MECHANIZMY REAKCJI NA STRES CHŁODU U OWADÓW

MECHANISMS OF INSECTS IN RESPONSE TO COLD STRESS

Magdalena GARTYCH, Szymon CHOWAŃSKI,
Grzegorz ROSIŃSKI, Małgorzata SŁOCIŃSKA

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: Owady, przystosowując się do przeżywania niskich temperatur, wykształciły szereg molekularnych mechanizmów krioprotekcyjnych. Mechanizmy te determinują zdolność owadów do ochrony ich tkanek i komórek przed skutkami oddziaływania niskich temperatur. W pracy scharakteryzowano zmiany mechanizmów enzymatycznych zaangażowanych w przemiany metaboliczne indukowane niską temperaturą, opisano znaczenie procesu dehydratacji w odpowiedzi na chłód, a także przedstawiono udział białek przeciwdziałających zamarzaniu, białek szoku cieplnego oraz czynników indukujących powstawanie kryształów lodu w ciele owadów w reakcji na stres zimna. Ponadto, opisano procesy krioprotekcyjne, wartości punktu przechłodzenia oraz zmiany homeostazy płynów ustrojowych występujące u owadów tropikalnych w warunkach chłodu. Specyficznym mechanizmem przystosowania owadów strefy umiarkowanej do przeżywania okresu zimy jest przejście w stan diapauzy, charakteryzujący się głębokimi zmianami procesów biochemicznych i fizjologicznych na poziomie molekularnym, komórkowym i całego organizmu. Mimo intensywnych badań prowadzonych nad poznaniem funkcjonowania procesów krioprotekcyjnych wiedza na temat strategii tolerowania chłodu przez owady jest nadal niepełna.

Słowa kluczowe: stres chłodu, owady, hartowanie zimnem, odporność na chłód, HSP, akwaporyny

Summary: Cryoprotection is defined as the ability to protect body tissues and cells against cold. Many insect species have developed a number of molecular cryoprotective mechanisms. In this study, we characterize various processes activated during cold, such as dehydration, expression of aquaporins or activation of enzymes involved in the metabolic pathways. We show the participation of proteins, like anti-freeze proteins, heat shock proteins and ice nucleating agents sharing as response to the cold stress. Moreover, we paid attention to the cryoprotection processes in tropical insects. In this group, researchers try to determine the role of the supercooling point and body fluids homeostasis in cold conditions. A specific mechanism of cold adaptation in insects from the temperate climate zone is diapause. It is charac-

terized by change of biochemical and physiological processes on the molecular, cellular and whole body levels. Despite intensive research for understanding of the mechanisms of cryoprotection, the knowledge about the strategies to tolerate cold by insects is still incomplete.

Key words: cold stress, cold hardening, resistance to cold, HSP, aquaporins

WSTĘP

Owady, jako bezkręgowce poikilotermiczne, są szczególnie wrażliwe na sezonowe zmiany temperatury mikrosiedlisk, w których przebywają. Występowanie gatunków tolerujących zamarzanie bądź unikających go poprzez zastosowanie różnorodnych mechanizmów ochronnych w reakcji na stres chłodu wskazuje, na szerokie zdolności tych organizmów do przeżycia w ekstremalnie niskich, umiarkowanych lub tropikalnych temperaturach [19]. Przystosowanie owadów do zasiedlania środowisk o zróżnicowanych warunkach termicznych w każdej strefie klimatycznej umożliwiło osiągnięcie przez nie ogromnego sukcesu reprodukcyjnego. W reakcji na stres chłodu zwierzęta te wykształciły szereg molekularnych mechanizmów protekcyjnych [13, 20, 75, 76] polegających m.in. na aktywacji enzymów głównych szlaków metabolicznych [13, 76, 80, 85] czy kumulacji polioli i cukrów [42, 70, 86]. Ten ostatni proces wiąże się z przystosowawczą dehydratacją [8, 23, 52], zwiększającą odporność na zamarzanie przy udziale białek błonowych akwaporyn (ang. *Aquaporins,* AQPs) [13, 62, 83]. U owadów tolerujących zamarzanie aktywnymi czynnikami ochronnymi są nukleatory lodu (ang. *Ice Nucleating Agents,* INAs) [14, 20, 52], natomiast u gatunków zarówno tolerujących zamarzanie, jak i unikających go, do czynników ochronnych, oprócz białek przeciwdziałających zamarzaniu (ang. *Antifreeze Proteins,* AFPs) [16, 86], należą białka szoku cieplnego (ang. *Heat Shock Proteins,* HSP) [4, 8, 53]. Z kolei dla owadów zimujących, żyjących w klimacie umiarkowanym [25, 79], jak i dla niektórych owadów strefy subtropikalnej zdolnych do przeżycia w warunkach stresu niskiej temperatury, w procesie wytworzenia tolerancji na chłód istotny jest proces gwałtownego hartowania zimnem (ang. *Rapid Cold Hardening,* RCH) [11, 44, 78, 89]. Diapauza, jako strategia zimowania, najczęściej występuje u gatunków strefy umiarkowanej, u których istotne w odporności na chłód są zmiany zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *Unsaturated Fatty Acids,* UFA) w błonie komórkowej [45, 47, 100], a także inne mechanizmy protekcyjne, takie jak kumulacja krioprotektantów [15, 70]. Z kolei w przypadku owadów tropikalnych podczas działania niskiej temperatury istotne znaczenie ochronne odgrywa punkt przechłodzenia płynów ciała (ang. *Supercooling Point,* SCP) podczas działania niskiej temperatury [11, 77], a u owadów zapadających w stan odrętwienia mechanizmy oparte na zmianie homeostazy jonowej [54, 55]. Niniejsza praca jest studium przeglądowym, mającym na celu przedstawienie najnowszych doniesień naukowych na temat funkcjonujących mechanizmów protekcyjnych u owadów w odpowiedzi na stres chłodu oraz podczas zimowania.

AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA W STRESIE CHŁODU I PODCZAS DIAPAUZY

Jednym z podstawowych mechanizmów przeciwdziałania skutkom działania niskiej temperatury na organizm owada jest aktywacja protekcyjnych procesów metabolicznych. Głównymi szlakami aktywowanymi podczas stresu chłodu są szlaki przemian węglowodanowych, takie jak glikoliza, glukoneogeneza i szlak pentozofosforanowy oraz szlaki metaboliczne związane ze stresem oksydacyjnym, będące konsekwencją przejścia organizmu na metabolizm beztlenowy w odpowiedzi na szok termiczny. Z funkcjonowaniem tych szlaków jest związana aktywność specyficznych enzymów dla przemian węglowodanowych, która ulega zmianom w zależności od warunków środowiska, na jakie wystawiony jest organizm [38]. U gatunków narażonych na stres chłodu, takich jak np. mucha *Sarcophaga bullata,* w odpowiedzi na gwałtowne hartowanie zimnem obserwowano m. in. wzrost aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianu, co jest następstwem zwiększenia intensywności przemiany szczawiooctanu do fosfoenolopirgronianu podczas glukoneogenezy [29]. Ponadto u tego gatunku wykazano wzrost aktywności glukozo-6-fosfatazy i fruktozo-6-fosfatazy, podczas glikolizy i glukoneogenezy odpowiednio o 45 i 9% [80]. W odpowiedzi na długotrwały stres chłodu w temperaturze 0-5°C u motyla *Epiblema scudderiana* następuje zwiększenie syntezy kinaz białkowych A zależnych od cAMP [61], biorących udział w regulacji enzymów glikolitycznych, takich jak fosforylaza glikogenowa, która staje się aktywna w wyniku ufosforylowania. Z kolei u skoczogonka *Megaphorura arctica* podczas wychodzenia z fazy odrętwienia obserwowano zwiększony poziom ekspresji białek podobnych do kinaz argininowych, które podnoszą aktywność metaboliczną mitochondriów w celu dostarczenia dodatkowej ilości ATP niezbędnej dla energochłonnych procesów zachodzących w tej fazie, takich jak np. przywrócenie właściwości błony komórkowej sprzed stanu odrętwienia [13]. U organizmów zapadających w okresie zimowym w stan diapauzy obserwowane jest silne tłumienie aktywności Na^+/K^+-ATPaz oraz białek funkcjonujących jako pompy jonowe, czerpiących energię z ATP. W przypadku muchówki *Eurosta solidaginis* spadek aktywności tych białek zimą może sięgać nawet 50% [58]. W fazie przechodzenia w stan diapauzy, jak i podczas szoku termicznego wywołanego niską temperaturą, w tkankach wielu gatunków owadów następuje wzmożona synteza polioli. U chrząszcza *Upis ceramboides* przed przejściem w stan odrętwienia zimowego następuje kumulacja treitolu, jako jednego z metabolitów szlaku pentozofosforanowego, powstającego na drodze redukcji erytrozo-4-fosforanu przez dehydrogenazy i fosfatazy tego cyklu [85]. Zmagazynowany w tkankach owadów glikogen, jako materiał zapasowy, podczas szoku termicznego wywołanego niską temperaturą jest mobilizowany w wyniku aktywacji fosforylazy glikogenowej katalizującej jego rozkład [51]. U poczwarek motyla *Helicoverpa armigea* podczas inicjacji diapauzy stwierdzono podwyższoną aktywność aldolaz i enolaz katalizujących odpowiednio IV i IX etap glikolizy [5]. Z kolei u larw osy *Nasonia vitripennis* wykazano zwiększony udział dehydrogenazy

