

Stato dell'arte sullo sviluppo della tecniche di crioconservazione per la conservazione del germoplasma degli insetti

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

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 è di grande interesse scientifico ed economico, ma 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). Tali aspetti sono stati affrontati con risultati variabili, ma talora molto incoraggianti dalla ricerca scientifica nell'ultimo ventennio. In questo lavoro viene riportata una revisione bibliografica dell'argomento.

La tecnica della crioconservazione e sue possibili applicazioni in ambito entomologico

La crioconservazione è una tecnica che permette il recupero delle normali funzioni vitali di organismi viventi (o loro cellule e tessuti) dopo un periodo più o meno prolungato di conservazione a temperature ultra basse, per esempio in azoto liquido (-196°C).

La capacità di sopravvivere a basse temperature è diffusa nel regno animale grazie alla produzione naturale di crioprotettivi e il livello di tolleranza al congelamento è molto variabile (Storey *et al.*, 1981; Storey e Storey 1988; 1990; Wharton, 2002). La tecnica della crioconservazione cerca di riprodurre e migliorare questo fenomeno osservato in natura mediante l'aggiunta artificiale di crioprotettivi, il cui scopo è per l'appunto quello di evitare la formazione di dannosi cristalli di ghiaccio durante il congelamento.

La tecnica della crioconservazione è stata sviluppata per la conservazione di gameti ed embrioni di mammiferi (Leibo, 1992) e il suo adattamento ad altri metazozi pone una larga gamma di problemi, legati non solo alla diversità delle specie animali ma anche a quella dei loro stadi di sviluppo (Leopold, 2006). In particolare, l'applicazione della crioconservazione agli insetti è di grande interesse sia scientifico sia pratico e ha stimolato nell'ultimo ventennio la produzione di diversi lavori scientifici (Leibo *et al.*, 1988; Houle *et al.*, 1997; Collins, 2000; Li *et al.*, 2001; Nunamaker e Lockwood, 2001; Leopold *et al.*, 2003; Leopold, 2004; Luo *et al.*, 2006; Rajamohan e Leopold, 2007; Roversi *et al.*, 2008; Abidalla *et al.*, 2009).

Il mantenimento di specifiche linee di germoplasma di insetti necessita dell'allevamento continuo, con costi elevati e il rischio di perdita di materiale genetico per problemi tecnici che possono intervenire durante l'allevamento. La possibilità di utilizzare la crioconservazione riduce notevolmente questi problemi. Si possono facilmente

immaginare le ricadute in alcuni settori, come quello dello studio della genetica, se si pensa che nel caso di *Drosophila* sono mantenute fino a 10000-20000 linee di mutanti (Mazur *et al.*, 1993).

La conservazione del germoplasma ha poi una rilevante importanza economica nel caso dell'ape domestica e del baco da seta. Il numero di genotipi del baco da seta, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), disponibili a livello mondiale è di circa 3000 (Nagaraju *et al.*, 2000). Solo in Giappone vi sono più di 400 razze mantenute attraverso l'allevamento continuo delle larve almeno una volta l'anno. Le procedure sviluppate per la conservazione a lungo termine delle risorse genetiche di *B. mori* prevedono la crioconservazione del solo sperma (Takemura *et al.*, 2000). La crioconservazione degli embrioni del baco da seta rappresenta un interessante obiettivo per la costituzione di banche di germoplasma.

Infine, la conservazione del germoplasma d'insetti può avere importanti ricadute nel controllo delle specie dannose in agricoltura per le possibili applicazioni nello stoccaggio degli insetti allevati in maniera massale, siano essi entomofagi da lanciare in campo per il controllo biologico o fitofagi da utilizzarsi con la tecnica del maschio sterile.

