اثر سمیت برخی مواد ضد انجماد در جنین ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) به روش غوطه وری

سعیده کیوانلو [۱]
محمد سوداگر [۲*]

تاریخ دریافت :۹۱/۳/۲۷
تاریخ تصویب : ۹۲/۲/۱۰

چکیده

انجماد جنین ماهیان، نیازمند ورود مقادیر و غلظت های مناسبی از مواد ضد انجماد به قسمت های مختلف جنین می باشد. در این مطالعه به منظور بررسی اثر سمیت مواد ضد انجماد، جنین ماهی قره برون (در دو زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از لقاح) مورد بررسی قرار گرفت و از متانول، اتیلن گلیکول و ۱و۲- پروپان دی اُول (در غلظت ۱ تا ٦ مولار)، ساکارز و عسل (در غلظت های ۱۰،۱۵و۲۰ درصد) و پلی ونیل پیرولیدون (با غلظت های ۵،۱۰و۱۵ درصد) به عنوان مواد ضد انجماد استفاده گردید. جنین ها در دو زمان ۵ و ۱۰ دقیقه در این مواد غوطه ور، سپس آبکشی شدند و تا زمان تفریخ در داخل انکوباتورها قرار گرفتند.نتایج نشان داد در میان مواد ضد انجماد مورد بررسی در این تحقیق ، اتیلن گلیکول بیشترین سمیت را داشت. جنین ماهی قره برون غلظت های مختلف متانول را نسبت به اتیلن گلیکول بهتر تحمل کرد. ا

---

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- دانشکده شیلات و محیط زیست
[۲] *دانشیار گروه شیلات- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- دانشکده شیلات و محیط زیست (نویسنده مسئول)؛ sudagarm@yahoo.com
- مقاله حاضر بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر محمد سوداگر است.

و۲- پروپان دی اُول نسبت به متانول و اتیلن گلیکول در غلظت های مورد استفاده، دارای درصد تفریخ بالاتری بود و جنین ماهی قره برون در هر دو مرحله ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از لقاح، حساسیت کمتری نسبت به غلظت های مختلف این ماده از خود نشان داد. با افزایش غلظت و زمان غوطه وری، درصد تفریخ کاهش یافت و با افزایش زمان غوطه وری در تیمار های مربوط به ساکارز و عسل درصد تفریخ افزایش یافت. کاهش درصد تفریخ می‌تواند در اثر شوک اسمزی، عدم تعادل یونی و یا اثر سمیت مواد ضد انجماد باشد. در نهایت در میان مواد مورد آزمایش در این تحقیق، با پیشرفت روند تکاملی از ۲٤ به ٤۸ ساعت پس از لقاح، حساسیت جنین قره برون نسبت به غلظت های مختلف ۱و۲- پروپان دی اُول و پلی ونیل پیرولیدون کاهش یافت در حالی که، با پیشرفت مراحل تکاملی، حساسیت جنین قره برون نسبت به غلظت های مختلف متانول، اتیلن گلیکول، ساکارز و عسل افزایش یافت و اثرات سمی این مواد بیشتر شد.

واژه‌های کلیدی: سمیت، مواد ضد انجماد، جنین قره برون، غوطه وری

مقدمه

علیرغم موفقیت های قابل توجهی که در زمینه انجماد جنین در پستانداران (O'Neil et al. 1998; Otoi et al. 1998) و برخی بی مهرگان دریایی (Chao et al. 1997) به‌دست آمده است اما، تاکنون امکان انجماد کاملا موفقیت آمیز جنین ماهیان فراهم نشده است (Cabrita et al. 2006). یکی از عوامل اساسی در انجماد جنین ورود و توزیع همگن مواد ضد انجماد در قسمت های مختلف جنین می‌باشد، ابتدا این مواد باید وارد جنین شده تا بتوان اقدام به انجماد جنین نمود (Vuthiphandchai et al. 2005). این مواد در دماهای پایین از جنین محافظت کرده و مانع از مرگ آن می‌شوند، از سوی دیگر این مواد در غلظت های بالا می‌توانند ایجاد مسمومیت نموده و درصد تفریخ را کاهش و تلفات را در جنین ماهیان افزایش دهند (کیوانلو و همکاران،۱۳۹۰).

ماهیان در مراحل اولیه تکامل جنینی حساسیت بیشتری نسبت به ورود مواد ضد انجماد، شوک ناشی از کاهش ناگهانی دما و

تغییرات غلظت مایعات درون و برون سلولی دارند (Dinnyes et al. 1998; Robertson et al. 1988). لذا توجه به نوع و غلظت مواد ضد انجماد مورد استفاده و مدت زمان در معرض قرار گرفتن جنین با این مواد بسیار مهم می‌باشد (Vuthiphandchai et al. 2005).

بیشتر مطالعات در زمینه اثر مواد ضدانجماد، در جنین ماهیان آب شیرین (گونه هایی نظیر کپور و ماهی گورخری) صورت گرفته است (Hagedorn et al. 2004; Dinnyes et al. 1998; Liu et al. 1998) و در سال‌های اخیر تنها چند تحقیق به بررسی اثرات این مواد در ماهیان دریایی (ماهی توربوت و فلاندر) پرداخته است (Cabrita et al. 2003; Robles et al. 2006; Zhang et al. 2005).

ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) یکی از ماهیان بومی دریای خزر بوده که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است ولی، بدلایل مختلف نسل این ماهی در حال انقراض می باشد، به طوری که در کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری تکثیر این ماهیان روز بروز با مشکلات جدی تری روبروست. با این وجود تا کنون هیچ تلاشی در زمینه انجماد جنین این ماهی صورت نگرفته است، این تکنولوژی خواهد توانست به جنبه های متعدد تولید و پرورش این ماهی ارزشمند کمک شایانی نماید. امید است با استفاده از تکنیک انجماد تخم این ماهیان بتوان نسبت به ذخایر ژنتیکی این ماهیان اقدام و در زمان های مورد نیاز نسبت به پرورش آن‌ها اقدام نمود.

