

# 昆虫耐寒性研究

景晓红, 康 乐 \*

(中国科学院动物研究所, 农业虫鼠害综合治理国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:** 昆虫是变温动物, 气候变化是造成种群季节消长的基本原因之一。尤其在不良的低温环境中, 昆虫耐寒力的高低是其种群存在与发展的重要前提。昆虫对低温的适应能力及其机理也因而成为昆虫生态学和生物进化研究中的一个深受重视的问题。本文论述了与耐寒性直接相关的过冷却点和昆虫的抗寒对策, 明确了昆虫耐寒性的一些基本概念。一方面从环境影响昆虫的角度对耐寒性的一般规律, 如季节性变化, 地理变异, 快速冷驯化的作用等做了简要的概括, 另一方面阐述了昆虫适应环境的生理生化机制, 包括低分子量的抗冻物质的产生, 冰核剂的作用及抗冻蛋白的功能等。强调昆虫与环境相互作用过程中的生态生理适应。并指出昆虫耐寒性应当与生活史中别的因素联系起来, 这样才能对耐寒性有一个更加全面的理解。

**关键词:** 耐寒性; 生理生化机制

## Research Progress in Insect Cold Hardiness

JING Xiao-Hong, KANG Le\* (State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22 (12): 2202 ~ 2207.

**Abstract:** Climate change will often lead to the fluctuation of insect populations, because insect is poikilothermic animals. Cold hardiness becomes a crucial strategy of insects. It largely determines the distribution, abundance and developmental rates of insect population. Here we summarize the literature about insect cold hardiness in order to make others convenient to know this field.

The supercooling point (SCP) is perhaps the most common index of invertebrate cold hardiness and is often the first measurement to be made when the cold tolerance of a given species is to be investigated. Underlying the assumption that the SCP is an accurate indicator of cold hardiness, the strategies adopted by insects to survive at low temperature were classified into two types: freezing avoidance and freezing tolerance. In recent years, many scientists have questioned the validity of this viewpoint, because more insect mortality occurred well above the SCP. Therefore, it was suggested that the SCP should not be used as a unique and completely reliable index in determining the cold hardiness of insects. The current freezing avoidance/tolerance classification system has also been extended from two types to five types.

The cold hardiness of insect is a reflection of insect adaptation to its environment. In temporal and spatial scales, the seasonal climate change results in the seasonal difference in cold hardiness, and the latitudinal difference also leads to geographical variation in cold hardiness. Low temperature acclimation before cold stress significantly increases the cold hardiness of insects. In addition, the physiological and biochemical process in response to low temperature enhance insect's adaptation to extreme low temperature, which makes it possible to survive in the harsh winter climate. Both the degrees of freezing tolerance and supercooling increase by the accumulation of Low-molecular-weight cryoprotectant substances, e. g. glycerol. Ice nucleating agents have special functions in freezing tolerant insects, but have to be removed or biochemically masked in freezing intolerant species. Antifreezing proteins stabilize the supercooled state of insects and may prevent the inoculation of ice from outside through the cuticle.

**基金项目:** 中国科学院一期创新资助项目 (ksx2-1-05-03)

**收稿日期:** 2002-02-25; **修订日期:** 2002-09-20

**作者简介:** 景晓红, 女, 山西闻喜人, 博士。主要从事昆虫生态方面的研究。E-mail: jingxh@panda. ioz. ac. cn

\* **通信作者** Author for correspondence, E-mail: lkang@panda. ioz. ac. cn

Current research progress has given the explanation to the cold hardiness concerning about the molecular structure of antifreezing proteins, which will promote the cold hardiness studies at molecular level. Moreover, a better understanding of the cold hardiness of individual species requires the consideration of factors that are involved in life history strategies of insects.