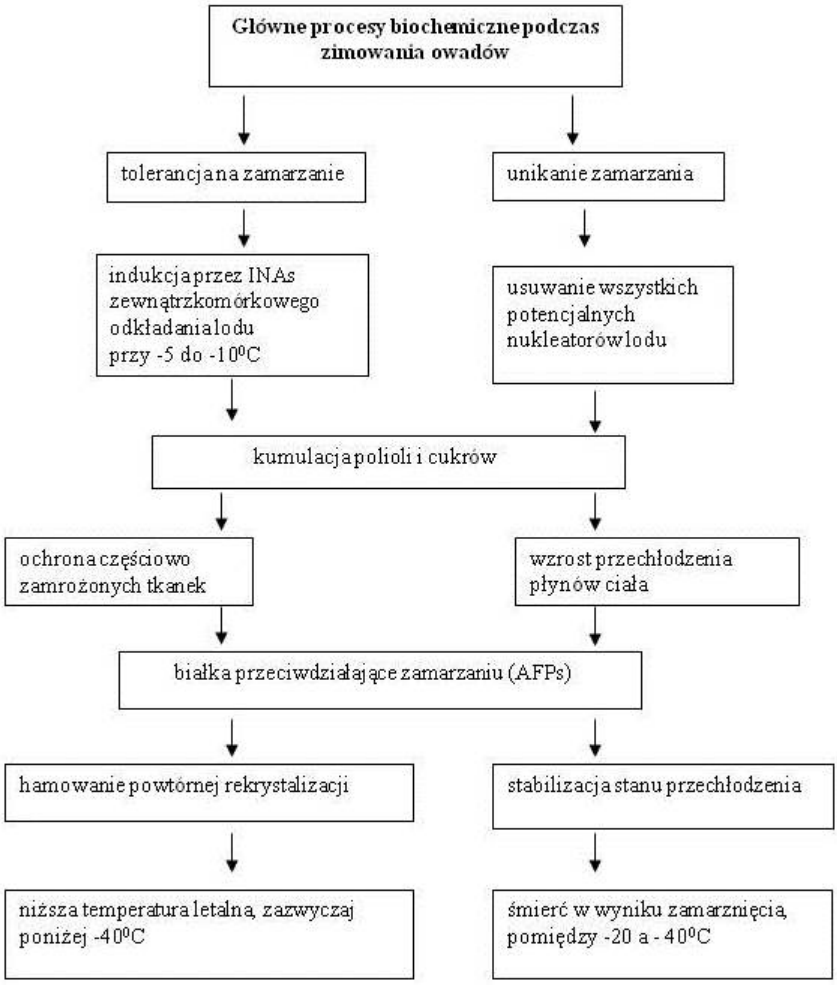
glicero-3-fosforanowej w syntezie glicerolu podczas fazy inicjacji diapauzy [88]. Występowanie wzmożonej glikolizy podczas diapauzy dowodzą również eksperymenty na poczwarce błonkówki *Praon volucre*, u której obserwowano zwiększony poziom aktywności dehydrogenazy 3-fosfogliceraldehydu [15]. W ciele owadów narażonych na stres chłodu powstają często reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species,* ROS), które mogą wpływać negatywnie na stan czynności komórek i tkanek. W obniżanie ich stężenia w komórce zaangażowane są enzymy antyoksydacyjne, takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalazy i peroksydazy. Peroksydacji lipidów błonowych podczas stresu chłodu u muchy *E. solidaginis* [57] i chrząszcza *Alphitobius diaperinus* zapobiega przede wszystkim dysmutaza ponadtlenkowa poprzez obniżenie poziomu ROS [50]. Z kolei katalazy i peroksydazy są głównymi enzymami przeciwdziałającymi stresowi oksydacyjnemu u *M. arctica* [82].

METABOLITY KRIOPROTEKCYJNE

Krioprotektanty są substancjami chroniącymi przed zamrożeniem płynów ciała w warunkach stresu termicznego [76]. U owadów tolerujących zamarzanie mechanizm ten zapobiega powstawaniu mikrouszkodzeń w częściowo zamrożonych tkankach, natomiast u owadów unikających zamarzania obecność krioprotektantów sprawia, że obniżeniu ulega punkt przechłodzenia (ryc. 1). Punkt przechłodzenia (SCP) jest minimalną temperaturą, do której można schłodzić ciecz poniżej jej temperatury krzepnięcia [73]. Poniżej tej temperatury następuje śmierć organizmu na skutek obrażeń spowodowanych przez kryształy powstałe w wyniku zamarzania płynów ustrojowych [51]. U owadów tolerujących zamarzanie, jak i unikających go, najczęściej występującymi metabolitami o właściwościach protekcyjnych są cukry fruktoza i trehaloza oraz poliole; sorbitol, erytritol i treitol [94]. Akumulacja tych związków zwiększa potencjał osmotyczny płynów ustrojowych, co przekłada się na obniżenie tendencji do zamarzania. W przypadku chrząszcza *U. ceramboides*, u którego głównymi metabolitami krioprotekcyjnymi są sorbitol i treitol, związki te występują w hemolimfie w bardzo wysokim stężeniu, sięgającym w okresie zimowym odpowiednio 400 i 250 mM [85]. U muchy *E. solidaginis* zamarzaniu płynów ustrojowych przeciwdziała podwyższony poziom glicerolu i sorbitolu w organizmie [74]. Podobny mechanizm występuje u karaczana alpejskiego żyjącego w Nowej Zelandii *Celatoblatta quinquemaculata,* akumulującego w hemolimfie glicerol i trehalozę, przez co poziomy tych krioprotektantów (mierzone w maju) wzrastają odpowiednio do ~220 i ~380 mM [86]. Niektóre owady po ekspozycji poniżej minimalnej temperatury krytycznej (ang. *Critical minimum Temperature,* CT_{min}), czyli minimalnej temperatury ciała, która jest tolerowana przez ich organizm wchodzą w stan odrętwienia. Zapadanie w stan odrętwienia jest związane z zanikiem funkcji nerwowo-mięśniowych organizmu owada [55]. Stan ten wywołany chłodem występuje przykładowo u pszczoły

miodnej *Apis mellifera* i muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [33], a jego cechą charakterystyczną w początkowej fazie jest zwiększony metabolizm trehalozy.

U owadów zapadających w diapauzę, takich jak motyl *Cydia pomonella*, źródło dla syntetyzowanych krioprotektantów stanowi najczęściej glikogen [70]. Wskazuje na to znaczący wzrost zawartości glikogenu w tkankach troficznych w okresie jesiennym przed wejściem w stan diapauzy, a następnie stopniowa jego mobilizacja. Uwolnione cząsteczki glukozy stanowią substrat do syntezy krioprotektantów.

