

Ricerche sulla crioconservazione di embrioni di Lepidotteri: sviluppo embrionale e sopravvivenza a seguito di trattamenti con agenti crioprotettivi

Muhamad T. Abidalla^{1*}, Elena Cosi², Donatella Battaglia¹, Pio Federico Roversi²

¹Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, via dell'Ateneo Lucano 10, 85100 Potenza

²Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia (CRA-ABP) Gestione ex Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria (ISZA), Via di Lanciola, 12/a – 50125 Cascine del Riccio – Firenze

*corresponding author: muhamad.tareq@gmail.com

Riassunto

L'applicazione delle tecniche di crioconservazione, già sviluppate per gli embrioni di mammiferi, alla conservazione del germoplasma di artropodi presenta difficoltà legate all'elevata sensibilità al congelamento degli embrioni e alla riduzione della permeabilità ai crioprotettivi dovuta alla presenza dei rivestimenti esterni delle uova (corion e membrana vitellina).

Obiettivo del presente lavoro è la definizione di protocolli di conservazione di uova di Lepidotteri, condotte utilizzando stadi embrionali diversi di due specie modello di rilevante importanza nei settori degli studi di base e delle ricerche di tipo applicato, *Galleria mellonella* L. e *Bombyx mori* L. Studi preliminari sull'embriologia di queste due specie ci hanno permesso d'individuare gli con più elevata resistenza agli stress termici e quindi maggiormente idonei per le successive prove di crioconservazione.

Vari protocolli per la decorionizzazione e permeabilizzazione degli embrioni sono stati messi a confronto.

Introduzione

Negli ultimi anni alcuni studi sono stati focalizzati sulle possibilità di utilizzare per lo stoccaggio del germoplasma di artropodi le tecniche di crioconservazione già sviluppate per gli embrioni di mammiferi. Le indagini svolte hanno evidenziato varie difficoltà nell'impiego di queste metodologie per il trattamento di stadi embrionali di insetti, legate in particolare all'elevata sensibilità al congelamento degli embrioni di questi esapodi e alla presenza dei rivestimenti esterni delle uova, corion e membrana vitellina in primo luogo, con relativa riduzione nella permeabilità ai crioprotettivi (Wang *et al.* 2000, Leopold *et al.*, 2001, Steponkus *et al.*, 1990).

Si distinguono due approcci di base nella crioconservazione di cellule, tessuti viventi e organismi indicati rispettivamente nella letteratura internazionale con i termini "slow freezing equilibrium" e "vitrification". Le procedure di vitrificazione sono le uniche applicabili agli insetti poiché, utilizzando elevate concentrazioni di crioprotettivi, consentono di attuare un raffreddamento molto rapido che evita la formazione di cristalli

di ghiaccio e consente invece, a temperature ultrabasse, il passaggio allo stato vetroso senza modifiche di volume e organizzazione delle molecole in strutture cristalline.

La vitrificazione richiede però di raggiungere preliminarmente una elevata ma ben precisa concentrazione di crioprotettivi, differente da specie a specie, che deve essere mantenuta al di sotto della soglia di tossicità in quanto si tratta di sostanze con effetti nocivi sui sistemi viventi.

L'identificazione dei livelli di concentrazione degli agenti crioprotettivi utilizzabili per evitare il congelamento degli embrioni con temperature prossime allo zero, deve inoltre essere affiancato alla individuazione degli stadi embrionali in grado di sopportare in modo efficace i trattamenti necessari per raggiungere quella che può essere definita come una condizione di vita sospesa, che prevede lo stoccaggio finale ad almeno -130°C , temperatura alla quale cessa ogni tipo di attività metabolica (Kattera e Chen, 2006; Rajamohan e Leopold, 2007; Roversi *et al.*, 2008).

Di seguito si espongono i risultati di indagini mirate alla definizione di protocolli di conservazione di uova di Lepidotteri, condotte utilizzando stadi embrionali diversi di due specie modello di rilevante importanza nei settori degli studi di base e delle ricerche di tipo applicato, *Galleria mellonella* L. e *Bombyx mori* L.

Materiali e Metodi

Per definire il ciclo di sviluppo embrionale di *G. mellonella*, ovature del lepidottero sono state raccolte dopo 30 minuti dall'inizio della ovideposizione da allevamenti mantenuti in ambiente controllato e incubate in cella climatizzata alla temperatura di $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $80 \pm 2\%$ di umidità relativa, fino al raggiungimento dello stadio di sviluppo desiderato.