**Key words:** cold hardiness; physiological and biochemical mechanism

文章编号:1000-0933(2002)12-2202-06 中图分类号:Q143 文献标识码:A

地球上,昆虫广泛地分布于温带地区和极地,在各种各样的栖境中越冬。冬季的低温是它们存活的主要障碍,其抗寒能力的高低已成为其种群存在与发展的重要前提,决定着它们的生殖、扩散、分布及在下一季节的发生动态<sup>[1]</sup>。由于栖息环境的多样性,昆虫在长期的进化中形成了多种多样的抗寒策略<sup>[2]</sup>。

对昆虫耐寒性的研究早在 1736 年就有报道,P. Bachmetjew 发现了昆虫的过冷却点,为昆虫在低温环境下的生命力这一理论问题,以及许多有关的实践问题的研究开辟了广阔的前景<sup>[3]</sup>。但早期有关昆虫耐寒性的文献多被引用于植物耐寒性的研究中,所以很多耐寒性的理论是从对植物耐寒性的研究中得到进一步升华。近代对昆虫耐寒性的研究始于 20 世纪 60 年代,尤其是近二三十年里,昆虫耐寒性的研究成一大热点领域,其中不乏有很多作者敢于对传统的理论提出挑战,得益于此,昆虫耐寒性的研究也进一步的完善,并取得了突破性的进展。

Lee 于 1989 年曾把耐寒性定义为:有机体暴露于长期或短期低温下的存活能力,这种能力因有机体特定的发育阶段,环境的季节性变化,遗传因素及营养状况和暴露低温的时间长短而变化<sup>[4]</sup>。概念既强调有机体对环境的适应,即它对恶劣的气候条件是否在生理上做了准备,或具备了这种准备的能力;同时也强调环境条件的变化对它的影响,如果站在这样的观点去研究引起昆虫生理上发生变化的环境条件时,便可获得定向改变这些条件和引起昆虫发生定向变异的可能性,即利用益虫和控制害虫的可能性。

# 1 昆虫的过冷却点及抗寒对策

昆虫的过冷却是指体液温度下降到冰点以下而不结冰的现象。在温带和寒带地区,冬季温度通常低于冰点,昆虫可以通过体液过冷却的方式来避免结冰造成的伤害。因而在许多昆虫耐寒性的研究中,都以过冷却点(super-cooling point)为一个重要指标来界定其耐寒性的强弱。越冬昆虫,特别是其卵体一般都有较低的过冷却点,例如飞蝗卵的过冷却点约为 $-26^{\circ}\text{C}$ ,斑潜蝇蛹的过冷却点约为 $-19^{\circ}\text{C}$ <sup>[5]</sup>。它与虫体的结构、经历的冬季低温等有关,同时受多种因素调节,如低分子量的多元醇、冰核剂以及抗冻蛋白等。由于绝大多数昆虫都有较低的过冷却点,这种方式至少可以减少结冰的可能性。但在以后的文献中多次引起争论的问题是,昆虫的过冷却点是否可以作为耐寒性的可依赖的指标<sup>[6]</sup>? 矛盾的焦点是过冷却点以上的亚致死温度就可导致不耐结冰昆虫的大量死亡,因此过冷却点不能作为其耐寒性的唯一指标。

传统的耐寒性对策是根据昆虫的过冷却点划分为两类,一类是不耐结冰的(freezing intolerant),这类昆虫对体液中的冰晶形成的损伤特别敏感,但它能尽量降低自身的过冷却点,从而避免体液结冰。过冷却点常被认为是这类昆虫能够存活的下限。绝大多数的昆虫属于这一类型。另一类是耐受结冰的(freeze-tolerant),这类昆虫能够忍受细胞外液的部分结冰,不造成死亡,但通常有较差的过冷却能力。当暴露于低温时,主动地形成冰核,促进细胞外液在较高的亚致死温度下结冰,从而阻止细胞内液的进一步结冰,避免其造成的更大损伤。针对这种耐寒性对策的划分方法,Bale 提出了一个有趣的问题:“如果昆虫在低温下既可以通过避免结冰,也可以通过抵抗结冰来存活的话,那么在什么样的环境下它们死亡呢?”他根据昆虫死亡出现的时间将耐寒性分为 5 类:①耐结冰的(Freeze-tolerance)。②避免结冰的(Freeze-avoidance),它的特点是有很强超冷却能力,从而避免结冰;能够在超冷状态存活很长时间;在过冷却点以上的死亡率很少或可以忽略;过冷却是一个可依赖的耐寒性指标。③耐受寒冷的(Chill-tolerance),它的特点是能降低过冷却点从而避免结冰;能在超冷状态存活 3~6 个月;随着在过冷却点以上的零下温度的暴露时间加长,其死亡率增加。④寒冷敏感的(Chill susceptible),它的特点是昆虫可能有强的过冷却能力;能在 $0^{\circ}\text{C}$ 到 $5^{\circ}\text{C}$ 存活;在 $-5^{\circ}\text{C}$ 到 $-15^{\circ}\text{C}$ 短暂的冷暴露会增加其死亡率;耐寒性和冬季