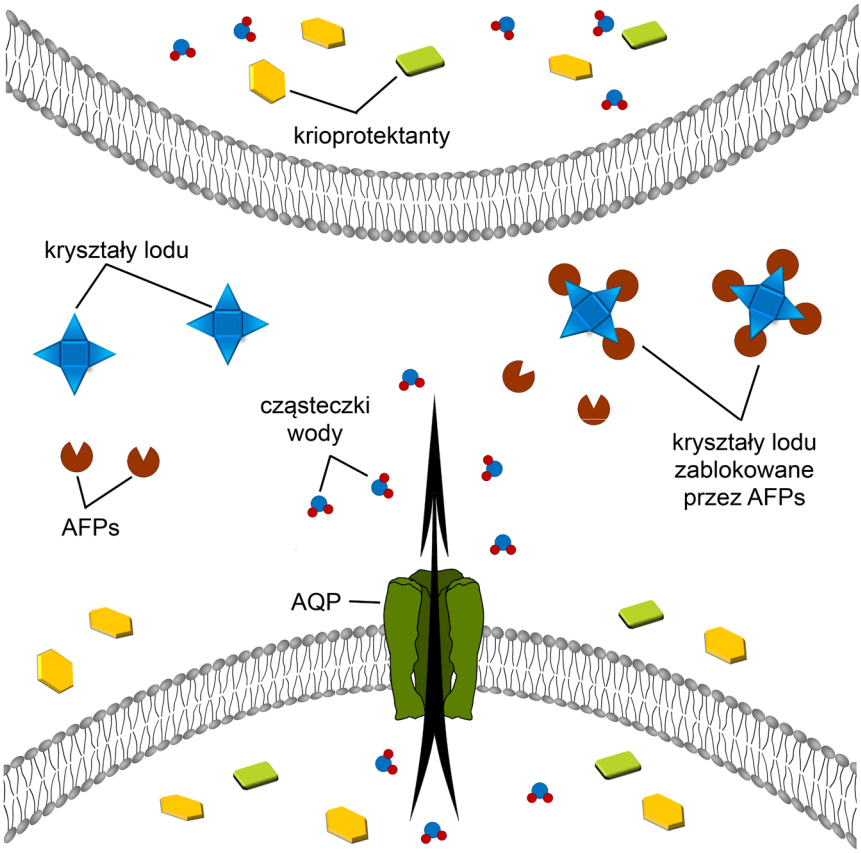


RYCINA 1. Schematyczne porównanie głównych procesów biochemicznych u owadów tolerujących zamarzanie i unikających zamarzania (zmodyfikowano wg. Bale, 2002)
FIGURE 1. Schematic comparison of the main biochemical processes in insects tolerating and avoiding freezing (modified according to Bale, 2002)

Związkami przeciwdziałającymi zamarzaniu u tego motyla jest glukoza, fruktoza, sorbitol oraz mannitol, występujące w znaczących ilościach zarówno w ciele tłuszczowym, jak i hemolimfie [70]. Z kolei u larw motyla *Ostrinia furnacalis* funkcję krioprotektantów pełnią trehaloza oraz glicerol [26], a u poczwarek *P. volucre* główną taką rolę odgrywają sorbitol oraz glicerol [15]. Znaczenie glikogenu, jako źródła glukozy do syntezy polioli w okresie diapauzy potwierdzają również badania przeprowadzone przez Wipking i współpracowników na larwach ćmy *Zygaena trifolii.* Autorzy ci wykazali, iż larwy diapauzujące zawierały 2-krotnie więcej glikogenu niż osobniki niediapauzujące [87]. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na osie *Cotesia vestalis* zaobserwowano, że zawartość glikogenu ulegała obniżeniu w trakcie kolejnych faz diapauzy [30].

DEHYDRATACJA I ROLA AKWAPORYN W ODPOWIEDZI NA CHŁÓD

Mechanizm przystosowania do chłodu, jakim jest odwodnienie (dehydratacja lub powolna desykacja) u owadów wiąże się ze zmniejszeniem zawartości wody w tkankach i w konsekwencji utratą masy ciała. Owady posiadają wysoko przepuszczalną kutikulę, którą wykorzystują do regulacji osmotyczności hemolimfy i punktu zamarzania [19]. Utrata wody zachodzi w wyniku gradientu stężeń między przes chłodzonymi płynami ciała i lodem w otoczeniu [13]. U skoczkogonka *M. arctica* proces dehydratacji jest ściśle powiązany ze stresem desykacji wymuszonym przez kontakt ciała owada z lodem. W temperaturze poniżej 0°C efektywność krioprotekcyjnego mechanizmu dehydratacyjnyego ulega znaczącemu obniżeniu na skutek silnej desykacji, stąd zdecydowanie większa śmiertelność osobników, które proces dehydratacji przechodzą w temperaturze -10 do -20°C niż u osobników, u których miał on miejsce w temperaturze powyżej 1°C. Efekt ten może być związany z zahamowaniem transportu wody przez akwaporyny i kutikulę w celu ograniczenia utraty wody, co z kolei osłabia efektywność dehydratacji [2]. Podczas desykacji larwy muchy *E. solidaginis* tracą 6-10% całkowitej masy ciała, co zwiększa ich tolerancję na zamarzanie w -15°C z ok. 33% do ok. 73% [52]. Jest to zgodne z wynikami ba% dań Hayward'a i współpracowników, którzy dowodzą, że w przypadku muchy *B. antarctica*, przy redukcji masy ciała w następstwie utraty wody o 20-50%, w -10°C tolerancja na zamarzanie wzrasta o 90% [32]. W innych badaniach nad tym gatunkiem owada wykazano, że przy zawartości wody poniżej 1,8 g/g suchej masy ciała jest on zdolny przeciwdziałać zamarznięciu płynów ciała w temperaturze -0,2°C, gdy okryty jest kokonem oddzielającym go od zamarzającej wilgotnej gleby [7, 23]. Jednak nie zawsze utrata wody pozwala na przeciwdziałanie zamarzaniu. Badania na pluskwie domowej *Cimex lectularius* dowodzą, że przy utracie 15% zawartości wody nie występuje zwiększenie tolerancji na zamarzanie u tego owada [8].



RYCINA 2. Mechanizmy ochronne komórek u owadów w reakcji na stres chłodu i zamarzanie. Zwiększone stężenie krioprotektantów przeciwdziała zamarzaniu płynów ciała oraz ogranicza nadmierną utratę wody przez organizm zachodzącą w następstwie desykacji spowodowanej niską temperaturą. Białka przeciwdziałające zamarzaniu (AFPs) wiążą się z kryształami lodu, co wywołuje zmniejszenie ich rozmiaru, a poprzez akwaporyny woda migruje do roztworu o wyższym potencjale osmotycznym
FIGURE 2. Protective mechanisms of insect cells as a response to cold stress and freezing. Increased concentrations of cryoprotectants prevent against adverse water fluxes and counteract body fluid freezing. Anti-freezing proteins (AFP) bind to the ice nucleators and decrease their size. Through aquaporins water migrates to the solution with higher osmotic potential

Akwaporyny (AQP), czyli integralne białka błonowe, biorące udział w transporcie wody i glicerolu [12] mają znaczący udział w zwiększeniu stopnia odporności na zamarzanie u owadów [13]. Białka te poprzez transportowanie wody i glicerolu zaangażowane są w regulację potencjału osmotycznego płynu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego, a tym samym wpływają na wartość SCP i szybkość tworzenia kryształów lodu (ryc. 2). W odpowiedzi na stres chłodu biorą udział 3 izoformy tych białek – AQP2, AQP3 (tzw. akwagliceroporyna) oraz AQP4, odpowiadająca za

transport wody. Badania Izumi i współpracowników nad akwaporynami ćmy *Chilo suppressalis* wykazały, że po zablokowaniu ich działania chlorkiem rtęci spada przeżywalność komórek ciała tłuszczowego i jelita środkowego w następstwie działania stresu chłodu [37]. Podobne wyniki w doświadczeniach z miedzią jako blokerem AQP3 uzyskali Zelenina i współpracownicy [97] oraz Ramløv i Lee [64] u muchy *E. solidaginis*, którzy stwierdzili, że przeżywalność komórek jelita środkowego u tej muchy wzrastała w obecności glicerolu do ok. 91% [62]. Ponadto u larw *E. solidaginis* w odpowiedzi na desykację i traktowanie temperaturą poniżej -20°C obserwowano ponad 50% wzrost zawartości AQP3 w porównaniu z osobnikami kontrolnymi przetrzymywanymi w temp. 4°C [62]. Z kolei u innej muchówki *B. antarctica* wykazano, że blokowanie akwaporyn powoduje obniżenie tolerancji na zamarzanie komórek jelita środkowego i cewek Malpighiego [93]. Akwaporyny zaangażowane w transport wody i/lub glicerolu zidentyfikowano także w komórkach jelita środkowego i cewek Malpighiego u pluskwiaka *Rhodnius prolixus* i piewika *Cicadella viridis* [83], jednak ich przypuszczalna rola we wzmacnianiu odporności na chłód u tych owadów nie została do tej pory opisana.