در این مطالعه سمیت سه ماده ضد انجماد نفوذپذیر و سه ماده ضد انجماد نفوذناپذیر در جنین ماهی قره‌برون به روش غوطه وری مورد بررسی قرار گرفت. مواد ضد انجماد نفوذپذیر بدلیل وزن مولکولی پایین خود می-توانند از غشای سلول عبور کنند و کاهش قابل ملاحظه ای را در دمای انجماد محلول-های درون سلولی ایجاد نمایند در حالی که مواد ضد انجماد نفوذناپذیر وزن مولکولی بالایی داشته و توانایی ورود به سلول را ندارند و اساس کار آنها بر پایه آبگیری از سلول قبل از انجماد می باشد که موجب کاهش شکل گیری کریستال‌های یخی در طول فریز کردن می‌شود. اگر چه برخی از این مواد نیز شکل کریستال‌ها را به شکلی بی ضرر تبدیل می‌کنند. در این تحقیق به‌دنبال یافتن غلظت های مجاز از ترکیبات و محلول های ضد انجماد بوده که برای جنین ماهی قره برون سمی و کشنده نباشد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی مصرفی

در این تحقیق از مواد ضد انجماد نفوذ پذیر شامل: متانول، اتیلن گلیکول و ۱و۲- پروپان دی اُول و مواد ضد انجماد نفوذ ناپذیر شامل: ساکارز، عسل و پلی ونیل پیرولیدون استفاده گردید. برای نفوذ پذیر کردن کوریون از آنزیم پروناز (نوع XIV از استرپتومایسیز گریسیوس) استفاده شد، همه مواد از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران خریداری گردیدند.

انکوباسیون تخم های لقاح یافته

این تحقیق از ابتدای اسفندماه ۸۹ تا پایان اردیبهشت ماه ۹۰ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی، گرگان به انجام رسید. تخم های لقاح یافته ماهی قره برون در همان مرکز در داخل انکوباتورهای یوشچنکو در دمای۱ ± ۱۹/۳ درجه سانتی گراد مراحل تکامل جنینی خود را طی کردند.پس از گذشت ٢٤ و ٤٨ ساعت از زمان لقاح، جنین ها برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

سمیت مواد ضد انجماد نفوذ پذیر و نفوذ ناپذیر

جنین های لقاح یافته (٢٤ و ٤٨ ساعت پس از لقاح) در سه ماده ضد انجماد نفوذ پذیر شامل متانول، اتیلن گلیکول و ۱و۲- پروپان دی اُول غوطه ور شدند. برای تهیه غلظت های مورد نیاز از ضد انجماد از محلول رینگر (۲/۹۹ گرم کلرید پتاسیم+ ٦/٤٩ گرم کلرید سدیم+ ۰/۲۹ گرم کلرید کلسیم و۰/۲۰ گرم بی کربنات سدیم در یک لیتر آب) استفاده شد. قبل از آنکه جنین ها در معرض مواد ضد انجماد قرار گیرند، کوریون تخم ها با استفاده از آنزیم پروناز با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر به مدت ٥ دقیقه نفوذ پذیر شد (کابریتا و همکاران، ٢٠٠٦).

۱۰۰ عدد تخم لقاح یافته ماهی قره برون در ۳۰ میلی لیتر از هر یک از غلظت های ۱، ۲، ۳، ٤، ٥ و٦ مولار از مواد ضد انجماد برای زمان های ٥ و ۱۰ دقیقه در دمای ۱۹/۳ درجه سانتی گراد (شرایط کارگاهی) غوطه ور شدند. سپس، جنین ها با آب کارگاه آبکشی شده و ادامه مراحل تکاملی خود را در انکوباتورها طی کردند.غلظت مواد ضد انجماد نفوذ ناپذیر برای ساکارز (کابریتا و همکاران،٢٠٠٦) و عسل ۱۰، ۱٥ و۲۰ درصد و برای پلی ونیل پیرولیدون ۱۰،٥ و۱٥ درصد (کابریتا و همکاران، ٢٠٠٦) بود. جنین ها در زمان های ٥ و ۱۰ دقیقه در محلول های ذکر شده غوطه ور شده سپس با آب کارگاه آبکشی شده و دوباره مراحل انکوباسیون خود را طی کردند.برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد(گروه شاهد نیز در همان

زمان بدون انکه در معرض مواد ضد انجماد قرار بگیرند در آب گارگاه مراحل انکوباسیون خود را انجام دادند).

بررسی سمیت مواد ضد انجماد با تعیین درصد تفریخ لارو (بر اساس فرمول ۱) صورت گرفت.

۱۰۰ × (تعداد کل تخم های مورد آزمایش / تعداد لارو تفریخ شده)= درصد تفریخ لارو : (فرمول ۱)

نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One Way) به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج

سمیت مواد ضد انجماد نفوذپذیر(متانول، اتیلن گلیکول و ۱و۲- پروپان دی اُول)

