

## 첨가제의 종류와 동해방지제의 농도에 따른 피조개, *Scapharca broughtonii* D형 유생의 냉동보존 효과 비교

조필규, 최윤희, 강경호<sup>1</sup>, 고강희<sup>1</sup>, 고창순<sup>2</sup>, 김병학<sup>2</sup>, 임한규<sup>3</sup>, 최철영<sup>4</sup>, 장영진

부경대학교 수산과학대학 양식학과, <sup>1</sup>여수대학교 수산생명공학부

<sup>2</sup>국립수산과학원 남해수산종묘시험장, <sup>3</sup>국립수산과학원 울진수산종묘시험장

<sup>4</sup>미국 국립보건원

### Comparison of Cryopreservation Effects on D-shaped Larvae of Arkshell, *Scapharca broughtonii* (Pelecypoda: Acidae) by the Kinds of Additive and the Concentrations of Cryoprotectant

Pil Gue Jo, Youn Hee Choi, Kyoung Ho Kang<sup>1</sup>, Kang Hee Kho<sup>1</sup>, Chang-Soon Go<sup>2</sup>,  
Byong-Hak Kim<sup>2</sup>, Han Kyu Lim<sup>3</sup>, Cheol-Young Choi<sup>4</sup> and Young Jin Chang

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Department of Aquaculture, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

<sup>2</sup>Namhae Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Namhae 668-820, Korea

<sup>3</sup>UJin Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, UJin 767-860, Korea

<sup>4</sup>Laboratory of Gene Regulation and Development, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD 20892, USA

#### ABSTRACT

This study was performed to find out the optimal kind of additive and concentration of ethylene glycol (EG) as the cryoprotectant on the D-shaped larvae of arkshell, *Scapharca broughtonii*. The larvae in straws was carried in the programed freezer set up at 0°C, frozen to -12°C by the freezing rate of -1°C/min, held for 10 minutes, seeded at -12°C, finally refrozen to -35°C by the freezing rate of -1°C/min and then directly plunged into liquid nitrogen. The survival of larvae frozen in 1.0 M and 2.0 M ethylene glycol added with 0.5 M sucrose were high (50.5 ± 1.3% and 51.9 ± 1.7%, respectively) in the early D-shaped larvae cryopreserved in 1 M and 2 M ethylene glycol diluted with 0.2 M and 0.5 M fructose, glucose and sucrose. In

the late D-shaped larvae were cryopreserved according to five concentrations of ethylene glycol added with 0.5 M sucrose, the survival of larvae frozen in 2.0 M ethylene glycol was the highest as 51.9 ± 1.7%. The morphological differences in cells between unfrozen and frozen-thawed D-shaped larvae were not found by the scanning and transmission electron microscopy.

**Keywords:** Arkshell, *Scapharca broughtonii*, Cryopreservation, Cryoprotectant, D-shaped larva, Additive.

#### 서론

어패류 배우자 및 유생의 냉동보존은 암수의 유전적 특성 보존, 국제무역과 같은 장거리 수송의 간편화, 가리비 (*Patinopecten yessoensis*), 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 과 같이 웅성선숙 (protandry) 하는 종과 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*), 강당돔 (*Oplegnathus punctatus*), 황돔 (*Dentex tumifrons*) 과 같은 자성선숙

Received September 28, 2002; Accepted December 7, 2002

Corresponding author: Chang, Young Jin

Tel: (82) 51-620-6135 e-mail: yjchang@pknu.ac.kr

1225-3480/18202

© The Malacological Society of Korea

(protogyny) 하는 종의 보존성을 높일 수 있다. 또한 냉동한 유생을 해동하여 정상적으로 발생·성장이 이루어질 경우에는 연중 종묘생산과 선발육종이 가능해지고, 입 크기가 작은 양식 어류의 종묘생산시 생먹이로도 사용될 수 있다.

냉동보존에서 세포내 전해질 농축, 삼투질 상승과 세포내외의 빙결정 (ice crystal) 형성 등을 완화·조절하기 위해 동해방지제 사용은 필수적인 요소이다 (Chang *et al.*, 1999). 동해방지제는 냉동에 의한 손상을 감소시키거나 방지할 수 있고, 삼투압을 상승시켜 평형을 유지하게 하는 반면, 동해방지제의 독성 자체가 세포를 손상시킬 수 있다 (Rall *et al.*, 1978). Glycerol (1.0-1.4 M) 을 첨가했을 경우 세포의 삼투질 농도는 300 mOsm에서 1500 mOsm까지 증가한다 (Niemann, 1982). 이처럼 세포는 동해방지제와 삼투압 평형을 이루기 위해 삼투압 상승이 급속히 일어나기 때문에, 충분한 시간을 주어 단계적인 방법으로 동해방지제가 첨가되어야 한다 (Niemann, 1984).