CZYNNIKI ZASZCZEPIAJĄCE LÓD W KOMÓRKACH

W temperaturze od 0 do -3°C, a u części owadów poniżej -5°C rozpoczyna się proces stopniowego zamarzania płynów ciała indukowany przez czynniki zaszczepiające kryształy lodu (INAs) [6]. Zaszczepianie lodu w ciele owada jest niebezpieczne, ponieważ powstające kryształy wywołują mechaniczne uszkodzenia komórek i tkanek. Czynnikami powodującymi powstawanie lodu w komórkach ciała są białka, sole, lipoproteiny lub bakterie [21]. U owadów tolerujących zamarzanie kryształy lodu powstają na zewnątrz komórki i czynniki zaszczepiające lód wspomagają ochronę przed wewnątrzkomórkowym zamarzaniem [95]. Natomiast u owadów unikających zamarzania potencjalne nukleatory lodu są usuwane z organizmu (ryc. 1). Larwy muchówki *B. antarctica* unikają zaszczepiania lodu poprzez obniżenie punktu przechłodzenia dzięki krioochronnej dehydratacji [23]. Z kolei u larw chrząszcza *Acanthocinus aedilis* w następstwie zmian prowadzących do znaczącego obniżenia przepuszczalności kutikuli dla wody podczas stresu chłodu, jej utrata jest znacząco ograniczona i w konsekwencji brak jest warstwy lodu na zewnątrz komórek [49]. Koncepcje, według których najważniejszą funkcją INAs nie jest krioprotekcja, ale zapobieganie stratom wody przez kutikulę [96] i przeciwdziałanie obrażeniom podczas rozmrażania [20], nie zostały do tej pory potwierdzone. U larw owocówki jabłkóweczki *C. pomonella*, obniżenie punktu przechłodzenia wiąże się z eliminacją INAs z jelita i hemolimfy [51]. Usuwanie treści pokarmowej z jelita podczas linienia wraz z potencjalnymi nukleatorami lodu zostało potwierdzone m.in. u skoczka *Tullbergia antarctica* [91].

BIAŁKA PRZECIWDZIAŁAJĄCE ZAMARZANIU

Rolą białek przeciwdziałających zamarzaniu (AFPs) jest zapobieganie zaszczepianiu lodu [60] i hamowanie narastania kryształów lodu w przechłodzonych płynach ciała [96], co określane jest mianem inokulacji (ryc. 1). Takie dwukierunkowe działanie zapobiega powstawaniu mechanicznych uszkodzeń komórek podczas formowania się lodu. U owadów interakcja pomiędzy białkami AFPs poszczególnych typów a powierzchnią małych kryształów lodu, zapobiegająca formowaniu się dużych kryształów, odbywa się prawdopodobnie poprzez oddziaływania typu van der Waalsa [16]. Do tej pory produkcję AFPs stwierdzono u około 50 gatunków owadów unikających bądź tolerujących zamarzanie (szczegółowa lista – Duman i wsp., [22]). Można tu wskazać takie gatunki, jak chrząszcza *Tenebrio molitor*, gdyż u larw tego gatunku białka te zapobiegają powstawaniu lodu wewnątrz komórek zlokalizowanych tuż pod kutikulą [21], chrząszcza *A. aedilis*, u którego larw inokulacja z udziałem AFPs ma miejsce w ścianach i płynach ciała [49], czy motyla *Choristoneura fumiferana* [63]. Właściwości fizyko-chemiczne AFPs bardzo dobrze scharakteryzowano u ryb i roślin [65], ale w mniejszym zakresie poznano je dla białek występujących u owadów.

BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO

Białka szoku cieplnego (HSP) produkowane są w komórce przez cały czas w warunkach fizjologicznych (są to tzw. HSP konstytutywne), synteza pozostałych HSP, które należą do chaperonów czyli białek opiekuńczych wzrasta w czasie stresu komórkowego, w tym stresu wysokiej i niskiej temperatury lub suszy [69]. Rolą HSP jest stabilizacja proteomu przez udział w prawidłowym zwijaniu się innych białek, renaturacji lub degradacji białek zdenaturowanych lub uszkodzonych przez czynniki stresowe; ponadto białka te modulują proces apoptozy komórek [98]. W następstwie szoku termicznego dochodzi do aktywacji różnych klas białek HSP, przy czym występują tu liczne różnice gatunkowe. W przypadku poczwarek muchy *Delia antiqua* podczas zimy obserwowano zwiększoną ekspresję białek HSP 60 i HSP 70 [40]. Natomiast u muchy *S. bullata* podczas desykacji i rehydratacji wywołanej ujemną temperaturą stwierdzono ekspresję genów kodujących odpowiednio HSP 23, HSP 70 i HSP 104 [31]. Z kolei poziom białek HSP 40, HSP 70 i HSP 110 u larw muchy *E. solidaginis* późną jesienią oraz zimą wzrastał 2-krotnie [98]. Synteza poszczególnych klas HSP wykazuje również zależność od stadium rozwojowego owada, przykładowo u larw muchy *B. antarctica* zidentyfikowano HSP 70, HSP 90 i niskocząsteczkowe HSP. Są to białka, które nie występują w stadium imaginalnym tego gatunku owada [68]. Synteza białek HSP jednak nie zawsze ulega zwiększeniu w warunkach stresu termicznego. U stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* obserwowano bowiem, iż poziom syntezy białek HSP był niższy w populacji owadów częściej na-

rażonych na niekorzystne temperatury [53]. Zmiany poziomu ekspresji białek HSP występują również w fazie diapauzy u owadów zasiedlających umiarkowane szerokości geograficzne, u których obserwowano podwyższenie ekspresji genów kodujących HSP [69]. Funkcje białek HSP podczas diapauzy są podobne jak podczas działania stresu fizjologicznego. Czynnikiem regulującym transkrypcję genów kodujących białka szoku cieplnego, którego aktywność zwiększa się w stresie chłodu i podczas gwałtownego hartowania zimnem, jest HSF-1. Czynnik ten został zidentyfikowany u muszki owocowej *D. melanogaster* [41] oraz pluskwy *Cimex lectularius*, której białka HSP są w około 95% identyczne z tymi u muszki owocowej [8]. Szczegółową listę genów kodujących białka HSP u owadów przedstawili Zhao i Jones [99].

AKLIMACJA POPRZEZ GWAŁTOWNE HARTOWANIE ZIMNEM

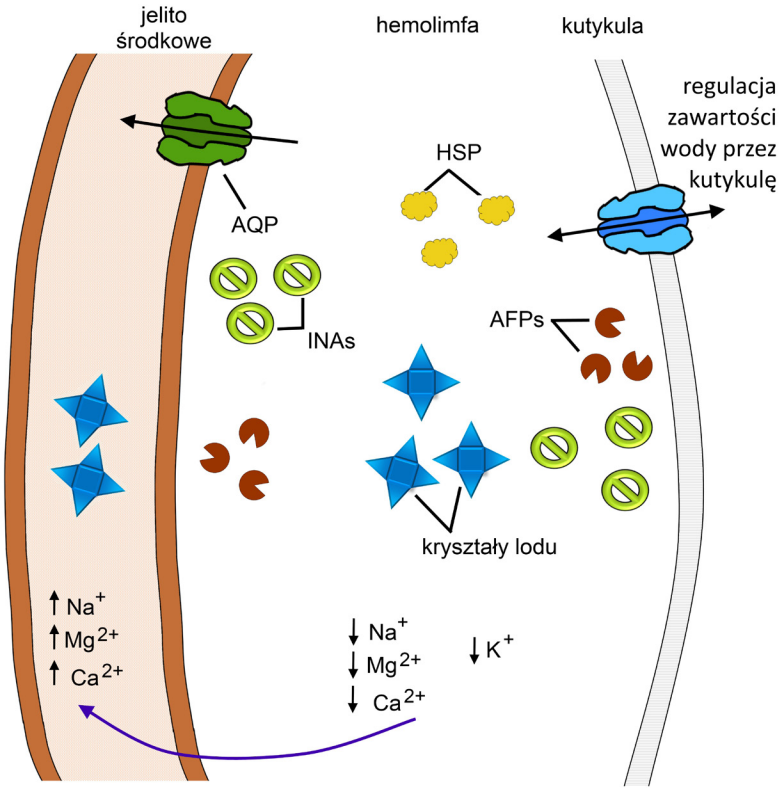
Mechanizm gwałtownego hartowania zimnem (RCH) polega na szybkiej, bo trwającej od kilku minut do kilku godzin, aklimacji owadów, która podnosi ich przeżywalność po ekspozycji na stres chłodu [44]. Polega ona na szybkich/gwałtownych zmianach warunków mikroklimatycznych, w których żyją owady. Efekt ten uzyskuje się poprzez przeniesienie hartowanych osobników z warunków naturalnych do temperatury około 0°C, a następnie do temperatury, w której śmiertelność owadów wynosi 100% [4]. Zjawisko to określa stopień adaptacji danego gatunku do warunków siedliska w temperaturze poniżej 0°C. Na tej podstawie można wykazać również, jaki procent owadów przeżywa podczas RCH (tab. 1).

