

УДК 591.463/465-57:615.014.41

Л.И. Релина*, А.К. Гулевский

Криоконсервирование репродуктивных продуктов насекомых

UDC 591.463/465-57:615.014.41

L.I. Relina*, A.K. Gulevsky

Cryopreservation of Insect Germplasm

Реферат: В обзоре освещены основные проблемы криоконсервирования репродуктивных продуктов насекомых, а также разработанные на сегодняшний день подходы к их решению. Особенности процедур криоконсервирования эмбрионов и сперматозоидов насекомых обсуждаются в сравнительном аспекте с методами криоконсервирования репродуктивных продуктов других видов. Представлена краткая характеристика видов, на которых рассмотрены протоколы криоконсервирования, обосновывающая необходимость долгосрочного хранения их генетического материала. Виды насекомых, для которых приведены разработанные методики низкотемпературного хранения, сгруппированы в обзоре по систематическим таксонам (отрядам). Рассматриваются перспективы дальнейших разработок данного направления.

Ключевые слова: криоконсервирование, насекомые, репродуктивные продукты.

Реферат: Висвітлено основні проблеми криоконсервування репродуктивних продуктів комах, а також розроблені підходи до їх вирішення. Особливості процедур криоконсервування ембріонів і сперматозоїдів комах обговорюються в порівняльному аспекті з методами криоконсервування репродуктивних продуктів інших видів. Представлена коротка характеристика видів, на яких розглянуто протоколи криоконсервування, що обґрунтовує необхідність довгострокового зберігання їх генетичного матеріалу. Види комах, для яких наведені розроблені методики низькотемпературного зберігання, згруповані в огляді по систематичним таксонам (рядам). Розглядаються перспективи подальших розробок даного напрямку.

Ключові слова: криоконсервування, комахи, репродуктивні продукти.

Abstract: The review describes the basic problems of cryopreservation of insect germplasm as well as approaches to their solution, which have been developed to date. The peculiarities of cryopreservation procedures for insect embryos and sperm are discussed in comparison with cryopreservation methods for reproductive products of other species. A brief description of species, for which the cryopreservation protocols are considered, substantiates the need for long-term storage of their genetic material. In the review we categorized the insect species, for which the designed low-temperature storage techniques are presented, in systematic taxa (orders). The prospects for the further development in this area are discussed.

Key words: cryopreservation, insects, reproductive products.

Развитие молекулярной генетики и биологии привело к созданию тысяч новых линий экспериментальных животных, включая насекомых. Можно ожидать, что этот процесс будет только ускоряться, и все уменьшающееся число линий можно будет поддерживать в виде размножающихся популяций. Многие полезные линии животных могут быть утрачены, если не будут созданы банки их репродуктивных продуктов (*germplasm*): эмбрионов и сперматозоидов. В связи с актуальностью проблемы в ряде стран организованы и функционируют низкотемпературные банки репродуктивных продуктов животных. Например, в лаборатории Джексона (г. Бар Харбор, штат Мэн, США) законсервировано около 5500 репродуктивных продуктов уникальных линий мышей [29]. Семь лет назад была основана Международная федерация ресурсов генетического материала мышей, которая объединяет 17 гене-

The progress of molecular genetics and biology was manifested in the creation of thousands of new lines of experimental animals, including insects. This process will likely develop more and more, and only few lines could be maintained as propagating populations. Many valuable lines of animals may be lost, if there would be no banks for germplasm, *i. e.* embryos and sperm. Due to the urgency of the problem, low-temperature banks of animal germplasm are already established and operate in several countries. For example, the Jackson's Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) stocks about 5,500 germplasm specimens of unique mice strains [29]. Seven years ago, the Federation of International Mouse Resources was founded and comprised 17 genetic centres in North America, Europe, Japan and Australia. The main goal of this organization is to ensure the preservation of the mice lines collection using cryopreservation [6]. Omaha Zoo stocks in liquid

Отдел биохимии холодовой адаптации, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Biochemistry of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-87, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: lianaisaakovna@rambler.ru

* To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

Поступила 30.04.2013
Принята в печать 05.07.2013

Received April, 30, 2013
Accepted August, 05, 2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 205–227.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 3. – P. 205–227.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

тических центров в Северной Америке, Европе, Японии и Австралии. Основная цель деятельности этой организации – обеспечить сохранение коллекции линий мышей в виде криоконсервированных ресурсов [6]. В зоопарке Омахи в жидком азоте хранится свыше 20000 образцов спермы и эмбрионов от более 40 видов животных [37]. В Национальном институте сельскохозяйственных исследований Франции существует банк генетического материала рыб и моллюсков [2]. При Департаменте сельского хозяйства США с 2005 по 2011 годы осуществлялись научно-исследовательские проекты «Разработка технологии холодового хранения эмбрионов насекомых, разводимых в массовых количествах и в лабораторных популяциях» («Development of cold storage technology for mass-reared and laboratory-colonized insects») и «Оценка системы массового криоконсервирования эмбрионов насекомых» (Evaluation of a mass-cryopreservation system for insect embryos) по разработке методов долгосрочного хранения генетического материала насекомых для их массового воспроизводства в лабораторных условиях [46, 47]. В Республике Корея при Информационном банке генетических ресурсов успешно осуществлено криоконсервирование материала 321 линии шелкопряда и планируется разработка протоколов хранения не только коммерчески востребованных линий шелкопряда, но и диких шелкопрядов, а также представителей редких видов насекомых [44]. К сожалению, методы криоконсервирования репродуктивных продуктов насекомых не удовлетворяют потребности в сохранении разнообразия их генетического материала. В мире существует около 20000 мутантных линий дрозофил [26], и их содержание в виде размножающихся популяций представляет собой трудоемкий и дорогостоящий процесс. Кроме того, существует вероятность генетического дрейфа, контаминации и т.п., что может привести к потере линий. Криоконсервирование генетического материала *Drosophila* и других насекомых, представляющих интерес для современной биологии, позволило бы сохранить генетическое разнообразие насекомых. При поиске генетических подходов борьбы с вредителями было создано множество линий, содержание которых экономически дорого. Разработка способа долгосрочного хранения репродуктивных продуктов этих линий в криобанках могла бы решить эту проблему.

В таблице приведен перечень видов насекомых, для которых была исследована возможность низкотемпературного хранения и разработаны технологические подходы для некоторых этапов этого процесса.

nitrogen over 20,000 semen and embryos specimens from more than 40 animal species [37]. French National Institute for Agricultural Research has the bank of fish and shellfish germplasm [2]. Since 2005 to 2011 the U.S. Department of Agriculture supported the research projects ‘Development of Cold Storage Technology for Mass-Reared and Laboratory-Colonized Insects’ and ‘Evaluation of a Mass-Cryopreservation System For Insect Embryos’ aimed to develop the methods for long-term storage of insect germplasm for their mass reproduction in laboratory [46, 47]. The Korean Information Bank of Genetic Resources reported successful cryopreservation of germplasm from 321 lines of silkworm and the planned development of storage protocols for not only commercially valuable lines of silkworms, but also for wild silkworms, as well as for representatives of the rare insect species [44]. Unfortunately, the existing methods of insect germplasm cryopreservation do not satisfy the need to preserve their genetic diversity. There are about 20,000 mutant strains of *Drosophila* [26], and their maintenance as a propagating population is time-consuming and costly. Furthermore, there is a possibility of genetic drift, contamination, etc., which may result in the loss of lines. Cryopreservation of germplasm from *Drosophila* and other insects, being valuable for contemporary biology, would allow to preserve the genetic diversity of insects. Seeking the genetic approaches for pest control led to appearance of number of lines, maintenance of which is expensive. Creation of a method for long-term storage of germplasm of these lines in low-temperature banks could solve this problem.

The Table represents the list of species for which the possibility of low temperature storage was investigated and some technological issues of the process developed.

Cryopreservation of *Diptera* germplasm

Cell survival at cryogenic temperatures depends on the ability to avoid the intracellular crystallization and if the saturation of cells with cryoprotectants was accomplished. To achieve these goals, the cells are to be permeable to water and cryoprotectants. *Drosophila* embryos are surrounded by vitelline membrane with a high content of wax [20], which makes it impermeable both for water and cryoprotectants. The process of cryopreservation should primarily include the removal of the barrier compounds. Cryopreservation of *Diptera* embryos could be implemented solely if they became permeable (scheme of the preparation stage is shown in Figure). Permeabilization of *D. melanogaster* embryos includes: 1) dechorionization with 50% solution of domestic bleach Clorox or 2.6% solution of sodium hypochlorite; 2) rinsing in water flow; 3) immersion



Криоконсервирование генетического материала Двукрылых

Выживание клеток при криогенных температурах зависит от возможности избежать внутриклеточной кристаллизации и от насыщения клеток криопротекторами. Для достижения этих целей клетки должны быть проницаемы для воды и криопротекторов. Эмбрионы дрозофил окружены вителлиновой мембраной с высоким содержанием восков [20], что делает их непроницаемыми как для воды, так и для криопротекторов. Процесс криоконсервирования должен, прежде всего, включать удаление этих барьерных соединений. Эмбрионы двукрылых удается криоконсервировать только, если сделать их проницаемыми (схема подготовки приведена на рисунке). Пермеабилзация эмбрионов *D. melanogaster* включает: 1) дехорионизацию в 50%-м растворе хозяйственного отбеливателя «Слогах» или в 2,6%-м растворе гипохлорита натрия; 2) промывание в потоке воды; 3) погружение в изопропанол для удаления большей части внеэмбриональной воды; 4) высушивание на воздухе в течение 2 мин для удаления основного количества изопропанола; 5) 90-секундную экспозицию в *n*-гептане, содержащем 0,3%-й 1-бутанол; 6) 15-секундную экспозицию в чистом *n*-гептане [24, 27]. После пермеабилзации в смеси бутанол-гептан выживает более 80% 12-часовых эмбрионов *D. melanogaster* линии Oregon R-P2 [26].

Для криоконсервирования отбирали эмбрионы дрозофилы не старше 12 ч, так как между 14 и 16 ч развития кутикула становится нечувствительной к обработке бутанол-гептановой смесью, предположительно, из-за появления в ней липидов [1, 30]. Однако позднее было установлено, что при криоконсервировании 15-часовых эмбрионов вылуплялось 30% личинок по сравнению с 12%-й выживаемостью 12-часовых эмбрионов [28], а в работе P.L. Steponkus и S. Caldwell [54] процент вылупления после криоконсервирования 15-часовых эмбрионов составил 49–55% по сравнению с 18% у 12-часовых. Точный контроль времени и температуры развития эмбрионов дрозофилы перед отбором для криоконсервирования позволил достичь средних значений вылупляемости 68%, при этом большая часть (40%) вылупившихся личинок развивалась в фертильных имаго [26], т. е. общая эффективность криоконсервирования (процент фертильных имаго от количества витрифицированных эмбрионов) составила 25%.

По аналогии с криоконсервированием эмбрионов мышей и нематод *Caenorhabditis elegans* можно было предположить, что эмбрионы ранних стадий развития, состоящие из малодифференци-

Виды насекомых, для которых разработаны протоколы низкотемпературного хранения репродуктивных продуктов

Insect species for which the protocols of low temperature storage are developed

Отряд Order	Вид Species	Материал Specimen	Проработанный этап Explored stage
Diptera	<i>Drosophila melanogaster</i>	Эмбрионы Embryos	Полный цикл криоконсервирования Full cycle of cryopreservation
	<i>Musca domestica</i>		
	<i>Lucilia cuprina</i>		
	<i>Lucilia sericata</i>		
	<i>Anastrepha ludens</i>		
	<i>Anastrepha suspensa</i>		
	<i>Ceratitis capitata</i>		
	<i>Cochliomyia hominivorax</i>		
	<i>Cochliomyia macellaria</i>		
	<i>Culicoides sonorensis</i>		
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Этап пермеабилзации Permeabilization stage		
<i>Anopheles gambiae</i>			
Lepidoptera	<i>Bombix mori</i>	Сперматозоиды; яичники и семенники Sperm, ovaries and testes	Полный цикл криоконсервирования Full cycle of cryopreservation
	<i>Galleria mellonella</i>	Эмбрионы Embryos	
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	Сперматозоиды Sperm	
	<i>Athalia rosae</i>		
	<i>Megachile rotundata</i>	Куколки и фарадные имаго Pupae and pharate imago	Гипотермическое хранение Hypothermic storage

into isopropanol to remove bulk of the extra-embryonic water; 4) air drying for 2 minutes to remove bulk of isopropanol; 5) 90-second-long exposure in *n*-heptane supplemented with 0.3% 1-butanol; 6) 15-second-long exposure to pure *n*-heptane [24, 27]. After permeabilization in heptane-butanol more than 80% 12-hour-



рованных клеток, будут лучше переносить процедуру криоконсервирования. Так, эмбрионы мышей обычно замораживают на стадии 8 клеток [50], а эмбрионы нематод – на стадии 558 клеток [50, 57]. В то же время эмбрионы дрозофил ранних стадий развития более уязвимы при криоконсервировании, чем 12- и 13-часовые эмбрионы, несмотря на то, что эмбрион дрозофилы на 13-м часе развития состоит примерно из 50000 клеток [1], которые уже высоко дифференцированы и образуют ткани и органы, включая мышцы и нервы (вылупление личинок дрозофил при 24°C происходит на 21-м часе развития).

Стандартным подходом при криоконсервировании является медленное охлаждение клеток, при котором внутриклеточная вода покидает клетки, и риск внутриклеточной кристаллизации становится минимальным [25]. Myers S.P. и соавт. [35] рассчитали, что для эмбрионов дрозофилы скорость охлаждения должна составлять менее 1 град/мин. Однако для эмбрионов дрозофилы такая скорость охлаждения неприемлема, поскольку они характеризуются чрезвычайно высокой холодочувствительностью. Практически все 12-часовые эмбрионы *D. melanogaster* дикого типа линии Oregon R-P2 гибнут при скорости охлаждения 1 град/мин до -25°C без образования кристаллов льда [30, 34, 36], 3- и 6-часовые эмбрионы гибнут уже при 0°C. Mazur P. и соавт. [30] указали на несколько возможных причин чрезвычайной чувствительности эмбрионов насекомых к охлаждению без кристаллообразования. Во-первых, накопление «ошибочных» продуктов ферментативных реакций в результате того, что взаимозависимые реакции при низких температурах теряют синхронность из-за различных энергий активации для разных реакций. Во-вторых, белки эмбрионов дрозофилы (и других видов) чрезвычайно чувствительны к холодовой денатурации [7]. В третьих, клетки гибнут в результате термоэластического стресса в охлажденных мембранах [31]. Единственным выходом в такой ситуации может быть попытка «обогнать» холодовые повреждения при очень быстром охлаждении со скоростью 20000 град/мин [30]. Наиболее эффективным подходом для достижения таких скоростей оказалось погружение образца в поток жидкого азота [55], так как при простом погружении в жидкий азот кипение вокруг образца приводит к медленной теплопередаче. К сожалению, при обычных концентрациях криопротекторов (1–1,5 М) невозможно избежать летальной внутриклеточной кристаллизации. Следовательно, приходится использовать очень высокие концентрации криопротекторов (≥ 50 вес. %), которые обеспечивают стеклование во время охлаждения и предупреждают рекристал-



Схема основных этапов подготовки эмбрионов насекомых к криоконсервированию (на примере *D. melanogaster*).

