CC BY

مقاله علمی – مروری:

بررسی انجماد تخم، جنین، لارو ماهی و آبزیان صدف‌دار

رقیه محمودی [۱*]، محمد میثم صلاحی اردکانی [۱]، رکسانا فلاحی [۲]

*Roghaye. mahmodi@gmail.com

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.

۲-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۱

چکیده

تلاش‌های زیادی برای انجماد گامت‌های ماهی و آبزیان صدف‌دار انجام شده است. تشکیل بانک اسپرم در برخی از ماهی‌های مهم تجاری با موفقیت حاصل شده است. در آبزیان صدف‌دار به‌ویژه در میگوها، اگرچه انجماد اسپرم موفقیت‌آمیز بوده است، اما هیچ تلاشی برای تشکیل بانک‌های اسپرم صورت نگرفت. تحقیقات در زمینه انجماد تخم و جنین ماهی و آبزیان صدف‌دار، با موفقیت کمتری همراه بوده است. دلایل متعددی برای عدم موفقیت در انجماد تخمک/جنین ذکر شده است و موانع اصلی نفوذپذیری غشاء کم در تخم‌ها، حجم بالای زرده تخمک و وجود محفظه‌ها در جنین‌های در مراحل اولیه رشد است. این عوامل منجر به تشکیل کریستال یخ در طول فرآیند انجماد می شود. همچنین تخمک‌ها و جنین‌ها مستعد آسیب‌های سرمایی غیر مرتبط با آسیب کریستال یخ هستند. عده ای از محققین برخی دیگر از مشکلات را در پروتکل‌های کرایوبانک [۱] تخمک/جنین گزارش کرده‌اند که به طور مفصل در مقاله حاضر مورد بحث قرار گرفته است. نیاز مبرمی به توسعه تکنولوژی کرایوبانک مناسب برای تخم/جنین ماهی به منظور افزایش تولید ماهی در شرایط اسارت وجود دارد. تلاش برای حفظ انجماد لارو جانوران آبزی چالش دیگری است که در گذشته نه چندان دور رخ داده است. هدف از بررسی حاضر، جمع‌آوری اطلاعات جامع در مورد تلاش‌هایی است که تاکنون در زمینه کرایوبانک تخم و جنین ماهی و نیز سایر آبزیان انجام شده است؛ سپس چالش‌های موجود در راستای برنامه‌ریزی تحقیقات آتی به منظور قابل دوام و مقرون به صرفه بودن این فناوری ارزیابی می گردد.

کلمات کلیدی: انجماد، ماهی، آبزیان صدف‌دار، تخم، جنین، لارو

[۱] فرآیند خنک‌سازی و ذخیره‌سازی سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌ها در دمای بسیار پایین یا انجماد برای ذخیره آنها به منظور استفاده در آینده «انجماد» نیز نامیده می شود.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

مقدمه

برای افزایش ذخایر ماهی از طریق تکنولوژی‌های پرورش آبزیان و نیز کاهش وابستگی به ذخایر وحشی در تولید ماهی، حفاظت و نگهداری از طریق انجماد تخم و جنین بسیار حائز اهمیت است. انجماد تخم و جنین نه تنها سبب افزایش تولید ماهی می‌شود بلکه به بازسازی منابع مهم ژنتیکی نیز کمک می‌کند و فرصتی برای ما به‌وجود می آورد تا از بقاء گونه‌های مختلف اطمینان حاصل گردد و توانایی ذخیره مجدد را امکان‌پذیر سازد. به رغم موفقیت آمیز بودن انجماد اسپرم ماهی ، ولی انجماد تخم و جنین چندان موفقیت‌آمیز نبوده است. دو دلیل عمده برای عدم موفقیت عمده در تکنولوژی انجماد وجود دارد که شامل نفوذپذیری پایین غشاء در تخم و جنین و نیز کیسه زرده بزرگی در تخم است که باعث تشکیل کریستال‌های یخ طی فرآیند انجماد می گردد. علاوه بر این، تخم‌ها و جنین‌ها در دمای بسیار پایین آسیب پذیر هستند. در حال حاضر، تحقیقات انجماد تخم و جنین ماهی بر سه جنبه مهم از جمله، نفوذ پذیری ترکیبات محافظ سرما در غشاء تخم و جنین از طریق اصلاح غشاء و روش اولتراسوند، اصلاح مستقیم توده زرده با میکرودستکاری و استفاده از طیف‌سنج امپدانس برای ارزیابی سریع نفوذپذیری غشاء جنین، متمرکز شده است (Rawson and Zhang, 2005).

محققین مطالعات بسیاری را بر انجماد تخم و جنین ماهی انجام داده‌اند، اما به دلیل چند بخشی بودن ساختار تخم و جنین ماهی، انجماد تخم و جنین موفقیت‌آمیز نبوده است (Diwan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2005; Diwan *et al.*, 2010). در بین چندین مواد محافظ سرمایی مورد استفاده، گزارش شده که متانول موثرترین ماده نسبت به DMSO یا اتاندیول در جنین ماهی گورخری بوده است (Zhang & Rawson, 1993). مشاهده شده است که متانول در عرض ۱۵ دقیقه به کل جنین نفوذ می کند درحالی‌که سایر ترکیبات محافظ سرمایی پس از گذشت ۲/۵ ساعت نفوذ بسیار کمی در زرده دارند یا اصلاً قادر به نفوذ نبودند (Hagedorn *et al.*, 1997). استفاده از تکنیک اولتراسوند برای افزایش نفوذپذیری جنین در ماهی گورخری گزارش شده است (Bart, 2000). با این‌حال، نشان داده شد که متانول در مرحله ۶ رشد جنین ماهی گورخری مقدار کمی نفوذ پذیری داشت، اما در مراحل بعدی هیچ نفوذی مشاهده نشد (Liu *et al.*, 2000). Aril و همکاران (۱۹۸۷) مشاهده کردند که DMSO یک محافظ برودتی مناسب برای جنین‌های ماهی مداکا هست. در ماهی کپور معمولی جنین‌های مرحله مورولا تا حدی درون DMSO و ترکیب ساکارز، در مرحله روخزیدگی به ضربان قلب در DMSO، محلول ساکارز و متانول و در مرحله رشد ضربان قلب در محلول متانول و گلیسرول در شرایط سرد نگهداری شده بودند (Dinnyes *et al.*,1998). با استفاده از ایزوتوپ‌های نشاندار DMSO و گلیسرول مشخص شد که این محلول‌ها پس از مدت ۵ ساعت به درون جنین‌های دوکوریونی و تک کوریونی ماهی گورخری نفوذ کرده بودند. Ahammad و همکاران (۲۰۰۳) هنگام مطالعه بر جنین‌های ماهی کپور معمولی که در دمای ۴ و ۲- درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های مختلف متانول و ساکارز نگهداری شده بودند، دریافتند که عملکرد تفریخ تخم‌ها در محلول ساکارز با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در حداکثر میزان خود (۴۱ درصد) قرار داشت. در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه بازماندگی در هیچ‌کدام از غلظت‌های محلول ساکارز مشاهده نشد. علاوه‌براین، گزارش شد که ترکیب متانول و ساکارز بهترین نتیجه را در میان تمام غلظت‌های آزمایش شده در دو دمای مختلف ارائه می‌کند.

مسائل مهم در تشکیل بانک‌های تخم و جنین ماهی و آبزیان صدف‌دار

برخی از محققان به مشکلاتی که در حین مطالعه بر انجماد تخم/ جنین ماهی و آبزیان صدف‌دار و نیز مراحل مختلف رشد تخمک‌ها مواجه شده، پرداخته‌اند. به رغم تلاش‌های بسیار، انجماد تخم/جنین به دلیل وجود مقادیر بالای زرده همواره شکست خورده است. Rall (۱۹۹۳) هنگام بحث بر انجماد آزاد ماهیان اشاره کرده است که ۵ مانع بزرگ بر سر راه انجماد تخم و جنین ماهیان استخوانی وجود دارد:

۱- اندازه تخم و جنین ماهی بسیار بزرگ بوده و چند محفظه‌ای هستند. این امر باعث شده تخم‌ها و جنین‌ها غیر یکسان و ناهماهنگ یخزده یا گرم شوند و سبب آسیب رساندن می‌شود.

۲- اندازه بزرگ تخم و جنین سبب کم شدن نسبت سطح/ حجم و در نتیجه پایین آمدن نفوذپذیری غشاء به آب و محلول‌های انجمادی می‌گردد.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

۳- به دلیل وجود ساختار غشایی چند لایه، خاصیت اسمزی تخم یا جنین کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه، بر میزان انتقال‌پذیری محلول‌های محافظت‌کننده در مقابل انجماد نیز تاثیر می‌گذارد.

۴- به دلیل وجود لایه کوریونیک، نفوذپذیری غشاء کاهش پیدا می‌کند.

۵- تخم و جنین ماهی نسبت به دمای پایین به‌خصوص دماهای زیر صفر درجه بسیار حساس هستند.