Dopo la decorionizzazione (1% NaOH per 1 min e NaOCl 3% per 3 minuti) le uova sono state montate su vetrino con soluzione di Hoyer oppure colorate con Blu di Toluidina e montate su vetrino con balsamo del Canada.

Le osservazioni sullo sviluppo embrionale sono state effettuate con microscopio invertito equipaggiato con ottica DIC Nomarski. Il corion dell'uovo è stato inoltre osservato al microscopio elettronico a scansione per definirne spessore e struttura.

Nella prima fase di indagine relativa alle prove di decorionizzazione e permeabilizzazione, uova di *G. mellonella* sono state sottoposte ai trattamenti elencati in Tabella 1. Ulteriori trattamenti di decorionizzazione e permeabilizzazione per *G. mellonella*, nonché le prove di caricamento dei crioprotettivi e vitrificazione testati per *G. mellonella* e *B. mori* sono descritti nelle legende di tabelle e figure.

L'efficienza dei trattamenti di permeabilizzazione è stata controllata mediante trattamento con 0.1% di Rodamina B o con immersione in soluzioni iperosmotiche quali 1M di saccarosio e 2 M di etilene glicole (EG) fino a 40 min.

Nel caso del *B. mori* sono state testate due razze, una polivoltina non-diapausante Nistari e un poliibrido (126X57) (70X79) diapausante e per prima cosa è stata valutata la sensibilità al freddo e le possibilità di un conservazione per breve tempo a 0°C e 5°C della razza polivoltina Nistari

Ogni esperimento è stato effettuato su circa 500 uova ed è stato replicato almeno 3 volte. I dati sono stati analizzati mediante t-Student o ANOVA a una via seguita dal Test di Tukey per il confronto multiplo delle medie, utilizzando il programma di analisi statistica SPSS® 10.1 (USA). Tutte le percentuali sono state normalizzate mediante trasformazione in arcoseno.

Group A	Group B	Group C
A1 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min	B1 1% NaOH 1 min 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min;	C1 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min 2.5% Sodio tiosolfato 10 sec,
A2 1.25% NaOCl 2min, 0.04% Tween 80 2 min;	B2 1% NaOH 1 min 1.25% NaOCl + 0.08% Tween 80 2 min;	C2 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min; 2.5% Sodio tiosolfato 10 sec, isopropanolo 10 sec, eptano 10 sec
A3 1.25% NaOCl 2min, isopropanolo 5 sec, eptano 30 sec	B3 0.5% NaOH 1 min 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min;	C3 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min; 2.5% Sodio tiosolfato 10 sec, isopropanolo 10 sec, eptano 20 sec
A4 1.25% NaOCl 2min, 2.5% Sodio tiosolfato + 0.1% Tween 80 10 sec, isopropanolo 5 sec, eptano 30 sec	B4 0.5% NaOH for 1 min, 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min;TNM-FH + 10% FBS 30 min	C4 1.25% NaOCl + 0.04% Tween 80 2 min; 2.5% Sodio tiosolfato 10 sec, isopropanolo 10 sec, eptano 30 sec

Tabella 1. Trattamenti testati su *G. mellonella* per decorionizzare e permeabilizzare le uova da utilizzare nei successivi passaggi del processo di crioconservazione.

Risultati e discussione

Per quanto attiene *G. mellonella*, sono stati individuati due stadi embrionali (24 e 75 ore) che hanno evidenziato una più elevata resistenza a stress termici, a conferma di quanto rilevato di recente da Roversi *et al.* (2008).

In relazione a *B. mori* le indagini di embriologia e criobiologia hanno permesso di individuare tre stadi di sviluppo maggiormente idonei per le successive prove di crioconservazione: formazione della banda germinale (24 ore), sviluppo delle appendici della testa e del torace e stadio di entrata in diapausa nelle specie monovoltine (40 ore), inizio dell'invaginazione del proctodeo (60 ore).

Galleria mellonella

I risultati relativi alla decorionizzazione e permeabilizzazione, riportati in Tabella 2, mostrano che con il trattamento A1 (NaOCl (1,25%) + Tween 80 (0,04%) per 2 min) la percentuale di schiusura delle uova è più alta, con una maggiore resistenza degli embrioni di 24 ore.

La valutazione dei livelli di permeabilizzazione delle uova, fatta sulla base dell'intensità di colorazione e della velocità di disidratazione/rigonfiamento, ha invece indicato il trattamento B2 (1% NaOH 1 min, 1.25% NaOCl + 0.08% Tween 80 2 min) quale più efficiente, sebbene con una sopravvivenza ridotta di circa il 20% rispetto al trattamento A1.