Scheme of main stages of insect embryos preparation to cryopreservation (*D. melanogaster* as an example).

old *D. melanogaster* embryos of Oregon R-P2 line survived [26].

Drosophila embryos, intended for cryopreservation, were no older than 12 hours, since the cuticle of 14 to 16 hour-old embryos became insensitive to treatment with a mixture of heptane-butanol, presumably because of appeared lipids [1, 30]. However, it was later found 30% post-thaw larvae hatching in case of 15 hour-old embryos unlike 12% survival in the case of 12-hour-old embryos [28], moreover Steponkus and Caldwell reported the 49–55% post-thaw hatching after cryopreservation of 15-hour-old embryos unlike to 18% for 12 hour-old embryos [54]. Precise control of time and temperature of *Drosophila* embryos development prior to cryopreservation prior allowed to reach average post-thaw hatchability of 68%, herewith the majority



лизацию при отогреве. Наиболее широко для криоконсервирования эмбрионов *D. melanogaster* используется криопротектор этиленгликоль (ЭГ) [26, 55]. Типичный протокол включает инкубацию эмбрионов в растворе 2 М ЭГ в течение 30 мин при комнатной температуре и последующую инкубацию в растворе ЭГ 8,5 М в течение 5 мин при 5°C. В раствор 8,5 М ЭГ часто добавляют 10% (вес/объем) поливинилпирролидона (ПВП) или 6–12% бычьего сывороточного альбумина. Они не способны проникнуть в дехорионизированные эмбрионы, тем более за 5 мин при 5°C. Mazur P. и соавт. [28] предполагают, что защитная функция этих веществ может заключаться в снижении жесткости внеэмбриональной стекловидной массы. Кроме того, они повышают осмолярность внешней среды и способствуют большей дегидратации эмбрионов по сравнению с чистым ПВП. Поскольку криоконсервированию подвергаются эмбрионы с хорошо дифференцированными тканями и органами, они могут иметь компартменты, плохо проницаемые для ЭГ. Авторы связывают гибель эмбрионов при криоконсервировании с рекристаллизацией при отогреве [28]. Для предотвращения рекристаллизации и достижения приемлемых значений выживаемости необходима скорость отогрева порядка 100000 град/мин.

Криоконсервирование репродуктивных продуктов *D. melanogaster* вызывает особый интерес у генетиков и специалистов в области эволюционной биологии, поэтому до использования криоконсервированного материала в экспериментах необходимо убедиться, что оно не является мутагенным фактором. Несмотря на рутинное использование криотехнологий для хранения разнообразных биообъектов, существует очень мало исследований, посвященных количественной оценке частоты мутаций после криоконсервирования. Houle D. и соавт. [12] впервые количественно оценили мутагенное действие криоконсервирования на зародышах многоклеточного организма. Тестирование проводили на эмбрионах линии *D. melanogaster*; несущей рецессивные летали, сцепленные с X-хромосомой. Уровень мутаций у контрольных мух и мух, развившихся из криоконсервированных эмбрионов, достоверно (95%) не отличался.

Эмбрионы домашней мухи *Musca domestica* для криоконсервирования отбирают на тех же стадиях, что и эмбрионы дрозофил. Однако для каждого вида требуется подбор оптимальных условий пермеабиллизации вителлиновой оболочки. Оказалось, что протоколы криоконсервирования эмбрионов *D. melanogaster* не пригодны для эмбрионов других мух. Wang W.B. и соавт. [67] разработали протокол хранения эмбрионов домашней мухи

(40%) of hatched larvae developed into fertile imago [26], *i. e.*, the overall efficiency of cryopreservation (the percentage of fertile imago *vs.* vitrified embryos) was 25%.

Similarly to the cryopreservation of embryos of mice and *Caenorhabditis elegans* nematode it can be assumed that the early embryos, consisting of undifferentiated cells could better tolerate the cryopreservation. For example, the mouse embryos are usually frozen at 8 cell stage [50], and nematode embryos are at 558 cell stage [50, 57]. At the same time the early *Drosophila* embryo are more vulnerable during cryopreservation unlike 12 and 13 hour-old embryos, despite the fact that 13 hour-old *Drosophila* embryo has approximately 50,000 cells [1], which are highly differentiated and form tissues and organs, including muscles and nerves (*Drosophila* larvae hatching at 24°C occurs at the 21st hour of development).

Slow cooling of cells, when intracellular water leaves the cells, and the risk of intracellular crystallization is minimal, is a standard approach for cryopreservation [25]. Myers *et al.* [35] calculated that in case of *Drosophila* embryos the cooling rate should be less than 1 deg/min. However, for *Drosophila* embryos this cooling rate is not acceptable, as they are extremely cold sensitive. Almost all 12-hour-old *D. melanogaster* embryos of wildtype Oregon R-P2 line died after being cooled down to –25°C with rate of 1 deg/min without ice crystals formation [30, 34, 36], 3 and 6 hour-old embryos died already at 0°C. Mazur *et al.* [30] hypothesised several possible causes of the extreme sensitivity of insect embryos to cooling without crystallization. First, this could be the accumulation of ‘erroneous’ products of enzymatic reactions as a result of lost synchronicity of interrelated reactions at low temperatures due to the different activation energies. Second, the proteins in *Drosophila* embryos (and in other species) are highly sensitive to cold denaturation [7]. And the third, the cells die as the result of thermoelastic stress in chilled membranes [31]. The only solution here could be the attempt to ‘outrun’ the cold damages using ultra-rapid cooling rates of 20,000 deg/min [30]. The most effective approach to achieve such rates was an immersion of sample into flowing liquid nitrogen [55], since the simple plunging into it resulted in boiling around the sample and thereby in slower heat transfer. Unfortunately, the conventionally applied concentrations of cryoprotectants (1 to 1.5 M) could not exclude the lethal intracellular crystallization. Therefore, it is necessary to use very high concentrations of cryoprotectants (more than 50% w/w), which could provide the glass transition during cooling and prevent recrystallization during warming. Ethylene glycol (EG) is the most common cryoprotectant used for cryopre-



M. domestica: витрифицирующийся раствор содержал ЭГ, полиэтиленгликоль и трегалозу, стадии охлаждения и отогрева включали этап пребывания эмбрионов в парах жидкого азота. Более 70% эмбрионов *M. domestica* выдерживали процедуры дехорионизации, пермеабализации, нагрузки криопротектором и дегидратации в витрифицирующемся растворе, однако витрификация и отогрев резко снижали их выживаемость. Около 53% эмбрионов *M. domestica* после витрификации и отогрева достигали стадии личинки, и всего лишь 13% эмбрионов, подвергнутых данной процедуре, развивались в фертильных имаго по сравнению с контролем. Потомство F1, полученное от мух, развившихся из криоконсервированных эмбрионов, не отличалось от контроля. Использование изопропанола для пермеабализации резко снижало процент вылупившихся личинок [67]. Электронно-микроскопический анализ показал, что смесь гексан-изопропанол проникает сквозь вителлиновую мембрану и повреждает периферические клетки эмбриона. Тонкослойная хроматография слоя, покрывающего вителлиновую мембрану *M. domestica*, показала, что он не содержит восков [67] в отличие от аналогичного слоя у дрозофил [40]. Наилучшие результаты выживаемости эмбрионов *M. domestica* были получены при их пермеабализации гептаном или гексаном без добавления изопропанола, что, по всей видимости, обусловлено особенностями химического состава липидного слоя вителлиновой оболочки. Витрифицирующийся раствор для эмбрионов *M. domestica* содержал 34% ЭГ, 5,4% полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000–7500) и 15,5% трегалозы [67]. После пермеабализации эмбрионы инкубировались в растворе 1,8 М ЭГ в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем 10 мин в витрифицирующемся растворе на льду. Добавление ПЭГ и трегалозы позволило добиться витрификации при снижении концентрации ЭГ, что снизило токсический эффект ЭГ. Эмбрионы выдерживали в парах азота в течение 1 мин, а затем погружали в поток жидкого азота, что давало неоспоримое преимущество по сравнению с погружением в поток азота без предварительной экспозиции в его парах. При непосредственном погружении в поток азота вителлиновые мембраны эмбрионов *M. domestica* повреждаются, и после отогрева процент вылупления составлял всего лишь 2%. Экспозиция в парах жидкого азота позволяла достичь необходимой скорости охлаждения. При отогреве эмбрионы также выдерживали в парах азота в течение 1 мин, а затем погружали в инкубационную среду при комнатной температуре. Wang W.B. и соавт. [67] считают, что одной из причин столь невысокой

сervation of *D. melanogaster* embryos [26, 55]. A typical protocol involves incubation of embryos in 2 M EG solution for 30 minutes at room temperature and subsequent incubation in a 8.5 M EG solution for 5 minutes at 5°C. Solution of 8.5 M EG is often supplemented with 10% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) or 6–12% bovine serum albumin (BSA). They are not able to penetrate into dechorionized embryos, especially for 5 minutes at 5°C. Mazur *et al.* [28] suggested the protective function of these substances to be consisted in reducing the rigidity of the extraembryonic vitreous mass. Furthermore, they increased the osmolarity of the environment and contributed to greater dehydration of embryos if compared with pure PVP solution. Since the procedure was performed in embryos with well differentiated tissues and organs, they may have compartments poorly permeable to EG. The authors associated the death of embryos with recrystallization during warming [28]. To prevent recrystallization and to achieve an acceptable survival the warming should be provided with rate of about 100,000 deg/min.

Cryopreservation of *D. melanogaster* reproductive products is of particular interest to geneticists and evolutionary biologists, therefore the application of cryopreserved specimens in experiments is possible if proving that cryopreservation is not a mutagenic factor. Despite the routine use of cryogenic technologies for the storage of various biological specimens, there are only few studies on the quantification of the mutation frequency post cryopreservation. Houle *et al.* [12] for the first time quantified the mutagenic effect of cryopreservation on the embryos of a multicellular organism. The investigation was performed in *D. melanogaster* embryos of the line carrying recessive X-linked lethals. Mutation rate in the control flies and those developed from cryopreserved embryos did not significantly differ (95%).

The embryos of housefly *Musca domestica* are selected for cryopreservation at the same stages like *Drosophila* embryos. However, each species require the selection of optimal conditions for permeabilization of the vitelline membrane. It was found that the protocols for cryopreservation of *D. melanogaster* embryos were not suitable for preservation of embryos of other flies. Wang *et al.* [67] developed a protocol for housefly *M. domestica* embryos: vitrifying solution contained EG, polyethylene glycol, trehalose; cooling and warming steps included keeping of embryos in liquid nitrogen vapors. More than 70% of the *M. domestica* embryos survived dechorionization procedures, permeabilization, loading with cryoprotectants and dehydration in vitrifying solution, but vitrification and following warming sharply reduced their survival.



эффективности криоконсервирования эмбрионов домашней мухи может быть размер яиц. Средний размер яйца *D. melanogaster* составляет 150×420 мкм [52], тогда как у *M. domestica* размер яйца гораздо больше – 260×1000 мкм [3].

Падальница *Lucilia cuprina* представляет собой серьезную проблему для овцеводства, поскольку вызывает миаз, зачастую приводящий к гибели животных [53]. Для хранения ее генетического материала был модифицирован протокол, разработанный для криоконсервирования эмбрионов *D. melanogaster* [17]. В экспериментах использовали 6–7-часовые эмбрионы, при этом на стадии 6,5 ч эмбрионы оказались наиболее подходящими, поскольку после их замораживания-оттаивания процент вылупления личинок был наиболее высок – 20,2 ± 3,5%. Данная стадия развития эмбрионов падальницы как раз предшествует инволюции головы и дорсальному закрытию, что соответствует стадии развития эмбрионов *D. melanogaster*, на которой они наиболее устойчивы к факторам криоконсервирования. В 7-часовые эмбрионы плохо проникает криопротектор, о чем свидетельствует характер их сжатия и набухания. Природа повреждений 6,5- и 6,75-часовых эмбрионов не вполне ясна, поскольку многие из них развиваются до стадии вылупления, но неспособны выбраться из вителлиновой оболочки. Наилучший результат (20,2 ± 3,5%) был получен при использовании в качестве криопротектора ЭГ в концентрациях 3,0 М для нагрузочного раствора и 7,5 М – для дегидратирующего. Однако данное вещество оказывает пагубное воздействие на эмбрионы *L. cuprina*, поскольку значительное их количество погибает на этапе дегидратации. Тестирование других криопротекторов положительных результатов не имело. При этом ЭГ не является специфичным только для эмбрионов *L. cuprina*, поскольку он оказался вреден и для других видов двукрылых [16]. При этом уровень выживаемости, достигнутый для *D. melanogaster* (до 50% насекомых, превратившихся в имаго из личинок, вылупившихся из криоконсервированных яиц) [26] не приемлем для *L. cuprina*, поэтому для использования криоконсервирования как надежного способа сохранения линий этого насекомого требуется тестирование других криопротекторов, их смесей и различных добавок к витрифицирующимся растворам для снижения негативных эффектов на этапе дегидратации [17].