برای پرداختن به این موضوعات، محققین مطالعات مختلفی انجام داده‌اند. در میان این تلاش‌ها یکی از مهم‌ترین آنها میکرواینجکشن (تزریق درون سیتوپلاسمی) مستقیم محافظ‌های سرما به درون سیتوپلاسم است. مطالعه بعدی استفاده از فشار منفی بر تخم یا جنین به منظور افزایش نفوذپذیری محافظ‌های سرمایی بوده است (Routray *et al.*, 2002). آزمایش‌هایی نیز بر میکرواینجکشن پروتئین‌های ضدیخ صورت پذیرفته است (Robles *et al.*, 2006) و برخی از پژوهشگران نیز حتی اعمال فشار هیدرواستاتیک بر تخم یا جنین را بررسی کرده‌اند (Zhang *et al.*, 2003a,b; Valdez *et al.*, 2005). شایان ذکر است، به رغم تمام این مطالعات و تحقیق‌ها، هنوز موفقیتی در توسعه تکنولوژی مناسب برای انجماد تخم و جنین حاصل نشده است. تاکید شده است که برای انجماد موفق تخم یا جنین، دانستن میزان دقیق نفوذپذیری جنین یکی از مهم‌ترین و ضروری‌ترین عوامل است (Danilo *et al.*, 2014). همچنین گزارش‌هایی وجود دارد که تزریق ریز محافظ‌های برودتی و تابش لیزر برای گرم کردن مجدد، نویدبخش دستیابی به این هدف طولانی‌مدت است. همچنین برخی از پژوهشگران به تزریق محافظ‌های برودتی به همراه نانوذرات طلای پلاسمونیک به تخم/جنین ماهی گورخری اقدام کرده‌اند. این جنین‌ها پس از گذشت چند ثانیه از تزریق نانوذرات طلای پلاسمونیک در داخل نیتروژن مایع قرار داده شدند، سپس از این محلول خارج و بلافاصله در معرض تابش لیزر قرار گرفتند تا نانوذراتی که به طور یکنواخت اطراف جنین پخش شده بودند، گرم شوند. بسیاری از جنین‌های منجمد با نانوذرات طلای پلاسمونیک، دوباره احیاء شده و فرآیند رشد آنها آغاز شده است (ACS, 2017)[1].

[1] انجمن شیمی آمریکا

به رغم تحقیقات گسترده، انجماد تخم و جنین‌ها در آبزیان به صورت جدی مورد توجه قرار نگرفته است. تلاش برای انجماد تخم و جنین میگو نیز موفقیت‌آمیز نبوده است، هر چند که دستورالعمل استانداردی برای چند نوع آبزی وجود دارد. اندازه تخم و جنین در میگوها کوچک است، اما تخم‌ها تمایل زیادی به جذب آب دارند، متورم شده و سپس برای لقاح آماده می‌گردند. پس از لقاح پوشش قوی و محکم تفریخ اطراف تخم تشکیل شوند. بنابراین، وجود آب و یک محافظ ضخیم در اطراف تخم‌ها از انجماد موفق تخم و جنین در میگوها ممانعت می‌کند. همچنین گزارش شده است که حجم بالای آبی که تخم و جنین جذب می‌کنند، باعث ایجاد کریستال‌های یخ در آنها شده و سبب آسیب به قسمت‌های داخلی می‌گردد . به گزارش Martinez و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعات انجام شده بر انجماد تخم و جنین آبزیان صدف‌دار، سه مسئله مهم: (۱) بررسی بقاء جنین و لارو، (۲) امکان بازماندگی جنین پس از فرایند گرم شدن و (۳) عملکرد پرورش طولانی مدت لاروهای گرم شده، وجود دارد.

ساختار تخم

به منظور پرداختن به مسئله نفوذپذیری مواد برودتی به درون تخم در دمای پایین، دانستن ترکیب لایه‌های محافظ اطراف تخم ضروری است. از آن‌جایی‌که این امر به ساختار تخم ماهی مربوط می‌شود، لذا تحقیقات گسترده‌ای بر بافت‌شناسی تخم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام شده است. Cotelli و همکاران (۱۹۸۸) مطالعاتی بر ساختار و ترکیب لایه کوریونی تخم ماهی *Carassius auratus* انجام داده و وجود سه لایه کوریونی را در اطراف تخم گزارش نموده‌اند که از سمت بیرونی به سمت داخلی نزدیک به غشاء پلاسمایی تخم شروع می شود. شایان ذکر است، هر کدام از این لایه‌های کوریونیک دارای ویژگی‌های عملکردی متفاوتی بوده که محققان مختلف به تفصیل مورد بررسی قرار داده‌اند. Rawson و همکاران (۲۰۰۰) مطالعاتی را بر کوریون، غشاء پلاسما و لایه‌های پیوسته جنین مرحله گاسترولا در ماهی گورخری برای یافتن رابطه عملکردی و ساختاری، با توجه به نفوذ پذیری محافظ‌های برودتی، انجام دادند. تمام این مطالعات با استفاده از اسکن تصاویر میکروسکوپ الکترونی انجام شد. این مطالعه نشان داد که در مرحله گاسترولا، جنین در حال رشد دارای یک لایه کوریونیک خارجی ضخیم بوده و

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

دارای سه زیر لایه است (لایه متراکم خارجی، لایه داخلی و وجود یک لایه دیگر بین این دو لایه که یک لایه الکترونی شفاف است.). آنها مشاهده کردند که لایه میانی و داخلی را یک کانال با منافذ کوچک احاطه کرده است. Ninhaus و همکاران (۲۰۰۸) طی مطالعه تاثیر دمای انجماد بر ترکیب ساختار تخم/جنین ماهی‌ها مشاهده کردند که هسته در این تخم‌ها دارای کروماتین با منافذی در غشاء پلاسمای خود است که سبب مرگ جنین در حال رشد می گردد.

در مورد آبزیان صدف‌دار به‌ویژه در سخت پوستان، دو لایه بیرونی و داخلی تخمک‌های بارور شده را احاطه کرده و پوشش داخلی آن از تخمدان منشا گرفته است. Cheung (۱۹۶۶) بیرونی‌ترین لایه تخمک بارور شده خرچنگ *Carcinus maenas* را بررسی کرده و اذعان داشته است که تخمدان در این خرچنگ باعث ایجاد لایه‌های اضافی جدیدی می‌شود که تخمک‌ها را احاطه کرده‌اند. با توجه به اطلاعات مذکور، Talbot و Goudeau (۱۹۸۸) گزارش کردند که پوشش تخم‌های خرچنگ دریایی *H. americanus* طی تخم‌ریزی دچار تورم شده و یک لایه داخلی نیز تحت یک واکنش پیچیده‌تر تشکیل می‌شود. در میگوهای پنائیده، تخمک‌ها دارای یک توده سلولی خارجی هستند که آنها را احاطه کرده‌اند. گفته می شود که این توده خارجی از جنس خود تخمک‌ها هستند. قشر خارج سلولی با تشکیل یک غشاء نازک ویتلین از محیط خارجی جدا می‌گردد Clark *et al.*, (1977, 1980). در مقابل، تخمک‌های میگوی *M. rosenbergii* ، فاقد این توده سلولی خارجی است. گزارش شده است که تخمک‌های این میگو دارای یک پوشش ضخیم و حتی وزیکول‌های جنینی هستند که در تخمک‌های سایر آبزیان مشاهده نشده است (Lynn and Clark, 1983).

تحقیقات انجام شده برای توسعه کرایو بانک تخم و جنین ماهی

کرایو بانک جنین ماهی

در آبزی پروری تکنولوژی انجماد تخم و جنین برای بیش از ۲۰۰ گونه ماهیان (عمدتاً آزاد ماهیان و کپور ماهیان) (Martinez-Paramo *et al.*, 2017) ، ۲۷ گونه نرم تنان (Yang, 2017) و ۳۵ گونه جلبک های دریایی (Yang *et al.*, 2021) مطالعه شده است.

Liu و همکاران (۲۰۲۲) در گزارش خود عنوان کردند که انجماد لارو به عنوان یک روش قابل اعتماد و موثر برای حفظ ژرم پلاسم شناخته شده است. این تکنیک را می توان در صنعت آبزی پروری به منظور بهره مندی از فرآیند مدیریت تفریخ، از جمله تامین و عرضه لارو مورد نیاز در تمام طول سال به کار برد (Labbé *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). اگرچه نگهداری و انجماد اسپرم ماهی در برخی از ماهیان استخوانی مورد مطالعه قرار گرفته است Linhart *et al.*,2000). با این‌حال انجماد تخم و جنین همه آبزیان همچنان یک هدف دست نیافتنی است. تلاش‌های متعددی در ارتباط با انجماد تخم ماهیان انجام شده است که هیچ‌کدام موفقیت آمیز نبوده‌اند (Horton and Ott, 1976) و دلیل آن نیز مشکلاتی نظیر دهیدراسیون، اندازه بزرگ تخم‌ها و سطوح نفوذپذیری متفاوت غشاء است (Loeffler and Lovtrup, 2000). چنین بیان شده است که ذخیره‌سازی جنین ماهی زبرا در پروپیلن گلیکول و نیتروژن مایع حتی به مدت یک دقیقه نیز می‌تواند سبب آسیب به میتوکندری، به‌هم ریختگی ریبوزوم‌ها و غشاء پلاسمای لایه‌های زرده شود (Anchordoguy *et al.*,1987). در برخی از جنین‌های ماهی‌های استخوانی (*C. carpio*، *Labeo rohia* و *B. rerio*) مرگ و میر حتی وقتی که در نیتروژن مایع به مدت کمتر از ۳ ساعت ذخیره شده بودند، حدود ۱۰۰ درصد گزارش گردید (Harvey *et al.*, 1983). از سوی دیگر، Zhang و همکاران (۱۹۸۹) انجماد موفقیت‌آمیز جنین‌های ماهی کپور معمولی در دمای انجماد را گزارش دادند. با وجود این، نتایج هیچ وقت تکرار و تایید نشدند. مطالعات انجام شده محققان بر انجماد تخم/ جنین ماهی نشان داده است که به دلیل ساختار لایه‌های تخم‌ها و فقدان تکنولوژی موثر در انجماد تخم/ جنین‌های زنده، موفقیت چندانی در این امر حاصل نشده است (Danilo *et al.*, 2014; Keivanloo and Sudagar, 2013, 2016).