Stadio (ore)	Group A (% di schiusa)	Group B (% di schiusa)	Group C (% di schiusa)
	A1	B1	C1
24	80,0 ± 1,6	60,5 ± 2,3	57,2 ± 2,9
75	58,3 ± 1,5	26,6 ± 2,1	43,9 ± 4,4
	A2	B2	C2
24	54,9 ± 3,7	68,2 ± 1,5	4,2 ± 0,8
75	11,0 ± 1,8	22,4 ± 3,7	4,3 ± 0,8
	A3	B3	C3
24	0,3 ± 0,2	64,2 ± 4,2	4,2 ± 1,7
75	4,6 ± 1,2	36,8 ± 5,3	7,6 ± 2,0
	A4	B4	C4
24	0,1 ± 0,1	56,8 ± 2,0	1,2 ± 0,1
75	11,2 ± 2,8	32,6 ± 1,4	7,6 ± 1,8
	F= 57,650; gdl= 4, 80; P=0,000	F=58,828; gdl = 4, 80; P=0,000	F= 5,754; gdl = 4, 80; P= 0,000

Tabella 2. Percentuale di schiusa delle uova trattate come indicato in Tabella 1 dopo 24 o 75 ore dalla deposizione. La percentuale di schiusa del controllo varia da $93,0 \pm 0,4$ a $82,6 \pm 1,5$. I valori indicati rappresentano la media \pm errore standard (n= 9).

Nel successivo esperimento di crioconservazione, i cui risultati sono riportati in tabella 3, è stato pertanto utilizzato preliminarmente quest'ultimo trattamento. Analogamente a quanto osservato in precedenza, anche in questa prova lo stadio di sviluppo precoce è risultato più tollerante ai trattamenti.

STADIO (ora)	Controllo (% di schiusa)	Caricamento (% di schiusa)	Disidratazione (% di schiusa)	Azoto Liquido (% di schiusa)
24	92,8 ± 1,4 a	51,5 ± 2,3 b	69,5 ± 1,3 d	0,1 ± 0,1 f
75	92,0 ± 1,3 a	22,9 ± 5,0 c	34,0 ± 2,1 e	0,0 f

Tabella 3. Percentuale di schiusa delle uova trattate dopo 24 o 75 ore dalla deposizione con la procedura di decorionizzazione e permeabilizzazione B2 e sottoposte ai successivi passaggi del processo di crioconservazione: Caricamento = 10% EG in TMN-FH a 25 °C per 30 min; Disidratazione = 40% EG+ 10% Trealosio + 5 % PEG a 0°C per 10 min; Azoto liquido = 1 min nei vapori di azoto e immersione in azoto liquido per 5-10 min, seguito da rimozione dei crioprotettivi in 0,5M trealosio in acqua distillata per 2 min a 25°C; 0,25 M trealosio in acqua distillata per 10 min; 0,1M trealosio in acqua distillata per 10 min a 25°C, TMN-FH+ 10%FBS per 10 min a 25°C. F= 22,0270; gdl=3, 49; P= 0,000. I valori indicati rappresentano la media \pm errore standard (n= da 6 a 9).

L'aggiunta dei crioprotettivi nella fase di caricamento e di disidratazione ha diminuito significativamente la sopravvivenza rispetto al controllo, ma non in modo drastico rispetto al solo trattamento di decorionizzazione/permeabilizzazione.

Un crollo nei livelli di sopravvivenza è stato invece registrato con immersione in azoto liquido, probabilmente a causa della scarsa penetrazione delle soluzioni crioprotettive all'interno dell'uovo. È stata pertanto testata nel corso dello studio una ulteriore procedura con la modifica della decorionizzazione/permeabilizzazione, impiegando una miscela di Tween80/Tween 20 (Tabella 4), che ha portato ad un leggero incremento della sopravvivenza nel solo stadio precoce.

STADIO (ora)	Controllo (% di schiusa)	Decorionizzazione (% di schiusa)	Caricamento/Disidratazione (% di schiusa)	Azoto Liquido (% di schiusa)
24	92,8 ± 1,4 a	53,4 ± 5,8 b	61,3 ± 2,7 b	0,6 ± 0,2 d
75	92,0 ± 1,3 a	22,6 ± 0,4 c	15,3 ± 1,2 c	0,0 d