Сохранение генетического материала вредителей необходимо для лабораторных исследований и массового воспроизводства мух при реализации программ аутоцидного контроля (программы выпуска стерильных насекомых-вредителей). Де-

About 53% of vitrified-warmed *M. domestica* embryos achieved the larvae stage, and only 13% of the embryos evolved fertile imago if compared with the control. F1 flies that evolved from cryopreserved embryos did not differ from the control. The use of isopropanol for permeabilization sharply reduced the percentage of hatched larvae [67]. Electron microscopic analysis indicated that the hexane-isopropanol mixture penetrated through the vitelline membrane and damaged the peripheral cells of the embryo. Thin layer chromatography assay of the layer covering the vitelline membrane of *M. domestica*, showed that it did not contain waxes [67] unlike the same layer in *Drosophila* [40]. The highest survival of *M. domestica* embryos was obtained after permeabilization with heptane or hexane, without isopropanol added, apparently due to the peculiarities of chemical composition of the vitelline membrane lipid layer. Vitrifying solution for *M. domestica* embryos contained 34% of EG, 5.4% of polyethylene glycol (PEG 6000–7500), and 15.5% of trehalose [67]. After permeabilization the embryos were incubated for 20 min in 1.8 M EG solution at room temperature and then for 10 min on ice in vitrifying solution. Adding of PEG and trehalose allowed to obtain vitrification at lower concentrations of EG, which reduced its negative effect. Embryos were kept in nitrogen vapors for 1 minute, and then plunged into flowing liquid nitrogen, which was more beneficial if compared with immersion into the nitrogen stream without pre-exposure to nitrogen vapor: direct immersion into the flowing liquid nitrogen resulted in injury of *M. domestica* embryo vitelline membrane damaged and post-warming hatching was only 2%. Exposure in liquid nitrogen vapors allowed reaching the necessary cooling rate. During warming the embryos were also kept in nitrogen vapors for 1 minute, and then plunged into incubation medium of room temperature. Wang *et al.* [67] believed that one of the reasons for low efficiency of the house-fly embryos cryopreservation may be the size of eggs. The average size of the *D. melanogaster* eggs is 150×420 mm [52], whereas the size of the *M. domestica* eggs is much bigger, 260×1000 mm [3].

Sheep blowfly *Lucilia cuprina* is a major problem for sheep breeding because it causes myiasis, often leading to death of the animals [53]. To store its germplasm the protocol developed for the cryopreservation of *D. melanogaster* embryos has been modified [17]. The experiments were conducted in 6–7 hour-old embryos, herewith the embryos at the 6.5 hour stage were most appropriate: post-thaw hatching was the highest among studied cases, 20.2 ± 3.5%. This stage of sheep blowfly embryo development just precedes the involution of the head and dorsal closure, and this corresponds to the stage of *D. melanogaster* embryo



партамент сельского хозяйства США выпускает в неделю 25 млн стерильных мексиканских плодовых мух *Anastrepha ludens* (Loew) (*Diptera: Tephritidae*), которые представляют серьезную угрозу для цитрусовых и других плодовых в Техасе, Калифорнии и Флориде, что позволяет свести к минимуму фумигацию экспортируемых плодов [10]. Исследования на дрозофиле показали, что одним из ключевых моментов успешного криоконсервирования эмбрионов является правильный выбор стадии эмбрионального развития. Поэтому важно установить структурный маркер нужной стадии [42]. В качестве таких маркеров для *A. ludens* были выбраны количество желтка, этап развития ротового аппарата и кишечника, поскольку при использовании морфологии кишечника как единственного маркера были получены неоднозначные результаты. Высокое содержание желтка считалось критическим фактором, влияющим на успех криоконсервирования, при разработке протокола для долгосрочного хранения эмбрионов средиземноморской плодовой мухи *Ceratitidis capitata* [43] (см. ниже). Делипидизация была одним из подходов, позволяющих повысить выживаемость криоконсервированных эмбрионов других видов [14, 22, 63]. Даже яйца, отложенные на протяжении 30 мин, развиваются с разной скоростью вследствие естественной индивидуальной вариативности. Отбор эмбрионов вручную позволил повысить вылупляемость личинок из криоконсервированных эмбрионов до 80%. Прямое погружение эмбрионов *A. ludens* в жидкий азот оказалось менее эффективным, чем погружение после предварительного выдерживания в парах жидкого азота. Длительность хранения в жидком азоте на результаты криоконсервирования не влияла, поскольку вылупляемость личинок из витрифицированных эмбрионов, хранящихся в жидком азоте в течение года, не отличалась от таковой при хранении 15 мин. Наибольшая вылупляемость (при простой синхронизации образцов без отбора эмбрионов вручную) личинок *A. ludens* была достигнута при использовании витрифицирующегося раствора, содержащего 40% ЭГ и 5% ПЭГ8000 ($49,1 \pm 12,2\%$) [42]. Из этих личинок $66,5 \pm 17,8\%$ окукливались, и $89,1 \pm 7,6\%$ куколок превращались в имаго. Таким образом, конечный выход мух из криоконсервированных эмбрионов *A. ludens* составил 29,2%.

Еще один представитель семейства *Tephritidae*, эмбрионы которого удалось криоконсервировать, — это средиземноморская плодовая муха *Ceratitidis capitata*. Она повреждает около 200 видов плодовых растений. К маркерным признакам, служащим для отбора нужной стадии эмбрионального разви-

development, which is namely the most resistant to the factors of cryopreservation. The 7 hour-old embryos are hardly permeable for the cryoprotectant, as was evidenced by the course of their shrinkage and following swelling. The reason of injuries in 6.5 and 6.75 hour-old embryos is not clear, because many of them develop to the stage of hatching, but are unable to get out of the vitelline membrane. The highest survival ($20.2 \pm 3.5\%$) was obtained after using EG as a cryoprotectant in concentrations of 3.0 M for loading solution and 7.5 M for dehydrating one. Nevertheless, this substance has also a detrimental effect on the *L. cuprina* embryos, since a significant number of them do not survive the dehydration step. Screening for other cryoprotectants did not deliver a positive results. In addition the negative action of EG was not specific only for the *L. cuprina* embryos, since it was harmful to other species of *Diptera* too [16]. Moreover the survival rate achieved for *D. melanogaster* (up to 50% of the insects developed to imago from larvae hatched from cryopreserved eggs) [26] is not suitable for *L. cuprina*, so to apply cryopreservation as a reliable way to preserve the lines of this insect the thorough screening for other cryoprotectants is needed, as well as their mixtures and various supplements to cryopreserving solutions to reduce the negative effects at the stage of dehydration [17].

Preservation of the pest germplasm is necessary for laboratory investigations and mass reproduction of flies during implementation of autocide projects (project of sterile pest insects releasing). U.S. Department of Agriculture release 25,000,000 sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (*Diptera: Tephritidae*) each week. These insects seriously threaten citrus and other fruit in Texas, California and Florida, and these measures minimize the need of the fumigation of exported fruits [10]. Studies in *Drosophila* have shown that one of the key points in successful cryopreservation of embryos is choosing the right stage of embryonic development. Therefore it is important to establish the structural marker for appropriate stage [42]. As markers for *A. ludens* the amount of yolk, stages of mouthparts and intestine development were selected, whereas using only intestinal morphology as a marker gave diverse results. The high content of yolk was considered as a critical factor in the success of cryopreservation during development of a protocol for long-term storage of Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* embryos [43] (see below). Delipidization was one of the approaches that increased the survival of cryopreserved embryos of other species [14, 27, 63]. Natural individual variability resulted in different rate of development even in the eggs laid during 30 min. The manual selection of embryos allowed to increase



тия, относятся характерная спиральная форма кишечника и отсутствие желтка [43]. Интересно, что период эмбрионального развития, пригодный для криоконсервирования у *C. capitata*, достигает почти 2 ч [43], в то время как для *M. domestica* такое «окно» составляет лишь 20 мин, а для *Cochliomyia hominivorax* – еще меньше [19, 67]. При этом отсутствие или минимальное количество желтка, по-видимому, является общим признаком пригодности эмбрионов двукрылых для витрификации. Wang W.B. и соавт. [67] в исследованиях на эмбрионах *M. domestica* показали, что увеличение проницаемости вителлиновой оболочки с помощью изопропанола сопровождается резким снижением вылупляемости. Rajamohan A. и соавт. [43] также наблюдали участки некроза в умирающих эмбрионах, когда концентрация изопропанола в гексане превышала 0,5%. Они считают, что наличие некротической ткани является хорошим индикатором уровня токсичности изопропанола на этапе пермебилизации. Витрифицирующийся раствор содержит 40% ЭГ. Добавление 0,5 М трегалозы и 5% ПЭГ существенно на уровень выживаемости криоконсервированных эмбрионов *C. capitata* не влияло. «Закалка» эмбрионов *C. capitata* в парах жидкого азота перед погружением в жидкий азот позволяет достичь более высоких результатов выживаемости, что ранее было показано на других видах двукрылых [42, 67]. Необходимость этапа «закалки» в парах жидкого азота, возможно, определяется размером яиц. Яйца домашней, средиземноморской плодовой и мясной мух в 3,5–13 раз больше, чем яйца дрозофилы и в 7–25 раз больше, чем яйца мокреца [43]. Для малых эмбрионов разломы витрифицирующегося раствора не столь опасны. Риск возникновения разломов во время витрификации можно снизить экспозицией нагруженных криопротектором эмбрионов при более высоких температурах в парах жидкого азота, что было предложено W.F. Rall и T.K. Meyer [41]. Эмбрионы падальницы даже больше, чем эмбрионы мясной мухи. Не исключено, что низкая вылупляемость личинок, полученная при витрификации эмбрионов падальницы [17], объясняется именно отсутствием этапа «закаливания». При наиболее оптимальных режимах пермебилизации, витрификации и последующего восстановления выход имаго из криоконсервированных эмбрионов *C. capitata* составил 35,4% (47,3 ± 0,7% вылупившихся личинок, из которых окуклилось 80,3 ± 7,9%; 92,9 ± 7,96% этих куколок завершили метаморфоз и превратились в имаго) [43].

Протокол криоконсервирования эмбрионов *D. melanogaster* был модифицирован для низкотемпературного хранения эмбрионов эктопарази-

the hatchability of larvae from cryopreserved embryos up to 80%. Direct plunging of *A. ludens* embryos into liquid nitrogen was less effective than the plunging preceded by exposure in liquid nitrogen vapors. Duration of storage in liquid nitrogen did not affect the outcome of cryopreservation, as the hatchability of larvae from the vitrified-warmed embryos stored in liquid nitrogen for a year, did not differ from that after 15 minutes of storage. The highest hatchability (in the case of simple synchronization of specimens without manual embryos selection) of *A. ludens* larvae was achieved using a vitrifying solution containing 40% EG, 5% PEG-8000 (49.1 ± 12.2%) [42]. Pupation was observed in 66.5 ± 17.8% of these larvae, and 89.1 ± 7.6% of these pupae developed to imago. Thus, the final yield of flies from cryopreserved *A. ludens* embryos was 29.2%.

Another member of the family *Tephritidae*, embryos of which were successfully cryopreserved, is the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*, which affects about 200 species of fruit plants. As the markers for selection of the desired stage of embryonic development served characteristic spiral shape of the intestine and the absence of yolk [43]. Of interest is the fact that the term of embryonic development, suitable for cryopreservation for *C. capitata*, reached almost 2 hours [43], while for *M. domestica* the 'gap' was only 20 minutes, and even less for *Cochliomyia hominivorax* [19, 67]. The absence or minimum amount of yolk, apparently, is a common feature of validity for *Diptera* embryos for vitrification. Wang *et al.* [67] showed in research on *M. domestica* embryos that an elevation of the vitelline membrane permeability by means of isopropanol was followed by a sharp decrease in their hatchability. Rajamohan *et al.* [43] also observed necrotic areas in dying embryos when the concentration of isopropanol in hexane solution exceeded 0.5%, and believed that the presence of necrotic tissue is a good indicator of the isopropanol toxicity at the permeabilization step. Vitrification solution contained 40% of EG. Its supplementation with 0.5 M trehalose and 5% PEG did not substantially affect the survival of devitrified *C. capitata* embryos. Hardening of *C. capitata* embryos in liquid nitrogen vapors prior the plunging into liquid nitrogen allowed to achieve higher survival, similarly to the previously shown in other *Diptera* species [42, 67]. The need to hardening in liquid nitrogen vapors is probably determined by the dimensions of eggs. Eggs of domestic fly, Mediterranean fruit fly and blowfly are 3,5 to 13 times bigger than the *Drosophila* eggs and 7 to 25 times bigger than biting midge eggs [43]. For small embryos the fractures in vitrifying solution are not so dangerous. The risk of fractures appearance during



та – мясной мухи *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) [19], вызывающей миаз у людей и животных. Это было первое насекомое, элиминированное благодаря массовому выпуску стерильных особей. На территории Северной и Центральной Америки оно исчезло [68]. Leopold R.A. и Rinehart J.P. [18] предлагают метод криоконсервирования эмбрионов этого вида взять как основу для криоконсервирования эмбрионов насекомых. Для успешного криоконсервирования эмбрионов *C. hominivorax* важно было определить стадии эмбрионального развития, на которых эмбрионы наиболее устойчивы к факторам криоконсервирования. Это стадия, на которой развитие завершено на 75–80%. Пока нет удовлетворительного объяснения, почему именно эта стадия оказалась наиболее устойчивой. Leopold R.A. и Rinehart J.P. [18] предположили, что наличие желтка и/или многочисленные деления клеток могут быть причинами чрезвычайной чувствительности эмбрионов более ранних стадий развития. Кроме того, важно время инкубации в витрифицирующемся растворе, так как его продление всего на 2 мин приводит к гибели насекомых [67]. Это может являться результатом и негативного воздействия ЭГ, и концентрирования внутриклеточных веществ. Первое предположение кажется более обоснованным, поскольку Mazur P. и соавт. [28] показали, что внутриклеточное повышение концентрации этиленгликоля более пагубно влияет на эмбрионы *D. melanogaster*, чем дегидратация. Приблизительно 53% личинок вылупляется из криоконсервированных эмбрионов *C. hominivorax*, из них окукливается 22%, и 75% этих куколок развивается до стадии имаго. Выход имаго из криоконсервированных эмбрионов *C. hominivorax* составлял около 9%, но этого достаточно для воспроизведения колоний различных линий, поскольку потомство мух, развившихся из криоконсервированных эмбрионов количественно не отличается от контрольного уровня.

При криоконсервировании эмбрионов мясной мухи *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), также вызывающей миаз, удалось достичь 63,7% вылупляемости личинок из витрифицированных эмбрионов, однако при витрификации эмбрионов падалицы зеленой *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), вызывающей луцилиоз, вылуплялось только 20,2% личинок [66]. Это еще раз свидетельствует о необходимости отработки каждого этапа криоконсервирования для каждого вида насекомых, несмотря на их принадлежность к одному семейству.