Zhang و Rawson (۱۹۹۳) مطالعات مربوط به انجماد جنین‌های ماهی زبرا *B. rerio* را در مرحله پیش تفریخ با جزئیات بیشتری انجام دادند و گزارش کردند که جنین‌هایی که در مرحله پیش تفریخ در داخل طیف وسیعی از محافظ‌های برودتی (متانول، DMSO، گلیسرول، اتاندیول و ساکارز) در غلظت‌های مختلف برای مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده بودند، نرخ بقاء بالایی از خود نشان دادند. مشخص شد

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

که اتاندیول پس از ۳ و ۱ ساعت سمی می شود. علاوه‌براین، آنها مشاهده کردند که یکی از اثرات خنک‌سازی در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد، پایین آمدن نرخ بقاء جنین‌های مرحله پیش تفریخ است. چنین گزارش شده است که غلظت محافظ‌های برودتی، زمان تعادل و سرعت خنک‌سازی، جزو عوامل اصلی در مطالعات بر حفاظت انجمادی هستند. بالاترین نرخ بقاء در جنین‌ها در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد (۹۴ درصد) و در دمای دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد به میزان ۷۲ درصد، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به میزان ۴۳ درصد و در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد تنها ۸ درصد بود. با توجه به ایجاد کریستال‌های یخ درون تخمک‌ها که می‌تواند بر بقاء جنین‌ها تاثیر بگذارد، جنین‌ها در دمای بالاتر از ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمی‌شوند. Lui و همکاران (۱۹۹۹) تلاش کردند تا جنین‌های گلدفیش را از طریق عبور دادن تخم‌های ذخیره شده در داخل DMSO با غلظت ۵، ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد برای ۵ دقیقه منجمد نمایند. جنین‌ها در دمای ۱۵- و ۲۵- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه منجمد شدند. نرخ بقاء مشاهده شده به‌ترتیب ۲۰ درصد در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد در ۲۵- درجه سانتی‌گراد بودند و نرخ تفریخ ۱۵ و ۳ درصد در دمای ۱۵- و ۲۵- درجه سانتی‌گراد گزارش گردید.

Zhang و همکاران (۲۰۰۳ a,b) تاثیر متانول و توقف رشد در طول سرمای انجماد را بر جنین ماهی زبرا طی مراحل مختلف رشد مورد بررسی قرار دادند (مرحله ۶۴ سلولی، ۵۰ درصد اپی بولی، ۶ سومیتی، ۶ پریمی و مرحله جوانی زنی). در آزمایش آنها جنین‌ها پیش از انجماد در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد با سرعت سرد شدن آهسته و در دوره‌های زمانی مختلف درون متانول ذخیره می‌شوند. گزارش شده است که اضافه کردن متانول به محیط رشد جنین می‌تواند نرخ بقاء جنین را به طور قابل‌توجهی در تمامی مراحل رشد و نیز طی مرحله انجماد افزایش دهد. با افزایش غلظت متانول، میزان بقاء جنین‌ها افزایش می‌یابد. تا آن‌جایی‌که به حساسیت سرمایی مربوط می‌شود، ۵۰ درصد جنین‌های مرحله اپیبولی و پریم ۶- بعد از ۱۵ دقیقه به دلیل کمبود اکسیژن دچار توقف رشد شدند.

Chen و Tian (۲۰۰۵) هنگام مطالعه بر حفاظت انجمادی سفره ماهی گزارش کردند که پروپیلن گلیکول و متانول برای جنین سمی تر از دی متیل فرمامید (DMF) و DMSO هستند درحالی‌که استفاده از اتیلن گلیکول و گلیسرول سمی‌تر بود. علاوه‌براین، در تحقیقاتی که بر محلول‌های محافظ برودتی مختلف انجام شده، نشان داده شده است که ترکیب پروپیلن گلیکول و DMSO در حفاظت انجمادی ماهی فلاندر (کفشک ماهی) بهترین نتیجه را ایجاد می‌کند. همچنین با آزمایش بر حفاظت انجمادی جنین‌های سفره ماهی، چهارده لارو با مورفولوژی طبیعی و با موفقیت از میان ۲۹۲ جنین منجمد شده خارج شده و ۲۰ جنین بازیابی شده و زنده ماندند. علاوه‌براین، گزارش شده است که جنین‌ها در مراحل اولیه تخم‌ریزی حساسیت بیشتری نسبت به سرما نشان می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهند که حفاظت انجمادی جنین ماهی فلاندر امکان‌پذیر است.

Sharifuddin و Azizah (۲۰۱۴) مطالعاتی بر حفاظت انجمادی مارماهی (*Channa striata*) انجام دادند. هدف آنها از این مطالعه ارزیابی حساسیت جنین‌ها به دمای پایین در چهار محافظ برودتی مختلف بودند. آنها در مطالعه خود محلول‌های DMSO، اتیلن گلیکول، متانول و ساکارز را به عنوان محافظ‌های برودتی انتخاب کردند. جنین‌ها به‌ترتیب در دمای ۱۵، ۴ و ۲- درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه، ۱ ساعت و ۳ ساعت، به‌ترتیب نگهداری شدند. از این مطالعه چنین گزارش شد که در هر دو مرحله رشد جنین‌ها کاهش قابل‌توجهی در میزان تفریخ در دمای ۴ و ۲- درجه سانتی‌گراد و ذخیره‌سازی به مدت ۱ و ۳ ساعت مشاهده شده است. علاوه‌براین، مشاهده شد که جنین‌هایی در مرحله رشد ضربان قلب در مجاورت سرمای ۲- درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ ساعت در داخل محافظ برودتی متانول، ساکارز و اتیلن گلیکول قرار گرفته بودند، تحمل‌پذیری بالاتری داشتند.

همانگونه که مشخص است بیشتر این مطالعات به توسعه پروتوکل های انجماد و یا بررسی فاکتورهای مشخصی از فرایند انجماد متمرکز بوده است (Yang and Huo , 2022). کاربردهای فناوری انجماد برای ایجاد مخازن ژرم پلاسم یا تولید تجاری آبزی پروری محدود بوده است . در سال ۲۰۱۹ فائو اولین گزارش خود به صورت دستورالعملی برای استفاده، انجماد و خط مشی منابع ژنتیکی آبزی منتشر کرد (FAO, 2019) .

کرایو بانک تخم و تخمک ماهی

Isayeva و همکاران (۲۰۰۴) ضمن مطالعه حساسیت تخمک‌های ماهی زبرا گزارش کردند که تخمک‌های این ماهی

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

به دمای انجماد بسیار حساس هستند و با کاهش دما و افزایش دوره‌های قرارگیری در معرض محافظ‌های برودتی میزان بقاء نیز کاهش قابل‌توجهی پیدا می کند. علاوه‌براین، مشخص شده است که تخمک‌ها در مرحله III از تخم‌ریزی بیشتر از مرحله IV نسبت به سرما حساسیت نشان می‌دهند و نیز تخمک‌های هر ماده تاثیر معنی‌داری نسبت به حساسیت به سرما داشتند. این فاکتور حساسیت به سرما می‌تواند یکی از موانع پیش روی پروتکل فناوری انجماد و حفاظت از تخم باشد. Tsai و Lin (۲۰۰۹) مطالعاتی را بر حساسیت به سرما در فولیکول‌های اولیه تخمک‌های ماهی زبرا انجام دادند. بدین منظور، آنها مراحل مختلف رشد تخمک‌ها به‌ویژه مرحله I (رشد اولیه)، مرحله II و مرحله III (زرده سازی) را انتخاب کردند. بافت‌های تخمک‌ها ابتدا در بافر KCL و در محیط کشت L، ۱۸- درجه سانتی‌گراد و ۱- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴۴ ساعت نگهداری شدند. سپس این بافت‌ها در معرض متانول ۲ مولار و DMSO و در دمای ۱- و ۵- درجه سانتی‌گراد و برای مدت ۱۶۸ قرار گرفتند. فولیکول‌های شاهد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. چنین گزارش شده است که بافت‌های تخمک‌ها در مراحل I و II رشد نسبت به مرحله III حساسیت کمتری به سرما داشتند. بعدها، آنها این نتایج را به دنبال بلوغ فولیکول‌های تخمدانی منجمد شده، در شرایط آزمایشگاهی تایید کردند. Guan و همکاران (۲۰۱۰) ضمن انجام مطالعات متعددی بر حفاظت انجمادی تخمک‌های ماهی زبرا، میزان بقاء و حساسیت به سرما را در تخمک‌ها در حین ذخیره آنها در نیتروژن مایع، تاثیر محیط‌های انجماد مختلف و محافظ‌های برودتی گوناگون مورد بررسی قرار دادند. در مشاهدات آنها مشخص شد که نرخ بقاء تخمک‌های منجمد شده در بافر KCL به طور قابل‌توجهی بالاتر از تخمک‌های منجمد شده در محیط کشت L بود. آنها همچنین گزارش کردند که ذوب کردن سریع این تخمک‌ها و حذف مرحله استفاده از محافظ‌های برودتی به طور قابل‌توجهی نرخ بقاء تخمک‌ها را بهبود بخشیده و آنها را به بالاترین حد خود (۸۸ درصد) می‌رساند. با این‌حال، پس از ۲ ساعت از انکوباسیون در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد مشخص شد که نرخ بقاء تخمک‌های ذوب شده از انجماد تا درصد کاهش پیدا می‌کند. آنها تاکید کردند که روش‌های جدید ارزیابی نرخ بقاء تخمک‌ها مورد نیاز است.