Niemann (1984) 의 보고에 의하면, methanol, ethanol, ethylene glycol (EG), acetamide, propylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 세포를 보호하기 위해 세포내로 침투한다. 이 용액들의 대부분은 여러 농도에서 효과가 있으며, 세포내로 완전히 빠르게 침투해야만 냉동시 세포를 보호할 수 있다. 또한 이 동해방지제들은 독성에 의한 세포 파괴를 고려해야만 한다. 또 다른 종류로 polyvinylpyrrolidone, sucrose, glucose, mannitol, polyethylene glycol, dextran 또는 다른 설탕류 등이 있다. 이들은 첨가제로 많이 사용되며, 세포외에서 세포를 보호한다. 일반적으로 저농도 (0.01-0.2 M) 에서 효과가 매우 좋으며 독성 또한 낮다.

세포 보호 효과의 측면에서 동해방지제는 다음과 같은 세 가지 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 1) glycerol은 세포외 용액의 나트륨의 농도를 현저하게 줄이므로 (Rall *et al.*, 1978), 용액의 영향과 세포내 냉동으로부터 손상의 최소화 (Farrant, 1965; Lepock *et al.*, 1978), 2) 쥐의 세포는 냉동보존시 -35℃에서 -45℃에서는 냉동되지 않는 사례처럼 (Leibo *et al.*, 1978) 동결시 세포내 온도저하, 3) 세포막의 안정화 (Maurer, 1978). 그러나 정확한 세포보호 기구는 아직 완전히 해명되지 않은 상태이다.

분자량에 따라 동해방지제의 투과 속도는 달라지는데, Renard (1991) 는 분자량이 적은 methanol (MW 32.04) 은 빨리 침투하지만, 분자량이 매우 많은 sucrose (MW 342.3) 는 침투하지 못한다고 하였다. 또한 동해방지제의 농도가 증가하고 평형시간이 길어지면, 조개류 유생은 점점 더 악영향을 받는데, methanol이 ethylene glycol, 1,2-propanediol, DMSO, glycerol, sucrose 등 보다 배 발달에 손상을 덜 입히는 것으로 알려져 있다 (Renard, 1991). 그리고 첨가

제와 동해방지제를 복합적으로 사용하였을 때에는 냉동하는 동안 배에 대한 보호효과가 높아지는 것으로 알려져 있다 (Takahashi and Kanagawa, 1985).

이와 같이 동해방지제는 세포나 배의 냉동보존 효과를 좌우하는 중요한 요인 중의 하나이지만, 조개류 유생을 사용하여 그 효과를 검증한 연구사례는 미미하다. Toledo *et al.* (1989) 은 진주담치 (*Mytilus edulis*) 의 유생에 DMSO를 사용하여 냉동 후 동해방지제의 효과를 조사하였다. 굴 속 (*Crassostrea*) 에서 Renard (1991) 는 methanol과 sucrose를, Paniagua-Chavez *et al.* (1998) 은 15% propylene glycol 을, Chao *et al.* (1997) 과 Naidenko (1997) 는 trehalose 를 첨가한 DMSO를 사용하여 냉동보존시 동해방지제가 유생에 미치는 영향을 보고하였다. 이와 같이 조개류의 적정 동해방지제는 종에 따라 각각 다르며 적정 동해방지제가 밝혀졌더라도 농도별로 생존율이 크게 다른 경우가 있어 (Paniagua-Chavez and Tiersch, 2001), 유생에 대한 냉동보존시 동해방지제의 최적농도에 대한 탐색이 필요하다.