Витрифицирующийся раствор для криоконсервирования эмбрионов карибской плодовой мухи

vitrification can be reduced by exposure of cryoprotectant loaded embryos at higher temperatures in liquid nitrogen vapors, which was proposed by Rall and Meyer [41]. Sheep blowfly embryos are even bigger than the blowfly embryos. It could not be excluded that the low hatchability of larvae obtained from devitrified sheep blowfly embryos [17] resulted from absence of ‘hardening’ stage. The most optimal conditions of permeabilization, vitrification and following reviving the yield of imago from devitrified *C. capitata* embryos was 35,4% ($47,3 \pm 0,7\%$ of hatched larvae, of which $80,3 \pm 7,9\%$ pupated; and $92,9 \pm 7,96\%$ of these pupae completed metamorphosis and transformed to imago) [43].

Cryopreservation protocol for *D. melanogaster* embryo was modified for low temperature storage of embryos of an ectoparasite, blowfly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) [19], causing myiasis in humans and animals. It was the first insect eliminated due to the mass production of sterile individuals. In North and Central America, it was fully eliminated [68]. Leopold and Rinehart [18] proposed the method for cryopreservation of embryos of this species as the basis for the development of cryopreservation methods for embryos of insects. For successful cryopreservation of *C. hominivorax* embryos, it was important to determine the stage of embryonic development in which embryos were the most resistant to the factors of cryopreservation. This was the stage at which the development was completed by 75–80%. There is still no fair explanation, why this step has been the most resistant. Leopold and Rinehart [18] suggested that the presence of yolk and/or multiple cell division may be a cause of the extreme sensitivity of embryo at earlier stages of development. Moreover, the duration of incubation in vitrifying solution was also crucial, since its extension even for 2 minutes caused the death of insects [67]. This may be the result of both adverse effects of EG and concentrating of intracellular solutes as well. The first assumption seemed as more reasonable since Mazur *et al.* [28] have shown that increasing of intracellular concentration of EG caused more detrimental effect on the *D. melanogaster* embryos than dehydration. Approximately 53% of the larvae hatched from devitrified *C. hominivorax* embryos, 22% of them pupated, and 75% of the pupae developed to the imago. The yield of imago from devitrified *C. hominivorax* embryos thus was about 9%, but it was enough to propagate the colonies of different lines, as the offspring of flies developed from devitrified embryos had no quantitative differences from the control level.

Cryopreservation of blowfly *Cochliomyia macellaria* embryos (Diptera: Calliphoridae), also causing



Anastrepha suspensa содержит ЭГ, ПЭГ и трегалозу. Стадии охлаждения и отогрева включают этапы проведения эмбрионов через пары жидкого азота. До 46,5% эмбрионов *A. suspensa* (*Diptera: Tephritidae*) выдерживают витрификацию и развиваются до стадии личинок [66], 29% этих личинок окукливаются, и из куколок вылупляются фертильные имаго.

Еще один вид вредителей, эмбрионы которого удалось криоконсервировать, это мокрец *Culicoides sonorensis* (*Diptera: Ceratopogonidae*). Мокрец *C. sonorensis* является переносчиком вируса африканской катаральной лихорадки и вызывает цератопогонидоз. Яйца *C. sonorensis* устойчивы к процедурам дехорионизации, пермеабилзации и насыщения ЭГ [38]. После этих этапов в среднем 80,3% обработанных эмбрионов развиваются до стадии личинки. Дегидратация в витрифицирующемся растворе снижает жизнеспособность эмбрионов до 42,7%, после замораживания в жидком пропане число эмбрионов, развившихся до стадии личинки, куколки и имаго, составило 40,1, 22,9 и 18,8% соответственно.

В рамках проекта Департамента сельского хозяйства США была создана технология массового криоконсервирования эмбрионов мясной мухи *C. hominivorax*, благодаря которой за один цикл можно законсервировать до 5000 эмбрионов и более [46–48]. Для создания криобанка генетического материала мясной мухи и других двукрылых необходима разработка протокола автоматизированного криоконсервирования. Также был усовершенствован протокол криоконсервирования эмбрионов хлопковой моли *Pectinophora gossypiella* (*Lepidoptera: Gelechiidae*), согласно которому гипохлорит натрия перед удалением хориона можно не использовать или, по крайней мере, снизить его отрицательное влияние добавлением в среду поверхностно-активного вещества Tween 80. Этот подход можно также использовать и для процедуры автоматизированного криоконсервирования эмбрионов двукрылых, например мясной мухи. Кроме того, в 2011 г. был начат проект «Разработка роботизированной системы с высокой пропускной способностью для криоконсервирования эмбрионов насекомых» («Development of a Robotic System for High Through-Put Insect Embryo Cryopreservation») по усовершенствованию роботизированной системы криоконсервирования эмбрионов насекомых, тестирование которой планируется на домашней мухе *M. domestica*, мясной мухе *Cochliomyia macellaria* и зеленой падающей мухе *Lucilia sericata* [45].

Криоконсервирование генетического материала комара *Anopheles gambiae* облегчило бы создание банка линий, неспособных к передаче малярии [21]. Интактные эмбрионы комара приблизительно в 50

myiasis, resulted in 63.7% larvae hatchability of devitrified embryos, nevertheless vitrification of green blowfly *Lucilia sericata* embryos (*Diptera: Calliphoridae*), causing luciliosis, resulted only in 20.2% hatched larvae [66]. This highlights again the need for refining each step of cryopreservation protocol for each species, despite their belonging to the same family.

Vitrifying solution for cryopreservation of Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa* embryos contained EG, PEG and trehalose. The stages of cooling and warming included the exposure of embryos in liquid nitrogen vapors. Up to 46.5% of *A. suspensa* embryos (*Diptera: Tephritidae*) survived vitrification and developed to the larvae stage after devitrification [66], 29% of the larvae pupated, and thereafter fertile imago emerged from the pupae.

Another species of pests, embryos of which were successfully cryopreserved, was midge *Culicoides sonorensis* (*Diptera: Ceratopogonidae*). The biting midges *C. sonorensis* are carriers of the bluetongue virus and cause ceratopogonidosis. Eggs of *C. sonorensis* were resistant to procedures of dechorionisation, permeabilization and saturation with EG [38]. After these steps, 80.3% of treated embryos in average developed to the larvae stage. Dehydration in the vitrifying solution reduced the viability of the embryos down to 42.7%, after vitrification in liquid propane the number of embryos that developed after warming to the stages of larvae, pupae and imago was 40.1, 22.9 and 18.8%, respectively.

Within the frames of the project supported by the U.S. Department of Agriculture the technology of mass cryopreservation of blowfly *C. hominivorax* embryos was developed, which provided preservation of up to 5,000 or more embryos in a single cycle [46–48]. To create low temperature bank for germplasm of blowfly and other *Diptera* it is necessary to develop an automated cryopreservation protocol. The optimization of cryopreservation protocol for cotton moth *Pectinophora gossypiella* embryos (*Lepidoptera: Gelechiidae*) was also performed, according to which it was possible to omit the use of sodium hypochlorite before removing the chorion or at least to reduce its negative effect by supplementation of the medium with Tween 80 surfactant. This approach could also be used for an automated procedure for cryopreservation of *Diptera* embryos, e. g. blowfly. Moreover, a project ‘Development of a Robotic System for High Through-Put Insect Embryo Cryopreservation’ was started in 2011 to improve robotic system intended for cryopreservation of insect embryos, which is planned to test in *M. domestica* fly, *Cochliomyia macellaria* blowfly and green blowfly *Lucilia sericata* [45].

Cryopreservation of germplasm of *Anopheles gambiae* mosquito would facilitate the creation of the



раз более проницаемы для водяных паров, чем эмбрионы дрозофилы. Следовательно, при высушивании на воздухе они могут быть дегидратированы более эффективно, чем эмбрионы дрозофил на аналогичных стадиях развития. Проницаемость для воды дехорионизированных эмбрионов *A. gambiae* многократно превышает данный показатель у эмбрионов *D. melanogaster*. Тем не менее как интактные, так и дехорионизированные эмбрионы комара непроницаемы для ЭГ [64]. Применение протокола пермеабилзации, разработанного для эмбрионов дрозофилы, привело к 100%-й летальности эмбрионов малярийного комара *A. gambiae* [65]. Гибель некоторой части эмбрионов была вызвана воздействием 50%-го раствора отбеливателя, а после погружения в изопропанол погибали все эмбрионы комара. При замене «Clorox» на 10%-й раствор гипохлорита натрия, который также осуществляет дехорионизацию яиц, существенно снижалась токсичность данного этапа. Токсичный этап погружения яиц в изопропанол был заменен их воздушным высушиванием для удаления поверхностной воды. Этот процесс контролировали микроскопически и прекращали, когда эмбрионы начинали сжиматься. Такая модифицированная процедура пермеабилзации позволила достичь 30%-й выживаемости пермеабилзированных эмбрионов *A. gambiae*.

Была также предпринята попытка криоконсервировать личинки первого возраста *A. gambiae* [21], которые состоят на 81% из воды. Высушивание на воздухе удаляет 90% этой воды примерно за 20 мин, однако личинки не способны пережить потерю более 70% воды тела. В то же время предварительная экспозиция личинок в растворе 0,2 М трегалозы позволяла достичь выживаемости на уровне 63% при 75%-й потере воды. При дальнейшем увеличении концентрации трегалозы показатели выживаемости снижались. Аналогичные результаты были получены при применении сахарозы. Механизм, благодаря которому наличие сахаров на внешней поверхности личинок оказывает защитное действие, пока не изучен. Кроме того, отсутствуют сообщения о результатах успешного криоконсервирования каких-либо насекомых на стадии личинок.

Криоконсервирование генетического материала Чешуекрылых

Генетический материал Чешуекрылых также является предметом изучения криобиологов. Существует огромное количество линий тутового шелкопряда *Bombix mori* (*Bombycidae: Lepidoptera*), которые широко используются для экспериментальных целей и при производстве шелка, что делает вопрос о сохранении генетического мате-

rial of the lines incapable of transmitting malaria [21] Intact mosquito embryos were about 50 times more permeable for water vapors than *Drosophila* embryos. Therefore, during drying on air they can be dehydrated more effectively than *Drosophila* embryos at similar development stages. Permeability for water of dechorionized *A. gambiae* embryos was many times higher than that found in *D. melanogaster* embryos. However, both intact and dechorionized mosquito embryos were impermeable for EG [64]. Application of permeabilization protocol developed for *Drosophila* embryos resulted in 100% mortality of mosquito *A. gambiae* embryos [65]. The death of a part of the embryos was due to the influence of 50% solution of bleach and immersion into isopropanol resulted in death of all the mosquito embryos. Replacing of Clorox by 10% solution of sodium hypochlorite, also providing dechorionization of eggs, substantially reduced the toxicity of this stage. Toxic stage of plunging the eggs into isopropanol solution was replaced by air drying to remove surface water. This process was monitored microscopically and ceased when the embryo started to shrink. Such modified procedure of permeabilization allowed to get 30% survival rate of permeabilized *A. gambiae* embryos.

There was also an attempt to cryopreserve the first instar larvae of *A. gambiae* [21], consisting of 81% water. Air drying allowed removing 90% of this water for about 20 minutes, but the larvae were not able to survive the loss of more than 70% of body water. At the same time, pre-exposure of larvae in 0.2 M trehalose solution allowed to reach 63% survival at 75% water loss. Further increase in the trehalose concentration led to a decrease of survival rates. Similar results were obtained in case of using sucrose. There was no mechanism found, which underlie the protective effect of presence of sugars on the outer surface of the larvae. Moreover, there were no reports about successful cryopreservation of any insects in the larval stage.

Cryopreservation of *Lepidoptera* germplasm

The germplasm of *Lepidoptera* is also of interest for cryobiologists. There is a huge number of silkworm *Bombix mori* lines (*Bombycidae: Lepidoptera*), which are widely used for experimental purposes and the production of silk, which makes the issue of the preservation of the germplasm of this species highly relevant. Tamura and Sakate [60] succeeded to freeze sperm of *B. mori*, but after storage in liquid nitrogen they lost their fertility. Since the ovaries of *B. mori* larvae could be successfully transplanted into ovariectomized caterpillars [62], the idea of low-temperature storage of the silkworm gonads appeared. Imago ovarian discs were isolated from 5th instar larvae