بی‌شک نگهداری به روش انجماد جنین ماهی به دلیل موانع زیاد در طول فرآیند انجماد بسیار دشوار است. بنابراین، اخیراً تمرکز بیشتری بر انجماد تخمک‌های ماهی شده است. مزیت انجماد تخمک‌ها اندازه کوچک آنها، نفوذپذیری بالای غشاء و حساسیت کمتر به سرماست (Isayeva *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2005). چندین محقق مطالعاتی را بر انجماد تخمک‌های ماهیان دریایی و آب شیرین به‌ویژه ماهی زبرا انجام داده‌اند (Streit *et al*., 2014). Leandro و همکاران (۲۰۱۳) پس از مطالعه بر انجماد تخمک‌های ماهی زبرا در مرحله IV، گزارش کردند که توانایی لقاح در محلول‌های محافظ برودتی مختلف متفاوت است. آنها به عنوان محافظ برودتی از پروپیلن گلیکول، متانول و DMSO استفاده کردند. تغییرات ثبت شده در تخمک‌ها پس از انجماد به این صورت بود که در مواد الیافی، یکپارچگی غشاء در تخمک‌هایی که در مخلوطی از متانول و پروپیلن گلیکول حفظ شدند، دست نخورده بود. با این‌حال، هنگامی که تخمک‌ها داخل ترکیب متانول و DMSO نگهداری شده بودند، یکپارچگی غشاء در آنها کاهش پیدا کرده بود. مشاهده شد که فولیکول‌های واقع در بافت میانی تخمدان‌ها بیشتر از صدمات سرمازدگی و انجماد محفوظ هستند. در سلول‌های گرانولار یا دانه‌ریز، یکپارچگی میتوکندری در پروتکل انجماد آسیب دیده بود. علاوه‌براین، ذکر شده است که این نوع اطلاعات به توسعه پروتکل بهینه برای انجماد تخمک ماهی کمک خواهد کرد. Marques و همکاران (۲۰۱۵) نیز بقاء فولیکول‌های تخمدان ماهی زبرا پس از انجماد در ظرف فلزی را مورد بررسی قرار دادند. برای این‌کار آنها از بافت‌های کامل تخمدان و برش‌های آن استفاده کردند. در یکی از این آزمایش‌های آنها بقاء فولیکولی پنج مرحله از رشد را در محافظ‌های برودتی مختلفی بررسی کردند. سپس گزارش کردند که بالاترین نرخ بقاء مربوط به ذخیره فولیکول‌های نابالغ در داخل ترکیب متانول و پروپیلن گلیکول است. در آزمایش دیگر، قطعات بریده شده بافت تخمدان را در دو ظرف مختلف مانند لوله‌های پلاستیکی انجماد یا ظرف فلزی نگهداری و ارزیابی گردید. در این بخش از آزمایش این نتیجه‌گیری حاصل شد که پس از گذشت ۲۴ ساعت، خصوصیات مورفولوژیک انجماد فولیکول‌ها در شرایط انجمادی به‌خوبی حفظ می‌شوند. میزان بقاء فولیکولی نیز در قطعات منجمد شده بافت تخمدان در مقایسه با کل تخمدان کامل بالاتر بود. بررسی‌های متعددی بر پروتکل‌های موفق

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

برای بلوغ تخمک‌ها پس از انجماد در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است. Seki و همکاران (۲۰۰۸، ۲۰۱۱) گزارش کردند که آنها با موفقیت توانسته‌اند تخمک‌های ماهی زبرا را در مرحله III رشد بارور نمایند. این مطالعات به‌وضوح نشان می‌دهند که با انجماد تخمک‌ها در مراحل اولیه می‌تواند نتایج بهتری حاصل نمود.

Plachinta و همکاران (۲۰۰۴) مطالعه سمیت محافظ‌های برودتی در تخمک‌های ماهی زبرا را انجام داده‌اند. آنها در این مطالعه از DMSO، متانول، اتیلن گلیکول (EG)، پروپیلن گلیکول (PG)، ساکارز و گلوکز به عنوان محافظ‌های برودتی استفاده کردند. این محافظ‌های برودتی در مراحل مختلف رشد تخمدان مانند زرده سازی تخمدان، تخمدان بالغ و اووسیت‌های مرحله تخم بالغ، آزمایش شدند که ابتدا در محیط کشت Hank حاوی غلظت‌های مختلف انجماد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. آزمایش سمیت با استفاده از روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی و نیز با مشاهده تجزیه وزیکول ژرمینال اندازه‌گیری شد. گزارش‌ها حاکی از این است که اثر سمیت محافظ‌های بردوتی با افزایش غلظت آنها بالاتر می‌رود و تأثیر آن در مراحل پیشرفته بلوغ برای تخمدان بیشتر دیده می‌شود. به‌نظر می‌رسد که حساسیت تخمک‌ها به محافظ‌های برودتی در مرحله IV از رشد به حداکثر میزان خود می‌رسد. مطالعه Tsai و همکاران (۲۰۰۸) بر سمیت محافظ‌های برودتی در ماهی زبرا (*B. rerio*) انجام گردید. در آزمایش سمیت در این مطالعه مشاهده شد که در تخمک‌های مرحله رشد I و II؛ تاثیر سمیت محافظ‌های برودتی متانول، DMSO، پروپیلن گلیکول و اتیلن گلیکول افزایش پیدا می‌کند درحالی‌که به‌نظر می‌رسد تخمک‌ها در مرحله رشد III حساسیت کمتری دارند.

Kopeika و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که هنگامی که از DMSO به عنوان محافظ برودتی برای حفاظت از تخم/جنین ماهی زبرا استفاده می شود، mtDNA تغییرات زیادی از خود نشان نمی‌دهد و فرآیند جهش تحت کنترل است. همچنین گفته شده است که در طراحی پروتکل‌های انجماد تخمک و جنین، این عوامل باید با دقت بیشتری مدنظر قرار داده شوند. در سال‌های اخیر، محققانی مانند Martinez و همکاران (۲۰۱۶) اقدام به بررسی آبزیان برای تحمل سرما و حفظ ژنوم آبزیان آب شیرین کرده‌اند. در این بررسی‌ها گزارش شده است که تاثیر انجماد برای گونه‌های سلولی مختلف (اسپرم، تخمک، جنین، سلول‌های سوماتیک و سلول‌های اسپرماتوگونی اولیه) متفاوت از هم است و برای هر پروتکل نیز مزایا و معایبی گزارش شده است. چندین کرایوبانک که در اروپا، ایالات متحده، برزیل، استرالیا و نیوزیلند تاسیس شده، تمامی این عوامل را با جزئیات کامل مورد بحث قرار داده‌اند.

Janik و همکاران (۲۰۰۰) به منظور برطرف کردن موانع محافظ برودتی، از تکنیک ریز تزریق در جنین ماهی‌های زبرا استفاده کردند. هدف از ریز تزریق محافظ‌های برودتی فقط بقاء جنین نیست بلکه ارزیابی سمیت و آسیب سرمایی به لایه‌های تخمک نیز یکی دیگر اهداف بود. گزارش شده است که جنین‌ها پس از ریز تزریق پروپیلن گلیکول پس از ۵ روز نرخ بقاء بالاتری (۷۰ درصد) نسبت به DMSO (۶۰ درصد) نشان دادند. همچنین آنها گزارش کردند که به دلیل کمبود آب ناشی از نفوذپذیری پایین غشاء در جنین، نرخ بقاء کاهش پیدا می‌کند. با این‌حال، عوامل دیگری نیز وجود دارند که باید برای نتیجه‌گیری بهتر مدنظر قرار داده شوند. Zhang و همکاران (a,b ۲۰۰۵) نفوذپذیری غشاء تخمک‌های ماهی زبرا را در حضور محافظ‌های برودتی مختلف مطالعه کردند. این مطالعه در تخمک‌های در حال رشد مرحله IV و V انجام شدند. محافظ‌های برودتی مورد استفاده در این مطالعه DMSO، پروپیلن گلیکول و متانول بودند. تخمک‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد و در معرض این محافظ‌های برودتی قرار گرفتند. چنین گزارش شده است که نفوذپذیری غشاء در تخمک‌های مرحله IV به طور قابل‌توجهی کاهش پیدا می‌کند. هیچ تغییر قابل‌توجهی در حجم سلول‌های مواجه با متانول مشاهده نشد. همچنین بیان کردند که تخمین پارامترهای نفوذپذیری غشاء در تخمک‌های رشد مرحله V امکان‌پذیر نیست، زیرا غشاء این تخمک‌ها هنگام قرار گرفتن در معرض انجماد از آنها جدا می‌شود. اخیراً Sawitriو Amrit (۲۰۱۰) با استفاده از روش اولتراسوند مطالعاتی را در مورد نفوذپذیری متانول به جنین ماهی زبرا انجام دادند. بدین منظور، سه جنین (کوریون‌دار، با کوریون نرم و جنین‌های دست نخورده) انتخاب کردند. در این مطالعه نشان داده شد که در حضور محافظ برودتی DMSO، ۱۰۰ درصد بهبودی در جنین‌ها نشان داده شد و میزان بازیابی جنین‌های آسیب دیده در حضور DMSO نیز ۳/۱ درصد بود. از این مطالعات همچنین این گونه نتیجه‌گیری گردید که برای دستیابی به نفوذپذیری بیشتر می‌توان از متانول استفاده کرد،

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

اما برای موفقیت بیشتر در این زمینه به روش‌های جدید و غیر تهاجمی بیشتری نیاز است.