Le tecniche di crioconservazione utilizzate per gli embrioni dei mammiferi presentano varie difficoltà quando impiegate per il trattamento di stadi embrionali di insetti, a causa soprattutto della loro elevata sensibilità al congelamento e della presenza dei rivestimenti esterni delle uova, soprattutto corion e membrana vitellina, con relativa riduzione della permeabilità ai crioprotettivi (Steponkus *et al.*, 1990; Wang *et al.* 2000, Leopold *et al.*, 2001). Nel caso delle uova d'insetti, quindi, occorre applicare opportune procedure di rimozione dei rivestimenti esterni per permeabilizzare l'embrione ai crioprotettivi.

In letteratura la maggior parte degli studi sulla crioconservazione applicata agli insetti riguardano i ditteri, *Drosophila melanogaster* in primo luogo (Steponkus *et al.*, 1990; 1993; Mazur *et al.*, 1992 a; 1992 b; Steponkus & Caldwell, 1993), ma anche specie vettrici di malattie come *Culicoides sonorensis* Wirth & Jones (Nunamaker, e Lockwood, 2001). Pochi lavori prendono in considerazione i lepidotteri per i quali sono state ottenute percentuali di sopravvivenza ridotte dopo il trattamento a basse temperature. Nel caso di *Spodoptera exigua*, la percentuale di adulti ottenuti da embrioni stoccati in azoto liquido è stata inferiore al 2,0% (Li *et al.*, 2001), mentre la sopravvivenza degli embrioni di *Galleria mellonella* è stata dell'1,6 ± 0,5% dopo il congelamento in azoto liquido e dello 0,6 ± 0,2% dopo un periodo di stoccaggio in un refrigeratore meccanico a -149°C (Roversi *et al.*, 2008).

Le tecniche di crioconservazione possono provocare vari tipi di stress molecolari tra cui shock termico, tossicità chimica, carenza di ossigeno, stress osmotico (Rajamohan *et al.*, 2005). Riguardo alle possibili conseguenze mutagene, invece, Houle *et al.* (1997) hanno trovato che le procedure di crioconservazione degli embrioni di *Drosophila melanogaster* non producono effetti mutageni dal momento che il tasso di mutazioni aumenta di un fattore che non supera 2,39.

Embriogenesi e selezione dello stadio tollerante

Nel caso degli insetti vi sono molti ostacoli alla crioconservazione correlati con lo stadio di sviluppo (Leopold, 1991; Leopold e Rinehart, 2010) per cui la conoscenza dell'embriologia è fondamentale. La variabilità nella sopravvivenza dopo il trattamento è

ridotta dall'utilizzazione di embrioni di uno stesso stadio precisamente determinato (Schreuders e Mazur, 1994).

Nei Ditteri si è osservato che la massima tolleranza alla crioconservazione si ottiene quando l'embrionale è nello stadio subito precedente allo sviluppo dell'esoscheletro embrionale (Mazur *et al.*, 1992b; Steponkus e Caldwell, 1993; Wang *et al.*, 2000; Leopold *et al.*, 2001; Rajamohan e Leopold, 2007) quando la chiusura dorsale è completa, la segmentazione è evidente e vi è un minimo di tuorlo nell'intestino medio. La determinazione precisa dello stadio embrionale più tollerante alle manipolazioni criogeniche produce la massima sopravvivenza degli embrioni. Selezionare un preciso stadio di sviluppo non è difficile perché il tasso di sviluppo negli insetti dipende dalla temperatura. Per esempio gli embrioni della mosca mediterranea della frutta, *Ceratitis capitata*, mantenuti alla stessa temperatura e della stessa età cronologica sono per il 70% nello stesso stadio di sviluppo e la selezione dello stadio corretto per il trattamento aumenta la percentuale di schiusura delle uova dal 45% circa all'80% circa (Rajamohan e Leopold, 2007).

In *Drosophila* le procedure di permeabilizzazione diventano rapidamente meno efficaci, quando gli embrioni raggiungono l'età di 14-16 ore. Con embrioni più giovani (10 ore) si ottiene una permeabilizzazione eccellente ma la sopravvivenza è molto bassa (Mazur *et al.*, 1992a).