риала этого вида особенно актуальным. Tamura T. и Sakate S. [60] сообщили об удачном криоконсервировании сперматозоидов *B. mori*, однако после хранения в жидком азоте они утрачивали фертильность. Поскольку яичники личинок *B. mori* могут быть успешно трансплантированы гусеницам, подвергнутым овариэктомии [62], возникла идея низкотемпературного хранения гонад тутового шелкопряда. Овариальные имагиальные диски извлекали из гусениц 5 возраста и выдерживали в растворах глицерина различных концентраций, после чего охлаждали со скоростью 1 град/мин до -35°C и хранили в жидком азоте в течение, как минимум, 2 суток, а затем оттаивали со скоростью 500 град/мин [15]. Деконсервированные яичники трансплантировали личинкам *B. mori* 5 возраста. Более 20% яичников развивались нормально и продуцировали зрелые яйца. После партеногенетической активации в этих яйцах начинался эмбриогенез. В зависимости от линии реципиента вылупляемость составляла около 10 или 50%. Вылупившиеся личинки, как и контрольные особи, завершили постэмбриональное развитие. Shinbo H. [51] использовал подобный протокол для криоконсервирования яичников и семенников *B. mori*. Гонады инкубировали в серии растворов с повышающимися концентрациями глицерина (0,5, 1 и 1,5 М), затем охлаждали со скоростью 1 град/мин до -7°C , выдерживали при данной температуре в течение 10 мин, медленно охлаждали до -35°C и погружали в жидкий азот. Оттаивание гонад происходило при 37°C . Деконсервированные гонады трансплантировали предварительно стерилизованным личинкам такого же возраста, что и доноры. После вылупления имаго самки и самцы спаривались с нормальными самцами и самками. В экспериментах были использованы личинки 3, 4 и 5 возрастов. До 33,3 и 7,3% самок, которым были пересажены криоконсервированные яичники на стадии личинок 4 и 5 возрастов соответственно, отложили оплодотворенные яйца. Mochida Y. и соавт. [32, 33] сообщили о разработке надежного метода долговременного хранения яичников *B. mori*. Яичники извлекали из гусениц 3, 4 и 5 возрастов и инкубировали в среде Грейса, содержащей 1,5 М ДМСО, при комнатной температуре в течение 10 мин. В криопробирки объемом 1,2 мл помещали 120–150 яичников в виде суспензии в витрифицирующейся среде, охлаждали их в парах жидкого азота в течение 30 мин и погружали в жидкий азот. Непосредственно после оттаивания на водяной бане при 37°C яичники инкубировали в растворах ДМСО понижающихся концентраций (1,0, 0,5 и 0 М) в течение 10 мин при комнатной температуре. Деконсервированные яичники транспланти-

and exposed in glycerol solutions of various concentrations, cooled thereafter with rate of 1 deg/min down to -35°C and stored in liquid nitrogen for at least 2 days and then thawed at a rate of 500 deg/min [15]. Post-thaw ovaries were transplanted into *B. mori* larvae of 5th instar. More than 20% of ovaries normally developed and produced mature eggs. After parthenogenetic activation, embryogenesis began in these eggs. Depending on the recipient line hatchability varied from 10 to 50%. Hatched larvae completed post-embryonic development like the control individuals. Shinbo [51] used a similar protocol to cryopreserve *B. mori* ovaries and testes. The gonads were incubated in a series of solutions with increasing concentrations of glycerol (0.5, 1 and 1.5 M), then cooled with a rate of 1 deg/min down to -7°C , kept at this temperature for 10 min, then slowly cooled down to -35°C and plunged into liquid nitrogen. Thawing of the gonads occurred at 37°C . Post-thaw gonads were transplanted in preliminarily sterilized larvae of the same age as the donor individuals. After hatching of imago the males and females were mated with normal males and females. The experiments were conducted in larvae of 3rd, 4th and 5th instars. Up to 33.3 and up to 7.3% of the females, which underwent transplantation of cryopreserved ovaries from 4th and 5th instar larvae, respectively, produced fertilized eggs. Mochida *et al.* [32, 33] reported the development of a reliable method of long-term storage of *B. mori* ovaries. Ovaries were isolated from the caterpillars of 3rd, 4th and 5th instars and incubated in Grace's medium supplemented with 1.5 M DMSO, at room temperature for 10 min. Cryovials of 1.2 ml were filled with 120–150 ovaries suspended in the cryopreservation medium, cooled in liquid nitrogen vapors for 30 minutes and plunged into liquid nitrogen. Immediately after thawing in a water bath at 37°C the ovaries were incubated in DMSO solutions of reducing concentrations (1.0, 0.5 and 0 M) for 10 min at room temperature. Post-thaw ovaries were transplanted into surgically sterilized caterpillar females of different ontogenic stages. It was found that the highest percentage of female recipients capable of oviposition, was achieved if larvae of 3rd instar were used as ovaries donors and recipients as well (22.1%). After natural mating the recipient butterflies produced fertilized eggs. The results of cryopreservation of testes were less successful [51]. Only in one case the oviposition was achieved in 9.1% of females mated with the males which were transplanted with cryopreserved testes of 3rd instar larvae (the testes were frozen in a medium contained 1.5 M glycerol, in 0.5 ml plastic straws, cooling rate was 1 deg/min in range from 0 down to -7°C , then 10 min exposure at -7°C , and thereafter the cooling rate was 0.3 deg/min from -7 down to -35°C , followed by immersion in



ровали стерилизованным хирургическим путем гусеницам-самкам на разных стадиях онтогенеза. Было установлено, что наиболее высокий процент самок-реципиентов, способных отложить яйца, был получен при использовании гусениц 3 возраста в качестве как доноров яичников, так и реципиентов (22,1%). После естественного спаривания бабочки-реципиенты откладывали оплодотворенные яйца. Результаты криоконсервирования семенников оказались менее успешными [51]. Только в одном варианте удалось достичь того, чтобы 9,1% самок, спарившихся с самцами, которым были пересажены криоконсервированные семенники на стадии личинок 3 возраста, отложили оплодотворенные яйца (семенники замораживали в среде, содержащей 1,5 М глицерина в пластиковых соломинках объемом 0,5 мл; скорость охлаждения составляла 1 град/мин от 0 до -7°C , экспозиция в течение 10 мин при -7°C , скорость охлаждения 0,3 град/мин от -7 до -35°C , затем образцы погружали в жидкий азот). В результате экспериментов с криоконсервированием семенников, полученных от личинок других возрастов, и варьированием скоростей охлаждения на этапе от -7 до -35°C ожидаемого увеличения количества отложенных оплодотворенных яиц получено не было. Возможно, в будущем удастся добиться лучших результатов путем подбора криоконсервирующих растворов и режимов замораживания-оттаивания.

Имеются сообщения о криоконсервировании сперматозоидов тутового шелкопряда. Самки *B. mori*, которых искусственно оплодотворили сперматозоидами, хранившимися при -196°C в течение 356 суток, были способны откладывать яйца, при этом показатель оплодотворяемости и число отложенных яиц практически не отличались от показателей нормально спаривавшихся бабочек [58]. В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО в среде Грейса, который добавляли к равному объему спермы. Затем сперму замораживали в соломинках объемом 0,25 мл. Для достижения высокой оплодотворяющей способности спермиев оптимальная скорость охлаждения должна быть в пределах 5–65 град/мин. Авторы считают, что простой и надежный способ криоконсервирования следующий: контейнеры со спермой помещают в морозильную камеру (-80°C) на 10 мин, затем переносят в жидкий азот. Когда самки бабочек мутантной линии с белым цветом яиц (рецессивная мутация «white 2») оплодотворяли смесью деконсервированной спермы от самцов с геном окраски яиц дикого типа (яйца бабочек дикого типа темно-коричневые) и незамороженной спермы от самцов, несущих аллель «w-2», бабочки откладывали в основном белые яйца и лишь очень небольшое количество

жидкий азот). As a result of experiments with cryopreservation of testes obtained from larvae of other ages and varying cooling rates within the range of -7 to -35°C the expected increase in the number of fertilized eggs were not achieved. Maybe, future success could be achieved by choosing proper cryopreservation solutions and freeze-thawing regimes.

There are the reports about cryopreservation of silk-worm sperm. *B. mori* females artificially inseminated with sperm stored at -196°C for 356 days were able to oviposit, and the fertility rate and the number of eggs laid was almost the same as in normally mated butterflies [58]. As a cryoprotectant in the studies served 10% DMSO solution in Grace's medium, which was added to an equal volume of semen. Then the sperm was frozen in 0.25 ml straws. To achieve a high post-thaw fertilizing ability of sperm the optimal cooling rate was reported to be within 5–65 deg/min. The authors proposed a simple and reliable method for cryopreservation: containers with sperm were placed into a freezer (-80°C) for 10 minutes, then transferred to liquid nitrogen. When butterfly females of mutant line with white colored eggs (recessive mutation 'white 2') were fertilized with a mixture of frozen-thawed sperm from males with the gene of wild-type colored eggs (eggs of wild-type butterflies are dark brown) and non-frozen-thawed sperm from males carrying the allele 'w-2', butterflies produced mostly white and only a very small amount of dark brown eggs. These results suggest that there was a competition between the sperm during fertilization and that cooling down to -196°C significantly reduced the fertilizing ability of sperm.

Some species of *Lepidoptera* constantly form apyrene spermatozoa (sperm cells lacking nuclei), and the process of fertilization in *B. mori* requires the presence of apyrene and eupyrene (with normal haploid set of chromosomes) of sperm. It was found that eupyrenous sperm tolerate cryopreservation procedure better than apyrenous [59]. The silkworm female artificially fertilized with cryopreserved sperm showed the fertility rate ranged from 0 to 76.9%, depending on the line. Adding fresh semen from triploid males (infertile, but with apyrene spermatozoa in the semen) significantly increased the fertilizing ability of cryopreserved sperm of normal diploid males. Frozen-thawed apyrene sperm from triploid males also increased the fertility of females, fertilized with cryopreserved sperm of normal males, but to a lesser extent compared with fresh sperm of triploid males. Takemura *et al.* [59] recommend to add apyrene sperm of triploid donors as an auxiliary agent for cryopreserved semen during artificial insemination, which can contribute in turning cryopreservation into a routine technology for genetic conservation of the silkworm.



темно-коричневых. Эти результаты свидетельствуют о том, что существует конкуренция между спермиями при оплодотворении и что замораживание до -196°C значительно снижает оплодотворяющую способность спермиев.

У некоторых видов чешуекрылых постоянно образуются апиренные спермии (спермии, лишенные ядра), причем процесс оплодотворения у *B. mori* требует присутствия и апиренных и эупиренных (имеющих нормальный гаплоидный набор хромосом) спермиев. Было установлено, что эупиренные спермии переносят процедуру криоконсервирования лучше, чем апиренные [59]. Самок шелкопряда искусственно оплодотворяли криоконсервированными сперматозоидами, и фертильность оплодотворенных самок составляла от 0 до 76,9% в зависимости от линии. Добавление свежей спермы от триплоидных самцов, которые являются бесплодными и сперма которых содержит интактные апиренные сперматозоиды, значительно увеличивало оплодотворяющую способность криоконсервированных сперматозоидов нормальных диплоидных самцов. Замороженная апиренная сперма триплоидных самцов также повышала плодовитость самок, оплодотворенных криоконсервированной спермой нормальных самцов, однако в меньшей степени по сравнению со свежей спермой триплоидных самцов. Taketura Y. и соавт. [59] рекомендуют добавлять апиренную сперму триплоидных доноров как вспомогательный агент к криоконсервированной сперме при искусственном оплодотворении, что может способствовать превращению криоконсервирования в рутинную технологию сохранения генетических ресурсов тутового шелкопряда

Mochida Y. и соавт. [32] также исследовали возможность криоконсервирования спермы тутового шелкопряда. Деконсервированной спермой искусственно оплодотворяли самок, развившихся из яиц, отложенных самками-реципиентами деконсервированных яичников в наиболее оптимальном варианте эксперимента. Только небольшое количество оплодотворенных бабочек откладывало яйца (8–10,3%) по сравнению с контролем (100%). Кроме того, фертильность яиц экспериментальных самок была гораздо ниже, чем контрольных: 40,3–88 и 97,5% соответственно. В следующей серии экспериментов яйца хирургически извлекали из ovarioles самок-реципиентов *B. mori* после трансплантации деконсервированных яичников и подвергали партеногенетической активации с последующим искусственным вылуллением. Всех полученных таким образом бабочек-самок спаривали естественным путем либо искусственно оплодотворяли деконсервированной спермой, что давало высокий выход нормального потомства в обоих случаях.

Mochida *et al.* [32] also investigated the possibility of cryopreservation of silkworm sperm. Frozen-thawed sperm was used in artificial insemination of females developed from eggs produced by the females, that were the recipients of frozen-thawed ovaries in the most optimal variant of the experiment. Only a small number of fertilized butterflies produced eggs (8–0.3%) if compared to the control (100%). Furthermore, fertility of eggs from experimental female was much lower than that of the control ones: 40.3–88 and 97.5%, respectively. In the next series of experiments the eggs were surgically excised from ovarioles of *B. mori* recipient female after transplantation of frozen-thawed ovaries and were subjected to parthenogenetic activation followed by an artificial hatching. All obtained in such a way butterfly females were mated naturally or inseminated artificially with frozen-thawed sperm, giving a high yield of normal offspring in both cases.

Cosi *et al.* [5] tested various protocols of dechorionization and permeabilization of wax moth *Galleria mellonella* eggs (*Lepidoptera: Pyralidae*), damaging the wax honeycomb, honey brood stocks, bee-bread, frames and heat insulation of beehives. The study was performed in early (24 h after oviposition) and late (72 h after oviposition) embryos. *Lepidopteran* eggs unlike eggs of *Diptera* are surrounded by outer protective layers, that require a new approach for their dechorionization and permeabilization. After permeabilization with heptane *G. mellonella* hatchability was low: 0.1–4.2% in the early embryos and 4.3–11.2% in late ones. Replacement of heptane with a surfactant allowed to achieve better results. Exposure of eggs in 1.25% solution of NaOCl, containing 0,08% Tween 80 for 2 minutes, altered the permeability of egg envelope, like did the 10 second-long exposure in heptane, according to the rate of eggs shrinkage, but the hatchability level was thereafter significantly higher: 68.2 ± 1.5 and $22.4 \pm 3.7\%$ for early and late embryos, respectively.

One day old eggs of *G. mellonella*, dechorionized in sodium hypochlorite aqueous solution supplemented with Tween 80, were rapidly cooled by immersion into liquid nitrogen and stored at -140°C for 48 hours [49]. After the storage the survival rate was $0,6 \pm 0,2\%$. 92.9% of the larvae hatched from cryopreserved eggs underwent metamorphosis and turned into fertile imago. Hatchability in the F1 and F2 generations was above 90%. Roversi *et al.* [49] succeeded to create a colony of the descendants of butterflies hatched from cryopreserved eggs.

The attempt to cryopreserve late (45–48 hour-old) cutworm *Spodoptera exigua* embryos (*Lepidoptera: Noctuidae*), being a pest of many agricultural and wild plants, was not successful [23]. Ethylene glycol was the least toxic to cutworm embryos compared with



Cosi E. и соавт. [5] протестировали различные протоколы дехорионизации и пермеабилзации яиц восковой огневки *Galleria mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*), повреждающей восковые соты, расплод, запасы мёда, пергу, рамки и утеплительный материал ульев. В работе были использованы ранние (24 ч после откладки яиц) и поздние (72 ч после откладки яиц) эмбрионы. Яйца чешуекрылых, в отличие от яиц двукрылых, окружены наружными защитными слоями, что требует подбора новых подходов к их дехорионизации и пермеабилзации. После пермеабилзации гептаном вылупляемость *G. mellonella* была низкой: 0,1–4,2% у ранних эмбрионов и 4,3–11,2% у поздних. Замена гептана поверхностно-активным веществом позволила добиться лучших результатов. Экспозиция яиц в 1,25%-м растворе NaOCl, содержащем 0,08% Tween 80, в течение 2 мин изменяла проницаемость оболочек яйца, как и 10-секундная экспозиция в гептане, судя по степени сжатия яиц, но уровень вылупляемости после нее был достоверно выше: $68,2 \pm 1,5$ и $22,4 \pm 3,7\%$ для ранних и поздних эмбрионов соответственно.