بررسی اثر سمیت مواد ضد انجماد(متانول، اتیلن گلیکول و ۱و۲- پروپان دی اُول) نشان داد که در میان تیمارهای مربوط به متانول در مرحله ۲٤ ساعت پس از لقاح، هنگامی که جنین ها برای مدت زمان ۵ دقیقه در غلظت های مختلف این ماده غوطه ور شدند، بالاترین درصد تفریخ در گروه شاهد و پس از آن در غلظت ۳ مولار ثبت گردید و پایین ترین درصد تفریخ در تیمار ۱ مولار مشاهده گردید و در بین سایر تیمارها روند منظمی مشاهده نشد. با افزایش زمان غوطه وری از ۵ به ۱۰ دقیقه، بالاترین درصد تفریخ در تیمار شاهد مشاهده شد و هیچ اختلاف معنی داری (به جز تیمار ۵ مولار) بین سایر گروه ها مشاهده نشد (جدول۱). در جنین هایی که ٤۸ ساعت از زمان لقاح آنها گذشته بود و برای مدت زمان ۵ دقیقه در غلظت های مختلف متانول غوطه ور شدند، بالاترین درصد تفریخ در گروه شاهد و به دنبال آن در غلظت ۵ مولار مشاهده شد که اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ($p > ۰/۰۵$). با افزایش غلظت متانول، درصد تفریخ افزایش یافت و پایین ترین درصد تفریخ در تیمارهای ۲ و ٤ مولار به ثبت رسید که اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ($p > ۰/۰۵$) . با افزایش مدت زمان غوطه وری از ۵ به ۱۰ دقیقه، بیشترین درصد تفریخ در تیمار شاهد و به دنبال آن در غلظت ٦ مولار ثبت گردید. کمترین درصد تفریخ در غلظت های ۲ و ۳ مولار مشاهده شد که اختلاف معنی داری با غلظت ۱ مولار نداشتند ($p > ۰/۰۵$) . به طور کلی با افزایش غلظت متانول، درصد تفریخ افزایش یافت. جنین هایی که ٤۸ ساعت از زمان لقاح آنها گذشته بود حساسیت بیشتری نسبت به غلظت های مختلف متانول از خود نشان دادند، به عبارت دیگر جنین های قره برون در مرحله ۲٤ ساعت پس از لقاح

توانـایی بـالاتری بـرای تحمـل غلظـت هـای مختلف متانول از خود نشان دادند (جدول ۱). در تیمار آزمایشی اتـیلن گلیکـول، در مرحلـه ۲٤ ساعت پـس از لقـاح، پـس از غوطـه وری جنین ها برای مدت ٥ دقیقه، بـالاترین درصـد تفریخ پس از تیمار شاهد در غلظـت ۱ مـولار مشاهده گردیـد امـا، اخـتلاف معنـی داری بـا غلظت های ۳،۲ و٤ مولار نداشت ($p>۰/۰٥$) . بـا افـزایش زمـان غوطـه وری بـه ۱۰ دقیقـه همانند تیمار ٥ دقیقه بـالاترین درصـد تفـریخ پس از گروه شاهد متعلق به غلظـت ۱ مـولار بود. با افزایش غلظـت اتـیلن گلیکـول، درصـد تفریخ کاهش یافت و با افـزایش زمـان غوطـه وری از ٥ به ۱۰ دقیقه، درصد تفـریخ کـاهش یافت (به جز غلظت ۱ مـولار) بـه طـوری کـه پایین ترین درصد تفـریخ در غلظـت ٦ مـولار در مـدت زمـان ۱۰ دقیقـه غوطـه وری ثبـت گردید. در تیمـار ٤۸ سـاعت پـس از لقـاح،در مـدت زمـان ٥ دقیقـه غوطـه وری، بـالاترین درصد تفریخ پس از گروه شاهد در غلظـت ٤ مولار ثبت گردید که اخـتلاف معنـی داری بـا تیمـار ۱ مـولار نداشـت ($p>۰/۰٥$) . در ایـن مرحله هنگامی که جنین ها برای مـدت زمـان ۱۰ دقیقه در معرض غلظت های مختلف اتیلن گلیکول قرار گرفتند، بـالاترین درصـد تفـریخ پس از گروه شاهد در غلظت ۳ مولار مشاهده شد. لذا در این مرحلـه بـا افـزایش غلظـت در مدت زمان ٥ دقیقه رونـد منظمـی در درصـد تفریخ مشاهده نشد و در مدت زمان ۱۰ دقیقه با افزایش غلظت، درصد تفـریخ کـاهش یافـت (به جز غلظت های ۱و ۲ مولار) به طوری کـه درصـد تفـریخ در غلظـت ٦ مـولار بـه صـفر رسید. حساسیت جنین نسبت به غلظـت هـای مختلف اتیلن گلیکول با پیشرفت روند تکـاملی از ۲٤ به ٤۸ ساعت افزایش یافت (جدول ۱).

در تیمارهـــای ۱و۲- پروپـــان دی اُول در مرحله ۲٤ ساعت پس از لقاح، جنین هایی کـه برای مـدت ٥ دقیقـه در معـرض غلظـت هـای مختلف این ماده قـرار گرفتنـد، پـس از تیمـار شاهد بالاترین درصد تفریخ مربوط به غلظت ۳ مولار بود اما، بـا غلظـت ٤ مـولار اخـتلاف معنی دار نداشت ($p >۰/۰٥$). با افزایش غلظت رونـد خـاص و منظمـی در درصـد تفـریخ مشاهده نگردید. با افزایش زمان غوطـه وری به ۱۰ دقیقه، بـالاترین درصـد تفـریخ پـس از گروه شاهد در غلظت ٥ مولار ثبت گردید اما، اختلاف معنی داری با غلظـت هـای ٤،۳،۱ و٥ مولار نداشت ($p>۰/۰٥$) . در این مرحله پایین ترین درصد تفریخ مربوط به غلظت ۱ مـولار در مدت زمان ٥ دقیقه بود و با افزایش زمـان غوطه وری از ٥ به ۱۰ دقیقـه درصـد تفـریخ کاهش یافـت (بـه جـز تیمارهـای ۱ و ٥)، هـم چنین با افزایش غلظت روند منظمی در درصد تفریخ مشاهده نگردید.