Gli studi sulla genesi della cuticola embrionale negli insetti suggeriscono che gli embrioni secernono 2 o 3 strati cuticolari a seconda degli ordini (Konopova e Zrzavý, 2005). Tre cuticole embrionali sono presenti per esempio nei Coleotteri e nei Lepidotteri (Louvet, 1983; Ziese e Dorn, 2003), mentre due cuticole embrionali sono state descritte nei Ditteri (Bordes-Alle'aume e Sami, 1987). La sierosa e la membrana amniotica giocano un ruolo importante nella genesi della cuticola embrionale in tutti gli insetti (Lamer e Dorn, 2001; Goltseva *et al.*, 2009).

Dopo il corion la seconda barriera alla penetrazione dei crioprotettivi è costituita dallo strato ceroso, che gli embrioni degli insetti sviluppano molto precocemente (Mazur *et al.*, 2001). La rimozione di questo strato, resistente agli alcani, è molto importante per permettere la penetrazione dei crioprotettivi nell'uovo e l'uscita parziale dell'acqua.

Un'altra potenziale barriera alla crioconservazione è costituita dal tipo e dalla quantità di tuorlo presente nelle uova della maggior parte degli insetti. Le lipo-proteine sono particolarmente soggette ad alterazioni in cellule sottoposte a raffreddamento e a congelamento in quanto questi complessi non sono tenuti insieme da legami covalenti (Lovelock, 1957). Alcuni lavori hanno dimostrato che il tuorlo è una barriera critica per la penetrazione dei crioprotettivi e può rallentare la risposta osmotica dell'embrione, la qual cosa deve essere tenuta nel giusto conto quando si preparano i protocolli per la crioconservazione (Hagedorn *et al.*, 1997).

L'embriogenesi di *Galleria mellonella* si svolge in 144 ore alla temperatura di 30°C e può essere divisa in 12 stadi embrionali. Osservazioni svolte su questa specie hanno indicato che il migliore stadio embrionale candidabile per le procedure di crioconservazione è lo stadio precoce ottenuto a 24 ore dopo la deposizione dell'uovo, quando la stria germinativa è completa, la sierosa e l'amnion si sono formati, ma la prima cuticola della sierosa non è stata ancora depositata (Abidalla, 2009; Abidalla *et al.*, 2009).

Nel caso di *Bombyx mori*, invece, lo stadio meno sensibile si raggiunge 40 ore dopo la deposizione dell'uovo, quando il carattere morfologico più evidente è la presenza di

appendici sviluppate. Tale stadio corrisponde all'ingresso in diapausa nelle razze diapausanti (Abidalla, 2009; Abidalla *et al.*, 2009).

Decorionizzazione e permeabilizzazione delle uova

Per crioconservare con successo gli embrioni degli insetti è necessario che le barriere impermeabili siano rimosse senza danneggiare eccessivamente l'embrione, in modo che i crioprotettivi possano penetrare all'interno (Schreuders *et al.*, 1996). La definizione di un protocollo specifico per la decorionizzazione-permeabilizzazione delle uova è, quindi, un prerequisito necessario per l'applicazione di questa tecnica.

Il corion dell'uovo viene tolto mediante incubazione in una soluzione diluita di ipoclorito di sodio e lo strato lipidico sottostante viene rimosso mediante estrazione con alcani. La rimozione del corion è semplice mentre il metodo per l'eliminazione dello strato lipidico impermeabile deve essere messo a punto per ogni specie (Wang *et al.*, 2000; Rajamohan *et al.*, 2003).

Il processo di crioconservazione comporta l'esposizione degli embrioni a una serie di stress fisici e chimici che possono avere come risultato finale una riduzione drastica della percentuale di individui che raggiunge lo stadio adulto e/o la nascita di adulti debilitati.

Gli stress chimici, in particolare, sono causati dai solventi usati per rimuovere lo strato lipidico (Mazur *et al.*, 1992b; Pajot-Augy, 1993; Rajamohan *et al.*, 2003).

Una completa permeabilizzazione ai crioprotettivi non è necessaria e può danneggiare l'embrione. Una parziale penetrazione dei crioprotettivi, associata ad una perdita d'acqua per osmosi con conseguente concentrazione delle macromolecole citoplasmatiche, aumenta notevolmente le possibilità di successo (Rall, 1987).