Однодневные яйца *G. mellonella*, дехорионизированные в водном растворе гипохлорита натрия и Tween 80, быстро охлаждались погружением в жидкий азот и хранили при -140°C в течение 48 ч [49]. После хранения выживаемость составила $0,6 \pm 0,2\%$. Из тех личинок, которые вылупились из криоконсервированных яиц, 92,9% прошли метаморфоз и превратились в фертильных имаго. Вылупляемость в поколениях F1 и F2 была выше 90%. Roversi P.F. и соавт. [49] удалось создать колонию из потомков бабочек, вылупившихся из криоконсервированных яиц.

Попытка криоконсервировать поздние (45–48-часовые) эмбрионы совки наземной малой *Spodoptera exigua* (*Lepidoptera: Noctuidae*), которая является вредителем многих сельскохозяйственных и дикорастущих растений, не увенчалась успехом [23]. Этиленгликоль оказался наименее токсичен для эмбрионов совки по сравнению с другими протестированными криопротекторами (метанолом, 1,3-пропандиолом, глицерином, 2-амино-1-этано-лом, 3-амино-1-пропанолом и 3-метокси-1,2-пропандиолом), однако личинки, вылупившиеся из деконсервированных эмбрионов, были не способны питаться и развиваться далее. Luo L. и соавт. [23] полагают, что это объясняется образованием кристаллов в теле поздних эмбрионов, которые имеют сформированную среднюю кишку.

Криоконсервирование генетического материала Перепончатокрылых

Перепончатокрылые – еще один отряд насекомых, некоторые представители которого являются перспективными объектами для разработки мето-

other tested cryoprotectants (methanol, 1,3-propanediol, glycerol, 2-amino-1-ethanol, 3-amino-1-propanol and 3-methoxy-1,2-propanediol) but the larvae hatched from frozen-thawed embryos were not able to feed and develop. Luo *et al.* [23] believed that this was due to the formation of crystals in the body of the late embryos with developed midgut.

Cryopreservation of Hymenoptera germplasm

Hymenoptera is another order of insects, some members of which are promising for the development of methods for low-temperature storage of their germplasm. The number of bee colonies is reduced due to colony collapse syndrome and defeating by varroa mites. Cryopreservation of honeybee germplasm becomes increasingly important because of the emergence of new pests and diseases that are not treatable with antibiotics. Bee embryos, like other insects are cold sensitive. Collins and Mazur [4] estimated the cold sensitivity of bee embryos of 24 to 62 hours of development after exposure at 0, -6.6 and -15°C and showed that hatchability decreased sharply with decreasing temperature of exposure. The most stable in the conducted experiments were the 48 hour-old embryos.

Using of genetic markers allowed to reveal that honey bee *Apis mellifera* L. sperm (*Hymenoptera*) can produce progeny after storage at -196°C in cryoprotective medium containing DMSO and egg yolk within 2 years [9]. Unlike many studies suggested that the period of storage in liquid nitrogen did not affect the final result, in this report, it has been suggested that the loss of viability may occur between day 4 and 2 years of storage. Nine of queen bees, fertilized by sperm stored during 4 days, produced 22% of worker bees (fertility ranged from 8 to 55%), while eight females, fertilized by sperm stored for 2 years produced 8% of worker bees (range from 1 to 25%). Survival after cryopreservation is usually presented as the mean percentage of survivors. Obviously, that even more important is fraction of samples with survival close to zero. A wide range of survival in this case served as an alert, and meant that there was a factor of cryopreservation being at extremely dangerous level, or that there was an off-design change in the cryopreservation protocol. In addition, the sample with extremely low survival prejudice the quality of the material stored in the repository on the whole.

Taylor *et al.* [61] tested three cryoprotectants (DMSO, dimethyl acetamide and glycerol), six media and five variations of solvent/sperm ratio (1:1, 3:1, 6:1, 9:1 and 12:1) for purpose of enhancing the viability of honey bee *A. mellifera* sperm after freeze-thawing. Exposure in the medium of fresh sperm *per se* decreased spermatozoa motility. Hypotonic antioxidant



дов низкотемпературного хранения их репродуктивных продуктов. Численность пчелиных колоний сокращается вследствие синдрома краха колоний и поражения клещами варроа. Криоконсервирование генетического материала медоносных пчел приобретает большую актуальность из-за появления новых паразитов и болезни, которая не поддается лечению антибиотиками. Эмбрионы пчел, так же как и других насекомых, холодочувствительны. Collins A.M. и Mazur P. [4] оценили холодочувствительность пчелиных эмбрионов между 24 и 62 ч развития после экспозиции при 0, -6,6 и -15°C и показали, что вылупляемость резко снижается с понижением температуры экспозиции. Наиболее устойчивыми в проведенных экспериментах оказались 48-часовые эмбрионы.

При использовании генетических маркеров установлено, что сперматозоиды медоносной пчелы *Apis mellifera* L. (Hymenoptera) могут давать потомство после хранения при -196°C в криозащитной среде, содержащей ДМСО и яичный желток в течение 2 лет [9]. В отличие от многих исследований, свидетельствующих о том, что срок хранения в жидком азоте не влияет на конечный результат, в данной работе было высказано предположение, что потеря жизнеспособности может происходить между 4 сутками и 2 годами хранения. Девять пчелиных маток, оплодотворенных сперматозоидами, хранившимися в течение 4 суток, произвели 22% рабочих пчел (диапазон значений плодовитости 8–55%), в то время как восемь маток, оплодотворенных сперматозоидами, хранившимися в течение 2 лет, произвели 8% рабочих пчел (диапазон 1–25%). Выживание после криоконсервирования обычно представляют как средний процент выживших особей. Очевидно, что даже более важна доля образцов с выживаемостью, близкой к нулевой. Широкий диапазон выживаемости в этом случае является тревожным сигналом и означает, что один из факторов криоконсервирования находится на предельно опасном уровне либо произошло какое-то неучтенное изменение протокола криоконсервирования. Кроме того, выборки с предельно низкой выживаемостью вообще ставят под сомнение качество консервированного в хранилище материала.

Taylor M.A. и соавт. [61] протестировали три криопротектора (ДМСО, диметилацетамид и глицерин), шесть сред и пять вариантов соотношений растворитель/сперма (1:1, 3:1, 6:1, 9:1 и 12:1) с целью повысить жизнеспособность сперматозоидов медоносной пчелы *A. mellifera* после замораживания-оттаивания. Сама по себе обработка средой свежей незамороженной спермы снижала подвижность сперматозоидов. Гипотоническая

medium which contained highly diluted catalase and comprised DMSO allowed to reach the highest sperm viability ($68.3 \pm 5.4\%$). No differences in viability of sperm from different lines of bees were found. Kaftanoglu and Peng [13] reported an artificial insemination of 15 females with sperm frozen-thawed in the presence of 10% DMSO and 3–4 deg/min cooling rate. Area occupied by juveniles obtained from surviving females was $345 \pm 60 \text{ cm}^2$. It should be noted that 47% yield of worker bees obtained from the queen bees fertilized with cryopreserved sperm indicated rather low level of fertilization performed in these conditions. Later, Hopkins and Herr [11] succeeded in achieving better results. Slow freezing under the protection of 10% DMSO and 3 deg/min cooling rate resulted in post-thaw viability of *A. mellifera* sperm of 93%, moreover the post-thaw motility did not differ from that of fresh sperm. This research group proposed an alternative method of freezing honey bee spermatozoa which provided 93.13% viability of the sperm assessed by fluorescent dye staining [56]. Other tested in this study methods of cryopreservation were ranged by the efficiency which was expressed as percentage of viable cells assessed by fluorescent staining and made the following descending row: 1) slow cooling from 5 down to -40°C with rate of 3 deg/min and following plunging into liquid nitrogen, DMSO as cryoprotectants, resulting viability was 78.84%; 2) rapid cooling achieved by plunging of microglass cryostraws into liquid nitrogen accompanied with constant stirring to prevent the formation of vapor layer around straws, glycerol as cryoprotectant, resulting viability made 38.90%; and 3) slow cooling with glycerol as cryoprotectants resulted in 26% post-thaw viability. Since the females fertilized with semen, containing more than 50% of viable sperm, are highly probably to exhibit normal reproduction during the whole season, these results are of importance for beekeepers. Next stage of this research are the field experiments.

Turnip sawfly *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthredinidae) is a dangerous pest of oilseed rape, turnip, cabbage and other cruciferae. Moreover, this insect is an extremely interesting object for research on the genetics of sex, since it is a representative of a unique group of animals for which arrhenotoky (a kind of haploidy when diploid females develop from fertilized eggs and haploid males do from unfertilized eggs) is the normal way of reproduction [39]. Hatakeyama and Sumitani [8] procured sperm from males of transgenic *A. rosae* line, carrying reporter genes of green fluorescent protein (GFP), froze it in liquid nitrogen and stored thereafter at -80°C for a year. Thawed sperm was injected into mature unfertilized eggs isolated excised from the ovaries of wild-type females. Some of the



антиоксидантная среда, содержащая каталазу при сильном разведении в сочетании с ДМСО дала наилучшие результаты жизнеспособности сперматозоидов ($68,3 \pm 5,4\%$). Различий в жизнеспособности сперматозоидов пчел различных линий обнаружено не было. Kaftanoglu O. и Peng Y.S. [13] провели инструментальное оплодотворение 15 маток сперматозоидами, замороженными с 10% ДМСО со скоростью 3–4 град/мин. Площадь молодежи от 13 выживших маток составила $345 \pm 60 \text{ см}^2$. Следует отметить, что 47%-е производство рабочих пчел от пчелиных маток, оплодотворенных криоконсервированными сперматозоидами, указывает на достаточно низкий уровень оплодотворения в данных условиях. Позднее Hopkins В.К. и Herr С. [11] удалось добиться более высоких результатов. При медленном замораживании под защитой 10% ДМСО со скоростью 3 град/мин жизнеспособность сперматозоидов *A. mellifera* достигала 93%, причем их подвижность после замораживания-оттаивания не отличалась от подвижности нативных сперматозоидов. Эта же исследовательская группа [56] предложила альтернативный способ замораживания сперматозоидов пчелы, с помощью которого им удалось достичь 93,13%-й жизнеспособности сперматозоидов по результатам окрашивания флуоресцентными красителями. Другие протестированные в этой работе методы криоконсервирования по своей эффективности, выраженной как доля жизнеспособных клеток при флуоресцентном окрашивании, располагаются в следующем порядке: 1) медленное охлаждение от 5 до -40°C со скоростью 3 град/мин с последующим погружением в жидкий азот и ДМСО в качестве криопротектора, жизнеспособность 78,84%; 2) быстрое охлаждение, достигнутое погружением криосолинонок из микростекла в жидкий азот при постоянном перемешивании для предотвращения образования прослойки пара вокруг соломинок, глицерин как криопротектор, жизнеспособность 38,90%; 3) медленное охлаждение, криопротектор глицерин, жизнеспособность 26%. Поскольку матки, оплодотворенные спермой, содержащей более 50% жизнеспособных сперматозоидов, с высокой вероятностью способны к нормальному воспроизводству в течение сезона, данные результаты имеют большое значение для пчеловодов. Следующим этапом исследований является проведение экспериментов в полевых условиях.

Рапсовый пилильщик *Athalia rosae* (*Hymenoptera: Tenthredinidae*) – опасный вредитель рапса, турнепса, капусты и других растений семейства крестоцветных. Кроме того, это чрезвычайно интересный объект для исследований по генетике пола,

eggs were fertilized and developed into diploid females expressing BFP. Haploid males descended from these females segregate to BFP-positive and for BFP-negative individuals in 1:1 ratio, that indicated heterozygosity of the parental females and preservation of genetic markers for cryopreservation of semen.

Cold could be used not only for the conservation of collections of different genetic lines, but for synchronization of insects development as well. This approach was used for the synchronization of flowering period of alfalfa *Medicago sativa* with the development of its pollinator, alfalfa leafcutter bee *Megachile rotundata* (*Hymenoptera: Megachilidae*) [69]. The development of pupae and pharate imago in late spring was interrupted by short low-temperature storage. Insects of three stages of ontogeny: pupae with pigmented eyes, pupae with the pigmented body and pharate imago, were subjected to exposure at 6, 12 or 18°C for 28 days. The insects of all the studied stages of development collected in April and July survived the storage at 12 and 18°C during 14 days. The temperature of -18°C was the most optimal from the studied ones because the insects continued to develop slowly in these conditions. Storage at 6°C during 14 days significantly reduced the life span period of hatched bees.

Conclusion

It should be recognized that the cryopreservation of insect embryos was accompanied by appearance of much more problems than would be expected if compared to embryos of other taxa representatives. Over the past few years much has been achieved in the development of low-temperature storage methods of the germplasm of the orders *Diptera*, *Lepidoptera* and *Hymenoptera*. However, despite a number of publications in this field of research, the developed protocols are still insufficient to make the process of cryopreservation of insect reproductive cells routine. In addition, there is still a lot of unstudied species, both pests and laboratory research targets, germplasm of which should be stored in a cryopreserved state. Creation of cryobanks of such products would solve many fundamental and applied problems of genetics, bee-keeping, sericulture and other areas. One can expect further improvement of automated cryopreservation of germplasm from the species that are already objects of research in this area, as well as the development of methods of cryopreservation of embryos and sperm from new and promising species and members of other orders. It should be noted that insect embryos nowadays are among the most complex biological objects cryopreservation of which is an accomplished fact. This could be important for cryobiology in general, since the obtained results imply that the multi-cellular



так как является представителем уникальной группы животных, для которых арренотокия (разновидность гаплодиплоидии, когда диплоидные самки развиваются из оплодотворенных яиц, а гаплоидные самцы – из неоплодотворенных яиц) – нормальный способ воспроизводства [39]. Hatakeyama M. и Sumitani M. [8] получили сперматозоиды от самцов трансгенной линии *A. rosae*, несущей репортерные гены белка зеленой флуоресценции (БЗФ), и заморозили их в жидком азоте, после чего хранили при -80°C в течение года. Деконсервированные сперматозоиды вводили в зрелые неоплодотворенные яйца, извлеченные из яичников самок дикого типа. Часть яиц была оплодотворена и развивалась в диплоидных самок, экспрессирующих БЗФ. Гаплоидные самцы от этих самок сегрегировались на БЗФ-положительных и БЗФ-негативных особей в соотношении 1:1, что указывает на гетерозиготность родительских самок и сохранение генетических маркеров при криоконсервировании спермы.