Tabella 4 Percentuale di schiusa delle uova trattate dopo 24 o 75 ore dalla deposizione con la seguente procedura di decorionizzazione = 1% NaOH per 1 min, 1,25% NaOCl + 0.08%Tween 80/Tween 20 (6:2) per 2 min.; Caricamento / Disidratazione = 10% EG in TMN-FH a 25 °C per 30 min / 40% EG + 10% Trealosio + 5 % PEG a 0°C per 10 min; Azoto liquido = 1 min nei vapori di azoto e immersione in azoto liquido per 5-10 min, seguito da rimozione dei crioprotettivi in 0,5M trealosio in acqua distillata per 2 min a 25°C; 0,25 M trealosio in acqua distillata per 10 min; 0,1M trealosio in acqua distillata per 10 min a 25°C, TMN-FH+ 10%FBS per 10 min a 25°C. F= 22,8773; gdl=3, 49; P= 0,000. I valori indicati rappresentano la media ± errore standard (n= da 6 a 9)

Sempre al fine di individuare modalità di trattamento per migliorare la sopravvivenza dopo l'esposizione ad ultrabasse temperature si è testato l'utilizzo di una concentrazione più alta di EG nella fase di caricamento e l'aggiunta di metanolo (MetOH) o di dimetilsolfossido (DMSO) per aumentare la disidratazione e la penetrazione dei crioprotettivi (Figura 1). La prova, eseguita solo con uova di 24 ore, ha permesso di evidenziare come tutti i trattamenti di disidratazione (G, H, I) diminuiscono in maniera significativa la sopravvivenza rispetto al trattamento di caricamento in EG, ma non risultano significativamente diversi tra loro. In seguito all'immersione in azoto, in tutti i casi testati (G-LN, H-LN, I-LN) la percentuale di sopravvivenza è diminuita significativamente rispetto alla sola disidratazione con una percentuale di schiusa ottenuta con il trattamento di disidratazione contenente il DMSO pari all'1%.

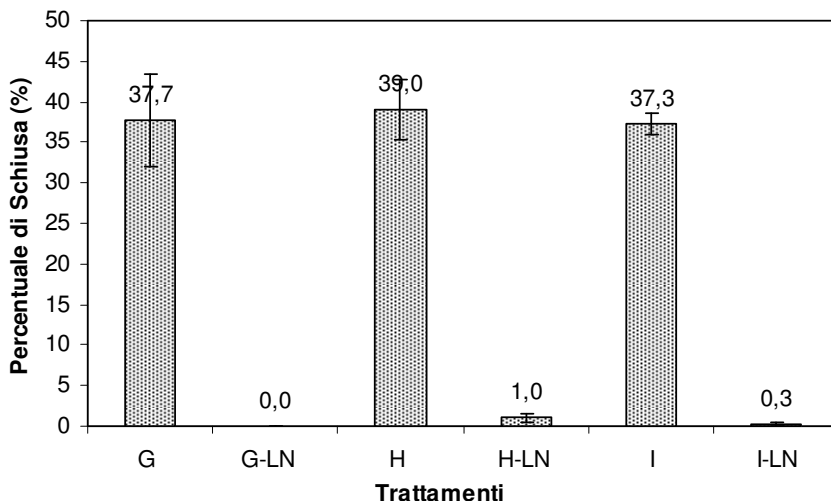


Figura 1. Percentuale di schiusa delle uova trattate dopo 24 ore dalla deposizione con trattamento di decorionizzazione B2 seguito dal caricamento in 12% EG in TMN-FH. G= disidratazione con 40%EG + 5% PEG + 10% Trealosio a 0°C 14 min; H = disidratazione con 40%EG + 10% DMSO + 5% PEG + 10% Trealosio a 0°C 14 min; I= disidratazione con 40%EG + 10% Metanolo + 5% PEG + 10% Trealosio a 0°C 14 min; G-LN, H-LN, I-LN= immersione in azoto liquido (LN) dopo disidratazione di tipo G, H, I e rimozione dei crioprotettivi come descritto in precedenza. F= 165,0799; gdl=6,62; P= 0,000.

Bombyx mori

Per quanto attiene le possibilità di stoccaggio a breve termine a basse temperature (Tabella 5), nel caso della razza Nistari gli stadi di sviluppo di 20 e 22 ore sono risultati nell'esposizione a 5°C le fasi più sensibili dello sviluppo embrionale con un netto miglioramento a partire dalle prove realizzate con uova di 24 ore e un picco massimo intorno alle 38-40 ore. Nelle prove con esposizione di uova Nistari a 0°C si sono invece ottenuti i valori più elevati con uova di 24 ore. Al riguardo si ritiene possibile ipotizzare che la Nistari, razza polivoltina e non diapausante di *B. mori*, si comporta come una razza diapausante. Infatti normalmente la diapausa inizia allo stadio di sviluppo di 40 ore, che rappresenta lo stadio di sviluppo in cui l'embrione trascorre la stagione fredda. Al contrario, la temperatura di 0°C con ogni probabilità induce uno stress che può essere meglio tollerato dagli embrioni in uno stadio di sviluppo precoce e meno differenziato. In generale si evidenzia anche nel caso del *B. mori* come per *G. mellonella* che gli stadi di sviluppo precoci dalle 24 alle 40 ore risultano di norma più adatti a subire le successive manipolazione necessarie per la crioconservazione.