피조개는 자연채료가 어려워 인공 종묘생산에 의해 종패를 생산할 필요성이 매우 높은 종입니다. 이런 인공 종묘생산의 문제점을 해결하기 위한 방법의 하나로 피조개의 D형 유생을 냉동보존하기 위한 적합한 첨가제와 동해방지제의 적정농도를 찾고자 합니다. 본 연구에서는 어패류의 배우자 및 유생의 냉동보존시 많이 이용되는 첨가제로 fructose, glucose, sucrose와 동해방지제로 ethylene glycol을 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 유생 확보

실험용 유생을 얻기 위하여 산란기 이전 (4월) 에 채집한 피조개 모패를 음지에서 2시간 동안 공기 노출한 다음, 23℃에서 1시간에 걸쳐 6℃의 수온상승 자극을 주어 채란, 채정하였으며, 부화한 유생을 10 m<sup>3</sup> 수조에서 사육하면서 먹이로는 *Isochrysis galbana*와 *Chaetoceros calcitrans*를 주었다. 실험을 위해 발생배의 50% 이상이 초기와 후기 D형 유생에 달한 것을 사용하였다 (Fig. 1, Table 1).

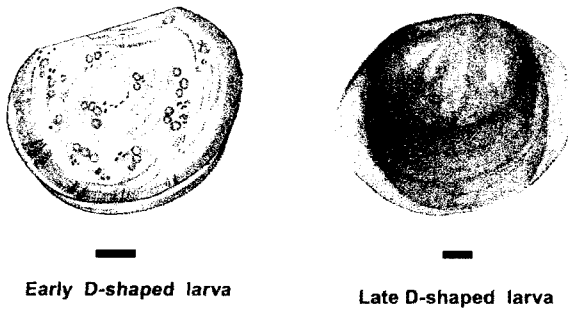
### 2. 냉동보존 과정

첨가제는 인공해수 (NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.05 g, CaCl<sub>2</sub> 0.12 g, MgCl<sub>2</sub> 0.46 g, 증류수 100 ml) 를 이용하여 만든, 각각 0.2 M, 0.5 M이 되게 한 fructose, glucose, sucrose 용액을 사용하였다. 동해방지제로는 ethylene glycol을 적용하였으며 (Choi and Chang, 1999), 각 첨가제에 각각 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M, 2.5 M이 되게 한 ethylene glycol을 사용하였다.

두 단계의 D형 유생을 실온 (23℃) 에서 각 용액에 10분 동

**Table 1.** Measurement of D-shaped larvae of *Scapharca broughtonii* used in the cryopreservation experiments.

Larval stage	Time after fertilization	Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell height ( $\mu\text{m}$ )
Early D-shaped	51 hr.	85.2 $\pm$ 3.2	65.5 $\pm$ 3.4
Late D-shaped	64 hr.	89.3 $\pm$ 3.1	67.4 $\pm$ 2.7



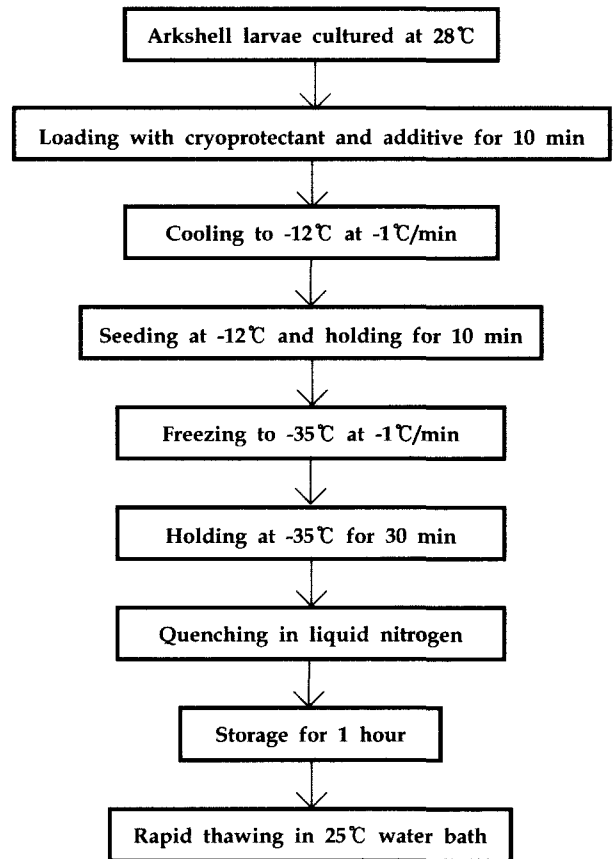
**Fig. 1.** D-shaped larvae of *Scapharca broughtonii* used in the cryopreservation experiments. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