پس از تجزیه و تحلیل مطالعات موجود مشاهده گردید که تحقیقاتی که بر انجماد جنین‌های ماهی انجام شده، مراتب مختلفی را شامل می شود. مطالعاتی مانند پروتکل‌های انجمادی و ارتباط سمیت محافظ‌های برودتی با زمان انجماد و سرعت ذوب نیز دارای مراحل و مراتب مختلفی هستند. برخی از این مطالعات با هدف بررسی نفوذپذیری غشاء در حضور محافظ‌های برودتی مختلف انجام شده‌اند. برخی مطالعات نیز به توسعه روش‌های جدید برای ارزیابی نرخ بقاء و فرآیند رشد جنین ماهی‌ها پرداخته‌اند. در سال‌های اخیر، de Carvalho و همکاران (۲۰۱۴) در مقاله خود اثربخشی پروتکل‌های انجماد جنین ماهی را با جزئیات بیشتری مورد بحث قرار دادند. در یک تحقیق برای کرایو بانک ژنوم ماهی، تعدادی از محققان به عوامل ژنومی مختلف مانند اسپرماتوزآ، سلول‌های ژرم اولیه، تخمک‌ها و جنین‌های مراحل مختلف رشد پرداختند (Labbé *et al.*, 2013). همان‌طوری‌که قبلاً نیز ذکر شد، انجماد تخم، جنین و لارو به دلیل تکنولوژی‌های موجود دارای محدودیت است. چندین محقق روش‌های کرایو بانک را برای بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های تخمک‌ها مورد بررسی قرار دادند (Seki *et al.*, 2008, 2011; Tsai *et al.*, 2010). با این‌حال، توسعه چنین پروتکل‌هایی به مطالعات تجربی بیشتری نیاز دارد. شایان ذکر است، تکنیک‌های بیوتکنولوژیک در حال توسعه برای حفاظت از ژنوم ماهی، می‌توانند در حل مشکلاتی مانند یکپارچگی DNA سلولی، محافظت از غشاء سلولی، آسیب‌دیدگی کروماتین و ساختارهای سلولی و اپی‌ژنتیکی بسیار کمک‌کننده باشند (Chenais *et al.*, 2014).

تلاش‌های انجام شده برای توسعه کرایو بانک‌های تخم، جنین و لارو آبزیان صدف‌دار

کرایو بانک تخم و جنین آبزیان صدف‌دار

تکنولوژی انجماد می‌تواند یک ابزار بسیار مفید در نگهداری مواد ژنتیکی باشد. Gwo (۲۰۰۰) گزارش داد که کرایو بانک مایع منی (میلت) گونه‌های آبزی می‌تواند در تولید گونه‌های هیبرید، ماده‌سازی و نیز اهلی‌سازی و حفاظت از صفات مهم آبزیان تجاری نقش بسیار قابل‌توجهی در صنعت آبزی‌پروری داشته باشد. اخیراً تعدادی از محققان به ارزیابی لقاح مصنوعی در گونه‌های مختلف میگو پرداخته و میزان موفقیت‌های متفاوتی در نرخ تولید ناپلئی گزارش کرده‌اند (Vuthiphandchai *et al.*, 2007). با این‌حال، در تمامی این تکنولوژی‌ها هنوز هم کمبودهای بسیاری وجود دارد که نیاز به توجه و تحقیقات بیشتری دارند. به‌منظور اجتناب از وابستگی به تلقیح مصنوعی برای تولید ناپلی، انجماد جنین، ناپلی و لارو به‌عنوان ابزار جایگزین در نظر گرفته شده است. برای جلوگیری از کم آبی اسمزی در حین انجماد دو روش پیشنهاد گردیده است: یکی فرآیند انجماد شیشه‌ای است که در آن سلول‌ها مستقیماً در نیتروژن مایع غوطه‌ور می‌شوند و به‌سرعت حالت خود را از مایع به شیشه‌ای تغییر می‌دهند و دیگری انجماد کنترل شده و ذوب آهسته است. هر دو این روش‌ها نیازمند حذف آب از سلول‌ها، تزریق محافظ‌های برودتی و متعاقباً حذف ترکیبات مضر از جنین‌ها هستند (Saragusty and Arav, 2011). Dong و همکاران (۲۰۰۴) هنگام مطالعه بر انجماد چندین گونه میگوی مختلف گزارش کردند که جنین‌ها و لاروها در مراحل پیشرفته رشد خود مقاومت بالاتری به سمیت محافظ‌های برودتی نسبت به جنین‌های مراحل اولیه رشد نشان می‌دهند.

در سطح جهانی، پرورش نرم تنان جزء اصلی تولیدات دریایی بوده است. تولید سالانه نرم تنان در سراسر جهان در سال ۲۰۱۸ ، ۱۷/۵ میلیون تن بود که ۵۶/۸ درصد از کل تولید آبزی پروری دریایی (۳۰/۸ میلیون تن) را با رشد سالانه ۳/۵ درصدی بین سال های ۲۰۰۰-۲۰۱۷ به منظور حمایت از بازارهای جهانی غذاهای دریایی تشکیل می داد (FAO، ۲۰۲۰). انجماد ژرم پلاسم در نرم تنان اولین بار برای انجماد اسپرم صدف اقیانوس آرام *Crassostrea gigas* در سال ۱۹۷۱ گزارش شد (Yang and Huo , 2022). تا به امروز، بیش از ۸۰ مقاله منتشر شده است که گونه‌های مورد مطالعه منحصراً گونه‌های آبزی پروری شامل صدف اویستر، ماسل ها، اسکالوپ، صدف دکمه ای و صدف آبالون بوده است (Yang, 2017). این مطالعات در درجه اول بر توسعه پروتکل های آزمایشگاهی به جای ایجاد مخازن ژرم پلاسم یا استفاده تجاری متمرکز بودند.

انجماد جنین‌های آبزیان صدف‌دار در مقایسه با سایر آبزیان، به دلیل اندازه کوچکتر آنها که به نفوذپذیری موثر آب و مواد برودتی، درصد کم زرده و شکاف هولوبلاستیک جنین در حال

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

رشد کمک می کند، آسان‌تر است (Robles *et al*., 2008). در میان مطالعات مختلفی که بر انجماد جنین و لاروهای آبزیان صدف‌دار انجام شده است، عمده مطالعات بر اویستر اقیانوس آرام به دلیل ارزش تجاری بالای آن بوده است (Suquet *et al*., 2014). Asahina و Takahashi (۱۹۷۸) گزارش کردند که جنین‌های در حال رشد توتیای دریایی می‌تواند برای یک مدت کوتاه در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد و با حضور محافظهای برودتی مانند DMSO و اتیلن گلیکول زنده بماند. در میان تخم‌ها و جنین‌های اوویستر و صدف دو کفه‌ای که در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منجمد شده بودند و پس از ۶۰-۳۰ دقیقه ذوب شدند، بقاء و رشد آنها با لاروهای گروه شاهد غیر منجمد از همان والدین مقایسه شدند. رشد لارو صدف مانیلا (*Manila clam*) به مدت ۳۵ روز کنترل شد و تفاوت معناداری بین طول پوسته لاروهای منجمد شده و لاروهای گروه کنترل مشاهده نشد. میزان بقاء لاروهای منجمد شده در مقایسه با لاروهای گروه شاهد به میزان ۸۴ درصد بیشتر است. در یک آزمایش، لارو صدف اقیانوس آرام که منجمد شده بود، با موفقیت پرورش داده شد، اما بقاء آن خیلی کم گزارش شد. با این‌حال، پس از اصلاح فرآیند انجماد نرخ بقاء لاروها به طور قابل‌توجهی افزایش یافتند (Rana *et al*., 1992). آنها همچنین گزارش دادند که انجماد تخم و جنین صدف *Crassostrea gigas* چندان موفقیت‌آمیز نبود. با این‌حال، درجات مختلفی از موفقیت با استفاده از لاروهای تروکوفور اولیه (۷ ساعت) گزارش شده است. آنها در تمامی این آزمایش‌ها دریافتند که DMSO در غلظت‌های ۱/۵-۱/۰ مولار و نیز ترکیب آن با گلیسرول، نرخ بقاء لاروها را بهبود می‌بخشد. میزان بقاء لاروها در نهایت پس از ذوب شدن ۵۰-۴۰ درصد بود. مشخص شد که نرخ بقاء پس از ذوب در جنین‌های بزرگ‌تر به میزان ۱۵درصد بیشتر است.

کرایو بانک لاروهای آبزیان صدف‌دار

در بررسی انجماد جنین در نرم تنان ، بقاء جنین های دیر رس/ لاروهای اولیه *Ruditapes philippinarum* ۶۴ درصد (Kang, 2021)، ۷۲-۷۸ درصد در *Meretrix lusoria* و ۶۲-۶۷ درصد در *Crassostrea gigas* گزارش گردیده است اما در لاروهای صدف آبالون *Haliotis diversicolor diversicolor* هیچ گونه بازماندگی مشاهده نشد (Lin and Chao, 2011).