死亡率与过冷却点无关。⑤机会主义的 (Opportunistic survival)。这样所有昆虫的耐寒性对策都可以根据定义和生态相关标准归入一个明确的范畴<sup>[6]</sup>。

2 环境变化对昆虫耐寒性的影响及其一般规律

Leather(1993)强调冬季低温的时间、空间变化对昆虫种群动态的影响,同时也指出昆虫在行为、生态和生理上对环境的适应<sup>[8]</sup>。昆虫耐寒性的变化规律则是这种相互作用的直接反映。

2.1 季节性气温变化对昆虫耐寒性的影响

生活在寒带和温带地区的昆虫,在自然条件下,每年要经历漫长而寒冷的冬季。在长期的进化中,形成了一套适应性的特征。很多昆虫的耐寒性的季节趋势与当地的气温变化趋势紧密相关。如飞蝗冬季种群卵的过冷却点显著低于夏季种群卵的过冷却点,这样确保了越冬卵的存活,为下一季节的发生奠定基础。一种螨类的过冷却点在 1 月份为  $-35.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,而 7 月份的值为  $-9.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,与当地气温(1 月份  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,7 月份  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ )呈现显著相关<sup>[9]</sup>。莠苣根蚜 (*Pemphigus bursarius*) 冬季种群和夏季种群的半致死温度分别是  $-13.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $2.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。这种耐寒性季节性变化的适应,有助于在土壤中越冬的无性蚜的存活,下一季节的温度一旦适合,无翅蚜便可以在在第二寄主上扩大其种群,对于该种的无性生活史的成功有很重要的意义<sup>[10]</sup>。

2.2 地理环境对耐寒性的影响

一般情况下,处在高纬度及高海拔地区的昆虫比低纬度及低海拔地区的昆虫有更强的耐寒能力,极地昆虫的多样性也证明了它们很强的耐寒能力。处于不同地理纬度的同一种昆虫,其耐寒力也不相同,一般来说,纬度越高的地区,其耐寒性越高,而纬度较低的或一些热带地区的种类,其耐寒性则低。如不同地理起源的伊蚊 (*Aedes albopictus*) 卵的耐寒性显著不同<sup>[11]</sup>;我国飞蝗的卵的半致死温度也从北到南逐渐降低;我国沿海卤虫品系耐寒力显著高于内陆盐湖卤虫品系<sup>[12]</sup>。地理环境包括纬度、海拔、沿海及内陆的差别也是通过不同环境的气温变化的差别间接地导致昆虫耐寒性的差别,从而在长期的进化中形成一种规律性的模式,它对于种群扩大其分布有重要的生态学意义。

2.3 个体发育阶段的不同也造成昆虫的耐寒性的差异

通常是进行越冬的虫期耐寒性最大,休眠或滞育虫期对低温的耐受能力较强,正在发育的时期差,比如:舞毒蛾 (*Porthetria dispar*) 的成虫在  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  时只能存活 30min,而其卵在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  也不会死亡;甜菜夜蛾不同虫态耐寒性由弱至强分别是:卵、成虫、幼虫和蛹<sup>[13]</sup>。卷叶蛾 (*Adoxophyes orana*) 的滞育和非滞育的幼虫过冷却点分别为  $-20.7\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $-17.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[14]</sup>;甚至在同一个虫期内,耐寒性也不同,如在飞蝗的卵中,因胚胎的发育阶段不同耐寒性不同,初产的卵耐寒性显著高于胚转期和孵化前的卵;不同龄期的卤虫耐寒力也不同,无节幼虫期耐寒力最强,其次是成虫期,以幼虫期最弱且对所有实验条件都敏感<sup>[12]</sup>。