안 침지한 후 0.5 ml straw (FHK, Japan) 에 넣고, 최초 온도가 0 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정되어 있는 프로그램냉동기 (Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea) 에서 -12 $^{\circ}\text{C}$ 까지 냉동하였다. 이후 -12 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 두면서 식빙 (seeding) 한 다음, 동일한 냉동률 (-1 $^{\circ}\text{C}/\text{분}$ ) 로 -35 $^{\circ}\text{C}$ 까지 냉동하였다. -35 $^{\circ}\text{C}$ 에 30분 유지한 후, 유생은 즉시 -196 $^{\circ}\text{C}$ 의 액체질소통 (MVE, USA) 에 옮겨 보관하였다 (Fig. 2). 1시간 후 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 담수에서 급속해동하여 인공해수로 재회석한 다음, 광학현미경에 의해 섬모운동에 의한 유영과 심장박동 여부로 생존율을 조사하였다.

**3. 냉동 전후 유생의 형태**

**1) 외부형태 관찰**

피조개 D형 유생의 외부형태를 파악하고자 주사전자현미경 시료를 제작하였다. 유생을 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2) 으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액에 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 1차 고정하였다. 이어서 PBS로 10분간 세척한 후, 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) 로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 2차 고정하였다. 고정이 끝난 시료는 PBS로 세척하고 50-100% 단계의 ethanol에서 10-20분씩 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료를 critical point dryer로 건조한 후 ion sputter를 이용하여 gold

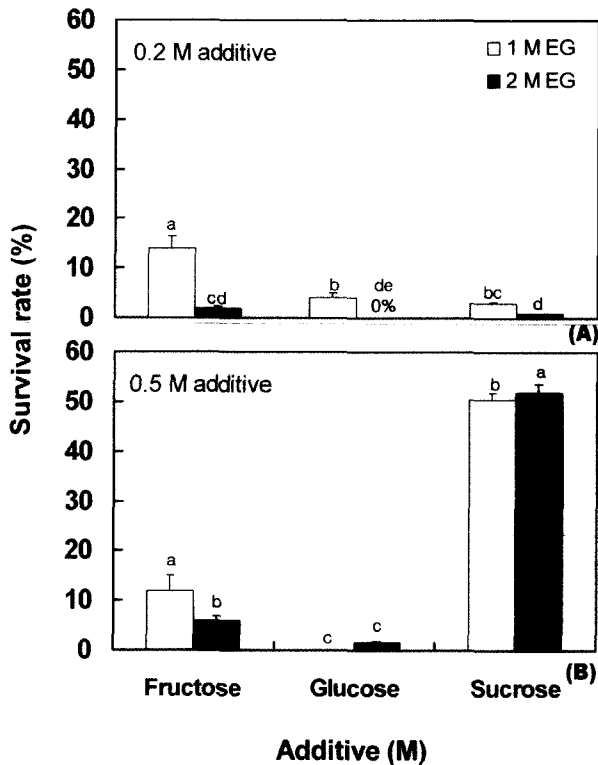


**Fig. 2.** Flow chart of the optimized two-step cryopreservation protocol (required time for cryopreservation was 85 minutes).

palladium-coating (15-20 nm) 한 다음, 주사전자현미경 (DMS 940-A, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 으로 관찰하였다.

**2) 내부형태 관찰**

피조개의 D형 유생을 투과전자현미경으로 관찰하기 위해 시료를 제작하였다. 투과전자현미경 시료의 제작과정에서 고정과 탈수는 주사전자현미경 시료의 제작방법과 동일하게 처리하였다. 탈수가 끝난 시료는 propylene oxide와 epon (A + B) 의 혼합물에 넣어 1-3시간 동안 중합시킨 다음, Epon 812에 포매하였다. 포매한 D형 유생의 시료는 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden) 에 의해 두께 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ 로 semithin section한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 시료는 다시 60-90 nm 두께로 박절하여 200 mesh copper grid에 부착하였다. Ultrathin section한 절편은 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEM 1200 E-XII,



**Fig. 3.** Survival rates of post-thawed early D-shaped larvae with 1 M and 2 M ethylene glycol (EG) as a cryoprotectant (A) and three kind of additive (B). Different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

60-80 kv, JEOL, Tokyo, Japan) 으로 관찰하였다.