Gli embrioni di *Galleria mellonella* non sono in grado di tollerare esposizioni, anche brevi, ad alcoli ed alcani, generalmente impiegati nelle tecniche di permeabilizzazione delle uova di ditteri. Trattamenti di decorionizzazione e permeabilizzazione delle uova di *G. mellonella* effettuate con una combinazione di NaOCl (1,25%) e Tween 80 (0,04%) per 2 minuti hanno fornito i migliori risultati in termini di successiva schiusa delle uova (Abidalla, 2009; Abidalla *et al.*, 2009). In *Bombyx mori*, prove di esposizione a una soluzione per la decorionizzazione costituita da 3% di NaOCl e 0,04% di Tween 80 per 3 minuti, seguita da un lavaggio in acqua distillata e tiosolfato di sodio per pochi secondi, hanno fornito le migliori risposte in termini di permeabilità e successiva sopravvivenza (Abidalla, 2009; Abidalla *et al.*, 2009).

La vetrificazione

L'acqua non ha una viscosità alta perciò può essere vetrificata solo attraverso un processo di raffreddamento molto rapido di un piccolo campione. La viscosità aumenta molto poco quando l'acqua viene raffreddata e alla temperatura di congelamento si passa all'improvviso in una fase di transizione, durante la quale si formano i cristalli di ghiaccio. L'acqua allo stato cristallino aumenta di volume danneggiando le strutture cellulari. Sottoposte ad un rapido raffreddamento, le molecole d'acqua non hanno il tempo di sistemarsi in una struttura cristallina. Una volta che il campione si trova al di sotto della temperatura a cui avviene la transizione nella fase cristallina, la cristallizzazione non ha più luogo e quindi viene raggiunto uno stato stabile (Jèrome e Commandeur, 1997).

I vetri sono dei liquidi ad alta viscosità solidificati. Essi sono amorfi, cioè non cristallini, e metastabili, e, poiché mancano di una struttura organizzata, sono molto meno dannosi del ghiaccio.

Ci sono due approcci di base alla crioconservazione di cellule e tessuti: le procedure di congelamento/scongelo e la vetrificazione. Le tecniche di congelamento/scongelo comportano la formazione di ghiaccio nella soluzione extracellulare, mentre, in condizioni operative opportune, è resa minima la probabilità che si formi ghiaccio intracellulare. Le procedure di vetrificazione, invece, escludono la formazione di ghiaccio in ogni parte del campione e prevedono l'utilizzo di concentrazioni più elevate di crioprotettivi (Kattera e Chen, 2006). L'elevata tossicità delle soluzioni vetrificanti richiede tempi di esposizione molto ridotti ed elevate velocità di discesa termica. Con questa tecnica è difficile che si producano danni fisici. La vetrificazione offre, inoltre, il vantaggio di essere più economica rispetto alle tecniche di congelamento lento.

La tecnica della vetrificazione, dunque, prevede l'aumento della viscosità mediante l'uso di crioprotettivi, e il raffreddamento rapido, in questo modo s'impedisce la formazione di cristalli di ghiaccio. Il processo di vetrificazione, come abbiamo detto, è molto vantaggioso ma non è privo di problemi (Schreuders e Mazur, 1994). I problemi possono riguardare l'introduzione della soluzione di vetrificazione nelle cellule e la sua successiva rimozione, l'effetto della soluzione sulla sopravvivenza dell'embrione, il mantenimento di uno stato vetroso stabile per tutto il tempo in cui l'embrione è mantenuto ad una temperatura inferiore al punto di congelamento dell'acqua.

La vetrificazione dell'acqua all'interno delle cellule può essere ottenuta in tre modi:

1. Aumentando la velocità di raffreddamento e di riscaldamento;
2. Aumentando la concentrazione dei crioprotettivi;
3. Riducendo la concentrazione di crioprotettivi richiesta usando sostanze con caratteristiche migliori (Rajamohan e Leopold, 2007; Chao *et al.*, 1994).

