冷冻保存中也是不可缺少的环节,不同鱼类胚胎或同种鱼类不同时期胚胎对玻璃化液及冷冻的耐受能力不同,在实验中我们发现,鲈 (*Lateolabrax japonicus*)心跳期胚对玻璃化液和超低温冷冻的耐受能力最强^[10]。牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)16 对肌节胚至尾芽胚对玻璃化液和对超低温冷冻的耐受能力最强。拟石首鱼尾芽胚比桑椹胚耐受能力更强^[15],斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)心跳胚对冷冻降温的耐受能力最强^[16]。大菱鲆 4 ~ 5 对肌节胚对玻璃化液的适应能力最强,尾芽期胚次之。在 PMP1 中平衡时间不宜超过 50min。

在鱼类胚胎超低温冷冻保存方面取得成活的例子很

少,鲤胚胎利用慢速降温取得了 4 粒成活胚,3 粒孵化出膜,但结果未能重复^[17]。泥鳅胚胎利用分段快速降温方式获得 16 粒成活胚,1 粒孵化出膜^[18]。在玻璃化冷冻方面取得的成活胚并孵化出膜的例子更少,泥鳅胚胎利用玻璃化法冷冻获得 4 粒胚孔封闭期胚胎发育至 18 ~ 19 对肌节期,但未孵化出膜^[9]。本文利用玻璃化法首次在海水鱼类大菱鲆胚胎的冷冻中取得 1 粒成活胚,并且孵化出膜,培养 50 h,体长生长至 3 mm。

参考文献:

- [1] 雷霖霖,马爱军,刘新富,等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 胚胎及仔稚幼鱼的发育研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34 (1): 9-18.
- [2] 朱杰,张秀梅,高天翔,等. 大菱鲆早期变态发育和体表黑色素细胞学观察[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 193-200.
- [3] Cabrita E, Chereguini O, luna M, et al. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquac, 2003, 221: 593-604.
- [4] 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.
- [5] Lazar L, Spak J, Dávid V. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method [J]. Theriogenology, 2000, 54(4): 571-578.
- [6] Begin I S, Bhatia B, Baldassarre H, et al. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods [J]. Theriogenology, 2003, 59: 1839-1850.
- [7] Chaves M G, González E P, Rosas C, et al. Cryopreservation of equine embryos by two vitrification methods [J]. Theriogenology, 2001, 66: 607-613.
- [8] Cseh S, Horlacher W, Brem G, et al. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions [J]. Theriogenology, 1999, 52: 103-113.
- [9] 章龙珍,鲁大椿,柳凌,等. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存的研究[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 213-217.
- [10] 田永胜,陈松林,严安生,等. 鲈鱼胚胎玻璃化冷冻保存研究[J]. 动物学报, 2003, 49(6).
- [11] 朱士恩,曾申明,张忠诚. 小鼠胚胎玻璃化冷冻保存及保存时间对其体内外发育的影响[J]. 中国畜牧杂志, 1996, 34 (6): 12-14.
- [12] Dhali A, Manik R S, Das S K, et al. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes [J]. Theriogenology, 2000, 53(6): 1295-1303.
- [13] Baril G, Traldi A L, Cognié Y. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos [J]. Theriogenology, 2000, 56(2): 299-305.
- [14] 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [15] Robertson S M, Lawrence A L. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose and sea salt solution to the embryos of red drum [J]. The Prog Fish-Culturist, 1988, 50: 148-154.
- [16] Zhang T, Rawson D M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos [J]. Cryobiology, 1995, 32(3): 239-246.
- [17] Zhang X S, Zhao L, Hua T C, et al. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos [J]. Cryo Letters, 1989, 10: 271-278.
- [18] 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和复温速率的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 366-217.



图版 Plate

1. 大菱鲆 4-5 对肌节胚利用 PMP1 平衡 50 min, 在液氮中冷冻 14 h 解冻、培养成活, $\times 60$; 2. 成活肌节胚培养 10 h, 发育至尾芽胚, $\times 60$; 3. 成活肌节胚培养 21 h, 心跳正常, 胚体转动, $\times 60$; 4. 成活肌节胚培养 28 h, 发育至出膜前期, $\times 60$; 5. 成活肌节胚培养 32 h 44min 孵化出膜, 体形与正常苗无异, 培养 50 h 体长达 3 mm, $\times 40$

1. Turbot embryos 4-5 somites stage were equilibrated for 50 min in PMP1 and cryopreserved for 14 h in LN2. After thawing, the embryo survived, $\times 60$; 2. The survival embryo developed to tail-bud after cultivation for 10 h, $\times 60$; 3. The survival embryo's heart was normal and the embryo moved after cultivation for 21 h, $\times 60$; 4. The survival embryo developed to pre-hatching after cultivation for 28 h, $\times 60$; 5. The survival embryo hatched after cultivation for 32 h 44 min and the morphology was same to the natural fish. The body length was 3 mm, $\times 40$