2.4 低温驯化对昆虫耐寒性的影响

低温驯化过程是指,昆虫在接受低温胁迫前 (cold stress),在较低温度下进行一定时间的锻炼,可以显著提高昆虫的耐寒性。在自然条件下,昆虫越冬前都是经历一个温度渐变的过程,使它们得以为渡过低温环境做一些生理上的准备,正如前面所提到的越冬种群的耐寒性高于夏季种群,在某程度上是冬季种群受到自然界低温驯化的缘故。而快速冷驯化 (rapid cold-hardening) 则是经历短时间的低温锻炼,比如 5min、20min 等,对很多昆虫来说,这样的过程可以使它们免于遭受过冷却点以上的低温的伤害。如蝇类 (*Sarcophaga crassipalpis*) 的非滞育虫态,接受  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  的低温胁迫前,在  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  驯化 10~60min,其存活率可从 20% 增到 80%<sup>[15]</sup>。Kelty 等<sup>[16]</sup>认为在快速冷驯化的诱导中,冷却速率起很重要的作用,以  $0.05\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  或  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的接近自然昼夜变温的速率进行冷驯化可显著地增强耐寒性;快速冷驯化并不只限于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  或其附近,只要冷却速率接近自然昼夜变温情况,较高的温度也可导致快速冷驯化的效果,如  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。快速冷驯化的能力具有重要的生态学意义,在早春或晚秋,当昆虫遇到急剧降温时,可以快速提高它们的抗寒性。尽管它不能确保昆虫在漫长的冬季存活,但它至少可以使昆虫适应自然界昼夜间温度的变化或简短的冷暴露。

2.5 时间和温度的交互作用

在昆虫耐寒性研究中,早期的作者都意识到低温胁迫时间长短的重要性<sup>[1]</sup>,Paynea 在 1927 年对低温的“数量因素”(quantity factor)和“强度因素”(intensity factor)加以区别,前者是指抵抗相对温和低温的

能力,而后者是指抵抗极端低温的能力。Nedvĕd<sup>[17]</sup>也曾以伤害性低温的累积(sum of injurious)包括时间和温度,低温伤害区域的上限(upper limit of the cold injury)等为参数的模型,对耐寒性进行定量的表达,这一模型与多种昆虫在低温下存活率的数据吻合。但是所有的数据都是有在恒定温度下测定,在其后的研究中,又进一步证实了变化的温度对昆虫存活率影响<sup>[18]</sup>,结果认为在昆虫耐寒性低温处理的过程中,间断性的高温处理(发育温度)能够增加其耐寒性。这一结论对于实验中活体昆虫的长期冷贮存及一些生物制剂的定期释放是非常有益的。

### 3 昆虫耐寒性生理生化机制

昆虫耐寒性是昆虫对栖境适应过程中体内生理、生化协调的结果。

#### 3.1 抗冻保护剂的产生及其作用

越冬期间许多昆虫体内聚集低分子量的糖或醇,如甘油、多元醇、糖等,这些抗冻保护剂可以增加昆虫体内束缚水的含量,或直接与酶及其他的蛋白质相互作用起到保护生物系统的作用<sup>[19]</sup>。多元醇在昆虫抗冻保护中的作用是昆虫耐寒性中研究最深入的特征之一。多元醇适合作抗冻保护剂是因为在水溶液中溶解度高,无毒且相溶性好,对酶或代谢过程影响很少,并且能自由跨膜<sup>[20]</sup>。它们在生物体内起到双重的作用,一方面增强膜的抗冻保护作用,另一方面可增加细胞燃料,利用体内的糖贮存来产生能量<sup>[21]</sup>。

早期的文献多报道单一成份的抗冻剂,实际上,昆虫在低温下往往产生多种抗冻保护剂(multi-component)。比如昆虫在低温下,伴随着体内甘油的出现,也会产生山梨醇、甘露醇、核糖醇、赤藓糖醇等多元醇。低温常常是抗冻物质出现的第一诱因,除此之外,光照也对它的产生也形成暗示。Tsumuki 等报道过保幼激素(JH)及类似物(JHA)刺激二化螟幼虫体内甘油聚集,而蜕皮激素降低其浓度,因此认为激素可能参与多元醇合成<sup>[22]</sup>。

抗冻物质能促使昆虫维持过冷却状态,在一些昆虫中有抗冻物质存在时其过冷却点可达 $-40^{\circ}\text{C}$ 甚至更低,而没有这些物质时过冷却点仅达 $-12^{\circ}\text{C}$ <sup>[23]</sup>,在耐结冰的昆虫中,这些物质能依其浓度相应地在胞外开始结冰时调节细胞体积,以防细胞进一步结冰,从而避免更大的伤害。糖和多元醇还可导致膜和蛋白质的稳定性,说明它们可以通过一些特定的非依数性的机制来保护生物系统。