Preston و Comen (۱۹۹۸) اثرات محافظهای برودتی را بر جنین میگوی *P. esculentus* مورد بررسی قرار دادند. با توجه به یافته‌های آن‌ها چنین نتیجه‌گیری می‌شود که موانع مختلفی بر سر راه انجماد موفق جنین‌های میگوی پنائیده وجود دارد. همچنین ثابت شده است که حساسیت جنین این میگوها نسبت به سرما و تغییرات اسمزی بسیار بالاست و قابلیت تحمل‌پذیری آنها تا دمای ۱- درجه سانتی‌گراد به‌ندرت به ۲۰ دقیقه می سد. گزارش شده است که قرار گرفتن سریع در معرض شرایط هایپراسموتیک یا هیپواسموتیک برای جنین‌های در حال رشد، کشنده است. همچنین آنها اشاره کردند که تحمل جنین در برابر مواد برودتی با توجه به وزن مولکولی و غلظت آنها می تواند متفاوت باشد (Preston and Comman, 1998). برای اولین بار میگوهای ناپلی *P. indicus* توانستند با استفاده از بخار نیتروژن مایع در دمای ۳۰- و ۴۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شوند. درصد بالای بقاء ناپلی‌های منجمد شده تا دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد (۸۲ درصد) و ۴۰- درجه سانتی‌گراد (۶۳ درصد) با استفاده از اتیلن گلیکول ۱۵ درصد ثبت شد که نشان می‌دهد، ذوب سریع و رقیق شدن آهسته در پروتکل انجماد ناپلی میگوی پنائیده ضروری است. Simon و همکاران (۱۹۹۴) تلاش کردند تا یک محیط انجماد مناسب برای جنین‌های *P. indicus* ایجاد کنند. آنها از میان پنج مرحله رشد در جنین‌های میگو مرحله گاسترولا را انتخاب کردند و نشان دادند جنین‌های ۵ ساعته در برابر تماس طولانی مدت با محافظهای برودتی مقاوم بودند و مشاهده شد که از ۱۱ محافظ برودتی مورد استفاده، ترکیب متانول با اتیلن گلیکول (DMSO) نرخ تفریخ برابر با گروه شاهد داشتند. Diwan (۲۰۰۰) هنگام مطالعه بر جنین و ناپلی‌های میگوی *P. semisulcatus* گزارش دادند که هنگام استفاده از DMSO و گلیسرول به صورت مستقل به عنوان محافظهای برودتی، نرخ بقاء جنین‌ها پس از ذوب شدن به صفر می رسد. اما ۵۰-۴۰ درصد از جنین‌ها با انجماد در مخلوطهای DMSO و گلیسرول تهیه‌شده در غلظت ۲۰-۵ درصد، با موفقیت به ناپلی‌ها تبدیل شدند. موفقیت مشابهی را همان نویسندگان در مورد انجماد ناپلی‌ها نیز گزارش کرده‌اند. مطالعه McLellan و همکاران (۱۹۹۲) بر غربالگری مراحل رشد جنین برای

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

ارزیابی مقاومت در برابر دمای خنک‌کننده (۷+ و صفر درجه سانتی‌گراد) نشان داد که ناپلیوس پنجم (N5) و مرحله اول زوئوپلانکتونی *P. vannamei* قادر خواهد بود که استرس ناشی از سرما و انجماد را تحمل کند. Alfaro و همکاران (۲۰۰۱) حساسیت جنین‌ها و لاروهای در حال رشد میگوهای *Trachypenaeus byrdi* و *Penaeus stylirostris* به انجماد، قرار گرفتن در معرض محافظت کننده‌های انجماد را به منظور کسب دانش اولیه روش‌های انجماد مطالعه کردند. محافظهای سرمایی مورد استفاده DMSO، ساکارز، متانول و گلیسرول بودند. گزارش شده است که جنین‌های مراحل مورولا و پیشرفته‌تر تحمل بیشتری نسبت به DMSO در مقابل سرما در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان دادند اما هنگام مواجهه با دمای صفر درجه سانتی‌گراد، حساس‌تر بودند. استفاده از متانول در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد و با غلظت ۲ مولار به‌نظر می‌رسد که غلظت غیر سمی برای جنین‌های مرحله رشد پیشرفته است. گزارش شده است که جنین‌های مرحله مورولا نسبت به جنین‌های مراحل پیشرفته‌تر نسبت به تیمار بالای نمک با غلظت ۵۵ppt مقاوم‌تر هستند. همچنین لاروهای مرحله ناپلی نسبت به جنین در مواجهه با DMSO تحمل بهتری در مقابل خنک شدن نشان دادند. Dong و همکاران (۲۰۰۴) اثرات سمیت انجماد بر جنین و لارو میگوی سفید *L. vannamei* را مورد مطالعه قرار دادند. محافظهای برودتی در مطالعه آنها متانول، اتیلن گلیکول، پروپیلن گلیکول و DMSO بود. جنین‌ها و لاروهای انتخابی شامل مراحل: جنین‌های پیش ناپلیوس، ناپلیوس (N I) ، ناپلیوس (N II)، ناپلیوس (N V)، و تک یاخته I و تک یاخته III، بودند. سه غلظت مختلف انجماد مورد استفاده قرار گرفت و جنین و لاروهای هر مرحله به مدت ۶۰-۵ دقیقه در معرض هر محافظ سرما قرار گرفتند. گزارش شده است که برای لاروهای پروتوزوآ (Z1) اتیلن گلیکول دارای کمترین میزان سمیت بود، زیرا میزان بقاء لاروها بالاتر از ۸۳ درصد بود. لاروهای مرحله رشد پیشرفته (Z3) نسبت به غلظت‌های بالاتر محافظهای برودتی، تحمل‌پذیری بیشتری داشتند. جنین‌های ناپلیوس بالاترین مقاومت را در برابر انجماد داشتند. اخیراً Tsai و Lin (۲۰۰۹) سمیت محافظهای برودتی را در میگوهای مرجانی، *Stenopus hispidus* مورد بررسی قرار دادند. برای این مطالعه آنها سه مرحله رشد جنینی را انتخاب کردند که شامل: مرحله تشکیل چشم، مرحله ایجاد ضربان قلب و مرحله پیش از تخم‌گذاری، بودند. میزان سمیت محافظهای انجماد به‌ترتیب در متانول، اتیلن گلیکول، DMSO، گلیسرول و دی متیل استامید بالاتر است. به‌نظر می‌رسد، جنین‌های مرحله پیش از تخم‌گذاری نسبت به جنین‌های مراحل تشکیل چشم و ضربان قلب تحمل بیشتری دارند.

توسعه بانک‌های گامت برای حیوانات آبزی دیدگاه‌های جدیدی را در صنعت شیلات به‌وجود آورده است. در صنعت شیلات و آبزی‌پروری، شناسایی نژاد والدین می‌تواند کیفیت ذخایر آبزیان وحشی را بالا ببرد، اما پرداختن به موضوعات مرتبط با آن دشوار است. توانایی انجماد گامت‌های آبزیان و ذخیره‌سازی آنها برای مدت زمان طولانی از اهمیت قابل‌توجهی در بهبود ژنتیکی پرورش آبزیان برخوردار است. در سال‌های اخیر با توجه به اهمیت افزایش تولید آبزیان، مطالعات بسیاری در این زمینه انجام شده‌اند. در بیشتر مواقع گامت‌های آبزیان، ذخیره و سپس تکثیر می‌گردد. هنگامی که تماس بین تخمک و اسپرم برقرار شد، گامت‌های اسپرم به عنوان پیش‌شرط لقاح باعث ایجاد واکنش فعال‌سازی تخمک می‌گردد. نفوذ اسپرم به تخمک باعث تحریک شدن آنها می گردد (Clark *et al.*, 1973). گامت‌های آبزیان از بسیاری از جهات بسیار منحصربه‌فرد هستند و تفاوت‌های چشمگیری با گامت‌های حیوانات خشکی‌زی دارند. تحقیقات انجام شده بر ساختار گامت‌ها نیز بسیار محدود است و در این زمینه اطلاعات زیادی در دسترس نیست.

نتیجه‌گیری

موفقیت در انجماد گامت آبزیان در مقایسه با مهره‌داران خشکی به‌ویژه پستانداران بسیار کمتر است. در حفظ گامت‌ها، اساساً انجماد تخمک‌ها نسبت به اسپرم دشوارتر است. دلیل اصلی این امر نیز بزرگ بودن تخم‌هاست که در فرآیند انجماد باعث نفوذپذیری پایین محافظهای برودتی می‌گردد. گاهی اوقات نیز درون تخم‌ها، کریستال‌های یخی تشکیل می‌شود که باعث آسیب به تخم می‌گردد. همچنین مشخص شده است که کروموزم‌های موجود در تخمک‌ها نسبت به اسپرم آسیب پذیرترند. علاوه‌براین، آسیب به غشاء اسپرم و تخمک‌ها به عنوان یک عامل آسیب رسان مهم در فرآیند انجماد/ ذوب مشاهده می‌شود. شواهد اخیر نشان می‌دهند که برخی از آنزیم‌های اصلی در سلول‌ها می‌توانند تاثیرات یخزدگی را

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

کاهش دهند. یکی از محدودیت‌های اصلی، در توسعه صنعت آبزی‌پروری، در دسترس نبودن مولد کافی برای تولید تخم در زمان مورد نظر است. حتی در صورتی که مولدین این آبزیان به‌وفور در دسترس باشند، نگهداری و مدیریت آنها بسیار دشوار و هزینه‌بر است. بنابراین، به منظور حل این مشکل نیاز به تکنولوژی مناسبی برای انجماد گامت‌های زنده وجود دارد تا از این طریق بتوان پرورش آبزیان در شرایط اسارت و کنترل شده را امکان‌پذیر ساخت.