TABELA 1. Przeżywalność owadów wyrażona w % w zależności od temperatury hartowania (°C) i czasu hartowania (h- godziny, d- dni); LT_{50}/LT_{95} (z ang. *Lethal Time*) – czas, w którym 50 i 95% osobników populacji ponosi śmierć na skutek chłodu

TABLE 1. Survival of insects (in %) depending on the time (h-hours, d-days) and temperature (°C) of cold hardiness; LT_{50}/LT_{95} (lethal time) – time when 50 and 95% of individuals die because of cold stress

GATUNEK	TEMPERATURA	CZAS HARTOWANIA / LT_{50}/LT_{95}	% PRZEŻYWALNOŚCI	ŹRÓDŁO DANYCH
Belgica antarctica	-15/-20°C	1h/1h	88/70%	[79]
Sacrophaga bullata	0/-10°C	2h/2h	~100/~50%	[80]
Cimex lectularius	-16/-18°C	1h/1h	≤10/0%	[8]
Brontispa longissima	0/-10°C	5/23 d	5/5%	[78]
Thaumatotibia leucotreta	-0,5/-4,5°C	10h/2h	50/50 %	[77]
Epiphyas postvittana	-0,5/-10°C	198 h/2,5 h	50/50%	[11]
Austracris guttulosa	-7/-8°C	3h/3h	~74/37%	[90]

W proces hartowania zimnem zaangażowane są prawdopodobnie szlaki sygnalizacji wapniowej, co przejawia się wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. U muchy *E. solidaginis* w warunkach RCH obserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia nawet o 40% [81]. Podobnie u muchówki *B. antarctica* podczas hartowania zimnem występuje aktywacja szlaków wapniowych, a inhibicja kalmoduliny hamuje ten proces [79]. Natomiast u szarańczy wędrownej *Locusta migratoria* stwierdzono, iż w warunkach hartowania zimnem następuje 2-krotny wzrost stężenia jonów K^+ wewnątrz komórki (z 14,7 do 32 mM), co ostatecznie wywołuje stan śpiączki [25].



RYCINA 3. Rola jelita środkowego i hemolimfy podczas stresu chłodu. AQP- akwaporyna transportująca wodę do światła jelita środkowego, INAs- czynniki zaszczepiające lód w komórce, HSP- białka szoku cieplnego, AFPs- białka przeciwdziałające zamarzaniu, Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+- jony wymieniane między hemolimfą a jelitem środkowym w celu ochrony jelita tylnego przed uszkodzeniami. W warunkach normalnych w jelicie tylnym owadów zachodzi resorpcja wody i jonów do hemolimfy

FIGURE 3. The role of midgut and haemolymph during cold stress. AQP- aquaporin transporting water to the intestine lumen, INAs- ice nucleator agents, HSP- heat shock proteins, AFPs- anti-freezing proteins, Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+, ions exchangeable between haemolymph and midgut protecting hindgut during cold. Under physiological conditions, in the insects' hindgut takes place water and ion resorption to the haemolymph

ZABURZENIA HOMEOSTAZY JONOWEJ PODCZAS ŚPIĄCZKI WYWOŁANEJ CHŁODEM

Jedną z reakcji na stres chłodu jest zapadanie owadów w śpiączkę (ang. *Chill--Coma,* CH-C). Reakcja ta występuje głównie u owadów tropikalnych i charakteryzuje się utratą pobudliwości układu nerwowego i mięśniowego [1]. Mechanizm prowadzący do powstania śpiączki jest prawdopodobnie związany z niemożliwością utrzymania homeostazy jonowej w wyniku działania niskiej temperatury na pompy jonowe zależne od ATP oraz transport jonów przez błony komórkowe [54]. U pochodzącego z północno-zachodniej Afryki karaczana *Nauphoeta cinerea* w reakcji na stres chłodu występuje podwyższony przepływ jonów K^+ z hemolimfy do komórek mięśniowych [48] i w konsekwencji dochodzi do obniżenia potencjału depolaryzacyjnego mięśni [33]. W śpiączkę zapada także subantarktyczny gatunek, ćma *Pringleophaga marioni,* znana ze swej wyjątkowej odporności na niskie temperatury, u której stan śpiączki występuje w odpowiedzi na niewydolność ATP-zależnych enzymów, odpowiadających za homeostazę jonową [72]. Najnowsze badania wykazały, że zaburzenia homeostazy jonowej wywołane są zahamowaniem wymiany jonowej między jelitem środkowym a hemolimfą [54] (ryc. 3). Ponadto u świerszcza *Gryllus pennsylvanicus* w temperaturze 0°C objętość hemolimfy zmniejsza się o około 84%, a równocześnie gwałtownie wzrasta objętość jelita [56]. Nie wyjaśniono do tej pory mechanizmu tego zjawiska. Stwierdzono natomiast u szarańczy *L. migratoria* usuwanie wody i jonów Na^+, Ca^{2+} i Mg^{2+} z hemolimfy do przewodu pokarmowego, co może ochronić jelito tylne owadów przed uszkodzeniami wywołanymi chłodem [28].

PUNKT PRZECHŁODZENIA PŁYNÓW CIAŁA U OWADÓW TROPIKALNYCH

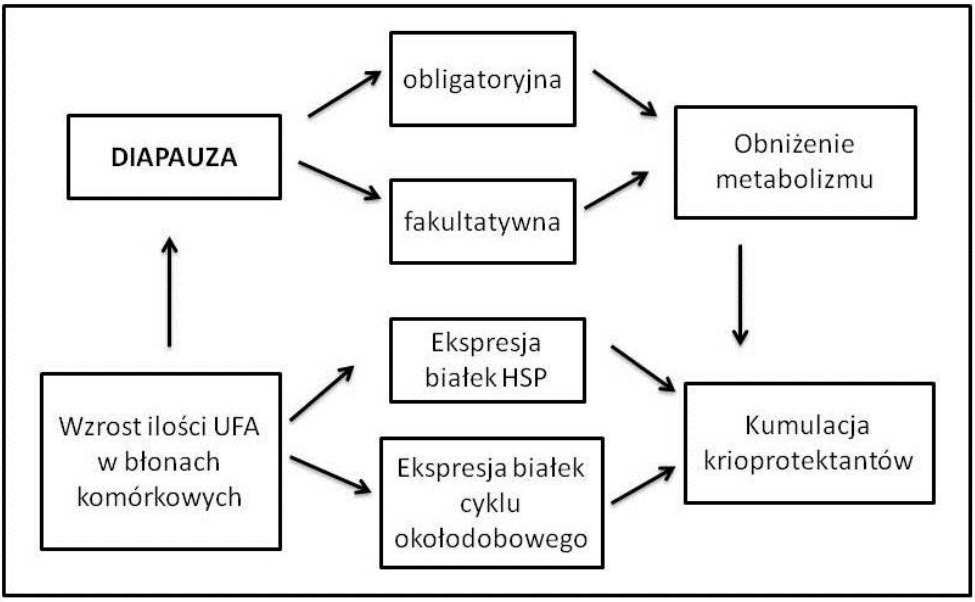
Jednym z parametrów określających odporność owadów tropikalnych na stres chłodu jest przechłodzenie płynów ciała (ang. *Supercooling Point,* SCP). Ze względu na okołodobowe oraz klimatyczne zmiany procesów życiowych [34] nie jest to jednak parametr doskonały [66]. Wartość punktu przechłodzenia u owadów tej strefy klimatycznej zależy m.in. od masy ciała, składu hemolimfy i dostępności pożywienia, a mieści się w przedziale od ok. -8°C do ok. -15°C [34]. Minder i wsp. [59] zaobserwowali, że im niższa wartość SCP tym większa odporność owada na chłód. U ćmy *Thaumatotibia leucotreta* wykazano wyraźną zależność między obniżeniem temperatury i wydłużeniem czasu ekspozycji na

chłód a zwiększoną śmiertelnością tych owadów [77]. Podobne, średnie wartości SCP równe -15°C wyznaczono dla ciem *Pectinophora gossypiella* [27] i *Epiphyas postvittana* [11], natomiast dla australijskiej szarańczy *Austracris guttulosa* średnia oszacowana wartość SCP wyniosła -9°C [90]. U innych gatunków tropikalnych: szarańczy *L. migratoria* i *Chortoicetes terminifera* wartości SCP mieszczą się w przedziałach odpowiednio ok. -4°C a -5°C i ok. -9°C a -14°C [25, 89]. W zależności od stadium rozwojowego SCP chrząszcza *Brontispa longissima* szacowany jest pomiędzy -9,8°C dla jaj a -4°C dla drugiego stadium larwalnego [92]. Przypuszcza się, że śmiertelność osobników poniżej wartości SCP powodowana jest niszczeniem błon komórkowych, degradacją białek oraz zmianą aktywności szlaków metabolicznych [3]. Zweryfikowanie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