جنین هـا در مرحلـه ٤۸ سـاعته هنگـامی کـه برای مـدت ٥ دقیقـه در معـرض غلظـت هـای

مختلف ۱و۲- پروپـان دی اُول قـرار گرفتنـد، بالاترین درصد تفریخ پس از گروه شاهد در غلظت ۱ مولار به ثبت رسید که ایـن عـدد بـا غلظـت هـای ۲ و ۵ مـولار تفـاوت معنـی دار نداشت ($p>۰/۰۵$) . در زمان غوطـه وری ۱۰ دقیقه، بالاترین درصـد تفـریخ پـس از گـروه شاهد در غلظت ۱ مـولار ثبـت گردیـد کـه بـا سایر غلظت ها (به جز ٦ مولار) اختلاف معنی دار نداشت ($p >۰/۰۵$) (جدول ۱). بـا افـزایش زمان غوطه وری از ۵ به ۱۰ دقیقه در غلظـت های ۵ و ٦ مولار، درصد تفریخ کاهش یافـت این در حالی اسـت کـه در غلظـت هـای ۱و ۲ مولار تفاوتی وجود نداشت و در غلظت هـای ۳ و ٤ درصد تفریخ افزایش یافت. با پیشرفت روند تکاملی از ۲٤ بـه ٤۸ سـاعت حساسـیت جنین ها نسبت به غلظت هـای مختـاف ۱و۲- پروپان دی اُول کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۱. درصد تفریخ در جنین های ۲۴ ساعته (الف) و جنین های ۴۸ ساعته (ب) ماهی قره برون در غلظت های مختلف متانول، اتیلن گلیکول و ۱و۲- پروپان دی اُول

مواد ضد انجماد		درصد تفریخ						
		غلظت						
		شاهد	۱ مولار	۲ مولار	۳ مولار	٤ مولار	٥ مولار	٦ مولار
الف								
متانول	٥ دقیقه	٧١/٦٦±١/٦٦ a	١٥± ٢/٨٨ e	٤١/٦٦±١/٦٦ cd	٥٥±٢/٨٨ b	٥٠±٢/٨٨ bc	٣٦/٦٦±٤/٤٠ d	٤٨/٣٣±١/٦٦ bc
	١٠ دقیقه	٧١/٦٦±٤/٤٠ a	٣١/٦٦±٤/٤٠ b	٣٥±٢/٨٨ b	٣١/٦٦±٤/٤٠ b	٢٦/٦٦±٤/٤٠ bc	١٦/٦٦±١/٦٦ c	٢٨/٣٣±٣/٣٣ bc
اتیلن گلیکول	٥ دقیقه	٧٠±٢/٨٨ a	٣٦/٦٦±١/٦٦ b	٣٥±٢/٨٨ b	٣١/٦٦±٤/٤٠ b	٣١/٦٦±١/٦٦ b	٢١/٦٦±٤/٤٠ c	٢٠± ٠ c
	١٠ دقیقه	٧٥±٢/٨٨ a	٥٣/٣٣±٤/٤٠ b	٣٠± ٠ cd	٢٦/٦٦±٤/٤٠ cde	٣١/٦٦±٤/٤٠ c	١٨/٣٣±٤/٤٠ de	١٥±٢/٨٨ e
١و٢-پروپان دی اُول	٥ دقیقه	٧٠±٢/٨٨ a	١٥± ٠ e	٤١± ١/٦٦ d	٥٥±٢/٨٨ b	٥٠± ٠ bc	٣٦/٦٦± ١/٦٦ d	٤٣/٣٣±١/٦٦ c
	١٠ دقیقه	٧٣/٣٣±١/٦٦ a	٤٣/٣٣±١/٦٦ bc	٣٣/٣٣± ٤/٤٠ e	٣٦/٦٦± ٤/٤٠ cd	٤٥± ٢/٨٨ bc	٥٠± ٢/٨٨ b	٤١/٦٦± ١/٦٦ bcd
ب								
متانول	٥ دقیقه	٧٣/٣٣±٣/٣٣ a	١٨/٣٣±٣/٣٣ bc	١٠±٢/٨٨ c	٢٥± ٢/٨٨ b	١٠± ٠ c	٦٨/٣٣± ٤/٤٠ a	٢١/٦٦± ١/٦٦ b
	١٠ دقیقه	٧٦/٦٦±١/٦٦	١١/٦٦±٤/٤٠ d	١٠± ٢/٨٨ d	١٠± ٢/٨٨ d	٢٥± ٥/٧٧ c	٣١/٦٦± ٤/٤٠ c	٤٨/٣٣± ١/٦٦ d
اتیلن گلیکول	٥ دقیقه	٧٠±٢/٨٨ a	٣٨/٣٣± ٤/٤٠ bc	٣٥± ٠ c	١١/٦٦± ١/٦٦ d	٤٦/٦٦± ١/٦٦ b	١٨/٣٣± ١/٦٦ d	٢٨/٣٣± ٣/٣٣ c
	١٠ دقیقه	٧٣/٣٣±١/٦٦ a	٢٥± ٢/٨٨ d	٣٦/٦٦± ١/٦٦ c	٥٠± ٢/٨٨ b	٤٠±٢/٨٨ c	١٣/٣٣± ١/٦٦ e	٠ f
١و٢-پروپان دی اُول	٥ دقیقه	٧١/٦٦±١/٦٦ a	٦٠± ٢/٨٨ b	٥٨/٣٣± ١/٦٦ b	٤٠± ٢/٨٨ d	٤٣± ١/٦٦ cd	٥٨/٣٣± ١/٦٦ b	٥٠± ٢/٨٨ c
	١٠ دقیقه	٧٣/٣٣±١/٦٦ a	٦٠± ٠ b	٥٨/٣٣± ٤/٤٠ b	٥٨/٣٣± ١/٦٦ b	٥٥± ٢/٨٨ b	٥١/٦٦± ١/٦٦ b	٤٠± ٢/٨٨ c

در هر ردیف میانگین هایی (میانگین ± خطای معیار) که دارای حروف متفاوت هستند اختلاف معنی دار ($p<0/05$) با یکدیگر دارند.