Le prove di decorionizzazione/permeabilizzazione condotte con la razza Nistari, che presenta un chorion di spessore doppio rispetto a *G. mellonella*, hanno evidenziato che il trattamento di decorionizzazione di 4 min sullo stadio di sviluppo di 40 ore è quello più resistente alla manipolazione (F=9,43323; gdl=7,38; 0=0,001). Le prove condotte con uova di questa razza di *Bombyx* non hanno però consentito di ottenere la sopravvivenza di

alcun embrione al termine del completamento della procedura di vitrificazione e successivo riscaldamento.

	% schiusura	Significatività
Controllo	85,2 ± 0,9 a	F= 300,5722 gdl = 2, 9 P = 0,000
1 mese 0°C 24 h	66,1 ± 0,1 b	
1 mese 0°C 40 h	49,4 ± 0,7 c	
Controllo	92,9 ± 1,6 a	F = 47,53927 gdl = 6, 66 P = 0,000
1 mese 5°C 20 h	20,2 ± 2,9 b	
1 mese 5°C 22 h	18,3 ± 3,6 b	
1 mese 5°C 24 h	48,5 ± 9,2 c	
1 mese 5°C 38 h	71,0 ± 4,5 c	
1 mese 5°C 40 h	69,3 ± 6,4 c	
1 mese 5°C 42 h	61, 9 ± 4,6 c	

Tabella 5. Percentuale di schiusa delle uova di *B. mori* razza Nistari in differenti stadi di sviluppo embrionale conservate a basse temperature (5°C e 0°C) per un mese.

Nell'ultimo periodo sono state testate uova di un ceppo poliibrido che sono state manipolate durante la diapausa nell'intento di sfruttare la naturale produzione di sostanze crioprotettive naturali che si accumulano nel tuorlo in questa fase (Chino, 1957). Le prove preliminari condotte con questo materiale biologico hanno permesso di osservare la schiusa di una quota di uova anche dopo l'immersione in azoto liquido, con valori percentuali significativamente superiori nel caso di uova di 40 ore ($8,6\% \pm 6,9$) rispetto a uova di 24 e 60 ore ($F=50,31042$; $gdl=3,23$; $P=0,000$). Data la novità dei risultati ottenuti sono attualmente in corso ulteriori prove per confermare i dati ottenuti.

Bibliografia

- Kattera, S., Chen C. **2006**. Cryopreservation of embryos by vitrification: Current development. *Int. Surg.*, 91(5): 55-62.
- Leopold, R. A. **2004**. Cryopreservation of Dipteran insects: Development and evaluation. In: *Materials of the international conference "Preservation of Genetic Resources"*, October 18-23, St. Petersburg, Russia, 36 (9): 760-761.
- Leopold, R. A., Wang, W. B., Berkebile, D. R., Freeman T. P. **2001**. Cryopreservation of embryos of the New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 94 (5): 695-701.
- Rajamohan, A., Leopold R. A., Harris, M., **2002**. Vitrification of Mexican fruit fly embryos. *Cryobiology*, 45: 247.
- Rajamohan, A., Leopold, R. A., Wang, W. B., Harris, M., McCombs, S. D., Peabody, N. C., Fisher, K **2003**. Cryopreservation of Mediterranean fruit fly embryos. *Cryoletters*, 24: 125-132.
- Rajamohan, A., Leopold, R. A. **2007**. Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: Stage selection and avoidance of thermal stress. *Cryobiology*, 54: 44-54.
- Roversi, P.F., Cosi, E., Irdani, T. **2008**. Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Cryobiology* 56: 1-7.

Steponkus, P. L., Myers, S. P., Lynch D.V., Gardner L., Bronshteyn V., Leibo S. P., Rall W. F., Pitt, R. E., Li, T. T., MacIntyre, R. J., **1990**. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, *345*: 170-172.

Wang, W. B., Leopold, R. A., Nelson D. R., Freeman, T. P. **2000**. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. *Cryobiology*, *41*: 153-166.

Chino, H. **1957**. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause eggs of the Bombyx silkworm. *Nature* *180*, 606-607.