DIAPAUZA JAKO STRATEGIA ZIMOWANIA OWADÓW STREFY UMIARKOWANEJ

Diapauza, to głębszy stan fizjologiczny niż spoczynek lub uśpienie, charakteryzujący się endogennym i centralnie sterowanym mechanizmem zatrzymania rozwoju i morfogenezy oraz przejściem do alternatywnego programu zmian [43]. Rozróżniamy diapauzę obligatoryjną [46, 71], która jest genetycznie zaprogramowana i zachodzi co roku oraz fakultatywną, mającą miejsce podczas niekorzystnych warunków klimatycznych [10]. Czynnikami wywołującymi zjawisko diapauzy są przede wszystkim fotoperiod, temperatura, zmiana jakości pokarmu, a także wilgotność i przegęszczenie owadów [17]. Diapauza jest najczęstszą strategią zimowania owadów strefy umiarkowanej. Charakteryzuje się głębokimi zmianami procesów biochemicznych i fizjologicznych w skali całego organizmu oraz na poziomie komórkowym i molekularnym [10]. Różnorodne aspekty diapauzy są przedmiotem wnikliwych badań [17, 18].

U owadów podczas diapauzy funkcjonują mechanizmy protekcyjne podobne do tych, które występują u nich w reakcji na stres chłodu. Występuje wtedy spowolnienie metabolizmu, kumulacja krioprotektantów, zwiększona ekspresja białek HSP, białek cyklu okołodobowego czy wzrost zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórek (ryc. 4). Aktywność enzymów szlaków metabolicznych, kumulacja krioprotektantów oraz ekspresja białek szoku termicznego zostały opisane w poprzednich rozdziałach. W dalszych rozdziałąch skoncentrujemy się na opisie ekspresji białek cyklu okołodobowego [17, 24] oraz metabolizmu lipidów w błonach komórkowych owadów podczas diapauzy [47, 100].



RYCINA 4. Schemat przedstawiający funkcjonujące mechanizmy protekcyjne u owadów podczas diapauzy obligatoryjnej i fakultatywnej. UFA – nienasycone kwasy tłuszczowe
FIGURE 4. The scheme showing protective mechanisms during insect diapause. UFA-unsaturated fatty acids

BIAŁKA CYKLU OKOŁODOBOWEGO W DIAPAUZIE OWADÓW

Fotoperiod jest najważniejszym synchronizatorem okołodobowych rytmów biologicznych w procesach życiowych owadów. Diapauza jest kontrolowana przez geny zegara okołodobowego układu nerwowego [9]. Geny te kodują białka PER (PERIOD) i TIM (TIMELESS) i są odpowiedzialne za prawidłowy poziom tych białek podczas fotofazy diapauzy. Poziom obu białek wraz z produktami innych genów zegara biologicznego, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, odgrywa ważną rolę w regulacji funkcjonowania rytmiki okołodobowej owadów, dobrze poznanej u *D. melanogaster* [17]. U muszki owocowej zaobserwowano, że białko TIM, nawet przy braku zegara okołodobowego, kontroluje wystąpienie diapauzy proporcjonalnie do długości dnia [24]. U pluskwiaka *Riptortus pedestris* wyciszenie genu *period* (*per*) hamowało diapauzę przy wywołującym ją fotoperiodzie, z kolei wyciszenie genu *cycle* (*cyc*) wywoływało diapauzę w warunkach fotoperiodu wywołującego wyjście ze stanu diapauzy [35]. Białkiem funkcjonalnym zegara biologicznego mierzącego czas trwania diapauzy embrionalnej jedwabnika morwowego *Bombyx mori* jest metaloglikoproteina TIME -EA4 [36]. Ponadto prowadzone są liczne badania nad aktywnością genów regulujących funkcjonowanie zegara okołodobowego w tkankach nienerwowych.

ZAWARTOŚĆ KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W BŁONACH KOMÓRKOWYCH OWADÓW W DIAPAUZIE

Lipidy są głównymi, obok cukrów, metabolitami zużywanymi w trakcie procesu diapauzy. Zaobserwowano, że zimujące larwy motyla *Zygaena trifolii* podczas diapauzy posiadają 2 razy więcej zmagazynowanych lipidów niż osobniki, które nie wchodzą w stan diapauzy [87]. U komara *Culex pipiens* zawartość lipidów do 35 dnia diapauzy pozostawała na stałym poziomie, a następnie ulegała znacznemu obniżeniu [100]. Z kolei u azjatyckiego komara *Aedes albopictus* i świerszcza *Allonemobius socius* stwierdzono obecność desaturaz i elongazy Co-A (enzymów cyklu kwasu cytrynowego), których aktywność podczas diapauzy sugeruje zwiększoną rolę nienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *Unsaturated Fatty Acids,* UFA) w utrzymaniu stabilizacji błon komórkowych [67]. U przedpoczarek ćmy *Cymbalophora pudica* zaobserwowano w błonie komórkowej wyraźny wzrost nienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do nasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *Saturated Fatty Acids,*SFA). Pozwala to na zachowanie właściwości dynamicznych błony komórkowej, jej płynności, wytrzymałości na naprężenia czy organizacji przestrzennej jej składników (m.in. organizacja tratw lipidowych) [45]. Uwagę zwraca również podwyższona zawartość UFA w mięśniach kowala bezskrzydłego *Pyrrhocoris apterus*, głównie kwasu linolowego w warstwie fosfolipidowej błony komórkowej, stanowiącego około 32% wszystkich fosfolipidów błonowych [47]. U omacnicy prosowianki *Ostrinia nubilalis* zaobserwowano, że kwasy palmitooleinowy i oleinowy błon komórkowych zabezpieczają je przed przejściem fazowym ze stanu ciekłego w stan stały [84]. Podwyższoną zawartość UFA, zabezpieczających przed uszkodzeniem błon komórkowych niską temperaturą w czasie diapauzy stwierdzono również u owadów z rzędu Lepidoptera [39].

PODSUMOWANIE

Zimowanie owadów w strefach klimatu umiarkowanego i subarktycznego wiąże się z uruchomieniem w komórkach ich ciała specyficznych procesów fizjologicznych i biochemicznych warunkujących przeżycie w niskich temperaturach. Mechanizmy umożliwiające owadom przetrwanie w niskich temperaturach, takie jak przechłodzenie płynów ciała, czy synteza cukrów i polioli oraz ekspresja białek AFPs i HSP zostały już dość dobrze poznane. Niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmów krioprotekcyjnych u owadów tropikalnych, u których głównie analizowano wartości punktu przechłodzenia płynów ciała. Dotychczasowe dane dotyczące owadów zimujących w stanie diapauzy wskazują na ważną rolę białek zegara okołodobowego i nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych. Aktualnie prowadzone są badania mające na celu analizę profili białkowych i procesów metabolicznych zachodzących podczas diapauzy owadów.

Reakcja organizmu na stres chłodu jest procesem złożonym i dlatego poznanie molekularnych mechanizmów leżących u jej podstaw pozwoli w przyszłości na dokładniejsze określenie poszczególnych typów strategii występujących w odpowiedzi na stres niskiej temperatury u tej najliczniejszej na Ziemi grupy zwierząt.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z działalności statutowej ZFBRZ oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2013/09/N/N29/01621