منابع

Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D. and Jana, B.B., 2003. Stage dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita)* embryos to different concentration of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology*, 46: 2–16. doi: 10.1016/s0011- 2240(02)00138-4

Alfaro, J., Komen, J., and Huisman, E. M. A., 2001. Cooling, cryoprotectant and hyper saline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. *Aquaculture*, 16: 353–366.

American Chemical Society (ACS) News, 2017. Zebra Fish Embryo Cryopreservation Achieved by Using Gold Nanotechnology and Laser. Tokyo: Fish Information Services (FIS).

Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F. and Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24: 324–331. doi: 10.1016/0011-2240(87)90036-8

Aril, N., Namai, K., Gomi, F. and Nakazawa, T., 1987. Cryopreservation of medaka embryos during development. *Zoological Science*, 4: 813–818.

Asahina, E. and Takahashi, T., 1978. Freezing tolerance in embryos and spermatozoa if the sea urchin. *Cryobiology*, 15: 122–127. doi: 10.1016/0011- 2240(78)90016-0

Bart, A., 2000. "New approaches in cryopreservation of fish embryos," *in Cryopreservation in Aquatic Species*, 8, eds T. R. Terrence and P. M. Mazik (Baton Rouge: World Aquaculture Society), 179–187. doi: 10.1006/cryo.1997.2014.

Chen, S.L. and Tian, Y.S., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology*, 63: 1207–1219. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.007

Chenais, N., Depince, A., Le Bail, P.Y. and Labbe, C., 2014. Fish cell cryopreservation and fish reconstruction by nuclear transfer stand as promising technologies for preservation of finfish genetic resources. *Aquaculture International*, 22: 63–76. doi:10.1007/s10499-013-9671-4

Cheung, T.S., 1966. (published online 2009). The development of the egg membrane and egg attachment in the shore crab Carcinus maenas, and some related decapods. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 46: 373–400. doi: 10.1017/S0025315400027181

Clark, W. H. Jr., Talbot, P., Neal, R. A., Mock, C.R., and Salser, B.R., 1973. *In vitro* fertilization with on-motile spermatozoa of the brown shrimp Penaeus aztecus. *Marine biology*. 22:353–354.

Clark, W.H. Jr. and Lynn, J.W., 1977. A Mg^{++}dependent cortical reaction in the eggs of penaeid shrimp. *Journal of Experimental Zoology*, 200:177–183. doi.org/10.1002/jez.1402000122

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

Clark, W.H. Jr., Lynn, J.W., Yudin, A.I. and Ho, P., 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *penaeid* shrimp. *Biology Bulletin*, 158:175–186.

Cotelli, F., Andronico, F., Brivio, M.L. and Lamia, C., 1988. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus)*. *Journal of Ultrastructure* and *Molecular Structure Research*, 99: 70–80.

Danilo, P.S.Jr., Leandro, C.G., Ricardo, P.R., Darci, C.F., Melanie, D. and Zhang, T., 2014. "Cryopreservation of embryos and oocytes of South American fish species*," in Recent Advances in Cryopreservation*, ed. H. Yamashiro (Rijeka: InTech). 308P.

de Carvalho, A.F.S., Ramos, S.E., de Carvalho, T.S.G., de Souza, Y.C.P., Zangeronimo, M.G. and Pereira, L.J., 2014. Efficacy of fish embryo vitrification protocols in terms of embryo morphology-a systematic review. *Cryoletters*, 35: 361–370.

Dinnyes, A., Urbanyi, B., Baranyai, B. and Magyary, I., 1998. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in thepresence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology*, 50: 1–13. doi: 10.1016/s0093-691x (98)00108-3

Diwan, A.D., Harke, S.N., Panche, A.N., 2020. Cryobanking of Fish and Shellfish Egg, Embryos and Larvae: An Overview. Frontiers in *Marine Science*, 7:251. doi: 10.3389/fmars.2020.00251

Diwan, A.D., 2000. Shrimp embryo cryobanking is now possible. *Current Science*, 78: 1282–1212.

Diwan, A.D., Ayyappan, S., Lal, K.K. and Lakra, W.S., 2010. Cryopreservation of fish gametes and embryos. *Indian Journal of Animal Sciences*, 80:109–124.

Dong, Q., Lin, J. and Huang, C., 2004. Effects of cryoprotectant toxicity on the embryos and rvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 242: 655–670. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.08.040

FAO, 2019. The State of the World's Aquatic Genetic Resources for Food and Agriculture, FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments, Rome, pp. 290.

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action., Rome, 206P.

Guan, M., Rawson, D.M. and Zhang, T., 2010. Cryopreservation of zebra fish *(Danio rerio)* oocytes by vitrification. *Cryoletters*, 31:230–238.

Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research*, 31: 259–271. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00462.x

Hagedorn, M., Hsu, E., Kleinhans, F.W. and Wildt, D.E., 1997. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. *Cryobiology*, 34: 335–347. doi: 10.1006/cryo.1997.2014

Harvey, B., Kelly, R. N., and Ashwood-Smith, M. J., 1983. Cryobiology Permeability of intact and dichorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Aquaculture* 20, 432–439. doi: 10.1016/0011-2240(83) 90033-0

Horton, H.F. and Ott, A.G., 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33: 995–1000.

Isayeva, A., Zhang, T. and Rawson, D.M., 2004. Studies on chilling sensitivity of zebra fish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*, 49: 114–122. doi: 10.1016/j. cryobiol.2004.05.005

Janik, M., Kleinhans, F.W. and Hagedorn, M., 2000. Overcoming permeability barriers by microinjecting cryoprotectants into zebra fish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology*, 41:25 - 35. doi: 10.1006/cryo.2000.2261

Kang, K.H., 2021. Effect of cryoprotectants on the cryopreservation of *Manila clam*, Ruditapes philippinarum embryo. *Journal of Convergence for Information Technology*, 11: 128- 135.

Keivanloo, S. and Sudagar, M., 2013. Preliminary studies on the cryopreservation of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos. Open Access *Scientific Reports*, 2:674. doi: 10.4172/scientific reports: 674

Keivanloo, S. and Sudagar, M., 2016. Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos by DMSO-based vitrificant solutions. *Theriogenology*, 85: 1013–1018. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.012

Kopeika, J., Zhang, T., Rawson, D.M. and Elgar, G., 2005. Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebra fish (*Danio rerio*) blastomere cells. Mutat. Res. Fundament. *Mutation Research* Mutagen, 570: 49–61. doi: 10.1016/j. mrfmmm.2004.09.007

Labbé, C., Robles, V. and Herráez, M.P., 2013. "Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation," in Advances *in Aquaculture Hatchery Technology*, eds G. Allan and G. Burnell (Sawston: Wood Head Publishing), 76–116.

Labbé, C., Haffray, P., Mingant, C., Quittet, B., Diss, B., Tervit, H. R., … Suquet, M., 2018. Cryopreservation of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae: Revisiting the practical limitations and scaling up the procedure for application to hatchery. *Aquaculture*, 488: 227–234. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.01.023

Leandro, C.G., Danilo, P.S., Zampolla, T., Mikich, A.B. and Zhang, T., 2013. A study on the vitrification of stage III zebra fish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, 67:347–354. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.10.002

Lin, T.T., Chao, N.H., 2011. Cryopreservation of eggs and embryos of shellfish. in: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), Cryopresevation in Aquatic Species. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, pp. 604-615.

Linhart, O., Rodina, M., and Cosson, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp Cyprinus carpio: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, 41: 241–250. doi: 10.1006/cryo.2000.2284

Liu, X.H., Zhang, T. and Rawson, D.M., 2000. Effects of cooling rates and anoxia on the chilling sensitivity of zebra fish (*Danio rerio*) embryos. *Cryobiology*, 39:318–319.

Liu, Y., Gluis, M., Miller-Ezzy, P., Qin, J., Han, J., Zhan, X., & Li, X., 2020. Development of a programmable freezing technique on larval cryopreservation in Mytilus galloprovincialis. *Aquaculture*, 516 : 734554.doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734554

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

Liu, R., Catalanno, S.R., Qin, J., Han, J., Zhan, X., Li, X., 2022. Effects of cryopreservation on redox status and gene expression of trochophore larvae in *Mytilus galloprovincialis*. *World Aquaculture Society*. 53(2): 516-526. doi:10.1111/jwas.12855

Loeffler, C. and Lovtrup, S., 2000. Water balance in the salmon egg. *Journal of Experimental Biology*, 52, 291–298.

Lynn, J.W. and Clark, W.H. Jr., 1983. A morphological examination of sperm egg interaction in the fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Biology Bulletin*, 164:446–458. doi.org/10.1242/jeb.52.2.291

Marques, L.S., Mikich, A.B., Leandro, G., Laura, A.S., Daniel, M. and Zhang, T., 2015. Viability of zebra fish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container. *Cryobiology*, 71: 1–7. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.09.004

Martinez, P.S., Horváth, Á, Labbé, C., Zhang, T., Robles, V. and Herráez, P., 2016. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472:156–177.