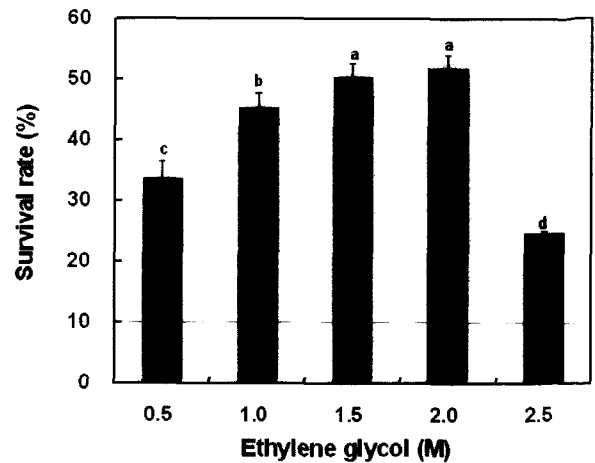
#### 4. 통계처리

모든 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 probit 분석을 하였고, 통계처리는 one-way ANOVA를 실시하여, 최소유의 차검정 (least significant difference test, LSD test) 에 의해 평균간 유의차 유무 ( $p < 0.05$ ) 를 파악하였다.

### 결 과

#### 1. 첨가제별 유생의 생존율

적합한 첨가제를 찾기 위하여 각각 0.2 M과 0.5 M의 fructose, glucose, sucrose에 ethylene glycol을 첨가하여 최종 농도가 1.0 M과 2.0 M이 되도록 하였다. 여기에 초기 D형 유생을 침지하여 냉동한 결과, 해동 후 생존율은 Fig. 3에서와 같이, 0.2 M fructose, glucose, sucrose가 첨가된 1.0 M ethylene glycol에서 각각  $13.9 \pm 2.5\%$ ,  $4.1 \pm 0.9\%$ ,  $2.9 \pm 0.2\%$ 였다. 2.0 M ethylene glycol에서는 각각  $1.9 \pm$



**Fig. 4.** Survival rates of post-thawed late D-shaped larvae with five different concentrations of cryoprotectant mixed with 0.5 M sucrose. Different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

0.3%, 0%,  $0.8 \pm 0.0\%$ 였다. 0.5 M fructose, glucose, sucrose가 첨가된 1.0 M ethylene glycol에서 유생의 생존율은 각각  $11.9 \pm 3.1\%$ , 0%,  $50.4 \pm 1.3\%$ 였고, 2.0 M ethylene glycol에서는 각각  $6.0 \pm 0.8\%$ ,  $1.5 \pm 0.3\%$ ,  $51.8 \pm 1.7\%$ 였다. 따라서 피조개 D형 유생의 냉동보존시 첨가제로 0.5 M sucrose가 적합한 것으로 나타났다.