Il danno alle uova crioconservate può derivare dalla sensibilità alle basse temperature e/o dalla formazione di ghiaccio, possibile sia nella fase di raffreddamento all'inizio del processo di crioconservazione, sia in quella di riscaldamento alla fine dello stesso periodo (Mazur *et al.*, 1993).

I crioprotettivi

I crioprotettivi utilizzati nelle procedure di vetrificazione sono sostanze di varia natura come il dimetil sulfoxide, l'etilen glicole, il metanolo, il glicerolo, il saccarosio, il polietilen glicole e il trealosio. A seconda delle loro caratteristiche chimiche queste sostanze penetrano all'interno permeando le cellule o rimangono all'esterno. I crioprotettivi permeanti sono dotati a loro volta di una diversa diffusibilità e tossicità, parametri influenzati dalla temperatura.

La tossicità dei crioprotettivi nei confronti delle uova degli insetti è piuttosto ben documentata (Schreuders e Mazur, 1994; Wang *et al.*, 2000; Leopold *et al.*, 2001; Guanghong *et al.*, 2001; Cabrita *et al.*, 2002; 2003; Luo *et al.*, 2006). Essa aumenta con il crescere della concentrazione e dei tempi di esposizione (Cabrita *et al.*, 2003). La concentrazione che la soluzione deve avere perché si verifichi il fenomeno della vetrificazione dipende dalla velocità di raffreddamento, dalle dimensioni dell'oggetto,

dalla pressione idrostatica e dall'abilità del composto o della miscela di composti a produrre lo stato vetroso (Fahy *et al.*, 1984).

I crioprotettivi permeanti (etilen- glicole, glicerolo, dimetilsulfoxide) proteggono il sistema riducendo la quantità di ghiaccio intra e extra cellulare. I crioprotettivi non permeanti, come il trealosio e il saccarosio, proteggono la struttura della membrana durante le fasi di congelamento e scongelamento (Kruuv *et al.*, 1988; Rudolph e Crowe, 1985). Le proprietà stabilizzanti del trealosio sono ben documentate (Crowe *et al.*, 1992; Kuleshova *et al.*, 1999; Wusteman *et al.*, 2003) e l'aggiunta di questo zucchero alla soluzione vetrificante ha la funzione di proteggere l'integrità della membrana vitellina.

L'uso del trealosio o del glucosio riduce la tossicità legata all'elevata concentrazione di crioprotettivi (Chao *et al.*, 1994) e determina un aumento della percentuale di sopravvivenza degli embrioni trattati (Rajamohan e Leopold, 2007). Inoltre, inserendo nella soluzione crioprotettiva macromolecole come il polietilen- glicole è possibile aumentare la viscosità massimizzando la stabilità del sistema e inibendo la devetrificazione (Pegg *et al.*, 1997; Rall, 1987).

L'etilen- glicole è stato scelto come principale crioprotettivo permeante nella crioconservazione di uova d'insetti (Mazur *et al.*, 1992b; Nunamaker e Lockwood, 2001; Steponkus *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2000), tuttavia il metanolo è riportato essere un efficace crioprotettivo (James, 1980; Liu *et al.*, 1998), con una velocità di penetrazione maggiore dell'etilen glicole (Liu *et al.*, 2004) e con una minore tossicità rispetto al dimetil sulfoxide e ai glicoli (Pollock *et al.*, 1991; Ali e Shelton, 1993; Zhang e Rawson, 1996).

Il rapporto ottimale tra crioprotettivi permeanti e non permeanti dipende dalle caratteristiche della specie o addirittura della razza. Per esempio nel baco da seta le razze non diapausanti sono più sensibili all'ipoclorito di sodio perché il corion non è spesso quanto quello delle uova diapausanti. Per questo motivo è necessario aumentare la concentrazione esterna di crioprotettivi non permeanti che rimuovono l'acqua interna e, così facendo, favoriscono il flusso dei crioprotettivi permeanti all'interno (Abidalla, 2009). Nel caso delle razze diapausanti del baco da seta una strategia innovativa e promettente consiste nell'effettuare un pretrattamento a basse temperature, volto a stimolare il processo di diapausa, con conseguente conversione del glicogeno del tuorlo in glicerolo e sorbitolo, che fungono da crioprotettivi endogeni, in grado di migliorare il risultato complessivo delle procedure di vetrificazione all'interno (Abidalla, 2009).