#### 3.2 冰核剂在昆虫抗寒性中的作用

昆虫体内冰的出现通常是由冰核剂促使,冰核是通过吸收冰晶而形成冰。冰核剂有两种,一种是同型冰核(homogeneous nucleation),理论上需要由水分子聚集形成一个核,然后与周围的水分子偶然地聚集到一起形成冰晶;另一种为称为异型冰核(heterogeneous nucleation),如矿物颗粒等,水分子与这些外来物质更容易吸收冰晶而形成冰<sup>[1]</sup>。在耐受结冰的昆虫体内,冰核剂往往有助于它们抗寒,因为超冷却过后,冰形成的速度很快,由于冰晶快速膨大而造成机械损伤对昆虫来说是致命的,所以耐结冰的昆虫产生冰核剂促使虫体在较高的亚致死温度下形成冰,从而避免细胞内液的进一步结冰。昆虫体内的冰核可在体液中或细胞基质中。也可以是肠道中的食物微粒及冰核细菌<sup>[24,25]</sup>,如日本杨毛叶蜂预蛹肠道中的冰核剂能诱导冰晶的形成,然后扩展到血淋巴中,建立一种保护性的结冰<sup>[26]</sup>。但冰核剂可显著地降低昆虫的过冷却点能力,对不耐结冰的昆虫来说,它会降低耐寒性。Strong-Guanderson 证实冰核细菌对越冬昆虫的 SCP 有明显的提高作用。到目前为止,至少已对 4 个属的 4 种细菌和 2 种镰刀菌对昆虫 SCP 影响进行了实验,其中有从肠道内分离的,平均提高 SCP  $8.37^{\circ}\text{C}$ ,大大增加了亚致死温度下的死亡率。对防治那些聚集或限制在微生境中越冬的害虫,用冰核细菌处理有一定的应用前景<sup>[27]</sup>。国内的研究也证明冰核细菌能在棉铃虫、光肩星天牛等虫体上起到异源冰核的作用,提高虫体的过冷却点,造成越冬害虫的大量死亡,为生防指出新的途径<sup>[28~30]</sup>。

#### 3.3 抗冻蛋白的产生及其与耐寒性的关系

抗冻蛋白(antifreeze protein)是一些植物、寒带鱼类和在极地或温带生活的昆虫及蜘蛛等在秋、冬季体内产生的一类能提高其抗冻能力的多肽。产生抗冻蛋白是许多昆虫的一个重要的越冬策略<sup>[31,32]</sup>。一般认为抗冻蛋白在脂肪体中合成,然后释放到血淋巴中通过氢键与冰晶连接,阻止冰晶的进一步增长,从而降低体液的结冰点,增大熔点与冰点之间的差异。在昆虫的肠液和细胞内液中都有抗冻蛋白的产生,它们不



是作为溶质,增加血淋巴的渗透压而使冰点下降,而是吸附于冰晶表面阻止其进一步增长,从而降低冰点,即所谓的吸附抑制理论。抗冻蛋白中所有的羟基、羧基和氨基都能与冰晶格中的氧原子和氢原子形成氢键,所以在其作用过程中氢键必定参与。

低温下昆虫体内产生的抗冻蛋白能长时间地维持亚稳态的过冷却状态,这是不耐结冰的昆虫的重要适应机制<sup>[23]</sup>。同时也能够阻止越冬场所的冰通过昆虫的表皮进入体液中,它们的作用远远大于仅通过其热滞活性而导致冰点下降 3~6℃<sup>[33,34]</sup>。另外,抗冻蛋白不仅能提高血淋巴的过冷却能力,还可以通过抑制冰核剂在肠液中的出现而提高肠液的过冷却能力。细胞内产生的抗冻蛋白在维持冷暴露的昆虫体内的离子梯度中也有重要的功能<sup>[24]</sup>。