سمیت مواد نفوذ ناپذیر(ساکارز، عسل و پلی ونیل پیرولیدون)

هنگامی که جنین های تیمار ۲٤ ساعته و برای مدت ٥ دقیقه در معرض غلظت های مختلف ساکارز قرار گرفتند، بالاترین درصد تفریخ پس از گروه شاهد در غلظت ۱۰ درصد مشاهده شد اما، اختلاف معنی داری با غلظت ۲۰ درصد نداشت ($p>۰/۰٥$). در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه وری، بالاترین درصد تفریخ در گروه شاهد و به دنبال آن در غلظت ۱۰ درصد به ثبت رسید که اختلاف معنی داری با غلظت ۲۰ درصد نداشت ($p >۰/۰٥$). با افزایش مدت زمان غوطه وری از ٥ به ۱۰ دقیقه، درصد تفریخ افزایش یافت و با افزایش غلظت ساکارز، درصد تفریخ کاهش یافت. در تیمار ٤۸ ساعته، بالاترین درصد تفریخ در مدت زمان ٥ دقیقه غوطه وری در ساکارز و در غلظت ۱٥ درصد مشاهده شد که در غلظت های بالاتر و پایین تر از این غلظت درصد تفریخ بطور معنی داری کاهش یافت ($p<۰/۰٥$). در تیمار ۱۰ دقیقه غوطه وری، بالاترین درصد تفریخ پس از تیمار شاهد در غلظت ۲۰ درصد مشاهده شد. با افزایش غلظت درصد تفریخ در مدت زمان ٥ دقیقه کاهش یافت ولی، در مدت زمان ۱۰ دقیقه با افزایش غلظت روند خاص و منظمی مشاهده نشد. با افزایش مدت زمان غوطه وری از ٥ به ۱۰ دقیقه، درصد تفریخ کاهش یافت (جدول ۲).

در تیمار ۲٤ ساعته هنگامی که جنین ها به مدت ٥ دقیقه در معرض غلظت های مختلف عسل قرار گرفتند، بالاترین درصد تفریخ پس از تیمار شاهد در غلظت ۲۰ درصد مشاهده شد که با غلظت ۱۰ درصد اختلاف معنی داری نداشت ($p >۰/۰٥$). در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه وری، بالاترین درصد تفریخ در تیمار شاهد و به دنبال آن در غلظت ۱۰ درصد ثبت گردید که با غلظت ۲۰ درصد اختلاف معنی داری نداشت ($p >۰/۰٥$). با افزایش غلظت، درصد تفریخ کاهش یافت (به جز غلظت ۲۰ درصد) و با افزایش مدت غوطه زمان غوطه وری از ٥ به ۱۰ دقیقه، درصد تفریخ افزایش یافت. در تیمار ٤۸ ساعته، بالاترین درصد تفریخ پس از تیمار شاهد در غلظت ۱٥ درصد عسل به ثبت رسید. با افزایش غلظت، روند درصد تفریخ کاهش یافت (به جز غلظت ۱٥ درصد).در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه وری، بالاترین درصد تفریخ پس از تیمار شاهد در غلظت ۱۰ درصد مشاهده شد که اختلاف معنی داری با غلظت ۲۰ درصد نداشت ($p >۰/۰٥$) . با افزایش غلظت عسل، درصد تفریخ کاهشی یافت (به جز غلظت ۲۰ درصد). حساسیت جنین ها نسبت به غلظت های مختلف عسل با پیشرفت

رونـد تکـاملی جنـین از ۲٤ بـه ٤۸ سـاعت افزایش یافت (جدول ۲).

با قرار گرفتن جنین های تیمـار ۲٤ سـاعته برای مـدت ۵ دقیقـه در معـرض غلظـت هـای مختلف پلی ونیل پیرولیدون، بالاترین درصـد تفریخ پس از تیمار شاهد در غلظت ۱۰ درصد مشاهده شد، در غلظت های بالاتر و پایین تر از این تیمار، درصد تفـریخ کـاهش یافـت. در مـدت زمـان ۱۰ دقیقـه غوطـه‌وری بـالاترین درصد تفریخ در تیمار شاهد مشـاهده شـد و سایر غلظت ها اختلاف معنی داری با یکـدیگر نداشتند ($p >۰/۰۵$) . با افزایش غلظت، درصد تفریخ کاهش یافت. افزایش زمان غوطـه وری از ۵ به ۱۰ دقیقه سبب شد که درصـد تفـریخ بصورت معنی داری کـاهش یابـد ($p <۰/۰۵$) (جدول ۲). جنین هایی که ٤۸ ساعت از زمـان لقاح آنها می گذشت، هنگامی که برای مدت ۵ دقیقـه در غلظـت هـای مختلـف پلـی _ ونیـل پیرولیدون غوطه ور شدند، بـالاترین درصـد تفریخ در تیمار شاهد و بـدنبال آن در غلظـت ۱۰ درصـد مشـاهده شـد کـه اخـتلاف معنـی داری با یکـدیگر نداشـتند ($p >۰/۰۵$) و رونـد درصد تفریخ نیز به صورت کاهشی بـود. در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه وری نیـز، هماننـد تیمار ۵ دقیقه، بالاترین درصد تفـریخ پـس از تیمـار شـاهد در غلظـت ۱۰ درصـد بـه ثبـت رسید. با افزایش غلظت پلی ونیـل پیرولیـدون و بـا افـزایش زمـان غوطـه وری از ۵ بـه ۱۰ دقیقه درصد تفریخ کاهش یافت. بـا پیشـرفت رونـد تکامـل جنینـی از ۲٤ بـه ٤۸ سـاعت، حساسیت جنین نسبت به غلظت های مختلـف این ماده کاهش یافت (جدول ۳).

جدول ۲. درصد تفریخ در جنین های ۲۴ ساعته (الف) و جنین های ۴۸ ساعته (ب) ماهی قره برون در غلظت های مختلف ساکارز و عسل.