Conclusioni

La possibilità di conservare il germoplasma degli insetti utilizzando le tecniche di crioconservazione apre interessanti prospettive per lo sviluppo della ricerca entomologica, in particolare per ciò che riguarda gli insetti vettori di malattie, e per la conservazione di razze di insetti utili come l'ape e il baco da seta. Allo stato attuale la conservazione di queste risorse genetiche avviene per lo più attraverso l'allevamento continuo delle diverse linee genetiche con costi e problemi tecnici non indifferenti.

L'applicazione delle tecniche di crioconservazione, già sviluppate per gli embrioni di mammiferi, alla conservazione del germoplasma degli artropodi in generale, e degli insetti in particolare, 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). Il risultato finale dipende da

molti fattori legati alle caratteristiche delle uova e alla loro resistenza nei confronti degli effetti tossici provocati dalle alte concentrazioni di crioprotettivi permeanti.

Nell'ultimo ventennio diversi studi hanno preso in considerazione le tecniche di permeabilizzazione delle uova, gli effetti tossici dei crioprotettivi e il miglioramento delle soluzioni vetrificanti. I risultati ottenuti sono incoraggianti e lasciano intravedere una concreta possibilità di crioconservare specie di interesse scientifico ed economico.

Bibliografia

- Abidalla, M.T. **2009**. Development of Cryoconservation Technology of Lepidoptera: Study of embryonic development and survival after treating with cryoprotective agents. *Tesi di dottorato: 169 pp.*
- Abidalla, M.T., Cosi, E., Battaglia, D., Roversi, P.F. **2009**. Ricerche sulla crioconservazione di embrioni di Lepidotteri: sviluppo embrionale e sopravvivenza a seguito di trattamenti con agenti crioprotettivi. *Atti del convegno "Ricerca, innovazione e sviluppo nelle biotecnologie agro-alimentari"*, Potenza. 27 ottobre 2009: 34-41.
- Ali, J., Shelton, J. N. **1993**. Design of vitrification solution for the cryopreservation of embryos. *J. Reprod. Fertil.* 99: 471- 477.
- Bordes-Alle 'aume N, Sami L. **1987**. Ecdysteroid titres and cuticle depositions in embryos of the Dipteran *Calliphora erythrocephala*. *Int J. Invert. Reprod. Dev.* 11:109–122.
- Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Real M., Herraéz, M.P. **2002**. Toxicity of different permeable and non-permeable cryoprotectants on Turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*.45:261.
- Cabrita, E., Robles, V., Chereguinic, O., Wallacea, J. C., Herráezb, M. P. **2003**. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*. 47 (3): 204-213.
- Chao N., Chiang C., Hsu H., Tsai C. and Lin T. **1994**. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquatic Living Resources*, 7: 99-104.
- Chino, H. **1957**. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause eggs of the *Bombyx* silkworm. *Nature* 180, 606-607.
- Collins, A. M. **2000**. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. *J. Econ. Entomol.* 93: 568–571.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. **1992**. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*. 54: 579–599.
- Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., Meryman, H. T. **1984**. Vitrification as an approach cryopreservation. *Cryobiology*. 21 (4): 407-426.
- Goltseva, Y., Rezendea, G. L., Vranizana, K., Lanzaroc, G., Valleb, D., Levinea, M. **2009**. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Developmental Biology*, 330(2): 462-470.
- Guang-hong, L., Yi P., Qi-jin, C., Zhi-jian, S. **2001**. Cryopreservation of the beet armyworm eggs. *Entomologia Sinica*. 8(2): 124-130.
- Hagedorn, M., Kleinhans, F., Freitas, W. R., Liu, J., Hsu, E. W., Wildt, D. E., Rall, W. F. **1997**. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 278 (6): 356 – 371.