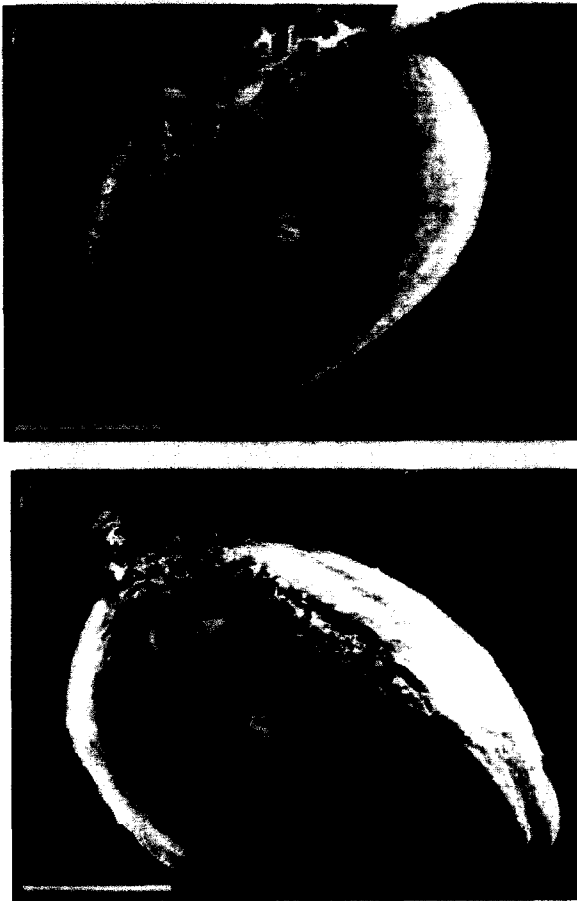
#### 2. 동해방지제 농도별 유생의 생존율

첨가제로 0.5 M sucrose가 첨가된 ethylene glycol을 사용하여 냉동하였을 때 생존율이 가장 높았다 (Fig. 4). 이를 토대로 후기 D형 유생을 첨가제로 0.5 M sucrose, 동해방지제로 ethylene glycol을 농도별로 첨가하여 냉동한 결과, 해동유생의 생존율은 ethylene glycol 농도 1.5 M과 2.0 M에서 각각  $50.5 \pm 1.3\%$ ,  $51.9 \pm 1.7\%$ 로 높았다. EG에서 2.0 M까지는 농도가 높아질수록 유생의 생존율이 유의하게 높아지는 경향을 보였으나, 2.5 M에서는 생존율이 유의하게 낮아졌다 ( $p < 0.05$ ).

#### 3. 냉동 전후 유생의 형태 비교

피조개 D형 유생의 외부형태를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 냉동 전 유생에서는 운동기관인 섬모환 (ciliary band) 과 정상적인 패각의 형태가 관찰되었다 (Fig. 5(A)). 2.0 M ethylene glycol을 사용하여 냉동-해동 후 생존한 유생도 냉동 전 유생과 비교하여 외부의 형태적 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 5(B)).

피조개 D형 유생의 내부형태를 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 냉동 전 D형 유생은 핵막과 핵질, 세포내 소기관



**Fig. 5.** External feature of *Scapharca broughtonii* D-shaped larva in every cryopreservation experiment. (A): Unfrozen D-shaped larva. (B): Frozen-thawed D-shaped larva. c: cilia, s: shell. Bar = 20  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Fine structure of cells in *Scapharca broughtonii* D-shaped larva in every cryopreservation experiment. (A): Unfrozen D-shaped larva. (B): Frozen-thawed D-shaped larva. c: cilia, m: mitochondrion, n: nucleus. Bar = 1  $\mu$ m.

들이 편중됨 없이 조밀하게 차 있는 것을 알 수 있었다 (Fig. 6A). 2.0 M ethylene glycol을 사용하여 냉동-해동 후 생존한 D형 유생에서도 세포내 소기관의 형태는 냉동하지 않은 유생의 세포와 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 6B). 다만 일부 몇몇 세포에서 핵질의 응축과 세포질의 공포화가 관찰되었다.

### 고 찰

기존의 조개류 발생배의 냉동보존 연구에서 사용된 발생단계는 세포분열 초기의 배가 대부분이었다. Toledo *et al.* (1989) 은 진주담치의 발생단계 중 2-8세포와 담륜자를 사용한 냉동보존에서 담륜자의 냉동보존이 가능함을 밝혔다. 본 연구에서도 피조개 D형 유생을 이용하여 냉동실험을 실시한 결과, 0.5 M sucrose를 첨가한 1.5 M과 2.0 M의 ethylene glycol을 사용하였을 때, 50% 이상의 생존율을 보여 냉동보존

이 가능함을 알 수 있었다.

Gwo (1995) 는 참굴의 상실배 (morula), 낭배 (gastrula), 담륜자 (trochophore) 를 10%, 20%, 30%의 DMSO, glycerol, ethylene glycol, propylene glycerol에 냉동보존한 결과, 담륜자가 10% propylene glycerol로 냉동한 담륜자가 해동후 생존율 95%로 가장 좋았다고 보고하였다. Chao *et al.* (1997) 은 참굴의 후기 배와 초기 유생을 0.06 M trehalose를 희석한 2 M DMSO를 동해방지제로 사용하여 62.3-75.1%의 생존율을 얻었으며, 백합 (*Meretrix lusoria*) 의 후기 배와 초기 유생을 0.06 M glucose를 희석한 2 M DMSO를 동해방지제로 냉동하였을 때, 해동 후 생존율이 73.3-74.2%였다고 하였다. 본 연구에서는 피조개 D형 유생을 이용하여 첨가제로 fructose, glucose, sucrose 중 0.5 M sucrose, 동해방지제로 2.0 M ethylene glycol을 사용하였을

때, 해동 후 생존율이 가장 높았다. 동해방지제의 높은 삼투질 농도는 발생배의 삼투압과 생화학적 측면에 손상을 입히는 것으로 알려져 있지만 (Renard and Cochard, 1989), 본 연구에 사용한 유생의 생존율에는 큰 영향을 미치지 못하였으며, sucrose와 ethylene glycol을 혼합하여 사용하였을 때 생존율이 높았다. 이는 동해방지제로 인한 삼투압 충격을 첨가제인 sucrose가 세포막 외부에서 완화시키기 때문인 것으로 판단된다 (Choi and Chang, 1999).