Холод можно использовать не только для сохранения коллекций различных генетических линий, но и для синхронизации развития насекомых. Такой подход использовали для синхронизации цветения люцерны *Medicago sativa* с развитием опылителей пчел-листорезов люцерновых *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) [69]. Развитие кукол и фататных имаго поздней весной прерывали кратковременным низкотемпературным хранением. Насекомые на трех стадиях онтогенеза – куколки с пигментом глаз, куколки с пигментом тела и фататные имаго – были подвергнуты экспозиции при 6, 12 или 18°C в течение 28 суток. Все исследованные стадии развития «апрельских» и «июльских» пчел можно хранить при 12 и 18°C в течение 14 суток без снижения выживаемости. Из всех протестированных температур наиболее оптимальной была 18°C , поскольку в этих условиях насекомые продолжают медленно развиваться. Хранение при 6°C в течение 14 суток существенно снижало продолжительность жизни вылупившихся пчел.

Заключение

Следует признать, что при криоконсервировании эмбрионов насекомых возникло больше проблем, чем можно было ожидать в сравнении с эмбрионами представителей других таксонов. За последние годы были достигнуты значительные результаты в разработке низкотемпературных методов хранения генетического материала отрядов двукрылых, чешуекрылых и перепончатокрылых. Тем не менее, несмотря на множество публикаций в этом направлении исследований, разработанные

differentiated systems *per se* are not an insurmountable obstacle for the development of cryopreservation methods.

References

1. Anderson K.V., Lengyel J.A. Changing rates of DNA and RNA synthesis in *Drosophila* embryos // *Dev. Biol.* – 1981. – Vol. 82, N1. – P.127–138.
2. AQUAGAMETE COST European Cooperation in Science and Technology Fish reproductive biology and biotechnology Fish Physiology and Genomics laboratory Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) [Electronic document] // [website] <http://aquagamete.webs.upv.es/france/> (accessed on 24.04 2013).
3. Cantwell G.E., Nappi A.J., Stoffolano J.G. Embryonic and postembryonic development of the house fly (*Musca domestica* L.) Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, DC. – 1976. – 69 p.
4. Collins A.M., Mazur P. Chill sensitivity of honey bee, *Apis mellifera*, embryos // *Cryobiology.* – 2006. – Vol.53, N1. – P. 22–27.
5. Cosi E., Abidala M.T., Roversi P.F. The effect of Tween80 on eggshell permeabilization in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae) // *Cryo-Letters.* – 2010. – Vol. 31, N4. – P. 291–300.
6. Davisson M. FIMRe: Federation of International Mouse Resources: global networking of resource centers // *Mamm. genome* – 2006. – Vol. 17, N5. – P. 363–364.
7. Gulevsky A.K., Relina L.I. Molecular and genetic aspects of protein cold denaturation // *Cryo-Letters.* – 2013. – Vol. 34, N1. – P. 62–82.
8. Hatakeyama M., Sumitani M. Preservation of a transgenic strain of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) by artificial fertilization using cryopreserved sperm // *Insect Mol. Biol.* – Vol. 14, N1. – P. 105–109.
9. Harbo J.R. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196°C) // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 1983. – Vol. 76, N 5. – P. 890–891.
10. Holler T.C., Davidson J.L., Suarez A., Garsia R. Release of sterile Mexican fruit flies for control of feral populations in the Rio Grande Valley of Texas and Mexico // *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* – 1984. – Vol.37 – P. 113–121.
11. Hopkins B.K., Herr C. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa // *Apidologie.* – 2010. – Vol. 41, Issue 5. –P. 548–556.
12. Houle D., Kondrashov A.S., Yampolsky L.Y. et al. The effect of cryopreservation on the lethal mutation rate in *Drosophila melanogaster* // *Genet. Res.* – 1997. – Vol.69, N 3. – P. 209–213.
13. Kaftanoglu O., Peng Y.S. Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen // *J. Apicult. Res.*– 2012. – Vol. 23, N3. – P. 157–163.
14. Karja N.M., Otoi T., Wongstrikeao P. et al. In vitro development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats // *Theriogenology.* – 2006. – Vol.65, N2. – P. 415–423.
15. Kusuda J., Noguchi T., Onimaru K., Yamashita O. Maturation and hatching of eggs from silkworm ovaries preserved in liquid nitrogen // *J. Insect Physiol.* – 1985. – Vol.31, N12. – P. 963–967.
16. Leopold R.A. Cold storage of insects: using cryopreservation and dormancy as an aid to mass rearing // Area-wide control of insect pests integrating the sterile insect and related nuclear and other techniques. FAO/IAEA International Conference, Penang, Malaysia. 1998. – P. 235–267.
17. Leopold R.A., Atkinson P.W. Cryopreservation of sheep blow fly embryos, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) // *Cryo-Letters.* – 1999. – Vol. 20, N1. – P. 37–44.
18. Leopold R.A., Rinehart J.P. A template for insect cryopreservation // *Low Temperature Biology of Insect* / Ed. by D.L. Denlinger, R.E. Lee. – Cambridge: University Press, 2010. – P. 325–341.



протоколы все же являются недостаточно эффективными для перевода процедуры криоконсервирования репродуктивных клеток насекомых на рутинную основу. Кроме того, остается еще множество неисследованных видов как вредителей, так и объектов лабораторных исследований, репродуктивные продукты которых целесообразно хранить в криоконсервированном виде. Создание криобанков таких продуктов решило бы многие фундаментальные и прикладные проблемы генетики, пчеловодства, шелководства и других областей. Можно ожидать как дальнейшего усовершенствования систем автоматизированного криоконсервирования генетического материала видов, которые уже являются объектами исследований в этой области, так и разработки методов криоконсервирования эмбрионов и сперматозоидов новых перспективных видов и представителей других отрядов. Следует отметить, что эмбрионы насекомых на сегодняшний день являются одними из самых сложных биообъектов, которые удалось криоконсервировать. Данный факт может иметь важное значение для криобиологии в целом, так как из полученных результатов следует, что многоклеточные дифференцированные системы *per se* не являются непреодолимым препятствием для разработки методов криоконсервирования.

Литература

- Anderson K.V., Lengyel J.A. Changing rates of DNA and RNA synthesis in *Drosophila* embryos // *Dev. Biol.* – 1981. – Vol. 82, №1. – P.127–138.
- AQUAGAMETE COST European Cooperation in Science and Technology Fish reproductive biology and biotechnology Fish Physiology and Genomics laboratory Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) [Электронный документ] // [веб-сайт] <http://aquagamete.webs.upv.es/france/> (24.04 2013).
- Cantwell G.E., Nappi A.J., Stoffolano J.G. Embryonic and postembryonic development of the house fly (*Musca domestica* L.) Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, DC. – 1976. – 69 p.
- Collins A.M., Mazur P. Chill sensitivity of honey bee, *Apis mellifera*, embryos // *Cryobiology.* – 2006. – Vol.53, №1. – P. 22–27.
- Cosi E., Abidala M.T., Roversi P.F. The effect of Tween№80 on eggshell permeabilization in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae) // *CryoLetters.* – 2010. – Vol. 31, №4. – P. 291–300.
- Davison M. FIMRe: Federation of International Mouse Resources: global networking of resource centers // *Mamm. genome* – 2006. – Vol. 17, №5. – P. 363–364.
- Gulevsky A.K., Relina L.I. Molecular and genetic aspects of protein cold denaturation // *CryoLetters.* – 2013. – Vol. 34, №1. – P. 62–82.
- Hatakeyama M., Sumitani M. Preservation of a transgenic strain of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) by artificial fertilization using cryopreserved sperm // *Insect Mol. Biol.* – Vol. 14, №1. – P. 105–109.
- Harbo J.R. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (–196°C) // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 1983. – Vol. 76, N 5. – P. 890–891.
- Leopold R.A., Wang W.B., Berkebile D.R., Freeman T.P. Cryopreservation of embryos of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) // *Ann. Entomol. Soc. Amer.* – 2001. – Vol. 94, N5. – P. 695–701.
- Limbourg B., Zalokar M. Permeabilization of *Drosophila* eggs // *Dev. Biol.* – 1973. – Vol. 35, N2. – P. 382–377.
- Liu X.H., Mazur P. Effects of sugars on the kinetics of drying and on the survival of partially dehydrated larvae of *Anopheles* mosquitoes // *J. Insect Physiol.* – 2003. – Vol. 49, N7. – P. 685–695.
- Liu X.H., Zhang T., Rawson T.M. Effect of cooling rate and partial removing of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos // *Theriogenology.* – 2001. – Vol.55, N8. – P. 1719–1731.
- Luo L., Pang Y., Chen Q., Li G. Cryopreservation of the late stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) // *Cryo-Letters.* – 2006. – Vol.27, N6. – P. 341–352.
- Lynch D.V., Lin T.T., Myers S.P. et al. A two-step method for permeabilization of *Drosophila* eggs // *Cryobiology.* – 1989. – Vol. 26, N5. – P. 445–452.
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell Biophys.* – 1990. – Vol. 17, N1. – P. 53–92.
- Mazur P., Cole K.W., Hall J.W. et al. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos // *Science.* – 1992. – Vol. 258, N5090. – P. 1932–1935.
- Mazur P., Cole K.W., Mahowald A.P. Critical factors affecting the permeabilization of *Drosophila* embryos by alkanes // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, N2. – P.210–239.
- Mazur P., Cole K.W., Schreuders P.D., Mahowald A.P. Contributions of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of *Drosophila* embryos cooled to –205°C // *Cryobiology.* – 1993. – Vol. 30, N1. – P. 45–73.
- Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E.Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: Importance, impact, status and future directions // *Biol. Reprod.* – 2008. – Vol. 78, N1. – P.1–12.
- Mazur P., Schneider U., Mahowald A.P. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, N1. – P. 39–68.
- McGrath J.J. Cold shock: thermoelastic stress in chilled biological membranes // *Network thermodynamics, heat and mass transfer in biotechnology* / Ed. by K.R. Diller. – New York: American Society of Mechanical Engineers, 1987. – P. 57–66.
- Mochida Y., Takemura Y., Kanda T., Horie Y. Fertilized eggs obtained from transplantation of frozen ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen semen of the silkworm, *Bombyx mori* // *Cryobiology.* – 2003. – Vol. 46, N2. – P. 153–160.
- Mochida Y., Takemura Y., Ohnuma A. et al. Fertilization of eggs developed from the cryopreserved and transplanted ovaries by artificial insemination with cryopreserved semen in the silkworm, *Bombyx mori* // *J. Insect Biotechnol. Sericol.* – 2007. – Vol. 76, N2. – P. 97–100.
- Myers S.P., Lynch D.V., Knipple D.C. et al. Low-temperature sensitivity of *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology.* – 1988. – Vol.25, N6 – P. 544–545.
- Myers S.P., Pitt R.E., Lynch D.V., Steponkus P.L. Characterization of intracellular ice formation in *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology.* – 1989. – Vol. 26, N5. – P. 472–484.
- Myers S.P., Steponkus P.L. Subzero chilling sensitivity of *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology.* – 1990. – Vol. 27, N6. – P. 651–652.
- National Project Reproductive Cryobank (Omaha's Henry Doorly Zoo & Aquarium) [Electronic document] // [web-site] <http://www.omahazoo.com/conservation/reproductive-sciences/national-projects/reproductive-cryobank> (accessed on 24.04 2013).
- Nunamaker R.A., Lockwood J.A. Cryopreservation of embryos of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) // *J. Med. Entomol.* – 2001. – Vol. 38, N1. – P. 55–58.
- Oishi K., Sawa M., Hatakeyama M., Kageyama Y. Genetics and biology of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) // *Genetica.* – 1993. – Vol. 88, N2–3. – P.119–127.