LITERATURA

[1] Armstrong GA, Rodriguez EC, Meldrum Robertson R. Cold hardening modulates K^+ homeostasis in the brain of *Drosophila melanogaster* during chill coma. J Insect Physiol 2012; **58**: 1511-1516
[2] Bahrndorff S, Petersen SO, Loeschcke V, Overgaard J, Holmstrup M. Differences in cold and drought tolerance of high arctic and sub-arctic populations of *Megaphorura arctica* Tullberg 1876 (Onychiuridae: Collembola). Cryobiology 2007; **55**:315-323
[3] Bale JS. Insect cold hardiness: A matter of life and death. Eur J Entomol 1996; **93**:369-382
[4] Bale JS. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2002; **357**:849-861
[5] Bao B, Xu WH. Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. BMC Genomics 2011; **12**
[6] Baust JG, Lee RE. Environmental "homeothermy" in an Antarctic insect. Antract J US 1981; **15**:170-172
[7] Benoit JB, Lopez-Martinez G, Michaud MR, Elnitsky MA, Lee RE Jr, Denlinger DL. Mechanisms to reduce dehydration stress in larvae of the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. J Insect Physiol 2007; **53**:656-667
[8] Benoit JB, Lopez-Martinez G, Teets NM, Phillips SA, Denlinger DL. Responses of the bed bug, *Cimex lectularius*, to temperature extremes and dehydration: levels of tolerance, rapid cold hardening and expression of heat shock proteins. Med Vet Entomol 2009; **23**:418-425
[9] Bębas P. O złożoności zegara biologicznego owadów czyli jak narządy odmierzają czas. Kosmos 2010; **59**:497-511
[10] Boczek J. Diapauza owadów i roztoczy a ochrona roślin przed szkodnikami. Wiadom Entoml 2008; **27**
[11] Burgi LP, Mills NJ. Cold tolerance of the overwintering larval instars of light brown apple moth *Epiphyas postvittana*. J Insect Physiol 2010; **56**:1645-1650
[12] Campbell EM, Ball A, Hoppler S, Bowman AS. Invertebrate aquaporins: a review. J Comp Physiol B 2008; **178**:935-955
[13] Clark MS, Thorne MA, Purac J, Burns G, Hillyard G, Popovic ZD, Grubor-Lajsic G, Worland MR. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). BMC Genomics 2009; **10**:328
[14] Clark MS, Worland MR. How insects survive the cold: molecular mechanisms-a review. J Comp Physiol B 2008; **178**:917-933
[15] Colinet H, Renault D, Charoy-Guevel B, Com E. Metabolic and proteomic profiling of diapause in the aphid parasitoid *Praon volucre*. PLoS One 2012; **7**: e32606
[16] Davies PL, Baardsnes J, Kuiper MJ, Walker VK. Structure and function of antifreeze proteins. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2002; **357**: 927-935
[17] Denlinger DL. Regulation of diapause. Annu Rev Entomol 2002; **47**: 93-122

[18] Denlinger DL. Why study diapause? Entomol Res 2008; **38**: 1-9
[19] Denlinger DL, Lee RE. Low temperature biology in insects 2010. Cam Univ Press
[20] Doucet D, Walker VK, Qin W. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects. Cell Mol Life Sci 2009; **66**: 1404-1418
[21] Duman JG. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. Annu Rev Physiol 2001; **63**: 327-357
[22] Duman JG, Bennett V, Sformo T, Hochstrasser R, Barnes BM. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. J Insect Physiol 2004; **50**: 259-266
[23] Elnitsky MA, Hayward SA, Rinehart JP, Denlinger DL, Lee RE Jr. Cryoprotective dehydration and the resistance to inoculative freezing in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. J Exp Biol 2008; **211**: 524-530
[24] Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM. Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. Trends Genet 2009; **25**: 217-225
[25] Findsen A, Andersen JL, Calderon S, Overgaard J. Rapid cold hardening improves recovery of ion homeostasis and chill coma recovery time in the migratory locust, *Locusta migratoria*. J Exp Biol 2013; **216**: 1630-1637
[26] Goto M, Sekine Y, Outa H, Hujikura M, Koichi S. Relationships between cold hardiness and diapause, and between glycerol and free amino acid contents in overwintering larvae of the oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis*. J Insect Physiol 2001; **47**: 157-165
[27] Gutierrez AP, D'oultremont T, Ellis CK, Ponti L. Climatic limits of pink bollworm in Arizona and California: effects of climate warming. Acta Oecol 2006; **30**: 353-364
[28] Hanrahan JW, Phillips JE. El ect r ogenic, K^+-dependent chloride transport in locust hindgut. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1982; **299**: 585-595
[29] Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annu Rev Biochem 1997; **66**: 581-611
[30] Hao Z, Tang B, Chen C, He Y, Shi Z. Maternal effects of photoperiods on glycogen metabolism related to induction of diapause in *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) from Jilin, China. Appl Entomol Zool 2013; **48**: 47-56
[31] Hayward SA, Rinehart JP, Denlinger DL. Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. J Exp Biol 2004; **207**: 963-971
[32] Hayward SA, Rinehart JP, Sandro LH, Lee RE Jr, Denlinger DL. Slow dehydration promotes desiccation and freeze tolerance in the Antarctic midge *Belgica antarctica*. J Exp Biol 2007; **210**: 836-844
[33] Hosler JS, Burns JE, Esch HE. Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill-coma. J Insect Physiol 2000; **46**: 621-627
[34] Hunter DM, Walker PW, Elder RJ. Adaptations of locusts and grasshoppers to the low and variable rainfall of Australia. J Orthop Res 2001; **10**: 347-351
[35] Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG. Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. BMC Biol 2010; **8**: 116
[36] Isobe M, Kai H, Kurahashi T, Suwan S, Pitchayawasin-Thapphasaraphong S, Franz T, Tani N, Higashi K, Nishida H. The molecular mechanism of the termination of insect diapause, part 1: A timer protein, TIME-EA4, in the diapause eggs of the silkworm *Bombyx mori* is a metallo-glycoprotein. Chembiochem 2006; **7**: 1590-1598
[37] Izumi Y, Sonoda S, Yoshida H, Danks HV, Tsumuki H. Role of membrane transport of water and glycerol in the freeze tolerance of the rice stem borer, Chilo suppressalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae). J Insect Physiol 2006; **52**: 215-220
[38] Joanisse DR, Storey KB. Temperature acclimation and seasonal responses by enzymes in cold-hardy gall insects. Arch Insect Biochem Physiol 1995; **28**: 339-349
[39] Joanisse DR, Storey KB. Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. Physiol Zool 1996; **69**: 1079-1095
[40] Kayukawa T, Ishikawa Y. Chaperonin contributes to cold hardiness of the onion maggot *Delia antiqua* through repression of depolymerization of actin at low temperatures. PLoS One 2009; **4**: e8277
[41] Kelty JD, Lee RE Jr. Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophiladae) during ecologically based thermoperiodic cycles. J Exp Biol 2001; **204**: 1659-1666

[42] Khani A, Moharramipour S. Cold hardiness and supercooling capacity in the overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*. J Insect Sci 2010; **10**: 83
[43] Kostal V. Eco-physiological phases of insect diapause. J Insect Physiol 2006; **52**: 113-127
[44] Kostal V, Korbelova J, Rozsypal J, Zahradnickova H, Cimlova J, Tomcala A, Simek P. Long-term cold acclimation extends survival time at 0 degrees C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. PLoS One 2011; **6**: e25025
[45] Kostal V, Simek P. Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold -acclimation of an aestivating insect prepupa. J Comp Physiol B 1998; **168**: 453-460
[46] Kostal V, Tollarova M, Dolezel D. Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*. J Insect Physiol 2008; **54**: 77-88
[47] Kostal V, Urban T, Rimnacova L, Berkova P, Simek P. Seasonal changes in minor membrane phospholipid classes, sterols and tocopherols in overwintering insect, *Pyrrhocoris apterus*. J Insect Physiol 2013; **59**: 934-941
[48] Kostal V, Yanagimoto M, Bastl J. Chilling-injury and disturbance of ion homeostasis in the coxal muscle of the tropical cockroach (*Nauphoeta cinerea*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2006; **143**: 171-179
[49] Kristiansen E, Li NG, Averensky AI, Laugsand AE, Zachariassen KE. The Siberian timberman *Acanthocinus aedilis*: a freeze-tolerant beetle with low supercooling points. J Comp Physiol B 2009; **179**: 563-568
[50] Lalouette L, Williams CM, Hervant F, Sinclair BJ, Renault D. Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2011; **158**: 229-234
[51] Lee RE, Denlinger DL. Insects at low temperature 1991. Chapman and Hall, New York
[52] Levis NA, Yi SX, Lee RE Jr. Mild desiccation rapidly increases freeze tolerance of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*: evidence for drought-induced rapid cold-hardening. J Exp Biol 2012; **215**: 3768-3773
[53] Lyytinen A, Mappes J, Lindstrom L. Variation in Hsp70 levels after cold shock: signs of evolutionary responses to thermal selection among *Leptinotarsa decemlineata* populations. PLoS One 2012; **7**: e31446
[54] Macmillan HA, Sinclair BJ. The role of the gut in insect chilling injury: cold-induced disruption of osmoregulation in the fall field cricket, *Gryllus pennsylvanicus*. J Exp Biol 2011; **214**: 726-734
[55] Macmillan HA, Williams CM, Staples JF, Sinclair BJ. Metabolism and energy supply below the critical thermal minimum of a chill-susceptible insect. J Exp Biol 2012; **215**: 1366-1372
[56] Macmillan HA, Williams CM, Staples JF, Sinclair BJ. Reestablishment of ion homeostasis during chill-coma recovery in the cricket *Gryllus pennsylvanicus*. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; **109**: 20750-20755
[57] Mccord JM. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. Dose Response 2008; **6**: 223-238
[58] McMullen DC, Storey KB. Suppression of Na^+K^+-ATPase activity by reversible phosphorylation over the winter in a freeze-tolerant insect. J Insect Physiol 2008; **54**: 1023-1027
[59] Minder IF, Dudash AV, Chesnek SI. Seasonal changes in the resistance to cold and the content of glycogen, glycerin and reducing sugars in the body of hibernating larvae of the codling moth (*Laspeyresia pomonella*). Zoolog Zhurnal 1984; **63**: 1355-1362
[60] Olsen T, Sass S, Li N, Duman J. Factors contributing to seasonal increases in inoculative freezing resistance in overwintering fire-colored beetle larvae *Dendroides canadensis*. J Exp Biol 1998; **201 (Pt 10)**: 1585-1594
[61] Pfister TD, Storey KB. Protein kinase A: purification and characterization of the enzyme from two cold-hardy goldenrod gall insects. Insect Biochem Mol Biol 2002; **32**: 505-515
[62] Philip BN, Yi SX, Elnitsky MA, Lee RE Jr. Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. J Exp Biol 2008; **211**: 1114-1119
[63] Qin W, Doucet D, Tyshenko MG, Walker VK. Transcription of antifreeze protein genes in *Choristoneura fumiferana*. Insect Mol Biol 2007; **16**: 423-434
[64] Ramlov H, Lee RE Jr. Extreme resistance to desiccation in overwintering larvae of the gall fly *Eurosta solidaginis* (Diptera, tephritidae). J Exp Biol 2000; **203**: 783-789