요 약

피조개 D형 유생을 냉동보존하기 위한 적절한 첨가제 종류와 농도 및 동해방지제로 적용한 ethylene glycol의 농도에 대한 냉동보존 효과실험을 실시하였다. 유생을 0℃로 설정된 프로그램 냉동기로 옮겨 -1℃/분의 냉동률로 -12℃까지 냉동한 후 10분 동안 유지한 상태에서 식빙하고 -35℃까지 재냉동한 다음, 즉시 액체질소통에 저장하였다. 1.0 M과 2.0 M ethylene glycol을 동해방지제로 사용하여 첨가제별로 D형 유생을 냉동한 결과, 0.5 M sucrose에서 생존율이 각각 50.5 ± 1.3%, 51.9 ± 1.7%로 가장 좋았다. 0.5 M sucrose를 첨가한 ethylene glycol의 농도별 냉동에서는 2.0 M이 생존율 51.9 ± 1.7%로 가장 높았다. 주사 및 투과전자현미경을 이용하여 유생을 관찰한 결과, 냉동 전, 후 유생의 외부형태 및 세포내 구조의 차이가 인정되지 않았다.

REFERENCES

Chang, Y.J., Choi, Y.H. and Chang, Y.J. (1999) Selection of cryoprotectants for cryopreservation of pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* trochophore. *Development and Reproduction*, **3**: 107-111. [in Korean]

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.

Choi, Y.H. and Chang, Y.J. (1999) Survival rates of trochophores from pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* and Pacific oyster, *Crassostrea gigas* immersed in four kinds of cryoprotectant. *Journal of the Korean Fisheries Society*, **32**: 476-480. [in Korean]

Farrant, J. (1965) Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature* (London), **205**: 1284-1287.

Gwo, J.C. (1995) Cryopreservation of oyster *Crassostrea*

*gigas* embryos. *Theriogenology*, **43**: 1163-1174.

Leibo, S.P., Mcgrath, J.J. and Cravalho, E.G. (1978) Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, **15**: 157-271.

Lepock, J.R., Morse II, P.D. Keith, A.D. and Kruuv, J. (1978) Freeze-thaw damage in isolated lobster sarcoplasmic reticulum membranes: A model system for membranes damage. *Cryobiology*, **15**: 643-653.

Maurer, R.R. (1978) Freezing mammalian embryos: A review of the technique. *Theriogenology*, **9**: 45-67.

Naidenko, T. (1997) Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFPI. *Cryo Letter*, **18**: 375-382.

Niemann, H. (1982) Neuere ergebnisse und erkenntnisse aus tiefgefrierersuchen mit rinderembryonen. *Tierzuchter*, **34**: 412-413.

Niemann, H. (1984) Theoretical and practical aspects of deep freezing cattle embryos. *Animal Research and Development*, **19**: 83-97.

Paniagua-Chavez, C.G., Buchanan, J.T. Supan, J.E. and Tiersch, T.R. (1998) Settlement and growth of eastern oyster produced from cryopreserved larvae. *Cryo Letter*, **19**: 283-292.

Paniagua-Chavez, C.G. and Tiersch, T.R. (2001) Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology*, **43**: 211-223.

Rall, W.F., Mazur, P. and Souzu, H. (1978) Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. *Biophysiology Journal*, **23**: 101-120.

Renard, P. (1991) Cooling and freezing tolerance in embryos of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, **92**: 43-57.

Renard, P. and Cochard, J.C. (1989) Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam, *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop, *Pecten maximus* (L) embryos: Influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo Letter*, **10**: 169-180.

Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1985) Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapour: Effect of sugars. *Japanese Journal of Veterinary Research*, **33**: 141-144.

Toledo, J.D., Kurokura, H. and Kasahara, S. (1989) Preliminary studies on the cryopreservation of the blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 1661.