مواد ضد انجماد		درصد تفریخ			
		غلظت			
		شاهد	۱۰ درصد	۱۵ درصد	۲۰ درصد
الف					
ساکارز	۵ دقیقه	۷۰±۲/۸۸ [a]	۴۵± ۲/۸۸ [b]	۲۳/۳۳± ۱/۶۶ [c]	۳۸/۳۳±۴/۴۰ [b]
	۱۰ دقیقه	۷۳/۳۳±۱/۶۶ [a]	۵۰±۲/۸۸ [b]	۳۶/۶۶± ۱/۶۶ [c]	۴۳/۳۳± ۳/۳۳ [bc]
عسل	۵ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ [a]	۳۱/۶۶±۱/۶۶ [bc]	۲۶/۶۶± ۴/۴۰ [c]	۴۰± ۲/۸۸ [b]
	۱۰ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ [a]	۵۱/۶۶± ۴/۴۰ [b]	۳۸/۳۳±۱/۶۶ [c]	۴۵± ۲/۸۸ [bc]
ب					
ساکارز	۵ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ [a]	۳۰±۲/۸۸ [c]	۴۶/۶۶±۱/۶۶ [b]	۲۶/۶۶± ۳/۳۳ [c]
	۱۰ دقیقه	۷۱/۶۶± ۴/۴۰ [a]	۲۰±۲/۸۸ [c]	۲۰±۰ [c]	۳۵±۲/۸۸ [b]
عسل	۵ دقیقه	۷۳/۳۳±۳/۳۳ [a]	۲۶/۶۶±۱/۶۶ [d]	۵۱/۶۶± ۱/۶۶ [b]	۳۶/۶۶± ۱/۶۶ [c]
	۱۰ دقیقه	۷۳/۳۳±۳/۳۳ [a]	۴۰± ۲/۸۸ [b]	۲۵± ۲/۸۸ [c]	۳۶/۶۶± ۱/۶۶ [b]

در هر ردیف میانگین هایی (میانگین ± خطای معیار) که دارای حروف متفاوت هستند اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) با یکدیگر دارند.

جدول ۳. درصد تفریخ در جنین های ۲۴ ساعته (الف) و جنین های ۴۸ ساعته (ب) ماهی قره برون در غلظت های مختلف پلی ونیل پیرولیدون

ماده ضد انجماد		درصد تفریخ			
		غلظت			
		شاهد	۵ درصد	۱۰ درصد	۱۵ درصد
الف					
پلی ونیل پیرولیدون	۵ دقیقه	۷۳/۳۳±۳/۳۳ [a]	۳۵± ۲/۸۸ [c]	۴۶/۶۶±۳/۳۳ [b]	۳۵±۲/۸۸ [c]
	۱۰ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ [a]	۸/۳۳±۱/۶۶ [b]	۵±۲/۸۸ [b]	۳/۳۳± ۱/۶۶ [b]
ب					
پلی ونیل پیرولیدون	۵ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ [a]	۴۳/۳۳± ۴/۴۰ [b]	۶۸/۳۳± ۱/۶۶ [b]	۴۱/۶۶± ۲/۸۸ [d]
	۱۰ دقیقه	۷۰±۵/۷۷ [a]	۴۳/۳۳± ۱/۶۶ [b]	۵۸/۳۳± ۱/۶۶ [b]	۱۸/۳۳± ۱/۶۶ [b]

در هر ردیف میانگین هایی (میانگین ± خطای معیار) که دارای حروف متفاوت هستند اختلاف معنی دار ($p < ۰/۰۵$) با یکدیگر دارند.

بحث

در بررسی های صورت گرفته در زمینه انجماد جنین موجودات، اطلاعات مربوط به سمیت مواد ضدانجماد از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. به طور کلی، اثرات هر ماده ضدانجماد علاوه بر ویژگی و خاصیت شیمیایی آن، به مرحله تکامل و نوع گونه نیز بستگی دارد (Suzuki et al. 1995). نتایج تحقیقات صورت گرفته در جنین ماهی فلاندر نشان داد، اتیلن گلیکول در تمامی غلظت ها برای این گونه سمی بود (Chen and Tian, 2005. Robertson و همکاران (۱۹۸۸) نیز بیان کردند اتیلن گلیکول حتی در پایین ترین غلظت، اثرات سمی روی جنین ماهی باس کانالی دارد. با این حال، نتایج بررسی های Cabritaو همکاران (۲۰۰۶) نشان داد اتیلن گلیکول ماده ضد انجمادی است که کمترین سمیت را در طی مراحل تکامل جنینی سیم دریایی سر طلایی دارد. در میان مواد ضد انجماد مورد بررسی در این تحقیق، اتیلن گلیکول بیشترین سمیت را در جنین ماهی قره برون داشت. با افزایش غلظت اتیلن گلیکول از ۱ به ٦ مولار، روند درصد تفریخ به‌صورت کاهشی بود به طوری که در مرحله ٤٨ ساعت پس از لقاح، در غلظت ٦ مولار اتیلن گلیکول درصد تفریخ به صفر رسید.

نتایج بررسی های صورت گرفته روی جنین ماهی گورخری نشان داد ، جنین این ماهی سطوح مختلف متانول را نسبت به اتیلن گلیکول بهتر تحمل کرد و نسبت به آن حساسیت کمتری داشت (Liu et al. 2004; Zhang and Rawson, 1996). نتایج تحقیقات صورت گرفته در جنین ماهی فلاندر نیز بیانگر آن بود که متانول سمیت کمتری

نسبت به اتیلن گلیکول داشت (Chen and Tian, 2005).

نتایج بررسی سمیت مواد ضد انجماد در جنین صدف دو کفه ای نشان داد متانول کمترین سمیت را در جنین در حال تکامل داشت (Renard and Cochard, 1989). با این حال بررسی Pillai و همکاران (۲۰۰۱) بیانگر آن بود که، متانول بیشترین سمیت را برای لارو میگوی آب شیرین داشت. مطالعه حاضر نتایج نشان داد، ۱و۲- پروپان دی اُول نسبت به متانول و اتیلن گلیکول در غلظت های مورد استفاده دارای درصد تفریخ بالاتری بود و جنین ماهی قره برون در هر دو مرحله ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از لقاح، حساسیت کمتری نسیت به غلظت های مختلف این ماده از خود نشان داد. پس از اتیلن گلیکول، بیشترین سمیت مربوط به متانول بود.