- Houle, D., Kondrashov, A. S., Yampolsky, L. Y., Caldwell, S., Steponku, P. L. **1997**. The effects of cryopreservation on the lethal mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. Camb.* 69: 209-213.
- James, E. R. **1980**. Cryopreservation of schistosoma – *Mansoni schistosomula* using 40-percent V-V (10-M) methanol and rapid cooling. *Cryo- Letter. 1*: 535-544.
- Jérôme, B., Commandeur, J. **1997**. Dynamics of glasses below the glass transition. *Nature.* 386: 589 – 592.
- Kattera, S., Chen, C. **2006**. Cryopreservation of embryos by vitrification: Current development. *Int. Surg., 91(5)*: 55-62.
- Konopová, B., Zrzavý, J. **2005**. Ultrastructure, development, and homology of insect embryonic cuticles. *J. Morphology.* 264: 339-262.
- Kruuv, J., Glofcheski, D. J., Lepock, J. R. **1988**. Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology.* 25: 121-130.
- Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., Trounson, A. **1999**. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod.* 14(12):3077-3079.
- Lamer, A., Dorn, A., **2001**. The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue and Cell,* 33(6): 580-595.
- Leibo, S. P. **1992**. Techniques for the preservation of mammalian germplasm. *Anim. Biotechnol.* 3:139–153.
- Leibo, S. P., Myers, S. P., Steponkus, P. **1988**. Survival of *Drosophila melanogaster* embryos cooled to subzero temperatures. *Cryobiology.* 26: 545- 546.
- Leopold, R. A. **1991**. Cryopreservation of insects germplasm: cells, tissues and organisms, pp. 379-407. In R. E. Lee and D. L. Denlinger (eds.), *Insects at low temperature*. Chapman & Hall, New York.
- 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. **2006**. Cryopreservation of non-mammalian Metazoa system. (Ed.) *Advances in Biopreservation*. John G. Baust, John M. Baust. Taylor and Francis group. CRC Press. New York.
- Leopold, R. A., Rajamohan, A., Shelly, T. E. **2003**. Development and results of quality assurance testing for mass-reared and laboratory colonized insects after embryo cryopreservation. *Abstracts/Cryobiology.* 47(3):270.
- Leopold, R. A., Rinehart, J. P. **2010**. A template for insect cryopreservation. In: *Low Temperature Biology of Insects*, ed. David L. Denlinger and Richard E. Lee Jr. Published by Cambridge University Press. Cambridge University Press.
- 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.
- Li, G., Yi, P., Qi-jin, C., Zhi-jian, S. **2001**. Cryopreservation of the beet armyworm eggs. *Entomologia Sinica.* 8(2): 124-130.
- Liu, B.L., McGrath, J. **2004**. Vitrification solutions for the cryopreservation of tissue-engineered bone, *Cell Preservation Technology.* 2: 133–143.
- Liu, X. H., Zhang, T. T., Rawson, D. M. **1998**. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol. *Cryo Lett.* 19: 309-318.