#### 4 昆虫耐寒性研究的新进展

早期对昆虫耐寒性的研究主要着眼于耐寒性的一些现象,但近年来人们越来越多地对耐寒性的机制进行进一步的探讨。特别是在耐寒性的分子机制方面迈出了很大步伐,但由于可操作方面的原因或研究基础的原因,大多深入的研究只停留在有限的几种昆虫中,比如对抗冻蛋白的研究和抗冻基因的研究大多集中在鞘翅目的几种昆虫和双翅目的果蝇中,如小蠹、黄粉甲等<sup>[35]</sup>,在这两种昆虫中 Andorfer 等人<sup>[36]</sup>已经纯化出上十种抗冻蛋白,并对氨基酸的序列进行检测。目前,已经证实小蠹的抗冻蛋白二级结构是β折叠和β转角,由半胱氨酸形成的二硫键在维持抗冻蛋白的高度有序的结构中起到了极其重要的作用<sup>[37]</sup>。因而在昆虫抗寒机制的研究中开辟了新的领域。对昆虫抗寒性基因调控的研究则主要集中于编码抗冻蛋白的基因,如黄粉甲中的抗冻基因<sup>[38]</sup>;编码调控低温代谢中酶的基因,如脯氨酸代谢中 p5cr 基因的表达等等<sup>[39~41]</sup>。相信越来越多的研究会使人们从分子角度对昆虫耐寒性有更深入的了解。

#### 5 结语

对大多数的昆虫来说,不论是避免冬季低温的生态的和行为的方式,还是抵抗低温的生理生化的或其它调节方式,实际上,只有当各种适应方式结合起来才能确保昆虫的越冬存活。把耐寒性与生活史中别的方面联系起来,比如季节的时序性,水份平衡,代谢和能量支付等,便可以明确生活史中的各种因素是如何与抗寒的需求统一起来而促使种群的发展。所以耐寒性研究不应该在分离的情况下进行,只有把各种因素都考虑在内,才能加强对耐寒性的综合理解。

#### 参考文献

- [1] McDonald J R, Head J, Bale J S, *et al.* Cold tolerance, overwintering and establishment potential of *Thrips palmi*. *Physiol. Entomol.*, 2000, **25**: 159~166.
- [2] Sømme L, The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *Eur. J. Entomol.*, 1999, **96**: 1~10.
- [3] Sømme L, The history of cold hardiness research in terrestrial arthropods. *Cryoletters*, 2000, **21**: 289~296.
- [4] Lee R E Jr, Insect cold hardiness: to freeze or not to freeze. *Bioscience*, 1989, **39**: 308~313.
- [5] Zhao Y X, Kang L, Cold tolerance of the leafminer *Liriomyza sativae* (Dipt., Agromyzidae). *J. Appl. Entomol.*, 2000, **124**: 185~189.
- [6] Bale J S, Insect cold hardiness: a matter of life and death. *Eur. J. Entomol.*, 1996, **93**: 369~382.
- [7] Sinclair B J, Insect cold tolerance: how many kinds of frozen. *Eur. J. Entomol.*, 1999, **96**: 157~164.
- [8] Leather S R, Walters K F A, Bale J S. *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- [9] Sjørnsen H, Sømme L, Seasonal changes in tolerance to cold and desiccation in *Phauloppia* sp. (Acari, Oribatida) from Finse, Norway. *J. Insect Physiol.*, 2000, **46**: 1387~1396.
- [10] Phillips S W, Bale J S, Tatchell G M, Overwintering adaptations in the lettuce root aphid *Pemphigus bursarius* (L.). *J. Insect Physiol.*, 2000, **46**: 353~363.
- [11] Hanson S M, Craig G B Jr. Relationship between cold hardiness and supercooling point in *Aedes albopictus* eggs. *J. American Mosq. Control Assoc.*, 1995, **11**: 35~38.
- [12] Jia Q X (贾沁贤), Chen L J (陈立靖), Zuo Z Y (左中原). Comparison of cold tolerance among different *artemia* strains. *Acta Zoologica Sinica* (in Chinese) (动物学报), 1999, **45**(1): 32~39.
- [13] Jiang X F (江幸福), Luo L Z (罗礼智), Li K B (李克斌), *et al.* A study on the cold hardiness of the beet armyworm *Protoparva exigua*. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 2001, **10**(10): 1575~1582.
- [14] Milonas P G, Savopoulou-Soultani M. Cold hardiness in diapause and non-diapause larvae of the summer fruit