10. Holler T.C., Davidson J.L., Suarez A., Garsia R. Release of sterile Mexican fruit flies for control of feral populations in the Rio Grande Valley of Texas and Mexico // *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* – 1984. – Vol.37 – P. 113–121.
11. Hopkins B.K., Herr C. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa // *Apidologie.* – 2010. – Vol. 41, Issue 5. – P. 548–556.
12. Houle D., Kondrashov A.S., Yampolsky L.Y. et al. The effect of cryopreservation on the lethal mutation rate in *Drosophila melanogaster* // *Genet. Res.* – 1997. – Vol.69, N 3. – P. 209–213.
13. Kaftanoglu O., Peng Y.S. Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen // *J. Apicult. Res.* – 2012. – Vol. 23, №3. – P. 157–163.
14. Karja N.M., Otoi T., Wongstrikeao P. et al. In vitro development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats // *Theriogenology.* – 2006. – Vol.65, №2. – P. 415–423.
15. Kusuda J., Noguchi T., Onimaru K., Yamashita O. Maturation and hatching of eggs from silkworm ovaries preserved in liquid nitrogen // *J. Insect Physiol.* – 1985. – Vol.31, №12. – P. 963–967.
16. Leopold R.A. Cold storage of insects: using cryopreservation and dormancy as an aid to mass rearing // Area-wide control of insect pests integrating the sterile insect and related nuclear and other techniques. FAO/IAEA International Conference, Penang, Malaysia. – 1998. – P. 235–267.
17. Leopold R.A., Atkinson P.W. Cryopreservation of sheep blow fly embryos, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) // *Cryo-Letters.* – 1999. – Vol. 20, №1. – P. 37–44.
18. Leopold R.A., Rinehart J.P. A template for insect cryopreservation // *Low Temperature Biology of Insect* / Ed. by D.L. Denlinger, R.E. Lee. – Cambridge: University Press, 2010. – P. 325–341.
19. Leopold R.A., Wang W.B., Berkebile D.R., Freeman T.P. Cryopreservation of embryos of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) // *Ann. Entomol. Soc. Amer.* – 2001. – Vol. 94, №5. – P. 695–701.
20. Limbourg B., Zalokar M. Permeabilization of *Drosophila* eggs // *Dev. Biol.* – 1973. – Vol. 35, №2. – P. 382–377.
21. Liu X.H., Mazur P. Effects of sugars on the kinetics of drying and on the survival of partially dehydrated larvae of *Anopheles* mosquitoes // *J. Insect Physiol.* – 2003. – Vol. 49, №7. – P. 685–695.
22. Liu X.H., Zhang T., Rawson T.M. Effect of cooling rate and partial removing of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos // *Theriogenology.* – 2001. – Vol.55, №8. – P. 1719–1731.
23. Luo L., Pang Y., Chen Q., Li G. Cryopreservation of the late stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) // *CryoLetters.* – 2006. – Vol.27, №6. – P. 341–352.
24. Lynch D.V., Lin T.T., Myers S.P. et al. A two-step method for permeabilization of *Drosophila* eggs // *Cryobiology.* – 1989. – Vol. 26, №5. – P. 445–452.
25. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell Biophys.* – 1990. – Vol. 17, №1. – P. 53–92.
26. Mazur P., Cole K.W., Hall J.W. et al. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos // *Science.* – 1992. – Vol. 258, №5090. – P. 1932–1935.
27. Mazur P., Cole K.W., Mahowald A.P. Critical factors affecting the permeabilization of *Drosophila* embryos by alkanes // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, №2. – P.210–239.
28. Mazur P., Cole K.W., Schreuders P.D., Mahowald A.P. Contributions of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of *Drosophila* embryos cooled to –205°C // *Cryobiology.* – 1993. – Vol. 30, №1. – P. 45–73.
29. Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E. Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: Importance, impact, status and future directions // *Biol. Reprod.* – 2008. – Vol. 78, №1. – P.1–12.
30. Mazur P., Schneider U., Mahowald A.P. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, №1. – P. 39–68.
31. McGrath J.J. Cold shock: thermoelastic stress in chilled biological membranes // *Network thermodynamics, heat and mass*
40. Papassideri I., Margaritis L.H., Gulik-Krzywicki T. The eggshell of *Drosophila melanogaster* VI. Structural analysis of the wax layer in laid eggs // *Tissue Cell.* – 1991. – Vol. 23, N4. – P. 567–575.
41. Rall W.F., Meyer T.K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos // *Theriogenology.* – 1989. – Vol. 31, N3. – P.683–692.
42. Rajamohan A., Leopold R.A. Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification stage selection and avoidance of thermal stress // *Cryobiology.* – 2007. – Vol. 54, N1. – P. 44–54.
43. Rajamohan A., Leopold R.A., Wang W.B. et al. Cryopreservation of Mediterranean fruit fly embryos // *Cryo-Letters.* – 2003. – Vol. 24, N2. – P. 125–132.
44. RDA-Genbank Information Center, Republic of Korea (Silkworm breeding lab., Sericulture & Apiculture Division, Department of Sericulture and Entomology) [Electronic document] // [web-site] [<http://www.genbank.go.kr/eng/silkworm/introduction.jsp>] (accessed on 24.04 2013).
45. Research Project: Development of A Robotic System for High Through-Put Insect Embryo Cryopreservation (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research, Project Number: 5442-21220-027-04) [Electronic document] // [web-site] http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?accn_no=421831 (accessed on 09.11 2012).
46. Research Project: Development of Cold Storage Technology for Mass-Reared and Laboratory-Colonized Insects (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research, Project Number: 5442-22000-040-00) [Electronic document] // [web-site] http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?accn_no=409603 (accessed on 09.11 2012).
47. Research Project: Evaluation of a Mass-Cryopreservation System for Insect Embryos (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research, Project Number: 5442-21220-027-02) [Electronic document] // [web-site] http://www.abadrl.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=414373] (accessed on 09.11 2012).
48. Research Project: Insect Cryopreservation, Dormancy, Genetics and Biochemistry (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research Project Number: 5442-21220-027-00) [Electronic document] // [web-site] http://www.larri.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=421077 (accessed on 09.11 2012).
49. Roversi P.F., Cosi E., Irdani T. Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the great wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) // *Cryobiology.* – 2008. – Vol. 56, N1. – P. 1–7.
50. Schierenberg E. Developmental strategies during early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1986. – Vol. 97. – P. 31–44.
51. Shinbo H. Survival of larval ovaries and testes frozen in liquid nitrogen in the silkworm, *Bombyx mori* // *Cryobiology.* – 1989. – Vol. 26, N4. – P.389–396.
52. Sonnenblick B.P. The early embryology of *Drosophila melanogaster* // *Biology of Drosophila* / Ed. by M. Demerec. – New York: Hafner, Wiley and Son, 1965. – P. 62–167.
53. Spradbery J.P. A manual for the diagnosis of screwworm fly. – Canberra: CSIRO Division of Entomology. – 1991. – 19 p.
54. Steponkus P.L., Caldwell S. An optimized procedure for the cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryo-Letters.* – 1993. – Vol.14, N6. – P. 375–380.
55. Steponkus P.L., Myers S.P., Lynch D.V. et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos // *Nature.* – 1990. – Vol. 345, N6271. – P. 170–172.
56. Stucky M., Hopkins B.K., Herr C. Cryopreservation of Honey Bee Spermatozoa // *The 34th Annual IETS conference.* – Denver, Colorado, 2008. – P. 94.
57. Sulston J.E., Schierenberg E., White J.G., Thomson J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Dev. Biol.* – 1983 – Vol.100, N1. – P. 64–119.
58. Takemura Y., Kanda T., Horie Y. Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori* // *J. Insect Physiol.* – 2000. – Vol. 46, N4. – P. 491–497.

- transfer in biotechnology / Ed. by K.R. Diller. – New York: American Society of Mechanical Engineers, 1987. – P. 57–66.
32. Mochida Y., Takemura Y., Kanda T., Horie Y. Fertilized eggs obtained from transplantation of frozen ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen semen of the silkworm, *Bombyx mori* // *Cryobiology*. – 2003. – Vol. 46, №2. – P. 153–160.
 33. Mochida Y., Takemura Y., Ohnuma A. et al. Fertilization of eggs developed from the cryopreserved and transplanted ovaries by artificial insemination with cryopreserved semen in the silkworm, *Bombyx mori* // *J. Insect Biotechnol. Sericol.* – 2007. – Vol. 76, №2. – P. 97–100.
 34. Myers S.P., Lynch D.V., Knipple D.C. et al. Low-temperature sensitivity of *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology*. – 1988. – Vol. 25, №6. – P. 544–545.
 35. Myers S.P., Pitt R.E., Lynch D.V., Steponkus P.L. Characterization of intracellular ice formation in *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology*. – 1989. – Vol. 26, №5. – P. 472–484.
 36. Myers, S.P., Steponkus P.L. Subzero chilling sensitivity of *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology*. – 1990. – Vol. 27, №6. – P. 651–652.
 37. National Project Reproductive Cryobank (Omaha's Henry Doorly Zoo & Aquarium) [Электронный документ] // [веб-сайт] <http://www.omahazoo.com/conservation/reproductive-sciences/national-projects/reproductive-cryobank/> (24.04 2013).
 38. Nunamaker R.A., Lockwood J.A. Cryopreservation of embryos of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) // *J. Med. Entomol.* – 2001. – Vol. 38, №1. – P. 55–58.
 39. Oishi K., Sawa M., Hatakeyama M., Kageyama Y. Genetics and biology of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) // *Genetica*. – 1993. – Vol. 88, №2–3. – P. 119–127.
 40. Papassideri I., Margaritis L.H., Gulik-Krzywicki T. The eggshell of *Drosophila melanogaster* VI. Structural analysis of the wax layer in laid eggs // *Tissue Cell*. – 1991. – Vol. 23, №4. – P. 567–575.
 41. Rall W.F., Meyer T.K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos // *Theriogenology*. – 1989. – Vol. 31, №3. – P. 683–692.
 42. Rajamohan A., Leopold R.A. Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification stage selection and avoidance of thermal stress // *Cryobiology*. – 2007. – Vol. 54, №1. – P. 44–54.
 43. Rajamohan A., Leopold R.A., Wang W.B. et al. Cryopreservation of Mediterranean fruit fly embryos // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, №2. – P. 125–132.
 44. RDA-Genebank Information Center, Republic of Korea (Silkworm breeding lab., Sericulture & Apiculture Division, Department of Sericulture and Entomology) [Electronic document] // [web-site] [<http://www.genebank.go.kr/eng/silkworm/introduction.jsp>] (accessed on 24.04 2013).
 45. Research Project: Development of A Robotic System for High Through-Put Insect Embryo Cryopreservation (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research, Project Number: 5442-21220-027-04) [Электронный документ] // [веб-сайт] http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?accn_no=421831 (09.11 2012).
 46. Research Project: Development of Cold Storage Technology for Mass-Reared and Laboratory-Colonized Insects (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research, Project Number: 5442-22000-040-00) [Электронный документ] // [веб-сайт] http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?accn_no=409603 (09.11 2012).
 47. Research Project: Evaluation of a Mass-Cryopreservation System for Insect Embryos (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research, Project Number: 5442-21220-027-02) [Электронный документ] // [веб-сайт] http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=414373] (09.11 2012).
 48. Research Project: Insect Cryopreservation, Dormancy, Genetics and Biochemistry (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Location: Insect Genetics and Biochemistry Research Project Number: 5442-
 59. Takemura Y., Sahara K., Mochida Y., Ohnuma A. Apyrene sperm from the triploid donors restore fecundity of cryopreserved semen in *Bombyx mori* // *J. Insect Physiol.* – 2006. – Vol. 52, N10. – P. 1021–1026.
 60. Tamura T., Sakate S. Preservation of spermatozoa of the silkworm, *Bombyx mori*, by freezing // *Acta Sericologica*. – 1985. – Vol. 13. – P. 123–128.
 61. Taylor M.A., Guzman-Novoa E., Morfin N., Buhr M.M. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios // *Theriogenology*. – 2009. – Vol. 72, N2. – P. 149–159.
 62. Umeya Y. Morphological study on ovarian transplantation in the silkworm, *Bombyx mori* // *Zool. Magaz. Japan*. – 1933. – Vol. 45, N2. – P. 59–66.
 63. Ushijima H., Yamakawa H., Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer // *Biol. Reprod.* – 1999. – Vol. 60, N2. – P. 534–539.
 64. Valencia M.D., Miller L.H., Mazur P. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila* // *Cryobiology*. – 1996. – Vol. 33, N1. – P. 142–148.
 65. Valencia M.D., Miller L.H., Mazur P. Permeabilization of eggs of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* // *Cryobiology*. – 1996. – Vol. 33, N1. – P. 149–162.
 66. Wang W.B., Leopold R.A., Freeman T.P. Cryopreservation of Dipteran embryos // *Cryobiology*. – 2000. – Vol. 41, N4. – P. 349–350.
 67. Wang W.B., Leopold R.A., Nelson D.R., Freeman T.P. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) embryos // *Cryobiology*. – 2000. – Vol. 41, N2. – P. 153–166.
 68. Wyss J.H. Screwworm eradication in the Americas // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 916. – P. 186–193.
 69. Yocum G.D., Rinehart J.P., West M., Kemp W.P. Interrupted incubation and short-term storage of the alfalfa pollinator *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae): a potential tool for synchronizing bees with bloom // *J. Econ. Entomol.* – 2010. – Vol. 103, N2. – P. 234–241.



- 21220-027-00) [Электронный документ] // [веб-сайт] http://www.larri.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=421077 (09.11.2012).
49. Roversi P.F., Cosi E., Irdani T. Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the great wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) // *Cryobiology*. – 2008. – Vol. 56, №1. – P. 1–7.
 50. Schierenberg E. Developmental strategies during early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1986. – Vol. 97. – P. 31–44.
 51. Shinbo H. Survival of larval ovaries and testes frozen in liquid nitrogen in the silkworm, *Bombyx mori* // *Cryobiology*. – 1989. – Vol. 26, №4. – P.389–396.
 52. Sonnenblick B.P. The early embryology of *Drosophila melanogaster* // *Biology of Drosophila* / Ed. by M. Demerec. – New York: Hafner, Wiley and Son, 1965. – P. 62–167.
 53. Spradbery J.P. A manual for the diagnosis of screwworm fly. – Canberra: CSIRO Division of Entomology. – 1991. – 19 p.
 54. Steponkus P.L., Caldwell S. An optimized procedure for the cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryo-Letters*. – 1993. – Vol.14, №6. – P. 375–380.
 55. Steponkus P.L., Myers S.P., Lynch D.V. et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos // *Nature*. – 1990. – Vol. 345, №6271. – P. 170–172.
 56. Stucky M., Hopkins B.K., Herr C. Cryopreservation of Honey Bee Spermatozoa // The 34th Annual IETS conference. – Denver, Colorado, 2008. – P. 94.
 57. Sulston J.E., Schierenberg E., White J.G., Thomson J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Dev. Biol.* – 1983 – Vol.100, №1. – P. 64–119.
 58. Takemura Y., Kanda T., Horie Y. Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori* // *J. Insect Physiol.* – 2000. – Vol. 46, №4. – P. 491–497.
 59. Takemura Y., Sahara K., Mochida Y., Ohnuma A. Apyrene sperm from the triploid donors restore fecundity of cryopreserved semen in *Bombyx mori* // *J. Insect Physiol.* – 2006. – Vol. 52, №10. – P. 1021–1026.
 60. Tamura T., Sakate S. Preservation of spermatozoa of the silkworm, *Bombyx mori*, by freezing // *Acta Sericologica*. – 1985. – Vol. 13. – P. 123–128.
 61. Taylor M.A., Guzman-Novoa E., Morfin N., Buhr M.M. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios // *Theriogenology*. – 2009. – Vol. 72, №2. – P. 149–159.
 62. Umeya Y. Morphological study on ovarian transplantation in the silkworm, *Bombyx mori* // *Zool. Magaz. Japan*. – 1933. – Vol. 45, №2. – P. 59–66.
 63. Ushijima H., Yamakawa H., Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer // *Biol. Reprod.* – 1999. – Vol.60, №2. – P. 534–539.
 64. Valencia M.D., Miller L.H., Mazur P. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila* // *Cryobiology*. – 1996. – Vol. 33, №1. – P. 142–148.
 65. Valencia M.D., Miller L.H., Mazur P. Permeabilization of eggs of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* // *Cryobiology*. – 1996. – Vol. 33, №1. – P. 149–162.
 66. Wang W.B., Leopold R.A., Freeman T.P. Cryopreservation of Dipteran embryos // *Cryobiology*. – 2000. – Vol. 41, №4. – P. 349–350.
 67. Wang W.B., Leopold R.A., Nelson D.R., Freeman T.P. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) embryos // *Cryobiology*. – 2000. – Vol. 41, №2. – P. 153–166.
 68. Wyss J.H. Screwworm eradication in the Americas // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 916. – P. 186–193.
 69. Yocum G.D., Rinehart J.P., West M., Kemp W.P. Interrupted incubation and short-term storage of the alfalfa pollinator *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae): a potential tool for synchronizing bees with bloom // *J. Econ. Entomol.* – 2010. – Vol.103, №2. – P. 234–241.