- Louvet, J. **1983**. Ultrastructure du pleuropode chez l'embryon du hanneton *Rhizotrogus majalis* Razoum (Coleoptera, Melolonthidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 12: 97–117.
- Lovelock, J. E. **1957**. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc Royal Soc London B.* 147:427- 434.
- Luo, L., Pang, Y., Chen, Q., Li, G. **2006**. Cryopreservation of the late stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Cryoletters* 27, 341-352.
- Mazur, P., Cole, K. W., Hall, J. W., Schreuders, P. D., and Mahowald, A. P. **1992a**. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science.* 258, 1932–1935.
- Mazur, P., Cole, K. W., and Mahowald, A. P. **1992b**. Critical factors affecting the permeabilization of drosophila embryos by alkanes. *Cryobiology.* 29: 210-239.
- Mazur, P., Cole, K. W., Schreuders, P. D. , Mahowald, A. P. **1993**. Contribution of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of *Drosophila* embryos cooled to – 205°C. *Cryobiology.* 30: 45-73.
- Mazur, P., Liu, X.-H., Koshimoto, C., Cole, K., Gamliel, E., Benedict, M., Valle, D., **2001**. The development of permeability barriers in oocytes and eggs of *Anopheles gambiae* and the golden cuticle mutant of *Anopheles quadrimaculatus*. *Cryobiology.* 43: 340.
- Nagaraju, J., Klimenko, V., Couble, P., **2000**. The silkworm, *Bombyx mori*: a model genetic system. Encyclopedia of Genetics (ed. by E. Reeves), pp. 219-239 London, Fitzroy Dearborn.
- Numamaker, R. A., Lockwood, J. A. **2001**. Cryopreservation of Embryos of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(4): 55-58.
- Pajot-Augy, E. **1993**. Comparative effects of cryosolvents on tubulin association, thermal stability, and binding of microtubule-associated proteins. *Cryobiology.* 30: 286-298.
- Pegg, D. E., Wusteman, M. C., Boylan, S. **1997**. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology.* 34:183–192.
- Pollock, G. A., Hamlyn, L., Maguire, S. H., Stewart-Richardson, P. A., Hardie, I. R. **1991**. Effects of four cryoprotectants in combination with two vehicle solutions on cultured vascular endothelial cells. *Cryobiology* 28: 413-421.
- Rajamohan, A., Yocum, G. D., Leopold, R. A **2005**. Differential gene expression in Mexican fruit flies after cryopreservation. *Cryobiology*, 51 (3): 406.
- Rajamohan, A., Leopold, R. A. **2007**. Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: Stage selection and avoidance of thermal stress. *Cryobiology*, 54: 44-54.
- 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.
- Rall, W. F. **1987**. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification, *Cryobiology.* 24: 387–402.
- 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.
- Rudolph, A.S., Crowe, J. H. **1985**. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, Trehalose and proline. *Cryobiology.* 22: 367-377.
- Schreuders, P. D, Jetton, A. E, Baker, J. L, Critser, J. K, Mazur, P. **1996**. Mechanical and chill sensitivity of mouse sperm. *Cryobiology.* 33:676–677.

- Schreuders, P. D., Mazur, P. **1994**. Vitrification-based cryopreservation of *Drosophila* embryos. *Advances in Cryogenic Engineering*, 39: 2031-2038.
- Steponkus, P. L., Caldwell, S. **1993**. An optimized procedure for the cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos, *Cryo- Letters*. 14: 375–380.
- 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.
- Storey, K. B., Baust, J. G. and Storey, J. M. **1981**. Intermediary metabolism during low temperature acclimation in the overwintering gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. *J. Comp. Physiol.* 144: 183-190.
- Storey, K. B., Storey, J. M. **1988**. Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews*. 68: 27–84.
- Storey, K. B., Storey, J. M. **1990**. Carbone balance and energetic of cryoprotectant synthesis in a freeze tolerant insect: responses to perturbation by anoxia. *J. Comp. Physiol.* 160: 77-84.
- Takemura, Y., Kanda, T., Horie, Y. **2000**. Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* 46:491–497.
- Wang, W. B., Leopold, R. A., Nelson D. R., Freeman, T. P. **2000**. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. *Cryobiology*, 41: 153-166.
- Wharton, D. A. **2002**. Cold Lazarus. In: Life at the Limits, Organisms in extreme environments. (ed. Wharton D. A.), Cambridge university press. Cambridge, UK pp. 150-197.
- Wusteman, M. C., Pegg, D. E., Wang, L. H., Robinson, M. P. **2003**. Vitrification of ECV304 cell suspensions using solution containing propane-1,2-diol and Trehalose. *Cryobiology* 46: 135–145.
- Zhang, T., Rawson, D. M. **1996**. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*. 33: 1-13.
- Ziese, S., Dorn A. **2003**. Embryonic integument and molts in *Manduca sexta* (Insects: Lepidoptera). *J. Morphol.* 255: 146-161.