بررسی های صورت گرفته در لارو میگوی آب شیرین نشان داد، افزایش زمان غوطه وری (از ۲۰ به ٤٠ دقیقه) در مواد ضد انجماد سبب شد، سمیت مواد ضد انجماد نیز افزایش یابد (Pillai et al. 2001). این احتمال وجود دارد که این ترکیبات (مواد ضد انجماد) سبب ایجاد اثرات زیان آوری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده و از این رو درصد تفریخ را کاهش دهند. به نظر می رسد که مدت زمان در معرض گذاری جنین با مواد ضد انجماد، عامل مهمی است خصوصا هنگامی که غلظت مواد ضد انجماد از ٥ مولار فراتر می رود. با این حال بایستی توجه داشت برای دستیابی به انجماد موفقیت آمیز جنین، باید مقداری از مواد ضد انجماد به درون پیکره جنین وارد شوند و این مستلزم استفاده از غلظت های بالای مواد ضد انجماد است. نتایج تحقیقات صورت گرفته نیز حاکی از آن است که ارتباط مستقیمی بین غلظت های بالای این مواد و انجماد وجود دارد. نتایج تحقیق حاضر روی جنین ماهی قره برون نشان داد، افزایش زمان غوطه وری (از ٥ به ١٠ دقیقه) و غلظت مواد ضدانجماد، سبب شد کاهش درصد تفریخ گردید.

لارو ماهیان در مراحل اولیه تکامل جنینی از نفوذپذیری و تراوایی نسبتا بالایی برخوردار هستند اما، نسبت به ورود مواد ضد انجماد و تغییرات غلظت مایعات درون و برون سلولی بسیار حساس بوده و خطر مرگ جنین وجود دارد (Vuthiphandchai et al. 2005).

نتایج پژوهش های صورت گرفته حاکی از آن است که در طی مراحل تکامل جنینی آبزیانی مانند: ماهی، بی مهرگان دریایی و سخت پوستان دریایی، حساسیت نسبت به مواد ضد انجماد کاهش یافته و مقاومت این آبزیان در برابر سمیت مواد ضد انجماد افزایش می یابد

(Chao et al. 1994, Simon et al. 1994 ; Newton and Subramoniam, 1997;

; Urbanyi et al. 1997; Dinnyes 1996 et al. 1998; Liu et al. 1998).

نتایج بررسی های Robertson و همکاران (۱۹۸۸) نشان داد، جنین ماهی باس کانالی در مرحله ظهور دم نسبت به مرحله مورولا، حساسیت کمتری نسبت به غلظت های مختلف مواد ضد انجماد دارد. علت این امر می تواند افزایش تحمل نسبت به دستکاری، تغییر در تراوایی و نفوذپذیری غشای سلولی و توانایی تنظیم اسمزی باشد. در این بررسی اتیلن گلیکول در مرحله مورولا برای جنین ماهی باس کانالی بسیار سمی و با پیشرفت روند تکامل جنینی در مرحله ظهور دم تقریبا بی ضرر بود. حال آن که در تحقیق حاضر، نتایج گویای آن است که در جنین ماهی قره برون پیشرفت روند تکاملی جنین با افزایش اثرات سمی اتیلن گلیکول همراه بود. کاهش درصد تفریخ می تواند به علت وارد آمدن شوک اسمزی، عدم تعادل یونی و یا اثرمستقیم سمیت مواد ضد انجماد باشد. مواد ضد انجماد هم چنین می توانند نفوذپذیری و تراوایی غشا را نسبت به یون ها تغییر داده و سبب اثرات غیر مستقیم سمیت شوند (Robertson et al. 1988). مواد ضد انجماد می‌توانند سبب بروز صدمات بیوشیمیایی و اسمزی شوند. با وجود بررسی های فراوان، علت اصلی و نحوه بروز صدمات بیوشیمیایی هنوز ناشناخته است، با این حال، این صدمات با افزایش زمان در معرض گذاری، افزایش می-یابند. صدمات اسمزی به علت تغییر در حجم و اندازه سلول ها ایجاد می‌شوند که می‌توانند روی نفوذپذیری و تراوایی مواد ضد انجماد اثر گذار باشند (Renard and Cochard, 1989).

مواد ضد انجماد نفوذناپذیر برای جلوگیری از تشکیل کریستال های یخی در پیکره موجودات ضروری هستند. این ترکیبات سبب کاهش نفوذ غلظت های بالای مواد ضد انجماد نفوذپذیر شده و سبب کاهش سمیت آن‌ها در غلظت های بالا می شوند (Cabrita et al. 2003).

اکثر محلول های شیشه سازی که برای هدف انجماد جنین آبزیان استفاده می شوند، حاوی ترکیبی از مواد ضد انجماد نفوذپذیر و یک یا چند ماده نفوذ ناپذیر هستند. این مواد سبب نفوذ مواد ضد انجماد به درون قسمت های مختلف جنین شده و سبب کاهش سمیت مواد ضد انجماد مورد نیاز برای محلول های شیشه سازی می شوند (Kuleshova et al. 1999, 2001; Bautista et al. 1998).