- tortrix, *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Eur. J. Entomol.*, 1996, **96**:183~187.
- [15] Lee R E Jr, Chen C P, Denlinger D L. A rapid cold-hardening process in insects. *Science*, 1987, **238**:1415~1417.
- [16] Keltz J D, Lee R E Jr. Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 1999, **45**:719~726.
- [17] Nedv d O, Lavy D, Verhoef H A. Modeling time-temperature relationship in cold injury and effect of high temperature interruptions on survival in a chill sensitive Collembolan. *Funct. Ecol.*, 1998, **12**:816~824.
- [18] Hanc Z, Nedv d O. Chill injury at alternating temperatures in orchesella cineta (collembola: Entomobryidae) and *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Eur. J. Entomol.*, 1999, **96**:165~168.
- [19] Lee R E Jr, Denlinger D L. Insects at low temperature. Chapman and Hall, New York, 1991.
- [20] Storey K B, Storey J M. Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.*, 1998, **68**:27~84.
- [21] Storey K B, Storey J M. Biochemistry of cryoprotectants in Lee R. E. and Denlinger D. L. ed. *Insects at low temperature* Chapman and Hall, New York, 1991.
- [22] Tsumuki H. An ice-nucleating active fungus isolated from the gut of the ice stem borer, chilo suppressalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Insect. Physiol.*, 1992, **38**:119~125.
- [23] Zachariassen K E. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.*, 1985, **65**:977~832.
- [24] Olsen T M, Duman J G. Maintenance of the super-cooled state in the gut fluid of overwintering pyrochroid beetle larvae, *Dendroides canadensis*; role of ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol. (B)*, 1997, **167**:114~122.
- [25] Olsen T M, Duman J G. Maintenance of the super-cooled state in overwintering pyrochroid beetle larvae, *Dendroides canadensis*; role of hemolymph ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol. (B)*, 1997, **167**:105~113.
- [26] Shimada K. Ice-nucleating activity in the alimentary canal of the freezing-tolerant prepupae of (Hymenoptera: Tenthredinidae). *J. Insect. Physiol.*, 1989, **35**:113~120.
- [27] Strong-Guanderson J M, Lee R E, Lee M R, *et al.* Ingestion of ice nucleating active bacteria increases the supercooling point of the lady beetle *Hippodamia convergens*. *J. Insect Physiol.*, 1990, **33**:153~157.
- [28] Sun F Z (孙福在). Progress on the studies of biological ice nucleation in China. *Scientia Agricultura Sinica* (in Chinese) (中国农业科学), 1996, **39**(5):62~67.
- [29] Zhu H (朱红), Sun F Z (孙福在), Zhang Y X (张永祥). The effects of INA bacteria on the freezing temperature of cotton bollworm. *Scientia Agricultura Sinica* (in Chinese) (中国农业科学), 1994, **27**(6):23~27.
- [30] Ma J F (马巨法), Hu G W (胡国文), Cheng J A (程家安). Effects of ice nucleation active microorganism on insect cold tolerance. *Plant Protection* (in Chinese) (植物保护), 1996, **22**(2):35~38.
- [31] Zachariassen K E, Husby J A. Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature*, 1982, **298**:285~287.
- [32] Duman J G, Wu D W, Olsen T M, *et al.* Thermal-hysteresis proteins. *Adv. Low-Temp. Biol.*, 1993, **2**:131~182.
- [33] Olsen T M, Seass S J, Li N, *et al.* Factors contributing to seasonal increases in inoculative freezing resistance in overwintering firecolored beetle larvae *Dendroides canadensis* (Pyrochroidae). *J. Exp. Bio.*, 1998, **201**:1585~1594.
- [34] Gehrken V. Inoculative freezing and thermal hysteresis in the adult beetles *IPS acuminatus* and *Rhagium inquisitor*. *J. Insect. Physiol.*, 1992, **38**:519~524.
- [35] Graham L A, Liou Y-C, Walker V K, *et al.* Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, 1997, **388**:727~728.
- [36] Andorfer C A, Duman J G. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis*. 2000. *J. Insect Physiol.*, **46**:365~372.
- [37] Li N, Chibber B A K, Castellino F J, *et al.* Mapping of disulfide bridges in antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *Biochemistry*, 1998, **37**:6343~4350.
- [38] Liou Y C, Thibault P, Walker V K, *et al.* A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, 1999, **38**:11415~11424.
- [39] Misener S R, Chen C P, Walker V K. Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 2001, **47**:393~400.
- [40] Goto S G. Expression of *Drosophila* homologue of senescence marker protein-30 during cold acclimation. *J. Insect Physiol.*, 2000, **46**:1111~1120.
- [41] Goto S G. A novel gene that is up-regulated during recovery from cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 2001, **270**:259~264.