[65] Raymond JA, Devries AL. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; **74**: 2589-2593
[66] Renault D, Salin C, Vannier G, Vernon P. Survival at low temperatures in insects: What is the ecological significance of the supercooling point? Cryoletters 2002; **23**: 217-228
[67] Reynolds JA, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. J Insect Physiol 2012; **58**: 966-973
[68] Rinehart JP, Hayward SAL, Elnitsky MA, Sandro LH, Lee RE, Denlinger DL. Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; **103**: 14223-14227
[69] Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SA, Denlinger DL. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; **104**: 11130-11137
[70] Rozsypal J, Kostal V, Zahradnickova H, Simek P. Overwintering strategy and mechanisms of cold tolerance in the codling moth (*Cydia pomonella*). PLoS One 2013; **8**: e61745
[71] Schmidt PS, Paaby AB. Reproductive diapause and life-history clines in North American populations of *Drosophila melanogaster*. Evolution 2008; **62**: 1204-1215
[72] Sinclair BJ, Klok CJ, Chown SL. Metabolism of the sub-Antarctic caterpillar *Pringleophaga marioni* during cooling, freezing and thawing. J Exp Biol 2004; **207**: 1287-1294
[73] Somme L. The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. Eur J Entomol 1999; **96**: 1-10
[74] Storey KB. Metabolism and bound water in overwintering insects. Cryobiology 1983; **20**: 365-379
[75] Storey KB, Storey JM. Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation. Can J Zool 2012; **90**: 456-475
[76] Storey KB, Storey JM. Molecular biology of freezing tolerance. Compr Physiol 2013; **3**: 1283-1308
[77] Stotter RL, Terblanche JS. Low-temperature tolerance of false codling moth *Thaumatotibia leucotreta* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) in South Africa. J Therm Biol 2009; **34**: 320-325
[78] Takano S, Takasu K, Ichiki RT, Nakamura S. Cold tolerance of the coconut hispine beetle, *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Japan. Appl Entomol Zool 2012; **47**: 173-180
[79] Teets NM, Elnitsky MA, Benoit JB, Lopez-Martinez G, Denlinger DL, Lee RE. Rapid cold-hardening in larvae of the Antarctic midge *Belgica antarctica*: cellular cold-sensing and a role for calcium. Am J Physiol-Reg I 2008; **294**: R1938-R1946
[80] Teets NM, Peyton JT, Ragland GJ, Colinet H, Renault D, Hahn DA, Denlinger DL. Combined transcriptomic and metabolomic approach uncovers molecular mechanisms of cold tolerance in a temperate flesh fly. Physiol Genomics 2012; **44**: 764-777
[81] Teets NM, Yi SX, Lee RE, Denlinger DL. Calcium signaling mediates cold sensing in insect tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; **110**: 9154-9159
[82] Thorne MAS, Worland MR, Feret R, Deery MJ, Lilley KS, Clark MS. Proteomics of cryoprotective dehydration in *Megaphorura arctica* Tullberg 1876 (Onychiuridae: Collembola). Insect Mol Biol 2011; **20**: 303-310
[83] Tomkowiak E, Pienkowska J. The current knowledge of invertebrate aquaporin water channels with particular emphasis on insect AQPs. Post Biol Kom 2009; **39**: 203-216
[84] Vukasinovic EL, Pond DW, Worland MR, Kojic D, Purac J, Blagojevic DD, Grubor-Lajsic G. Diapause induces changes in the composition and biophysical properties of lipids in larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2013; **165**: 219-225
[85] Walters KR, Pan QF, Serianni AS, Duman JG. Cryoprotectant biosynthesis and the selective accumulation of threitol in the freeze-tolerant Alaskan beetle, *Upis ceramboides*. J Biol Chem 2009; **284**: 16822-16831
[86] Wharton DA, Pow B, Kristensen M, Ramlov H, Marshall CJ. ICE-active proteins and cryoprotectants from the New Zealand alpine cockroach, *Celatoblatta quinquemaculata*. J Insect Physiol 2009; **55**: 27-31
[87] Wipking W, Viebahn M, Neumann D. Oxygen-consumption, water, lipid and glycogen-content of early and late diapause and nondiapause larvae of the burnet moth *Zygaena trifolii*. J Insect Physiol 1995; **41**: 47-56

[88] Wolschin F, Gadau J. Deciphering proteomic signatures of early diapause in nasonia. PLoS One 2009; **4**
[89] Woodman JD. Cold tolerance of first-instar nymphs of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*. J Insect Physiol 2010; **56**: 376-379
[90] Woodman JD. Cold tolerance of the Australian spur-throated locust, *Austracris guttulosa*. J Insect Physiol 2012; **58**: 384-390
[91] Worland MR, Leinaas HP, Chown SL. Supercooling point frequency distributions in Collembola are affected by moulting. Funct Ecol 2006; **20**:323-329
[92] Xiao GJ, Zeng L, Li Q, Lu YY. Cold hardiness of palm leaf beetle, *Brontispa longissima*. Chin Bull Entomol 2006; **43**: 527-530
[93] Yi SX, Benoit JB, Elnitsky MA, Kaufmann N, Brodsky JL, Zeidel ML, Denlinger DL, Lee RE Jr. Function and immuno-localization of aquaporins in the Antarctic midge *Belgica antarctica*. J Insect Physiol 2011; **57**: 1096-1105
[94] Zachariassen KE. Physiology of cold tolerance in insects. Physiol Rev 1985; **65**: 799-832
[95] Zachariassen KE, Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature. Cryobiology 2000; **41**: 257-279
[96] Zachariassen KE, Li NG, Laugsand AE, Kristiansen E, Pedersen SA. Is the strategy for cold hardiness in insects determined by their water balance? A study on two closely related families of beetles: Cerambycidae and Chrysomelidae. J Comp Physiol B 2008; **178**: 977-984
[97] Zelenina M, Tritto S, Bondar AA, Zelenin S, Aperia A. Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3. J Biol Chem 2004; **279**: 51939-51943
[98] Zhang GJ, Storey JM, Storey KB. Chaperone proteins and winter survival by a freeze tolerant insect. J Insect Physiol 2011; **57**: 1115-1122
[99] Zhao L, Jones WA. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. Isj-Invert Surviv J 2012; **9**: 93-101
[100] Zhou GL, Miesfeld RL. Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes. J Insect Physiol 2009; **55**: 40-46

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 21.05.2014
Przyjęto: 18.08.2014
Małgorzata Słocińska,
Zakład Fizjologii i Biologii Zwierząt
Wydział Biologii UAM Poznań
ul. Umultowska 89, Poznań
tel.: 61 8295925 (20)
e-mail: slocina@amu.edu.pl