بررسی های صورت گرفته در جنین پستانداران نشان می دهد که قندها از عواقب ناشی از آبگیری سلول ها جلوگیری کرده و میزان سمیت مواد ضد انجماد را کاهش می دهند. قندها سبب آبگیری آرام و تدریجی از سلول ها شده و از غشا سلول در زمان

کاهش دما محافظت می کنند. نتایج بررسی های صورت گرفته در جنین موش نشان داد که ساکارز که یک ماده ضد انجماد نفوذناپذیر بود در ترکیب با مواد ضد انجماد نفوذپذیر اثر مهمی را در محافظت از جنین در طی انجماد در نیتروژن مایع داشت (Takahashi and Kanagawa, 1985). نتایج بررسی حاضر نشان داد با افزایش غلظت مواد ضد انجماد نفوذناپذیر، روند درصد تفریخ به صورت کاهشی بود. افزایش زمان غوطه وری با این مواد سبب شد که در تیمار های مربوط به ساکارز و عسل، درصد تفریخ افزایش یافت؛ در حالی که با افزایش مدت زمان غوطه وری جنین ماهی قره برون با پلی ونیل پیرولیدون ، درصد تفریخ کاهشی یافت. این نتیجه، می تواند نشان دهنده سمیت بیشتر پلی ونیل پیرولیدون نسبت به دو ماده ساکارز و عسل باشد.

به طور کلی در میان مواد مورد استفاده در این تحقیق، تنها در ۱و۲- پروپان دی اُول و پلی ونیل پیرولیدون با پیشرفت روند تکاملی از ۲٤ به ٤۸ ساعت پس از لقاح، حساسیت جنین قره برون کاهش یافت. در سایر مواد (متانول، اتیلن گلیکول، ساکارز و عسل) با پیشرفت تکامل جنینی، حساسیت جنین نیز نسبت به غلظت های مختلف مواد ذکر شده افزایش یافت و اثرات سمی آن‌ها بیشتر شد.

REFRENCES

- کیوانلو، س.؛ حاجی بگلو، ع. ع و سوداگر، م. (۱۳۹۰). مطالعات اولیه بر روی انجماد (محافظت در برابر سرما) در جنین ماهیان. دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران. لاهیجان، ۲۲-۲۰ اردیبهشت.
- Bautista, J. A. N. and Kanagawa, H. (1998). Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestical animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. Japan Journal of Veterinary Research. 45: 183-191.
- Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., and Herra´ez, M.P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Cryobiology. 47: 204– 213.
- Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C., and Herra´ez, M.P. (2006). Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture. 251: 245– 255.
- Chao, N. H., Chiang, C. P., Hsu, H. W., Tasi, C. T. and Lin, T. T. (1994). Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants . Aquatic Living Resources. 9: 99-104.

- Chao, N.H., Lin, T.T., Chen, Y.J., Hsu, H.W., and Liao, I.C. (1997). Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. Aquaculture. 155: 31– 44.
- Chen, S. L., Tian, Y. S. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrfication. Theriogenology. 63: 1207-1219.
- Dinnyes, A., Urbanyi, B., Baranyai, B. and Magyary, I. (1998). Chiling sensivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence of cryoprotectants: work in progress. Theriogenology. 50: 1-13.
- Hagedorn, M., Peterson, A., Mazur, P. and Kleinhans, F. W. (2004). High ice nucleation temperature of zebrafih embryos: slow-freezing is not an option. Cryobiology. 49: 181-189.
- Kuleshova, L.L., MacFarlance, D.R., Trounson, A. O. and Shaw, J.M. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology. 38: 119-130.
- Kuleshova, L.L., Shaw, J.M. and Trounson, A. O. (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology. 43: 21-31.
- Liu, X. H., Zhang, T. and Rawson, D.M. 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol. Cryo-Letters. 19: 309-318.
- Liu, X.H., Zhang, T. and Rawson, D.M. (2004). Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Theriogenology. 55: 17-19.
- Newton, S. S. and Subramoniam, T. (1996). Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology. 33: 172-177.
- O'Neil, L., Paynter, S.J., Fuller, B.J., and Shaw, R.W. (1998). Vitrification of mature mouse oocytes in a 6M DMSO solution supplemented with antifreeze glycoproteins. Cryobiology. 37: 59– 66.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikama, S., and Suzuki, T. (1998). Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. Cryobiology. 37: 77– 85.
- Pillai, B. R., Rao, K. J., and Mohanty, J. (2001). Toxicity of selected Cryoprotectants to the First Zoeal Stages of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) (de Man). Ashian fisheries Science. 14: 1-8.
- Renard, P. and Cochard. J.C. (1989). Effects of various cryoprotectants on Pacific oyster (*Crassostria gigas*). Thunberg, Manil clam. *Ruditapes philippinarium*.
- Robertson, S. N., Lawrence, A. L., Neil. W. H., Arnold. C. R. and McCarty. G. (1988). Toxicity of the Cryoprotectants Glycerol, Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol, Methanol, Sucrose, and Sea Salt Solution to the Embryos of Red Drum. The Progressive Fish Culturist. 50: 148-154.
- Robles, V., Cabrita, E., Anel, L., and Herráez, M. P. (2006). Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. Aquaculture. 261: 1299–1306.
- Simon, C., Dumont, P., Cuende, F.X. Diter, A. and Aquacop. (1994). Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaus indicus* embryos. Cryobiology. 31: 245-253.

- Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Arii, K. and Kozima, T.T. (1995). Relation between toxicity of cryoprotectant Me_2SO and its concentration in several fish embryos. Fisheries Science. 61: 193-197.
- Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1985). Quick-freezing of mouse embryos by direct plung into liquid nitrogen vapour-effects of sugars. Japanese Socity of Veterinary Research. 33: 141-144.
- Urbanyi, B., Baranyai, B., Magyary, I. and Dinnyes, A. (1997). Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different development stages. Theriogenology. 47: 408 (abstract).
- Vuthiphandchai, V., Pengpun, B., and Nimrat, S. (2005). Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 246: 275– 284.
- Zhang, T., Rawson, D.M. (1996). Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. Cryobiology. 33: 1 – 13.
- Zhang, Y. Z., Zhang, S. C., Liu, X.Y., Xu, Y. J., Hu, J. H., Xu, Y. Y., Li, J. and Chen, S.L. (2005). Toxicity and protective efficency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Theriogenology. 63: 765-773.