Martinez-Paramo, S., Horvath, A., Labbe, C., Zhang, T.T., Robles, V., Herraez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R., Cabrita, E., 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. 472: 156-177. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042

McLellan, M.R., Mac Fadzen, I.R.B., Morris, G.J., Hartinez, G. and Wyban, J.A., 1992. "Recovery of shrimp embryos (*Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon*) from -*30◦C," in Proceedings of the Workshop on Gamete and Embryo Storage and cryopreservation of Aquatic Organisms*, Marly Le Roi.

Ninhaus, S.A., Foresti, F., Azevedo, A., Agostinho, C.A. and Silveira, R.V., 2008. Cryogenic preservation of embryos of Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (*Characiforme; Prochilodontidae*). *Zygote*, 17:45. doi: 10.1017/S0967199408004991

Plachinta, M., Zhang, T. and Rawson, D.M., 2004. Studies on cryoprotectant toxicity to zebra fish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryoletters*, 25: 415–424.

Preston, N.P. and Coman, F.E., 1998. "The effects of cryoprotectants, chilling and freezing on *Penaeus esculentus* embryos and nauplii," *in Advances in Shrimp Biotechnology*, ed. T.W. Flegel (Khlong Nueng: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology).

Rall, W.F., 1993. "Recent advances in the cryopreservation of salmonids fishes," *in Genetic conservation of Salmonids fishes*, eds J.G. Cloud and G.H. Thorgard (New York: Plenum Press), 138–158.

Rana, K.J., McAndrew, B.J. and Musa, A., 1992. "Cryopreservation of oyster, Crassostrea gigas eggs and embryos," *in Proceedings of the Workshop on Gameteand Embryo Storage and cryopreservation of Aquatic Organisms*, Marly Le Roi. doi: 10.1016/0093-691x (95)00088-p

Rawson, D.M. and Zhang, T., 2005. New Approaches to the Cryopreservation of Fish Oocytes and Embryos. *Turin: Villa Gualino*, 209–210.

Rawson, D.M., Zhang, T., Kalicharan, D. and Jongebloed, W.L., 2000. FE-SEM and TEM studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula stage embryo of

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

the zebra fish (*Brachydanio rerio*): a consideration of the structural and functional relationship with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research*, 31: 325–336.

Robles, V., Cabrita, E., Anel, L. and Herráez, M. P., 2006. Micro injection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: toxicity and protein distribution. *Aquaculture*, 261:1299–1306. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.07.047

Robles, V., Cabrita, E., Acker, J.P. and Herraez, M.P., 2008. "Embryo cryopreservation: what we know until now," *in Methods in Reproductive Aquaculture*, eds E. Cabrita, V. Robles, and M.P. Herraez (Boca Raton: CRC Press), 261–294.

Routray, P., Suzuki, T. and Strüssmann, C.A., 2002. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*. *Theriogenology*, 58: 1483–1496.

Saragusty, J. and Arav, A., 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141: 1–19. doi: 10.1530/REP-10-0236

Sawitri, S. and Amrit, B., 2010. Ultrasound enhanced permeation of methanol in to zebra fish, *Danio rerio*, embryos. *Aquaculture*, 303: 71–76. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.018

Seki, S., Kouya, T., Tsuchiya, R., Valdez, D.M., Jin, B. and Hara, T., 2008. Development of a reliable in-vitro maturation system for zebra fish oocytes. *Reproduction*, 135: 285–292. doi: 10.1530/REP-07-0416

Seki, S., Kouya, T., Tsuchiya, R., Valdez, D.M., Jin, B. and Koshimoto, C., 2011. Cryobiological properties of immature zebra fish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. *Cryobiology*, 62: 8–14. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.11.003

Sharifuddin, M.M. and Azizah, M.N.S., 2014. Preliminary studies on cryopreservation of snakehead (*Channa striata*) embryos. *Cryobiology*, 69: 1–9. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.001

Simon, C., Dumont, P., Cuende, F. and Dilter, A., 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. *Cryobiology*, 31: 245–253.

Streit, D.P., Godoy, L.C., Ribeiro, R.P., Fornari, D.C., Digmayer, M. and Zhang, T., 2014. "Cryopreservation of embryos and oocytes of South American fishspecies*," in Recent Advances in Cryopreservation*, ed. H. Yamashiro (London: IntechOpen). 308P.

Suquet, M., Labbe, C., Puyo, S., Mingant, C., Quittet, B. and Boulais, M., 2014. Survival, growth and reproduction of cryopreserved larvae from a marine Invertebrate, the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *PLoS One*, 9:e93486. doi: 10.1371/journal.pone.0093486

Talbot, P. and Goudeau, M., 1988. A complex cortical reaction leads to formation of the fertilization envelope in the lobster *Homarus*. *Gamete Research*, 19: 1–18. doi: 10.1002/mrd.1120190102.

Tsai, S., Rawson, D.M. and Zhang, T., 2008. Studies on cryoprotectant toxicity to early stage zebra fish (*Danio rerio*) ovarian follicle. *CryoLetters*, 29: 477–483.

Tsai, S. and Lin, C., 2009. Effects of cryoprotectant on the embryos of banded coral shrimp *(Stenopus hispidus*), preliminary

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

studies to establish freezing protocols. *CryoLetters*, 30: 373–381.

Tsai, S., Rawson, D. M., and Zhang, T., 2010. Development of in vitro culture method for early stage zebra fish *(Danio rerio)* ovarian follicles for use in cryopreservation studies. *Theriogenology*, 74: 290–303. doi: 10.1016/j. theriogenology.2010.02.013

Valdez, M.D., Miyamoto, A., Hara, T., Edashige, K. and Kasai, M., 2005. Sensitivity to chilling of medaka (*Orysias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, 64:112–122. doi: 10.1016/j. theriogenology.2004.11.006

Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N., 2007. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology*, 68: 1192–1199. doi: 10. 1016/j.theriogenology.2007.08.024

Yang, H., 2017. Application of germplasm preservation in breeding programs for molluscan shellfish aquaculture and restoration. *Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency*. 45, 15-20

Yang, H., Huo, Y., Yee, J.C., Yarish, C., 2021. Germplasm cryopreservation of macroalgae for aquaculture breeding and natural resource conservation: A review. *Aquaculture.* 544, 737037. 10.1016/j.aquaculture.2021.737037

Yang, H., Huo, Y., 2022. Review of molluscan larval cryopreservation and application to germplasm cryobanking and commercial seed production. *Aquaculture*, 547:737491. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737491

Zhang, T. and Rawson, D.M., 1993. Cryoprotectant toxicity and permeability studies on zebra fish (*Brachydanio rerio)* embryos. *Cryobiology*, 6:640. doi: 10.1006/cryo.1997.2002

Zhang, X. S., Zhao, L., Hua, T. C., and Zhu, H. Y., 1989. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio)* embryos. *CryoLetters* 10, 271–278. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.02.003.

Zhang, T., Liu, X.H. and Rawson, D.M., 2003a. Effects of methanol anddevelopmental arrest on chilling injury in zebra fish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, 59: 1545–1556.

Zhang, T., Plachinta, M., Isayeva, A. and Rawson, D.M., 2003b. Studies on zebra fish (*Danio rerio*) oocytes sensitivity to chilling and cryoprotectant toxicity. *Cryobiology*, 47: 259. doi: 10.1016/j.theriogenology. 2004.04.011

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Y., Xu, Y.Z., Hu, J.H. and Xu, Y.Y., 2005a. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectant to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*, 63: 765–773.

Zhang, T., Plachinta, M., Kopeika, J., Rawson, D. M., Cionna, C., Tosti, L., .2005b. Membrane integrity and cathepsin activities of zebra fish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to -196_C using controlled slow cooling. *Cryobiology* 51, 385–386. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.01.002

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]

Evaluation of cryopreservation of fish and shellfish egg, embryos and larvae

Mahmoudi R.[1]*; Salahei Ardekani M.M.[1]; Fallahi R.[2]

* Roghaye.mahmodi@gmail.com

1-Shahid Motahary Cold Water Fishes Genetic and breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Yasoj, Iran.
2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

Abstract

Number of attempts has been made to cryopreserve fish and shellfish gametes. Success has been achieved to establish only sperm banks in case of some commercially important fish. In shellfish, also particularly in shrimps, though the sperm cryopreservation was successful; no attempts were made to develop sperm banks. As far as cryopreservation of egg and embryos of fish and shellfish is concerned, less research efforts were made with limited success. Number of reasons have been given for the failure of egg/embryo cryopreservation and the main barriers speculated are low membrane permeability in the eggs, the large yolk mass of the oocyte, and the presence of compartments in early developing embryos. These factors result in ice crystal formation during the freezing process. In addition, the oocytes and embryos are prone to chilling injuries unrelated to ice crystal damage. There are number of other problems reported by several researchers in the egg/embryo cryobanking protocols which are elaborately discussed in the present paper. There is an urgent need to develop a viable cryobanking technology for fish egg/embryos to enhance fish production in captive condition. Attempts to cryopreserve larvae of aquatic animals are another challenge occurring in the recent past. The aim of the present review is to collect comprehensive information on the efforts so far made on fish and shellfish egg and embryo cryobanking; and to assess the challenges in the development of viable technology and plan for future research for making this technology viable and cost effective.

Keywords: Cryobanking, Fish, Shellfish, Egg, Embryos, Larvae

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.5.3]